

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

**Analyse der zellulären Ca^{2+} -Kationenhomöostase von
Sec61a1^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten aus *M. musculus***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: René Tinschert
geb. am: 29.10.1982 in Kaiserslautern

Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort	5
1.1	Gen- und Proteinsymbolverzeichnis	6
1.2	Verzeichnis chemischer bzw. physikalischer Formelzeichen des Haupttexts	11
2	Zusammenfassung	15
2.1	Zusammenfassung - deutsch	15
2.2	Zusammenfassung - englisch	15
3	Einleitung	16
3.1	Einleitung.....	16
3.1.1	Calcium: Physikochemische Charakteristika	17
3.1.2	Zelluläre Ca ²⁺ -Kationenhomöostase.....	18
3.1.3	Ca ²⁺ -Signale.....	19
3.1.3.1	Temporaler Verlauf am Bsp. des cytosolischen Ca ²⁺ -Signals.....	19
3.1.3.2	Spatiale Begrenzung und spatiotemporale Decodierung des Ca ²⁺ -Signals	21
3.1.3.2.1	Spatiale Begrenzung des Ca ²⁺ -Signals durch Ca ²⁺ -Signalmodulatoren.....	21
3.1.3.2.2	Spatiotemporale Decodierung des Ca ²⁺ -Signals durch Ca ²⁺ -Sensoren.....	24
3.1.4	ER-Ca ²⁺ -Kationenhomöostase.....	26
3.1.5	SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplex	30
3.1.6	HSPA5.....	35
3.2	Zielsetzung.....	38
4	Material und Methodik	40
4.1	Material	40
4.1.1	Tiere.....	40
4.1.2	293 [HEK-293] (ATCC® CRL-1573™).....	40
4.2	Methodik	41
4.2.1	Isolation von Hautfibroblasten aus enthaarten thorakoabdominalen Hautlappen	41
4.2.2	Zellkultur	42
4.2.2.1	Chemikalien/Lösungen/Zellkulturmedien.....	42
4.2.2.1.1	Poly-(S)-Lysinhydrobromidlösung.....	42
4.2.2.1.2	Trypsin-EDTA-Lösung	42
4.2.2.1.3	Phosphatgepufferte Salzlösung	42
4.2.2.1.4	Zellkulturmedien	42
4.2.2.1.4.1	Hautfibroblasten.....	42
4.2.2.1.4.2	293-Zellen.....	42
4.2.2.1.5	Lösungen der Ca ²⁺ -Bildgebung	43
4.2.2.2	Einfrierung, Lagerung und Auftauung der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen	43

4.2.2.3	Kultivierung der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen.....	44
4.2.2.3.1	Hautfibroblasten	44
4.2.2.3.2	293-Zellen	44
4.2.2.4	Ausplattierung der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen zur Ca^{2+} -Bildgebung	45
4.2.3	Ca^{2+} -Bildgebung	45
4.2.3.1	Statistik.....	45
4.2.3.1.1	Induktive Statistik.....	52
4.2.3.1.1.1	Anpassungsmodelle	52
4.2.3.1.1.1.1	Lineares Anpassungsmodell.....	53
4.2.3.1.1.1.1.1	Einfaches lineares Anpassungsmodell.....	54
4.2.3.1.1.1.1.2	Polynomielles Anpassungsmodell.....	54
4.2.3.1.1.1.2	Exponentielles Anpassungsmodell.....	55
4.2.3.1.1.1.3	Logistisches Anpassungsmodell	56
4.2.3.1.1.2	Hypothesentests	57
4.2.3.2	Software (Datenauswertung, Datenrepräsentation).....	57
4.2.3.3	Fluoreszenz.....	57
4.2.3.4	Ca^{2+} -Bildgebungsapparatur	66
4.2.3.4.1	Illuminationssystem.....	66
4.2.3.4.2	Inverses Mikroskop	66
4.2.3.4.3	Halterung mikroskopischer Deckgläser.....	66
4.2.3.4.4	Kamerasystem	66
4.2.3.4.5	Optische Filter	66
4.2.3.4.6	Software zur Kontrolle der Ca^{2+} -Bildgebungsapparatur	66
4.2.3.4.7	Systemeinstellungen.....	67
4.2.3.5	Tunicamycin.....	67
4.2.3.6	Trifluorperazin.....	67
4.2.3.7	Thapsigargin.....	68
4.2.3.8	Ionomycin.....	69
4.2.3.9	Nigericin.....	69
4.2.3.10	Fura-2	70
4.2.3.10.1	Analyse des thapsigargininduzierten Fura-2-Signals zu verschiedenen Zeitpunkten nach Trypsinierung bzw. Ausplattierung der Hautfibroblasten.....	73
4.2.3.10.2	Kalibrierung des Fura-2-Signals.....	76
4.2.3.10.2.1	$K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^2)$ -Bestimmung.....	76
4.2.3.10.2.2	R_{max} -, R_{min} -Bestimmung.....	78
4.2.3.10.2.3	Umrechnung $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ und Bestimmung von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	81

4.2.3.10.3	z_0 - und $\tau vCa_2 +$ (ERL \rightarrow Cyt)-Bestimmung.....	84
4.2.3.11	ER-GCaMP6-150-Konstrukt.....	87
4.2.3.11.1	Transfektion der Hautfibroblasten mit dem <i>ER-GCaMP6-150</i> -Konstrukt	90
4.2.3.11.2	$c(Ca^{2+})_{ERL, frei, b}$ -Bestimmung.....	91
5	Ergebnisse.....	96
5.1	Nernst-Spannung für Ca^{2+} -Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol $U(Ca^{2+})$ und des chemischen Potentials für Ca^{2+} -Kationen über die ER-Membran $\Delta\mu(Ca^{2+})$	97
5.2	Kinetik der $vCa_2 +$ (ERL \rightarrow Cyt)	100
5.2.1	ER-GCaMP6-150-Konstrukt.....	100
5.2.2	Fura-2 - z_0 - und $\tau vCa_2 +$ (ERL \rightarrow Cyt)-Bestimmung.....	115
5.2.2.1	Bestimmung von $a_2(Cyt \rightarrow EZR)$ arithm.....	115
5.2.2.2	z_0 - und $\tau vCa_2 +$ (ERL \rightarrow Cyt)-Bestimmung unter basalen Bedingungen	122
5.2.2.3	z_0 - und $\tau vCa_2 +$ (ERL \rightarrow Cyt)-Bestimmung unter tunicamycininduzierten Kurzzeit- bzw. Langzeit-ER-Streßbedingungen	125
5.3	Analyse des ionomycininduzierten Fura-2-Signals zur Bestimmung der maximalen Menge an aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern mobilisierbaren Ca^{2+} -Kationen.....	132
5.4	Pharmakologische Modulation der $vCa_2 +$ (EMAR \rightarrow Cyt) durch Trifluoperazin	135
6	Diskussion	140
7	Abbildungsverzeichnis.....	144
8	Tabellenverzeichnis.....	146
9	Abkürzungsverzeichnis.....	149
10	Literaturverzeichnis.....	155
11	Danksagung	162
12	Lebenslauf.....	163

1 Vorwort

Zum Zweck der Einheitlichkeit und vor allem der eindeutigen Identifizierbarkeit von Genen und Proteinen, wurde in dieser Arbeit viel Wert daraufgelegt, die standardisierte Nomenklatur zu verwenden. D.h. Gennamen wurden mit den entsprechenden Symbolen in *kursiven Schriftzeichen* belegt, wie sie bspw. in der Datenbank Mouse Genome Informatics (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>) für *M. musculus* oder der Datenbank HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (<https://www.genenames.org/>) für *H. sapiens* hinterlegt sind (Nur *E6* und *E7* in 4.1.2 sind viralen Ursprungs, weshalb für diese die dafür empfohlene Nomenklatur greift). Folglich entsprechen die verwendeten Proteinsymbole den Gensymbolen, mit dem Unterschied, dass nicht kursive Schriftzeichen verwendet werden. Bei *M. musculus* setzen sich die Symbole aus einem ersten großen Schriftzeichen und den folgenden kleinen Schriftzeichen zusammen, bei *H. sapiens* nur aus großen Schriftzeichen (Nur *MraY* und *WecA* in 4.2.3.5 sind prokaryotischen Ursprungs, weshalb für diese die dafür empfohlene Nomenklatur greift). Z.B.:

- *M. musculus*: *Sec61a1* (Gen), Sec61a1 (Protein)
- *H. sapiens*: *SEC61A1* (Gen), SEC61A1 (Protein)

Proteinvollnahmen richten sich nach den Empfehlungen des UniProt-Konsortiums und sind unter diesen in der Datenbank UniProt (<https://www.uniprot.org/>) hinterlegt. Da im Text nur die Gen- und Proteinsymbole verwendet werden, sind im Anschluß an das Vorwort (1.1) die verwendeten Gensymbole mit entsprechend codiertem Protein sowie die Proteinsymbole mit entsprechendem Proteinvollnamen direkt gelistet. Da es in der Einleitung (3.1) um allgemeine Prinzipien der zellulären Ca^{2+} -Homöostase bzw. des SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplexes und damit assoziierter Proteine geht, wurde sich hier für die Proteinsymbole nach *H. sapiens*-Nomenklatur entschieden. Was die Enzymnomenklatur betrifft, so wurde die deutsche Übersetzung des empfohlenen Namens oder des systematischen Namens gemäß dem Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) verwendet. Die Enzymnamen wurden der Datenbank BRENDA The Comprehensive Enzyme Information System (<https://www.brenda-enzymes.org/>) entnommen und zur eindeutigen Identifizierung mit der entsprechenden Enzyme Commission-Nummer (EC-Nummer) versehen. Molekulare Mechanismen wurden zum Teil in kompakten einfachen Schemata organisiert, die Schritt für Schritt durch den entsprechenden Prozeß führen (Ähnliches gilt für die Schemata, die eine Datenprozessierung beinhalten). Formelzeichen, die einen Ca^{2+} -Flux repräsentieren, sind zur eindeutigen Kennzeichnung stets mit der Richtungsangabe des Ca^{2+} -Flux versehen (z.B. Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$). Formelzeichen in geschweiften Klammern kennzeichnen wie üblich den Zahlenwert einer chemischen bzw. physikalischen Größe (z.B. $\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}$, nur der Zahlenwert, aber nicht die Einheit wird logarithmiert). Formelzeichen für Gehaltsangaben (in dieser Arbeit: Stoffmengenkonzentration c , Massenkonzentration β , Volumenanteil ϕ) richten sich wie üblich nach DIN 1310 des Deutschen Instituts für Normung (DIN). Auch die chemischen bzw. physikalischen Formelzeichen sind im

Anschluß an das Vorwort direkt gelistet (1.2). Die mathematische Notation richtet sich nach der gängigen deutschsprachigen Literatur zur Analysis usw. (z.B. Analysislehrbuchreihe von Otto Forster (Springer-Verlag)). Mathematische Symbole bzw. mathematische Standardformulierungen, wie sie im Rahmen der mathematischen Grundausbildung eines jeden naturwissenschaftlich-technischen Studiengangs vermittelt werden, z.B. die Darstellung einer Funktion als „ $f: X \rightarrow Y, x \mapsto f(x) = y$ “, werden als bekannt vorausgesetzt und daher nicht weiter erläutert.

1.1 Gen- und Proteinsymbolverzeichnis

Gensymbol	Codiertes Protein
<i>E6</i>	E6 (Protein E6)
<i>E7</i>	E7 (Protein E7)
<i>IL2</i>	IL2 (Interleukin-2)
<i>Sec61a1</i>	Sec61a1 (Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1)

Proteinsymbol	Empfohlener Proteinname nach UniProt-Konsortium
ACT	Actin
ABCB1	ATP-dependent translocase ABCB1
ADRA1A	Alpha-1A adrenergic receptor
ASPH	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase
ATP1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
ATP1A2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2
ATP1A3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3
ATP1A4	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-4
Atp2a	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
ATP2A	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
ATP2A1	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1
ATP2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
ATP2A3	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3
ATP2B	Plasma membrane calcium-transporting ATPase
ATP2B1	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
ATP2B2	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2
ATP2B3	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3
ATP2B4	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
ATP2C	Calcium-transporting ATPase type 2C
ATP2C1	Calcium-transporting ATPase type 2C member 1
ATP2C2	Calcium-transporting ATPase type 2C member 2
CACNA1	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-1

CACNA1A	Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A
CACNA1B	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B
CACNA1C	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C
CACNA1D	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D
CACNA1E	Voltage-dependent R-type calcium channel subunit alpha-1E
CACNA1F	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1F
CACNA1G	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G
CACNA1H	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H
CACNA1I	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1I
CACNA1S	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1S
CALB1	Calbindin
CALB2	Calretinin
CALM	Calmodulin
CALM1	Calmodulin-1
CALR	Calreticulin
CALU	Calumenin
CALY	Neuron-specific vesicular protein calcyon
CAMK2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II
CAMLG	Calcium signal-modulating cyclophilin ligand
CAPN	Calpain
CASQ1	Calsequestrin-1
CASQ2	Calsequestrin-2
CASR	Extracellular calcium-sensing receptor
CDH	Cadherin
CYP1A2	Cytochrome P450 1A2
DNAJ	DnaJ homolog
DNAJB11	DnaJ homolog subfamily B member 11
DNAJC3	DnaJ homolog subfamily C member 3
DPAGT1	UDP-N-acetylglucosamine--dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminephosphotransferase
DRD2	D(2) dopamine receptor
EIF2AK3	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3
ERN1	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1
ESYT1	Extended synaptotagmin-1
ESYT2	Extended synaptotagmin-2

ESYT3	Extended synaptotagmin-3
FICD	Protein adenylyltransferase FICD
FOLH1	Glutamate carboxypeptidase 2
GET1	Guided entry of tail-anchored proteins factor 1
GET3	ATPase GET3
GET4	Golgi to ER traffic protein 4 homolog
HRC	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein
HSP90B1	Endoplasmin
Hspa5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1
Ins	Insulin
ITPR	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
ITPR1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1
ITPR2	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2
ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcu	Calcium uniporter protein, mitochondrial
MraY	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase
MRLN	Myoregulin
MYH	Myosin
NCS1	Neuronal calcium sensor 1
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFATC	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic
NFKB	Nuclear factor NF-kappa-B
NUCB1	Nucleobindin-1
NUCB2	Nucleobindin-2
OCM	Oncomodulin-1
ORAI1	Calcium release-activated calcium channel protein 1
ORAI2	Protein orai-2

ORAI3	Protein orai-3
P4HB	Protein disulfide-isomerase
PDIA2	Protein disulfide-isomerase A2
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3
PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4
PDIA5	Protein disulfide-isomerase A5
PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6
PHK	Phosphorylase b kinase
PIGK	GPI-anchor transamidase
PIGT	GPI transamidase component PIG-T
PLN	Cardiac phospholamban
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
PPP3C	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit
PPP3R	Calcineurin subunit B
PRKA	cAMP-dependent protein kinase
PRKC	Protein kinase C
PTH	Parathyroid hormone
PVALB	Parvalbumin alpha
RYR	Ryanodine receptor
RYR1	Ryanodine receptor 1
RYR2	Ryanodine receptor 2
RYR3	Ryanodine receptor 3
S100A4	Protein S100-A4
S100G	Protein S100-G
SDF4	45 kDa calcium-binding protein
SEC11A	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A
SEC11C	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C
SEC61A	Protein transport protein Sec61 subunit alpha
SEC61B	Protein transport protein Sec61 subunit beta
SEC61G	Protein transport protein Sec61 subunit gamma
SEC62	Translocation protein SEC62
SEC63	Translocation protein SEC63 homolog
SGTA	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha
SIL1	Nucleotide exchange factor SIL1

SLC8A1	Sodium/calcium exchanger 1
SLC8A2	Sodium/calcium exchanger 2
SLC8A3	Sodium/calcium exchanger 3
SLN	Sarcolipin
SMIM6	Small integral membrane protein 6SRL Sarcalumenin
SRP	Signal recognition particle
SRPR	Signal recognition particle receptor
SSR1	Translocon-associated protein subunit alpha
SSR2	Translocon-associated protein subunit beta
SSR3	Translocon-associated protein subunit gamma
SSR4	Translocon-associated protein subunit delta
STIM	Stromal interaction molecule
STIM1	Stromal interaction molecule 1
STIM2	Stromal interaction molecule 2
STRIT1	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase regulator DWORF
STT3A	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
STT3B	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B
SYT	Synaptotagmin
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TMBIM6	Bax inhibitor 1
TMCO1	Calcium load-activated calcium channel
TNNC1	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles
TNNC2	Troponin C, skeletal muscle
TNNI	Troponin I
TNNT	Troponin T
TRPV5	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
TRPV6	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6
UBL4A	Ubiquitin-like protein 4A
UGT1A4	UDP-glucuronosyltransferase 1A4
Vdac	Voltage-dependent anion-selective channel protein
WecA	Undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase

1.2 Verzeichnis chemischer bzw. physikalischer Formelzeichen des Haupttexts

Formelzeichen in Gleichungen (insbesondere bei einmaliger Verwendung im Text), Tabellen und Schemata sind aus Übersichtsgründen, auch bei Wiederholung, eigens dort stets erklärt.

Formelzeichen	Bedeutung
$\beta(\text{Poly-(S)-Lysin-hydrobromid})$	Massenkonzentration des Poly-(S)-Lysinhydrobromids
$\beta(\text{Tun})$	Massenkonzentration des Tunicamycins
γ_{H}	Hauptleitfähigkeit
γ_{N}	Nebenleitfähigkeit
$\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$	chemisches Potential für Ca^{2+} -Kationen über die ER-Membran
$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	Änderung der cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
ΔF	Änderung der Fluoreszenzintensität
ΔF_{10}	Änderung der Fluoreszenzintensität bei $t = 10 \text{ s}$
$\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$	Kinetik der passiven Abnahme der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ -Ratio
$\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv, tot dem}}$	total demaskierte Kinetik der passiven Abnahme der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ -Ratio
$\Delta G^{0\prime}$	freie Standardenthalpie ($\text{pH} = 7,0$)
$\Delta G_{\text{Transfer}}^0(\text{H}_2\text{O} - \text{Dampf})$	freie Standardenthalpie des Transfers von der wäßrigen Phase in die Dampfphase
λ_{ex} -Bereich	Exzitationswellenlängenbereich
λ_{ex1} -Bereich	Exzitationswellenlängenbereich 1
λ_{ex2} -Bereich	Exzitationswellenlängenbereich 2
λ_{em} -Bereich	Emissionswellenlängenbereich
τ_1	Abklingzeitkonstante 1
τ_2	Abklingzeitkonstante 2
$\tau_{\text{v}_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}$	Abklingzeitkonstante der 1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen nach der Zeit \cong Abklingzeitkonstante des Ca^{2+} -Flux vom Cytosol in den Extrazellulärraum
$\tau_{\text{v}_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$	Abklingzeitkonstante der 1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen nach der Zeit \cong Abklingzeitkonstante des passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol
$\varphi(\text{DMSO})$	Volumenanteil des DMSO

A	Area (Fläche)
$A_r(20\text{Ca})$	relative Masse des ^{20}Ca -Isotops
$\bar{A}_{\text{arithm, gew}}$	gewichteter arithmetischer Mittelwert der relativen Masse
$c([\text{CaEGTA}]^{2-})$	Stoffmengenkonzentration der $[\text{CaEGTA}]^{2-}$ -Komplexe
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	basale cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	maximale cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Ca}^{2+}\text{-Efflux, initial}}$	initiale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen zu Beginn des Ca^{2+} -Efflux
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Ca}^{2+}\text{-Influx, initial}}$	initiale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen zu Beginn des Ca^{2+} -Influx
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$	ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$	basale ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}}$	extrazelluläre Stoffmengenkonzentration der Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR, frei}}$	extrazelluläre Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}$	Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei, b}}$	basale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei, gewünscht}}$	gewünschte Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{EGTA}^{4-})$	Stoffmengenkonzentration der EGTA^{4-} -Anionen
$c(\text{EGTA})_{\text{EZR}}$	extrazelluläre Stoffmengenkonzentration des EGTA
$c(\text{Fura-2-AM})$	Stoffmengenkonzentration des Fura-2-AM
$c(\text{HSPA5})_{\text{ERL}}$	ER-luminale Stoffmengenkonzentration des HSPA5
$c(\text{Iono})$	Stoffmengenkonzentration des Ionomycins
$c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}}$	cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien K^+ -Kationen
$c(\text{K}^+)_{\text{ERL, frei}}$	ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien K^+ -Kationen
$c(\text{Na}^+)_{\text{Cyt, frei}}$	cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Na^+ -Kationen
$c(\text{Na}^+)_{\text{ERL, frei}}$	ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Na^+ -Kationen
$c(\text{Nig})$	Stoffmengenkonzentration des Nigericins
$c(\text{TFP})$	Stoffmengenkonzentration des Trifluorperazins
$c(\text{Thap})$	Stoffmengenkonzentration des Thapsigargin
$D(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt}}$	cytosolischer Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient
$D(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL}}$	ER-luminaler Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient
f	Frequenz
f(Bild)	Bildfrequenz
F	Fluoreszenzintensität
F_{10}	Fluoreszenzintensität bei $t = 10$ s
F_b	basale Fluoreszenzintensität

F_{\max}	maximale Fluoreszenzintensität
F_{\min}	minimale Fluoreszenzintensität
$F_{\min 1}$	minimale Fluoreszenzintensität 1
$F_{\min 2}$	minimale Fluoreszenzintensität 2
G	Leitwert
$k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}}$ (arithm (SGM(5,25))) (SGM(5,100))	Proportionalitätsfaktor (Transportgeschwindigkeitsfaktor) (siehe Schema 14: Datenprozessierung 2)
k_{an}	Geschwindigkeitskonstante der Bindungsreaktion des Komplexes
k_{ab}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion des Komplexes
K_d	Dissoziationskonstante
$K_d([CaFura-2]^{2-})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $[CaFura-2]^{2-} \rightleftharpoons Fura-2^4 + Ca^{2+}$
$K_d([MgFura-2]^{2-})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $[MgFura-2]^{2-} \rightleftharpoons Fura-2^4 + Mg^{2+}$
$K_d([ZnFura-2]^{2-})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $[ZnFura-2]^{2-} \rightleftharpoons Fura-2^4 + Zn^{2+}$
$K_d(Pr, Ca^{2+})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $Protein/Ca^{2+} \rightleftharpoons Protein + Ca^{2+}$
$K_{d1}(Pr, Ca^{2+})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $Protein/Ca^{2+} \rightleftharpoons Protein + Ca^{2+}$ der funktionellen Ca^{2+} -Bindestelle 1
$K_{d2}(Pr, Ca^{2+})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $Protein/Ca^{2+} \rightleftharpoons Protein + Ca^{2+}$ der funktionellen Ca^{2+} -Bindestelle 2
$K_{d3}(Pr, Ca^{2+})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $Protein/Ca^{2+} \rightleftharpoons Protein + Ca^{2+}$ der funktionellen Ca^{2+} -Bindestelle 3
$K_{d4}(Pr, Ca^{2+})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $Protein/Ca^{2+} \rightleftharpoons Protein + Ca^{2+}$ der funktionellen Ca^{2+} -Bindestelle 4
$K_d(STIM1, Ca^{2+})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $STIM1/Ca^{2+} \rightleftharpoons STIM1 + Ca^{2+}$
$K_d(STIM2, Ca^{2+})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $STIM2/Ca^{2+} \rightleftharpoons STIM2 + Ca^{2+}$
$K_{d,app}([CaFura-2]^{2-})$	apparente Dissoziationskonstante der Reaktion $[CaFura-2]^{2-} \rightleftharpoons Fura-2^4 + Ca^{2+}$
$P_{Ca^{2+}}$	Ca^{2+} -Kationenpermeabilität
P_{Na^+}	Na^+ -Kationenpermeabilität
R	Fluoreszenzintensitätsratio
R_b	basale Fluoreszenzintensitätsratio
R_{\max}	maximale Fluoreszenzintensitätsratio (nur $[CaFura-2]^{2-}$ -Komplexe)
R_{\min}	minimale Fluoreszenzintensitätsratio (keine $[CaFura-2]^{2-}$ -Komplexe)
$t_{0,5}$	Halbwertszeit

t_{37}	Zeit, in der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ ($t = 1$ min, Thapsigarginapplikation) $\cong 100$ % auf $\frac{1}{e}$ % $\approx 36,8$ % abfällt
t_{50}	Zeit, in der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ ($t = 1$ min, Thapsigarginapplikation) $\cong 100$ % auf 50 % abfällt
t_{90}	Zeit, in der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ ($t = 1$ min, Thapsigarginapplikation) $\cong 100$ % auf 90 % abfällt
$U(\text{Ca}^{2+})$	Nernst-Spannung für Ca^{2+} -Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol
$U(\text{ERM})$	ER-Membran-Spannung
$U(\text{K}^+)$	Nernst-Spannung für K^+ -Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol
$U(\text{Na}^+)$	Nernst-Spannung für Na^+ -Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol
$v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})$	1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} - Kationen nach der Zeit $\cong \text{Ca}^{2+}$ -Flux vom Cytosol in den Extrazellulärraum
$v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})$	1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} - Kationen nach der Zeit $\cong \text{Ca}^{2+}$ -Flux vom endomembranabgegrenzten Raum ins Cytosol
$v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}$	maximale 1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen nach der Zeit \cong maximaler Ca^{2+} -Flux vom endomembranabgegrenzten Raum ins Cytosol
$v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$	1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} - Kationen nach der Zeit $\cong \text{Ca}^{2+}$ -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol

2 Zusammenfassung

2.1 Zusammenfassung - deutsch

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Ca^{2+} -Kationenhomöostase in primären *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten aus *Mus musculus* durch Ca^{2+} -bildgebende Verfahren analysiert. Auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums kam ein reversibel Ca^{2+} -schaltbares Fluoreszenzprotein, das GCaMP6-150-Konstrukt, zum Einsatz und im Cytosol der synthetisierte fluoreszierende, ratiometrische Ca^{2+} -Indikator Fura-2. Besonderes Augenmerk galt dem passiven Ca^{2+} -Flux vom Lumen des endoplasmatischen Retikulums ins Cytosol im Hinblick auf seine Kinetik. Unter basalen Bedingungen verhielten sich die Zellen mit *Sec61a1*^{Y344H}-Fehlsinmmutation nicht anders als die Wildtypzellen, wurden diese jedoch über einen Zeitraum von 24 Stunden mit dem endoplasmatisches Retikulum-Streßor Tunicamycin behandelt, so wurde die zelluläre Ca^{2+} -Kationenhomöostase nicht mehr gewahrt. Die *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten zeigten eine massive Zunahme des passiven Ca^{2+} -Flux vom Lumen des endoplasmatischen Retikulums ins Cytosol bei gleichzeitig beschleunigter Kinetik. Da die *Sec61a1*^{Y344H}-Fehlsinmmutation in *Mus musculus* unter anderem mit Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert ist, eine gestörte Insulinbiosynthese und -sekretion jedoch nicht nachgewiesen wurde (Lloyd, Wheeler *et al.*, 2010), wird auf Grund der in dieser Arbeit vorliegenden Daten eine mögliche Störung der zellulären Ca^{2+} -Kationenhomöostase als alternativer/zusätzlicher pathobiophysikalischer Mechanismus des *Sec61*^{Y344H}-assoziierten Diabetes mellitus Typ 1 in *Mus musculus* vorgeschlagen.

2.2 Zusammenfassung - englisch

Analysis of the cellular Ca^{2+} homeostasis of
Sec61a1^{Y344H/Y344H}-skin fibroblasts from *M.*

In this doctoral thesis the cellular Ca^{2+} homeostasis in primary *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-skin fibroblasts of *Mus musculus* was analysed by Ca^{2+} imaging. Two fluorescent Ca^{2+} indicators were used, the fluorescent protein GCaMP6-150 which was directed to the lumen of the endoplasmic reticulum and the synthetic ratiometric Ca^{2+} dye Fura-2 which was directed to the cytosol. Especially the passive Ca^{2+} flux directed from the lumen of the endoplasmic reticulum to the cytosol was analysed according to its kinetics. There was no difference between *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-skin fibroblasts and wildtype cells under basal conditions. After treatment with tunicamycin for 24 hours the Ca^{2+} homeostasis was disturbed. The *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-skin fibroblasts showed a massive rise in the passive Ca^{2+} flux with faster kinetics. In *Mus musculus* the *Sec61a1*^{Y344H}-missense mutation leads to type 1 diabetes mellitus among other things (Lloyd, Wheeler *et al.*, 2010). Since insulin biosynthesis and secretion was normal by virtue of the results of this thesis altered Ca^{2+} homeostasis may be an alternative/additional pathobiophysical mechanism that leads to type 1 diabetes mellitus in these mice.

3 Einleitung

3.1 Einleitung

Ein kleines Gedankenexperiment: Was würde passieren, könnte man mit einem Fingerschnippen sämtliche Ca^{2+} -Kationen aus einem menschlichen oder tierischen Körper verschwinden lassen? Nun, die restliche Masse würde (makroskopisch und von außen betrachtet) zunächst einmal in sich zusammenfallen. Es verbliebe ein gallertartiger Haufen. Der Grund ist, dass Ca^{2+} -Kationen in Form von Pentacalciumhydroxidtriphosphat $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, besser bekannt als Hydroxylapatit, bis zu 70 % der Masse der menschlichen Knochen ausmacht (Agbeboh, Oladele *et al.*, 2020). Selbst die Zähne wären wohl größtenteils aufgelöst, denn die härteste Substanz des menschlichen Körpers, der Zahnschmelz (> 97 % anorganische Substanzen), aber auch das Dentin, an deren Aufbau das Hydroxylapatit beteiligt ist, hätten keinen Halt mehr (Schiebler und Korf, 2007). Würde man etwas von all dem spüren? Wohl kaum, denn (mikroskopisch und von innen betrachtet) sind Ca^{2+} -Kationen u.a. an der Informationsaufnahme, -weiterleitung, -verarbeitung und -integration im peripheren und zentralen Nervensystem beteiligt:

- elektrosekretorische Kopplung zwischen Aktionspotential und Exocytose von Neurotransmittern, -peptiden usw. an der Präsynapse, sprich an der Kontaktstelle zwischen Neuron und Neuron (Sudhof, 2004)
- Generation exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSS) und damit exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (EPSP) durch Ca^{2+} -permeable ionotrope Rezeptoren (ligandenregulierte Ionenkanäle) (Brini, Cali *et al.*, 2014; Pankratov, Lalo *et al.*, 2003)

Eine Motorik wäre wahrscheinlich nicht wahrzunehmen: Ca^{2+} -Kationen sind für die stimulomechanische Kopplung zwischen Stimulus (z.B. Aktionspotential oder 1. Botenstoff) und Kontraktion glatter und quergestreifter Myocyten verantwortlich, alle Myocyten wären relaxiert, das Herz stände still (Bravo-Sagua, Parra *et al.*, 2020). Zellverbände wie Epithelien würden zerfallen, da die Ca^{2+} -kationenabhängige Zell-Zell-Adhäsion über CDHs gestört wäre (van Roy und Berx, 2008). Die Hämostase bliebe aus, da Ca^{2+} -Kationen (früher als Faktor IV bezeichnet) an der sekundären Hämostase (Blutgerinnung) beteiligt sind (Norris, 2003). Die Ca^{2+} -kationenabhängige stimulo-transkriptionische Kopplung bliebe aus u.v.a.m. (Puri, 2020). Kurzum: Ohne Ca^{2+} -Kationen kein Leben auf Erden! Da sich in dieser Arbeit alles um dieses lebenswichtige Kation dreht, genauer gesagt, um die Analyse der zellulären Ca^{2+} -Kationenhomöostase von *Sec61a1^{Y344H/Y344H}*-Hautfibroblasten aus *M. musculus* (wie dem schlichten Titel zu entnehmen ist), und zwar im Hinblick auf den passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol, wurde im Folgenden zunächst auf die physikochemischen Charakteristika des Calciums eingegangen. Es folgen ein Überblick über zelluläre Ca^{2+} -Signale und die ER- Ca^{2+} -Kationenhomöostase. Im Anschluß geht es um den SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplex (dessen Komponente Sec61a1 in den analysierten Hautfibroblasten von *M. musculus* auf Grund der homozygoten *Sec61a1^{Y344H}*-Fehlsinmmutation eine Y344H-(S)-AS-Substitution aufweist (genaueres dazu in 3.2) und dessen Interaktionspartner HSPA5.

3.1.1 Calcium: Physikochemische Charakteristika

Calcium (Ca) steht in Gruppe 2, Periode 4 (s-Block-Element) des Langperiodensystems der Elemente und gehört zu den Erdalkalimetallen (MII) (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). Tab. 1 gibt einen Überblick über die natürlich und künstlich vorkommenden Ca-Isotope.

Tab. 1: Natürlich und künstlich vorkommende Ca-Isotope (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017)

${}^A_Z\text{Ca}$: A = Z + N; A Massenzahl (Nukleonenzahl), Z Ordnungszahl (Kernladungszahl), N Neutronenzahl. $A_r({}_{20}^X\text{Ca})$ relative Masse des ${}_{20}^X\text{Ca}$ -Isotops, I Kernspinzquantenzahl, \vec{m} magnetisches Dipolmoment, $w_{20}^X\text{Ca}$ Massenanteil des ${}_{20}^X\text{Ca}$ -Isotops, $t_{0,5}$ Halbwertszeit, β^- β^- -Strahler.

Ca-Isotop	$w_{20}^X\text{Ca}$	$A_r({}_{20}^X\text{Ca})$	Nukleus		$t_{0,5}$ (d)
			I (\hbar)	\vec{m} (A m ²)	
${}^{40}_{20}\text{Ca}$	0,96941	39,962 591	0		stabil
${}^{42}_{20}\text{Ca}$	0,00647	41,958622	0		stabil
${}^{43}_{20}\text{Ca}$	0,00135	42,958 770	$\frac{7}{2}$	-1,3173	stabil
${}^{44}_{20}\text{Ca}$	0,02086	43,955 485	0		stabil
${}^{45}_{20}\text{Ca}$	künstl.				165 (β^-)
${}^{46}_{20}\text{Ca}$	0,00004	45,953 690	0		stabil
${}^{47}_{20}\text{Ca}$	künstl.				4,53 (β^-)
${}^{48}_{20}\text{Ca}$	0,00187	47,952 532	0		stabil

Somit ergibt sich der gewichtete arithmetische Mittelwert der natürlichen ${}_{20}^X\text{Ca}$ -Isotope zu $\overline{A}_{r\text{arithm,gew}}(\text{natürliche } {}_{20}^X\text{Ca-Isotope}) = A_r({}_{20}\text{Ca}) \approx 40,073$. Ca besitzt im Grundzustand die Elektronenkonfiguration $1s^22s^22p^63s^23p^64s^2$, kurz [Ar] $4s^2$ (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). Tab. 2 sind die 1., 2. und 3. Ionisierungsenergie (IE), die Elektronenaffinität (EA) und die Elektronegativitäten (EN) nach Allred-Rochow bzw. Pauling zu entnehmen.

Tab. 2: Ca-Elementeigenschaften (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017)

1., 2. und 3. IE 1., 2. und 3. Ionisierungsenergie, EA Elektronenaffinität, EN (Allred-Rochow/Pauling) Elektronegativität nach Allred-Rochow bzw. Pauling.

Ca-Elementeigenschaft	Zahlenwert
1. IE (kJ mol ⁻¹)	589,62
2. IE (kJ mol ⁻¹)	1145,28
3. IE (kJ mol ⁻¹)	4910,14
EA (kJ mol ⁻¹)	28,95
EN (Allred-Rochow/Pauling)	1,04/1,0

Tab. 3 listet den Metallatomradius bei einer Koordinationszahl von 12 und die effektiven Ionenradii bei Koordinationszahl = 6/7/8/9/10/12 auf.

Tab. 3: Metallatomradius (r für Ca) und effektive Ionenradii (r für Ca²⁺) bei entsprechenden Koordinationszahlen (KZ) (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017)

	KZ	r (nm)
Ca	12	0,197
Ca ²⁺	6	0,114
Ca ²⁺	7	0,120
Ca ²⁺	8	0,126
Ca ²⁺	9	0,132
Ca ²⁺	10	0,137
Ca ²⁺	12	0,148

Tab. 4 gibt die Standardelektrodenpotentialdifferenz (E^0) in wässriger Lösung bei pH = 0 und pH = 14 für das Redoxsystem Ca/Ca^{2+} wieder.

Tab. 4: Standardelektrodenpotentialdifferenz (E^0) in wässriger Lösung bei pH = 0 und pH = 14 für das Redoxsystem Ca/Ca^{2+} (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017)

Standardelektrodenpotentialdifferenz (wässrige Lösung)		
	$E^0(\text{pH} = 0)$ (V)	$E^0(\text{pH} = 14)$ (V)
Ca/Ca^{2+}	-2,84	-3,02

Tab. 5 listet Eigenschaften des hydratisierten Ca^{2+} -Kations auf, auf die nochmals im Rahmen der Ca^{2+} -Permeabilität von SEC61A in 3.1.5 eingegangen wird.

Tab. 5: Eigenschaften des hydratisierten Ca^{2+} -Kations (Schwenk und Rode, 2004)

mittlere $\text{KZ}_{1/2}$ mittlere Koordinationszahl der 1./2. Hydrathülle, $r_{1/2}$ Radius des Ca^{2+} -Kations mit 1./2. Hydrathülle, mittlere t_1 mittlere Verweildauer eines H_2O -Moleküls in der 1. Hydrathülle, $\Delta H_{\text{Hydr, m}}$ molare Hydratisierungsenthalpie.

Eigenschaft	Zahlenwert
mittlere KZ_1	7,89 bis 8,04
r_1 (nm)	0,248
mittlere t_1 (s)	ca. 10^{-11}
mittlere KZ_2	18,0 bis 18,9
r_2 (nm)	0,453 bis 0,468
$\Delta H_{\text{Hydr, m}}$ (kJ mol^{-1})	-1778,2 bis -1757,3

In biologischen Systemen, insbesondere Proteinen, weisen Ca^{2+} -Kationen ein flexibles Koordinationsverhalten mit variablen Längen bzw. Winkeln der koordinativen Bindungen auf (Carafoli und Krebs, 2016). Hauptsächlich werden sie pentagonal bipyramidal (Koordinationspolyeder) von 7 O-Atomen (z.B. $-\text{COO}^-$ -Grp., neutrales O-Atom) koordinativ gebunden. Diese Eigenschaft, an Stellen mit vorgeformter irregulärer Koordinationsgeometrie zu binden, prädestiniert Ca^{2+} -Kationen und nicht bspw. Mg^{2+} -Kationen, die ein unflexibles Koordinationsverhalten zeigen, als Signalkationen bzw. allosterische Effektoren in biologischen Systemen (Carafoli und Krebs, 2016). Typische Ca^{2+} -Bindestellen in Proteinen sind die EF-Hand (E- α -Helix-Schleife-F- α -Helix) und die C2-Domäne (antiparalleles β -Faltblatt) (Bagur und Hajnóczky, 2017; Elies, Yáñez *et al.*, 2020; Rizo und Südhof, 1998). Ausgerüstet mit dem Wissen um die physikochemischen Charakteristika, insbesondere um die Bindung in biologischen Systemen, geht es jetzt auf die nächst höhere Ebene über, die zelluläre Ca^{2+} -Kationenhomöostase.

3.1.2 Zelluläre Ca^{2+} -Kationenhomöostase

Alle Zellen sind mit einem sog. Ca^{2+} -Signalwerkzeugkasten ausgestattet. Verstanden wird darunter die Gesamtheit aller an Ca^{2+} -Signalen und der zellulären Ca^{2+} -Kationenhomöostase beteiligten Strukturen (Tab. 6) (Schwaller, 2012).

Tab. 6: Zellulärer Ca²⁺-Signalwerkzeugkasten (Schwaller, 2012)
SLC solute carrier.

Transporter
passiv: Ca ²⁺ -permeabler Ionenkanal, Ca ²⁺ -permeable Nichtionenkanalstruktur
primär aktiv: P-Typ-Ca ²⁺ -Transporter (EC 7.2.2.10)
sekundär aktiv: SLC
Enzym (nicht EC 7.2.2.10)
Ca²⁺-Signalmodulator
Ca²⁺-Sensor

Cytosol und endomembranabgegrenzte Räume (EMAR) erhalten somit die für ihre Funktion essentielle c(Ca²⁺)_{frei, b} (Tab. 7) (Bootman und Bultynck, 2020; Barak und Parekh, 2020; Pizzo, Lissandron *et al.*, 2011).

Tab. 7: Kompartimente mit korrespondierender c(Ca²⁺)_{frei, b} (Bootman und Bultynck, 2020; Barak und Parekh, 2020; Pizzo, Lissandron *et al.*, 2011)

c(Ca²⁺)_{frei, b} basale Stoffmengenkonzentration der freien Ca²⁺-Kationen. ⁽¹⁾ Spannweite ca. 0,020 µmol l⁻¹ bis 0,300 µmol l⁻¹ (Nakajima, Harada *et al.*, 1993; Westerblad und Allen, 1994; Helmchen, Imoto *et al.*, 1996; Kennedy und Thomas, 1996; Maravall, Mainen *et al.*, 2000). ⁽²⁾ Spannweite ca. 1 µmol l⁻¹ bis 5000 µmol l⁻¹ (Bygrave und Benedetti, 1996; Meldolesi und Pozzan, 1998).

Kompartiment	c(Ca²⁺)_{frei, b} (µmol l⁻¹)
Extrazellulärraum (EZR)	ca. 1200 bis 1500
Cytosol (Cyt)	ca. 0,100 ⁽¹⁾
Nucleoplasma	ca. 0,100
perinucleärer Raum	ca. 500
endoplasmatisches Retikulum (ER)	ca. 500 ⁽²⁾
Golgi-Apparat	
cis-Golgi-Netzwerk	ca. 250
mediales Golgi-Netzwerk	ca. 190
trans-Golgi-Netzwerk	ca. 130
sekretorische Granule	ca. 70
sekretorisches Vesikel	ca. 80
Lysosom	ca. 500
Peroxisom	ca. 0,100 bis 2,000
Mitochondrium	ca. 0,100

Wie mit diesem Ca²⁺-Signalwerkzeugkasten Ca²⁺-Signale generiert, moduliert und decodiert werden, ist dem nächsten Abschnitt zu entnehmen.

3.1.3 Ca²⁺-Signale

3.1.3.1 Temporaler Verlauf am Bsp. des cytosolischen Ca²⁺-Signals

Schema 1 gibt den typischen temporalen Verlauf eines cytosolischen Ca²⁺-Signals wieder, wie er in den meisten Zellen zu finden ist.

Schema 1 : Temporaler Verlauf eines cytosolischen Ca^{2+} -Signals

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}} \approx 0,100 \mu\text{mol l}^{-1} \Rightarrow$ mechanischer/thermischer/elektrischer/stofflicher (1. Botenstoff-vermittelter) Stimulus $\Rightarrow \text{Ca}^{2+}$ -Flux vom Extrazellulärraum bzw. vom endomembranabgegrenzten Raum ins Cytosol steigt $\Rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ steigt global auf ca. $0,500 \mu\text{mol l}^{-1}$ bis $1,000 \mu\text{mol l}^{-1}$, lokal auf $> 100 \mu\text{mol l}^{-1} \Rightarrow$ 3 Ereignisse treten simultan ein: 1. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ wird erreicht, 2. eine negative Rückkopplung (z.B. CDI) setzt ein (Ca^{2+} -Flux vom Extrazellulärraum bzw. vom endomembranabgegrenzten Raum ins Cytosol nimmt ab) und 3. Ca^{2+} -Exportmechanismen werden aktiviert (Ca^{2+} -Flux vom Cytosol in den Extrazellulärraum bzw. den endomembranabgegrenzten Raum steigt) $\Rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ sinkt \Rightarrow Inhibierung der Ca^{2+} -Exportmechanismen (Ca^{2+} -Flux vom Cytosol in den Extrazellulärraum bzw. den endomembranabgegrenzten Raum nimmt ab) $\Rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}} \approx 0,100 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Bootman und Bultynck, 2020; Lewis, 2020)

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	basale cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	maximale cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
CDI	Ca^{2+} -abhängige Inhibierung

Ca^{2+} -Flux vom Extrazellulärraum bzw. dem endomembranabgegrenzten Raum ins Cytosol

Für den passiven Transport werden in erster Linie Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle in Zell- und Endomembranen genutzt. TRPV5/6 ($P_{\text{Ca}^{2+}} : P_{\text{Na}^+} > 100$), CACNA1(S/C/D/F (L-Typ), A/B/E (P/Q / N / R-Typ), G/H/I (T-Typ)) ($P_{\text{Ca}^{2+}} : P_{\text{Na}^+} > 1000$) und ORAI1/2/3 ($P_{\text{Ca}^{2+}} : P_{\text{Na}^+} \approx 2000$) sind als Ca^{2+} -spezifisch einzuordnen (Vangeel und Voets, 2019; Sather und McCleskey, 2003; Lewis, 2020).

Ca^{2+} -Flux vom Cytosol in den Extrazellulärraum bzw. den endomembranabgegrenzten Raum

Für den primär aktiven Transport kommen P-Typ- Ca^{2+} -Transporter (EC 7.2.2.10) zum Einsatz. Diese katalysieren via ATP-Hydrolyse ($\Delta G^{0'} = -30,6 \text{ kJ mol}^{-1}$) den vektoriellen Ca^{2+} -Transport über Zell- und Endomembranen, wobei sie einen chemischen Ca^{2+} -Gradienten über diese Membranen (Ca^{2+} -Konzentrationsgradient, dessen elektrochemische Triebkraft für den Ca^{2+} -Flux vom Extrazellulärraum bzw. dem endomembranabgegrenzten Raum ins Cytosol genutzt wird) generieren und die $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ senken (vergl. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei, b}}$ -Werte der Kompartimente vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ in Tab. 7) (Chen, Sitsel *et al.*, 2020; Heinrich, Müller *et al.*, 2014). Unterschieden werden ATP2B1/2/3/4 (P2B-Typ, Zellmembran), ATP2A1/2/3 (P2A-Typ, ER-Membran) und ATP2C1/2 (P2A-Typ, Golgi-Apparat-Membran, Synaptisches-Vesikel-Membran). Die Strukturen sind ähnlich, alle besitzen eine Actuator-domäne (A, cytosolisch) zur Regulierung des H_2O -Molekülzugangs für die Dephosphorylierung, eine

Nucleotidbindedomäne (N, cytosolisch) mit KGA-Motiv zur ATP-Bindung, eine Phosphorylierungsdomäne (P, cytosolisch) mit konserviertem DKTGT-Motiv (cis-Autophosphorylierung von D) und eine Transmembrandomäne mit 10 transmembranären α -Helices M1 bis M10, die eine (ATP2B1/2/3/4, ATP2C1/2) bzw. zwei (ATP2A1/2/3) Ca^{2+} -Bindestelle(n) (I, II) besitzen, N- und C-terminales Ende liegen im Cytosol (Chen, Sitsel *et al.*, 2020). Dem sekundär aktiven Transport dienen die Solute Carrier (SLC) wie der SLC8A1/2/3, der einen $\text{Ca}^{2+}/3 \text{ Na}^+$ -Antiport katalysiert und dabei den Na^+ -Konzentrationsgradienten über die Zellmembran nutzt, der durch ATP1A1/2/3/4 (Na^+/K^+ -austauschende ATPase (EC 7.2.2.13)) generiert wird (Gilbert, Demydenko *et al.*, 2020).

3.1.3.2 Spatiale Begrenzung und spatiotemporale Decodierung des Ca^{2+} -Signals

Ca^{2+} -bindende Proteine können grob in 2 Gruppen eingeteilt werden: Die spatiale Begrenzung des Ca^{2+} -Signals erfolgt durch Ca^{2+} -Signalmodulatoren, die spatiotemporale Decodierung des Ca^{2+} -Signals durch Ca^{2+} -Sensoren. Ca^{2+} -Signalmodulatoren besitzen eine niedrige Affinität zu und eine hohe Kapazität für Ca^{2+} -Kationen und vollziehen relativ geringe Konformationsänderungen nach Ca^{2+} -Bindung, Ca^{2+} -Sensoren besitzen eine hohe Affinität zu und eine niedrige Kapazität für Ca^{2+} -Kationen und vollziehen relativ große Konformationsänderungen nach Ca^{2+} -Bindung (Wang, Agellon *et al.*, 2019).

Tab. 8 faßt die Eigenschaften zusammen.

Tab. 8: Eigenschaften von Ca^{2+} -Signalmodulatoren und Ca^{2+} -Sensoren (Wang, Agellon *et al.*, 2019)

$K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ Dissoziationskonstante der Reaktion $\text{Protein}/\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Protein} + \text{Ca}^{2+}$, $\frac{n(\text{Ca}^{2+})}{n(\text{Pr})}$ Kapazität, Grad(KÄ) Grad der Konformationsänderung. Pr Protein. \uparrow hoch, \downarrow niedrig.

	$K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$	$\frac{n(\text{Ca}^{2+})}{n(\text{Pr})}$	Grad(KÄ)
Ca^{2+} -Signalmodulator	\uparrow	\uparrow	\downarrow
Ca^{2+} -Sensor	\downarrow	\downarrow	\uparrow

Ca^{2+} -Signalmodulator- und Ca^{2+} -Sensorfunktion sind nicht strikt zu trennen, so können Ca^{2+} -bindende Proteine nur eine aber auch beide Funktionen gleichzeitig (verschiedene Proteindomänen im selben Protein) wahrnehmen und können bez. Höhe von $K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$, Kapazität und Grad der Konformationsänderung verschiedene Abstufungen aufweisen.

3.1.3.2.1 Spatiale Begrenzung des Ca^{2+} -Signals durch Ca^{2+} -Signalmodulatoren

Tab. 9 und Tab. 10 geben Eigenschaften ausgewählter Ca^{2+} -bindender Proteine wieder, die in Cytosol, ER und Golgi-Apparat u.a. als Ca^{2+} -Signalmodulatoren fungieren und für die spatiale Begrenzung von Ca^{2+} -Signalen verantwortlich sind.

Tab. 9: Eigenschaften ausgewählter Ca²⁺-bindender Proteine des Cytosols, die u.a. als Ca²⁺-Signalmodulatoren fungieren (Schwaller, 2020)

$K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ Dissoziationskonstante der Reaktion $\text{Protein}/\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Protein} + \text{Ca}^{2+}$, $K_{d, \text{app}}(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ apparente Dissoziationskonstante der Reaktion $\text{Protein}/\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Protein} + \text{Ca}^{2+}$. Sind mehrere $K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ für ein Ca²⁺-bindendes Protein angegeben, so entsprechen sie verschiedenen funktionellen Ca²⁺-Bindestellen: K_{d1} Dissoziationskonstante der funktionellen Ca²⁺-Bindestelle 1, K_{d2} Dissoziationskonstante der funktionellen Ca²⁺-Bindestelle 2. $c(\text{Mg}^{2+})_{\text{frei}}$ Stoffmengenkonzentration der freien Mg²⁺-Kationen, $D(\text{Pr})$ Protein-Diffusionskoeffizient, n_H Hill-Koeffizient. BS Bindestelle, Pr Protein.

Cytosol						
Protein	Anzahl funktioneller Ca ²⁺ -BS	spezifische Ca ²⁺ -BS / gemischte Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -BS	$K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ (nmol l ⁻¹)	$K_{d, \text{app}}(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ (nmol l ⁻¹) bei $c(\text{Mg}^{2+})_{\text{frei}} = 0,5-1,0 \text{ mmol l}^{-1}$	$D(\text{Pr})$ (μm ² s ⁻¹)	Kooperativität n_H
PVALB	2	0 / 2	4-9	150-250	12-43	nein
OCM	2	1 / 1	$K_{d1} \approx 590-780$ (spezifisch), $K_{d2} \approx 42-45$ (gemischt)	230-310	-	ja(?)
S100G	2	2 / 0	$K_{d1} \approx 200-500$, $K_{d2} \approx 60-300$	-	-	ja
CALB1	4	4 / 0	$K_{d1} \approx 180-240$, $K_{d2} \approx 410-510$, $K_{d1} : K_{d2} = 2 : 2$ oder $3 : 1$	-	26 bis > 100	ja 1,1-1,2
CALB2	5	5 / 0	68-36000	-	ca. 25	ja 1,3-1,9

Tab. 10: Eigenschaften ausgewählter Ca²⁺-bindender Proteine des ER (endoplasmatisches Retikulum) und Golgi-Apparats, die u.a. als Ca²⁺-Signalmodulatoren fungieren (Wang, Agellon *et al.*, 2019)

$K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ Dissoziationskonstante der Reaktion $\text{Protein}/\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Protein} + \text{Ca}^{2+}$. Sind mehrere $K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ für ein Ca²⁺-bindendes Protein angegeben, so entsprechen sie verschiedenen funktionellen Ca²⁺-Bindestellen: K_{d1} Dissoziationskonstante der funktionellen Ca²⁺-Bindestelle 1 ($K_{d1}(\emptyset \text{ A-nt})$ Dissoziationskonstante der funktionellen Ca²⁺-Bindestelle 1 in Abwesenheit eines Adeninucleotids), K_{d2} Dissoziationskonstante der funktionellen Ca²⁺-Bindestelle 2 ($K_{d2}(\text{ADP})$ Dissoziationskonstante der funktionellen Ca²⁺-Bindestelle 2 in Anwesenheit von ADP), $K_{d3}(\text{ATP})$ Dissoziationskonstante der funktionellen Ca²⁺-Bindestelle 3 in Anwesenheit von ATP. $\frac{n(\text{Ca}^{2+})}{n(\text{Pr})}$ Kapazität, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EMAR, total}}$ totale Stoffmengenkonzentration der Ca²⁺-Kationen im endomembranabgegrenzten Raum. Pr Protein.

Protein	Enzymname	EC-Nummer	$K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ (mmol l ⁻¹)	$\frac{n(\text{Ca}^{2+})}{n(\text{Pr})}$	% $(c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EMAR, total}})$
ER					
CALR	-	-	P-Domäne ca. 0,001, C-Domäne ca. 2,000	P-Domäne 1, C-Domäne 20-30	ca. 50
CASQ1/2	-	-	1	40-50	-
HSP90B1	-	-	$K_{d1} \approx 0,002$, $K_{d2} \approx 0,600$	16-18	-
SRL	-	-	0,300	30-35	-
HRC	-	-	1,9	ca. 200 nmol mg ⁻¹ (Einheit!)	-

HSPA5	Nicht-Chaperonin-molekulares Chaperon-ATPase	3.6.4.10	$K_{d1}(\emptyset \text{ A-nt}) \approx 0,700,$ $K_{d2}(\text{ADP}) \approx 0,0008,$ $K_{d3}(\text{ATP}) \approx 0,018$	1-2	ca. 25
P4HB / PDIA2/3/4/5/6	Proteindisulfid-isomerase	5.3.4.1	ca. 4,7	ca. 19	-
ASPH	Peptidaspartat- β -dioxxygenase	1.14.11.16	ca. 0,217	ca. 21	-
Golgi-Apparat					
NUCB1/2	-	-	ca. 0,0066	ca. 1,1	-
CALU	-	-	ca. 1,6	-	-
SDF4	-	-	-	-	-

Zu erkennen ist, dass die cytosolische $K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ kleiner ist, als die $K_d(\text{Pr}, \text{Ca}^{2+})$ in ER bzw. Golgi-

Apparat. Folglich ist mit $v_{\text{Diff}}(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = \frac{l_{\text{Diff}}(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}}{t_{\text{Diff}}(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}} = \frac{\leq 0,1 \mu\text{m}}{\text{ca.} 0,5 \mu\text{s}} \approx 0,2 \text{ m s}^{-1}$ (Gl. 1)

($v_{\text{Diff}}(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ cytosolische Diffusionsgeschwindigkeit der freien Ca^{2+} -Kationen, $l_{\text{Diff}}(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ cytosolische Diffusionsstrecke der freien Ca^{2+} -Kationen, $t_{\text{Diff}}(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ cytosolische Diffusionszeit der freien Ca^{2+} -Kationen): ($D(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt}} < 16 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$) < ($D(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL}} \text{ ca. } 60 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$) (Petersen, Courjaret *et al.*, 2017; Gilabert, 2020; Wu und Bers, 2006). Die höhere Diffusionsgeschwindigkeit der freien Ca^{2+} -Kationen im ER-Lumen relativ zum Cytosol wird von Zellen zum Ca^{2+} -Tunneln (Schema 2) verwendet, ein Mechanismus, um Ca^{2+} -Kationen schnell und effizient von A nach B zu transportieren (Petersen, Courjaret *et al.*, 2017; Barak und Parekh, 2020).

Schema 2: Ca^{2+} -Tunneln

Ca^{2+} -Flux vom Extrazellulärraum ins Cytosol am Punkt A der Zelle \Rightarrow Ca^{2+} -Flux vom Cytosol ins ER-Lumen am Punkt A der Zelle \Rightarrow relativ schnelle Diffusion der Ca^{2+} -Kationen durchs ER-Lumen von Punkt A nach Punkt B \Rightarrow Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol am Punkt B der Zelle \Rightarrow Ca^{2+} -induzierter Effekt am Punkt B der Zelle bzw. Ca^{2+} -Flux vom Cytosol in den Extrazellulärraum am Punkt B der Zelle (Petersen, Courjaret *et al.*, 2017; Barak und Parekh, 2020)

> 95 % der Ca^{2+} -Kationen werden nach Permeation durch CACNA1 in einem Abstand von 10 nm bis 50 nm vom Austrittspunkt des Ionenkanals von Ca^{2+} -Signalmodulatoren gebunden (Gabso, Neher *et al.*, 1997; Gilabert, 2020). So entsteht im Raum unmittelbar um die Ionenaustrittsstelle eines Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals eine Ca^{2+} -Nanodomäne (Ca^{2+} -Mikrodomäne = Überlappung ≥ 2 Ca^{2+} -Nanodomänen), wobei sich die $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ im Diffusionsbereich ausgehend von der Ionenaustrittsstelle des Ionenkanals am einfachsten durch

$$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = \frac{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EZR} \rightarrow \text{Cyt})}{2 \pi D(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt}} x} \operatorname{erfc} \frac{l}{2 \sqrt{D(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt}} t_{\text{offen}}}} \quad (\text{Gl. 2})$$

- $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen (mol l^{-1})
- $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EZR} \rightarrow \text{Cyt})$ 1. Ableitung der Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen nach der Zeit ($\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$) \cong Ca^{2+} -Flux vom Extrazellulärraum ins Cytosol (durch 1 offenen Ca^{2+} -permeablen Ionenkanal)
- $D(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt}}$ cytosolischer Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
- l Distanz zur Ionenaustrittsstelle des Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals (m)
- t_{offen} Offenzeit des Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals (s)

beschreiben läßt (ungefähre Werte können Tab. 11 entnommen werden) (Wang und Augustine, 2014).

Tab. 11: Charakteristika einer Ca^{2+} -Nanodomäne (ungefähre Werte) (Wang und Augustine, 2014)

l Distanz zur Ionenaustrittsstelle des Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen, t_{offen} Offenzeit des Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals (Gl. 2).

Ca ²⁺ -Nanodomäne		
l (nm)	c(Ca ²⁺) _{Cyt, frei} (μmol l ⁻¹) ~ l ⁻¹	t _{offen} (μs) ~ l ²
10	100	1
100	10	100
1000	1	10000

Weiter sind Ca^{2+} -Nanodomänen vom Gating, d.h. Aktivitätsregelung, Geschlossenzeit, Offenzeit (Offenwahrscheinlichkeit) und Ionenkanalleitfähigkeit (kanonische Ionenkanalleitfähigkeit (Hauptleitfähigkeit, Nebenleitfähigkeit), nichtkanonische Leitfähigkeit (?)), sowie der elektrochemischen Triebkraft für Ca^{2+} -Kationen über die Membran abhängig (Gilabert, 2020). Der Grad an Komplexität zur Ausbildung einer Ca^{2+} -Nanodomäne nimmt zu, wenn zusätzlich die mit dem Ca^{2+} -permeablen Ionenkanal assoziierten Proteine betrachtet werden. So sind bspw. CACNA1 (P/Q-, N-, R-Typ) in ihrer Nanoumgebung in ein Netzwerk aus ca. 200 verschiedenen Proteinen eingebettet (Müller, Haupt *et al.*, 2010). Ca^{2+} -Nanodomänen bilden die fundamentale Einheit des intrazellulären Ca^{2+} -Signalnetzwerks und somit für die Ausbildung intrazellulärer komplexer spatiotemporaler Ca^{2+} -Signalmuster (z.B. Ca^{2+} -Oszillation, Ca^{2+} -Welle, Ca^{2+} -Funke, Ca^{2+} -Blitz, Ca^{2+} -Ripple, Ca^{2+} -Hauch, globaler $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ -Anstieg (Narayanan, Adebisi *et al.*, 2012)) (Wieder, Fink *et al.*, 2020). Allen Ca^{2+} -Signalmodulatoren gemein ist, dass sie die $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})$ und die $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EMAR})$ senken („ Ca^{2+} -Signalmodulator“ (Schwaller, 2020)). Zudem zeigt PVALB die Eigenschaft, eine zeitabhängige $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ -Abnahme mit einfachem exponentiellen Graphenverlauf in eine solche mit zweifach exponentiellem Graphenverlauf zu transformieren (Schwaller, 2020).

3.1.3.2.2 Spatiotemporale Decodierung des Ca^{2+} -Signals durch Ca^{2+} -Sensoren

Die Decodierung des spatialen Profils eines Ca^{2+} -Signals erfolgt durch spezifische subzelluläre Lokalisation der Ca^{2+} -Sensoren (Verankerung durch Gerüstproteine, Diffusionsfalle für Membranproteine durch Cytoskelett des Zellcortex usw.), denn wie oben erwähnt, finden sich bspw. in der Nanoumgebung von CACNA1 (P/Q-, N-, R-Typ) ca. 200 verschiedene Proteine, zu denen auch der

Ca²⁺-Sensor SYT gehört (Müller, Haupt *et al.*, 2010). Ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung von NFAT, die durch Ca²⁺-Nanodomänen des ORAI, nicht aber durch globale Ca²⁺-Oszillationen erfolgt (stimulotranskriptionale Kopplung) (Barak und Parekh, 2020). Die Decodierung der Amplitude eines Ca²⁺-Signals erfolgt über die Anzahl spezifischer(/gemischter) Ca²⁺/(Mg²⁺)-Bindestellen mit gleicher oder unterschiedlicher K_d(Pr, Ca²⁺), bspw. wäre bei $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ein Ca²⁺-Sensor 1 mit einer Ca²⁺-Bindestelle (K_{d1}(Pr, Ca²⁺) = 1 μmol l⁻¹) zu 50 %, ein Ca²⁺-Sensor 2 mit vier gleichen Ca²⁺-Bindestellen (K_{d1}(Pr, Ca²⁺) = K_{d2}(Pr, Ca²⁺) = K_{d3}(Pr, Ca²⁺) = K_{d4}(Pr, Ca²⁺) = 1 μmol l⁻¹) nur zu 10 % gesättigt (Barak und Parekh, 2020). Hier führt die Erhöhung identischer Ca²⁺-Bindestellen zu einer Änderung der Ca²⁺-Abhängigkeit des Ca²⁺-Sensors, indem die Beziehung zwischen $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ und fraktionaler Sättigung moduliert wird (Barak und Parekh, 2020). Die Decodierung der Frequenz von Ca²⁺-Oszillationen ist komplizierter und Gegenstand laufender Forschung. Bspw. besitzen CAMK2 (Ca/CALM-abhängige Proteinkinase (EC 2.7.11.17)), MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase (EC 2.7.11.24)), PHK (Phosphorylasekinase (EC 2.7.11.19)), CAPN (Calpain (EC 3.4.22.-)), PRKC (Proteinkinase C (EC 2.7.11.13)), NFAT und NFκB Ca²⁺-oszillationsfrequenzdecodierende Eigenschaften (Smedler und Uhlén, 2014). Als Beispiel diene CAMK2 (Schema 3).

Schema 3: Spatiotemporale Ca²⁺-Signaldecodierung durch den Ca²⁺-Sensor CAMK2

Autoinhibierung der Ser/Thr-Proteinkinasedomäne durch regulatorisches Segment (Pseudosubstratmechanismus) ⇒ stimulusinduzierter $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ -Anstieg ⇒ allosterische Aktivierung durch Bindung von Ca²⁺/CALM an CALM-bindendes Element des regulatorischen Segments ⇒ aktivierende trans-Autophosphorylierung eines Thr-Rests im N-terminalen Bereich des regulatorischen Segments via Substrateinfangmechanismus (Ca²⁺/CALM-Ultrasensitivität) ⇒ Ca²⁺/CALM-unabhängige konstitutive Aktivität (Autonomie) und ca. 10000-fache Steigerung der Affinität zu Ca²⁺/CALM (Ca²⁺/CALM-Einfang, d.h. hohe CAMK2-Aktivität auch bei $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ unter dem Schwellenwert, der zur CAMK2-Aktivierung benötigt wird) bilden die Gedächtnisfunktion für ein vergangenes CAMK2-aktivierendes Ca²⁺-Signal (⇒ Abdissoziation von Ca²⁺/CALM ⇒ inhibierende cis-Autophosphorylierung zweier Thr-Reste im CALM-bindenden Element des regulatorischen Segments ⇒ Inhibierung erneuter Ca²⁺/CALM-Bindung) ⇒ Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung (Bhattacharyya, Karandur *et al.*, 2020)

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$

cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca²⁺-Kationen

Die Decodierung der Frequenz der Ca²⁺-Oszillationen erfolgt hier durch positive Kooperativität und Ca²⁺/CALM-Einfang. Bei $f < 1 \text{ s}^{-1}$ erfolgt eine vollständige Dissoziation von CAMK2 und Ca²⁺/CALM und damit die CAMK2-Inaktivierung im Interstimulusintervall (Ruhezustand zwischen 2 Ca²⁺-

Signalen). Bei $f > 10 \text{ s}^{-1}$ erfolgt eine partielle Dissoziation von CAMK2 und $\text{Ca}^{2+}/\text{CALM}$ mit kumulativer Akkumulation von $\text{Ca}^{2+}/\text{CALM}/\text{CAMK2}$ -Komplexen und partieller CAMK2-Aktivität im Interstimulusintervall (Gedächtnisfunktion für vergangene CAMK2-aktivierende Ca^{2+} -Signale bei hohen Frequenzen) (Bhattacharyya, Karandur *et al.*, 2020). Tab. 12 gibt einen kleinen Überblick über wichtige Proteine mit Ca^{2+} -Sensormotiv und korrespondierender Funktion.

Tab. 12: Ausgewählte Proteine mit Ca^{2+} -Sensormotiv und korrespondierender Funktion samt übergeordneten Prozeß in Klammern (Chavez-Abiega, Mos *et al.*, 2020; Wolfes und Dean, 2020; Gauthier und Wollheim, 2008; Li und Hwang, 2015; Li, Jia *et al.*, 2009; Roy und Cyert, 2020; Müller und Rao, 2010; Halling, Liebeskind *et al.*, 2016; Burgoyne, Helassa *et al.*, 2019; Boeckel und Ehrlich, 2018; Prole und Taylor, 2019; Santulli, Lewis *et al.*, 2018)

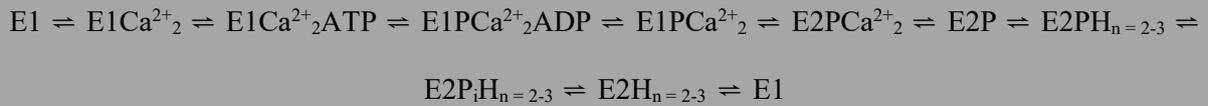
G_s heterotrimeres G-Protein Typ s, $G_{i/o}$ heterotrimeres G-Protein Typ i/o, $G_{q/11}$ heterotrimeres G-Protein Typ q/11, $G_{12/13}$ heterotrimeres G-Protein Typ 12/13, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR, frei}}$ Änderung der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR, frei}}$.

Protein (Anmerkung)	Funktion (übergeordneter Prozeß)
CASR (GPCR, $G_s/G_{i/o}/G_{q/11}/G_{12/13}$ -gekoppelt)	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR, frei}}$ -Detektion (Regulation der extrazellulären Ca^{2+} -Kationenhomöostase u.a. via PTH)
SYT	stimulosekretorische Kopplung von Stimulus (z.B. Aktionspotential, 1. Botenstoff) und regulierter Exocytose von synaptischem/sekretorischem Vesikel (Sekretion von z.B. Neurotransmittern (Neuron) oder Hormonen (endokrine Zelle))
TNNC1/2 (TNNC/TNNI/TNNT-Komplex)	stimulomechanische Kopplung von Stimulus und ACT-MYH-Wechselwirkung (Myocytkontraktion)
PPP3R (PPP3R/PPP3C-Komplex, PPP3C: Protein-Ser/Thr-phosphatase (EC 3.1.3.16))	stimulotranskriptionale Kopplung von Stimulus und Transkription (z.B. klonale Expansion durch NFATC-induzierte <i>IL2</i> -Genexpression)
CALM	allosterischer Effektor (diverse, > 300 Zielproteine)
NCS1	allosterischer Effektor (diverse, z.B. Regulation von Exocytose, Axonwachstum)
ITPR1/2/3	Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol (cytosolisches Ca^{2+} -Signal, zelluläre Signaltransduktion)
RYR1/2/3	Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol (cytosolisches Ca^{2+} -Signal, zelluläre Signaltransduktion)

3.1.4 ER- Ca^{2+} -Kationenhomöostase

ATP2A1/2/3, jene Struktur durch deren Inhibition durch Thapsigargin in dieser Arbeit der passive Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol demaskiert wurde (siehe auch 4.2.3.7), generiert die hohe $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ von ca. $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Spannweite ca. $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ bis $5000 \mu\text{mol l}^{-1}$) (Chen, Sitsel *et al.*, 2020; Bootman und Bultynck, 2020; Bygrave und Benedetti, 1996). Via ATP-Hydrolyse ($\Delta G^{0\prime} = -30,6 \text{ kJ mol}^{-1}$) wird ein vektorieller 2 $\text{Ca}^{2+}/2-3 \text{ H}^+$ -Antiport katalysiert (Schema 4) (Ravishankar, Pedersen *et al.*, 2020; Meldolesi und Pozzan, 1998; Chen, Sitsel *et al.*, 2020; Heinrich, Müller *et al.*, 2014).

Schema 4: ATP2A-Reaktionszyklus



(Ravishankar, Pedersen *et al.*, 2020; Meldolesi und Pozzan, 1998; Chen, Sitsel *et al.*, 2020)

E1	ATP2A-Zustand E1
E2	ATP2A-Zustand E2
E1P	ATP2A-Zustand E1, phosphoryliert
E2P	ATP2A-Zustand E2, phosphoryliert

Die zwei Ca²⁺-Bindestellen I und II werden von M5, M6 und M8 (I, Koordinationszahl = 7 (5 ATP2A, 2 H₂O)) bzw. M4 und M5 (II, Koordinationszahl = 7 (7 ATP2A)) gebildet (Møller, Olesen *et al.*, 2010). *In vitro* beträgt die Transportrate unter optimalen Bedingungen bei c(Ca²⁺)_{frei} = 1 μmol l⁻¹ ca. 150-200 nmol Ca²⁺ mg⁻¹ ATP2A (generierter Ca²⁺-Konzentrationsgradient ca. 40000 : 1), *in cellulo* ca. 35-45 nmol Ca²⁺ mg⁻¹ ATP2A (generierter Ca²⁺-Konzentrationsgradient ca. 5000 : 1) (Møller, Olesen *et al.*, 2010). Die Regulation der ATP2A erfolgt u.a. durch die Typ 2-Transmembranproteine PLN (allosterischer Inhibitor, glatter/quergestreifter Myocyt), SLN (allosterischer Inhibitor, quergestreifter Myocyt), MRLN (allosterischer Inhibitor), SMIM6 (allosterischer Inhibitor) und STRIT1 (allosterischer Aktivator), die alle ein konserviertes LFXXF-Motiv im Transmembranbereich besitzen und vermutlich alle die gleiche Regulatorbindestelle an ATP2A nutzen (Chen, Sitsel *et al.*, 2020). Gut untersucht ist die Regulation via PLN (Schema 5).

Schema 5: ATP2A-Regulation via PLN

PLN-Pentamer (PLN mehr im T-Zustand als im R-Zustand) ⇔ PLN-Monomer (PLN mehr im T-Zustand als im R-Zustand) ⇔ PLN-Monomer-Bindung inhibiert ATP2A (gebundenes PLN im T- oder R-Zustand), die K_d(ATP2A, Ca²⁺) nimmt ab ⇔ Ser-Phosphorylierung von PLN via PRKA (cAMP-abhängige Proteinkinase (EC 2.7.11.11)) ⇔ ATP2A-gebundenes PLN wird in den B-Zustand versetzt, in dem es an ATP2A gebunden bleibt, jedoch nicht mehr inhibierend wirkt (Gustavsson, Verardi *et al.*, 2013; Chen, Sitsel *et al.*, 2020)

T-Zustand	gespannter Zustand (T tensed)
R-Zustand	entspannter Zustand (R relaxed)
B-Zustand	gebundener, nicht inhibierender Zustand
K _d (ATP2A, Ca ²⁺)	Dissoziationskonstante der Reaktion ATP2A/Ca ²⁺ ⇔ ATP2A + Ca ²⁺

Aus dem ATP2A-generierten Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten (ER-Lumen \rightarrow Cyt-gerichtete chemische Triebkraft) und der damit einhergehenden Nernst-Spannung für das Ca^{2+} -Kation (ER-Lumen \rightarrow Cyt-gerichteten elektrischen Triebkraft)

$$U(\text{Ca}^{2+}) = \frac{k_B T}{z(\text{Ca}^{2+})e} \log_e \frac{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}}{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}} = \frac{k_B T}{2e} \log_e \frac{500 \mu\text{mol l}^{-1}}{0,100 \mu\text{mol l}^{-1}} \approx 113,8 \text{ mV (Gl. 3)}$$

$U(\text{Ca}^{2+})$	Nernst-Spannung (Ca^{2+}) (mV)
k_B	Boltzmann-Konstante $1,380649 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
T	thermodynamische Temperatur (K), $T = 310,15 \text{ K}$
$z(\text{Ca}^{2+})$	Valenz/Wertigkeit (Ca^{2+}) = +2
e	Elementarladung $1,602176634 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ($\text{C} = \text{A s}$)
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$	ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)

resultiert bei einer ER-Membran-Spannung von

$$U(\text{ERM}) \approx U(\text{K}^+) = \frac{k_B T}{z(\text{K}^+)e} \log_e \frac{c(\text{K}^+)_{\text{ERL, frei}}}{c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}}} = \frac{k_B T}{e} \log_e \frac{155 \text{ mmol l}^{-1}}{155 \text{ mmol l}^{-1}} = 0 \text{ mV (Gl. 4)}$$

$U(\text{ERM})$	ER-Membran-Spannung (mV)
$U(\text{K}^+)$	Nernst-Spannung (K^+) (mV)
k_B	Boltzmann-Konstante $1,380649 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
T	thermodynamische Temperatur (K), $T = 310,15 \text{ K}$
$z(\text{K}^+)$	Valenz/Wertigkeit (K^+) = +1
e	Elementarladung $1,602176634 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ($\text{C} = \text{A s}$)
$c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}}$	cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien K^+ -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
$c(\text{K}^+)_{\text{ERL, frei}}$	ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien K^+ -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)

die ER-Lumen \rightarrow Cyt-gerichtete elektrochemische Triebkraft des Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol (Chen, Sitsel *et al.*, 2020; Hille, 2001; Bootman und Bultynck, 2020; Lam und Galione, 2013). Molekulare Korrelate des Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol sind Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle (ITPR1/2/3, RYR1/2/3, TMCO1) und Ca^{2+} -permeable Nichtionenkanalstrukturen (TMBIM6, SEC61A) beteiligt (Carreras-Sureda, Pihán *et al.*, 2018; Lang, Pfeffer *et al.*, 2017). Ca^{2+} -Kationen des Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol gelangen nur partiell wieder zurück ins ER-Lumen (ca. 70 % bis 90 % im Cardiomyocyt) (Chen, Sitsel *et al.*, 2020). Zum Ausgleich des Verlusts existiert der speicheroperierende Ca^{2+} -Eintritt (SOCE) (Schema 6), bei dem die Ca^{2+} -Sensoren STIM1 und STIM2 Änderungen der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ detektieren. Mit $K_d(\text{STIM1}, \text{Ca}^{2+}) \approx 200 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $K_d(\text{STIM2}, \text{Ca}^{2+}) \approx 500 \mu\text{mol l}^{-1}$ detektiert STIM1 größere Änderungen der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ (bzw. indirekt höhere Ligandenkonzentrationen im Extrazellulärraum beim IICR) und STIM2 kleinere Änderungen der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ (bzw. indirekt niedrigere Ligandenkonzentrationen im Extrazellulärraum beim IICR) (Lewis, 2020).

Schema 6: Speicheroperierender Ca^{2+} -Eintritt (SOCE)

STIM-Autoinhibierung durch Wechselwirkung zwischen CC1 und CAD/SOAR (ein Ca^{2+} -Kation an cEF gebunden) \Rightarrow Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol z.B. durch IICR über ITPR oder CICR über RYR und/oder ITPR \Rightarrow $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ sinkt unter Schwellenwert \Rightarrow Abdissoziation des einen Ca^{2+} -Kations von cEF \Rightarrow STIM-Konformationsänderung mit Aufhebung der Wechselwirkung zwischen CC1 und CAD/SOAR und konsekutiver STIM-Extension \Rightarrow STIM-Oligomerisierung via SAM, TM und CC1 \Rightarrow STIM-Translokation zur Zellmembran \Rightarrow Ausbildung der ER-PM-Junktion (= Membrankontaktstelle (MCS) zwischen ER-Membran und Zellmembran (Spalt ca. 10 nm bis 25 nm)), die v.a. durch ESYT1/2/3, STIM1/2 und ORAI1/2/3 ausgebildet wird \Rightarrow Interaktion von CAD/SOAR und ORAI \Rightarrow ORAI-Aktivierung ($\gamma \approx 20$ fS) \Rightarrow Ca^{2+} -Flux vom Extrazellulärraum ins Cytosol (SOCE) \Rightarrow Ca^{2+} -Mikrodomäne \Rightarrow Ca^{2+} -Flux vom Cytosol ins ER-Lumen \Rightarrow $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ steigt über Schwellenwert \Rightarrow Bindung von einem Ca^{2+} -Kation an cEF \Rightarrow STIM-Autoinhibierung durch Wechselwirkung zwischen CC1 und CAD/SOAR (ein Ca^{2+} -Kation an cEF gebunden) (Lewis, 2020; Barak und Parekh, 2020)

γ	Leitfähigkeit
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$	ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
CICR	Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung
IICR	inositol-1,4,5-trisphosphatinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung

STIM-Domänen vom N- zum C-terminalen Ende hin:

cEF	canonical EF hand
SAM	sterile α motif
TM	transmembrane
CC1	coiled coil 1
CAD/SOAR	CRAC activation domain/STIM ORAI activating region

Auch existieren Mechanismen, die eine zu hohe $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ antagonisieren und eine speicherüberladungsinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung (SOICR) induzieren (Schema 7) (Chen, Wang *et al.*, 2014; Yamaguchi, 2020; Wang, Zheng *et al.*, 2016).

Schema 7: Speicherüberladungsinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung (SOICR)

RZR-vermittelte SOICR

RZR im inaktivierten Zustand $\Rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ steigt über Schwellenwert $\Rightarrow \text{Ca}^{2+}$ -Kationbindung an (S)-Glu-Rest in M6 (allosterische Aktivierung), d.h. RZR fungiert als Ca^{2+} -Sensor $\Rightarrow \text{Ca}^{2+}$ -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol $\Rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ sinkt unter Schwellenwert \Rightarrow RZR im inaktivierten Zustand (Chen, Wang *et al.*, 2014; Yamaguchi, 2020)

TMCO1-vermittelte SOICR

TMCO1-Monomer $\Rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ steigt über Schwellenwert \Rightarrow TMCO1-Tetramerisierung zum funktionsfähigen Ionenkanal $\Rightarrow \text{Ca}^{2+}$ -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol $\Rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ sinkt unter Schwellenwert \Rightarrow TMCO1-Tetramerdissoziation \Rightarrow TMCO1-Monomer (Wang, Zheng *et al.*, 2016)

 $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen

M6

Transmembran- α -Helix 6

Wie durch SEC61A der passive Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol vermittelt wird, ist dem nächsten Abschnitt zu entnehmen.

3.1.5 SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplex

Der heterotrimere SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplex der ER-Membran, um den es in dieser Arbeit geht, ist ein Subkomplex des Translokons, einem dynamischen (in Bezug auf die Zusammensetzung aus Untereinheiten) Proteinkomplex, und besteht aus der laterales tor-bildenden Untereinheit SEC61A (ca. $139 \cdot 10^3$ SEC61A1/HeLa-Zelle) und den an diese gebundenen akzessorischen Untereinheit SEC61B (ca. $456 \cdot 10^3$ SEC61B/HeLa-Zelle) und SEC61G (ca. $400 \cdot 10^3$ SEC61G/HeLa-Zelle) mit 1 : 1 : 1-Stöchiometrie (Lang, Nguyen *et al.*, 2019). SEC61B und SEC61G sind Typ 2-Transmembranproteine, die den Schwanzankerproteinen (SA-Protein) angehören (Lang, Pfeffer *et al.*, 2017). Nach vollständiger 80S-ribosomaler Proteinsynthese und hydrolytischer Freisetzung vom 80S-Ribosom erfolgt die Zielfindung der SA-Proteine (411 im *H. sapiens*-Genom codiert) über eine Zielfindungssequenz, die von der Transmembrandomäne und flankierenden Sequenzen (v.a. C-terminale Sequenz (CTS)) gebildet wird (Tab. 13) (Jiang, 2021; Borgese, Coy-Vergara *et al.*, 2019).

Tab. 13: SA-Proteinzielfindung (Jiang, 2021)

Zielfindungssequenz: TMD Transmembrandomäne, CTS C-terminale Sequenz. Endomembran: ERM ER-Membran, GAM Golgi-Apparat-Membran, ÄMM äußere Mitochondrienmembran, PerM Peroxisomenmembran. ↑ hoch, → mittel, ↓ niedrig.

SA-Proteinzielfindung			
TMD		Anzahl positiver Ladungen in CTS	Endomembran
Hydrophobizität	Länge		
→	→	↓	ERM
↑	↑	↓	GAM
↓	↓	↓	ÄMM
→	→	↑	ÄMM, PerM

Für die SA-Proteintranslokation zur und -insertion in die ER-Membran wird u.a. der GET-Weg genutzt (Schema 8) (Borgese, Coy-Vergara *et al.*, 2019).

Schema 8: GET-Weg

cytosolische 80S-ribosomale SA-Proteinsynthese ⇒ hydrolytische SA-Proteinfreisetzung vom 80S-Ribosom ⇒ Bildung des UBL4A/GET4/SGTA/SA-Protein-Präzielfindungskomplexes mit SGTA-Bindung an SA-Protein-Transmembrandomäne ⇒ GET3-Bindung an SA-Protein-Transmembrandomäne (GET3/SA-Protein-Zielfindungskomplex) (GET3: ATPase (EC 3.6.-.-)) ⇒ GET3/SA-Protein-Zielfindungskomplex-Translokation zur ER-Membran ⇒ GET3/SA-Protein-Zielfindungskomplex-Bindung an GET1/CAMLG (GET3-Rezeptor in ER-Membran) ⇒ SA-Proteininsertion in ER-Membran (Borgese, Coy-Vergara *et al.*, 2019)

SA Schwanzankerprotein

Auch existiert ein SRP/SRPR/SEC61A-abhängiger Weg (Casson, McKenna *et al.*, 2017). SEC61B ist Protein-S-Palmitoyliert ((R)-Cys-Rest) und SEC61G besitzt eine 60S-Untereinheit-Bindestelle für das 80S-Ribosom im cytosolischen N-terminalen Ende (Forrester, Hess *et al.*, 2011; Lang, Pfeffer *et al.*, 2017). Das polytope SEC61A besitzt 10 transmembranäre α -Helices (M1 bis M10: N-terminale Hälfte M1 bis M5, C-terminale Hälfte M6 bis M7), von denen M2, M3, M7 und M8 das laterale Tor bilden, N- und C-terminales Ende liegen im Cytosol, das IQ-Motiv im cytosolischen N-terminalen Ende dient der Bindung von Ca^{2+} /CALM, die Verschlußdomäne der Schleife S1 der Besetzung des ER-luminalen Trichters (siehe unten) im geschlossenen inaktivierten Zustand (SEC61A-Inaktivierung), die Schleife S5 der Bindung der Typ 1-TM-Proteine SSR1 und SSR2 des SSR1/2/3/4-Komplexes sowie als Gelenkregion zwischen N- und C-terminaler Hälfte des SEC61A, die Schleifen S6 und S8 der Bindung der 60S-Untereinheit des 80S-Ribosoms und die Schleife S7 der Bindung von HSPA5 (Lang, Pfeffer *et al.*, 2017; Gérard, Hall *et al.*, 2020). SEC61A begrenzt einen sanduhrförmigen Raum mit cytosolischem Trichter, zentraler Konstriktion in der ER-Membranebene aus 6 hydrophoben (S)-AS-Resten der TM-

α -Helices M2, M5, M7 sowie M10 (hydrophober Porenring) und ER-luminalem Trichter (Lang, Nguyen *et al.*, 2019). Die Funktion des SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplexes als dem zentralen Bestandteil des Translokons der ER-Membran besteht in der Proteintranslokation (Cyt \rightarrow ER-Lumen-Proteintransport, Cyt \rightarrow ER-Membran-Proteintransport) und dem passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol (Hauptleitfähigkeit $\gamma_H \approx 165 \text{ pS} \pm 10 \text{ pS}$ mit Porendurchmesser von 0,5 nm bis 0,7 nm, Nebenleitfähigkeit $\gamma_N \approx 733 \text{ pS} \pm 16 \text{ pS}$ mit Porendurchmesser von 1,2 nm bis 1,4 nm) (Nebentätigkeitsprotein) (Lang, Nguyen *et al.*, 2019). Während bzw. unmittelbar nach der Proteintranslokation durch den SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplex kommt es zu co- bzw. posttranslationalen Proteinmodifikationen (Tab. 14) (Ellgaard, McCaul *et al.*, 2016; Gamage und Hendrickson, 2013).

Tab. 14: Ausgewählte co- bzw. posttranslationale Proteinmodifikationen während bzw. unmittelbar nach der Proteintranslokation durch den SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplex (Nach UniProtKB 2021-Einträgen P67812, Q9BY50, P11021, P46977, Q8TCJ2, P07237, Q13087, P30101, P13667, Q14554, Q15084, P23284, Q92643, Q969N2 (Zugriff 09.03.2021) und (Ellgaard, McCaul *et al.*, 2016; Gamage und Hendrickson, 2013))
GPI Glycosylphosphatidylinositol.

Protein	Enzymname	EC-Nummer	Funktion
SEC11A/C	Signalpeptidase I	3.4.21.89	hydrolytische Signalpeptidabspaltung (limitierte Proteolyse)
HSPA5	Nicht-Chaperonin-molekulares Chaperon-ATPase	3.6.4.10	Proteinfaltung
STT3A/B	Dolichyldiphosphooligosaccharid: protein-L-asparagin-N- β -D-oligopolysaccharidotransferase	2.4.99.18	Protein-N-glycosylierung
P4HB / PDIA2/3/4/5/6	Proteindisulfid-isomerase	5.3.4.1	Einführung/Isomerisierung von Disulfidbrücken
PPIB	Peptidylprolin-cis-trans-isomerase	5.2.1.8	(S)-Prolylrest-cis-trans-isomerisierung
PIGK/T	GPI-ankertransamidase	3.-.-.-	Abspaltung der C-terminalen GPI-Signalsequenz und Anhängen eines GPI-Ankers an das neue C-terminale Ende

Nach Beendigung des Cyt \rightarrow ER-Lumen- bzw. Cyt \rightarrow ER-Membran-Proteintransports erfolgt ein passiver Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol via SEC61A (Schema 9) (Lang, Pfeffer *et al.*, 2017).

Schema 9: Passiver Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol via SEC61A

SEC61A im inaktivierten Zustand (laterales Tor geschlossen, Verschlussdomäne von S1 in ER-luminalem Trichter) \Rightarrow Bindung der 60S-Untereinheit des 80S-Ribosoms durch S6 und S8 von SEC61A und dem cytosolischen N-terminalen Ende von SEC61G \Rightarrow Konformationsänderung von S6 und S8 \Rightarrow SEC61A im vorbereiteten (engl. primed) Zustand (laterales Tor geschlossen, Verschlussdomäne von S1 in ER-luminalem Trichter), der Peptidylrestaustrittstunnel der 60S-Untereinheit des 80S-Ribosoms liegt gegenüber dem cytosolischen Trichter von SEC61A \Rightarrow (putatives) SEC61A-Intermediat (laterales Tor offen, Verschlussdomäne von S1 in ER-luminalem Trichter) \Rightarrow Bindung des Signalpeptids bzw. der N-terminalen TM- α -Helix des Peptidylrests an demaskierte hydrophobe Stelle im cytosolischen Trichter \Rightarrow Interkalation des Signalpeptids bzw. der N-terminalen TM- α -Helix zwischen M2 und M7 \Rightarrow M2-Verdrängung \Rightarrow SEC61A im aktivierten Zustand (laterales Tor offen, Verschlussdomäne von S1 aus ER-luminalem Trichter entfernt) \Rightarrow Insertion des naszierenden Peptidylrests (Translationsrate ca. 3 bis 5 (S/R)-AS-Reste s^{-1}) in laterales Tor (\Rightarrow Ausbildung einer Schleifenstruktur des naszierenden Peptidylrests mit eventueller Rückkehr (N-terminales Ende des Signalpeptids zum Cytosol hin orientiert)) \Rightarrow SEC61A im translozierenden aktiven Zustand (besetztes offenes laterales Tor, Verschlussdomäne von S1 aus ER-luminalem Trichter entfernt) \Rightarrow Cyt \rightarrow ER-Lumen- bzw. Cyt \rightarrow ER-Membran-Proteintransport \Rightarrow hydrolytische Spaltung der Carbonsäureesterbindung zwischen tRNA und Proteinyrest durch Peptidyl-tRNA:aminoacyl-tRNA-N-peptidyltransferase (EC 2.3.2.12) (Ribozym) der 60S-Untereinheit des 80S-Ribosoms \Rightarrow Proteinfreisetzung in ER-Lumen bzw. ER-Membran \Rightarrow SEC61A im aktivierten Zustand (laterales Tor offen, Verschlussdomäne von S1 aus ER-luminalem Trichter entfernt) \Rightarrow **passiver Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol, das zentrale Thema dieser Arbeit** \Rightarrow Ca^{2+} -Nanodomäne \Rightarrow HSPA5/ATP-Bindung an Di-(S)-Tyr-Motiv der Mini- α -Helix von S7 ($K_d(\text{SEC61A}, \text{HSPA5/ATP}) \approx 500 \mu\text{mol l}^{-1}$) und/oder Ca^{2+} /CALM-Bindung an IQ-Motiv ($K_d(\text{SEC61A}, \text{Ca}^{2+}/\text{CALM}) \approx 0,115 \mu\text{mol l}^{-1}$) \Rightarrow SEC61A im inaktivierten Zustand (laterales Tor geschlossen, Verschlussdomäne von S1 in ER-luminalem Trichter) \Rightarrow passiver Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol sinkt (Lang, Pfeffer *et al.*, 2017; Lang, Nguyen *et al.*, 2019; Gérard, Hall *et al.*, 2020; Ellgaard, McCaul *et al.*, 2016)

(S/R)-AS-Rest

(S/R)-Aminosäurerest

 $K_d(\text{SEC61A}, \text{Ca}^{2+}/\text{CALM})$ Dissoziationskonstante der Reaktion

	$\text{SEC61A/Ca}^{2+}/\text{CALM} \rightleftharpoons \text{SEC61A} + \text{Ca}^{2+}/\text{CALM}$
$K_d(\text{SEC61A}, \text{HSPA5/ATP})$	Dissoziationskonstante der Reaktion
	$\text{SEC61A/HSPA5/ATP} \rightleftharpoons \text{SEC61A} + \text{HSPA5/ATP}$
TM	Transmembran
SEC61A-Sequenzabschnitte:	
S1/6/8	Schleife 1/6/8
M2/7	Transmembran- α -Helix 2/7

Das Gating des SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplexes unterliegt somit einer Vielzahl an allosterischen Effektoren (Tab. 15), von denen $\text{Ca}^{2+}/\text{CALM}$ und HSPA5 entscheidend für die Inhibierung des passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol verantwortlich sind (Lang, Nguyen *et al.*, 2019).

Tab. 15: Allosterische Effektoren des SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplexes (Lang, Nguyen *et al.*, 2019)
TM Transmembran.

Struktur	Funktion
60S-Untereinheit (80S-Ribosom)	allosterischer Aktivator
SEC62/SEC63-Komplex	allosterischer Aktivator
Signalpeptid/N-terminale TM- α -Helix (Peptidylrest)	allosterischer Aktivator
SSR-Komplex	allosterischer Aktivator
DNAJB11	allosterischer Inhibitor
DNAJC3	allosterischer Inhibitor
SEC62/ Ca^{2+}	allosterischer Inhibitor
$\text{Ca}^{2+}/\text{CALM}$	allosterischer Inhibitor
HSPA5	allosterischer Aktivator/Inhibitor

Im Gegensatz zu Ca^{2+} -permeablen Ionenkanälen, deren Selektivitätsfilter erst nach zumindest partieller Dehydratisierung des Ca^{2+} -Kations (meist durch elektrostatische Repulsion von ≥ 2 Ca^{2+} -Kationen im Selektivitätsfilter (Stoßmechanismus)) passiert wird, ist nach den in Tab. 16 aufgelisteten Durchmessern anzunehmen, dass Ca^{2+} -Kationen das laterale Tor von SEC61A mit vollständiger 1. Hydrathülle bei $\gamma_H \approx 165 \text{ pS} \pm 10 \text{ pS}$ bzw. sogar vollständiger 2. Hydrathülle bei $\gamma_N \approx 733 \text{ pS} \pm 16 \text{ pS}$ permeieren können (Yelshanskaya, Nadezhdin *et al.*, 2020; Wu, Yan *et al.*, 2017; Hou, Pedi *et al.*, 2012; Schwenk und Rode, 2004; Lang, Pfeffer *et al.*, 2017).

Tab. 16: Durchmesser der Pore des SEC61A bei $\gamma_H \approx 165 \text{ pS} \pm 10 \text{ pS}$ (d_{γ_H}) und $\gamma_N \approx 733 \text{ pS} \pm 16 \text{ pS}$ (d_{γ_N}) und des Ca^{2+} -Kations mit 1. ($d_{1, \text{Hydr}}(\text{Ca}^{2+})$) und 2. Hydrathülle ($d_{2, \text{Hydr}}(\text{Ca}^{2+})$) (Lang, Pfeffer *et al.*, 2017; Schwenk und Rode, 2004)

Durchmesser (nm)
$d_{\gamma_H} \approx 0,5 \text{ bis } 0,7$
$d_{\gamma_N} \approx 1,2 \text{ bis } 1,4$
$d_{1, \text{Hydr}}(\text{Ca}^{2+}) \approx 0,496$
$d_{2, \text{Hydr}}(\text{Ca}^{2+}) \approx 0,906 \text{ bis } 0,936$

Da die *Sec61a1*^{Y344H}-Fehlsinnsmutation-induzierte Y344H-(S)-AS-Substitution S7, die Hspa5-Bindestelle von *Sec61a1*, betrifft (siehe auch 3.2), wird zum Schluß noch auf HSPA5 selbst eingegangen.

3.1.6 HSPA5

HSPA5 (Nicht-Chaperonin-molekulares Chaperon-ATPase (EC 3.6.4.10)) setzt sich vom N- zum C-terminalen Ende hin aus einer nucleotidbindenden Domäne (NBD) zur ATP-Hydrolyse $[\text{MgATP}]^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow [\text{MgADP}]^{1-} + \text{P}_i$ (ATPase-Funktion) und Bindung von K^+ -Kationen, einem Interdomänenverknüpfers zur HSPA5-Homooligomerisierung, einer substratbindenden Domäne (SBD) mit Deckel zur Bindung von Substratproteinen und einem C-terminalen KDEL-Motiv zur ER-Lumen-Retention via KDELR zusammen (Nach UniProtKB 2021-Eintrag P11021 (Zugriff 09.03.2021) und (Pobre, Poet *et al.*, 2019; Behnke, Feige *et al.*, 2015; Jin, Komita *et al.*, 2017)). Die basale $c(\text{HSPA5})_{\text{ERL}}$ beträgt ca. $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ und kann unter ER-Streß auf ein Vielfaches ansteigen, $t_{0,5}$ liegt bei $\geq 24 \text{ h}$ (Zellkultur) bzw. $\geq 3 \text{ d}$ (Gewebe) (Preissler und Ron, 2019). HSPA5 durchläuft einen AMPylierungs/De-AMPylierungs-Zyklus via FICD (difunktionelles Enzym: Proteinadenylyltransferase (EC 2.7.7.n1), De-AMPylase (EC 3.1.4.-)) und einen ATPase-Zyklus, die miteinander verbunden sind (Perera, Rato *et al.*, 2019; Behnke, Feige *et al.*, 2015; Pobre, Poet *et al.*, 2019; Ellgaard, McCaul *et al.*, 2016).

Schema 10: AMPylierungs/De-AMPylierungs- und ATPase-Zyklus von HSPA5

c(ungefaltetes Protein)_{ERL} steigt, $\frac{ADP}{ATP}$ -Ratio sinkt (ER-Streß) ⇒ FICD-Dimerisierung ⇒ allosterische Inhibierung der Proteinadenylyltransferase und allosterische Aktivierung der De-AMPylase von FICD ⇒ O-(5'-Adenylyl)-(S)-tyrosyl-[HSPA5]-Homooligomer-Modifikation: O-(5'-Adenylyl)-(S)-tyrosyl-[HSPA5] + H₂O $\xrightarrow{\text{De-AMPylase (FICD-Dimer)}}$ (S)-Tyrosyl-[HSPA5] + 5'AMP (De-AMPylierung) ⇒ (S)-Tyrosyl-[HSPA5]-Monomer (Deckel geschlossen) ⇒ Bindung von [MgATP]²⁻ und K⁺-Kation(en) an NBD ⇒ NBD-SBD-Distanz sinkt und Deckelöffnung ⇒ DNAJ/Substratprotein-Komplex-Bindung an HSPA5 ⇒ Substratproteintransfer auf SBD von HSPA5 ⇒ allosterische Aktivierung der ATPase-Funktion von HSPA5 durch J-Domäne von DNAJ ⇒ [MgATP]²⁻ + H₂O $\xrightarrow{\text{ATPase-Funktion (HSPA5)}}$ [MgADP]¹⁻ + P_i, zusätzlich steigt die NBD-SBD-Distanz ⇒ Abdissoziation von P_i und DNAJ ⇒ Deckelschließung ⇒ K_d(HSPA5/[MgADP]¹⁻, Substratprotein) nimmt ab ⇒ Substratproteinfaltung (mittlere t_{0,5}(Proteinfaltung) ≈ 30 min bis 60 min) ⇒ [MgADP]¹⁻ → [MgATP]²⁻-Austausch ([MgADP]¹⁻-Abdissoziation, [MgATP]²⁻-Bindung) vermittelt durch SIL1 oder HYOU1/[MgATP]²⁻ (NEFs) ⇒ Deckelöffnung ⇒ K_d(HSPA5/[MgATP]²⁻, Substratprotein) steigt ⇒ Abdissoziation des gefalteten Substratproteins ⇒ (S)-Tyrosyl-[HSPA5]-Monomer ⇒ c(ungefaltetes Protein)_{ERL} sinkt, $\frac{ADP}{ATP}$ -Ratio steigt (kein ER-Streß) ⇒ FICD-Dimerdissoziation ⇒ Inhibierung der De-AMPylase und Aktivierung der Proteinadenylyltransferase von FICD ⇒ (S)-Tyrosyl-[HSPA5] + 5'ATP $\xrightarrow{\text{Proteinadenylyltransferase (FICD-Monomer)}}$ O-(5'-Adenylyl)-(S)-tyrosyl-[HSPA5] + PP_i ⇒ O-(5'-Adenylyl)-(S)-tyrosyl-[HSPA5]-Homooligomer (Perera, Rato *et al.*, 2019; Behnke, Feige *et al.*, 2015; Pobre, Poet *et al.*, 2019; Ellgaard, McCaul *et al.*, 2016)

c(ungefaltetes Protein)_{ERL} ER-luminale Stoffmengenkonzentration der ungefalteten Proteine
NEF Nucleotidaustauschfaktor

HSPA5-Domänen:

NBD nucleotidbindende Domäne
SBD substratbindende Domäne

HSPA5 wechselwirkt mit einer Vielzahl ungefalteter und gefalteter Proteine, bildet also ein ausgeprägtes direktes Interaktionsnetzwerk (direktes Interaktom) aus, innerhalb dessen es diverse

Funktionen erfüllt (Tab. 17) (Pobre, Poet *et al.*, 2019; Behnke, Feige *et al.*, 2015; Lang, Pfeffer *et al.*, 2017; Lang, Nguyen *et al.*, 2019; Haßdenteufel, Johnson *et al.*, 2018; Preissler und Ron, 2019).

Tab. 17: Zusammenstellung ausgewählter Proteine des direkten HSPA5-Interaktionsnetzwerks (direktes HSPA5-Interaktom) und den wichtigsten korrespondierenden HSPA5-Proteinwechselwirkungsfunktionen (Pobre, Poet *et al.*, 2019; Behnke, Feige *et al.*, 2015; Lang, Pfeffer *et al.*, 2017; Lang, Nguyen *et al.*, 2019; Haßdenteufel, Johnson *et al.*, 2018; Preissler und Ron, 2019)

$K_d(\text{DNAJ}, 60\text{S-UE (80S-Ribosom)})$ Dissoziationskonstante der Reaktion $\text{DNAJ}/60\text{S-UE (80S-Ribosom)} = \text{DNAJ} + 60\text{S-UE (80S-Ribosom)}$. ERL ER-Lumen, ERM ER-Membran, Cyt Cytosol, NBD nucleotidbindende Domäne, SBD substratbindende Domäne, UE Untereinheit, NEF Nucleotidaustauschfaktor, UPR Ungefaltetes Protein-Antwort. ↓ sinkt.

Protein (Anmerkung)	Lokalisation	Wechselwirkungsfunktion (übergeordneter Prozeß)
HSPA5	ERL	HSPA5-Homooligomerisierung (AMPylierungs/De-AMPylierungs-Zyklus)
ungefalteter Substratpeptidylrest (cotranslational)	ERM/ERL	HSPA5 als molekulare Sperrvorrichtung zur Inhibierung der Retrotranslokation durch das laterale Tor von SEC61A (vektorieller Cyt → ER-Lumen- bzw. Cyt → ER-Membran-Proteintransport); Unterstützung der cotranslationalen Peptidylrestfaltung (Proteinfaltungshomöostase)
ungefaltetes Substratprotein (posttranslational)	ERL	Unterstützung der posttranslationalen Proteinfaltung (Proteinfaltungshomöostase)
DNAJ	ERL	DNAJ → HSPA5-Substratproteintransfer auf SBD von HSPA5 (HSPA5-ATPase-Zyklus); allosterische Aktivierung der ATPase-Funktion von HSPA5 (HSPA5-ATPase-Zyklus); allosterische Inhibierung des SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplexes (SEC61A-Gating)
DNAJ	ERM	$K_d(\text{DNAJ}, 60\text{S-UE (80S-Ribosom)})\downarrow$ (Bindung der 60S-UE des 80S-Ribosoms) und HSPA5-ER-Lumen → ER-Membran-Translokation (HSPA5-Substratproteindistanz↓) ⇔ DNAJ → HSPA5-Substratproteintransfer auf SBD von HSPA5 (HSPA5-ATPase-Zyklus), allosterische Aktivierung der ATPase-Funktion von HSPA5 (HSPA5-ATPase-Zyklus), Inhibierung der Retrotranslokation ungefalteter Substratpeptidylreste durch das laterale Tor von SEC61A (vektorieller Cyt → ER-Lumen- bzw. Cyt → ER-Membran-Proteintransport)
SIL1 (HSPA5-NEF)	ERL	$[\text{MgADP}]^1 \rightarrow [\text{MgATP}]^2$ -Austausch an NBD von HSPA5 (HSPA5-ATPase-Zyklus)
HYOU1/ $[\text{MgATP}]^2$ (HSPA5-NEF)	ERL	$[\text{MgADP}]^1 \rightarrow [\text{MgATP}]^2$ -Austausch an NBD von HSPA5 (HSPA5-ATPase-Zyklus)
SEC61A (SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplex)	ERM	kontextabhängige allosterische Aktivierung/Inhibierung des SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplexes (SEC61A-Gating)
SEC63 (SEC62/SEC63-Komplex)	ERM	allosterische Aktivierung des SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplexes (SEC61A-Gating)
ERN1 (difunktionelles Enzym: nichtspezifische Ser/Thr-Proteinkinase (EC 2.7.11.1), Endoribonuclease (EC 3.1.26.-))	ERM	ERN1-Inaktivierung (UPR-Inhibierung)

EIF2AK3 (nichtspezifische Ser/Thr-Proteinkinase (EC 2.7.11.1))	ERM	EIF2AK3-Inaktivierung (UPR-Inhibierung)
--	-----	---

3.2 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit bestand konkret darin, die zelluläre Ca^{2+} -Kationenhomöostase in Primärzellen, und zwar in *Sec61a1^{Y344H/Y344H}*-Hautfibroblasten aus *M. musculus*, durch Ca^{2+} -bildgebende Verfahren sowohl auf ER-luminaler Seite durch das GCaMP6-150-Konstrukt (reversibel Ca^{2+} -schaltbares Fluoreszenzprotein) (4.2.3.11) als auch auf cytosolischer Seite durch Fura-2 (synthetisierter fluoreszierender, ratiometrischer Ca^{2+} -Indikator) (4.2.3.10) zu analysieren.

Die *Sec61a1^{Y344H}*-Fehlsinmutation mit konsekutiver Y344H-(S)-AS-Substitution in S7 (Hspa5-Bindestelle) von *Sec61a1* ruft in C57BL/6J-*Sec61a1^{m1Gek}*/J-Mäusen Diabetes mellitus Typ 1, *Steatosis hepatis*, Leberzirrhose und Hepatomegalie hervor (Lloyd, Wheeler *et al.*, 2010). Bei einer Spannweite der Hydrophobizität von 4,5 ($\Delta G_{\text{Transfer}}^0(\text{H}_2\text{O} - \text{Dampf}) \approx 12,8 \text{ kJ mol}^{-1}$) für (S)-Ile bis -4,5 für (S)-Arg besitzt (S)-Tyr eine Hydrophobizität von -1,3 ($\Delta G_{\text{Transfer}}^0(\text{H}_2\text{O} - \text{Dampf}) \approx 21,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) und (S)-His eine von -3,2 ($\Delta G_{\text{Transfer}}^0(\text{H}_2\text{O} - \text{Dampf}) \approx 40,0 \text{ kJ mol}^{-1}$), folglich sinkt mit der Y344H-(S)-AS-Substitution die Hydrophobizität der Hspa5-Bindestelle in S7 (Kyte und Doolittle, 1982). Da Hspa5 bevorzugt hydrophobe Stellen im Substrat bindet, ist durch Y344H-(S)-AS-Substitution in S7 eine $K_d(\text{S7, Hspa5})$ -Abnahme zu erwarten, was u.a. durch Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie mit chemisch synthetisiertem S7^{Y344H}-Peptid(339 - 353) bestätigt wurde (Behnke, Feige *et al.*, 2015; Schäuble, Lang *et al.*, 2012). Komplementationsanalysen in HeLa-Zellen zeigten bei Komplementation mit SEC61A1^{Y344H} (verglichen mit der Komplementation durch SEC61A1) eine ca. 25 %-ige Erhöhung des thapsigargininduzierten passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol unter basalen Bedingungen, wohingegen die bei der Komplementation mit SEC61A1 zu beobachtende Erhöhung des thapsigargininduzierten passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol nach 3-minütiger Inkubation mit DTT bzw. Tunicamycin aufgehoben wurde (Schäuble, Lang *et al.*, 2012). Da der passive Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol via SEC61A1^{Y344H} bisher nur durch Komplementationsanalysen in HeLa-Zellen bez. der $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t = 180 \text{ s})$ untersucht wurde, wurde in dieser Arbeit der passive Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol erstmals in Primärzellen (*Sec61a1^{WT/WT}*-Hautfibroblasten (C57BL/6J-Maus), *Sec61a1^{Y344H/Y344H}*-Hautfibroblasten (C57BL/6J-*Sec61a1^{m1Gek}*/J-Maus)) mittels ER-GCaMP6-150-Konstrukt zur ER-luminalen Ca^{2+} -Bildgebung und Fura-2 zur cytosolischen Ca^{2+} -Bildgebung untersucht. Analysiert wurden $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ (basale Stoffmengenkonzentration freier Ca^{2+} -Kationen im ER-Lumen), $U(\text{Ca}^{2+})$ (Nernst-Spannung für Ca^{2+} -Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol), $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ (chemisches Potential für Ca^{2+} -Kationen über die ER-Membran), die Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$ unter basalen Bedingungen bzw. tunicamycininduzierten ER-Streßbedingungen und die pharmakologische Modulation der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})$ durch Trifluoperazin, auch in der Hoffnung, den/die pathobiophysikalischen Mechanismus/Mechanismen der *Sec61a1^{Y344H}*-Fehlsinmutation, der/die zu Diabetes mellitus Typ 1,

Steatosis hepatis, Leberzirrhose und Hepatomegalie in C57BL/6J-*Sec61a1^{m1Gek}*/J-Mäusen führt/führen, aufzuklären.

4 Material und Methodik

4.1 Material

4.1.1 Tiere

C57BL/6J-Mäuse (3 Weibchen, geb. 28.08.2014; 2 Männchen, geb. 28.08.2014) und C57BL/6J-*Sec61a1*^{m1Gek}/J-Mäuse (2 Weibchen, geb. 28.08.2014, *Sec61a1*^{WT/Y344H} (heterozygot); 9 Männchen, geb. 28.08.2014, *Sec61a1*^{WT/Y344H} (heterozygot)) wurden vom The Jackson Laboratory (Charles River Laboratory, Sulzfeld, Deutschland) käuflich erworben, um eine Zucht in unserer spezifisch pathogenfreien Versuchstierhaltung (Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland) zu etablieren. Alle Mäuse wurden bei einem 12 h hell/12 h dunkel-Zyklus gehalten. Trinkwasser und Standardfutter (schwängere Mäuse: V1185-300, ansonsten: V1534-300; ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) gab es ad libitum. Die Genotypisierung (Ohrgewebeprobe) wurde von der eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) vorgenommen.

Die Narkotisierung zur Entnahme eines zuvor enthaarten (asid[®]-med Enthaarungscreme; ASID BONZ GmbH; Herrenberg, Deutschland) thorakoabdominalen Hautlappens sowie verschiedener Organe erfolgte intraperitoneal durch Injektion einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid (100 mg (in physiologischer 0,9 %-iger NaCl-Lösung) pro kg KG; Ursotamin[®]; Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (10 mg (in physiologischer 0,9 %-iger NaCl-Lösung) pro kg KG; Rompun[®]; Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Getötet wurden Tiere beider Geschlechter (Alter: *Sec61a1*^{WT/WT}-Mäuse ca. 5-47 Wochen, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Mäuse ca. 9-53 Wochen) unter Narkose durch finale Blutentnahme (Entblutung) aus der V. cava inferior und Organentnahme. Für die in dieser Arbeit folgenden Experimente, wurden nur die enthaarten thorakoabdominalen Hautlappen weiterverwendet und zunächst in eiskaltes PBS (4.2.2.1.3) überführt. Alle Tierexperimente erfolgten gemäß der deutschen Gesetzgebung zum Tierschutz (§ 8 TierSchG), der EU-Direktive 2010/63/EU und wurden durch den amtstierärztlichen Dienst des Landesamts für Verbraucherschutz genehmigt (Versuchsvorhaben Nr. 25/2014).

4.1.2 293 [HEK-293] (ATCC[®] CRL-1573TM)

Die 293 [HEK-293] (ATCC[®] CRL-15TM; ATCC; Manassas, Virginia, USA) werden in dieser Arbeit als „293-Zellen“ bezeichnet. Eine Genotypisierung erfolgte durch die Leibniz-Institut DSMZ GmbH (Braunschweig, Deutschland). In Kultur wachsen 293-Zellen als adhärenente Monoschicht, zeigen partielle dichteabhängige Wachstumsinhibition (Kontaktinhibition via laterale Wechselwirkung) und besitzen eine Zellzyklusdauer von 24 h bis 30 h. Gemäß ATCC sind 30 % der 293-Zellen hypotriploid (64 Chromosomen), 4,2 % besitzen höhere Ploidiegrade. Der Karyotyp ist weiblich (mehrere X-Chromosomen (Meir, Weirauch *et al.*, 2011; Machida, Liu *et al.*, 2009; Gilbert, Pehrson *et al.*, 2000), kein Y-Chromosom bzw. keine Y-chromosomalen Sequenzen (Lin, Boone *et al.*, 2014)) und weist neben Polyploidie verschiedene Chromosomenaberrationen auf. Es liegt kein gewebespezifisches

Genexpressionsprofil vor (Lin, Boone *et al.*, 2014). Exprimiert werden Marker diverser Gewebe- bzw. Organtypen (Medulla gll. suprarenalis, Nervengewebe, Nierenepithel u.a.) (Lin, Boone *et al.*, 2014), so dass kein Schluß auf den genauen Zelltyp, das Ursprungsgewebe/-organ bzw. den Phänotyp möglich ist. 293-Zellen sind TERT (RNA-abhängige DNA-Polymerase (EC 2.7.7.49))-positiv und exprimieren virale Oncogene (u.a. *E6/E7* (HPV16)), was u.a. zu Genominstabilität und damit zu signifikanten Änderungen bzw. Selektionen des Karyotyps führen kann (Genesca, Pampalona *et al.*, 2011; Frias, Pampalona *et al.*, 2012; Komorek, Kuppuswamy *et al.*, 2010).

4.2 Methodik

4.2.1 Isolation von Hautfibroblasten aus enthaarten thorakoabdominalen Hautlappen

Enthaarte thorakoabdominale Hautlappen (4.1.1) von Mäusen gleichen Alters und Genotyps wurden entsprechend gepoolt, in Stücke (ca. 1,5 mm • 1,5 mm) geschnitten und zur Degradation der extrazellulären Matrix in einer Mischung aus 920 µl DMEM (Nr. 41965-039; life technologies™, Darmstadt, Deutschland) und 80 µl Liberase™ TL Research Grade (200 mg l⁻¹, Stammlösung: 2,5 mg ml⁻¹ (in Reinstwasser (18,2 MΩ cm = 0,055 µS cm⁻¹, 25 °C)); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) inkubiert (1 h, 37 °C, 5 % CO₂/95 % O₂, gelegentlich schütteln). Liberase™ TL Research Grade wurde durch 5 ml DMEM (Hautfibroblasten) (4.2.2.1.4.1) neutralisiert, die Suspension zentrifugiert (200 g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml DMEM (Hautfibroblasten) resuspendiert und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche (TC-Flasche T75; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) transferiert. Nachdem die Hautfibroblasten aus den verdauten Hautgewebestücken herausmigriert waren (ca. 6 d), wurden die Hautgewebestücke durch Waschen mit PBS entfernt und die Hautfibroblasten weiter in Kultur gehalten. Bei ca. 80 % Konfluenz wurden die Hautfibroblasten gesplittet:

1. Waschen (12 ml PBS)
2. Abnahme (12 ml PBS)
3. Trypsinierung (3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (4.2.2.1.2), 37 °C, 5 % CO₂/95 % O₂)
4. Inhibition der Trypsinierung (7 ml DMEM (Hautfibroblasten)), d.h. 10 ml Endvolumen
5. Vereinzelung der Hautfibroblasten durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren
6. Ein Teil wurde weiterhin in 25 cm²-Zellkulturflaschen (TC-Flasche T25; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) in Kultur gehalten (4.2.2.3.1), ein anderer Teil kryokonserviert (Lagerung: Gasphase des flüßigen Stickstoffs, ca. -150 °C bis -160 °C) und bei Bedarf aufgetaut (4.2.2.2).

4.2.2 Zellkultur

4.2.2.1 Chemikalien/Lösungen/Zellkulturmedien

4.2.2.1.1 Poly-(S)-Lysinhydrobromidlösung

Poly-(S)-Lysinhydrobromidlösung (β (Poly-(S)-Lysinhydrobromid) = 0,1 g l⁻¹; Solvens: Reinstwasser; Poly-L-Lysinhydrobromid: Nr. P1274-100MG; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde sterilfiltriert (Filtropur V100, 1000ml, 0,2 μ m; Nr. 83.3942.001; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland; Porengröße 0,22 μ m) und dann zur Beschichtung mikroskopischer Deckgläser (\varnothing 25 mm; ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland) verwendet.

4.2.2.1.2 Trypsin-EDTA-Lösung

Trypsin-EDTA-Lösung (Trypsin-EDTA solution; Nr. T4174; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde 1:10 mit phosphatgepufferter Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Nr. D8537; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verdünnt (final: 0,5 g Schweine-Trypsin; 0,2 g Na₄EDTA) und wird im Folgenden als „Trypsin-EDTA-Lösung“ bezeichnet.

4.2.2.1.3 Phosphatgepufferte Salzlösung

Die selbst hergestellte phosphatgepufferte Salzlösung wird in dieser Arbeit als „PBS“ abgekürzt (Tab. 18).

Tab. 18: PBS-Zusammensetzung

PBS	
Substanz	mmol l ⁻¹
NaCl	136,9
KCl	2,7
KH ₂ PO ₄	1,5
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	8,1
Reinstwasser (18,2 M Ω cm = 0,055 μ S cm ⁻¹ , 25 °C)	
pH = 7,4 (HCl bzw. NaOH), autoklaviert	

4.2.2.1.4 Zellkulturmedien

4.2.2.1.4.1 Hautfibroblasten

DMEM (Nr. 41965-039; life technologies™, Darmstadt, Deutschland) wurde supplementiert mit: FBS (10 %; Nr. 11573397, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), GlutaMAX™-I (1 %; Nr. 35050-038; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), Penicillin-Streptomycin (1 %; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und wird in dieser Arbeit als „DMEM (Hautfibroblasten)“ bezeichnet.

4.2.2.1.4.2 293-Zellen

MEM (Nr. 31095-029; life technologies™, Darmstadt, Deutschland) wurde mit FBS (10 %; Nr. 11573397, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) supplementiert und wird in dieser Arbeit als „MEM (293-Zellen)“ bezeichnet.

4.2.2.1.5 Lösungen der Ca²⁺-Bildgebung

Die selbst hergestellten Lösungen der Ca²⁺-Bildgebung werden in dieser Arbeit als „0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-“, „2,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-“, „50,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-“, „0,5 mmol l⁻¹-EGTA-“, „15,0 mmol l⁻¹-EGTA- -Lösung“ bezeichnet (Tab. 19).

Tab. 19: Zusammensetzungen der Lösungen der Ca²⁺-Bildgebung

Lösung	
Substanz	mmol l ⁻¹
NaCl	140,0
KCl	4,0
MgCl ₂	1,0
D-Glc	10,0
HEPES	10,0
entweder CaCl ₂ oder EGTA	
CaCl ₂	0,0 / 2,0 / 50,0
EGTA	0,5 / 15,0
Reinstwasser (18,2 MΩ cm = 0,055 μS cm ⁻¹ , 25 °C)	
pH = 7,4 (NaOH)	

4.2.2.2 Einfrierung, Lagerung und Auftauung der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen

Das Verfahren zur Einfrierung, zur Lagerung und zur Auftauung der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen verlief ähnlich. Protokoll eines Zyklus:

1. Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen in 75 cm²-Zellkulturflasche (TC-Flasche T75; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland)
2. Abnahme der 13 ml DMEM (Hautfibroblasten) bzw. MEM (293-Zellen)
3. Waschen (12 ml PBS)
4. Trypsinierung (3 ml Trypsin-EDTA-Lösung; Hautfibroblasten: 37 °C, 5 % CO₂/95 % O₂; 293-Zellen: RT)
5. Inhibition der Trypsinierung (7 ml DMEM (Hautfibroblasten) bzw. MEM (293-Zellen))
6. Vereinzeln der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren
7. Zentrifugation (200 g, 5 min, RT)
8. Überstand verwerfen
9. Resuspension des Pellet in Einfriermedium (1,5 ml; Lösung: 90 % DMEM (Hautfibroblasten) bzw. MEM (293-Zellen), 10 % DMSO (Nr. D2650; Sigma-Aldrich, München, Deutschland))
10. Transfer in Kryoröhrchen (Kapazität 1,8 ml; Thermo Scientific™ Nunc™ Kryoröhrchen für Biobanking und Zellkulturen; Nr. 375418; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
11. Kryoröhrchen in Mr. Frosty™ Gefrierbehälter (Nr. 5100-0001; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), der mit Propan-2-ol (Nr. P/7500/17; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gefüllt ist
12. Lagerung (-80 °C; 48 h; Frosty™ Gefrierbehälter gefüllt mit Propan-2-ol gewährleistet Abkühlung mit einer Geschwindigkeit von ca. -1 °C min⁻¹)

13. Lagerung (Gasphase des flüchtigen Stickstoffs, ca. -150 °C bis -160 °C)
14. Auftauen (Wasserbad, 37 °C)
15. Aufnahme in 5 ml DMEM (Hautfibroblasten) bzw. MEM (293-Zellen)
16. Zentrifugation (200 g, 5 min, RT)
17. Überstand verwerfen
18. Resuspension in äquilibriertem DMEM (Hautfibroblasten) bzw. MEM (293-Zellen) (Äquilibration: 37 °C, 5 % CO₂/95 % O₂)
19. Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen in 75 cm²-Zellkulturflasche (TC-Flasche T75; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland)
20. Zellteilung bis gewünschte Konfluenz erreicht ist

4.2.2.3 Kultivierung der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen

4.2.2.3.1 Hautfibroblasten

Die Hautfibroblasten wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen (TC-Flasche T25; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert (37 °C, 5 % CO₂/95 % O₂) bis ca. 90 % Konfluenz erreicht wurden und dann gesplittet, dabei wurde das DMEM (Hautfibroblasten) alle 48 h gewechselt:

1. Abnahme der 9 ml DMEM (Hautfibroblasten)
2. Waschen (6 ml PBS)
3. Trypsinierung (1,5 ml bis 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung, 37 °C, 5 % CO₂/95 % O₂)
4. Vereinzelung der Hautfibroblasten durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren
5. Ausplattierung: 2 bis 3 Tropfen Hautfibroblasten-Trypsin-EDTA-Lösung pro Kulturschale (Corning[®] tissue-culture treated culture dishes; Nr. CLS430165; Sigma-Aldrich, München, Deutschland); Transfer: Rest der Hautfibroblasten-Trypsin-EDTA-Lösung in 25 cm²-Zellkulturflaschen (TC-Flasche T25; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) mit 8 ml DMEM (Hautfibroblasten).

4.2.2.3.2 293-Zellen

Die 293-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen (TC-Flasche T75; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert (37 °C, 5 % CO₂/95 % O₂) und alle 48 h bei ca. 90 % Konfluenz gesplittet:

1. Abnahme der 13 ml MEM (293-Zellen)
2. Waschen (12 ml PBS)
3. Trypsinierung (3 ml Trypsin-EDTA-Lösung, RT)
4. Vereinzelung der 293-Zellen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren
5. Ausplattierung: 2 bis 3 Tropfen 293-Zellen-Trypsin-EDTA-Lösung pro Kulturschale (Corning[®] tissue-culture treated culture dishes; Nr. CLS430165; Sigma-Aldrich, München, Deutschland); Transfer: 2,5 ml bis 3 ml der 293-Zellen-Trypsin-EDTA-Lösung in 75 cm²-Zellkulturflaschen (TC-Flasche T75; SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) mit 10 ml MEM (293-Zellen)

4.2.2.4 Ausplattierung der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen zur Ca²⁺-Bildgebung

Das Protokoll ergibt sich wie folgt:

1. mikroskopische Deckgläser (Ø 25 mm; ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland) in Kulturschalen (Corning® tissue-culture treated culture dishes; Nr. CLS430165; Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
2. Behandlung mikroskopischer Deckgläser (Poly-(S)-Lysinhydrobromidlösung, 30 min, RT)
3. Waschen mikroskopischer Deckgläser (3-mal, PBS)
4. 2 ml Zellkulturmedium pro Kulturschale
5. Ausplattierung: 2 bis 3 Tropfen Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen-Trypsin-EDTA-Lösung pro Kulturschalen
6. Inkubation (37 °C, 5 % CO₂/95 % O₂)

4.2.3 Ca²⁺-Bildgebung

4.2.3.1 Statistik

Tab. 20 gibt einen Überblick über die Definition verwendeter Parameter der deskriptiven/induktiven Statistik (Backhaus, Erichson *et al.*, 2018; Cramer und Kamps, 2020; Messer und Schneider, 2019; Köhler, Schachtel *et al.*, 2012; Rüschen-dorf, 2014; Puhani, 2020; OriginLab, 2020).

Tab. 20: Definition verwendeter Parameter der deskriptiven/induktiven Statistik (Backhaus, Erichson *et al.*, 2018; Cramer und Kamps, 2020; Messer und Schneider, 2019; Köhler, Schachtel *et al.*, 2012; Rüschen-dorf, 2014; Puhani, 2020; OriginLab, 2020)

Parameter	Formelzeichen	Gleichung
deterministische unabhängige Variable (Regressor)	x	-
stochastische abhängige Variable (Regressand)	$f(x)$	-
vektorwertige Datenfunktion	$\vec{x}, \vec{f}(x)$	$\vec{x} = [x_1, \dots, x_n]^T$, x_k k-tes Element $\vec{f}(x) = [f(x_1), \dots, f(x_n)]^T$, $f(x_k)$ k-tes Element $\Rightarrow (x_k, f(x_k))$ k-ter Datenpunkt $x \in [x_{\min}, x_{\max}]$, $k = 1, \dots, n$ x_{\max} maximales Element x_{\min} minimales Element
Datenmatrix	$[f(l)(x_k)]$	$[f(l)(x_k)] = \begin{bmatrix} f(1)(x_1) & \dots & f(j)(x_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ f(1)(x_n) & \dots & f(j)(x_n) \end{bmatrix}$ $k = 1, \dots, n, l = 1, \dots, j$ nimmt l nur den Wert 1 an, ist $[f(l)(x_k)] = \vec{f}(l)(x) = \vec{f}(x)$ $x \in [x_{\min}, x_{\max}]$ x_{\max} maximales Element x_{\min} minimales Element

Parameter	Formelzeichen	Gleichung
Anpassungsfunktion	$f(x, \vec{a}), f(x, \vec{a}_{\min})$	$f(x, \vec{a})$ (nichtoptimiert), $f(x_k, \vec{a})$ k-tes Element, $\vec{a} = [a_1, \dots, a_m]^T$ (unbekannt), a_l l-tes Element $f(x, \vec{a}_{\min})$ (optimiert), $f(x_k, \vec{a}_{\min})$ k-tes Element, $\vec{a}_{\min} = [\hat{a}_1, \dots, \hat{a}_m]^T$ (prognostiziert), \hat{a}_l l-tes Element $x \in [x_{\min}, x_{\max}], k = 1, \dots, m$ x_{\max} maximales Element x_{\min} minimales Element
maximales Element bzw. minimales Element	x_{\max} bzw. x_{\min}	$x_{\max} = \max \vec{x}$ bzw. $x_{\min} = \min \vec{x}$ \vec{x} Datenvektor
p-Quantil	\tilde{x}_p $\tilde{x}_{0,05}$ $\tilde{x}_{0,25}$ (= 1. Quartil Q_1) $\tilde{x}_{0,50}$ (= 2. Quartil $Q_2 =$ \bar{x}_{med}) $\tilde{x}_{0,75}$ (= 3. Quartil Q_3) $\tilde{x}_{0,95}$	$\tilde{x}_p = \begin{cases} 0,5(x_{np} + x_{np+1}) & \text{für } n \in \mathbb{N} \\ x_{[np]+1} & \text{für } n \notin \mathbb{N} \end{cases}$ $p \in (0,1)$ n Anzahl (Elemente)
arithmetischer Mittelwert	\bar{x}_{arithm}	$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^{k=n} x_k$ n Anzahl (Elemente) x_k k-tes Element (\vec{x})
gewichteter arithmetischer Mittelwert	$\bar{x}_{\text{arithm,gew}}$	$\bar{x}_{\text{arithm,gew}} = \sum_{k=1}^{k=n} h_k x_k$ n Anzahl (Elemente) x_k k-tes Element (\vec{x}) h_k k-te relative Häufigkeit $\in [0, 1]$
k-te relative Häufigkeit	h_k	$h_k = \frac{H_k}{n} \in [0, 1]$ H_k absolute Häufigkeit n Anzahl (Elemente)
Median	\bar{x}_{med}	$\bar{x}_{\text{med}} = \begin{cases} x_{0,5(n+1)} & \text{für } n \text{ ungerade} \\ 0,5(x_{0,5n} + x_{0,5n+1}) & \text{für } n \text{ gerade} \end{cases}$ n Anzahl (Elemente)
Spannweite	SW	$SW = x_{\max} - x_{\min}$ x_{\max} maximales Element x_{\min} minimales Element

Parameter	Formelzeichen	Gleichung
Interquartilabstand	IQA	$\text{IQA} = \tilde{x}_{0,75} - \tilde{x}_{0,25} = Q_3 - Q_1$ $\tilde{x}_{0,25} \quad 0,25\text{-Quantil}$ $\tilde{x}_{0,75} \quad 0,75\text{-Quantil}$ $Q_1 \quad 1. \text{ Quartil}$ $Q_3 \quad 3. \text{ Quartil}$
Standardabweichung	$s(\vec{x})$	$s(\vec{x}) = \sqrt{s(\vec{x})^2} = \sqrt{\text{Var}(\vec{x})} =$ $\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^{k=n} (x_k - \bar{x}_{\text{arithm}})^2}$ $\vec{x} \quad \text{Datenvektor}$ $\text{Var}(\vec{x}) \quad \text{Varianz} (\vec{x})$ $n \quad \text{Anzahl (Elemente)}$ $x_k \quad \text{k-tes Element} (\vec{x})$ $\bar{x}_{\text{arithm}} \quad \text{arithmetischer Mittelwert} (\vec{x})$
Varianz	$\text{Var}(\vec{x})$	$\text{Var}(\vec{x}) = s(\vec{x})^2 = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^{k=n} (x_k - \bar{x}_{\text{arithm}})^2$ $\vec{x} \quad \text{Datenvektor}$ $s(\vec{x}) \quad \text{Standardabweichung} (\vec{x})$ $n \quad \text{Anzahl (Elemente)}$ $x_k \quad \text{k-tes Element} (\vec{x})$ $\bar{x}_{\text{arithm}} \quad \text{arithmetischer Mittelwert} (\vec{x})$
Standardabweichung des arithmetischen Mittelwerts	$s(\bar{x}_{\text{arithm}})$	$s(\bar{x}_{\text{arithm}}) = \frac{s(\vec{x})}{\sqrt{n}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^{k=n} (x_k - \bar{x}_{\text{arithm}})^2}}{\sqrt{n}}$ $s(\vec{x}) \quad \text{Standardabweichung} (\vec{x})$ $\vec{x} \quad \text{Datenvektor}$ $n \quad \text{Anzahl (Elemente)}$ $x_k \quad \text{k-tes Element} (\vec{x})$ $\bar{x}_{\text{arithm}} \quad \text{arithmetischer Mittelwert} (\vec{x})$
Kovarianz	$\text{Kov}(\vec{x}, \vec{f}(x)) = s(\vec{x}, \vec{f}(x))$	$\text{Kov}(\vec{x}, \vec{f}(x)) = s(\vec{x}, \vec{f}(x)) =$ $\frac{1}{n} \sum_{k=1}^{k=n} ((x_k - \bar{x}_{\text{arithm}})(f(x_k) - \bar{f}(x)_{\text{arithm}}))$ <p>Cauchy-Schwarz-Ungleichung:</p> $ \text{Kov}(\vec{x}, \vec{f}(x)) \leq s(\vec{x}) s(\vec{f}(x))$ $\vec{x} \quad \text{Datenvektor}$ $\vec{f}(x) \quad \text{Datenvektor}$ $n \quad \text{Anzahl (Elemente)}$ $x_k \quad \text{k-tes Element} (\vec{x})$ $\bar{x}_{\text{arithm}} \quad \text{arithmetischer Mittelwert} (\vec{x})$ $f(x_k) \quad \text{k-tes Element} (\vec{f}(x))$ $\bar{f}(x)_{\text{arithm}} \quad \text{arithmetischer Mittelwert} (\vec{f}(x))$ $s(\vec{x}) \quad \text{Standardabweichung} (\vec{x})$ $s(\vec{f}(x)) \quad \text{Standardabweichung} (\vec{f}(x))$

Parameter	Formelzeichen	Gleichung
Standardabweichung des k-ten Zeilenvektors der Datenmatrix	$s(\vec{f}(x_k)^T)$	$s(\vec{f}(x_k)^T) = \sqrt{\frac{1}{j} \sum_{l=1}^j (f(l)(x_k) - \bar{f}(x_k)_{arithm})^2}$ $\vec{f}(x_k)^T$ k-ter Zeilenvektor der Datenmatrix $f(l)(x_k)$ l-tes Element ($\vec{f}(x_k)^T$) $\bar{f}(x_k)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x_k)^T$)
Erwartungswert (diskrete stochastische Variable)	$E(\vec{x})$	$E(\vec{x}) = \sum_{k=1}^{k=n} (x_k P(x_k))$ \vec{x} Datenvektor x_k k-tes Element (\vec{x}) $P(x_k)$ Wahrscheinlichkeit (x_k)
Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizient	$Kor(\vec{x}, \vec{f}(x)) = r(\vec{x}, \vec{f}(x))$	$Kor(\vec{x}, \vec{f}(x)) = r(\vec{x}, \vec{f}(x)) = \frac{Kov(\vec{x}, \vec{f}(x))}{s(\vec{x})s(\vec{f}(x))} = \frac{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^{k=n} ((x_k - \bar{x}_{arithm})(f(x_k) - \bar{f}(x)_{arithm}))}{\sqrt{\sum_{k=1}^{k=n} (x_k - \bar{x}_{arithm})^2 \sum_{k=1}^{k=n} (f(x_k) - \bar{f}(x)_{arithm})^2}}$ $\in [-1, 1]$ $r(\vec{x}, \vec{f}(x)) = -1$: perfekte negative einfache lineare Korrelation (stochastische Abhängigkeit) $r(\vec{x}, \vec{f}(x)) = 0$: keine einfache lineare Korrelation (keine stochastische Abhängigkeit) $r(\vec{x}, \vec{f}(x)) = 1$: perfekte positive einfache lineare Korrelation (stochastische Abhängigkeit) \vec{x} Datenvektor $\vec{f}(x)$ Datenvektor $Kov(\vec{x}, \vec{f}(x))$ Kovarianz $s(\vec{x})$ Standardabweichung (\vec{x}) $s(\vec{f}(x))$ Standardabweichung ($\vec{f}(x)$) n Anzahl (Elemente) x_k k-tes Element (\vec{x}) \bar{x}_{arithm} arithmetischer Mittelwert (\vec{x}) $f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$) $\bar{f}(x)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x)$)
k-tes Residuum	Res_k	$Res_k = f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{min})$ $f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$) $f(x_k, \vec{a}_{min})$ k-tes Element ($f(x, \vec{a}_{min})$)
k-ter Gewichtungsfaktor	w_k	$w_k = 1$ (keine Gewichtung) $w_k = \frac{1}{s(\vec{f}(x_k)^T)}$ $s(\vec{f}(x_k)^T)$ Standardabweichung ($\vec{f}(x_k)^T$)

Parameter	Formelzeichen	Gleichung
Summe der gewichteten Quadrate der Residuen	$SQR(w_k)$	$SQR(w_k) = \sum_{k=1}^{k=n} (w_k Res_k ^2) = \sum_{k=1}^{k=n} (w_k f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{min}) ^2)$ $\vec{f}(x)$ Datenvektor $f(x, \vec{a}_{min})$ optimierte Anpassungsfunktion Res_k k-tes Residuum $f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$) $f(x_k, \vec{a}_{min})$ k-tes Element ($f(x, \vec{a}_{min})$) w_k k-ter Gewichtungsfaktor: $w_k = 1$ (keine Gewichtung), $w_k = \frac{1}{s(\vec{f}(x_k)^T)}$ $s(\vec{f}(x_k)^T)$ Standardabweichung $(\vec{f}(x_k)^T)$
mittlere Summe der gewichteten Quadrate der Residuen	$MQR(w_k)$	$MQR(w_k) = \frac{SQR(w_k)}{n-q} = \frac{\sum_{k=1}^{k=n} (w_k Res_k ^2)}{n-q} = \frac{\sum_{k=1}^{k=n} (w_k f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{min}) ^2)}{n-q}$ $SQR(w_k)$ Summe der gewichteten Quadrate der Residuen $\vec{f}(x)$ Datenvektor $f(x, \vec{a}_{min})$ optimierte Anpassungsfunktion n Anzahl (Elemente) q Anzahl (deterministischer unabhängiger Variablen) Res_k k-tes Residuum $f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$) $f(x_k, \vec{a}_{min})$ k-tes Element ($f(x, \vec{a}_{min})$) w_k k-ter Gewichtungsfaktor: $w_k = 1$ (keine Gewichtung), $w_k = \frac{1}{s(\vec{f}(x_k)^T)}$ $s(\vec{f}(x_k)^T)$ Standardabweichung $(\vec{f}(x_k)^T)$
totale Varianz	$Var_{tot}(\vec{f}(x))$	$Var_{tot}(\vec{f}(x)) = f(x_k) - \bar{f}(x)_{arithm}$ $\vec{f}(x)$ Datenvektor $f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$) $\bar{f}(x)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x)$)
Summe der Quadrate der totalen Varianz	SQT	$SQT = \sum_{k=1}^{k=n} (f(x_k) - \bar{f}(x)_{arithm})^2$ $f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$) $\bar{f}(x)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x)$)

Parameter	Formelzeichen	Gleichung
mittlere Summe der Quadrate der totalen Varianz	MQT	$MQT = \frac{SQT}{n-1} = \frac{\sum_{k=1}^{k=n} (f(x_k) - \bar{f}(x)_{arithm})^2}{n-1}$ <p>SQT Summe der Quadrate der totalen Varianz n Anzahl (Elemente) $f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$) $\bar{f}(x)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x)$)</p>
erklärte Varianz	$Var_{erk}(\vec{f}(x))$	$Var_{erk}(\vec{f}(x)) = f(x_k, \vec{a}_{min}) - \bar{f}(x)_{arithm}$ <p>$\vec{f}(x)$ Datenvektor $f(x_k, \vec{a}_{min})$ k-tes Element ($f(x, \vec{a}_{min})$) $\bar{f}(x)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x)$)</p>
Summe der Quadrate der erklärten Varianz	SQE	$SQE = \sum_{k=1}^{k=n} (f(x_k, \vec{a}_{min}) - \bar{f}(x)_{arithm})^2$ <p>$f(x_k, \vec{a}_{min})$ k-tes Element ($f(x, \vec{a}_{min})$) $\bar{f}(x)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x)$)</p>
Bestimmtheitsmaß = Determinationskoeffizient*	$B = R^2$	$B = R^2 = \frac{SQE}{SQT} = \frac{\sum_{k=1}^{k=n} (f(x_k, \vec{a}_{min}) - \bar{f}(x)_{arithm})^2}{\sum_{k=1}^{k=n} (f(x_k) - \bar{f}(x)_{arithm})^2} =$ $1 - \frac{SQR(w_k)}{SQT} = 1 - \frac{\sum_{k=1}^{k=n} (w_k f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{min}) ^2)}{\sum_{k=1}^{k=n} (f(x_k) - \bar{f}(x)_{arithm})^2}$ <p style="text-align: center;">$\in [0, 1]$</p> <p>$B = R^2 = 0$: keine Erklärung durch das Anpassungsmodell $\hat{f}(x_k) = \bar{f}(x)_{arithm}, k = 1, \dots, n$</p> <p>$B = R^2 = 1$: perfekte Erklärung durch das Anpassungsmodell $\hat{f}(x_k) = f(x_k), k = 1, \dots, n$</p> <p>SQE Summe der Quadrate der erklärten Varianz SQT Summe der Quadrate der totalen Varianz SQR(w_k) Summe der gewichteten Quadrate der Residuen n Anzahl (Elemente) x_k k-tes Element (\vec{x}) $f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$) $\bar{f}(x)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x)$) $f(x_k, \vec{a}_{min})$ k-tes Element ($f(x, \vec{a}_{min})$) w_k k-ter Gewichtungsfaktor: $w_k = 1$ (keine Gewichtung)</p>

Parameter	Formelzeichen	Gleichung
korrigiertes/adjustiertes Bestimmtheitsmaß = korrigierter/adjustierter Determinationskoeffizient*	$B_{kor} = R_{kor}^2$	$B_{kor} = R_{kor}^2 = 1 - \frac{MQR(w_k)}{MQT} =$ $1 - \frac{SQR(w_k)(n-1)}{SQT(n-q)} = 1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-q} =$ $1 - (1 - (1 - \frac{\sum_{k=1}^{k=n} (w_k f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{min}) ^2)}{\sum_{k=1}^{k=n} (f(x_k) - \bar{f}(x)_{arithm})^2})) \frac{n-1}{n-q} \leq 1$
		<p>MQR(w_k) mittlere Summe der gewichteten Quadrate der Residuen</p> <p>MQT mittlere Summe der Quadrate der totalen Varianz</p> <p>SQR(w_k) Summe der gewichteten Quadrate der Residuen</p> <p>SQT Summe der Quadrate der totalen Varianz</p> <p>n Anzahl (Elemente)</p> <p>q Anzahl (deterministischer unabhängiger Variablen)</p> <p>x_k k-tes Element (\vec{x})</p> <p>$f(x_k)$ k-tes Element ($\vec{f}(x)$)</p> <p>$\bar{f}(x)_{arithm}$ arithmetischer Mittelwert ($\vec{f}(x)$)</p> <p>$f(x_k, \vec{a}_{min})$ k-tes Element ($f(x, \vec{a}_{min})$)</p> <p>w_k k-ter Gewichtungsfaktor: $w_k = 1$ (keine Gewichtung)</p>

* Das Bestimmtheitsmaß $B = R^2$ gibt die Anpassungsgüte eines Anpassungsmodells an (Köhler, Schachtel *et al.*, 2012; Backhaus, Erichson *et al.*, 2018). Da B mit jeder weiteren stochastisch unabhängigen Variablen steigt, unabhängig davon, ob diese zur $Var_{erk}(\vec{f}(x))$ beiträgt oder nicht, erfolgt eine Korrektur/Adjustierung des Bestimmtheitsmaßes unter Berücksichtigung der Anpassungsmodellkomplexität: $B = R^2 \rightarrow B_{kor} = R_{kor}^2, B_{kor} \leq B$ (Backhaus, Erichson *et al.*, 2018). Diese dient u.a. der Vermeidung der Überanpassung (Bias = Verzerrung) des Anpassungsmodells an die empirischen Daten.

Abb. 1 zeigt den schematischen Aufbau, des in dieser Arbeit verwendeten Kasten-Antenne-Diagramms.

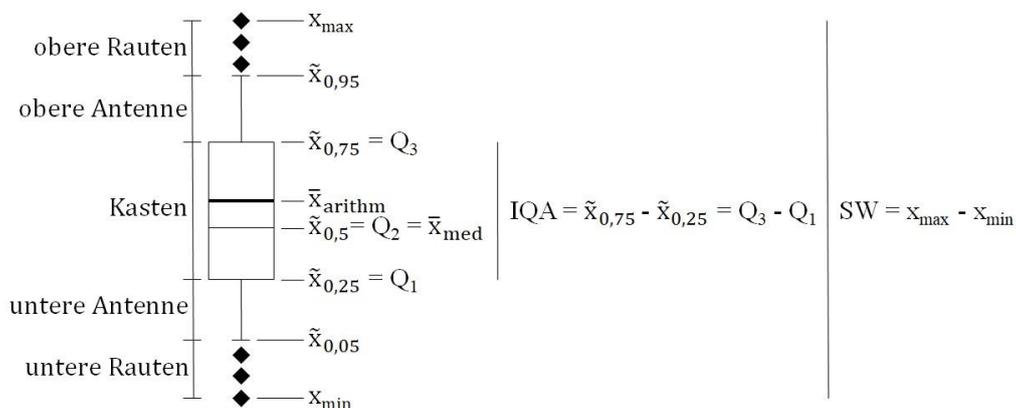


Abb. 1: Schematisches Kasten-Antenne-Diagramm (eigene Abb.)

x_{\max} bzw. x_{\min} maximales Element bzw. minimales Element; $\tilde{x}_{0,05}$, $\tilde{x}_{0,25} = Q_1$ (1. Quartil), $\tilde{x}_{0,50} = Q_2$ (2. Quartil) = \bar{x}_{med} (Median) (dünne Linie), $\tilde{x}_{0,75} = Q_3$ (3. Quartil), $\tilde{x}_{0,95}$ p-Quantile; \bar{x}_{arithm} arithmetischer Mittelwert (dicke Linie); Kasten IQR = $\tilde{x}_{0,75} - \tilde{x}_{0,25} = Q_3 - Q_1$ Interquartilabstand; untere Antenne $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten x_{\min} bis $\tilde{x}_{0,05}$, obere Rauten $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{\max} ; SW = $x_{\max} - x_{\min}$ Spannweite.

4.2.3.1.1 Induktive Statistik

4.2.3.1.1.1 Anpassungsmodelle

Im Folgenden ist der Optimierungsalgorithmus einer Anpassungsfunktion beschrieben. Für n experimentell bestimmte Datenpunkte $(x_k, f(x_k))$ ($k = 1, \dots, n$, $n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$) ist die nichtoptimierte Anpassungsfunktion der Form: $f: [x_{\min}, x_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}$, $x \mapsto f(x, \vec{a})$ ($\vec{a} = [a_1, \dots, a_m]^T$ (Gl. 5) unbekannt, $m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$) (Press, Teukolsky *et al.*, 2007; Urban und Mayerl, 2018). Es besteht eine lineare bzw. nichtlineare Abhängigkeit von \vec{a} mit der Bewertungsfunktion

$$\chi^2: \vec{a} \mapsto \chi^2(\vec{a}) = \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - f(x_k, \vec{a})}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2 \quad (\text{Gl. 6}), n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

(Press, Teukolsky *et al.*, 2007).

(Ist $s(\vec{f}(x_k)^T)$ unbekannt, so geht man von der Annahme $s(\vec{f}(x_k)^T) = \text{konst.}$ (Gl. 7) aus und setzt $s(\vec{f}(x_k)^T) = s(\vec{f}(x)) = 1$ (Gl. 8) (Press, Teukolsky *et al.*, 2007)) Daraus ergibt sich das Optimierungsproblem (Press, Teukolsky *et al.*, 2007):

$$\min_{\vec{a} \in \mathbb{R}^m} \chi^2(\vec{a})$$

Zur linearen Optimierung wird die Kleinste-Quadrate-Methode verwendet, zur nichtlinearen Optimierung die Levenberg-Marquardt-Methode, ein iterativer Minimierungsalgorithmus, der eine Kombination aus Gradienten- und Gauss-Newton-Methode darstellt (OriginLab, 2020; Press, Teukolsky *et al.*, 2007). Die Lösung des Optimierungsproblems ergibt sich aus dem Vektor $\vec{a}_{\min} = [\hat{a}_1, \dots, \hat{a}_m]^T$ (Gl. 9) ($m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$), durch den das hinreichende Optimalitätskriterium 2. Ordnung erfüllt wird (Ulbrich und Ulbrich, 2012; Reinhardt, Hoffmann *et al.*, 2013; Jungnickel, 2015; Stein, 2018; Papageorgiou, Leibold *et al.*, 2015):

$$\text{grad } \chi^2(\vec{a}_{\min}) = \vec{\nabla} \chi^2(\vec{a}_{\min}) = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial \hat{a}_1} \\ \vdots \\ \frac{\partial}{\partial \hat{a}_m} \end{bmatrix} \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{\min})}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2 = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial \hat{a}_1} \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{\min})}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2 \\ \vdots \\ \frac{\partial}{\partial \hat{a}_m} \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{\min})}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ \vdots \\ 0 \end{bmatrix} = \vec{0}$$

(Gl. 10) ($m, n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$) \Rightarrow $(\hat{a}_1, \dots, \hat{a}_m)$ kritischer Punkt

und

$$H(\chi^2(\vec{a}_{\min})) = \left(\frac{\partial^2}{\partial \hat{a}_p \partial \hat{a}_q} \chi^2(\vec{a}_{\min}) \right)_{p, q = 1, \dots, m} = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2}{\partial \hat{a}_1 \partial \hat{a}_1} \chi^2(\vec{a}_{\min}) & \cdots & \frac{\partial^2}{\partial \hat{a}_1 \partial \hat{a}_m} \chi^2(\vec{a}_{\min}) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial^2}{\partial \hat{a}_m \partial \hat{a}_1} \chi^2(\vec{a}_{\min}) & \cdots & \frac{\partial^2}{\partial \hat{a}_m \partial \hat{a}_m} \chi^2(\vec{a}_{\min}) \end{bmatrix}$$

(Gl. 11) ($m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$) positiv definit: $\vec{b}^T H(\chi^2(\vec{a}_{\min})) \vec{b} > 0$ (Gl. 12) $\forall \vec{b} \in \mathbb{R}^m \setminus \{\vec{0}\}$

H Hesse-Matrix

$\Rightarrow (\hat{a}_1, \dots, \hat{a}_m)$ strikter lokaler Minimalpunkt, d.h.

$$\min_{\vec{a} \in \mathbb{R}^m} \chi^2(\vec{a}) = \chi^2(\vec{a}_{\min}) = \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{\min})}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2 \quad (\text{Gl. 13}), n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

Die gesuchte optimierte Anpassungsfunktion ist $f_{\text{opt}}: [x_{\min}, x_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}, x \mapsto f_{\text{opt}}(x, \vec{a}_{\min})$. Die entsprechende Anpassungsgüte ist gegeben durch $B = R^2 \in [0, 1]$ bzw. $B_{\text{kor}} = R_{\text{kor}}^2 \leq 1$ ($B_{\text{kor}} \leq B$) (Köhler, Schachtel *et al.*, 2012; Backhaus, Erichson *et al.*, 2018; OriginLab, 2020). Zusätzlich ist der F-Statistik zu entnehmen, ob sich das Anpassungsmodell vom Modell $f(x) = \text{konst.}$ unterscheidet. Je höher der F-Wert

$$F = \frac{\frac{(\sum_{k=1}^{k=n} w_{k1} f(x_k)^2) - \text{SQR}(w_{k2})}{q}}{\frac{\text{SQR}(w_{k2})}{n-q}} = \frac{\frac{(\sum_{k=1}^{k=n} (w_{k1} f(x_k)^2)) - \sum_{k=1}^{k=n} (w_{k2} |f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{\min})|^2)}{q}}{\frac{\sum_{k=1}^{k=n} (w_{k2} |f(x_k) - f(x_k, \vec{a}_{\min})|^2)}{n-q}} \geq 1$$

- w_{k1} k-ter Gewichtungsfaktor 1
- w_{k2} k-ter Gewichtungsfaktor 2
- n Anzahl (Elemente) $\in \mathbb{N} \setminus \{0\}$
- q Anzahl (Parameter) $\in \mathbb{N} \setminus \{0\}$,

desto mehr unterscheidet sich das Anpassungsmodell vom Modell $f(x) = \text{konst.}$ ($p < 0,050 \Rightarrow$ signifikanter Unterschied zwischen $f_{\text{opt}}(x, \vec{a}_{\min})$ und $f(x) = \text{konst.}$) (OriginLab, 2020; Backhaus, Erichson *et al.*, 2018). Der beschriebene Optimierungsalgorithmus einer Anpassungsfunktion wird für die lineare (einfache lineare, polynomielle) (4.2.3.1.1.1.1), exponentielle (4.2.3.1.1.1.2) bzw. binäre logistische Anpassungsfunktion (4.2.3.1.1.1.3) verwendet.

4.2.3.1.1.1 Lineares Anpassungsmodell

Nichtoptimierte lineare Anpassungsfunktion (Matrixschreibweise) (Olive, 2017):

$$\vec{f}: [x_{\min}, x_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}^n, x \mapsto \vec{f}(x, \vec{a}) = [f_i(x_k)] \vec{a} \quad (\text{Gl. 14})$$

$$\Leftrightarrow \begin{bmatrix} f(x_1) \\ \vdots \\ f(x_n) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_1 f_1(x_1) & \cdots & a_m f_m(x_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_1 f_1(x_n) & \cdots & a_m f_m(x_n) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} f_1(x_1) & \cdots & f_m(x_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ f_1(x_n) & \cdots & f_m(x_n) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_1 \\ \vdots \\ a_m \end{bmatrix} \quad (\text{Gl. 15}),$$

$n, m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$

$f_k(x_k)$ k-te Basisfunktion

Somit ist $f(x_k, \vec{a}) = \vec{f}_1(x_k)^T \vec{a} = \sum_{l=1}^{l=m} a_l f_l(x_k) = a_1 f_1(x_k) + \dots + a_m f_m(x_k)$ (Gl. 16), $k = 1, \dots, n, n, m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$. Der Ausdruck „linear“ bezieht sich nur auf die lineare Abhängigkeit des Anpassungsmodells von \vec{a} , nicht auf die Abhängigkeit der Basisfunktion(en) von x . Aus der Bewertungsfunktion

$$\chi^2: \vec{a} \mapsto \chi^2(\vec{a}) = \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - \sum_{l=1}^{l=m} a_l f_l(x_k)}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2 \quad (\text{Gl. 17}), n, m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

ergibt sich das Optimierungsproblem $\min_{\vec{a} \in \mathbb{R}^m} \chi^2(\vec{a})$, dessen Lösung aus

$$\vec{a}_{\min} = ([f_i(x_k)]^T [f_i(x_k)])^{-1} [f_i(x_k)]^T \vec{f}(x) \quad (\text{Gl. 18})$$

$$\Leftrightarrow \begin{bmatrix} \hat{a}_1 \\ \vdots \\ \hat{a}_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_1 f_1(x_1) & \cdots & a_1 f_1(x_n) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_m f_m(x_1) & \cdots & a_m f_m(x_n) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_1 f_1(x_1) & \cdots & a_m f_m(x_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_1 f_1(x_n) & \cdots & a_m f_m(x_n) \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} a_1 f_1(x_1) & \cdots & a_1 f_1(x_n) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_m f_m(x_1) & \cdots & a_m f_m(x_n) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} f(x_1) \\ \vdots \\ f(x_n) \end{bmatrix}$$

$$(\text{Gl. 19}) \quad (n, m \in \mathbb{N} \setminus \{0\})$$

folgt:

$$\min_{\vec{a} \in \mathbb{R}^m} \chi^2(\vec{a}) = \chi^2(\vec{a}_{\min}) = \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - \sum_{l=1}^m \hat{a}_l f_l(x_k)}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2 \quad (\text{Gl. 20}) \quad (n, m \in \mathbb{N} \setminus \{0\})$$

Optimierte lineare Anpassungsfunktion (Matrixschreibweise):

$$\vec{f}_{\text{opt}}: [x_{\min}, x_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}^n, x \mapsto \vec{f}_{\text{opt}}(x, \vec{a}_{\min}) = [f_i(x_k)] \vec{a}_{\min} \quad (\text{Gl. 21})$$

$$\Leftrightarrow \begin{bmatrix} f(x_1, \vec{a}_{\min}) \\ \vdots \\ f(x_n, \vec{a}_{\min}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \hat{a}_1 f_1(x_1) & \cdots & \hat{a}_m f_m(x_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \hat{a}_1 f_1(x_n) & \cdots & \hat{a}_m f_m(x_n) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} f_1(x_1) & \cdots & f_m(x_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ f_1(x_n) & \cdots & f_m(x_n) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{a}_1 \\ \vdots \\ \hat{a}_m \end{bmatrix} \quad (\text{Gl. 22}),$$

$$n, m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

In dieser Arbeit treten 2 Spezialfälle auf, die einfache lineare und die polynomielle Anpassungsfunktion.

4.2.3.1.1.1.1 Einfaches lineares Anpassungsmodell

Optimierte einfache lineare Anpassungsfunktion (Anpassungsgeradenfunktion, Anpassungsgerade = beste Gerade) (Olive, 2017):

$$f_{\text{opt}}: [x_{\min}, x_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}, x \mapsto f_{\text{opt}}(x, \vec{a}_{\min}) = \hat{a}_1 + \hat{a}_2 x \quad (\text{Gl. 23})$$

\hat{a}_1 y-Achsenabschnitt

\hat{a}_2 Steigung

In dieser Arbeit nimmt x verschiedene physikalische Größen an. Die Anpassungsgüte ergibt sich aus dem (korrigierten) Bestimmtheitsmaß, das sich aus dem Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten berechnet (Köhler, Schachtel *et al.*, 2012; Backhaus, Erichson *et al.*, 2018; OriginLab, 2020):

$$B = R^2 = r(\vec{x}, \vec{f}(x))^2 \quad (\text{Gl. 24})$$

bzw.

$$B_{\text{kor}} = R_{\text{kor}}^2 = 1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-q} = 1 - (1 - r(\vec{x}, \vec{f}(x))^2) \frac{n-1}{n-q} \quad (\text{Gl. 25})$$

4.2.3.1.1.1.2 Polynomielles Anpassungsmodell

Optimierte polynomielle Anpassungsfunktion (Olive, 2017):

$$f_{\text{opt}}: [x_{\min}, x_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}, x \mapsto f_{\text{opt}}(x, \vec{a}_{\min}) = \hat{a}_0 + \sum_{k=1}^{k=m} \hat{a}_k x^k = \hat{a}_0 + \hat{a}_1 x^1 + \dots + \hat{a}_m x^m \quad (\text{Gl. 26}),$$

$$m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

\hat{a}_0 y-Achsenabschnitt

$\hat{a}_{k=1, \dots, m}$ Anpassungskoeffizienten

Die polynomielle Anpassung wird in dieser Arbeit im Rahmen der Savitzky-Golay-Methode verwendet, wobei x die Zeit t $\in [t_{\min}, t_{\max}]$ ist. Hierbei erfolgt die Faltung der Funktionswerte $f(t)$ und $f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\min})$,

d.h. $f(t) * f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}})$, oder signaltheoretisch ausgedrückt, eine Rauschunterdrückung via Tiefpaßfilterung (OriginLab, 2020; Press, Teukolsky *et al.*, 2007):

1. Definition:

N Anzahl Datenpunkte im beweglichen Intervall $[t_k - [0,5N], t_k + [0,5N]]$ ($k = 1, \dots, n, n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$)

m Grad der polynomiellen Anpassungsfunktion

Notation in dieser Arbeit: SGM(m, N)

2. Polynomielle Anpassung im Intervall $[t_1 - [0,5N], t_1 + [0,5N]]$ mit linearer Optimierung durch die Kleinste-Quadrate-Methode (Von den N erhaltenen Werten ist $f_{\text{opt}}(t_1, \vec{a}_{\text{min}})$ der gesuchte Wert)

3. Ersatz: $f(t_1) \rightarrow f_{\text{opt}}(t_1, \vec{a}_{\text{min}})$

4. Verschiebung des beweglichen Intervalls um 1 Datenpunkt: $[t_2 - [0,5N], t_2 + [0,5N]]$

5. Polynomielle Anpassung im Intervall $[t_2 - [0,5N], t_2 + [0,5N]]$ mit linearer Optimierung durch die Kleinste-Quadrate-Methode (Von den N erhaltenen Werten ist $f_{\text{opt}}(t_2, \vec{a}_{\text{min}})$ der gesuchte Wert)

6. Ersatz: $f(t_2) \rightarrow f_{\text{opt}}(t_2, \vec{a}_{\text{min}})$

7. Wiederholung: 4. bis 6. für $k = 3, \dots, n, n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$

4.2.3.1.1.2 Exponentielles Anpassungsmodell

Nichtoptimierte mehrfache exponentielle Anpassungsfunktion (Superposition m exponentieller Anpassungsfunktionen) (Backhaus, Erichson *et al.*, 2018; Papula, 2017):

$$f: [x_{\text{min}}, x_{\text{max}}] \rightarrow \mathbb{R}, x \mapsto f(x, [a_{jl}]) = \sum_{d=1}^{d=m} (a_{d1} + a_{d2} a_{d3}^x) \quad (\text{Gl. 27}),$$

$$[a_{jl}] = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{m1} & a_{m2} & a_{m3} \end{bmatrix} \quad (\text{Gl. 28}), m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

Aus der Bewertungsfunktion

$$\chi^2: [a_{jl}] \mapsto \chi^2([a_{jl}]) = \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - f(x_k, [a_{jl}])}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2 \quad (\text{Gl. 29}), j, l, n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

ergibt sich das Optimierungsproblem $\min_{\vec{a} \in \mathbb{R}^m} \chi^2([a_{jl}])$, dessen Lösung $\min_{\vec{a} \in \mathbb{R}^m} \chi^2([a_{jl}]) = \chi^2([a_{jl}]_{\text{min}}) = \sum_{k=1}^{k=n} \left(\frac{f(x_k) - f(x_k, [a_{jl}]_{\text{min}})}{s(\vec{f}(x_k)^T)} \right)^2$ (Gl. 30) ($j, l, n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$) ist.

Optimierte mehrfache exponentielle Anpassungsfunktion:

$$f_{\text{opt}}: [x_{\text{min}}, x_{\text{max}}] \rightarrow \mathbb{R}, x \mapsto f_{\text{opt}}(x, [a_{jl}]_{\text{min}}) = \sum_{d=1}^{d=m} (\hat{a}_{d1} + \hat{a}_{d2} \hat{a}_{d3}^x) \quad (\text{Gl. 31}), m \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

Es gilt $\hat{a}_{d3}^x = e^{\log_e \hat{a}_{d3}^x} = e^{\lambda_{d3} x}$ (Gl. 32), zusätzlich ist $f_{\text{opt}}(x, [a_{jl}]_{\text{min}})$ im Intervall $[x_{\text{min}}, x_{\text{max}}]$ streng monoton fallend, d.h. $\hat{a}_{d3}^x = e^{-\lambda_{d3} x}$ (Gl. 33) und $\lim_{x \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(x, [a_{jl}]_{\text{min}}) = \sum_{d=1}^{d=m} \hat{a}_{d1}$ (Gl. 34) ($f_{\text{opt}}(x, [a_{jl}]_{\text{min}}) = \sum_{d=1}^{d=m} a_{d1}$ (Gl. 35) Asymptote für $x \rightarrow \infty$) (Papula, 2017). In dieser Arbeit ist x die Zeit $t \in [t_{\text{min}}, t_{\text{max}}]$,

so dass $e^{-\lambda_{d3}x} = e^{-\lambda_{d3}t} = e^{-\frac{t}{\tau_{d3}}}$ (Gl. 36) (τ_{d3} d3-te Abklingzeitkonstante [τ_{d3}] = s). Es werden eine modifizierte einfache exponentielle Anpassungsfunktion

$$f_{\text{opt}}: [t_{\min}, t_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\max}}{\tau_1}} \quad (\text{Gl. 37}),$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(t) = a_{11} \quad (\text{Gl. 38}) \quad (f_{\text{opt}}(t) = a_{11} \quad (\text{Gl. 39}) \text{ Asymptote für } t \rightarrow \infty),$$

$$f_{\text{opt}}(\tau_1) = a_{11} + \frac{1}{e} a_{12} \approx a_{11} + 0,368 a_{12} \quad (\text{Gl. 40})$$

und eine modifizierte zweifache exponentielle Anpassungsfunktion

$$f_{\text{opt}}: [t_{\min}, t_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\max}}{\tau_1}} + a_{22} e^{-\frac{t-0,5t_{\max}}{\tau_2}} \quad (\text{Gl. 41}),$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(t) = a_{11} \quad (\text{Gl. 42}) \quad (f_{\text{opt}}(t) = a_{11} \quad (\text{Gl. 43}) \text{ Asymptote für } t \rightarrow \infty),$$

$$f_{\text{opt}}(\tau_1) = a_{11} + \frac{1}{e} a_{12} \approx a_{11} + 0,368 a_{12} \quad (\text{Gl. 44}), \quad f_{\text{opt}}(\tau_2) = a_{11} + \frac{1}{e} a_{22} \approx a_{11} + 0,368 a_{22} \quad (\text{Gl. 45})$$

verwendet, deren nichtlineare Optimierungen durch die Levenberg-Marquardt-Methode erfolgt (OriginLab, 2020).

4.2.3.1.1.3 Logistisches Anpassungsmodell

Aus der logistischen Funktion $f: \mathbb{R} \rightarrow (0, 1)$, $x \mapsto f(x) = \frac{1}{1+e^{-x}}$ (Gl. 46) ergibt sich die nichtoptimierte binäre logistische Anpassungsfunktion (Matrixschreibweise) zur Beschreibung eines Ereignisses mit dichotomem Ausgang (Behnke, 2015; Urban und Mayerl, 2018; Kleinbaum und Klein, 2010):

$$f: [x_{\min}, x_{\max}] \rightarrow (0, 1), x \mapsto f(x, \vec{a}) = \frac{1}{1+e^{-(a_0 + \sum_{k=1}^{k=n} (a_k x_k))}} \quad (\text{Gl. 47}), n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

$$\left(\lim_{x \rightarrow -\infty} f(x, \vec{a}) = 0 \quad (\text{Gl. 48}) \text{ z.B. „Ereignis tritt nicht ein“}, \right.$$

$$\left. \lim_{x \rightarrow \infty} f(x, \vec{a}) = 1 \quad (\text{Gl. 49}) \text{ z.B. „Ereignis tritt ein“} \right)$$

\vec{a}_{\min} kann durch die Maximale-Mutmaßlichkeits-Methode bestimmt werden und liefert die optimierte binäre logistische Anpassungsfunktion (Matrixschreibweise) (Kleinbaum und Klein, 2010):

$$f_{\text{opt}}: [x_{\min}, x_{\max}] \rightarrow (0, 1), x \mapsto f_{\text{opt}}(x, \vec{a}_{\min}) = \frac{1}{1+e^{-(\hat{a}_0 + \sum_{k=1}^{k=n} (\hat{a}_k x_k))}} \quad (\text{Gl. 50}), n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

In dieser Arbeit ist x die Zeit $t \in [189 \text{ s}, t_{\max}]$. Es wird eine modifizierte binäre logistische Anpassungsfunktion

$$f_{\text{opt}}: [189 \text{ s}, t_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_2 + \frac{a_1 - a_2}{1 + \left(\frac{t}{0,5t_{\max}}\right)^p} \quad (\text{Gl. 51}),$$

$$f_{\text{opt}}(189 \text{ s}) = a_1 \quad (\text{Gl. 52}), \quad \lim_{t \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(t) = a_2 \quad (\text{Gl. 53}) \quad (f_{\text{opt}}(t) = a_2 \quad (\text{Gl. 54}) \text{ Asymptote für } t \rightarrow \infty)$$

verwendet, deren nichtlineare Optimierung durch die Levenberg-Marquardt-Methode erfolgt (OriginLab, 2020).

4.2.3.1.1.2 Hypothesentests

2 unabhängige Stichproben wurden stets paarweise miteinander verglichen. Folgender Algorithmus wurde verwendet (Toutenburg und Heumann, 2008; Cleff, 2019; Bourier, 2018; Janczyk und Pfister, 2020; Kosfeld, Eckey *et al.*, 2019):

1. 2 unabhängige Stichproben
2. Normalverteilungstest (Shapiro-Wilk-Test)
3. 2 parametrische unabhängige Stichproben: parametrischer Signifikanztest (Student-t-Test STT (2 ungepaarte Stichproben, 2-seitig))
 ≥ 1 nichtparametrische unabhängige Stichprobe: nichtparametrischer Signifikanztest (Kolmogorov-Smirnoff-Test KST)

Für eine Signifikanzzahl (α -Fehler) von $\alpha = 0,050$ werden die p-Wertintervalle wie in Tab. 21 dargestellt symbolisiert.

Tab. 21: p-Wertintervalle und deren Symbole

p-Wert	Symbol
$p \geq 0,050$	n.s. (nicht signifikant)
$0,010 \leq p < 0,050$	*
$0,001 \leq p < 0,010$	**
$p < 0,001$	***

4.2.3.2 Software (Datenauswertung, Datenrepräsentation)

Zur Datenauswertung wurden Microsoft® Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und ORIGIN® 2016 Graphing & Analysis (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) verwendet, zur Datenrepräsentation das Vektorgrafikprogramm CorelDRAW®X4 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

4.2.3.3 Fluoreszenz

Da es in dieser Arbeit grundsätzlich um Fluoreszenz geht, soll diese im Folgenden genau beschrieben werden. Die in 4.2.3.3 aufgeführten Gleichungen dienen lediglich dem Verständnis, werden jedoch in dieser Arbeit nicht weiter verwendet. Nach der Heisenberg-Unschärferelation ist es nicht möglich, die Koordinaten des Teilchenortes ($\vec{x}_1, \vec{x}_2, \vec{x}_3$) und die Koordinaten der Ortskomponente des Teilchenimpulses ($\vec{p} = m \vec{v}$ (Gl. 55); m Masse [m] = kg, \vec{v} Geschwindigkeit [\vec{v}] = m s⁻¹) eines Teilchens (z.B. Elektron) gleichzeitig mit absoluter Genauigkeit zu bestimmen, da dieses eine intrinsische Eigenschaft der Teilchen ist (Heisenberg, 1927):

$$\Delta \vec{x}_1 / \vec{x}_2 / \vec{x}_3 \Delta \vec{p}_{\vec{x}_1 / \vec{x}_2 / \vec{x}_3} \geq \frac{\hbar}{2} \quad (\text{Gl. 56})$$

$$\Leftrightarrow \Delta \vec{x}_1 / \vec{x}_2 / \vec{x}_3 \Delta \vec{p}_{\vec{x}_1 / \vec{x}_2 / \vec{x}_3} \geq \frac{\hbar}{4\pi} \quad (\text{Gl. 57})$$

$\Delta\vec{x}_1/\vec{x}_2/\vec{x}_3$ Ortsunschärfe
 $\Delta\vec{p}_{\vec{x}_1/\vec{x}_2/\vec{x}_3}$ Teilchenimpulsunschärfe

\hbar $\frac{h}{2\pi}$ ca. $1,055 \cdot 10^{-34}$ J s

h Planck-Wirkungsquantum ca. $6,626 \cdot 10^{-34}$ J s

Der Welle-Teilchen-Dualismus beschreibt das Phänomen, dass jede elektromagnetische Welle (EMW) Materieteilchencharakter und jedes Materieteilchen (z.B. Elektron) Wellencharakter besitzt, sog. Materiewellen (de Broglie-Wellen) (Demtröder, 2016). Die de Broglie-Wellenlänge berechnet sich nach:

$$\lambda = \frac{h}{\vec{p}} = \frac{h}{m \vec{v}} \quad (\text{Gl. 58})$$

λ de Broglie-Wellenlänge [λ] = nm

h Planck-Wirkungsquantum ca. $6,626 \cdot 10^{-34}$ J s

\vec{p} Materieteilchenimpuls [\vec{p}] = kg m s⁻¹

m Materieteilchenmasse [m] = kg

\vec{v} Materieteilchengeschwindigkeit [\vec{v}] = m s⁻¹

Werden Planck-Beziehung $E = h f = h \frac{c}{\lambda}$ (Gl. 59) (h Planck-Wirkungsquantum ca. $6,626 \cdot 10^{-34}$ J s, f Frequenz [f] = s⁻¹, c Lichtgeschwindigkeit ca. $2,998 \cdot 10^8$ m s⁻¹, λ Wellenlänge [λ] = nm) und Einstein-Beziehung $E = m c^2$ (Gl. 60) (E Energie [E] = J, m Masse [m] = kg, c Lichtgeschwindigkeit ca. $2,998 \cdot 10^8$ m s⁻¹) gleichgesetzt, ergibt sich der Zusammenhang zwischen Länge und Masse einer EMW (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017):

$$\lambda = \frac{h}{m c} \quad (\text{Gl. 61})$$

λ Wellenlänge [λ] = nm

h Planck-Wirkungsquantum ca. $6,626 \cdot 10^{-34}$ J s

m Masse [m] = kg

c Lichtgeschwindigkeit ca. $2,998 \cdot 10^8$ m s⁻¹

Somit ist die Bewegung eines Materieteilchens (z.B. Elektron) in der Raumzeit durch eine Wellenfunktion, in der zeitabhängigen Schrödinger-Gleichung, beschreibbar (Fließbach, 2018):

$$\hat{H} \Psi(\vec{x}, t) = i \hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\vec{x}, t) = \left(-\frac{\hbar}{2m} \Delta + V(\vec{x}, t) \right) \Psi(\vec{x}, t) = -\frac{\hbar}{2m} \Delta \Psi(\vec{x}, t) + V(\vec{x}, t) \Psi(\vec{x}, t) = -\frac{\hbar}{2m} \vec{\nabla}^2 \Psi(\vec{x}, t) + V(\vec{x}, t) \Psi(\vec{x}, t) = -\frac{\hbar}{2m} \left(\sum_{i=1}^3 \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} \right) \Psi(\vec{x}, t) + V(\vec{x}, t) \Psi(\vec{x}, t) \quad (\text{Gl. 62})$$

\hat{H} Hamilton-Operator

$\Psi(\vec{x}, t)$ Wellenfunktion (\vec{x}, t)

i imaginäre Einheit $i^2 = -1$

\hbar	$\frac{h}{2\pi}$ ca. $1,055 \cdot 10^{-34}$ J s h Planck-Wirkungsquantum ca. $6,626 \cdot 10^{-34}$ J s
m	Masse [m] = kg
Δ	Laplace-Operator
$\vec{\nabla}$	Nabla-Operator
$V(\vec{x}, t)$	Potential (\vec{x} , t)
\vec{x}	Ortsvektor $[x_1, x_2, x_3]^T$
t	Zeit [t] = s

Es handelt sich um eine komplexwertige lineare partielle DGL 2. Ordnung, die durch Variablenseparation gelöst werden kann (Lechner, 2017). Ansatz:

$$\Psi(\vec{x}, t) = \psi(\vec{x}) \phi(t) \quad (\text{Gl. 63})$$

$\Psi(\vec{x}, t)$	Wellenfunktion (\vec{x} , t)
$\psi(\vec{x})$	Wellenfunktion (\vec{x})
$\phi(t)$	Störfunktion (t)
\vec{x}	Ortsvektor $[x_1, x_2, x_3]^T$
t	Zeit [t] = s

Sei $\Psi(\vec{x}, t)$ die Lösung der zeitabhängigen Schrödinger-Gleichung, so ergibt deren Betragsquadrat die Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeit (Wiberg, Wiberg et al., 2017). Diese ist zeitunabhängig

$$|\Psi(\vec{x}, t)|^2 = |\psi(\vec{x})|^2 \quad (\text{Gl. 64})$$

und berechnet sich für ein infinitesimales Volumenelement $dV = d(x_1, x_2, x_3) = dx_1 dx_2 dx_3$ durch $|\Psi(\vec{x}, t)|^2 dV$, was als mittlere Elektronenladungsdichte interpretierbar ist. Graphische Darstellung der radialen Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeit (radiale Elektronendichte) $|\Psi(\vec{x}, t)|^2 dV_r = |\Psi(\vec{x}, t)|^2 4\pi r^2 dr$ (Gl. 65) in Abhängigkeit vom Atomkernabstand r liefert die radiale Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung mit linkssteilen Verteilungen. Aufsummiert über alle dV beträgt die Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeit 1 (100 %) (Normierungsbedingung):

$$\int_V |\Psi(\vec{x}, t)|^2 dV = 1 \quad (\text{Gl. 66})$$

Der Raum in dem die Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeit ca. 0,9 (90 %) beträgt, wird als Atomorbital (AO) bezeichnet und ist damit eine Lösung der Schrödinger-Gleichung (Wiberg, Wiberg et al., 2017). Unterschieden werden 1 ns-AO, 3 energieentartete np-AO (np_x -, np_y -, np_z -AO), 5 energieentartete nd-AO (nd_{xy} -, nd_{xz} -, nd_{yz} -, $nd_{x^2-y^2}$ -, nd_{z^2} -AO) und 7 energieentartete nf-AO (nf_{xz^2} -, nf_{yz^2} -, nf_{xyz} -, $nf_{x(x^2-3y^2)}$ -, $nf_{y(3x^2-y^2)}$ -, $nf_{z(x^2-y^2)}$ -, nf_{z^3} -AO) (Hauptquantenzahl $n \in \mathbb{N}\{0\}$). Ein AO kann mit maximal 2 Elektronen unterschiedlicher magnetischer Spinquantenzahl ($m_s = \pm \frac{1}{2}$) besetzt werden (Pauli-Prinzip: ≥ 2 Elektronen eines Atoms dürfen nicht in allen 4 Quantenzahlen

(Hauptquantenzahl $n \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$; Nebenquantenzahl $l = 0, 1, \dots, n-1$; magnetische (Bahn-)Quantenzahl $m_l = -l, \dots, -1, 0, 1, \dots, +l$; magnetische Spinquantenzahl $m_s = \pm \frac{1}{2}$ übereinstimmen), wobei energieentartete Zustände (p-, d-, f-Orbitale) zunächst einzeln mit Elektronen gleicher magnetischer Spinquantenzahl besetzt werden (Hund-Regel) (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). Durch geeignete räumliche Nähe und Orientierung zueinander, kann es zu elektrostatischen Wechselwirkungen der Valenzelektronen (VE) eines Atoms mit dem Atomkern eines anderen Atoms kommen und vice versa. Es gilt das Coulomb-Gesetz (Roth und Stahl, 2018):

$$\vec{F} = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi \epsilon_0 \vec{r}_{12}^2} \quad (\text{Gl. 67})$$

\vec{F}	Coulomb-Kraft [\vec{F}] = N
Q_1	Ladung 1 [Q_1] = C
Q_2	Ladung 2 [Q_2] = C
ϵ_0	elekt. Feldkonstante ca. $8,854 \cdot 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$
	$\epsilon_0 = \frac{1}{\mu_0 c^2}$
	μ_0 magnet. Feldkonstante $4\pi \cdot 10^{-7} \text{ H m}^{-1}$
	c Lichtgeschwindigkeit ca. $2,998 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$

\vec{r}_{12} Vektor (Mittelpunkt Q_1 zu Mittelpunkt Q_2) [\vec{r}_{12}] = m

Die dabei auftretende VE-AO-Überlappung der beteiligten Atome kann zur Ausbildung einer kovalenten Bindung führen (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). Hierbei ist der mittlere Atomkernabstand im Gleichgewichtszustand durch ein Energieminimum gekennzeichnet. Gesprochen wird von einem mittleren Atomkernabstand, da Atomkerne selbst am absoluten Nullpunkt ($T = 0 \text{ K}$) eine Nullpunktsenergie und somit eine Nullpunktsschwingung um ihre Gleichgewichtslage besitzen. Der VE-AO-Überlappungsgrad ist durch das AO-Überlappungsintegral gegeben:

$$\int_V \Psi_1(\vec{x}_1, t_1) \Psi_2(\vec{x}_2, t_2) dV \quad (\text{Gl. 68})$$

$\Psi_1(\vec{x}_1, t_1)$ Wellenfunktion (\vec{x}_1, t_1) (Atom 1)

$\Psi_2(\vec{x}_2, t_2)$ Wellenfunktion (\vec{x}_2, t_2) (Atom 2)

Es resultiert eine Änderung der Elektronenaufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung unter Bildung eines Molekülorbitals (MO) (σ -, π -, δ -MO) (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). Die Elektronenbesetzung der MO erfolgt gemäß Pauli-Prinzip und Hund-Regel. Eine Strukturvorhersage der MO ist durch ein Approximationsverfahren möglich, die Linearkombination von AO zu MO (LCAO-MO-Methode) (Lechner, 2017). Bei der LCAO-MO-Methode werden die AO, die an der kovalenten Bindung beteiligt sind, addiert/subtrahiert: $\Psi_1(\vec{x}_1, t_1) \pm \Psi_2(\vec{x}_2, t_2)$ (positive/negative Interferenz der Schwingungsamplituden bzw. symmetrische/antisymmetrische Kombination der, an der chemischen Bindung beteiligten, AO). Dabei kann es zusätzlich zur Linearkombination (Hybridisierung, Mischung) der AO innerhalb der beteiligten Atome kommen (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). Es entstehen

energieentartete Hybridorbitale (HO) (sp^x -, $sp^x d^y$ -, sd^x -HO). Positive Interferenz der Schwingungsamplituden induziert die Bildung eines energieärmeren bindenden MO, negative Interferenz der Schwingungsamplituden die Bildung eines energiereicheren antibindenden MO mit Knotenfläche (Fläche mit $|\Psi(\vec{x}, t)|^2 = 0$) orthogonal zur Atomkernverbindungsachse (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). σ -, π - und δ -MO sind weiter durch 0 (σ -MO: rotationssymmetrisch), 1 (π -MO: spiegelsymmetrisch) und 2 (δ -MO: doppelt spiegelsymmetrisch, d.h. punktsymmetrisch) Knotenflächen in Richtung Atomkernverbindungsachse charakterisiert und an der Ausbildung der σ -, π - und δ -Bindung beteiligt. Für die Fluoreszenz sind Systeme konjugierter Doppelbindungen entscheidend (Valeur und Berberan-Santos, 2012a), weshalb auf diese weiter eingegangen wird. σ -Bindungen resultieren aus Orbitalüberlappung auf der Atomkernverbindungsachse (hohe $|\Psi(\vec{x}, t)|^2$ auf Atomkernverbindungsachse), π -Bindungen durch laterale Überlappung hantelförmiger p-Orbitale, deren Längsachsen parallel zueinander und orthogonal zur Atomkernverbindungsachse (hohe $|\Psi(\vec{x}, t)|^2$ ober- und unterhalb der Atomkernverbindungsachse) verlaufen (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). In mehratomigen Molekülen können die MO an der Stelle der kovalenten Bindung lokalisiert sein (bizentrische/monozentrische lokalisierte MO) bzw. sich über einen Molekülbereich oder das gesamte Molekül erstrecken (polyzentrische delokalisierte MO). Einfachbindungen setzen sich aus 1 σ -Bindung, Doppelbindungen aus 1 σ - und 1 π -Bindung zusammen (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). Konjugierte Doppelbindungen bestehen aus 2 Doppelbindungen, die durch 1 Einfachbindung getrennt werden. Hier kann die laterale Überlappung mehrerer (> 2) jeweils benachbarter, parallel angeordneter p-Orbitale zur Ausbildung delocalisierter π -MO (delokalisierte π -Bindungen) führen. Es liegt ein energetischer Mischzustand vor, der durch mehrere Grenzstrukturformeln beschrieben wird (Resonanz, Mesomerie), das gesamte Resonanzsystem wird als Resonanzhybrid bezeichnet (Wiberg, Wiberg *et al.*, 2017). Linear polarisierte EMW sind Transversalwellen, deren elektr. Feld und magnet. Feld orthogonal zueinander und jeweils orthogonal zur Ausbreitungsrichtung verlaufen ($(\vec{E}(\vec{x}_1, t_1), \vec{B}(\vec{x}_2, t_2)) = 0$ und $\vec{E}(\vec{x}_1, t_1)$ bzw. $\vec{B}(\vec{x}_2, t_2) \perp$ Ausbreitungsrichtung; $\vec{E}(\vec{x}_1, t_1)$ elektr. Feldstärke (\vec{x}_1, t_1) [$\vec{E}(\vec{x}_1, t_1)] = V m^{-1}$, $\vec{B}(\vec{x}_2, t_2)$ magnet. Feldstärke (\vec{x}_2, t_2) [$\vec{B}(\vec{x}_2, t_2)] = T$) (Roth und Stahl, 2018). $\vec{E}(\vec{x}_1, t_1)$ und $\vec{B}(\vec{x}_2, t_2)$ sind durch die 1. und 2. Maxwell-Gleichung gekoppelt, die 3. und 4. Maxwell-Gleichung beschreiben deren Divergenz. Es handelt sich um ein System linearer partieller DGL 1. Ordnung:

$$1. \quad \text{rot } \vec{E}(\vec{x}_1, t_1) = - \frac{\partial}{\partial t} \vec{B}(\vec{x}_2, t_2) \quad (\text{Gl. 69})$$

$$2. \quad \text{rot } \vec{B}(\vec{x}_2, t_2) = \mu_0 \vec{j}(\vec{x}_3) + \mu_0 \varepsilon_0 \frac{\partial}{\partial t} \vec{E}(\vec{x}_1, t_1) \quad (\text{Gl. 70})$$

$$3. \quad \text{div } \vec{E}(\vec{x}_1, t_1) = \frac{\rho}{\varepsilon_0} \quad (\text{Gl. 71})$$

$$4. \quad \text{div } \vec{B}(\vec{x}_2, t_2) = 0 \quad (\text{Gl. 72})$$

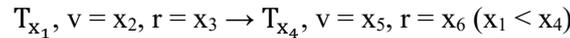
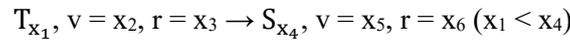
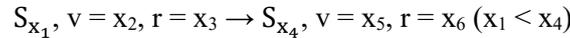
$\vec{E}(\vec{x}_1, t_1)$	elektr. Feldstärke (\vec{x}_1, t_1) $[\vec{E}(\vec{x}_1, t_1)] = \text{V m}^{-1}$
$\vec{B}(\vec{x}_2, t_2)$	magnet. Feldstärke (\vec{x}_2, t_2) $[\vec{B}(\vec{x}_2, t_2)] = \text{T}$
$\vec{j}(\vec{x}_3)$	Stromdichte $[\vec{j}(\vec{x}_3)] = \text{A m}^{-2}$
μ_0	magnet. Feldkonstante $4\pi \cdot 10^{-7} \text{ H m}^{-1}$
ϵ_0	elektr. Feldkonstante ca. $8,854 \cdot 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$
	$\epsilon_0 = \frac{1}{\mu_0 c^2}$
	c Lichtgeschwindigkeit ca. $2,998 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$
ρ	Ladungsdichte $[\rho] = \text{C m}^{-3}$

Gemäß der Planck-Beziehung (Gl. 59) gilt $E \sim \frac{1}{\lambda}$ (E Energie $[E] = \text{J}$, λ Wellenlänge $[\lambda] = \text{nm}$). Zusätzlich weist Energie eine Quantisierung (Quantelung) auf, d.h. Energie kann nur diskrete Werte annehmen bzw. nur in diskreten Paketen (Quanten) transferiert/freigesetzt werden, ein kontinuierliches Spektrum existiert nicht (Lechner, 2017). Ähnliches gilt für die verschiedenen Energieniveaus, die von Elektronen innerhalb eines Atoms/Moleküls besetzt werden können, die ebenfalls einer Quantisierung unterliegen und kein kontinuierliches Spektrum aufweisen (Reinhold, 2015; Demtröder, 2016). Bei der Wechselwirkung zwischen EMW und Elektronen (VE der VE-MO bzw. freie Elektronen/Elektronenpaare nichtbindender MO) können die EMW von den Elektronen absorbiert werden (Aktivierung) (Lottspeich und Engels, 2018). Dabei wird die Energie der EMW auf die Elektronen transferiert (Exzitation), so dass es entweder zum Elektronenübergang auf ein höheres Energieniveau im Molekül (Promotion) kommt, oder diese aus dem Molekül gelöst werden (photoelektrischer Effekt, Ionisierung). Folglich muß die transferierte Energie bei Promotion genau der Energiedifferenz (Energieslücke) zwischen den beteiligten Energieniveaus entsprechen und ist für verschiedene Elektronenübergänge unterschiedlich hoch. I.A. folgt sie der Sequenz: $\sigma \rightarrow \sigma^* > \sigma \rightarrow \pi^* > n \rightarrow \sigma^* > \pi \rightarrow \pi^* > n \rightarrow \pi^*$ (Valeur und Berberan-Santos, 2012a). Für die Fluoreszenz sind $\pi \rightarrow \pi^*$ -Elektronenübergänge von entscheidender Bedeutung. Vor Exzitation eines oder mehrerer Elektronen befindet sich das Molekül im sog. Grundzustand, danach im Exzitationszustand. Je nach Weg, dem ein angeregtes Elektron beim Übergang auf das ursprüngliche Energieniveau folgt (Deaktivierung, Relaxation), wird Energie in Form von thermischer Energie und/oder EMW frei, wobei es zum Phänomen der Fluoreszenz kommen kann (Valeur und Berberan-Santos, 2012b; Lottspeich und Engels, 2018). Unterschieden werden Singulettzustände (S_0, S_1, \dots, S_n) und Triplettzustände (T_1, T_2, \dots, T_n). S_0 sei der Grundzustand, S_1 bis S_n und T_1 bis T_n Exzitationszustände. Die energetische Sequenz ist: $S_0 < T_1 < S_1 < T_2 < S_2 < \dots < T_n < S_n$. Jeder Singulettzustand/Triplettzustand spaltet sich in Schwingungsniveaus (Vibrationsniveaus: $v = 0, v = 1, \dots, v = n$) und jedes Schwingungsniveau spaltet sich in Rotationsniveaus ($r = 0, r = 1, \dots, r = n$). Singulettzustände/Triplettzustände liegen somit als diskontinuierliche Energiebänder vor, die sich partiell überlappen (vgl. Energiebändermodell bei Leitern, Halbleiter, Nichtleitern mit Valenz- und Leitungsbändern), eine strikte Separation ist nicht möglich. Folgende

Phänomene bzw. Elektronenübergänge sind von Bedeutung ($x_1, x_2, \dots, x_7 \in \mathbb{N}$) (Valeur und Berberan-Santos, 2012b; Lottspeich und Engels, 2018):

Aktivierung

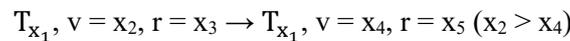
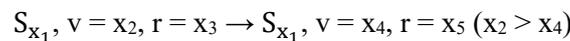
Absorption (10^{-15} s):



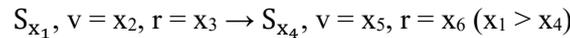
Deaktivierung

Nichtstrahlungsdeaktivierung

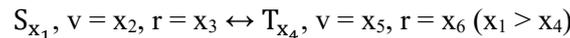
Schwingungsdeaktivierung (Vibrationsrelaxation) (10^{-12} bis 10^{-10} s):



interne Konversion (innere Umwandlung) (10^{-11} bis 10^{-9} s):

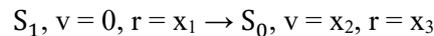


Interkombination (10^{-10} bis 10^{-8} s):

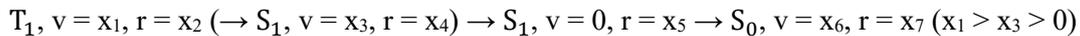


Strahlungsdeaktivierung

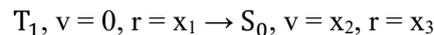
Fluoreszenz (10^{-10} bis 10^{-7} s):



verzögerte Fluoreszenz:



Phosphoreszenz (10^{-6} bis 10 s):



Die Aktivierung erfolgt durch Energietransfer. Kommt es dabei zur Absorption von EMW, so berechnet sich die Absorption bei bestimmter Wellenlänge in Approximation nach dem Lambert-Beer-Gesetz (Gey, 2015):

$$A_\lambda = -\log_{10} T_\lambda = \log_{10} \frac{I_{\lambda 0}}{I_\lambda} = \varepsilon_\lambda c l \quad (\text{Gl. 73})$$

A_λ	Absorption bei Wellenlänge λ
T_λ	Transmission bei Wellenlänge λ
$I_{\lambda 0}$	EMW-Intensität vor Eintritt ins Medium bei Wellenlänge λ
I_λ	EMW-Intensität nach Austritt aus dem Medium bei Wellenlänge λ
ε_λ	molarer Absorptionskoeffizient bei Wellenlänge λ [ε_λ] = l mol ⁻¹ cm ⁻¹
c	Stoffmengenkonzentration [c] = mol l ⁻¹
l	Weglänge [l] = m

Bei der Deaktivierung werden Nichtstrahlungsdeaktivierung (Schwingungsdeaktivierung (Vibrationsrelaxation), interne Konversion (innere Umwandlung), Interkombination) und Strahlungsdeaktivierung (Fluoreszenz, verzögerte Fluoreszenz und Phosphoreszenz) unterschieden (Valeur und Berberan-Santos, 2012b; Lottspeich und Engels, 2018). Die Schwingungsdeaktivierung beschreibt Elektronenübergänge zwischen 2 Schwingungsniveaus innerhalb eines Singulettzustands/Triplettzustands, die freigesetzte Energie kann u.a. an die Umgebung abgegeben werden. Bei der internen Konversion erfolgt der Elektronenübergang zwischen 2 Zuständen gleicher Spinmultiplizität, bei der Interkombination hingegen zwischen 2 Zuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität. Interkombination ist umso wahrscheinlicher, desto geringer die Energiedifferenz zwischen den Schwingungsniveaus beim Elektronenübergang ist. Bei kleinen Energiedifferenzen und entsprechend langem Aufenthalt im T_1 -Zustand kann es durch $T_1 \rightarrow S_1$ -Elektronenübergänge zur verzögerten Fluoreszenz kommen. Prinzipiell ist der Elektronenübergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität verboten (verbotener Übergang, Verletzung des Pauli-Prinzips), da es zur Reversion der magnetischen Spinquantenzahl (Spinreversion) kommt (Valeur und Berberan-Santos, 2012b). Dies kann durch Kopplung des orbitalen magnet. Moments des Elektrons mit dessen Spinmagnetmoment umgangen werden. Die Wahrscheinlichkeit der Interkombination ist eine Funktion der beteiligten Singulett- und Triplettzustände. Fluoreszenz tritt bei $S_1, v = 0 \rightarrow S_0, v = x$ -Elektronenübergängen auf, womit ihre Charakteristika, mit Ausnahme der Polarisation, unabhängig von der Exzitationswellenlänge der EMW sind (Valeur und Berberan-Santos, 2012b; Lottspeich und Engels, 2018). Auf Grund der Nichtstrahlungsdeaktivierung ist die Energie absorbierter EMW stets größer/gleich der Energie emittierter EMW (Valeur und Berberan-Santos, 2012b). Da nach der Planck-Beziehung (Gl. 59) $E \sim \frac{1}{\lambda}$ ist, ist die Wellenlänge der emittierten EMW gegenüber der Wellenlänge der absorbierten EMW bzw. das Fluoreszenzemissionsspektrum gegenüber dem Absorptionsspektrum zu höheren Wellenlängen hin verschoben (Bathochromie). Dies wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet:

$$\Delta k = k_{\text{abs, max}} - k_{\text{fl, max}} = \frac{2\pi}{\lambda_{\text{abs, max}}} - \frac{2\pi}{\lambda_{\text{fl, max}}} \quad (\text{Gl. 74})$$

$k_{\text{abs, max}}$	Wellenzahl ($\lambda_{\text{abs, max}}$) [k_{abs}] = nm^{-1}
$k_{\text{fl, max}}$	Wellenzahl ($\lambda_{\text{fl, max}}$) [k_{fl}] = nm^{-1}
$\lambda_{\text{abs, max}}$	maximale Wellenlänge (1. Bande (Absorptionsspektrum)) [$\lambda_{\text{abs, max}}$] = nm
$\lambda_{\text{fl, max}}$	maximale Wellenlänge (Emissionsspektrum) [$\lambda_{\text{fl, max}}$] = nm

Meistens treten spektrale Überlappungen auf, deren Energiedefekt dadurch zu erklären ist, dass sich bei Raumtemperatur ein kleiner Teil der Elektronen in einem höheren als dem $S_0, v = 0$ -Zustand befindet (Boltzmann-Verteilung). Die verzögerte Fluoreszenz wird in verzögerte Fluoreszenz Typ E (Eosin) und verzögerte Fluoreszenz Typ P (Pyren) unterteilt (Valeur und Berberan-Santos, 2012b). Typ E tritt bei thermischer Aktivierung, Typ P bei Triplett-Triplett-Annihilation auf. Die verzögerte Fluoreszenz unterscheidet sich von der Fluoreszenz lediglich durch die Abklingzeitkonstante. Phosphoreszenz tritt

beim $T_1 \rightarrow S_0$ -Elektronenübergang, eines eigentlich verbotenen Übergangs (Verletzung des Pauli-Prinzips), auf (Valeur und Berberan-Santos, 2012b). Der $T_1 \rightarrow S_0$ -Elektronenübergang ist nur nach erneuter Reversion der magnetischen Spinquantenzahl möglich. Gegenüber dem Absorptionsspektrum ist das Phosphoreszenzemissionsspektrum zu noch höheren Wellenlängen hin verschoben als das Fluoreszenzemissionsspektrum (Bathochromie, Stokes-Verschiebung). Eine spektrale Überlappung tritt bei Fluoreszenz- und Phosphoreszenzemissionsspektrum auf, aber nicht bei Absorptions- und Phosphoreszenzemissionsspektrum. Die Geschwindigkeitskonstanten des $S_1 \rightarrow S_0$ -, $S_1 \rightarrow T_1$ - und $T_1 \rightarrow S_0$ -Elektronenübergangs werden mit

k_r^S	Geschwindigkeitskonstante ($S_1 \rightarrow S_0$ -Elektronenübergang) (Fluoreszenz)
k_{ic}^S	Geschwindigkeitskonstante ($S_1 \rightarrow S_0$ -Elektronenübergang) (interne Konversion)
k_{isc}	Geschwindigkeitskonstante ($S_1 \rightarrow T_1$ -Elektronenübergang) (Interkombination)
k_r^T	Geschwindigkeitskonstante ($T_1 \rightarrow S_0$ -Elektronenübergang) (Phosphoreszenz)
k_{nr}^T	Geschwindigkeitskonstante ($T_1 \rightarrow S_0$ -Elektronenübergang) (Interkombination)

bezeichnet (Valeur und Berberan-Santos, 2012b). Die allgemeine Nichtstrahlungsgeschwindigkeitskonstante berechnet sich nach (Valeur und Berberan-Santos, 2012b):

$$k_{nr}^S = k_{ic}^S + k_{isc} \quad (\text{Gl. 75})$$

Damit berechnet sich die Quantenausbeute (Fraktion angeregter Moleküle, die in den Grundzustand zurückkehren bzw. die Ratio $\frac{\text{Anzahl emittierter EMW}}{\text{Anzahl absorbierter EMW}}$) nach:

$$\Phi_F = \tau_s k_r^S = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad (\text{Gl. 76})$$

τ_s	Dauer S_1 -Zustand
k_r^S	Geschwindigkeitskonstante ($S_1 \rightarrow S_0$ -Elektronenübergang) (Fluoreszenz)
k_{nr}^S	allgemeine Nichtstrahlungsgeschwindigkeitskonstante (Gl. 75)

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Grundlagen bilden das Fundament der mit Fura-2 und ER-GCaMP6-150 durchgeführten Fluoreszenzmessungen der Ca^{2+} -Bildgebung.

4.2.3.4 Ca²⁺-Bildgebungsapparatur

4.2.3.4.1 Illuminationssystem

LAMDA DG-4 (300 W Xenon-Gasentladungslampe; Wechselgeschwindigkeit benachbarter optischer Filter ca. 1,0 ms; SUTTER INSTRUMENT®, Hofheim, Deutschland) zur Anregung von Fura-2 und ER-GCaMP6-150.

4.2.3.4.2 Inverses Mikroskop

Inverses Mikroskop für Transmissionslicht und Epifluoreszenz Axio Observer.D1 (ZEISS, Jena, Deutschland) mit Objektiv Fluar 20x/0,75 M27 (Nr. 420150-9900-000; ZEISS, Jena, Deutschland) zur Ca²⁺-Bildgebung mit Fura-2 und Objektiv EC Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil M27 (Nr. 420480-9901-000; ZEISS, Jena, Deutschland) zur Ca²⁺-Bildgebung mit ER-GCaMP6-150.

4.2.3.4.3 Halterung mikroskopischer Deckgläser

Molekularsonden™ Attofluor™ Zellkammer für die Mikroskopie (Nr. A7816; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) mit O-Ring und Standardstufenhalterung (Ø 35 mm) für mikroskopische Deckgläser (Ø 25 mm; ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland) mit ausplattierten Zellen.

4.2.3.4.4 Kamerasystem

ORCA®-D² DUAL CCD CAMERA (12 bit-Analog-Digital-Umsetzer; Nr. C11254-10B; HAMAMATSU; VISITRON SYSTEMS GmbH, Puchheim, Deutschland) bestehend aus Kamerakopf mit hermetischem Vakuumverschluß und Kamerakontrolleinheit.

4.2.3.4.5 Optische Filter

Tab. 22 gibt einen Überblick über die verwendeten optischen Filter.

Tab. 22: Verwendete optische Filter. Optische Exzitationsfilter, dichroitische Strahlteiler, optische Emissionsfilter

optischer Exzitationsfilter
340/26 BrightLine HC: Nr. F39-340; AHF ANALYSETECHNIK, Tübingen, Deutschland
387/11 BrightLine HC: Nr. F39-387; AHF ANALYSETECHNIK, Tübingen, Deutschland
470/22 BrightLine HC: Nr. F39-470; AHF ANALYSETECHNIK, Tübingen, Deutschland
dichroitischer Strahlteiler
Strahlenteiler T 400 LP: Nr. F79-100; AHF ANALYSETECHNIK, Tübingen, Deutschland
Strahlenteiler T 495 LPXR: Nr. F48-495; AHF ANALYSETECHNIK, Tübingen, Deutschland
optischer Emissionsfilter
510/80 ET Bandpass: Nr. F47-510; AHF ANALYSETECHNIK, Tübingen, Deutschland
525/40 BrightLine HC: Nr. F37-524; AHF ANALYSETECHNIK, Tübingen, Deutschland

4.2.3.4.6 Software zur Kontrolle der Ca²⁺-Bildgebungsapparatur

VisiView® Software Version 2.1.1 (VISITRON SYSTEMS GmbH, Puchheim, Deutschland)

4.2.3.4.7 Systemeinstellungen

Tab. 23 gibt einen Überblick über die Systemeinstellungen für die Ca²⁺-Bildgebung mit Fura-2 bzw. ER-GCaMP6-150.

Tab. 23: Systemeinstellungen für die Ca²⁺-Bildgebung mit Fura-2 bzw. ER-GCaMP6-150

λ_{ex} -Bereich Exzitationswellenlängenbereich, λ_{em} -Bereich Emissionswellenlängenbereich, t(Belichtung) Belichtungszeit, f(Bild) Bildfrequenz.

	Fura-2-Meßung	ER-GCaMP6-150-Meßung
Illumination	300 W Xenon-Gasentladungslampe	300 W Xenon-Gasentladungslampe
λ_{ex} -Bereich (nm) (optischer Exzitationsfilter)	(1) 327,0 bis 353,0 (340/26 BrightLine HC) (2) 381,5 bis 392,5 (387/11 BrightLine HC)	459,0 bis 481,0 (470/22 BrightLine HC)
dichroitischer Strahlteiler	Strahlenteiler T 400 LP	Strahlenteiler T 495 LPXR
λ_{em} -Bereich (nm) (optischer Emissionsfilter)	470,0 bis 550,0 (510/80 ET Bandpass)	505 bis 545 (525/40 BrightLine HC)
t(Belichtung) (ms)	25	50
f(Bild) (s ⁻¹)	0,3	1
Pixelbinning	2 · 2	4 · 4
Vergrößerung	20-fach	60-fach, Öl-Immersion

4.2.3.5 Tunicamycin

Tunicamycin (Tunicamycin aus *Streptomyces* sp.; Nr. T7765; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) ist eine Sammelbezeichnung für eine Gruppe natürlicher Nucleoside mit antibakterieller, antiviraler und antitumorale Wirkung, deren Struktur sich aus den Bausteinen Uracil, Tunicamin, N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) sowie einer von mehreren verschiedenen Fettsäuren zusammensetzt und die als MraY-Inhibitor (MraY: UDP-MurAc(oyl-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala):undecaprenylphosphatphospho-N-acetylmuramoylpentapeptidtransferase (EC 2.7.8.13)) (Inhibierung der bakteriellen Zellwandsynthese), WecA-Inhibitor (WecA: UDP-N-Acetyl-D-glucosamin:ditrans, octacisundecaprenylphosphat-N-acetyl-D-glucosaminphosphotransferase (EC 2.7.8.33)) (Inhibierung der bakteriellen LPS-Synthese, Inhibierung der bakteriellen ECA-Synthese) und DPAGT1-Inhibitor (DPAGT1: UDP-N-Acetyl-D-glucosamin:dolichylphosphat-N-acetyl-D-glucosaminphosphotransferase (EC 2.7.8.15)) (Inhibierung der humanen Protein-N-glycosylierung induziert ER-Streß) wirken (Yamamoto und Ichikawa, 2019; Foufelle und Fromenty, 2016). Unterschieden werden die Homologe Ai, Bi, Ci und Di ($i \in \mathbb{N}$) (Duksin und Mahoney, 1982).

4.2.3.6 Trifluorperazin

Trifluorperazin (Trifluorperazin -dihydrochlorid; Nr. T8516; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) (C₂₁H₂₄F₃N₃S; ca. 407,5 g mol⁻¹; Abk. TFP) ist ein Trifluormethylphenothiazinderivat (polycyclischer Aromat mit Phenothiazinfunktion (lineares tricyclisches System: 2 Benzenringe, 1 4H-1,4-Thiazinring)), das in *H. sapiens* als DRD2-Antagonist, ADRA1A-Antagonist, CALM1-Inhibitor, S100A4-Inhibitor, CALY-Antagonist, UGT1A4-Substrat (UGT1A4: UDP-Glucuronat- β -D-

glucuronosyltransferase (akzeptorunspezifisch) (EC 2.4.1.17)), CYP1A2-Substrat (CYP1A2: Substrat, NADPH-Hämoproteinreduktase:sauerstoffoxidoreduktase (RH-hydroxylierend oder -epoxidierend) (EC 1.14.14.1)) sowie als ABCB1-Inhibitor (ABCB1: ABC-Typ Xenobiotikumtransporter (EC 7.6.2.2) bzw. P-Typ Phospholipidtransporter (EC 7.6.2.1)) wirkt und zusätzlich an TNNC1 (unbekannte Wirkung) bindet (Nach DRUGBANK-Eintrag DB00831 (Zugriff 12.03.2021) und UniProtKB 2021-Einträgen P22310, P05177, P08183 (Zugriff 12.03.2021)).

4.2.3.7 Thapsigargin

Thapsigargin (Molecular Probes™ Thapsigargin; Nr. T7459; life technologies™, Darmstadt, Deutschland) ($C_{34}H_{50}O_{12}$; ca. $650,8 \text{ g mol}^{-1}$; Abk. Thap) ist ein membranpermeables, bioaktives Guaianolid (tricyclisch: 2 5-Ringe (1 O-haltig), 1 7-Ring), ein Sesquiterpenlacton, das von *Thapsia garganica* L. aus dem Metabolit Farnesyldiphosphat synthetisiert wird und als Tumorpromotor wirkt (Inesi und Sagara, 1992; Christensen, Rasmussen *et al.*, 1980; Hakii, Fujiki *et al.*, 1986; Andersen, López *et al.*, 2015). Thapsigargin ist ein spezifischer Inhibitor der P-Typ- Ca^{2+} -Transporter (EC 7.2.2.10) ATP2A1 ($K_d \approx 0,21 \text{ nmol l}^{-1}$), ATP2A2 ($K_d \approx 1,30 \text{ nmol l}^{-1}$) und ATP2A3 ($K_d \approx 12,00 \text{ nmol l}^{-1}$), die Inhibition ist irreversibel (Wootton und Michelangeli, 2006; Michelangeli und East, 2011). Andere P-Typ- Ca^{2+} -Transporter (ATP2B, ATP2C) werden bei Thapsigarginstoffmengenkonzentrationen zwischen 10 nmol l^{-1} und 1000 nmol l^{-1} nicht inhibiert. Die Thapsigarginbindestelle des ATP2A liegt in der Membranebene an der Proteinlipidgrenzfläche und wird von den Membranhelices M3, M5 und M7 gebildet (Michelangeli und East, 2011; Winther, Liu *et al.*, 2010). Die Bindung ist nichtkovalent, die Stöchiometrie beträgt Thapsigargin : ATP2A = 1 : 1 (Sackgassenkomplex) und das Pharmakophor des Thapsigargin ergibt sich aus den Acylgruppen der O-Atome O3 (2-Methylbut-2-enoylgruppe), O8 (Butanoylgruppe) und O10 (Ethanoylgruppe) sowie der C15H₃-Gruppe (Sabała, Czarny *et al.*, 1993; Winther, Liu *et al.*, 2010; Doan, Paulsen *et al.*, 2015). Die Inhibition erfolgt durch Stabilisierung der Konformation des E2H_n-Zustands des ATP2A, wodurch der Transportzyklus im Vorwärts- (vektorieller Ca^{2+} -Transport) und Reversmodus inhibiert wird (globale Inhibition) (Sabała, Czarny *et al.*, 1993). Das Äquilibrium zwischen aktivem Ca^{2+} -Influx und passivem Ca^{2+} -Efflux des thapsigargin sensitiven intrazellulären Ca^{2+} -Speichers (ER) verschiebt sich auf die Seite des passiven Ca^{2+} -Efflux. Die $c(Ca^{2+})_{ERL, frei}$ sinkt, die $c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}$ steigt und Apoptose wird induziert (Sabała, Czarny *et al.*, 1993; Doan, Paulsen *et al.*, 2015). Mipsagargin ($C_{66}H_{100}N_6O_{27}$; ca. $1409,5 \text{ g mol}^{-1}$), ein Thapsigarginderivat, wird als Prodrug in klinischen Studien zur Behandlung von Tumoren verwendet (Andersen, López *et al.*, 2015; Doan, Paulsen *et al.*, 2015). Mipsagargin wird in der Nähe von Tumorzellen durch FOLH1 (Glutamatcarboxypeptidase II (EC 3.4.17.21); Expression: Prostataepithelzellen, Prostatatumorepithelzellen, Tumorendothelzellen diverser Tumoren), ein Typ-II-Membranprotein, dessen aktives Zentrum extrazellulär lokalisiert ist, hydrolytisch zum entsprechenden Wirkstoff metabolisiert: $Mipsagargin + 2 H_2O \xrightarrow{\text{Glutamatcarboxypeptidase II}} 8\text{-O-(12-Aminododecanoyl)-8-O-debutanoylthapsigarginyl-(S)-aspartat} + 5\text{-(S)-Glutamyl-5-(S)-glutamyl-(S)-glutamat} + \text{(S)-Glu. 8-O-}$

(12-Aminododecanoyl)-8-O-debutanoylthapsigarginyl-(S)-aspartat diffundiert in die Tumorzelle, inhibiert den ATP2A und induziert Apoptose.

4.2.3.8 Ionomycin

Ionomycin ($C_{41}H_{72}O_9$; ca. 708,5 g mol⁻¹; Abk. Iono) ist ein Polyether mit 2 O-haltigen Heterocyclen (2 5-Ringe), der von *Streptomyces conglobatus* synthetisiert wird (Liu, Slusarchyk *et al.*, 1978). *In vitro* wirkt es als Schmalbandantibiotikum primär gegen grampositive Bakterien. Ionomycin bzw. dessen Ca²⁺-Salz (Ionomycin, Calcium Salt; Nr. I24222; life technologies™, Darmstadt, Deutschland) ($CaC_{41}H_{70}O_9$; 746,5 g mol⁻¹) zeigt im UV-Spektrum ein Absorptionsmaximum bei ca. 280 nm bzw. ca. 300 nm (Solvens: Methanol). Die Fähigkeit Kationen aus einer wässrigen Phase (Pufferlösung) zu extrahieren und in eine organische (Toluol 70 %, Butan-1-ol 30 %) zu transferieren, ist stark vom pH-Wert der wässrigen Phase abhängig (Beginn: pH ≈ 6,5; Maximum: pH ≈ 10) (Liu und Hermann, 1978). Die Kationenselektivitätssequenz ergibt sich zu: Ca²⁺ > Mg²⁺ > La³⁺ > Ba²⁺ > K⁺ > Li⁺ > Sr²⁺ = Na⁺ = Cs⁺ > Rb⁺. Als 6-zähliger Ligand komplexiert Ionomycin Ca²⁺-Kationen über 6 O-Atome (2 OH-Gruppen, 1 1,3-Dicarbonylgruppe (cis-ähnlich, deprotoniert, Enolat-Form), 1 COO⁻-Gruppe, 1 Etherbindung) im Verhältnis 1:1 (Chelatkomplex) (Liu und Hermann, 1978; Toeplitz, Cohen *et al.*, 1979). Eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen terminalem H-Atom (OH-Gruppe) und terminalem O-Atom (COO⁻-Gruppe) führt zur Cyclisierung des Ionomycinmoleküls. Ca²⁺-Kationen können, entlang ihres Konzentrationsgradienten (chemische Triebkraft), von einer wässrigen Phase (z.B. Pufferlösung, Extrazellulärraum (EZR)) über eine hydrophobe Schicht (z.B. Trichlormethan, biologische Membran) in eine zweite wässrige Phase transportiert werden (z.B. Pufferlösung, Intrazellulärraum), d.h. Ionomycin wirkt als Ca²⁺-transportierendes Ionophor. Bei POPC-Vesikeln mit einer Membranspannung von ca. 0 mV (vgl. Spannung über ER-Membran) beträgt die Ratio

$$\frac{\text{elektrogener Transportzyklus}}{\text{elektroneutraler Transportzyklus}} \leq \frac{1}{10000}, \text{ bei ca. 150 mV (POPC-Vesikel innen negativ, vgl. Spannung}$$

über innere Mitochondrienmembran) $\leq \frac{1}{10}$, unabhängig davon, ob es sich um einen Ca²⁺-Flux in die

bzw. aus den POPC-Vesikeln handelt (Erdahl, Chapman *et al.*, 1994). Wird jedoch der initiale Ca²⁺-Efflux/Influx in Abhängigkeit von der Ionomycinstoffmengenkonzentration dargestellt, so zeigt sich,

dass bei allen Ionomycinstoffmengenkonzentrationen $\frac{\frac{d}{dt} c(Ca^{2+})_{Ca^{2+}-\text{Efflux, initial}}}{\frac{d}{dt} c(Ca^{2+})_{Ca^{2+}-\text{Influx, initial}}} \approx 20$ bis 25 ist. Die

$\frac{H^+}{Ca^{2+}}$ -Ratio des elektroneutralen Transportzyklus beträgt 2,0, d.h. es handelt sich um einen elektroneutralen 2 H⁺/1 Ca²⁺-Antiport, was für die Berechnung der $c(Ca^{2+})_{ERL, \text{ frei, b}}$ (Gl. 131) von Bedeutung ist.

4.2.3.9 Nigericin

Nigericin (Nigericin, Free Acid; Nr. N1495; life technologies™, Darmstadt, Deutschland) ($C_{40}H_{68}O_{11}$; ca. 724,5 g mol⁻¹; Abk. Nig) ist ein Polyether mit 6 O-haltigen Heterocyclen (3 5-Ringe, 3 6-Ringe), der

von *Streptomyces hygroscopicus* synthetisiert wird (Kubota und Matsutani, 1970). Durch Temperatursprung (Relaxationsmethode) induzierte pH-Wertgradienten über biologische Modellmembranen (z.B. Sojabohnenphospholipidvesikel) $\Delta T \frac{\partial pK_s}{\partial T} = \Delta pK_s \sim \Delta pH$ (Gl. 77) (T Temperatur (K), pK_s pK_s -Wert der Puffersubstanz, pH pH-Wert der erwärmten Lösung) werden durch Nigericin in einem elektroneutralen Transportzyklus abgebaut (Prabhananda und Ugrankar, 1991). Näherungsweise berechnet sich die Abklingzeitkonstante durch:

$$\tau = \frac{c(\text{Lipid}) \alpha_i}{0,95 c(\text{Nig}) \log_e 10 c(\text{H}^+) f(K_c, c(\text{H}^+))} \quad (\text{Gl. 78})$$

$$\text{mit } f(K_c, c(\text{H}^+)) = \frac{k_1 k_2 K_c}{(k_1 c(\text{H}^+) + k_2 K_c)(K_c + c(\text{H}^+))} \quad (\text{Gl. 79})$$

$$\text{und } K_c = K_s + \frac{K_s}{K_d([\text{KatNig}])} c(\text{Kat}^+) \quad (\text{Gl. 80})$$

$c(\text{Lipid})$	Stoffmengenkonzentration des Lipids (mol l^{-1})
$c(\text{Nig})$	Stoffmengenkonzentration des Nigericins (mol l^{-1})
$c(\text{H}^+)$	Stoffmengenkonzentration H^+ -Kationen (mol l^{-1})
α_i	innere (vesikuläre) Pufferkapazität (mol l^{-1})
K_s	Säurekonstante des Nigericin (mol l^{-1})
$K_d([\text{KatNig}])$	Dissoziationskonstante der Reaktion $\text{Kat/Nig} \rightleftharpoons \text{Kat}^+ + \text{Nig}^-$ (mol l^{-1})
$c(\text{Kat}^+)$	Stoffmengenkonzentration der freien einwertigen Kationen (mol l^{-1})
Kat^+	K^+ bzw. Na^+
k_1	Geschwindigkeitskonstante des H^+ -Transports (s^{-1})
k_2	Geschwindigkeitskonstante des Kat^+ -Transports (s^{-1})

Dabei katalysiert Nigericin einen 1 H^+ /1 Kat^+ -Antiport ($\text{Kat}^+ = \text{K}^+, \text{Na}^+$), was für die Berechnung der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ (Gl. 131) von Bedeutung ist. Die Kationenselektivitätssequenz ergibt sich zu: $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$ (Lutz, Wipf *et al.*, 1970), d.h. es handelt sich um ein alkalimetallkationtransportierendes Ionophor. Als 5-zähliger Ligand komplexiert Nigericin K^+ -Kationen über 5 O-Atome (1 COO^- -Gruppe, 4 Etherbindungen) im Verhältnis 1:1 (Chelatkomplex) (Geddes, Sheldrick *et al.*, 1974). 2 intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen 2 terminalen H-Atomen (2 OH-Gruppen) und 1 terminalem O-Atom (COO^- -Gruppe) führen zur Cyclisierung des Nigericinmoleküls.

4.2.3.10 Fura-2

Fura-2 ($\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{14}$; 641,1 g mol^{-1}) ist ein chemisch synthetisierter fluoreszierender, ratiometrischer Ca^{2+} -Indikator mit Stilbenchromophor, der der quantitativen Erfassung der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ dient (Gryniewicz, Poenie *et al.*, 1985; Naraghi, 1997; Vetter, Carter *et al.*, 2020). Es handelt sich um einen 8-zähligen Liganden, der Ca^{2+} -Kationen über 2 N-Atome, 6 O-Atome (4 COO^- -Gruppen, 2 Etherbindungen) im Verhältnis 1:1 bindet (Chelatkomplex; vgl. Ca^{2+} -Bindung durch EGTA, BAPTA).

Die $K_d([CaFura-2]^{2-})$ beträgt ca. 135 nmol l^{-1} (KCl 100 mmol l^{-1} , $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,1$ bis $7,2$), ca. 224 nmol l^{-1} (KCl 115 mmol l^{-1} , NaCl 20 mmol l^{-1} , KMOPS 10 mmol l^{-1} , freies Mg^{2+} 1 mmol l^{-1} , $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,05$), ca. 258 nmol l^{-1} ($K_d = \frac{k_{ab}}{k_{an}}$, k_{an} ca. $4,0 \cdot 10^8 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_{ab} ca. 103 s^{-1}) bzw. ca. 760 nmol l^{-1} (KCl 225 mmol l^{-1} , NaCl 25 mmol l^{-1}), die für weitere wichtige intrazelluläre Kationen betragen $K_d([MgFura-2]^{2-})$ ca. $5,6 \text{ nmol l}^{-1}$ bzw. $9,8 \text{ nmol l}^{-1}$ ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $20 \text{ }^\circ\text{C}$, Ionenstärke $0,1$ bis $0,5 \text{ mol l}^{-1}$), $K_d([ZnFura-2]^{2-})$ ca. $1,6 \text{ nmol l}^{-1}$ bis 2 nmol l^{-1} (Grynkiewicz, Poenie *et al.*, 1985; Naraghi, 1997; Vetter, Carter *et al.*, 2020). Der Dynamikbereich $D = \frac{R_{\max}}{R_{\min}}$ (Gl. 81) (R_{\max} maximale Fluoreszenzintensitätsratio (nur $[CaFura-2]^{2-}$ -Komplexe), R_{\min} minimale Fluoreszenzintensitätsratio (keine $[CaFura-2]^{2-}$ -Komplexe)) beträgt 13 bis 15 . Die Absorptionsmaxima ($Fura-2 \pm Ca^{2+}$) liegen im UV-A-Bereich (naher UV-Bereich, ca. 320 nm bis 400 nm) des elektromagnetischen Spektrums, die Fluoreszenzemissionsmaxima ($Fura-2 \pm Ca^{2+}$) im grünen Bereich (ca. 490 nm bis 560 nm) des sichtbaren Spektrums (ca. 400 nm bis 760 nm) (Grynkiewicz, Poenie *et al.*, 1985; Vetter, Carter *et al.*, 2020). Die Quantenausbeute (Gl. 76) beträgt im Ca^{2+} -gebundenen Zustand ca. $0,5$. Nach Ca^{2+} -Bindung werden Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum zu niedrigeren Wellenlängen hin verschoben (Hypsochromie): Absorptionsmaximum $515 \text{ nm} \rightarrow 505 \text{ nm}$, Fluoreszenzemissionsmaximum $336 \text{ nm} \rightarrow 366 \text{ nm}$ (Grynkiewicz, Poenie *et al.*, 1985; Vetter, Carter *et al.*, 2020). Der Schnittpunkt der Kurven der 2 Absorptionsspektren liegt bei ca. 360 nm und ist Ca^{2+} -unabhängig (isosbestischer Punkt). Somit kann die Fluoreszenzintensität bei Exzitation mit $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$ als Ladekontrolle der Zellen mit dem membranpermeablen Acetoxymethylesterderivat (Fura-2-AM) (Fura-2, AM, cell permeant; Nr. F1221; life technologies™, Darmstadt, Deutschland) dienen. Nach Diffusion in die Zelle werden die Esterbindungen durch zelluläre Esterasen hydrolytisch gespalten (Grynkiewicz, Poenie *et al.*, 1985): $Fura-2-AM + 10 H_2O \xrightarrow{\text{Esterase}} Fura-2 + 5 \text{ Methanal} + 5 \text{ Ethanoat} + 10 H^+$. Das negativ geladene Fura-2 ist membranimpermeabel und kann die Zelle durch Diffusion nicht mehr verlassen. Zur Beladung der Hautfibroblasten bzw. 293-Zellen mit Fura-2-AM, wurden diese in allen Experimenten wie folgt inkubiert: $c(Fura-2-AM) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung (Stammlösung: 1 mmol l^{-1} (Solvens: DMSO (Nr. D2650; Sigma-Aldrich, München, Deutschland))), RT, 20 min, Dunkelheit. Intrazelluläre Kationen, z.B. Mn^{2+} und Fe^{2+} , können zur Fluoreszenzemissionsintensitätslöschung führen (Kationquenching). Kleine Schwankungen um den physiologischen intrazellulären pH-Wert ($\text{pH}(\text{Cytosol}) \approx 7,2$) haben nur geringen Einfluß auf die spektralen Eigenschaften (Absorption, Fluoreszenzemission), eine H^+ -Inhibition der Ca^{2+} -Bindung via Fura-2-Protonierung findet nur in geringem Maß statt (stabile $K_d([CaFura-2]^{2-})$). Als ratiometrischer Ca^{2+} -Indikator ist Fura-2 weitgehend unabhängig von dessen Konzentration, der absoluten Detektorsensitivität, sowie der optischen Weglänge des Strahlengangs. Die Fluoreszenzintensitätsratio R der Fluoreszenzemissionsintensitäten

F_{340} und F_{387} ($\frac{F_{340}}{F_{387}}$) wird in dieser Arbeit zur Berechnung der Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen genutzt (Grynkiewicz, Poenie *et al.*, 1985):

$$R = \frac{F_1}{F_2} = \frac{S_{f_1} c_f + S_{b_1} c_b}{S_{f_2} c_f + S_{b_2} c_b} \quad (\text{Gl. 82}) \quad | \quad c_b = \frac{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}}{K_d} c_f$$

$$\Leftrightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}} = K_d([\text{CaFura-2}]^{2-}) \frac{S_{f_2}}{S_{b_2}} \frac{R - \frac{S_{f_1}}{S_{f_2}}}{\frac{S_{b_1}}{S_{b_2}} - R} = K_d([\text{CaFura-2}]^{2-}) \frac{S_{f_2}}{S_{b_2}} \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} =$$

$$K_{d,\text{app}}([\text{CaFura-2}]^{2-}) \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \quad (\text{Gl. 83})$$

R	Fluoreszenzintensitätsratio
R_{\min}	minimale Fluoreszenzintensitätsratio (keine $[\text{CaFura-2}]^{2-}$ -Komplexe)
R_{\max}	maximale Fluoreszenzintensitätsratio (nur $[\text{CaFura-2}]^{2-}$ -Komplexe)
F_1	Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{ex1}} = 327,0 \text{ nm}$ bis $353,0 \text{ nm}$ (F_{340})
F_2	Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{ex2}} = 381,5 \text{ nm}$ bis $392,5 \text{ nm}$ (F_{387})
S_{f_1}	Proportionalitätskonstante: Fura-2 kein Ca^{2+} gebunden, $\lambda_{\text{ex1}} = 327,0 \text{ nm}$ bis $353,0 \text{ nm}$
S_{f_2}	Proportionalitätskonstante: Fura-2 kein Ca^{2+} gebunden, $\lambda_{\text{ex2}} = 381,5 \text{ nm}$ bis $392,5 \text{ nm}$
S_{b_1}	Proportionalitätskonstante: Fura-2 Ca^{2+} gebunden, $\lambda_{\text{ex1}} = 327,0 \text{ nm}$ bis $353,0 \text{ nm}$
S_{b_2}	Proportionalitätskonstante: Fura-2 Ca^{2+} gebunden, $\lambda_{\text{ex2}} = 381,5 \text{ nm}$ bis $392,5 \text{ nm}$
c_f	Stoffmengenkonzentration des Fura-2 (mol l^{-1})
c_b	Stoffmengenkonzentration des $[\text{CaFura-2}]^{2-}$ -Komplexes (mol l^{-1})
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}$	Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen (mol l^{-1})
$K_d([\text{CaFura-2}]^{2-})$	Dissoziationskonstante der Reaktion $[\text{CaFura-2}]^{2-} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+} + \text{Fura-2}^{4-}$ (mol l^{-1})
$K_{d,\text{app}}([\text{CaFura-2}]^{2-})$	apparente Dissoziationskonstante der Reaktion $[\text{CaFura-2}]^{2-} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+} + \text{Fura-2}^{4-}$ (mol l^{-1})

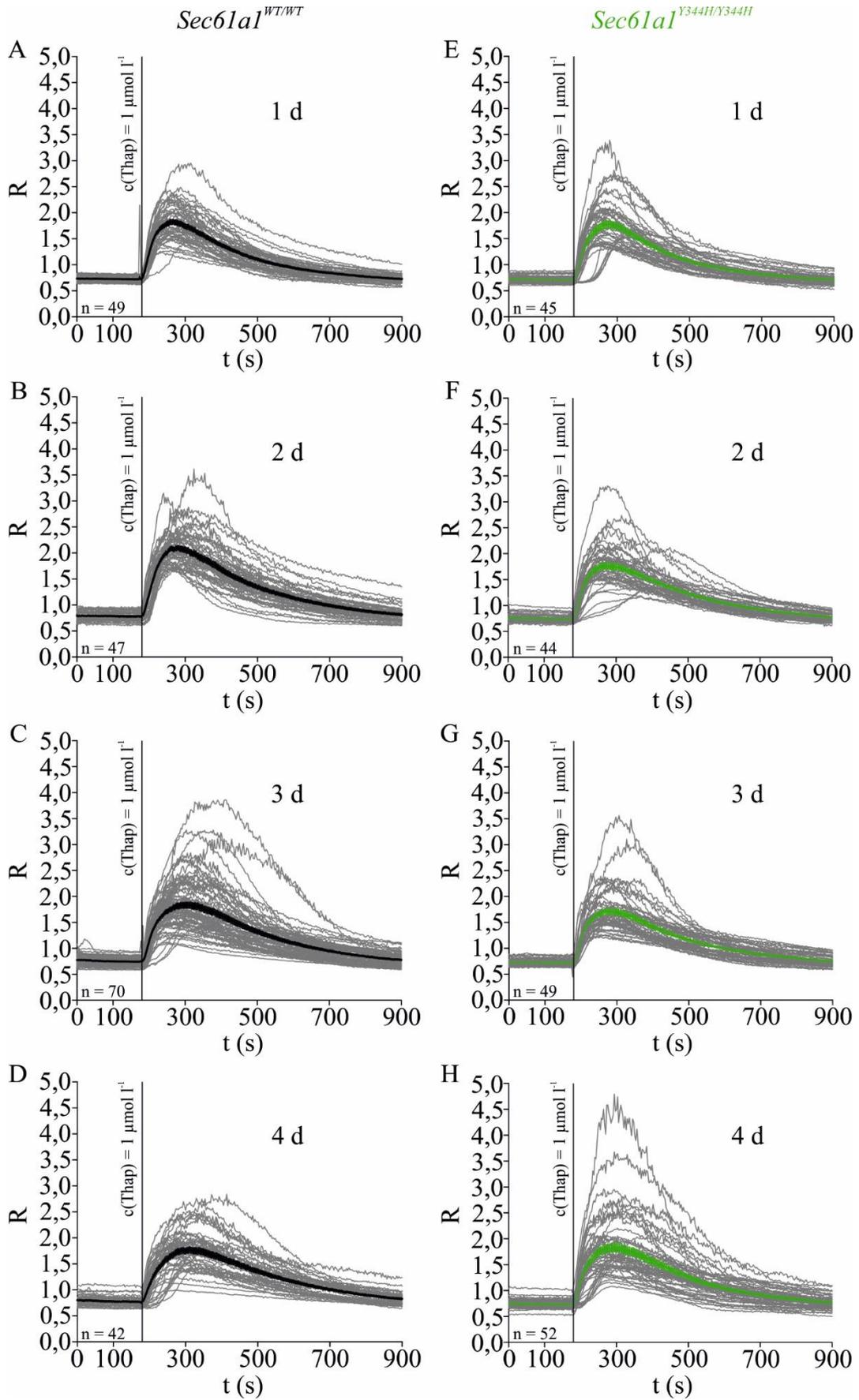
Die 4 Proportionalitätskonstanten ergeben sich durch Meßung von F_1 bzw. F_2 bei bekannter c_f und c_b und sind eine Funktion von molekularem Absorptionskoeffizienten, Fluoreszenzemissionsintensität, Fluoreszenzemissionsintensitätslöschung, Detektorsensitivität u.a..

4.2.3.10.1 Analyse des thapsigargininduzierten Fura-2-Signals zu verschiedenen Zeitpunkten nach Trypsinierung bzw. Ausplattierung der Hautfibroblasten

Um den Verlauf der Fura-2-Signale zu verschiedenen Zeitpunkten (1 d bis 4 d) nach Trypsinierung bzw. Ausplattierung der Hautfibroblasten zu analysieren, wurden thapsigargininduzierte Fura-2-Signale gemäß folgendem Meßprotokoll herangezogen (Abb. 2):

1. 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung)
2. 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$)
3. R_b (basale Fluoreszenzintensitätsratio): \bar{R}_{arithm} für $t = 100 \text{ s}$ bis 177 s , R_{max} : absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts, $\Delta R = R_{\text{max}} - R(t = 180 \text{ s})$

Zum Ausschluß der Einflußnahme der Trypsinierung auf die Ca^{2+} -Bildgebung und auf Grund der vergleichsweise stärkeren Streuung der thapsigargininduzierten Fura-2-Signale der *Sec61a1^{Y344H/Y344H}*-Hautfibroblasten 4 d nach Trypsinierung/Ausplattierung (Abb. 2 H, K), wurden die Hautfibroblasten im Folgenden 2 d bzw. 3 d nach Trypsinierung/Ausplattierung zur Ca^{2+} -Bildgebung (ER-GCaMP6-150, Fura-2) verwendet.



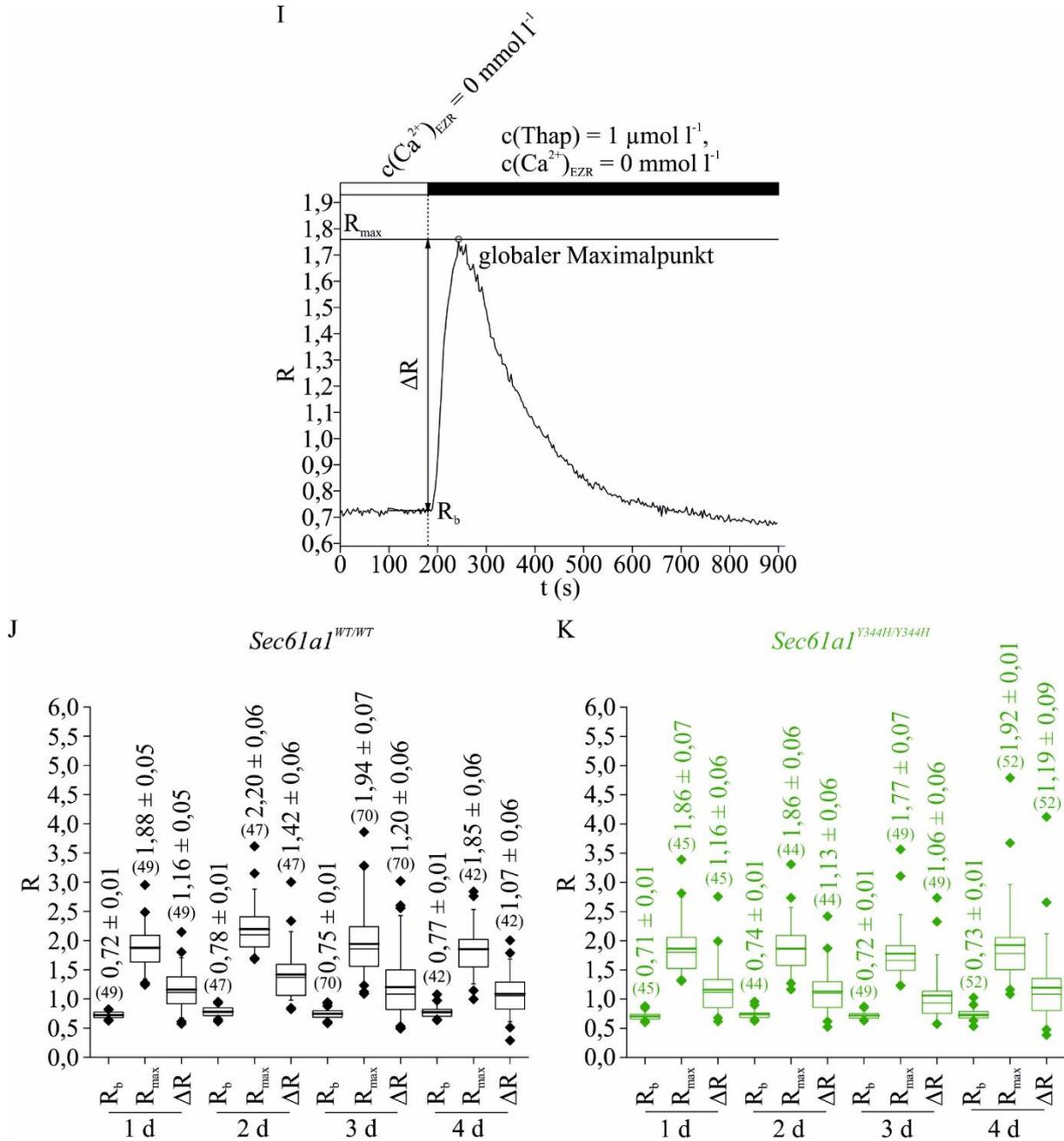


Abb. 2: Thapsigargininduzierte Fura-2-Signale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Trypsinierung bzw. Ausplattierung der Hautfibroblasten

Fura-2-Signale ($f(t) = R$) von *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten 1 d (A), 2 d (B), 3 d (C), 4 d (D) und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten 1 d (E), 2 d (F), 3 d (G), 4 d (H) nach Trypsinierung bzw. Ausplattierung; Einzelzellmessungen: dünne graue Linien; $\bar{x}_{\text{arithm}} \pm s(\bar{x}_{\text{arithm}})$: dicke schwarze/grüne Linien; n: Zellzahl (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, t (Belichtung) = 25 ms, f (Bild) = 0,3 Hz, Pixelbinning = 2 · 2, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: c (Fura-2-AM) = 4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in 2,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). Meßprotokoll: (1.) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, c (Thap) = 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit c (Thap) = 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$). I: Parameterdefinition am Bsp. des Fura-2-Signals eines *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten 2 d nach Trypsinierung/Ausplattierung: R_b : \bar{R}_{arithm} für $t = 100 \text{ s}$ bis 177 s, R_{max} : absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts, $\Delta R = R_{\text{max}} - R(t = 180 \text{ s})$. J-K: deskriptive Statistik zu A bis H. Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} ; (-): Zellzahl; Zahl über Kasten-Antenne-Diagramm: $\bar{x}_{\text{arithm}} \pm s(\bar{x}_{\text{arithm}})$.

4.2.3.10.2 Kalibrierung des Fura-2-Signals

4.2.3.10.2.1 $K_{d,app}([CaFura-2]^{2-})$ -Bestimmung

Die $K_{d,app}([CaFura-2]^{2-})$ zur Umrechnung $R \rightarrow c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}$ wurde *in vitro* mit dem Fura-2 Kalibrierkit für die Calciumbildung (null bis 10 mM CaEGTA, 50 μ M Fura-2) (Nr. F6774; life technologies™, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Das Protokoll zur $K_{d,app}([CaFura-2]^{2-})$ -Bestimmung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Enthalten sind folgende Lösungen (Tab. 24):

Tab. 24: Lösungen (jeweils 1 ml) des Fura-2 Kalibrierkit für die Calciumbildung (null bis 10 mM CaEGTA, 50 μ M Fura-2) (Nr. F6774; life technologies™, Darmstadt, Deutschland)

Alle Lösungen in KCl 100 mmol l⁻¹, K₂EGTA 10 mmol l⁻¹, MOPS 30 mmol l⁻¹, pH = 7,2, Polystyrolkugeln (Durchmesser 15 μ m) 16000 ml⁻¹, Reinstwasser (18 M Ω). Die Polystyrolkugeln dienen als Abstandhalter zwischen den 2 verwendeten mikroskopischen Deckgläsern, sowie zur Fokussierung. Nr. Nummer, c(Fura-2) Stoffmengenkonzentration des Fura-2, c([CaEGTA]²⁻) Stoffmengenkonzentration des [CaEGTA]²⁻-Komplexes, c(Ca²⁺)_{frei} Stoffmengenkonzentration der freien Ca²⁺-Kationen.

Nr.	c(Fura-2) (μ mol l ⁻¹)	c([CaEGTA] ²⁻) (mmol l ⁻¹)	c(Ca ²⁺) _{frei} (μ mol l ⁻¹)
1	50	-	-
2	50	1,0	0,017
3	50	2,0	0,038
4	50	3,0	0,065
5	50	4,0	0,100
6	50	5,0	0,150
7	50	6,0	0,225
8	50	7,0	0,351
9	50	8,0	0,602
10	50	9,0	1,350
11	50	10,0	39,000
12	-	10,0	39,000

Nach $[CaEGTA]^{2-} \rightarrow Ca^{2+} + EGTA^{4-}$ ergibt sich die $c(Ca^{2+})_{frei}$ zu:

$$K_d([CaEGTA]^{2-}) = \frac{c(Ca^{2+})_{frei} c(EGTA^{4-})}{c([CaEGTA]^{2-})} \quad (Gl. 84)$$

$$\Leftrightarrow c(Ca^{2+})_{frei} = K_d([CaEGTA]^{2-}) \frac{c([CaEGTA]^{2-})}{c(EGTA^{4-})} \quad (Gl. 85)$$

$K_d([CaEGTA]^{2-})$ Dissoziationskonstante der Reaktion $[CaEGTA]^{2-} \rightleftharpoons EGTA^{4-} + Ca^{2+}$
150,5 nmol l⁻¹ (KCl 100 mmol l⁻¹, pH = 7,2, 20 °C)

$c(Ca^{2+})_{frei}$ Stoffmengenkonzentration der freien Ca²⁺-Kationen (mol l⁻¹)

$c(EGTA^{4-})$ EGTA⁴⁻-Stoffmengenkonzentration (mol l⁻¹)

$c([CaEGTA]^{2-})$ Stoffmengenkonzentration der [CaEGTA]²⁻-Komplexe (mol l⁻¹)

Wird der Quotient $\frac{c([CaEGTA]^{2-})}{c(EGTA^{4-})}$ als Mischungsverhältnis der Lösungen Nr. 1 und 11 betrachtet, so

kann die $c(Ca^{2+})_{frei}$ beliebig eingestellt werden:

$$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei, gewünscht}} = 0,1505 \mu\text{mol l}^{-1} \frac{V_{11}}{V_1} \quad (\text{Gl. 86})$$

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei, gewünscht}}$ gewünschte Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
 V_{11} Volumen Lösung Nr. 11 (μl)
 V_1 Volumen Lösung Nr. 1 (μl)

Die $K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-})$ wurde 2-mal bestimmt (04.07.2017, 29.10.2019) (Abb. 3). Für die Bestimmung am 29.10.2019 wurden zusätzlich 2 weitere Ca^{2+} -Stoffmengenkonzentrationen eingestellt:

$$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei, gewünscht}} = 2,000 \mu\text{mol l}^{-1}: V_{11} = 265,8 \mu\text{l}, V_1 = 20,0 \mu\text{l}$$

$$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei, gewünscht}} = 2,700 \mu\text{mol l}^{-1}: V_{11} = 358,8 \mu\text{l}, V_1 = 20,0 \mu\text{l}$$

Nach 2-fachlogarithmischer Achsentransformation wurde eine einfache lineare Anpassung durchgeführt: $f_{\text{opt}}: [\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}_{\text{min}}, \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}_{\text{max}}] \rightarrow \mathbb{R}, \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\} \mapsto f_{\text{opt}}(\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 18,9 + 3,5 \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}$ (Gl. 87), $B_{\text{kor}} \approx 0,914$ (04.07.2017); $f_{\text{opt}}: [\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}_{\text{min}}, \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}_{\text{max}}] \rightarrow \mathbb{R}, \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\} \mapsto f_{\text{opt}}(\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 7,0 + 1,3 \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}$ (Gl. 88), $B_{\text{kor}} \approx 0,992$ (29.10.2019). Die Nullstelle der prognostizierten einfachen linearen Anpassungsfunktion ($\log_{10} \{K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-})\}$) steht mit der Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen in folgender Beziehung:

$$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}} = K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-}) \frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R} \quad (\text{Gl. 83})$$

$$\Leftrightarrow \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\} - \log_{10} \frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R} = \log_{10} \{K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-})\} \quad (\text{Gl. 89})$$

$$f(0) \Rightarrow \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\} = \log_{10} \{K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-})\} \quad (\text{Gl. 90})$$

$$\Leftrightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}} = K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-}) \quad (\text{Gl. 91})$$

Es ergaben sich $K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-}) \approx 3,742 \mu\text{mol l}^{-1}$ (04.07.2017) und $4,629 \mu\text{mol l}^{-1}$ (29.10.2019).

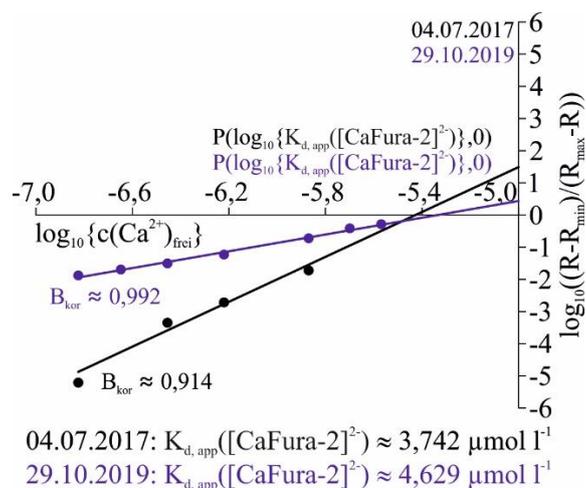


Abb. 3: $K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-})$ -Bestimmung

Die $K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-})$ wurde 2-mal *in vitro* mit dem Fura-2 Kalibrierkit für die Calciumbildgebung (null bis 10 mM CaEGTA, 50 μM Fura-2) (Nr. F6774; life technologiesTM, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Das Protokoll zur $K_{d,app}([\text{CaFura-2}]^{2-})$ -Bestimmung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, t (Belichtung) = 25 ms, f (Bild) = $0,3$ Hz, Pixelbinning = $2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach). Für die Bestimmung am 29.10.2019 wurden zusätzlich 2 weitere Ca^{2+} -

Stoffmengenkonzentrationen eingestellt, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei, gewünscht}} = 2,000 \mu\text{mol l}^{-1}$ bzw. $2,700 \mu\text{mol l}^{-1}$. Dargestellt ist $\log_{10} \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$ in Abhängigkeit von $\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}$. 04.07.2017 (schwarz): 4 verwendbare Datenpunkte (für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}} = 0,150 \mu\text{mol l}^{-1}$, $0,351 \mu\text{mol l}^{-1}$, $0,602 \mu\text{mol l}^{-1}$, $1,350 \mu\text{mol l}^{-1}$), 29.10.2019 (blau): 7 verwendbare Datenpunkte (für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}} = 0,150 \mu\text{mol l}^{-1}$, $0,225 \mu\text{mol l}^{-1}$, $0,351 \mu\text{mol l}^{-1}$, $0,602 \mu\text{mol l}^{-1}$, $1,350 \mu\text{mol l}^{-1}$, $2,000 \mu\text{mol l}^{-1}$, $2,700 \mu\text{mol l}^{-1}$). Es wurde eine einfache lineare Anpassung durchgeführt: $f_{\text{opt}}: [\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}_{\min}, \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}$, $\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\} \mapsto f_{\text{opt}}(\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\})$, $\bar{a}_{\min} \approx 18,9 + 3,5 \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}$ (Gl. 87), $B_{\text{kor}} \approx 0,914$ (04.07.2017); $f_{\text{opt}}: [\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}_{\min}, \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}_{\max}] \rightarrow \mathbb{R}$, $\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\} \mapsto f_{\text{opt}}(\log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\})$, $\bar{a}_{\min} \approx 7,0 + 1,3 \log_{10} \{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{frei}}\}$ (Gl. 88), $B_{\text{kor}} \approx 0,992$ (29.10.2019). Aus den Nullstellen der x-Achsenschnittpunkte $P(\log_{10} \{K_{\text{d,app}}([\text{CaFura-2}]^2)\}, 0)$ der prognostizierten einfachen linearen Anpassungsfunktion ergaben sich $K_{\text{d,app}}([\text{CaFura-2}]^2) \approx 3,742 \mu\text{mol l}^{-1}$ (04.07.2017) bzw. $4,629 \mu\text{mol l}^{-1}$ (29.10.2019).

4.2.3.10.2.2 R_{\max} -, R_{\min} -Bestimmung

Zur Umrechnung $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ wurden R_{\max} und R_{\min} in *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten bestimmt (Abb. 4).

Meßprotokoll zur R_{\max} -, R_b -, $\Delta R(\text{Iono})$ -Bestimmung:

1. Ca^{2+} -Bildgebung: 3 min $300 \mu\text{l}$ $0,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung
2. 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 25 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l}$ $50,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$)
3. R_{\max} : absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts, R_b : \bar{R}_{arithm} für $t = 0 \text{ s}$ bis 180 s , $\text{SW} = \Delta R(\text{Iono}) = R_{\max} - R_b$ (Abb. 4 A)

Meßprotokoll zur R_{\min} -Bestimmung:

4 mal Inkubation:

1. $300 \mu\text{l}$ $15,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$, 10 min, RT, Dunkelheit
2. Ca^{2+} -Bildgebung: $300 \mu\text{l}$ $15,0 \text{ mmol l}^{-1}$ -EGTA-Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$
3. R_{\min} : \bar{R}_{arithm} für $t = 20 \text{ s}$ bis 40 s (Abb. 4 B)

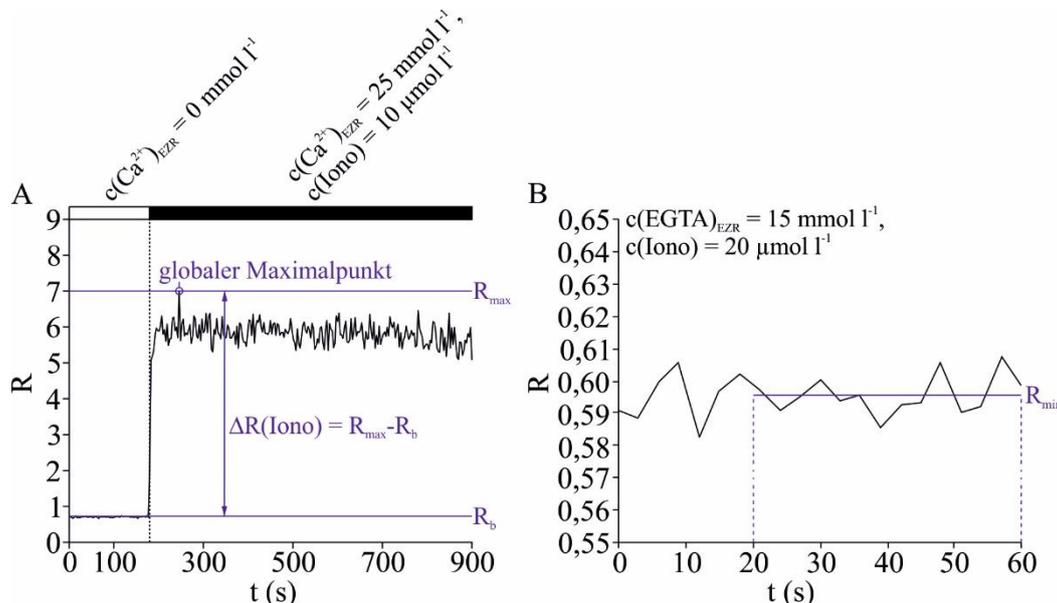
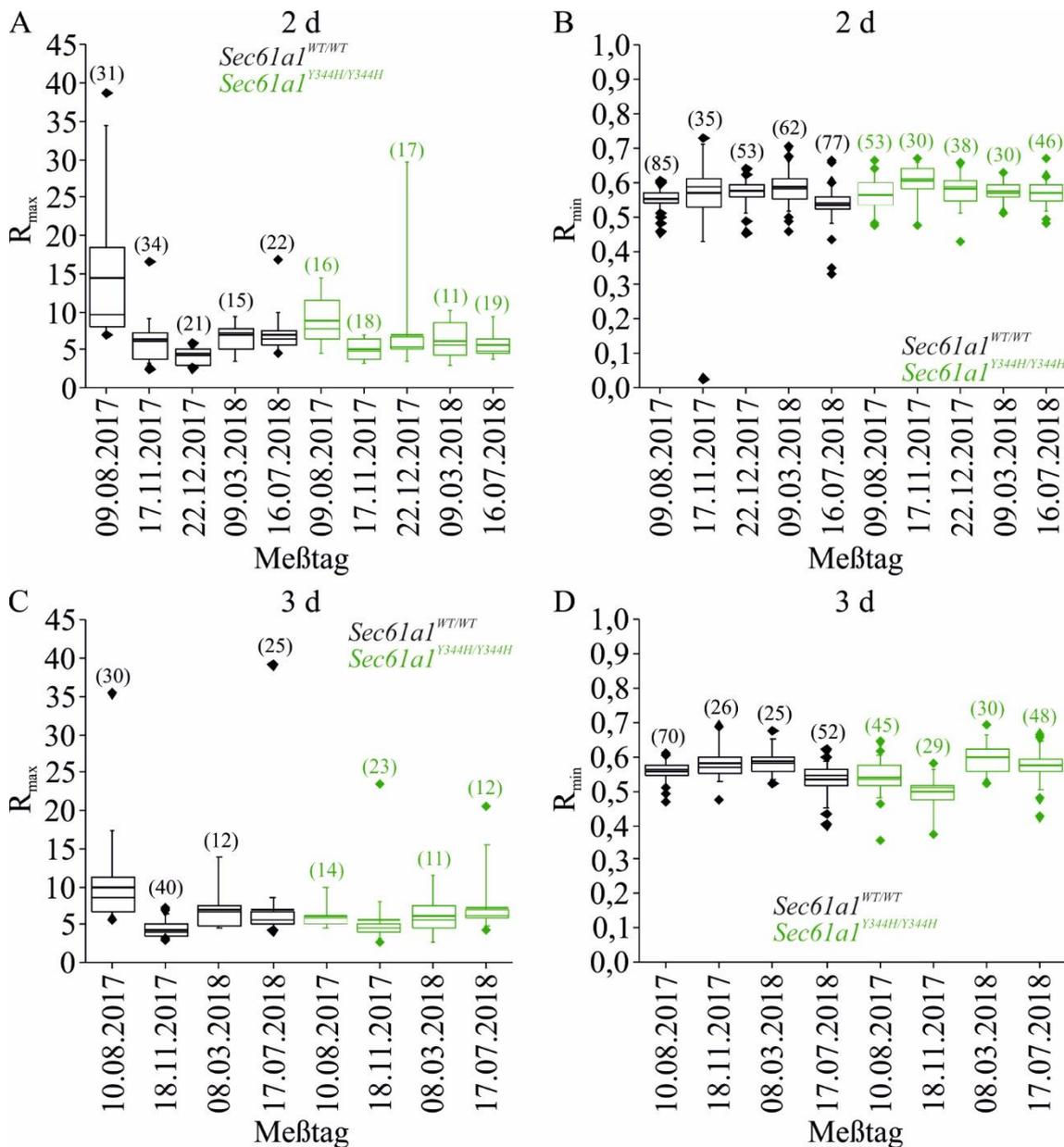


Abb. 4: Definition: R_{\max} , R_b , $\Delta R(\text{Iono})$, R_{\min}

Zur Umrechnung $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ wurden R_{\max} und R_{\min} in *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten bestimmt (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = $327,0 \text{ nm}$ bis $353,0 \text{ nm}$, λ_{ex2} -Bereich = $381,5 \text{ nm}$ bis $392,5 \text{ nm}$, λ_{em} -Bereich = $470,0 \text{ nm}$ bis $550,0 \text{ nm}$, $t(\text{Belichtung}) = 25 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 0,3 \text{ Hz}$, $\text{Pixelbinning} = 2 \cdot 2$, $\text{Vergr.} = 20\text{-fach}$; Beladung mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). A: Meßprotokoll zur R_{\max} -, R_b -, $\Delta R(\text{Iono})$ -Bestimmung: (1.) Ca^{2+} -Bildgebung: 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l}$ $0,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 25 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l}$ $50,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$) (3.) R_{\max} :

absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts, R_b : \bar{R}_{arithm} für $t = 0$ s bis 180 s, $SW = \Delta R(Iono) = R_{max} - R_b$. B: Meßprotokoll zur R_{min} -Bestimmung: (1.) 4 mal Inkubation: 300 μ l 15,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(Iono) = 20 \mu$ mol l^{-1} , 10 min, RT, Dunkelheit (2.) Ca^{2+} -Bildgebung: 1 min $c(EGTA)_{EZR} = 15$ mmol l^{-1} , $c(Iono) = 20 \mu$ mol l^{-1} (300 μ l 15,0 mmol l^{-1} -EGTA-Lösung mit $c(Iono) = 20 \mu$ mol l^{-1}) (3.) R_{min} : \bar{R}_{arithm} für $t = 20$ s bis 40 s.

R_{max} und R_{min} wurden mehrfach bestimmt, 5-mal 2 d nach Ausplattierung und 4-mal 3 d nach Ausplattierung der *Sec61a1*^{WT/WT}- bzw. der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten (Abb. 5 A - D). Die Werte wurden vereinigt ($R_{max}(2 \text{ d, } Sec61a1^{WT/WT}\text{-Hautfibroblasten}) + R_{max}(2 \text{ d, } Sec61a1^{Y344H/Y344H}\text{-Hautfibroblasten})$, $R_{min}(3 \text{ d, } Sec61a1^{WT/WT}\text{-Hautfibroblasten}) + R_{min}(3 \text{ d, } Sec61a1^{Y344H/Y344H}\text{-Hautfibroblasten})$) und anschließend kumulativ verrechnet (Abb. 5 E - H), so dass sich für die Hautfibroblasten 2 d bzw. 3 d nach Ausplattierung jeweils ein kumulativer $R_{max/min}$ -Wert ergab ($R_{max, 2 \text{ d vs. } 3 \text{ d: } 0,001 \leq p < 0,010$; $R_{min} 2 \text{ d vs. } 3 \text{ d: } 0,010 \leq p < 0,050$) (Abb. 5 I).



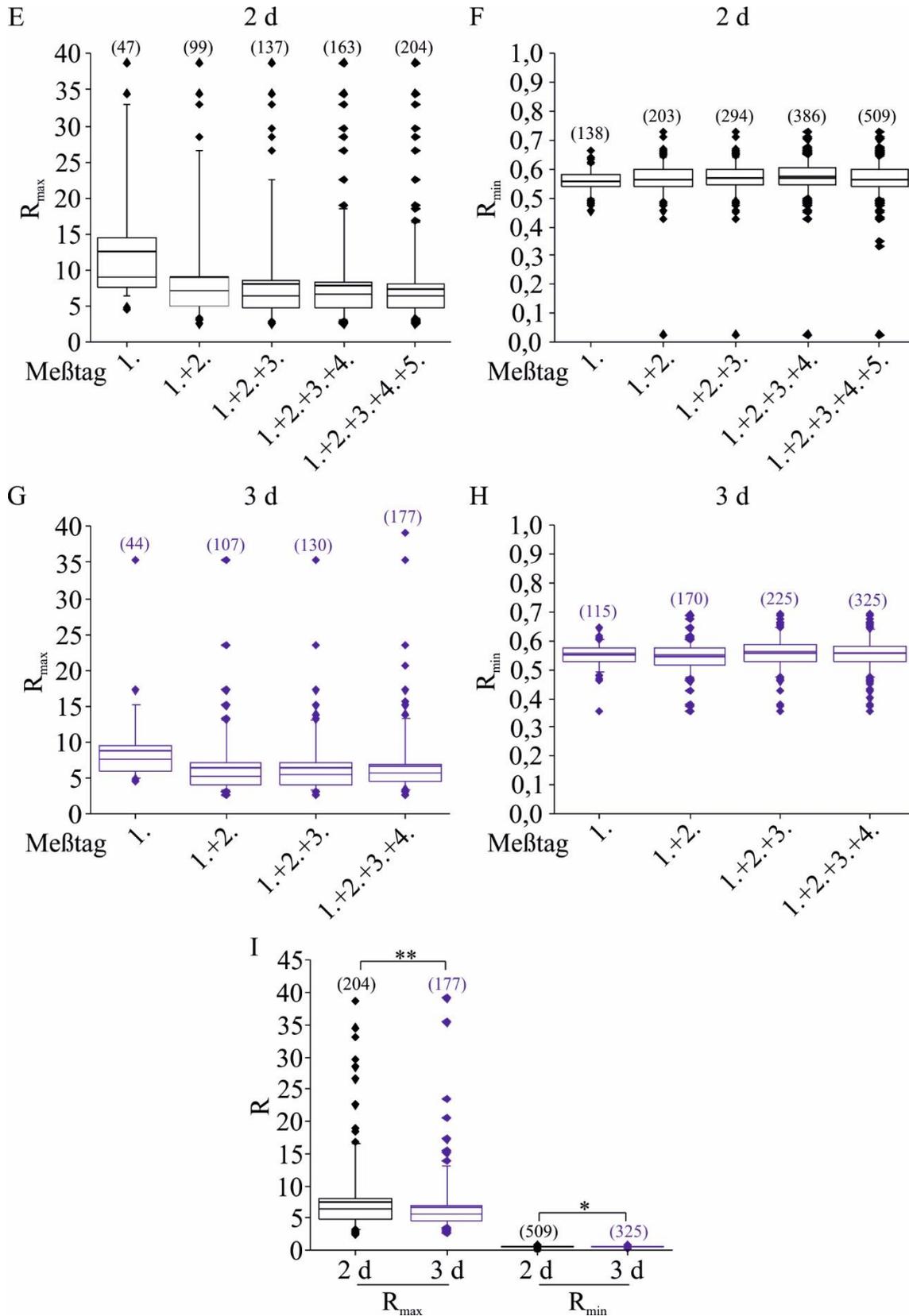


Abb. 5: R_{max}/R_{min} -Bestimmung

Zur Umrechnung $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ wurden R_{max} und R_{min} *in cellulo* bestimmt, 5-mal 2 d nach Ausplattierung und 4-mal 3 d nach Ausplattierung der *Sec61a1*^{WT/WT}- bzw. der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, $t(\text{Belichtung}) = 25$ ms, $f(\text{Bild}) = 0,3$ Hz, Pixelbinning = $2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach; Beladung mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). Meßprotokoll zur R_{max} -Bildgebung: Ca^{2+} -Bildgebung: (1.) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 25 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l } 50,0 \text{ mmol}$

$I^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$ (3.) R_{max} : absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts. Meßprotokoll zur R_{min} -Bestimmung: (1.) 4 mal Inkubation: $300 \mu\text{l } 15,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$, 10 min, RT, Dunkelheit (2.) Ca^{2+} -Bildgebung: 1 min $c(\text{EGTA})_{\text{EZR}} = 15 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l } 15,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-EGTA}$ -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$) (3.) R_{min} : \bar{R}_{arithm} für $t = 20 \text{ s}$ bis 40 s . A-D: R_{max} und R_{min} 2 d bzw. 3 d nach Ausplattierung der *Sec61a1*^{WT/WT}- (schwarz) bzw. der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten (grün) in Abhängigkeit vom Meßtag. E-I: Vereinigte Werte (R_{max} (2 d, *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten) + R_{max} (2 d, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten) (schwarz), R_{min} (3 d, *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten) + R_{min} (3 d, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten) (blau)) und deren kumulative Verrechnung, so dass sich jeweils ein kumulativer $R_{\text{max/min}}$ -Wert für die Hautfibroblasten 2 d bzw. 3 d nach Ausplattierung ergab. Kasten: IQR mit $\bar{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\bar{x}_{0,05}$ bis $\bar{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\bar{x}_{0,75}$ bis $\bar{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\bar{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\bar{x}_{0,95}$ bis x_{max} ; (-): Zellzahl. KST; $0,010 \leq p < 0,050 \cong *$, $0,001 \leq p < 0,010 \cong **$.

4.2.3.10.2.3 Umrechnung $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ und Bestimmung von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$

Mit den Werten für $K_{\text{d,app}}([\text{CaFura-2}]^2)$, R_{max} und R_{min} war gemäß (Gl. 83) die Umrechnung $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ sowie die Bestimmung von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ möglich. Als Bsp. zeigt Abb. 6 den Verlauf des Fura-2-Signals aus Abb. 2 I, d.h. eines *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten 2 d nach Ausplattierung, in Form von $R(t)$ und $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t)$ gemäß dem Meßprotokoll:

- 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung)
- 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \mu\text{mol l}^{-1}$)
- R_{b} bzw. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$: \bar{R}_{arithm} bzw. $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}}$ für $t = 100 \text{ s}$ bis 177 s , R_{max} bzw. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$: absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts, $\Delta R = R_{\text{max}} - R(t = 180 \text{ s})$ bzw. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t = 180 \text{ s})$

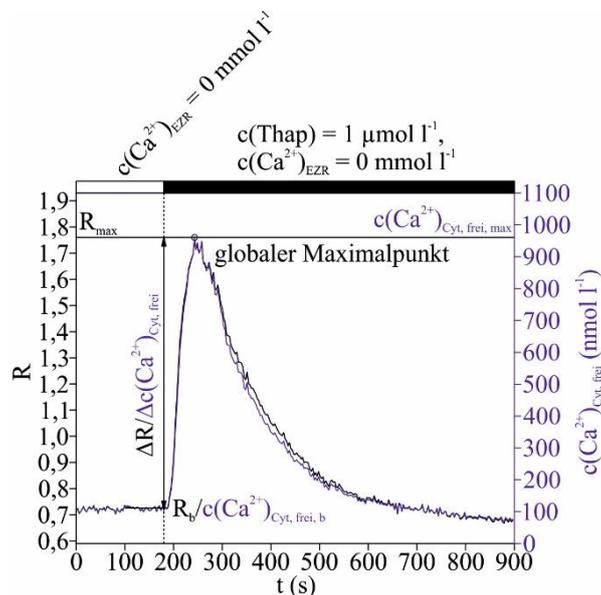


Abb. 6: Umrechnung $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ und Bestimmung von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$
Verlauf desselben Fura-2-Signals desselben *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten 2 d nach Ausplattierung in Form von $R(t)$ (schwarz) und $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t)$ (blau) (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = $327,0 \text{ nm}$ bis $353,0 \text{ nm}$, λ_{ex2} -Bereich = $381,5 \text{ nm}$ bis $392,5 \text{ nm}$, λ_{em} -Bereich = $470,0 \text{ nm}$ bis $550,0 \text{ nm}$, t (Belichtung) = 25 ms , f (Bild) = $0,3 \text{ Hz}$, Pixelbinning = $2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach ; Beladung mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). Meßprotokoll: (1.) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung) (2.) 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \mu\text{mol l}^{-1}$) (3.) R_{b} bzw. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$: \bar{R}_{arithm} bzw. $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}}$ für $t = 100 \text{ s}$ bis 177 s , R_{max} bzw. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$: absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts, $\Delta R = R_{\text{max}} - R(t = 180 \text{ s})$ bzw. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t = 180 \text{ s})$.

Die oben festgelegte Definition von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ liegt allen in dieser Arbeit dargestellten thapsigargin- bzw. ionomycininduzierten Fura-2-Signalen zugrunde. Für Hautfibroblasten 2 d bzw. 3 d nach Trypsinierung/Ausplattierung ergaben sich aus den Werten in Abb. 2 (J, K) somit $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (Abb. 7). Die $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}}$ arithm lagen mit 121 nmol l^{-1} bzw. 122 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{WT/WT}) und 96 nmol l^{-1} bzw. 105 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) (Abb. 7 A) im in der Literatur zu findenden Bereich zwischen 20 nmol l^{-1} und 300 nmol l^{-1} (Nakajima, Harada *et al.*, 1993; Westerblad und Allen, 1994; Helmchen, Imoto *et al.*, 1996; Kennedy und Thomas, 1996; Maravall, Mainen *et al.*, 2000). Da es innerhalb eines Hautfibroblastentyps für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ zw. 2 d bzw. 3 d keinen signifikanten Unterschied ($p \geq 0,050$) gab (Abb. 7 B), wurden die entsprechenden Werte vereinigt (Abb. 7 C). Hier zeigten die *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten deutlich kleinere Werte für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ ($0,001 \leq p < 0,010$), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ ($p < 0,001$) und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ ($p < 0,001$).

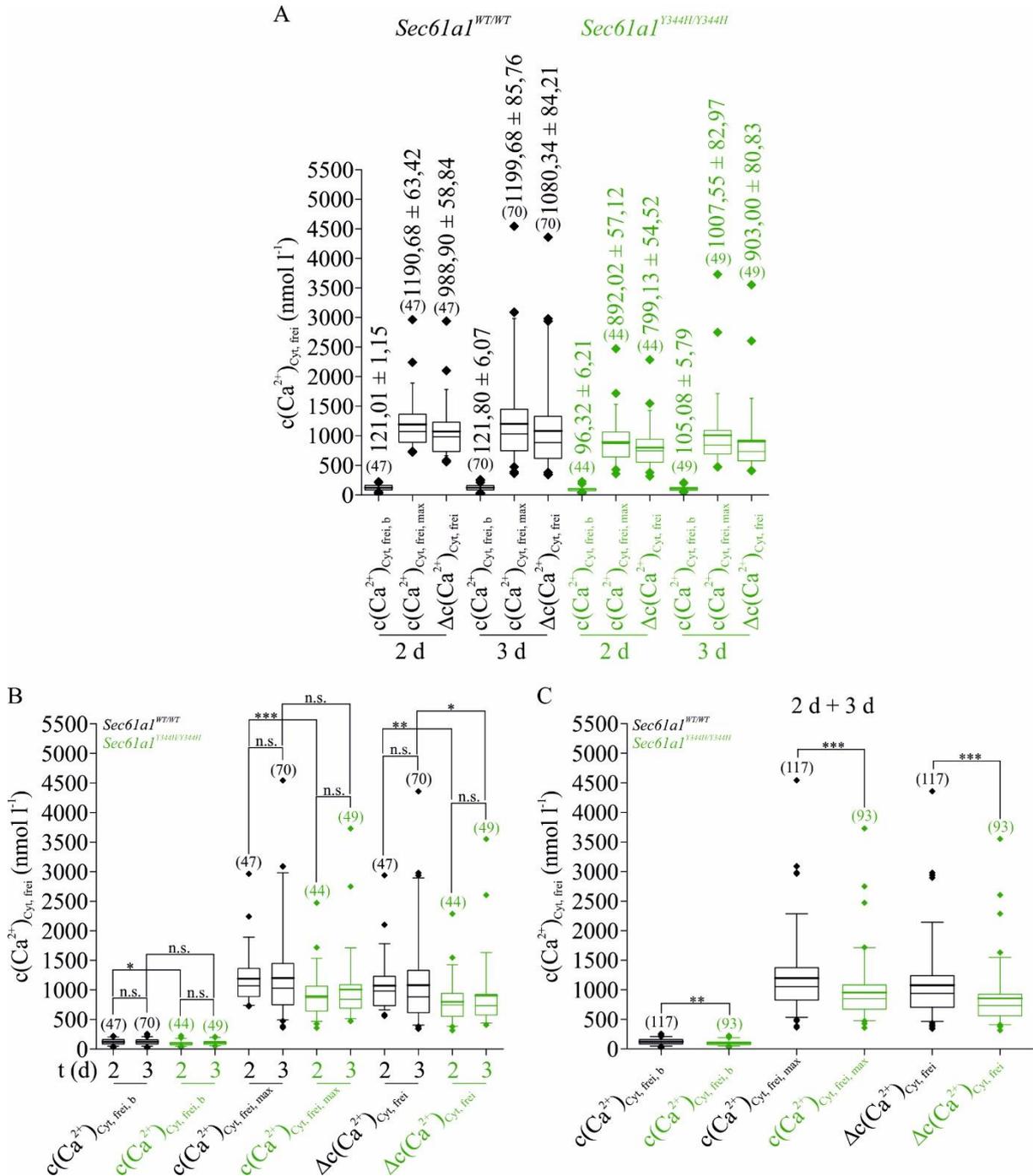


Abb. 7: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ für Hautfibroblasten 2 d bzw. 3 d nach Trypsinierung/Ausplattierung

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, arithm}}$ für $t = 100$ s bis 177 s, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$: absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t = 180 \text{ s})$. A: Umrechnung $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ der Werte aus Abb. 2 J, K. Zahl über Kasten-Antenne-Diagramm: $\bar{x}_{\text{arithm}} \pm s(\bar{x}_{\text{arithm}})$. B: Vergleich 2 d vs. 3 d (*Sec61a1*^{WT/WT} vs. *Sec61a1*^{WT/WT} bzw. *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} vs. *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) und 2 d vs. 2 d bzw. 3 d vs. 3 d (*Sec61a1*^{WT/WT} vs. *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) nach Trypsinierung/Ausplattierung der Hautfibroblasten. C: Vereinigung der Werte für 2 d und 3 d nach Trypsinierung/Ausplattierung der Hautfibroblasten. Vergleich $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} ; (·): Zellzahl. KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $0,010 \leq p < 0,050 \hat{=} *$, $0,001 \leq p < 0,010 \hat{=} **$, $p < 0,001 \hat{=} ***$.

4.2.3.10.3 z_0 - und $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ -Bestimmung

Die z_0 - und $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ -Bestimmung basieren auf einer Methode, die in „A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores“ (Bergling, Dolmetsch *et al.*, 1998) beschrieben wird.

Nomenklatur: Gesamtmeßdauer 900 s: $t = -180$ s Meßstart, $t = 0$ s Applikation (Thapsigargin), $t = 720$ s Meßende; $v_{Ca^{2+}} Ca^{2+}$ -Flux ($[v_{Ca^{2+}}] = \text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$); $\Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t) = c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t) - c(Ca^{2+})_{Cyt, frei, min}(-180 \text{ s bis } -1 \text{ s})$ (Gl. 92). Die momentane $\Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t)$ ergibt sich aus:

$$\frac{d}{dt} \Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t) = r v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt) - v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR) \quad (\text{Gl. 93})$$

Annahme: $v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR) = \overline{\hat{a}_2(Cyt \rightarrow EZR)}_{arithm} \Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t)$ (Gl. 94), $\overline{\hat{a}_2(Cyt \rightarrow EZR)}_{arithm} = \text{konst.}$ (einfache lineare Abhängigkeit). Der Proportionalitätsfaktor $\overline{\hat{a}_2(Cyt \rightarrow EZR)}_{arithm}$ (Transportgeschwindigkeitsfaktor) wurde experimentell als erstes bestimmt.

Annahme: $v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt) \sim c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t) - c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t)$. Da $c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t) \gg c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t)$, wird $c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t)$ vernachlässigt und es gilt $v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt) \sim c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t)$, d.h.

$$v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt) = - \frac{d}{dt} c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t) = \frac{1}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}} c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t) \quad (\text{Gl. 95}) \Leftrightarrow$$

$$\int_{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t_1 = 0 \text{ s})}^{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t_2 = t)} \frac{1}{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(u)} dc(Ca^{2+})_{ERL, frei}(u) = - \frac{1}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}} \int_{t_1 = 0 \text{ s}}^{t_2 = t} du \quad (\text{Gl. 96})$$

$$\Leftrightarrow [\log_e \{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(u)\}]_{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t_1 = 0 \text{ s})}^{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t_2 = t)} = - \frac{1}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}} [u]_{t_1 = 0 \text{ s}}^{t_2 = t} \quad (\text{Gl. 97}) \Leftrightarrow$$

$$\log_e \{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t)\} - \log_e \{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(0 \text{ s})\} = - \frac{1}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}} (t - 0 \text{ s}) \quad (\text{Gl. 98}) \Leftrightarrow$$

$$\log_e \{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t)\} = \log_e \{c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(0 \text{ s})\} - \frac{t}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}} \quad (\text{Gl. 99}) \Leftrightarrow$$

$$|c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t)| = |c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(0 \text{ s})| e^{-\frac{t}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}} \quad (\text{Gl. 100}) \Leftrightarrow$$

$$c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t) = c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(0 \text{ s}) e^{-\frac{t}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}} \quad (\text{Gl. 101}) \Rightarrow$$

$$v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt) = - \frac{d}{dt} c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(t) = \frac{1}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}} c(Ca^{2+})_{ERL, frei}(0 \text{ s}) e^{-\frac{t}{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}}$$

(Gl. 102).

Da $v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)$ mit dieser Methode nicht direkt bestimmt werden kann, wird $v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)$

in (Gl. 93) mit dem gewichteten Volumenanteil $r = \frac{V_{ERL} f_{Cyt}}{V_{Cyt} f_{ERL}}$ (Gl. 103) (V_{ERL} ER-Lumen-Volumen, f_{ERL}

Fraktion des freien Ca^{2+} im ER-Lumen, V_{Cyt} Cytosol-Volumen, f_{Cyt} Fraktion des freien Ca^{2+} im Cytosol;

wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt) multipliziert, um das cytosolische Äquivalent $z_0 = r c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}(0 \text{ s})$ (Gl. 104) zu erhalten, das experimentell bestimmbar ist:

$$r v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt}) = \frac{V_{\text{ERL}} f_{\text{Cyt}}}{V_{\text{Cyt}} f_{\text{ERL}}} \frac{1}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}(0 \text{ s}) e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} = \frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} \quad (\text{Gl. 105})$$

(Gl. 94) und (Gl. 105) in (Gl. 93) und Umformung ergibt:

$$\frac{d}{dt} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = \frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} - |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t)$$

$$(\text{Gl. 106}) \Rightarrow$$

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) =$$

$$\int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} \left(\frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} e^{-\frac{u}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} - |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) \right) du$$

$$(\text{Gl. 107}) \Leftrightarrow$$

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) =$$

$$\int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} \frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} e^{-\frac{u}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} du - \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du$$

$$(\text{Gl. 108}) \Leftrightarrow$$

$$\frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} e^{-\frac{u}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} du =$$

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du \quad (\text{Gl. 109}) \Leftrightarrow$$

$$\frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \left[-\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} \right]_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} =$$

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du \quad (\text{Gl. 110}) \Leftrightarrow$$

$$\frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \left(-\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} - \left(-\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} e^{-\frac{0 \text{ s}}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} \right) \right) =$$

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du \quad (\text{Gl. 111}) \Leftrightarrow$$

$$z_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} \right) = \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=t} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du$$

$$(\text{Gl. 112})$$

Für $t \rightarrow \infty$ ergibt sich aus (Gl. 112) z_0 , d.h.

$$z_0 \left(1 - \lim_{t \rightarrow \infty} e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} \right) = \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=\infty} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du$$

$$(\text{Gl. 113}) \Leftrightarrow$$

$$z_0 = \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=\infty} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du \quad (\text{Gl. 114})$$

In dieser Arbeit ist $t_2 = 720 \text{ s}$, so dass sich mit den experimentell bestimmten Werten für $\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}}$ und $\int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=720 \text{ s}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du$ ein Näherungswert für z_0 ergab:

$$z_0 \approx \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=720 \text{ s}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du \quad (\text{Gl. 115})$$

Mit dem experimentell bestimmten Wert für $\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}}$ und dem experimentell bestimmten Näherungswert für z_0 ergab sich zum Schluß aus (Gl. 112) ein Näherungswert für $\tau_{\text{vCa}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$:

$$\tau_{\text{vCa}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} \approx - \frac{t}{\log_e \left(1 - \frac{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=720 \text{ s}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du}{z_0} \right)} \quad (\text{Gl. 116})$$

Mit $\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}}$, z_0 und $\tau_{\text{vCa}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ ergibt sich aus (Gl. 106) die entsprechende Anpassungsfunktion:

$$\frac{d}{dt} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = \frac{z_0}{\tau_{\text{vCa}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} e^{-\frac{t}{\tau_{\text{vCa}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} - \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) \quad (\text{Gl. 106}), t = 0 \text{ s}, \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(0 \text{ s}) = 0 \text{ mol l}^{-1} \text{ (AWP)}$$

1. Lösen der entsprechenden homogenen DGL 1. Ordnung (Variablenseparation)

$$\frac{d}{dt} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = - \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) \quad (\text{Gl. 117}) \Rightarrow$$

$$\int \frac{1}{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t)} d\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = - \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \int dt \quad (\text{Gl. 118}) \Leftrightarrow$$

$$\log_e \left\{ \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) \right\} + C_1 = - \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t + C_2 \quad (\text{Gl. 119}) \Leftrightarrow$$

$$\left| \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) \right| = e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t + C_2 - C_1} = e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t} e^{C_2 - C_1} = e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t} C_3 \quad (\text{Gl. 120}) \Leftrightarrow$$

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = C_3 e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t} \quad (\text{Gl. 121})$$

2. Lösen der inhomogenen DGL 1. Ordnung

Variation der Konstanten: $C_3 \rightarrow C_3(t)$, so dass

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = C_3(t) e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t} \quad (\text{Gl. 122})$$

$$\frac{d}{dt} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = \left(\frac{d}{dt} C_3(t) \right) e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t} - C_3(t) \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t} \quad (\text{Gl. 123})$$

(Gl. 122) und (Gl. 123) in (Gl. 106):

$$\left(\frac{d}{dt} C_3(t) \right) e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t} - C_3(t) \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t} = \frac{z_0}{\tau_{\text{vCa}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} e^{-\frac{t}{\tau_{\text{vCa}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} - \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} C_3(t) e^{-\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} t}$$

(Gl. 124) \Leftrightarrow

$$\left(\frac{d}{dt} C_3(t)\right) e^{-|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} t} = \frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} \quad (\text{Gl. 125}) \Rightarrow$$

$$C_3(t) = \frac{z_0}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \int e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} e^{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} t} dt \quad (\text{Gl. 126}) \Leftrightarrow$$

$$C_3(t) = \frac{z_0}{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} - 1} e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} t} + C_4 \quad (\text{Gl. 127})$$

(Gl. 127) in (Gl. 122):

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = \frac{z_0}{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} - 1} e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} + C_4 e^{-|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} t} \quad (\text{Gl. 128})$$

Für $t = 0$ s und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(0 \text{ s}) = 0 \text{ mol l}^{-1}$ ergibt sich $C_4 = -\frac{z_0}{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} - 1}$ (Gl. 129).

Einsetzen von (Gl. 129) in (Gl. 127) ergibt die Anpassungsfunktion:

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) = \frac{z_0}{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} - 1} \left(e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}} - e^{-|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} t} \right) \quad (\text{Gl. 130})$$

4.2.3.11 ER-GCaMP6-150-Konstrukt

Im Gegensatz zu den chemisch synthetisierten Ca^{2+} -Indikatoren (z.B. Fura-2) handelt es sich beim ER-GCaMP6-150-Konstrukt um ein genetisch codiertes, fluoreszierendes, intensimetrisches, ultrasensitives Ca^{2+} -Indikatorprotein (genetisch codierter Ca^{2+} -Indikator GECl, fluoreszierendes Ca^{2+} -Indikatorprotein FCIP), das im ER lokalisiert ist (de Juan-Sanz, Holt *et al.*, 2017). Das ER-GCaMP6-150-Konstrukt wurde von Dr. Jaime de Juan-Sanz und Prof. Dr. Timothy A. Ryan (Department of Biochemistry, Weill Cornell Medicine, New York, New York 10065, USA) bereitgestellt und steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Die Codonverwendung wurde an den Modellorganismus der Maus angepaßt (Codonoptimierung). Die Ultrasensitivität gegenüber Änderungen der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ ist mit der chemisch synthetisierter Ca^{2+} -Indikatoren vergleichbar (Ding, Luo *et al.*, 2014). Zu den fluoreszierenden Proteinen (FP) gehört die Gruppe der phototransformierbaren FPs (PTFP). Diese gliedert sich in irreversibel photoaktivierbare (PAFP), irreversibel photokonvertierbare (PCFP) und reversibel schaltbare (RSFP) FPs (Duan, Adam *et al.*, 2014). In Anlehnung daran, wäre ER-GCaMP6-150 auch als reversibel Ca^{2+} -schaltbares FP einzuordnen. In der Primärstruktur des ER-GCaMP6-150-Konstrukts finden sich vom N- zum C-terminalen Ende hin: CALR-Signalpeptid / Linker / 6 x His / M13 / cpEGFP / CALM / Linker / KDEL-Sequenz. Das modifizierte humane CALR-Signalpeptid dient der cotranslationalen Translokation vom Cytosol ins ER-Lumen. Das zirkulär permutierte, verstärkt

grünfluoreszierende Protein (cpEGFP) besteht aus einem überwiegend antiparallelen 11-strängigen β -Faß mit zentral gelegener α -Helix, in der aus einer TYR-Sequenz autokatalytisch durch Cyclisierung, Dehydratisierung ($2 \text{ H}_2\text{O}$) und Oxidation (O_2) das 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-5-imidazolinon-Chromophor (*p*-HBI-Chromophor) synthetisiert wird. Den Ca^{2+} -Sensor bildet die CALM-Domäne mit ihren 4 EF-Hand-Motiven, die korrespondierende intramolekulare Ca^{2+} /CALM-Bindestelle wird vom M13-Peptid, einer α -Helix, die Teil der Myosin-Leichte-Kette-Kinase (EC 2.7.11.18) ist, gebildet. Die KDEL-Sequenz fungiert als ER-Retentionssignal solubler ER-residenter Proteine. Der putative Mechanismus der reversiblen Ca^{2+} -induzierten Fluoreszenzänderung ist Schema 11 zu entnehmen.

Schema 11: Putative reversible Ca^{2+} -induzierten Fluoreszenzänderung von GCaMP6

niedrigere $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}} \Rightarrow$ laterale Öffnung (ca. $0,5 \text{ nm} \cdot 1 \text{ nm}$) des β -Faßes nicht verschlossen \Rightarrow *p*-HBI-Chromophor solvensexponiert \Rightarrow *p*-HBI-Chromophorprotonierung (Phenolgruppe) \Rightarrow keine Fluoreszenz \Rightarrow $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ steigt \Rightarrow Wechselwirkung zwischen Ca^{2+} und CALM \Rightarrow Wechselwirkung zwischen Ca^{2+} /CALM und M13 \Rightarrow Wechselwirkung zwischen Ca^{2+} /CALM und lateraler Öffnung des β -Faßes \Rightarrow lateraler Öffnung des β -Faßes verschlossen \Rightarrow *p*-HBI-Chromophor nicht solvensexponiert \Rightarrow *p*-HBI-Chromophordeprotonierung (Phenolatgruppe) \Rightarrow Fluoreszenz (Akerboom, Rivera *et al.*, 2009; Ding, Luo *et al.*, 2014)

M13 Teil der Myosin-Leichte-Kette-Kinase (EC 2.7.11.18), eine α -Helix
p-HBI-Chromophor 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-5-imidazolinon-Chromophor

Tab. 25 listet wichtige Eigenschaften, die in *in vitro*-Experimenten bestimmt wurden (de Juan-Sanz, Holt *et al.*, 2017).

Tab. 25: Eigenschaften des ER-GCaMP6-150-Konstrukts aus *in vitro*-Experimenten (de Juan-Sanz, Holt *et al.*, 2017)
 n_H Hill-Koeffizient, D Dynamikbereich, $K_d(\text{Ca}^{2+}\text{-ER-GCaMP6-150})$ Dissoziationskonstante des Ca^{2+} -ER-GCaMP6-150-Komplexes ($\mu\text{mol l}^{-1}$), $pK_s (- \text{Ca}^{2+})$ pK_s bei $c(\text{Ca}^{2+}) = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $pK_s (+ \text{Ca}^{2+})$ pK_s bei sättigender $c(\text{Ca}^{2+})$.

n_H	D	$K_d(\text{Ca}^{2+}\text{-ER-GCaMP6-150})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	$pK_s (- \text{Ca}^{2+})$	$pK_s (+ \text{Ca}^{2+})$
1,6	45,0	150	> 12	7,09

Näherungsweise berechnet sich die ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen im Ruhezustand durch:

$$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}} = K_d(\text{Ca}^{2+}\text{-ER-GCaMP6-150}) \left(\frac{\frac{F_{\text{basal}} - 1}{F_{\text{max}} - D}}{1 - \frac{F_{\text{basal}}}{F_{\text{max}}}} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Gl. 131})$$

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$	basale ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
$K_d(\text{Ca}^{2+}\text{-ER-GCaMP6-150})$	Dissoziationskonstante des Ca^{2+} -ER-GCaMP6-150-Komplexes ($\mu\text{mol l}^{-1}$) 150 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Tab. 25)
F_b	basale Fluoreszenzintensität
F_{max}	maximale Fluoreszenzintensität ($c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR, frei}} = 2 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$) $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR, frei}}$ extrazelluläre Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen (mmol l^{-1}) $c(\text{Iono})$ Ionomycinstoffmengenkonzentration ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
D	Dynamikbereich $\frac{F_{\text{max}}}{F_{\text{min}}}$ F_{min} minimale Fluoreszenzintensität ($c(\text{EGTA})_{\text{EZR}} = 5 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$) $c(\text{EGTA})_{\text{EZR}}$ extrazelluläre Stoffmengenkonzentration des EGTA
n_H	Hill-Koeffizient 1,6 (Tab. 25)

Da Ionomycin einen elektroneutralen $2 \text{ H}^+ / 1 \text{ Ca}^{2+}$ -Antiport (4.2.3.7) katalysiert, steigt bei der Bestimmung von F_{max} der ER-luminale pH-Wert $\text{pH}(\text{ER})$ (1 Ca^{2+} -Kation entlang des Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten: Cytosol \rightarrow ER-Lumen, 2 H^+ : ER-Lumen \rightarrow Cytosol). Hierdurch ändern sich pK_s (+ Ca^{2+}) und n_H des ER-GCaMP6-150, was einen Einfluss auf den F_{max} -Wert hat. Der hieraus resultierende Fehler in der Bestimmung der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ wird auf Fehler bei der Messung der relativen Fluoreszenzänderung $\Delta F_{\text{rel}} = \frac{F_{\text{max}}}{F_b}$ (Gl. 132) (ΔF_{rel} relativen Fluoreszenzänderung, F_{max} maximale Fluoreszenzintensität, F_b basale Fluoreszenzintensität) zurückgeführt und ergibt sich zu:

$$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}} = \left| \frac{\partial}{\partial t} c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}} \right| \Delta f \quad (\text{Gl. 133})$$

$$\text{mit } \frac{\partial}{\partial t} c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}} = \frac{K_d(\text{Ca}^{2+}\text{-ER-GCaMP6-150})(-1+D)\left(\frac{f-D}{D-fD}\right)^{\frac{1}{n}}}{n(-1+f)(f-D)} \quad (\text{Gl. 134})$$

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$	basale ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
$K_d(\text{Ca}^{2+}\text{-ER-GCaMP6-150})$	Dissoziationskonstante des Ca^{2+} -ER-GCaMP6-150-Komplexes ($\mu\text{mol l}^{-1}$) 150 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Tab. 25)

D	Dynamikbereich $\frac{F_{\max}}{F_{\min}}$
	F_{\max} maximale Fluoreszenz $(c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR, frei}} = 2 \text{ mmol l}^{-1}, c(\text{Iono}) = 20 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1})$ $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR, frei}}$ extrazelluläre Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen (mmol l^{-1}) $c(\text{Iono})$ Ionomycinstoffmengenkonzentration ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
	F_{\min} minimale Fluoreszenz ($c(\text{EGTA})_{\text{EZR}} = 5 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{EGTA})_{\text{EZR}}$ extrazelluläre Stoffmengenkonzentration des EGTA
n_H	Hill-Koeffizient 1,6 (Tab. 25)

Da Nigericin einen elektroneutralen $1 \text{ H}^+/1 \text{ Kat}^+$ -Antiport katalysiert (4.2.3.9), wurden, um diesen Fehler zu korrigieren, Ionomycin und Nigericin gleichzeitig appliziert, d.h. der durch Ionomycin über die ER-Membran entstehende pH-Wertgradient wird durch Nigericin abgebaut (1 H^+ entlang des pH-Wertgradienten: Cytosol \rightarrow ER-Lumen, 1 Kat^+ (vermutlich K^+): ER-Lumen \rightarrow Cytosol).

4.2.3.11.1 Transfektion der Hautfibroblasten mit dem *ER-GCaMP6-150*-Konstrukt

Nach Ausplattierung der Hautfibroblasten ergibt sich das Transfektionsprotokoll wie folgt:

1. Inkubation ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5 \text{ } \%$ $\text{CO}_2/95 \text{ } \%$ O_2 , 24 h)
2. Waschen (2 ml DMEM (Hautfibroblasten) ohne Penicillin-Streptomycin)
3. 2 ml DMEM (Hautfibroblasten) ohne Penicillin-Streptomycin pro Kulturschale
4. Applikation: $100 \text{ } \mu\text{l}$ Opti-MEMTM (Opti-MEMTM | Reduced Serum Medium, GlutaMAXTM Supplement; Nr. 51985026; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) + $2,5 \text{ } \mu\text{l}$ FuGENE[®] HD-Transfektionsreagenz (FuGENE[®] HD Transfection Reagent; Nr. E231A; Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) + $1 \text{ } \mu\text{g}$ *ER-GCaMP6-150*-Konstrukt (Stammlösung: $1,178 \text{ g l}^{-1}$ (in nucleasefreiem Wasser (Nuclease-Free Water; Nr. P119C; Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) vom 29.01.2019) (Inkubation der Mischung vor Applikation (RT, 15 min, Dunkelheit))
5. Inkubation ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5 \text{ } \%$ $\text{CO}_2/95 \text{ } \%$ O_2 , 48 h)
6. Ca^{2+} -Bildgebung

Als indirektes Maß der relativen *ER-GCaMP6-150*-Konstrukt-Genexpression wurde die korrespondierende nichtnormierte Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ s}$ ($F(0 \text{ s})$) der Ca^{2+} -Signale aus Abb. 11 A, B, D und E verwendet, wobei die korrespondierenden Werte zu A und D ($(28) + (19) = (47)$) bzw. B und E ($(30) + (21) = (51)$) vereinigt wurden (Abb. 8). Es gab keinen Unterschied ($p \geq 0,050$), d.h. $F(0 \text{ s})$ ($\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$) $\approx F(0 \text{ s})$ ($\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$).

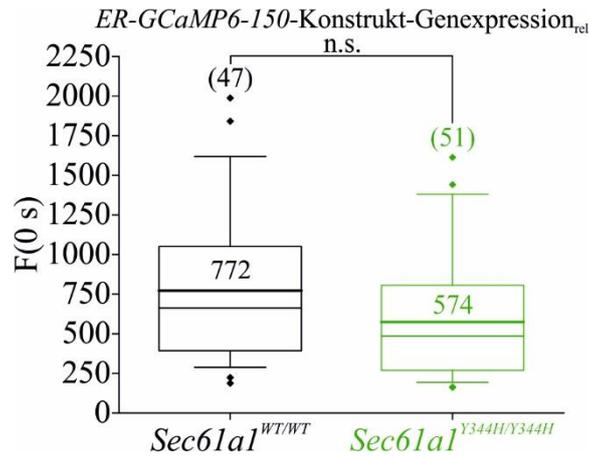


Abb. 8: Relative ER-GCaMP6-150-Konstrukt-Genexpression (ER-GCaMP6-150-Konstrukt-Genexpression_{rel})

Als indirektes Maß der relativen ER-GCaMP6-150-Konstrukt-Genexpression wurde die korrespondierende nichtnormierte Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0$ s ($F(0$ s)) der Ca^{2+} -Signale aus Abb. 11 A, B, D und E verwendet, wobei die korrespondierenden Werte zu A und D ((28) + (19) = (47)) bzw. B und E ((30) + (21) = (51)) vereinigt wurden (Systemeinstellung: λ_{ex} -Bereich = 459,0 nm bis 481,0 nm, λ_{em} -Bereich = 505,0 nm bis 545,0 nm, t (Belichtung) = 50 ms, f (Bild) = 1 Hz, Pixelbinning = $4 \cdot 4$, Vergr. 60-fach, Öl-Immersion). Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie, Zahl in Kasten); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} . KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$ (·): Zellzahl.

4.2.3.11.2 $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ -Bestimmung

Zur Umrechnung $F \rightarrow c$ wurden F_{b} , F_{max} , F_{min1} und F_{min2} in *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten bestimmt (Abb. 9).

Meßprotokoll zur F_{b} -, F_{max} - und F_{min1} -Bestimmung innerhalb desselben *Sec61a1*^{WT/WT}- bzw. *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten:

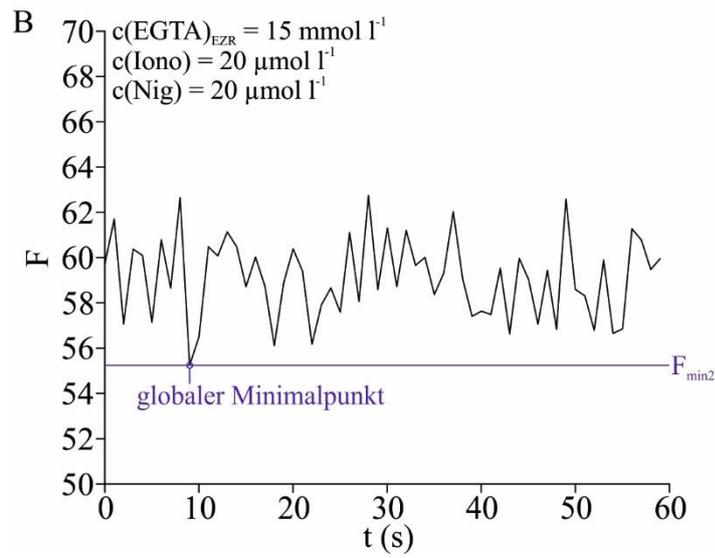
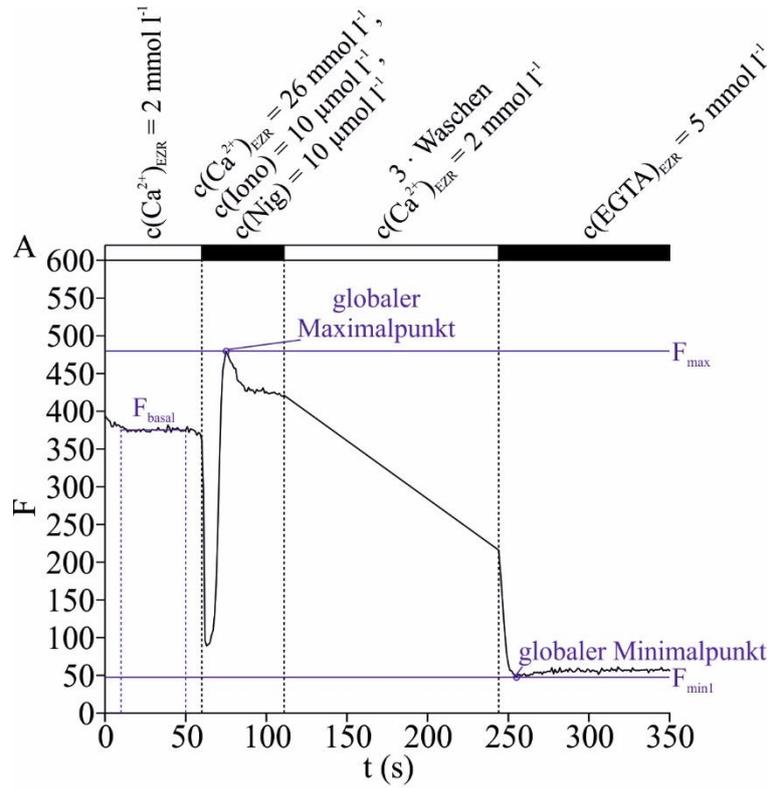
1. 1 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 2 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung); F_{b} : \bar{F}_{arithm} für $t = 10$ s bis 50 s
2. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 26 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 10 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$, $c(\text{Nig}) = 10 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 50,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ und $c(\text{Nig}) = 20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$): F_{max} : absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts
3. Meßstop: 3 mal Waschen mit 300 μl 2,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung, komplette Abnahme der 2,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung
4. Meßstart: 600 μl 5 mmol l^{-1} -EGTA-Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ und $c(\text{Nig}) = 20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$: F_{min1} : absolutes Minimum des globalen Minimalpunkts (Abb. 9 A)

Um sicherzustellen, dass es sich bei F_{min1} wirklich um die minimale Fluoreszenz handelte, wurde diese nochmals gesondert bestimmt und mit F_{min2} bezeichnet.

Meßprotokoll der F_{min2} -Bestimmung:

1. 4 mal Inkubation: 300 μl 15,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ und $c(\text{Nig}) = 20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$, 10 min, RT, Dunkelheit
2. Ca^{2+} -Bildgebung: 1 min $c(\text{EGTA})_{\text{EZR}} = 15 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (300 μl 15,0 mmol l^{-1} -EGTA-Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$)
3. F_{min2} : absolutes Minimum des globalen Minimalpunkts (Abb. 9 B)

Zwischen F_{\max} und $F_{\min 1}$ besteht eine positive einfache lineare Korrelation (Abb. 9 C): $f_{\text{opt}}: [F_{\min 1, \min}, F_{\min 1, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\min 1} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\min 1}, \vec{a}_{\min}) \approx -446,7 + 12,9F_{\min 1}$ (Gl. 135), $B_{\text{kor}} \approx 0,759$ (*Sec61a1*^{WT/WT}); $f_{\text{opt}}: [F_{\min 1, \min}, F_{\min 1, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\min 1} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\min 1}, \vec{a}_{\min}) \approx -408,2 + 14,2F_{\min 1}$ (Gl. 136), $B_{\text{kor}} \approx 0,655$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). Die F_{\min} -Werte innerhalb eines Hautfibroblastentyps bzw. zwischen *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten weisen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (alle $p \geq 0,05$) (Abb. 9 D). Gleiches gilt für die Dynamikbereiche $D_1 = \frac{F_{\max}}{F_{\min 1}}$ und $D_2 = \frac{F_{\max}}{\overline{F_{\min 2}}_{\text{arithm}}}$, sowie die $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ (alle $p \geq 0,05$) (Abb. 9 E). Nach (Gl. 131) ergeben sich die $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b arithm}}$ zu: ca. 521,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ($F_{\min 1}$) bzw. ca. 508,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ($\overline{F_{\min 2}}_{\text{arithm}}$) für *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten, ca. 476,6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ($F_{\min 1}$) bzw. ca. 454,7 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ($\overline{F_{\min 2}}_{\text{arithm}}$) für *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten (Abb. 9 F) und liegen somit im unteren Bereich der in der Literatur beschriebenen $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}$ -Werte von 0,001 mmol l⁻¹ bis 5 mmol l⁻¹ (Bygrave und Benedetti, 1996; Meldolesi und Pozzan, 1998). Zwischen $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ und F_{\max} bzw. $F_{\min 1}$ besteht keine einfache lineare Korrelation (Abb. 9 G, H): $f_{\text{opt}}: [F_{\max, \min}, F_{\max, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\max} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\max}, \vec{a}_{\min}) \approx 531,3 - 0,0F_{\max}$ (Gl. 137), $B_{\text{kor}} \approx -0,081$ bzw. $f_{\text{opt}}: [F_{\min 1, \min}, F_{\min 1, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\min 1} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\min 1}, \vec{a}_{\min}) \approx 486,8 + 0,5F_{\min 1}$ (Gl. 138), $B_{\text{kor}} \approx -0,078$ (*Sec61a1*^{WT/WT}); $f_{\text{opt}}: [F_{\max, \min}, F_{\max, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\max} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\max}, \vec{a}_{\min}) \approx 504,4 - 0,1F_{\max}$ (Gl. 139), $B_{\text{kor}} \approx -0,069$ bzw. $f_{\text{opt}}: [F_{\min 1, \min}, F_{\min 1, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\min 1} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\min 1}, \vec{a}_{\min}) \approx 636,3 - 2,7F_{\min 1}$ (Gl. 140), $B_{\text{kor}} \approx 0,000$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}).



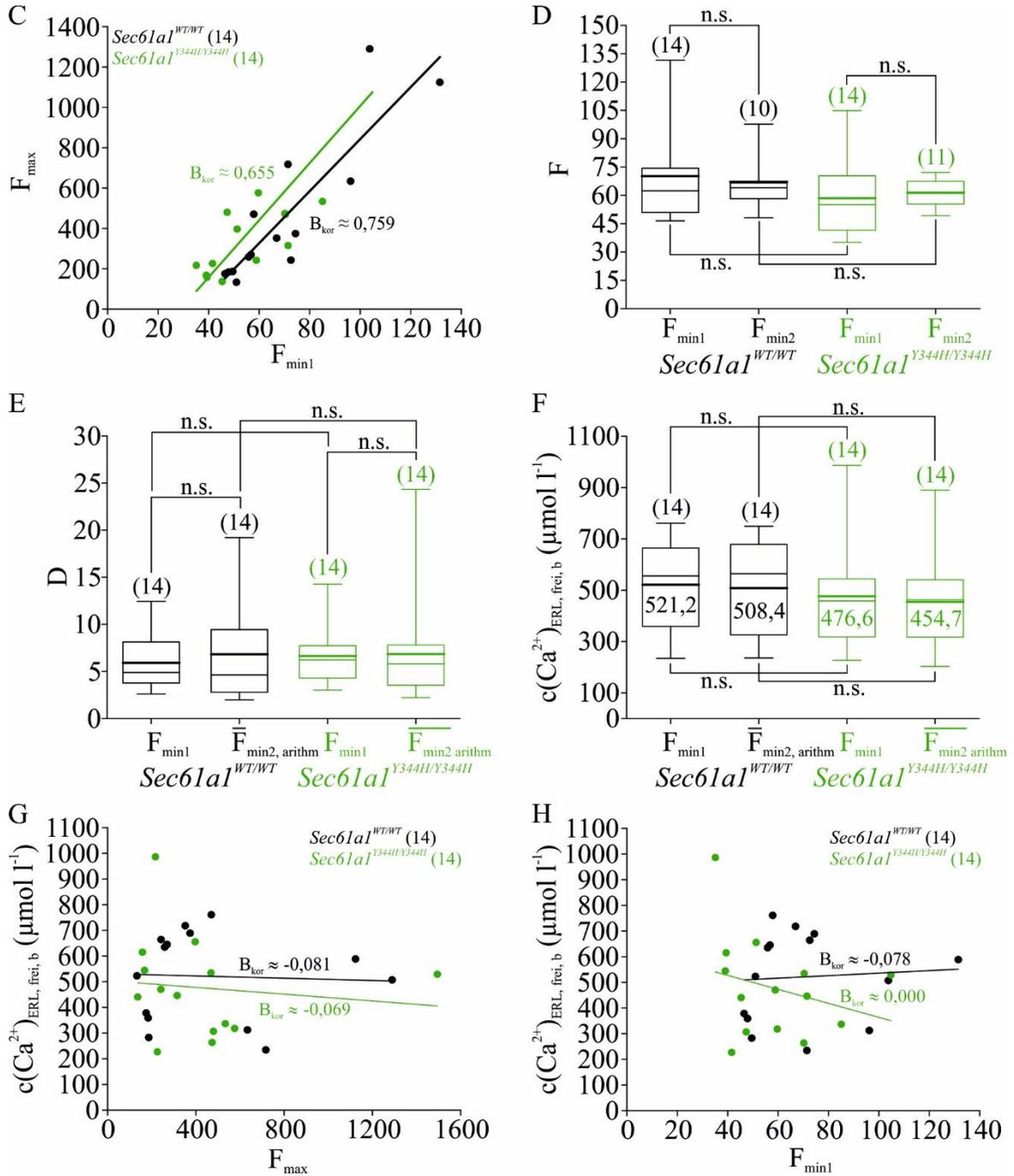


Abb. 9: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ -Bestimmung

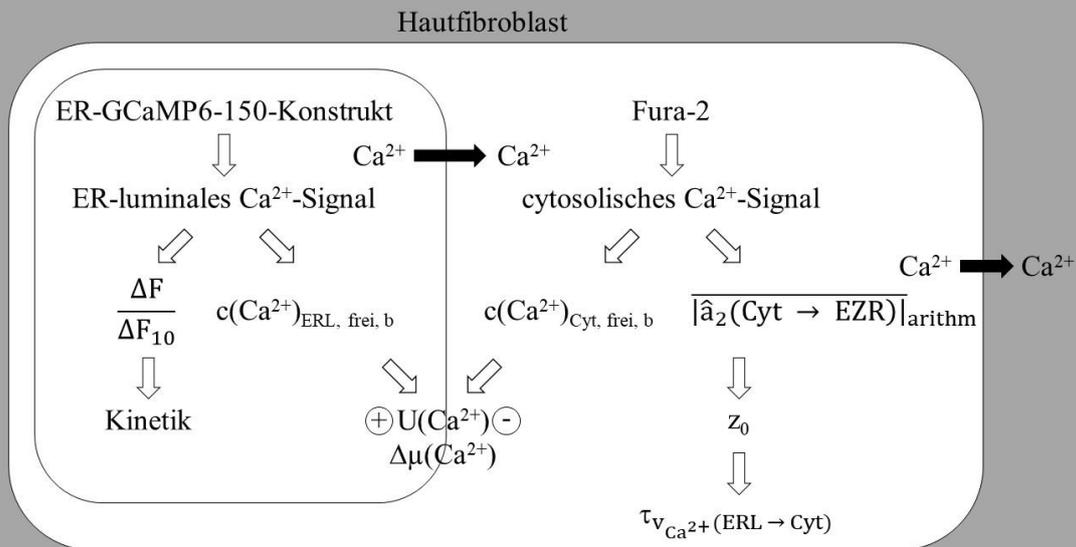
Zur Umrechnung $F \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ wurden F_b , F_{max} , F_{min1} und F_{min2} in $\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$ - und $\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$ -Hautfibroblasten bestimmt (Systemeinstellung: λ_{ex} -Bereich = 459,0 nm bis 481,0 nm, λ_{em} -Bereich = 505,0 nm bis 545,0 nm, $t(\text{Belichtung}) = 50 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 1 \text{ Hz}$, Pixelbinning = $4 \cdot 4$, Vergr. 60-fach, Öl-Immersion). A: Meßprotokoll zur F_b -, F_{max} - und F_{min1} -Bestimmung innerhalb desselben $\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$ - bzw. $\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$ -Hautfibroblasten: (1.) 1 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 2 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l}$ $0,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung); F_b : \bar{F}_{arithm} für $t = 10 \text{ s}$ bis 50 s (2.) $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 26 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$, $c(\text{Nig}) = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l}$ $50,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $c(\text{Nig}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$); F_{max} : absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts (3.) Meßstop: 3 mal Waschen mit $300 \mu\text{l}$ $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung, komplette Abnahme der $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung (4.) Meßstart: $600 \mu\text{l}$ 5 mmol l^{-1} -EGTA-Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $c(\text{Nig}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$; F_{min1} : absolutes Minimum des globalen Minimalpunkts. B: Meßprotokoll F_{min2} -Bestimmung: (1.) 4-mal Inkubation: $300 \mu\text{l}$ $15,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $c(\text{Nig}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$, 10 min, RT, Dunkelheit (2.) Ca^{2+} -Bildgebung: 1 min $c(\text{EGTA})_{\text{EZR}} = 15 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l}$ $15,0 \text{ mmol l}^{-1}$ -EGTA-Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$) (3.) F_{min2} : absolutes Minimum des globalen Minimalpunkts. C: F_{max} in Abhängigkeit von F_{min1} . Einfache lineare Anpassung: $f_{\text{opt}}: [F_{\text{min1, min}}, F_{\text{min1, max}}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\text{min1}} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\text{min1}}, \bar{a}_{\text{min}}) \approx -446,7 + 12,9F_{\text{min1}}$ (Gl. 135), $B_{\text{kor}} \approx 0,759$ ($\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$); $f_{\text{opt}}: [F_{\text{min1, min}}, F_{\text{min1, max}}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\text{min1}} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\text{min1}}, \bar{a}_{\text{min}}) \approx -408,2 + 14,2F_{\text{min1}}$ (Gl. 136), $B_{\text{kor}} \approx 0,655$ ($\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$). D:

$F_{\min 1}$ - und $F_{\min 2}$ -Werte im Vergleich. E: Dynamikbereiche $D_1 = \frac{F_{\max}}{F_{\min 1}}$ bzw. $D_2 = \frac{F_{\max}}{F_{\min 2 \text{ arithm}}}$. F: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ nach (Gl. 131) mit $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b arithm}}}$: ca. $521,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($F_{\min 1}$) bzw. ca. $508,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($\overline{F_{\min 2 \text{ arithm}}}$) (*Sec61a1^{WT/WT}*); ca. $476,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($F_{\min 1}$) bzw. ca. $454,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($\overline{F_{\min 2 \text{ arithm}}}$) (*Sec61a1^{Y344H/N344H}*). G, H: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) in Abhängigkeit von F_{\max} bzw. $F_{\min 1}$. Einfache lineare Anpassung: $f_{\text{opt}}: [F_{\max, \min}, F_{\max, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\max} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\max}, \vec{a}_{\min}) \approx 531,3 - 0,0F_{\max}$ (Gl. 137), $B_{\text{kor}} \approx -0,081$ bzw. $f_{\text{opt}}: [F_{\min 1, \min}, F_{\min 1, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\min 1} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\min 1}, \vec{a}_{\min}) \approx 486,8 + 0,5F_{\min 1}$ (Gl. 138), $B_{\text{kor}} \approx -0,078$ (*Sec61a1^{WT/WT}*); $f_{\text{opt}}: [F_{\max, \min}, F_{\max, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\max} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\max}, \vec{a}_{\min}) \approx 504,4 - 0,1F_{\max}$ (Gl. 139), $B_{\text{kor}} \approx -0,069$ bzw. $f_{\text{opt}}: [F_{\min 1, \min}, F_{\min 1, \max}] \rightarrow \mathbb{R}, F_{\min 1} \mapsto f_{\text{opt}}(F_{\min 1}, \vec{a}_{\min}) \approx 636,3 - 2,7F_{\min 1}$ (Gl. 140), $B_{\text{kor}} \approx 0,000$ (*Sec61a1^{Y344H/N344H}*). Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{\min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{\max} ; (·): Zellzahl. STT, KST; $p \geq 0,05 \hat{=} \text{n.s.}$

5 Ergebnisse

Schema 12 gibt vorab einen kurzen Überblick über den Zusammenhang bzw. die sequenzielle Bestimmung der in dieser Arbeit analysierten Größen, da diese stark miteinander vernetzt sind.

Schema 12: Überblick über den Zusammenhang bzw. die sequenzielle Bestimmung der in dieser Arbeit analysierten Größen



Durch Ca^{2+} -Bildgebung mittels ER-GCaMP6-150-Konstrukt wurde die Ca^{2+} -Kationenhomöostase auf ER-luminaler Seite und durch Ca^{2+} -Bildgebung mittels Fura-2 wurde die Ca^{2+} -Kationenhomöostase auf cytosolischer Seite analysiert. Aus der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ -Ratio (5.2.1) ergab sich die Kinetik des Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol (5.2.1). Aus der basalen ER-luminalen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen ($c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$) (4.2.3.11.2) und der basalen cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen ($c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$) (4.2.3.10.2.3) ergaben sich rechnerisch die Nernst-Spannung für Ca^{2+} -Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol $U(\text{Ca}^{2+})$ und das chemische Potential für Ca^{2+} -Kationen über die ER-Membran $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ (5.1). Aus dem arithmetischen Mittelwert des Betrags der Steigung $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}}$ der einfachen linearen Anpassungsfunktion $f_{\text{opt}}: [t_{\text{rel, lin, min}}, t_{\text{rel, lin, max}}] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t_{\text{rel}}, \vec{a}_{\text{min}}) = \hat{a}_1 + \hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})t_{\text{rel}}$ (Gl. 155) (5.2.2.1) wurden schließlich sequenziell z_0 und die Abklingzeitkonstante der 1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen nach der Zeit ($\hat{=}$ Abklingzeitkonstante des passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol) $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ (5.2.2.2 bzw. 5.2.2.3) ermittelt.

Eine Anmerkung zum Begriff des Ca^{2+} -Flux: Der Ca^{2+} -Flux von einem Kompartiment 1 in ein Kompartiment 2 ist in der Biologie keine fest definierte Größe, sondern ein Oberbegriff bzw. Sammelbegriff für diverse Größen mit unterschiedlichen Einheiten, die eben diesen repräsentieren (Dupont, Falcke *et al.*, 2016). In dieser Arbeit wird der passive Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol

durch die negative 1. Ableitung der Fluoreszenzintensitätsratio $-\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}} \right)_{\text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25))$ (SGM(5, 100)) mit der Einheit s^{-1} (siehe Schema 14: Datenprozessierung 2) und die 1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen nach der Zeit $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$ mit der Einheit $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ repräsentiert.

5.1 Nernst-Spannung für Ca^{2+} -Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol $U(\text{Ca}^{2+})$ und des chemischen Potentials für Ca^{2+} -Kationen über die ER-Membran $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$

Mit der Nernst-Gleichung

$$U(\text{Ion}) = \frac{RT}{z(\text{Ion})F} \log_e \frac{c(\text{Ion})_1}{c(\text{Ion})_2} = \frac{k_B T}{z(\text{Ion})e} \log_e \frac{c(\text{Ion})_1}{c(\text{Ion})_2} \quad (\text{Gl. 141})$$

$U(\text{Ion})$	Nernst-Spannung (Ion) (mV)
R	allgemeine Gaskonstante $R = N_A k_B \approx 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
T	thermodynamische Temperatur (K), $T = 293,15 \text{ K}$
$z(\text{Ion})$	Valenz/Wertigkeit (Ion) ($z(\text{Ca}^{2+}) = +2$)
F	Faraday-Konstante $F = N_A e \approx 9,649 \cdot 10^4 \text{ A s mol}^{-1}$
k_B	Boltzmann-Konstante $1,380649 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
e	Elementarladung $1,602176634 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ($\text{C} = \text{A s}$)
$c(\text{Ion})_1$	$c(\text{Ion})$ in Raum 1 (mmol l^{-1}), $c(\text{Ion})_1 = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$
$c(\text{Ion})_2$	$c(\text{Ion})$ in Raum 2 (mmol l^{-1}), $c(\text{Ion})_2 = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$
(N_A)	Avogadro-Konstante $6,02214076 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

wird die Spannung zwischen 2 Räumen, die durch eine Biomembran getrennt sind, berechnet, bei der für das betreffende Ion $\text{Ion-Flux}_{\text{hin}} = \text{Ion-Flux}_{\text{rück}}$ gilt (Nernst-Spannung = Äquilibriumsspannung = Umkehrspannung für ein Ion), d.h. bei der chemische und elektrische Triebkraft gleich groß, jedoch entgegengesetzt orientiert sind (Hille, 2001). Mit den entsprechenden Werten für $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}}$ (Abb. 9) und $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}}$ (Abb. 7) ergeben sich die Werte für $U(\text{Ca}^{2+})$ (Tab. 26).

Tab. 26: Nernst-Spannung für Ca²⁺-Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol U(Ca²⁺) (mV)

Die $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b arithm}}$ -Werte für F_{min1} bzw. $\overline{F}_{\text{min2 arithm}}$ sind Abb. 9, die $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}$ -Werte für Hautfibroblasten 2 d bzw. 3 d nach Trypsinierung/Ausplattierung sind Abb. 7 entnommen. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b arithm}}$ arithmetischer Mittelwert der basalen ER-luminalen Stoffmengenkonzentration der freien Ca²⁺-Kationen, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}$ arithmetischer Mittelwert der basale cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca²⁺-Kationen, F_{min1} minimale Fluoreszenzintensität 1, $\overline{F}_{\text{min2 arithm}}$ arithmetischer Mittelwert der minimalen Fluoreszenzintensität 2. 2 d bzw. 3 d 2 Tage nach Trypsinierung/ Ausplattierung bzw. 3 Tage nach Trypsinierung/Ausplattierung.

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b arithm}}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) rechts oben			<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}		<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	
			F_{min1}	$\overline{F}_{\text{min2 arithm}}$	F_{min1}	$\overline{F}_{\text{min2 arithm}}$
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) links unten			521,2	508,4	476,6	454,7
<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	2 d	0,1210	105,7 mV	105,4 mV		
	3 d	0,1218	105,6 mV	105,3 mV		
<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	2 d	0,0963			107,5 mV	106,9 mV
	3 d	0,1051			106,3 mV	105,8 mV

Die U(Ca²⁺) der *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten (105,3 mV bis 105,7 mV) unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten (105,8 mV bis 107,5 mV). Die Na⁺/K⁺-austauschende ATPase (EC 7.2.2.13) der Zellmembran induziert eine asymmetrische Distribution der Na⁺- und K⁺-Kationen zwischen Extrazellulär- und Intrazellulärraum (Tab. 27) (Hille, 2001; Pape, Kurtz *et al.*, 2019).

Tab. 27: c(Na⁺)_{Cyt, frei} (mmol l⁻¹) und c(K⁺)_{Cyt, frei} (mmol l⁻¹) in Extrazellulärraum (EZR) und Intrazellulärraum (IZR) des Säugerskelettmuskels (Hille, 2001)

	EZR	IZR
$c(\text{Na}^+)_{\text{Cyt, frei}}$ (mmol l ⁻¹)	ca. 145	ca. 12
$c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}}$ (mmol l ⁻¹)	ca. 4	ca. 155

Da die ER-Membran einen hohen Leitwert pro Fläche für monovalente Kationen (K⁺, Na⁺, Tl⁺, Li⁺) von $\frac{G}{A} \approx 0,1 \text{ S cm}^{-2}$ *in situ* besitzt (Garcia und Miller, 1984), kommt es zur Äquilibrierung von $c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}}$ bzw. $c(\text{Na}^+)_{\text{Cyt, frei}}$ und $c(\text{K}^+)_{\text{ERL, frei}}$ bzw. $c(\text{Na}^+)_{\text{ERL, frei}}$, so dass $c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}} \approx c(\text{K}^+)_{\text{ERL, frei}} \approx 155 \text{ mmol l}^{-1}$ bzw. $c(\text{Na}^+)_{\text{Cyt, frei}} \approx c(\text{Na}^+)_{\text{ERL, frei}} \approx 12 \text{ mmol l}^{-1}$ gilt (Lam und Galione, 2013). Zusätzlich wird die Äquilibrierung durch die Abwesenheit primäraktiver Transporter (ATPasen) für K⁺- bzw. Na⁺-Kationen in der ER-Membran unterstützt, denn diese würden einen vektorialen Ionen-Transport katalysieren und damit einen chemischen Gradienten (Konzentrationsgradienten) generieren (nach meinem Wissensstand sind in der Literatur bisher keine solche Systeme für *H. sapiens* oder *M. musculus* beschrieben worden). Durch die Dominanz der K⁺-Kationen im Intrazellulärraum $c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}} : c(\text{Na}^+)_{\text{Cyt, frei}} = 155 : 12 = 12,9 : 1$ ist $\frac{G}{A} \approx 0,1 \text{ S cm}^{-2}$ hauptsächlich K⁺-getragen, so dass die ER-Membran-Spannung

$$U(\text{ERM}) \approx U(\text{K}^+) = \frac{k_B T}{z(\text{K}^+) e} \log_e \frac{c(\text{K}^+)_{\text{ERL, frei}}}{c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}}} = \frac{k_B T}{e} \log_e \frac{155 \text{ mmol l}^{-1}}{155 \text{ mmol l}^{-1}} = 0 \text{ mV} \quad (\text{Gl. 142})$$

$U(\text{ERM})$ ER-Membran-Spannung (mV)

$U(\text{K}^+)$ Nernst-Spannung (K^+) (mV)

k_B Boltzmann-Konstante $1,380649 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$

T thermodynamische Temperatur (K), $T = 293,15 \text{ K}$

$z(\text{K}^+)$ Valenz/Wertigkeit (K^+) = +1

e Elementarladung $1,602176634 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ($\text{C} = \text{A s}$)

$c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}}$ cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien K^+ -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)

$c(\text{K}^+)_{\text{ERL, frei}}$ ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien K^+ -Kationen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)

beträgt (Da $U(\text{Na}^+) = \frac{k_B T}{z(\text{Na}^+) e} \log_e \frac{c(\text{Na}^+)_{\text{ERL, frei}}}{c(\text{Na}^+)_{\text{Cyt, frei}}} = \frac{k_B T}{e} \log_e \frac{12 \text{ mmol l}^{-1}}{12 \text{ mmol l}^{-1}} = 0 \text{ mV}$ (Gl. 143) ist, trägt

auch diese Komponente zum $U(\text{ERM})$ von ca. 0 mV bei.) (Garcia und Miller, 1984; Lam und Galione, 2013). Mit $U(\text{ERM}) \approx 0 \text{ mV}$ läßt sich auch das chemische Potential für Ca^{2+} -Kationen über die ER-Membran

$$\Delta\mu(\text{Ca}^{2+}) = R T \log_e \frac{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}}{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}} + z(\text{Ca}^{2+}) F U(\text{ERM}) \quad (\text{J mol}^{-1}) \quad (\text{Gl. 144})$$

$\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ chemisches Potential für Ca^{2+} -Kationen über die ER-Membran (J mol^{-1})

R allgemeine Gaskonstante $R = N_A k_B \approx 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

T thermodynamische Temperatur (K), $T = 293,15 \text{ K}$

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ basale cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}}$ basale ER-luminale Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen

$z(\text{Ca}^{2+})$ Valenz/Wertigkeit (Ion) ($z(\text{Ca}^{2+}) = +2$)

F Faraday-Konstante $F = N_A e \approx 9,649 \cdot 10^4 \text{ A s mol}^{-1}$
(N_A Avogadro-Konstante $6,02214076 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$,
 e Elementarladung $1,602176634 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ($\text{C} = \text{A s}$))

$U(\text{ERM})$ ER-Membran-Spannung (0 mV)

berechnen (Tab. 28) (Pape, Kurtz *et al.*, 2019).

Tab. 28: Chemisches Potential für Ca²⁺-Kationen über die ER-Membran $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ (J mol⁻¹)

Die $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL},\text{frei},\text{b arithm}}$ -Werte für $F_{\text{min}1}$ bzw. $\overline{F_{\text{min}2}}_{\text{arithm}}$ sind Abb. 9, die $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt},\text{frei},\text{b arithm}}$ -Werte für Hautfibroblasten 2 d bzw. 3 d nach Trypsinierung/Ausplattierung sind Abb. 7 entnommen. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL},\text{frei},\text{b arithm}}$ arithmetischer Mittelwert der basalen ER-luminalen Stoffmengenkonzentration der freien Ca²⁺-Kationen, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt},\text{frei},\text{b arithm}}$ arithmetischer Mittelwert der basale cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca²⁺-Kationen, $F_{\text{min}1}$ minimale Fluoreszenzintensität 1, $\overline{F_{\text{min}2}}_{\text{arithm}}$ arithmetischer Mittelwert der minimalen Fluoreszenzintensität 2. 2 d bzw. 3 d 2 Tage nach Trypsinierung/Aus-plattierung bzw. 3 Tage nach Trypsinierung/Ausplattierung.

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL},\text{frei},\text{b arithm}}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) rechts oben			<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}		<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	
			$F_{\text{min}1}$	$\overline{F_{\text{min}2}}_{\text{arithm}}$	$F_{\text{min}1}$	$\overline{F_{\text{min}2}}_{\text{arithm}}$
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt},\text{frei},\text{b arithm}}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) links unten			521,2	508,4	476,6	454,7
<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	2 d	0,1210	-69,6 J mol ⁻¹	-69,4 J mol ⁻¹		
	3 d	0,1218	-69,5 J mol ⁻¹	-69,3 J mol ⁻¹		
<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	2 d	0,0963			-70,7 J mol ⁻¹	-70,3 J mol ⁻¹
	3 d	0,1051			-70,0 J mol ⁻¹	-69,6 J mol ⁻¹

Die $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ der *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten (-69,3 J mol⁻¹ bis -69,6 J mol⁻¹) unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten (-69,6 J mol⁻¹ bis -70,7 J mol⁻¹). $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+}) < 0$ J mol⁻¹ impliziert, dass $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ vom ER-Lumen zum Cytosol hin orientiert ist und einen passiven Ca²⁺-Flux vom ER-Lumen ins Cytosol generiert, der seinerseits eine leichte Depolarisation ($U(\text{Ca}^{2+}) > U(\text{ERM})$) der ER-Membran induziert (Pape, Kurtz *et al.*, 2019; Lam und Galione, 2013). Die Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$ galt es im nächsten Schritt mit dem ER-GCaMP6-150-Konstrukt zu analysieren (5.2.1).

Zusammenfassung: $U(\text{Ca}^{2+})$ bzw. $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten $\approx U(\text{Ca}^{2+})$ bzw. $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten.

5.2 Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$

5.2.1 ER-GCaMP6-150-Konstrukt

Durch die Normierung der Funktionswerte $f(t)$ erfolgte nach

$$f_{\text{norm}}(t) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} = \frac{F - F_{\text{min}}}{F_{10} - F_{\text{min}}} \quad (\text{Gl. 145})$$

F Fluoreszenzintensität $f(t)$

F_{min} absolutes Minimum des globalen Minimalpunkts

F_{10} Fluoreszenzintensität $f(t = 10 \text{ s})$,

dargestellt am Bsp. der Ca²⁺-Signale zweier *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(\text{Thap})$

= 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Abb. 10), war es möglich die Kinetik der passiven Abnahme von $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ ($\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$) und

die Kinetik der $v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt) \cong \frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ zwischen $Sec61a1^{WT/WT}$ - und $Sec61a1^{Y344H/Y344H}$ -Hautfibroblasten zu vergleichen.

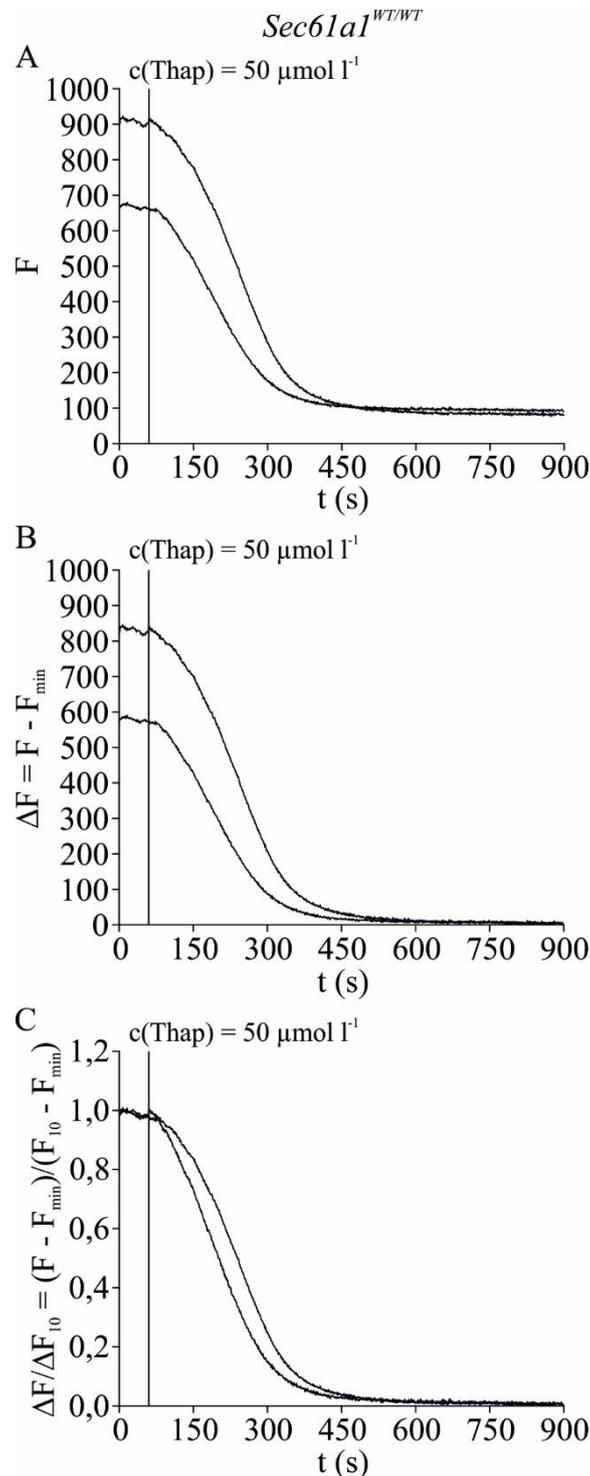


Abb. 10: Normierung der Funktionswerte $f(t)$ am Bsp. der Ca^{2+} -Signale zweier $Sec61a1^{WT/WT}$ -Hautfibroblasten

Die Normierung der Funktionswerte $f(t)$ erfolgte nach $f_{\text{norm}}(t) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} = \frac{F - F_{\text{min}}}{F_{10} - F_{\text{min}}}$ (Gl. 145), F Fluoreszenzintensität $f(t)$, F_{min} absolutes Minimum des globalen Minimalpunkts, F_{10} Fluoreszenzintensität $f(t = 10 \text{ s})$, dargestellt am Bsp. zweier $Sec61a1^{WT/WT}$ -Hautfibroblasten: Aus den nichtnormierten Funktionswerten $f(t) = F$ (A) ergibt sich $\Delta F = F - F_{\text{min}}$ (B) und schließlich die normierten Funktionswerte $f_{\text{norm}}(t) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} = \frac{F - F_{\text{min}}}{F_{10} - F_{\text{min}}}$ (C) (Systemeinstellung: λ_{ex} -Bereich = 459,0 nm bis 481,0 nm, λ_{em} -Bereich = 505,0 nm bis 545,0 nm, $t(\text{Belichtung}) = 50 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 1 \text{ Hz}$, Pixelbinning = $4 \cdot 4$, Vergr. 60-fach, Öl-

Immersion). Meßprotokoll: (1.) 1 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 14 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 50 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$).

Zunächst wurde $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ in Gegenwart von $c(\text{Thap}) = 1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ demaskiert. Da manche

Hautfibroblasten eine Lagphase aufwiesen, wurde $c(\text{Thap})$ auf $50 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ erhöht, so dass in allen

Hautfibroblasten $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ zum gleichen Zeitpunkt ($t = 1 \text{ min}$) demaskiert wurde (Abb. 11).

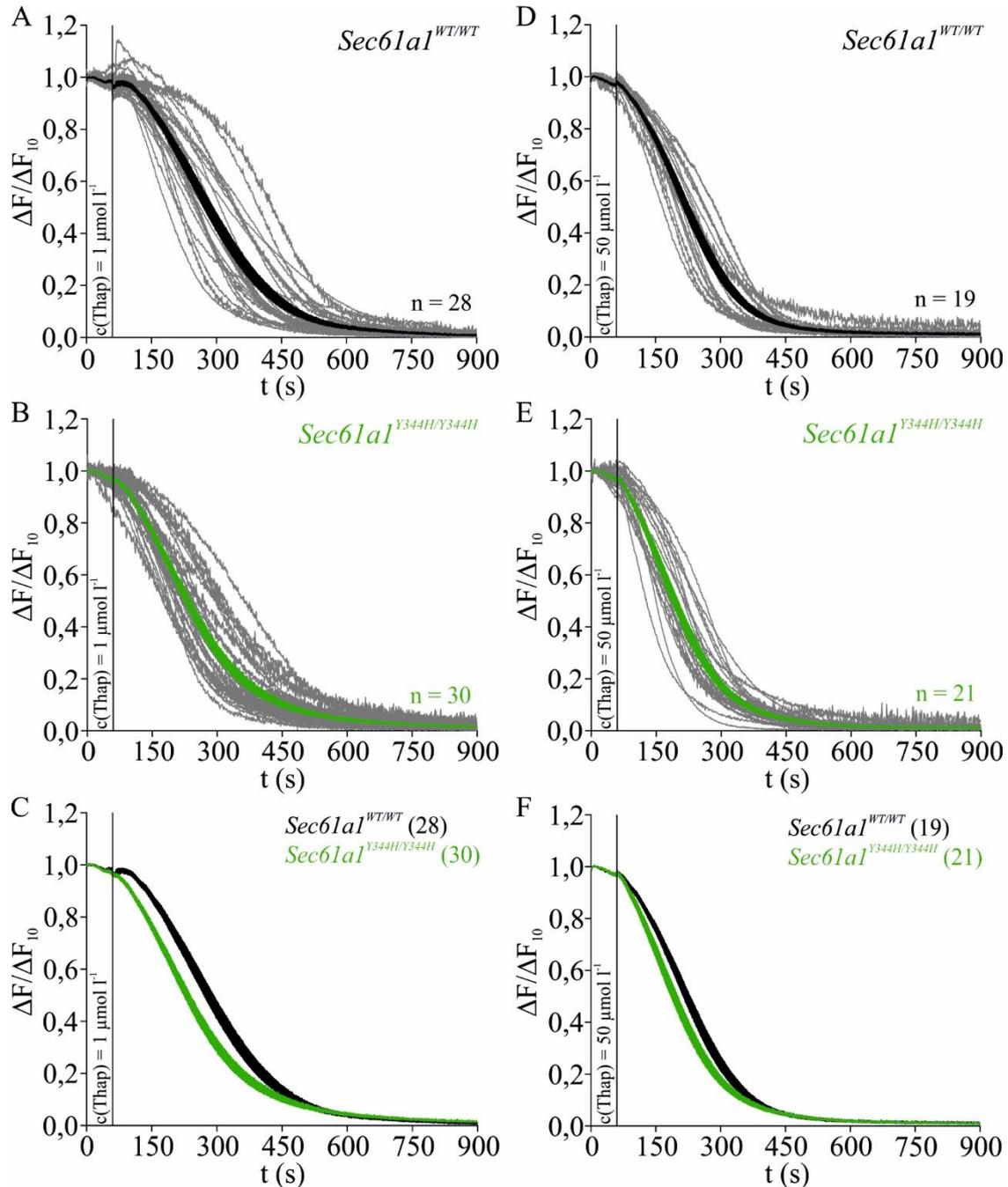


Abb. 11: Demaskierung der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ in $\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$ - und $\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$ -Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(\text{Thap}) = 1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ bzw. $50 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$

Dargestellt ist $f_{\text{norm}}(t) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ in Abhängigkeit von t (s). Meßprotokoll: (1.) 1 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 14 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (A, B, C) bzw. $50 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (D, E, F) (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ bzw. $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) (Systemeinstellung: λ_{ex} -Bereich = 459,0 nm bis 481,0 nm, λ_{em} -Bereich = 505,0 nm bis 545,0 nm, $t(\text{Belichtung}) = 50 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 1 \text{ Hz}$, Pixelbinning = $4 \cdot 4$, Vergr. 60-fach, Öl-Immersion). $\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$ -Hautfibroblasten schwarz, $\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$ -Hautfibroblasten grün, Ca^{2+} -Signale einzelner

Hautfibroblasten dünne graue Linien, $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}}_{\text{arithm}} \pm s(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}}_{\text{arithm}})$ dicke schwarze/grüne Linien, n Zellzahl bzw. (·) Zellzahl, aus der sich $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}}_{\text{arithm}}$ ergab.

In Abhängigkeit von t (s) nimmt $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ in allen Fällen exponentiell ab. Bei $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ zeigten

die *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten eine kürzere Lagphase und schnellere Kinetik der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}_{\downarrow\text{passiv}}$ als

die *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten (Abb. 11 A - C). Bei $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$ wurden die Lagphasen

deutlich verkürzt und der Unterschied in der Kinetik der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}_{\downarrow\text{passiv}}$ wurde geringer (Abb. 11 D - F). Bei

den einzelnen Hautfibroblasten (Abb. 11 A, B, D, E) wurde die exponentielle Abnahme von $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ dann

empirisch, d.h. ohne Anpassungsfunktion, quantitativ analysiert (Abb. 12). Es wurde die Zeit bestimmt,

in der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ (t = 1 min, Thapsigarginapplikation) $\hat{=}$ 100 % auf 90 % (t_{90}), 50 % (t_{50}) und $\frac{1}{e}$ % \approx 36,8 %

(t_{37}) abfiel, was am Bsp. eines *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$

veranschaulicht ist (Abb. 12 A). t_{90} , t_{50} und t_{37} der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten lagen bei $c(\text{Thap})$

= $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ bzw. $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ unter den Werten der *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten (alle $p < 0,050$) (Abb.

12 B, C). Auch sanken bei der Erhöhung von $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ auf $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$ t_{90} , t_{50} und

t_{37} innerhalb eines Hautfibroblastentyps (alle $p < 0,050$) (Abb. 12 D - F), wobei insbesondere die

Abnahme von t_{90} eine Verminderung der Lagphase kennzeichnet, was das Ziel der $c(\text{Thap})$ -Erhöhung

war.

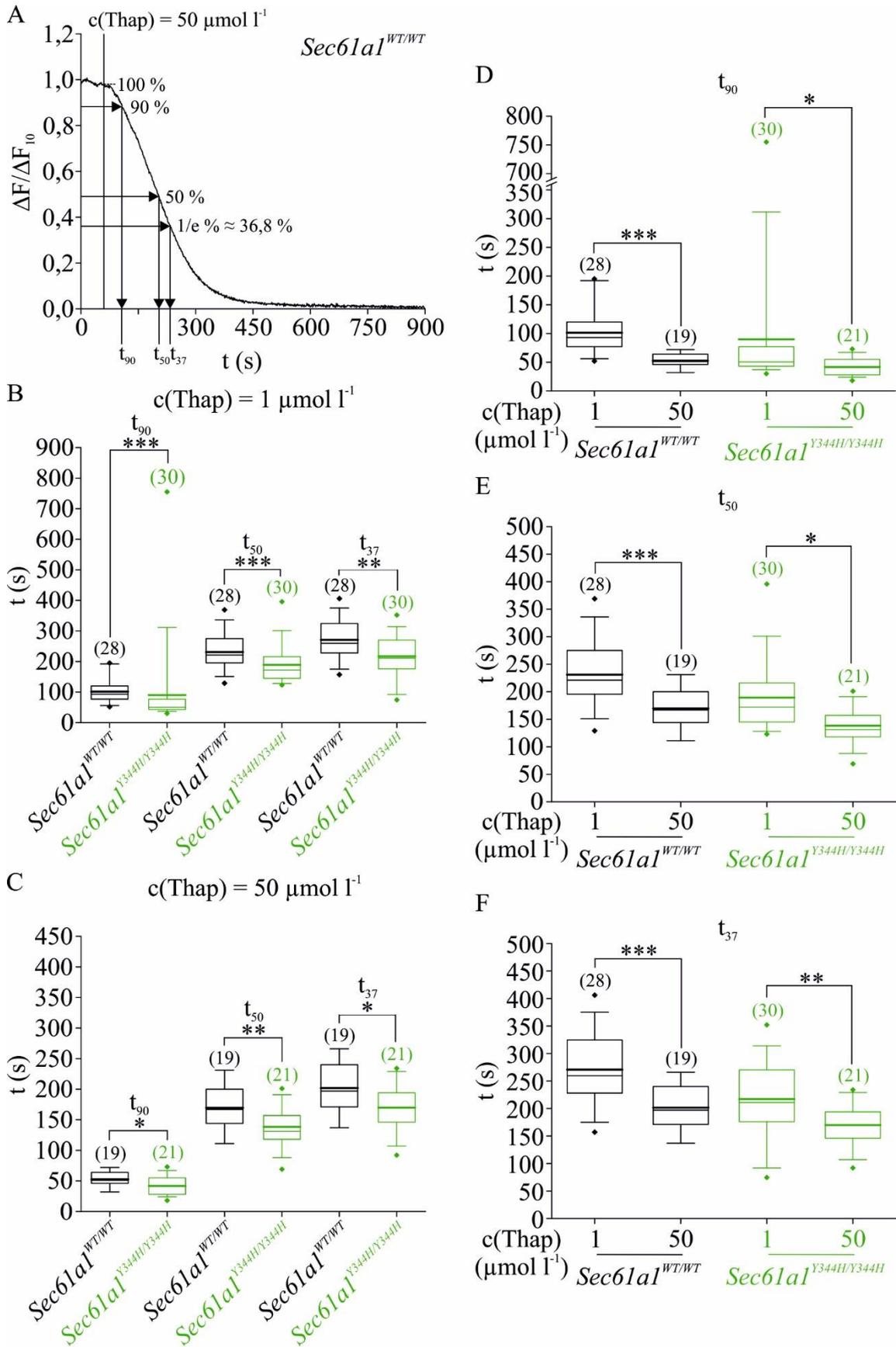


Abb. 12: Empirische (ohne Anpassungsfunktion) Analyse der exponentiellen Abnahme von $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ der einzelnen Hautfibroblasten aus Abb. 11 A, B, D, E

Es wurde die Zeit bestimmt, in der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ ($t = 1$ min, Thapsigarginapplikation) $\cong 100 \%$ auf 90% (t_{90}), 50% (t_{50}) und $\frac{1}{e} \approx 36,8 \%$ (t_{37}) abfiel, was am Bsp. des Ca^{2+} -Signals eines *Sec61al*^{WT/WT}-Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$

veranschaulicht ist (A). A: Meßprotokoll: (1.) 1 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 14 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 50 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 100 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$) (Systemeinstellung: λ_{ex} -Bereich = 459,0 nm bis 481,0 nm, λ_{em} -Bereich = 505,0 nm bis 545,0 nm, t (Belichtung) = 50 ms, f (Bild) = 1 Hz, Pixelbinning = $4 \cdot 4$, Vergr. 60-fach, Öl-Immersion). B, C: Vergleich $t_{90, 50, 37}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $t_{90, 50, 37}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) in Gegenwart von $c(\text{Thap}) = 1 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (B) bzw. $50 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (C). D - F: Vergleich $t_{90, 50, 37}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $t_{90, 50, 37}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) bzw. $t_{90, 50, 37}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) vs. $t_{90, 50, 37}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) bei der Erhöhung von $c(\text{Thap}) = 1 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ auf $c(\text{Thap}) = 50 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$. Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} ; (·): Zellzahl. TT, KST; $0,010 \leq p < 0,050 \hat{=} *$, $0,001 \leq p < 0,010 \hat{=} **$, $p < 0,001 \hat{=} ***$.

Durch Thapsigarginapplikation wurden die Atp2a sukzessiv irreversibel inhibiert, d.h. $-\frac{d}{dt} \left(\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \right)$

SGM(5, 25))(, SGM(5, 100)) nahm zu ($f_{\text{norm}}: \{0, 1, \dots, 899, 900\} \rightarrow \mathbb{R}$, $t \mapsto f_{\text{norm}}(t) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$, (streng)

konkav), erreichte im Punkt $P_{\text{max}}(t_{\text{max}}, -\frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}})_{\text{max}}$ ein Maximum (Wendepunkt $P_{\text{W}}(t_{\text{W}}, \frac{\Delta F}{\Delta F_{10W}})$) von $f_{\text{norm}}:$

$\{0, 1, \dots, 899, 900\} \rightarrow \mathbb{R}$, $t \mapsto f_{\text{norm}}(t) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$) und nahm ab ($f_{\text{norm}}: \{0, 1, \dots, 899, 900\} \rightarrow \mathbb{R}$, $t \mapsto$

$f_{\text{norm}}(t) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$, (streng) konvex) (Abb. 13 A). Folglich war die Wendestelle t_{W} der Funktion $f_{\text{norm}}:$

$\{0, 1, \dots, 899, 900\} \rightarrow \mathbb{R}$, $t \mapsto f_{\text{norm}}(t) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ der Zeitpunkt, ab dem alle Atp2a irreversibel inhibiert

waren, d.h. ab dem $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ in totaler Abwesenheit von Atp2a-Aktivität vorlag (Abb. 13 B) (Um

$P_{\text{W}}(t_{\text{W}}, \frac{\Delta F}{\Delta F_{10W}})$ einfacher ermitteln zu können, wurden die Daten nach Schema 13 prozessiert).

Schema 13: Datenprozessierung 1

$$\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \xrightarrow{\text{Faltung mit SGM}(5,25)} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}, \text{SGM}(5, 25) \xrightarrow{\text{negative 1.Ableitung}} -\frac{d}{dt} \left(\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}, \text{SGM}(5, 25) \right)$$

$$\xrightarrow{\text{Faltung mit SGM}(5,100)} -\frac{d}{dt} \left(\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}, \text{SGM}(5, 25) \right), \text{SGM}(5, 100) \xrightarrow{\text{Bestimmung des Maximalpunkts}} P_{\text{max}}(t_{\text{max}}, -\frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}})_{\text{max}}$$

$$\xrightarrow{\text{Bestimmung des Wendepunkts}} P_{\text{W}}(t_{\text{W}}, \frac{\Delta F}{\Delta F_{10W}}) \text{ (Abb. 13 A)}$$

SGM(5, 25) Savitzky-Golay-Methode (5. Grades, 25 Datenpunkte) (siehe 4.2.3.1.1.1.2)

SGM(5, 100) Savitzky-Golay-Methode (5. Grades, 100 Datenpunkte) (siehe 4.2.3.1.1.1.2)

Nun sollte die Frage beantwortet werden, ob die Ca^{2+} -Kationen dieser total demaskierten $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$

$(\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv, tot dem}})$ einem oder zwei mobilisierbaren Ca^{2+} -Pool(s) des ER-Lumens entstammen. Dazu

wurde bestimmt, ob für die Charakterisierung der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$, tot dem der einzelnen Hautfibroblasten entweder eine einfache exponentielle Anpassungsfunktion (Abb. 13 C)

$$f_{\text{opt}}: [t_W, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}} \quad (\text{Gl. 37}),$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(t) = a_{11} \quad (\text{Gl. 38}) \quad (f_{\text{opt}}(t) = a_{11} \quad (\text{Gl. 39}) \text{ Asymptote für } t \rightarrow \infty),$$

$$f_{\text{opt}}(\tau_1) = a_{11} + \frac{1}{e} a_{12} \approx a_{11} + 0,368 a_{12} \quad (\text{Gl. 40})$$

oder eine zweifache exponentielle Anpassungsfunktion (Abb. 13 D)

$$f_{\text{opt}}: [t_W, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}} + a_{22} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_2}} \quad (\text{Gl. 41}),$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(t) = a_{11} \quad (\text{Gl. 42}) \quad (f_{\text{opt}}(t) = a_{11} \quad (\text{Gl. 43}) \text{ Asymptote für } t \rightarrow \infty),$$

$$f_{\text{opt}}(\tau_1) = a_{11} + \frac{1}{e} a_{12} \approx a_{11} + 0,368 a_{12} \quad (\text{Gl. 44}), \quad f_{\text{opt}}(\tau_2) = a_{11} + \frac{1}{e} a_{22} \approx a_{11} + 0,368 a_{22} \quad (\text{Gl. 45})$$

besser geeignet ist (Kriterien für bessere Anpassung: Parameter der einfachen bzw. zweifachen exponentiellen Anpassungsfunktion (korrekt – nichtkorrekt), Anpassungsgüte (B_{kor})) (Tab. 29).

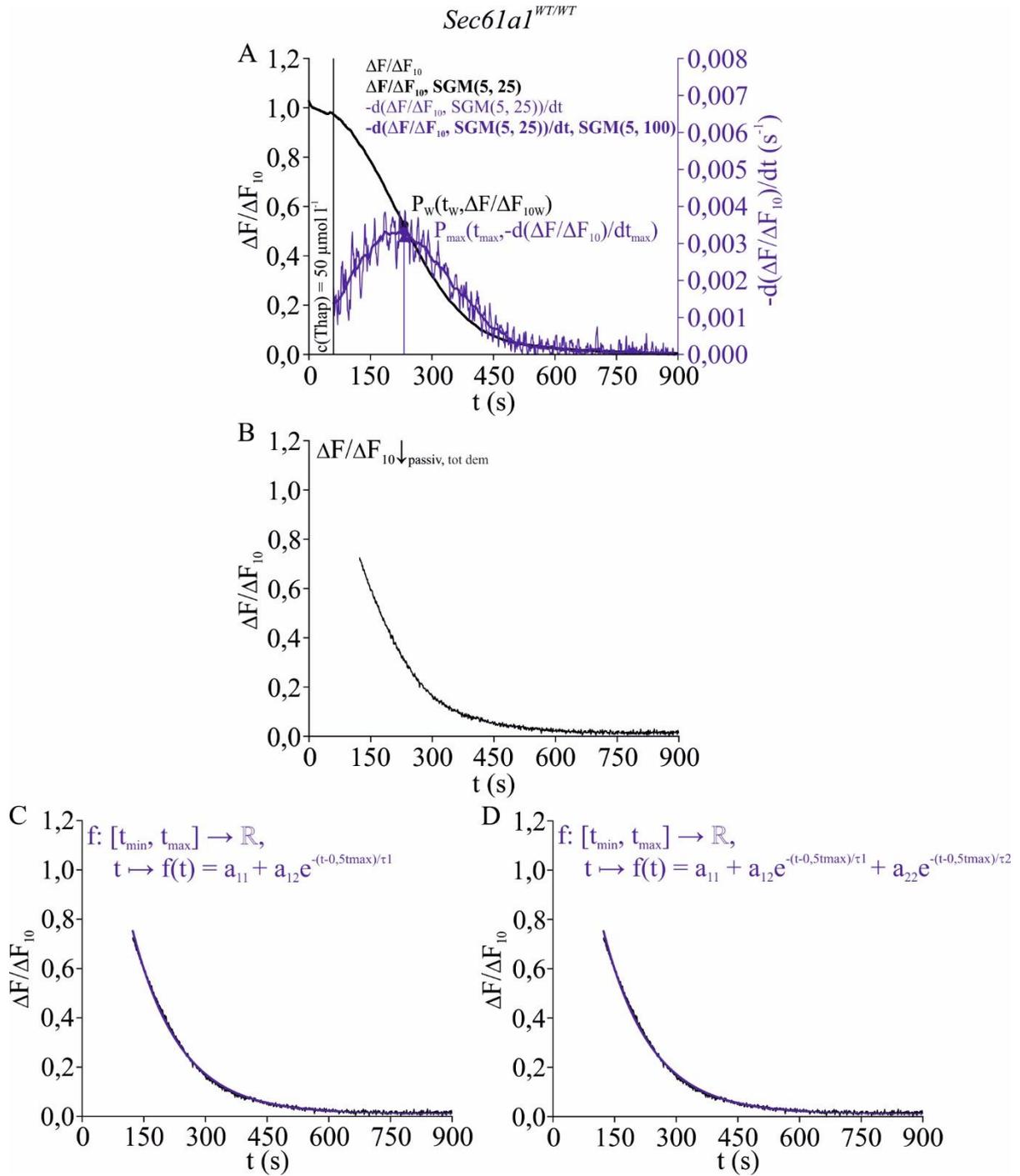


Abb. 13: Bestimmung und Charakterisierung der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ in totaler Abwesenheit von Atp2a-Aktivität ($\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv, tot dem}}$) am Bsp. des Ca^{2+} -Signals eines *Sec61a1^{WT/WT}*-Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$
 Meßprotokoll: (1.) 1 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}\text{-Lösung}$) (2.) 14 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}\text{-Lösung mit } c(\text{Thap}) = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$) (Systemeinstellung: λ_{ex} -Bereich = $459,0 \text{ nm bis } 481,0 \text{ nm}$, λ_{em} -Bereich = $505,0 \text{ nm bis } 545,0 \text{ nm}$, $t(\text{Belichtung}) = 50 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 1 \text{ Hz}$, $\text{Pixelbinning} = 4 \cdot 4$, Vergr. 60-fach, Öl-Immersion). A: $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ (linke y-Achse) in Abhängigkeit von t (s) schwarze Graphen, $-\frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ (rechte y-Achse) in Abhängigkeit von t (s) ab $t = 1 \text{ min}$ blaue Graphen; Datenprozessierung nach Schema 13: $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \Rightarrow \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$, $\text{SGM}(5, 25) \Rightarrow -\frac{d}{dt} (\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}, \text{SGM}(5, 25)) \Rightarrow -\frac{d}{dt} (\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}, \text{SGM}(5, 25)), \text{SGM}(5, 100) \Rightarrow P_{\max}(t_{\max}, -\frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}_{\max}) \Rightarrow P_w(t_w, \frac{\Delta F}{\Delta F_{10w}})$; Savitzky-Golay-Methode, d.h. Faltung der Funktionswerte $f(t)$ und $f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\min})$ ($f(t) * f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\min})$) (4.2.3.1.1.1.2), $m = 5$, $N = 25$ für $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$, $\text{SGM}(5, 25)$ und $m = 5$, $N = 100$ für $-\frac{d}{dt} (\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}, \text{SGM}(5, 25)), \text{SGM}(5, 100)$; $P_{\max}(t_{\max}, -\frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}_{\max})$ globaler Maximalpunkt, $P_w(t_w, \frac{\Delta F}{\Delta F_{10w}})$ Wendepunkt. B: $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv, tot dem}}$ ohne exponentielle Anpassungsfunktion. C: $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv, tot dem}}$ mit

einfacher exponentieller Anpassungsfunktion $f_{\text{opt}}: [t_w, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}}$ (Gl. 37). D: $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$, tot dem mit zweifacher exponentieller Anpassungsfunktion $f_{\text{opt}}: [t_w, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}} + a_{22} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_2}}$ (Gl. 41).

Waren beide Anpassungsmöglichkeiten korrekt, so entschied das höhere B_{kor} . War eine der beiden Anpassungsmöglichkeiten nichtkorrekt, so wurde diese Möglichkeit verworfen und der anderen automatisch der Vorzug gegeben. Waren beide Anpassungsmöglichkeiten nichtkorrekt, so ging das Ca^{2+} -Signal des korrespondierenden Hautfibroblasten nicht in die Statistik mit ein.

Tab. 29: Anzahl der Ca^{2+} -Signale mit korrekter exponentieller (exp.) Anpassung, sowie Anzahl der Ca^{2+} -Signale, die besser durch eine einfache bzw. zweifache Anpassungsfunktion charakterisiert werden
c(Thap) Stoffmengenkonzentration des Thapsigargin.

c(Thap) ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	1		50	
	<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}
Zahl aller Ca^{2+} -Signale	28	30	19	21
Zahl der Ca^{2+} -Signale mit 2 nichtkorrekten Anpassungen	6	3	1	3
Zahl der Ca^{2+} -Signale mit korrekter Anpassung	22 (100 %)	27 (100 %)	18 (100 %)	18 (100 %)
davon einfach exp.	20 (90,9 %)	23 (85,2 %)	16 (88,9 %)	13 (72,2 %)
davon zweifach exp.	2 (9,1 %)	4 (14,8 %)	2 (11,1 %)	5 (27,8 %)

In Abb. 14 sind die in der einfachen bzw. zweifachen exponentiellen Anpassungsfunktion der Ca^{2+} -Signale aus Tab. 29 auftretenden Parameter sowie deren Quotienten (a_{12} , a_{22} , $\frac{a_{12}}{a_{22}}$, τ_1 , τ_2 , $\frac{\tau_2}{\tau_1}$) bei c(Thap) = 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ bzw. 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ von *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten gegenübergestellt. Zusätzlich wurden die Daten bei Thapsigarginapplikation mit c(Thap) = 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ und 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ innerhalb eines Hautfibroblastentyps vereinigt (1 + 50). Die kürzere Lagphase und schnellere Kinetik der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ nach Thapsigarginapplikation der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten (Abb. 11, Abb. 12) impliziert für diese ein schnelleres Erreichen des Wendepunkts $P_w(t_w, \frac{\Delta F}{\Delta F_{10W}})$. Die y-Koordinate $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10W}}$ entspricht dem Parameter a_{12} der einfachen bzw. zweifachen exponentiellen

Anpassungsfunktion. Für $f_{\text{opt}}: [t_w, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}}$ (Gl. 37) zeigten die *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten höhere a_{12} -Werte (alle $p < 0,010$) (Abb. 14 A). Dabei resultieren die höheren Abklingzeitkonstanten (τ_1) der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten ($p < 0,001$ (c(Thap) = 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$), n.s. (c(Thap) = 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$)) (Abb. 14 B) möglicherweise aus dem schnelleren Erreichen des

Wendepunkts $P_W(t_w, \frac{\Delta F}{\Delta F_{10W}})$ und dem damit zusammenhängenden größeren Anpassungsintervall $([t_w, 900] (Sec61aI^{Y344H/Y344H}) \supseteq [t_w, 900] (Sec61aI^{WT/WT}))$ sowie den höheren a_{12} -Werten.

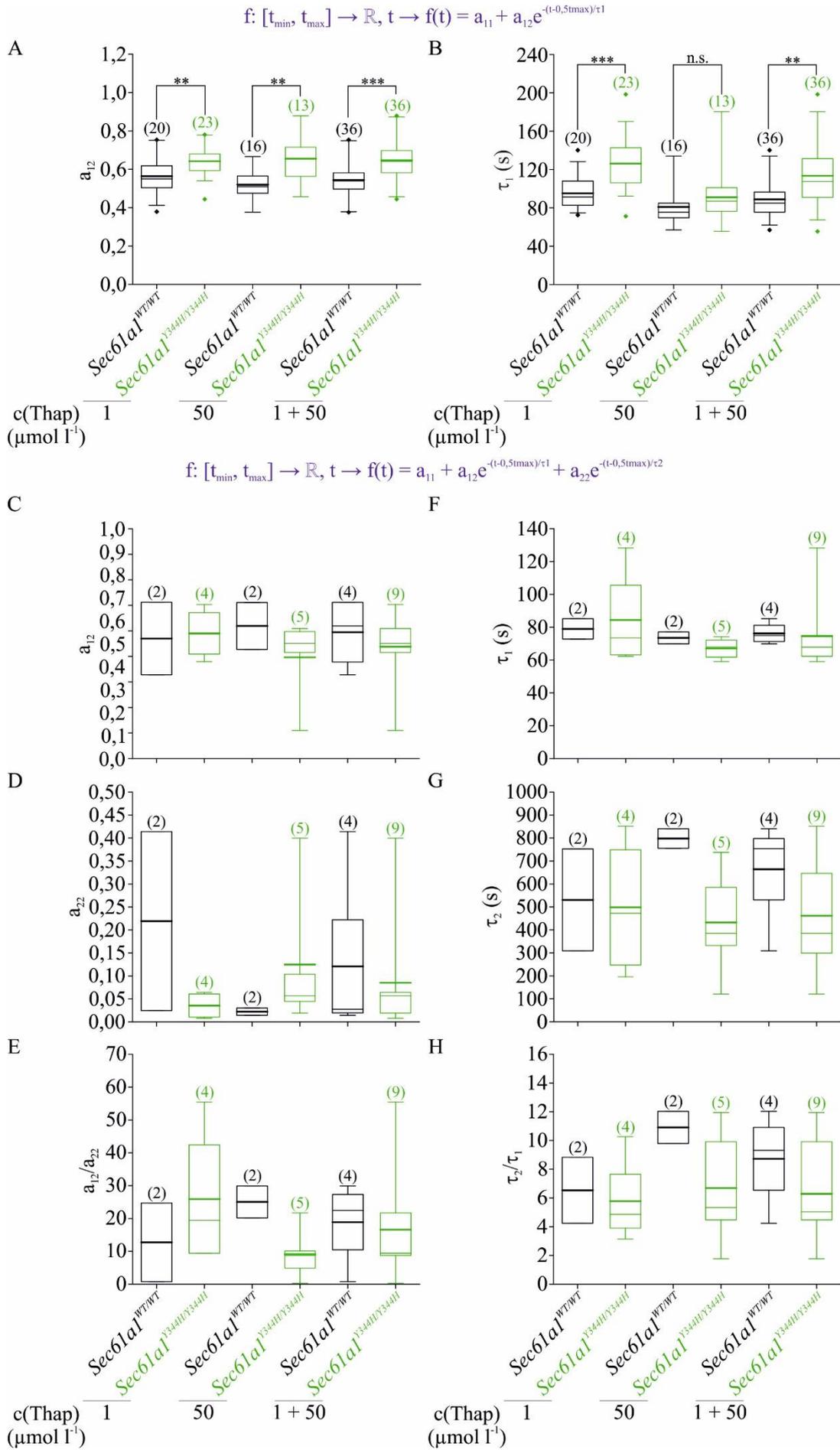
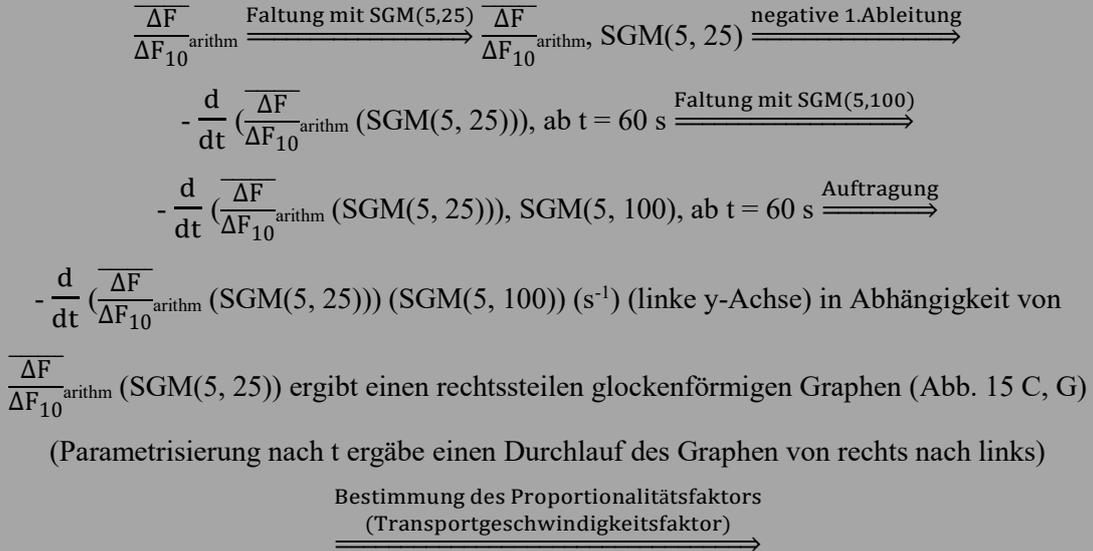


Abb. 14: Gegenüberstellung der Parameter sowie deren Quotienten (a_{12} , a_{22} , $\frac{a_{12}}{a_{22}}$, τ_1 , τ_2 , $\frac{\tau_2}{\tau_1}$), die in der einfachen bzw. zweifachen exponentiellen Anpassungsfunktion der Ca^{2+} -Signale aus Tab. 29 auftraten, in Gegenwart von $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ bzw. $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ von *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten (Zusätzlich wurden die Daten bei Thapsigarginapplikation mit $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ innerhalb eines Hautfibroblastentyps vereinigt (1 + 50))

$f_{\text{opt}}: [\text{tw}, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}}$ (Gl. 37) ($c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $1 \mu\text{mol l}^{-1} + 50 \mu\text{mol l}^{-1}$):
A: a_{12} (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. a_{12} (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). B: τ_1 (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. τ_1 (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). $f_{\text{opt}}: [\text{tw}, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto$
 $f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}} + a_{22} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_2}}$ (Gl. 41) ($c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $1 \mu\text{mol l}^{-1} + 50 \mu\text{mol l}^{-1}$): C: a_{12} (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. a_{12} (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). D: a_{22} (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. a_{22} (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). E: $\frac{a_{12}}{a_{22}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $\frac{a_{12}}{a_{22}}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). F: τ_1 (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. τ_1 (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). G: τ_2 (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. τ_2 (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). H: $\frac{\tau_2}{\tau_1}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $\frac{\tau_2}{\tau_1}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} ; (·): Zellzahl. TT, KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $0,001 \leq p < 0,010 \hat{=} **$, $p < 0,001 \hat{=} ***$.

Für $f_{\text{opt}}: [\text{tw}, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}} + a_{22} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_2}}$ (Gl. 41) wurde auf Grund der geringen Zellzahlen auf die Hypothesentests verzichtet (Abb. 14 C - H). Auf das heterogene Bild, das sich ergab, wird deshalb nicht eingegangen. Zum Schluß wurde der Proportionalitätsfaktor $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\overline{\Delta F_{10}}}$ (Transportgeschwindigkeitsfaktor) ermittelt (Abb. 15), wozu $\frac{\overline{\Delta F}}{\overline{\Delta F_{10}}}$ (Abb. 11) nach Schema 14.

Schema 14: Datenprozessierung 2



nach

passiver Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol $\hat{=}$

$$\frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} = k_d \frac{\Delta F}{\overline{\Delta F_{10}}} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \text{ (Gl. 146)} \Leftrightarrow k_d \frac{\Delta F}{\overline{\Delta F_{10}}} = \frac{\frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}}{\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}} \text{ (Gl. 147)}$$

$$\left(\left[\frac{d}{dt} \frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \right] = \text{s}^{-1}, \left[k_d \frac{\Delta F}{\overline{\Delta F_{10}}} \right] = \text{s}^{-1} \right)$$

$$k_d \frac{\Delta F}{dt \Delta F_{10}}$$

Proportionalitätsfaktor (Transportgeschwindigkeitsfaktor) der 1. Ableitung

der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}}$ -Ratio

ergibt sich der Proportionalitätsfaktor (Transportgeschwindigkeitsfaktor)

$$k_d \frac{\overline{\Delta F}}{dt (\overline{\Delta F}_{10}^{\text{arithm}} (\text{SGM}(5,25))) (\text{SGM}(5,100))} = - \frac{d}{dt} \left(\frac{- \frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\overline{\Delta F}_{10}^{\text{arithm}}} (\text{SGM}(5,25)) \right) (\text{SGM}(5,100))}{\frac{\overline{\Delta F}}{\overline{\Delta F}_{10}^{\text{arithm}}} (\text{SGM}(5,25))} \right)$$

Faltung mit SGM(5,100)
und Auftragung

(Gl. 148) (s⁻¹) (rechte y-Achse) $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$

$k_d \frac{\overline{\Delta F}}{dt (\overline{\Delta F}_{10}^{\text{arithm}} (\text{SGM}(5,25))) (\text{SGM}(5,100))}$, SGM(5, 100) (rechter y-Achse zugeordnet) in Abhängigkeit von

$\frac{\overline{\Delta F}}{\overline{\Delta F}_{10}^{\text{arithm}}} (\text{SGM}(5, 25))$, mit Schwingungen der Graphen zu Beginn, einem linearen Verlauf von positiven zu negativen Werten im mittleren Bereich (linear angepaßt mit $f_{\text{opt}}: [t_{\text{lin, min}}, t_{\text{lin, max}}] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) = \hat{a}_1 + \hat{a}_2 t$ (Gl. 149)) und Schwingungen am Ende (Abb. 15 C, G)

(Parametrisierung nach t ergäbe einen Durchlauf des Graphen von rechts nach links) $\xrightarrow{\text{Auftragung}}$

$k_d \frac{\overline{\Delta F}}{dt (\overline{\Delta F}_{10}^{\text{arithm}} (\text{SGM}(5,25))) (\text{SGM}(5,100))}$ (SGM(5, 100)) (s⁻¹) in Abhängigkeit von t (s) (Abb. 15 D, H)

SGM(5, 25) Savitzky-Golay-Methode (5. Grades, 25 Datenpunkte) (siehe 4.2.3.1.1.1.1.2)

SGM(5, 100) Savitzky-Golay-Methode (5. Grades, 100 Datenpunkte) (siehe 4.2.3.1.1.1.1.2)

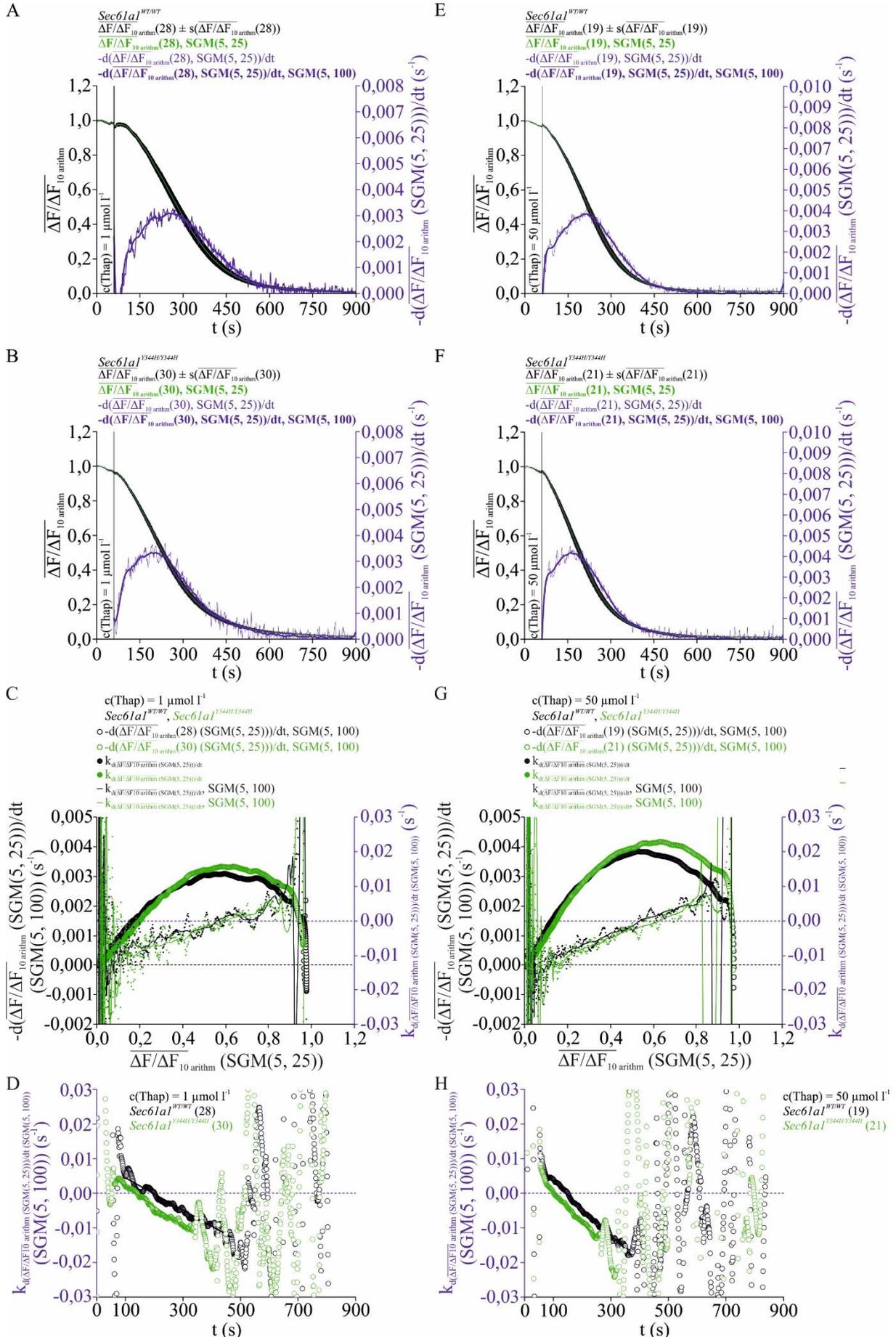


Abb. 15: Bestimmung des Proportionalitätsfaktors $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100))$ (Transportgeschwindigkeitsfaktor)

A, B, E, F: Meßprotokoll: (1.) 1 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung) (2.) 14 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (*Sec61a1*^{WT/WT} (A), *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} (B)) bzw. 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (*Sec61a1*^{WT/WT} (E), *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} (F)) (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \mu\text{mol l}^{-1}$ bzw. 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$) (Systemeinstellung: λ_{ex} -Bereich = 459,0 nm bis 481,0 nm, λ_{em} -Bereich = 505,0 nm bis 545,0 nm, $t(\text{Belichtung}) = 50 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 1 \text{ Hz}$, Pixelbinning = 4 · 4, Vergr. 60-fach, Öl-Immersion). $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}}$ (linke y-Achse) bzw. $-\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) \right) (\text{s}^{-1})$

(rechte y-Achse) in Abhängigkeit von t (s). $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}}$ (Abb. 11) wurde nach Schema 14: Datenprozessierung 2 prozessiert:

$\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} \pm s \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} \right)$ (schwarz) $\Rightarrow \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}}$, SGM(5, 25) (grün) $\Rightarrow -\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) \right)$ (blau, dünn), ab $t = 60 \text{ s} \Rightarrow -\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) \right)$, SGM(5, 100) (blau, dick), ab $t = 60 \text{ s}$. In C, D, G und H: *Sec61a1*^{WT/WT} schwarz, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} grün. C, G: $-\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) \right) (\text{SGM}(5, 100)) (\text{s}^{-1})$ (linke y-Achse) (○) bzw. $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100)) =$

$-\frac{d}{dt} \left(\frac{-\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100)) \right)}{\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25))} \right) (\text{Gl. 148}) (\text{s}^{-1})$ (rechte y-Achse) (● $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100))'$ -

$k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100))$, SGM(5, 100) in Abhängigkeit von $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25))$ (Parametrisierung nach t ergäbe einen Durchlauf des Graphen von rechts nach links); $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (C) bzw. 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (G); . D, H:

$k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100)) (\text{SGM}(5, 100)) = -\frac{d}{dt} \left(\frac{-\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100)) \right)}{\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25))} \right) (\text{SGM}(5, 100)) (\text{Gl. 150}) (\text{s}^{-1})$

¹⁾ in Abhängigkeit von t (s) mit linearer Anpassungsfunktion $f_{\text{opt}}: [t_{\text{lin, min}}, t_{\text{lin, max}}] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) = \hat{a}_1 + \hat{a}_2 t$ (Gl. 149): $f_{\text{opt}}: [91, 471] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,0091 - 4,6 \cdot 10^{-5}t$ (Linie), $B_{\text{kor}} \approx 0,950$ (*Sec61a1*^{WT/WT}), $f_{\text{opt}}: [68, 332] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,0079 - 5,8 \cdot 10^{-5}t$ (Linie), $B_{\text{kor}} \approx 0,973$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) für $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (D) und $f_{\text{opt}}: [81, 371] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,0113 - 7,8 \cdot 10^{-5}t$ (Linie), $B_{\text{kor}} \approx 0,991$ (*Sec61a1*^{WT/WT}), $f_{\text{opt}}: [80, 331] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,0089 - 8,6 \cdot 10^{-5}t$ (Linie), $B_{\text{kor}} \approx 0,995$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) für $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$ (H). (·) Zellzahl, aus der sich die Größe ergab; --- 0-Wert einer y-Achse, der nicht auf der x-Achse liegt.

Für $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ist im Bereich von $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) = 0,34$ bis $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) =$

$0,94 - \frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) \right) (\text{SGM}(5, 100))$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $> -\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) \right)$

(SGM(5, 100)) (*Sec61a1*^{WT/WT}) mit $P_{\text{max}}(0,64, 0,0033)$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) und $P_{\text{max}}(0,59, 0,0031)$

(*Sec61a1*^{WT/WT}) (Abb. 15 C), was die kürzere Lagphase und schnellere Kinetik der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ der

Sec61a1^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten widerspiegelt (Abb. 11, Abb. 12). Im Bereich $t = 73 \text{ s}$ bis $t = 346 \text{ s}$

ist $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100)) (\text{SGM}(5, 100))$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $<$

$k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5,25)) (\text{SGM}(5,100))$ (SGM(5, 100)) (*Sec61a1*^{WT/WT}). Es ergaben sich $f_{\text{opt}}: [91, 471] \rightarrow$

$\mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,0091 - 4,6 \cdot 10^{-5}t$, $B_{\text{kor}} \approx 0,950$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) und $f_{\text{opt}}: [68, 332] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t,$

$\vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,0079 - 5,8 \cdot 10^{-5}t$, $B_{\text{kor}} \approx 0,973$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}), d.h. $|\hat{a}_2|$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $> |\hat{a}_2|$

(*Sec61a1*^{WT/WT}). Für $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$ ist im Bereich von $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) = 0,33$ bis $\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}}$

(SGM(5, 25)) $= 0,97 - \frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}} (\text{SGM}(5, 25)) \right) (\text{SGM}(5, 100))$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $> -\frac{d}{dt} \left(\frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10} \text{arithm}}$

(SGM(5, 25)) (SGM(5, 100)) (*Sec61a1*^{WT/WT}) mit $P_{\text{max}}(0,63, 0,0042)$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) und $P_{\text{max}}(0,53,$

$0,0038)$ (*Sec61a1*^{WT/WT}), was die kürzere Lagphase und schnellere Kinetik der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ der

Sec61a1^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten widerspiegelt (Abb. 11, Abb. 12). Im Bereich $t = 54$ s bis $t = 274$ s ist $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}} \text{arithm}(\text{SGM}(5,25))(\text{SGM}(5,100))$ (SGM(5, 100)) (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $<$ $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}} \text{arithm}(\text{SGM}(5,25))(\text{SGM}(5,100))$ (SGM(5, 100)) (*Sec61a1*^{WT/WT}). Es ergaben sich $f_{\text{opt}}: [81, 371] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,0113 - 7,8 \cdot 10^{-5}t, B_{\text{kor}} \approx 0,991$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) und $f_{\text{opt}}: [80, 331] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,0089 - 8,6 \cdot 10^{-5}t, B_{\text{kor}} \approx 0,995$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}), d.h. $|\hat{a}_2|$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $>$ $|\hat{a}_2|$ (*Sec61a1*^{WT/WT}).

Zusammenfassung: Die normierte (Abb. 10) und durch Thapsigarginapplikation demaskierte $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten zeigte eine kürzere Lagphase und schnellere Kinetik, als der der *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten (Abb. 11, Abb. 12). Der größte Teil der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$, tot dem (Abb. 13) lies

sich besser mit $f_{\text{opt}}: [t_w, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}}$ (88,9 % bis 90,9 % *Sec61a1*^{WT/WT}, 72,2 % bis 85,2 % *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}; τ_1 (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $>$ τ_1 (*Sec61a1*^{WT/WT}) (Abb. 14) als mit $f_{\text{opt}}: [t_w, 900] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_1}} + a_{22} e^{-\frac{t-0,5t_{\text{max}}}{\tau_2}}$ (9,1 % bis 11,1 % *Sec61a1*^{WT/WT}, 14,8 % bis 27,8 % *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) charakterisieren (Tab. 29). Für $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}}$ galt im mittleren linearen

Bereich $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}} \text{arithm}(\text{SGM}(5,25))(\text{SGM}(5,100))$ (SGM(5, 100)) (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $<$ $k_d \frac{\overline{\Delta F}}{\Delta F_{10}} \text{arithm}(\text{SGM}(5,25))(\text{SGM}(5,100))$ (SGM(5, 100)) (*Sec61a1*^{WT/WT}), wobei $|\hat{a}_2|$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $>$ $|\hat{a}_2|$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) war.

5.2.2 Fura-2 - z₀- und $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ -Bestimmung

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt beziehen sich auf *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten 2 d nach Trypsinierung/Ausplattierung. Das gesamte mathematische Modell ist in 4.2.3.10.3 beschrieben. Die Annahme, dass unter Atp2a-Inhibition $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}(t) = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}(0 \text{ s})$

$e^{-\frac{t}{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}}}$ gilt, d.h. dass $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei}}(t)$ exponentiell abnimmt, wurde durch den Verlauf der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ bestätigt (Abb. 11). Die gesuchten Größen wurden sequenziell bestimmt:

$$\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}}} \rightarrow z_0 \rightarrow \tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$$

5.2.2.1 Bestimmung von $\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}}}$

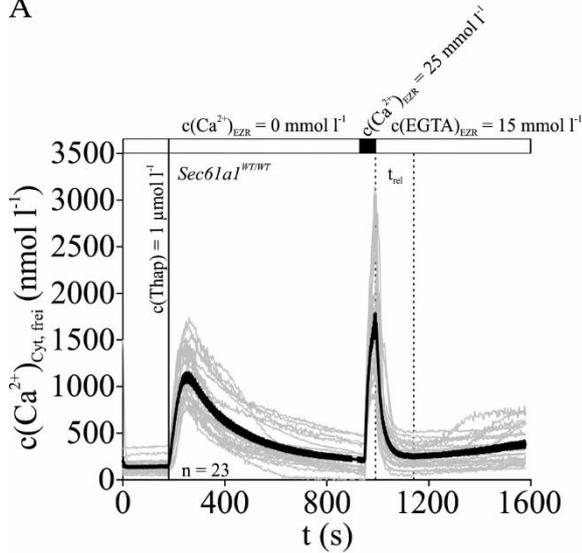
Meßprotokoll der $\overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}}}$ -Bestimmung (Abb. 16 A, B, C):

1. 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung)
2. 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$)

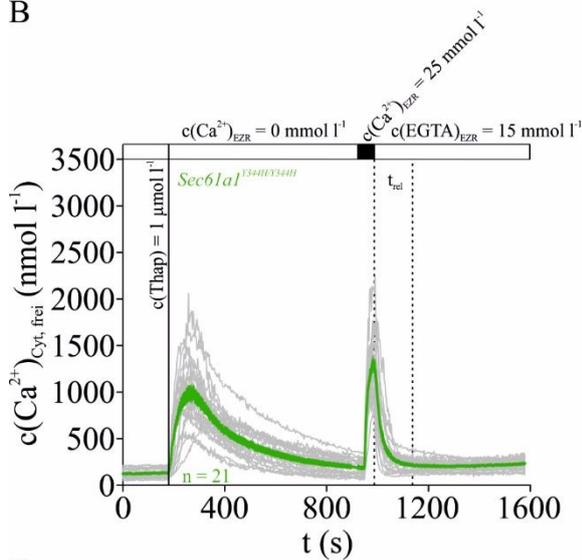
3. Meßstopp
4. Abnahme: 300 μl der Lösung mit $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$
5. Meßstart
6. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 25 \text{ mmol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 50,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) bis zum Erreichen von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$
7. $c(\text{EGTA})_{\text{EZR}} = 15 \text{ mmol l}^{-1}$ (Applikation: 600 μl 30,0 mmol l^{-1} -EGTA-Lösung), so dass $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ bis $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, min}}$ (EGTA) durchlaufen wurde (Meßdauer insgesamt $\geq 25 \text{ min}$)

Zur Analyse wurde ein Zeitintervall ab dem Zeitpunkt der EGTA-Applikation (t_{rel}) herangezogen (Abb. 16, Abb. 17).

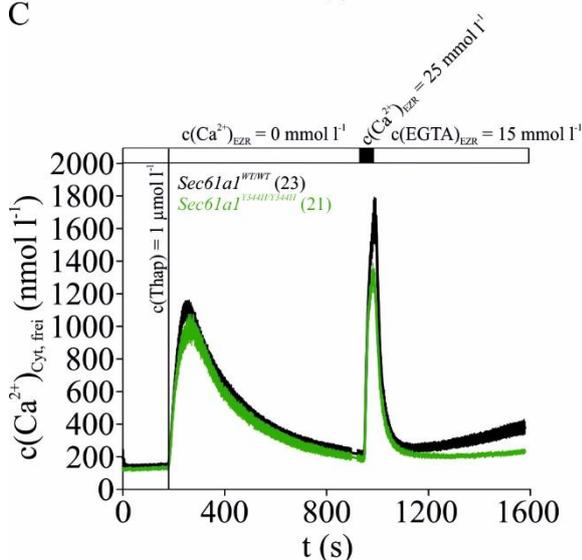
A



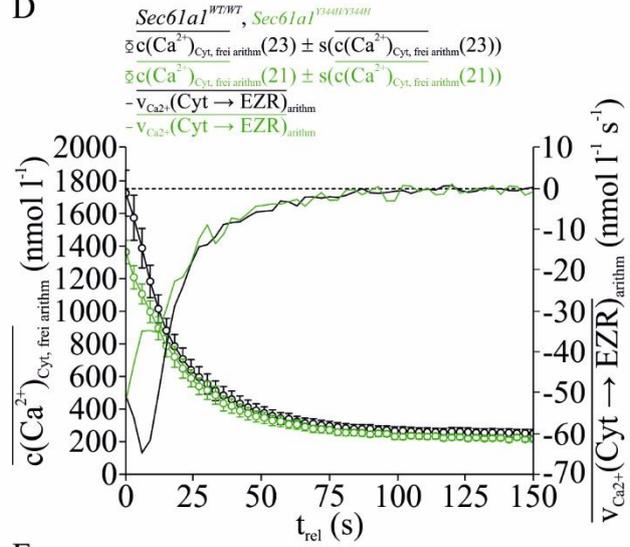
B



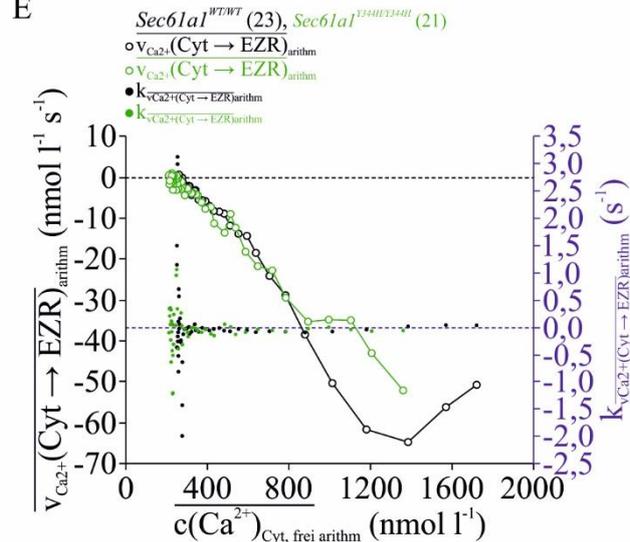
C



D



E



F

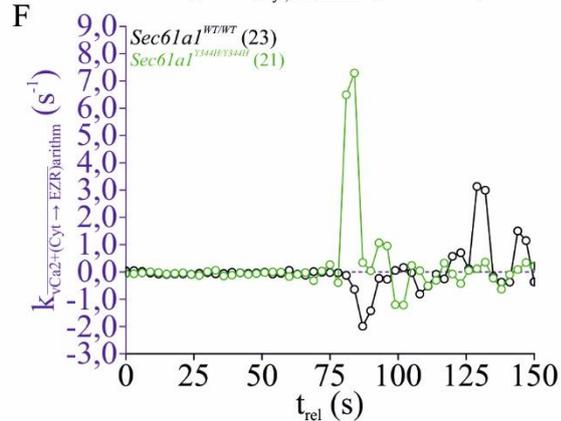


Abb. 16: Bestimmung des Proportionalitätsfaktors $k_{\text{Ca}^{2+}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})_{\text{arithm}}}$ (Transportgeschwindigkeitsfaktor)

In A bis F: *Sec61a1*^{WT/WT} schwarz, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} grün. A, B, C: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (nmol l⁻¹) in Abhängigkeit von t (s). Meßprotokoll (2 d nach Trypsinierung/Ausplattierung): (1.) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0$ mmol l⁻¹ (300 µl 0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung) (2.) 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0$ mmol l⁻¹, c(Thap) = 1 µmol l⁻¹ (Applikation: 300 µl 0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung mit c(Thap) = 2 µmol l⁻¹) (3.) Meßstopp (4.) Abnahme: 300 µl der Lösung mit $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0$ mmol l⁻¹, c(Thap) = 1 µmol l⁻¹ (5.) Meßstart (6.) $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 25$ mmol l⁻¹ (Applikation: 300 µl 50,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung) bis zum Erreichen von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (7.)

$c(\text{EGTA})_{\text{EZR}} = 15 \text{ mmol l}^{-1}$ (Applikation: $600 \mu\text{l}$ $30,0 \text{ mmol l}^{-1}$ -EGTA-Lösung), so dass $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ bis $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, min}}(\text{EGTA})$ durchlaufen wurde (Meßdauer insgesamt $\geq 25 \text{ min}$) (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = $327,0 \text{ nm}$ bis $353,0 \text{ nm}$, λ_{ex2} -Bereich = $381,5 \text{ nm}$ bis $392,5 \text{ nm}$, λ_{em} -Bereich = $470,0 \text{ nm}$ bis $550,0 \text{ nm}$, $t(\text{Belichtung}) = 25 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 0,3 \text{ Hz}$, $\text{Pixelbinning} = 2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). Ca^{2+} -Signale einzelner Hautfibroblasten dünne graue Linien, $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}})$ dicke schwarze/grüne Linien. Zur weiteren Analyse wurden die ersten 150 s nach dem Zeitpunkt der EGTA-Applikation (t_{rel} (bezogen auf $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}}$) vertikale gestrichelte Linien in A und B) herangezogen. D: $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \text{ (nmol l}^{-1}\text{)}$ (linke y-Achse) (○) bzw. $\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}} = \frac{d}{dt_{\text{rel}}} \overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}}$ (Gl. 151) ($\text{nmol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (rechte y-Achse) (-) in Abhängigkeit von t_{rel} (s). E: $\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}} = \frac{d}{dt_{\text{rel}}} \overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}}$ (Gl. 151) ($\text{nmol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (linke y-Achse) (○) bzw. $\overline{k_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}} = \frac{d}{dt_{\text{rel}}} \frac{\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}}}{\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}}}$ (Gl. 154) (s^{-1}) (rechte y-Achse) (●). F: $\overline{k_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}} = \frac{d}{dt_{\text{rel}}} \frac{\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}}}{\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}}}$ (Gl. 154) (s^{-1}) in Abhängigkeit von t_{rel} (s). n Zellzahl bzw. (·) Zellzahl, aus der sich die Größe ergab; --- 0-Wert einer y-Achse, der nicht auf der x-Achse liegt.

Zunächst wurde der Proportionalitätsfaktor $\overline{k_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}}$ (Transportgeschwindigkeitsfaktor) ermittelt, wozu $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}}$ nach Schema 15 prozessiert wurde.

Schema 15: Datenprozessierung 3

$$\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \xrightarrow{\text{1. Ableitung nach } t_{\text{rel}}}$$

$$\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}} = \frac{d}{dt_{\text{rel}}} \overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \text{ (Gl. 151)} \xrightarrow{\text{Auftragung}}$$

$$\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}} \text{ (nmol l}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)} \text{ (linke y-Achse) in Abhängigkeit von}$$

$$\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \text{ (nmol l}^{-1}\text{)} \text{ (Abb. 16 E)}$$

(Parametrisierung nach t_{rel} ergäbe einen Durchlauf des Graphen von rechts nach links)

Determination des Proportionalitätsfaktors
(Transportgeschwindigkeitsfaktor)

nach

passiver Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol $\hat{=}$

$$v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR}) = \frac{d}{dt} c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = k_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})} c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} \text{ (Gl. 152)}$$

$$\Leftrightarrow k_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})} = \frac{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}} \text{ (Gl. 153)}$$

$$[v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})] = \text{nmol l}^{-1} \text{ s}^{-1}, [k_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}] = \text{s}^{-1}$$

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen

$v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})$ 1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen nach der Zeit $\hat{=}$ passiver Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol

ergibt sich der Proportionalitätsfaktor (Transportgeschwindigkeitsfaktor)

$$\overline{k_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}} = \frac{d}{dt_{\text{rel}}} \frac{\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}}}{\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}}} \text{ (Gl. 154) (s}^{-1}\text{)}$$

(rechte y-Achse) (Abb. 16 E)

(Parametrisierung nach t_{rel} ergäbe einen Durchlauf des Graphen von rechts nach links)

Auftragung $\xrightarrow{\quad} k_{\overline{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}} (s^{-1})$ in Abhängigkeit der relativen Zeit t_{rel} (s) (Abb. 16 F)

t_{rel} relative Zeit

$\overline{c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}}_{arithm}$ bzw. $\overline{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}$ der *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten zeigten in Abhängigkeit von t_{rel} einen ähnlichen Verlauf, mit dem Unterschied, dass $\overline{c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}}_{arithm}(0 \text{ s})$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) $\approx 1360 \text{ nmol l}^{-1} < \overline{c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}}_{arithm}(0 \text{ s})$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) $\approx 1721 \text{ nmol l}^{-1}$ war (Abb. 16 D). $\overline{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}$ verlief in Abhängigkeit von $\overline{c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}}_{arithm}$ im Bereich von ca. 1384 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{WT/WT})/ca. 1360 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) bis ca. 250 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{WT/WT})/ca. 216 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) näherungsweise linear, ab ca. 879 nmol l^{-1} kamen die beiden Graphen zur Deckung (Abb. 16 E). Für $t_{rel} = 0 \text{ s}$ bis ca. 78 s galt $k_{\overline{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) \approx k_{\overline{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}) \approx \text{konst.}$ (Abb. 16 F). Das $\overline{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}$ in Abhängigkeit von $\overline{c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}}_{arithm}$ im Bereich von ca. 1384 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{WT/WT})/ca. 1360 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) bis ca. 250 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{WT/WT})/ca. 216 nmol l^{-1} (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) näherungsweise linear verlief bzw. dass für $t_{rel} = 0 \text{ s}$ bis ca. 78 s $k_{\overline{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) \approx k_{\overline{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}) \approx \text{konst.}$, unterstützte die unter 4.2.3.10.3 gemachte vereinfachte Annahme, dass in $v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR) = \overline{|\hat{a}_2(Cyt \rightarrow EZR)|_{arithm}} \Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}(t)$ (Gl. 94) $\overline{|\hat{a}_2(Cyt \rightarrow EZR)|_{arithm}} = \text{konst.}$ sei. Aus den graphisch ermittelten $\hat{a}_2(Cyt \rightarrow EZR)$ -Werten der einzelnen Ca^{2+} -Signale ergab sich $\overline{|\hat{a}_2(Cyt \rightarrow EZR)|_{arithm}}$, zur Kontrolle wurde zusätzlich $\overline{\tau_{v_{Ca^{2+}}(Cyt \rightarrow EZR)_{arithm}}}^{-1}$ bestimmt und $\overline{|\hat{a}_2(Cyt \rightarrow EZR)|_{arithm}}$ gegenübergestellt (Abb. 17). Dazu wurde $c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}$ normiert und logarithmiert, was am Bsp. des Ca^{2+} -Signals eines *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten repräsentativ dargestellt ist.

Schema 16: Datenprozessierung 4

$$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} \text{ (Abb. 17 A)} \xrightarrow{\text{Delta}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, min}} \text{ (Abb. 17 B)}$$

Normierung und einfache exponentielle Anpassung

$$\frac{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t_{\text{rel}})}{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(0 \text{ s})} \text{ mit } f_{\text{opt}}: [t_{\text{rel, exp, min}}, t_{\text{rel, exp, max}}] \rightarrow \mathbb{R},$$

$$t_{\text{rel}} \mapsto f_{\text{opt}}(t_{\text{rel}}) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t_{\text{rel}} - 0,5 t_{\text{rel, max}}}{\tau_{\text{vCa}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}} \text{ (Gl. 37) (Abb. 17 C)}$$

Logarithmierung und einfache lineare Anpassung

$$\log_e \frac{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t_{\text{rel}})}{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(0 \text{ s})} \text{ mit } f_{\text{opt}}: [t_{\text{rel, lin, min}}, t_{\text{rel, lin, max}}] \rightarrow \mathbb{R},$$

$$t \mapsto f_{\text{opt}}(t_{\text{rel}}, \vec{a}_{\text{min}}) = \hat{a}_1 + \hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})t_{\text{rel}} \text{ (Gl. 155) (Abb. 17 D)}$$

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen

Statistisch gab es zwischen $\tau_{\text{vCa}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) und $\tau_{\text{vCa}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) keinen Unterschied ($p \geq 0,050$) (Abb. 17 E). Gleiches galt für den Vergleich $\tau_{\text{vCa}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})^{-1}$ (einfaches exponentielles Anpassungsmodell) vs. $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|$ (einfaches lineares Anpassungsmodell) bzw. B_{kor} (einfaches exponentielles Anpassungsmodell) vs. B_{kor} (einfaches lineares Anpassungsmodell) innerhalb eines Hautfibroblastentyps (Abb. 17 F, G), sowie $\tau_{\text{vCa}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})^{-1}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $\tau_{\text{vCa}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})^{-1}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) bzw. $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) (Abb. 17 H) (alle $p \geq 0,050$) (Äquivalenz beider Anpassungsmodelle). Die korrespondierenden \bar{x}_{arithm} sind den Zahlen an und in den Kästen zu entnehmen (Abb. 17 E bis H), so auch $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} (\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) \approx 0,052 \text{ s}^{-1}$ und $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} (\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}) \approx 0,047 \text{ s}^{-1}$, die für die folgenden Berechnungen verwendet wurden.

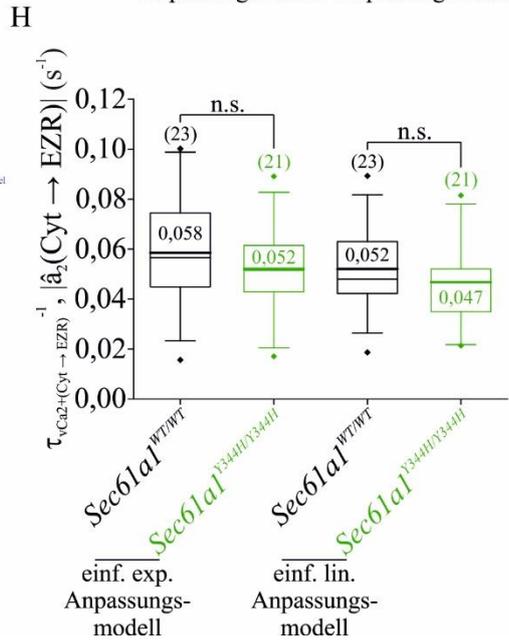
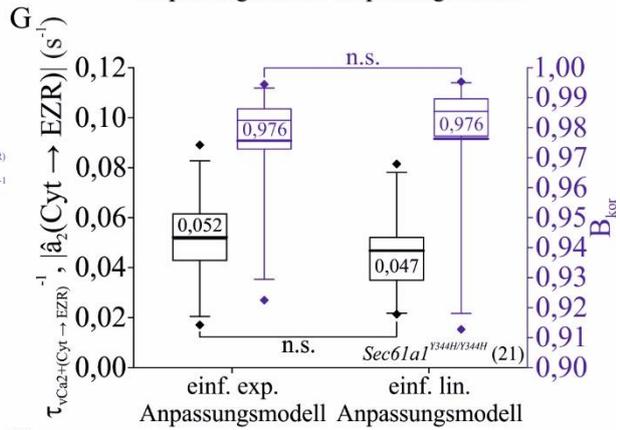
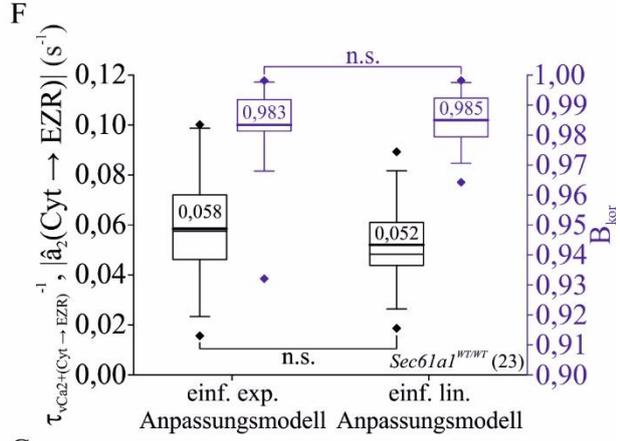
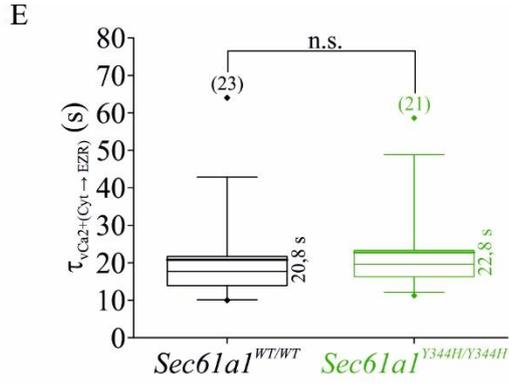
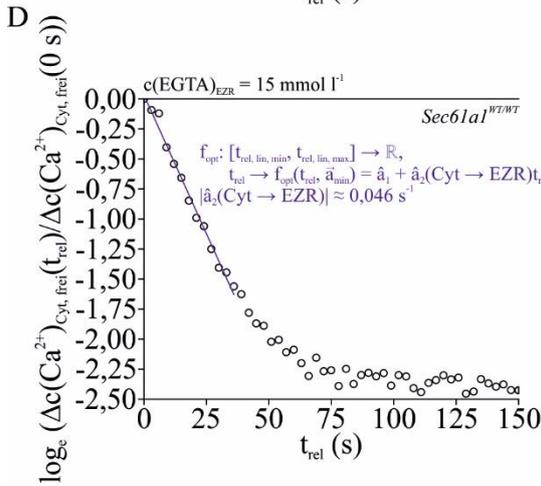
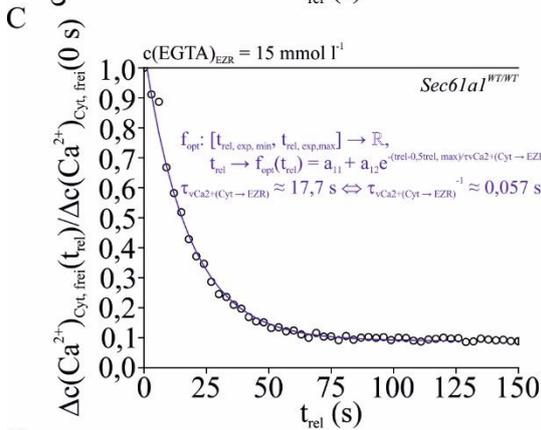
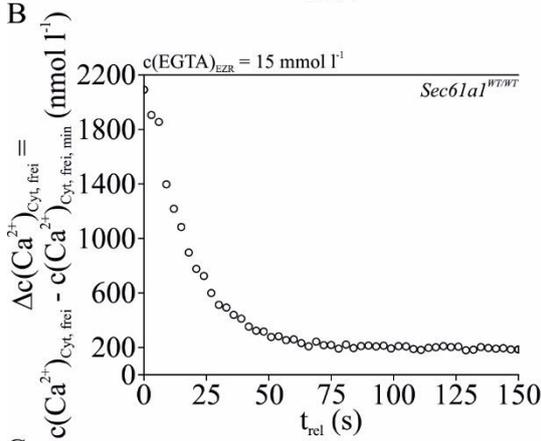
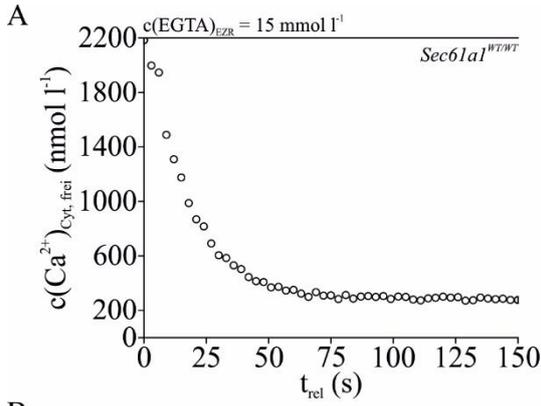


Abb. 17: $\tau_{\text{Ca}^{2+}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}^{-1}$ - und $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|$ -Bestimmung

Meßprotokoll (2 d nach Trypsinierung/Ausplattierung): (1.) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung) (2.) 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$) (3.) Meßstopp (4.) Abnahme: 300 μl der Lösung mit $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ (5.) Meßstart (6.) $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 25 \text{ mmol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 50,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung) bis zum Erreichen von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (7.) $c(\text{EGTA})_{\text{EZR}} = 15 \text{ mmol l}^{-1}$ (Applikation: 600 μl 30,0 mmol l⁻¹-EGTA-Lösung), so dass $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ bis $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, min}}$ (EGTA) durchlaufen wurde (Meßdauer insgesamt $\geq 25 \text{ min}$) (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, $t(\text{Belichtung}) = 25 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 0,3 \text{ Hz}$, Pixelbinning = 2 · 2, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ in 2,0 mmol l⁻¹-Ca²⁺-Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). A, B, C, D: Normierung und Logarithmierung von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ in den ersten 150 s nach dem Zeitpunkt der EGTA-Applikation (t_{rel}), dargestellt am Bsp. des Ca²⁺-Signals eines *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten aus Abb. 16 A: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(A) \Rightarrow \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, min}}$ (B) $\Rightarrow \frac{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t_{\text{rel}})}{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(0 \text{ s})}$ mit einfacher

exponentieller Anpassung $f_{\text{opt}}: [t_{\text{rel, exp, min}}, t_{\text{rel, exp, max}}] \rightarrow \mathbb{R}$, $t_{\text{rel}} \mapsto f_{\text{opt}}(t_{\text{rel}}) = a_{11} + a_{12} e^{-\frac{t_{\text{rel}} - 0,5 t_{\text{rel, max}}}{\tau_{\text{Ca}^{2+}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}}}$ (Gl. 37) (C) $\Rightarrow \log_e \frac{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t_{\text{rel}})}{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(0 \text{ s})}$ mit einfacher linearer Anpassung $f_{\text{opt}}: [t_{\text{rel, lin, min}}, t_{\text{rel, lin, max}}] \rightarrow \mathbb{R}$, $t \mapsto f_{\text{opt}}(t_{\text{rel}}, \vec{a}_{\text{min}}) = \hat{a}_1 + \hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})_{t_{\text{rel}}}$ (Gl. 155) (D). E: $\tau_{\text{Ca}^{2+}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}(\text{s})$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $\tau_{\text{Ca}^{2+}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}(\text{s})$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). F, G: $\tau_{\text{Ca}^{2+}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}^{-1}(\text{s}^{-1})$ (einfaches exponentielles Anpassungsmodell) vs. $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|(\text{s}^{-1})$ (einfaches lineares Anpassungsmodell) (linke y-Achse) bzw. B_{kor} (einfaches exponentielles Anpassungsmodell) vs. B_{kor} (einfaches lineares Anpassungsmodell) (rechte y-Achse) (*Sec61a1*^{WT/WT} (F), *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} (G)). H: $\tau_{\text{Ca}^{2+}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}^{-1}(\text{s}^{-1})$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $\tau_{\text{Ca}^{2+}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}^{-1}(\text{s}^{-1})$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) (einfaches exponentielles Anpassungsmodell), $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|(\text{s}^{-1})$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|(\text{s}^{-1})$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) (einfaches lineares Anpassungsmodell). Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie, Zahl an/in Kasten); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} ; (·): Zellzahl. TT, KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$

5.2.2.2 z_0 - und $\tau_{\text{Ca}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ -Bestimmung unter basalen Bedingungen

Mit $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}}$ wurden die von $R \rightarrow c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ umgerechneten Daten aus Abb. 2 B und F (Abb. 18 A, B) nach Schema 17 prozessiert (repräsentative Darstellung am Bsp. eines *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten).

Schema 17: Datenprozessierung 5

$$\begin{aligned}
 & c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} \text{ (nmol l}^{-1}\text{)} \text{ (Abb. 18 A, B)} \xrightarrow{\text{Auftragung}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} \text{ (nmol l}^{-1}\text{)} \text{ (linke y-Achse)} \\
 & \text{in Abhängigkeit von } t \text{ (s)} \text{ (Abb. 18 C)} \xrightarrow{\text{Auftragung}} \\
 & \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \int \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du \text{ (}\mu\text{mol l}^{-1}\text{)} \text{ (rechte y-Achse)} \\
 & \text{in Abhängigkeit von } t \text{ (s)} \text{ ab } t = 180 \text{ s (Zeitpunkt der Thapsigarginapplikation)} \text{ (Abb. 18 C)} \\
 & \xrightarrow{\text{Bestimmung}} \\
 & z_0 \approx \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \int_{t_1=0 \text{ s}}^{t_2=720 \text{ s}} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du \text{ (Gl. 115)} \\
 & \xrightarrow{\text{Auftragung}} \\
 & \log_e \left(1 - \frac{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + \overline{|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|}_{\text{arithm}} \int \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du}{z_0} \right)
 \end{aligned}$$

in Abhängigkeit der relativen Zeit t_{rel} (s) (Zeitintervall ab Zeitpunkt der Thapsigarginapplikation) mit einfacher linearer Anpassung $f_{\text{opt}}: [150, 400] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t_{\text{rel}}, \vec{a}_{\text{min}}) = \hat{a}_1 + \hat{a}_2(\text{EZR} \rightarrow \text{Cyt})t_{\text{rel}}$ (Gl. 156), $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} \approx -\hat{a}_2(\text{EZR} \rightarrow \text{Cyt})^{-1}$ (Gl. 157) (Abb. 18 D)

$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	Änderung der cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen
$\overline{ \hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR}) }_{\text{arithm}}$	arithmetischen Mittelwert des Betrags der Steigung der einfachen linearen Anpassungsfunktion
$\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$	Abklingzeitkonstante der 1. Ableitung der cytosolischen Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen nach der Zeit $\hat{=}$ Abklingzeitkonstante des passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	cytosolische Stoffmengenkonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen

Obwohl z_0 ($\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$) $<$ z_0 ($\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$) ($p < 0,001$) war, war $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ ($\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$) $\approx \tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ ($\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$) (Abb. 18 E). Folglich gab es keine einfache lineare Korrelation zwischen z_0 und $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ (Abb. 18 F), $f_{\text{opt}}: [z_0, \text{lin, min}, z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{\text{opt}}(z_0, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 157 + 1,414z_0$ mit $B_{\text{kor}} \approx 0,025$ ($\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$) und $f_{\text{opt}}: [z_0, \text{lin, min}, z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{\text{opt}}(z_0, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 225 - 3,576z_0$ mit $B_{\text{kor}} \approx 0,039$ ($\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$), so dass die Änderungsrate $1,4 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1}$ ($\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}$) bzw. $-3,6 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1}$ ($\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$) betrug (Abb. 18 G).

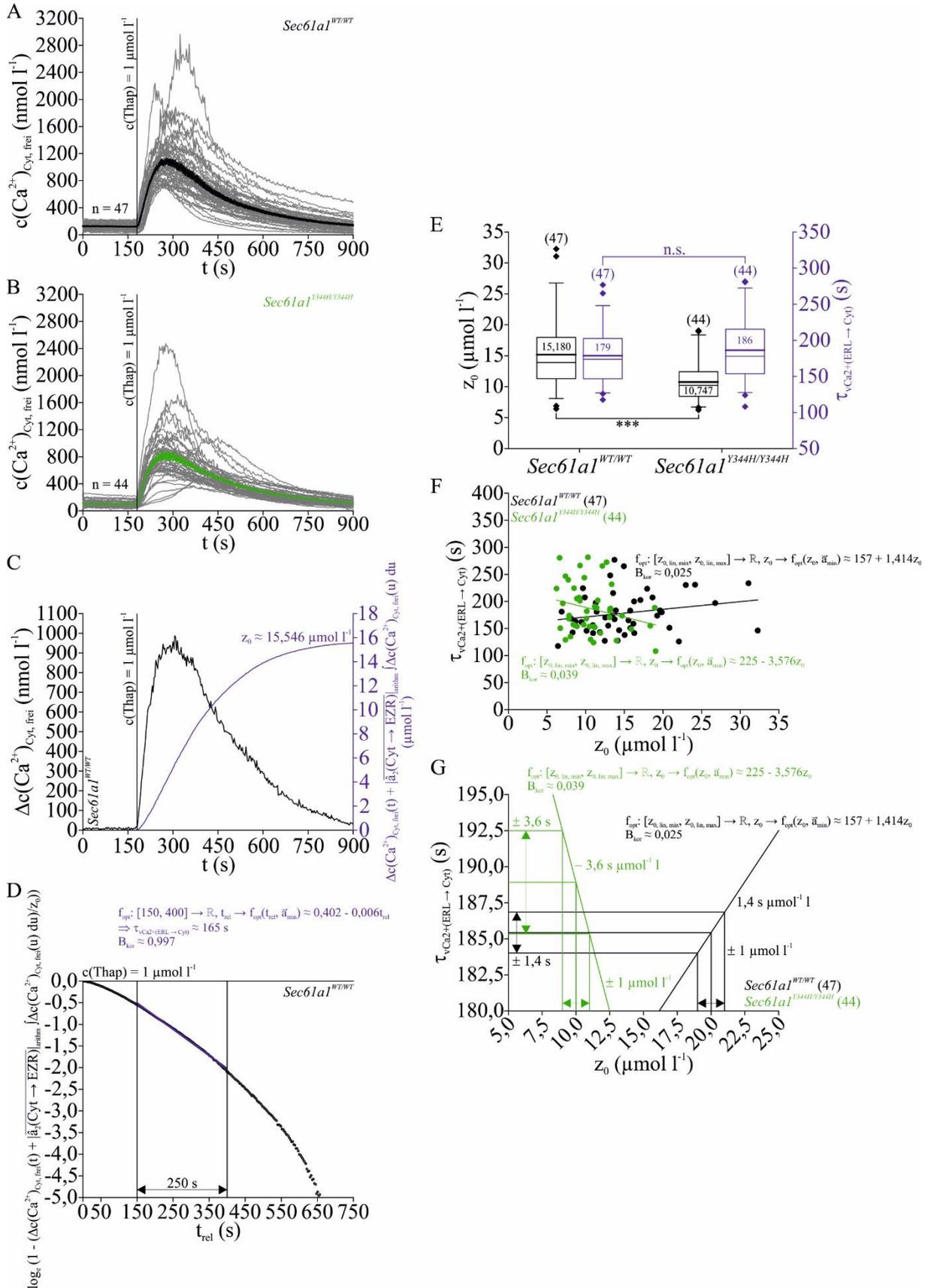


Abb. 18: z_0 - und $\tau_{vCa^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)$ -Bestimmung

In A, B, F und G: *Sec61a1*^{WT/WT} schwarz, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} grün. A, B: Von $R \rightarrow c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}$ umgerechnete Daten aus Abb. 2 B und F. Meßprotokoll (2 d nach Trypsinierung/Ausplattierung): (1.) 3 min $c(Ca^{2+})_{EZR} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 12 min $c(Ca^{2+})_{EZR} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -

Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, t (Belichtung) = 25 ms, f (Bild) = 0,3 Hz, Pixelbinning = 2 · 2, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: c (Fura-2-AM) = 4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in 2,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). Ca^{2+} -Signale einzelner Hautfibroblasten dünne graue Linien, $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}}$ \pm $s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}})$ dicke schwarze/grüne Linien. C, D: Repräsentative Analyse des Ca^{2+} -Signals eines *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten aus A. Mit $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) \approx 0,052 s^{-1} wurden die Daten nach Schema 17 prozessiert: $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}}$ (nmol l^{-1}) (A) $\Rightarrow \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (nmol l^{-1}) (linke y-Achse) in Abhängigkeit von t (s) (C) $\Rightarrow \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \int \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) (rechte y-Achse) in Abhängigkeit von t (s) ab $t = 180$ s (Zeitpunkt der Thapsigarginapplikation) (C), $z_0 \approx \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \int_{t_1=0}^{t_2=720} \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du$ (Gl. 115) $\Rightarrow \log_e(1 - \frac{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t) + |\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}} \int \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(u) du}{z_0})$ in Abhängigkeit von t_{rel} (s) (Zeitintervall ab Zeitpunkt der Thapsigarginapplikation) mit einfacher linearer Anpassung $f_{\text{opt}}: [150, 400] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t_{\text{rel}}, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 0,402 - 0,006t_{\text{rel}}$ (Gl. 158) ($B_{\text{kor}} \approx 0,997$), $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})} \approx -(0,006 \text{ s}^{-1})^{-1} \approx 165$ s (Gl. 157) (D). E: z_0 (*Sec61a1*^{WT/WT}) ($\mu\text{mol l}^{-1}$) vs. z_0 (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) ($\mu\text{mol l}^{-1}$), $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) (s) vs. $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) (s). Kasten: IQR mit $\bar{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie, Zahl in Kasten); untere Antenne: $\bar{x}_{0,05}$ bis $\bar{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\bar{x}_{0,75}$ bis $\bar{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\bar{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\bar{x}_{0,95}$ bis x_{max} . KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $p < 0,001 \hat{=} \text{***}$. F: $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ (s) in Abhängigkeit von z_0 ($\mu\text{mol l}^{-1}$) mit einfacher linearer Anpassung: $f_{\text{opt}}: [z_0, \text{lin}, \text{min}, z_0, \text{lin}, \text{max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{\text{opt}}(z_0, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 157 + 1,414z_0$ mit $B_{\text{kor}} \approx 0,025$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) und $f_{\text{opt}}: [z_0, \text{lin}, \text{min}, z_0, \text{lin}, \text{max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{\text{opt}}(z_0, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 225 - 3,576z_0$ mit $B_{\text{kor}} \approx 0,039$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). G: $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ (s) in Abhängigkeit von z_0 ($\mu\text{mol l}^{-1}$). Dargestellt sind Abschnitte der Anpassungsgeraden $f_{\text{opt}}: [z_0, \text{lin}, \text{min}, z_0, \text{lin}, \text{max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{\text{opt}}(z_0, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 157 + 1,414z_0$ mit $B_{\text{kor}} \approx 0,025$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) und $f_{\text{opt}}: [z_0, \text{lin}, \text{min}, z_0, \text{lin}, \text{max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{\text{opt}}(z_0, \vec{a}_{\text{min}}) \approx 225 - 3,576z_0$ mit $B_{\text{kor}} \approx 0,039$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). Änderungsrate: 1,4 s μmol^{-1} l (*Sec61a1*^{WT/WT}), - 3,6 s μmol^{-1} l (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). (·): Zellzahl.

Zusammenfassung (5.2.2): Tab. 30 gibt einen Überblick über die statistischen Charakteristika (Relation, korrespondierender p-Wert, \bar{x}_{arithm}) von $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|$, z_0 und $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$. Zum Vergleich: $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|_{\text{arithm}}$ (humane T-Lymphozyten, gesunde Probanden) \approx 0,018 s^{-1} bis \approx 0,037 s^{-1} , z_0 (humane T-Lymphozyten, gesunde Probanden) \approx 195 nmol l^{-1} , $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ (humane T-Lymphozyten, gesunde Probanden) \approx 138 s (Bergling, Dolmetsch *et al.*, 1998).

Tab. 30: Zusammenfassung der statistischen Charakteristika (Relation, korrespondierender p-Wert, $\bar{x}_{\text{arithm}} \pm s(\bar{x}_{\text{arithm}})$) von $|\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})|$, z_0 und $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$

	<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	Relation	<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	p-Wert
$ \hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR}) _{\text{arithm}} \pm s(\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR}) _{\text{arithm}})$ (s^{-1})	0,052 \pm 0,004	\approx	0,047 \pm 0,003	\geq 0,050
$\bar{z}_0_{\text{arithm}} \pm s(\bar{z}_0_{\text{arithm}})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	15,180 \pm 0,834	$>$	10,747 \pm 0,480	$<$ 0,001
$\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}_{\text{arithm}} \pm s(\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}_{\text{arithm}})$ (s)	179 \pm 5	\approx	186 \pm 7	\geq 0,050

$\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) \approx $\overline{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})}_{\text{arithm}}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). Unter basalen Bedingungen war die Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$ bei *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten gleich.

5.2.2.3 z_0 - und $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ -Bestimmung unter tunicamycininduzierten Kurzzeit- bzw. Langzeit-ER-Streßbedingungen

Da unter basalen Bedingungen die Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$ bei *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten gleich war, wurde diese im Anschluß unter ER-Streßbedingungen analysiert. Als spezifischer ER-Streßinduktor wurde Tunicamycin verwendet ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$, vergl. $\beta(\text{Tun})$ in (Schäuble, Lang *et al.*, 2012)) (Foufelle und Fromenty, 2016). Zur Abschätzung der

Tunicamycinkurzinkubationszeit wurden Vorversuche in 293-Zellen gemäß folgendem Meßprotokoll (24 h nach Trypsinierung/Ausplattierung) durchgeführt (Abb. 19):

- 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung)
- 3 min, 6 min und 10 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $\varphi(\text{DMSO}) = 0,2 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 20 \mu\text{g ml}^{-1}$)
- $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 600 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \mu\text{mol l}^{-1}$)
- $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t = 6 \text{ min}, 9 \text{ min}, 13 \text{ min})$

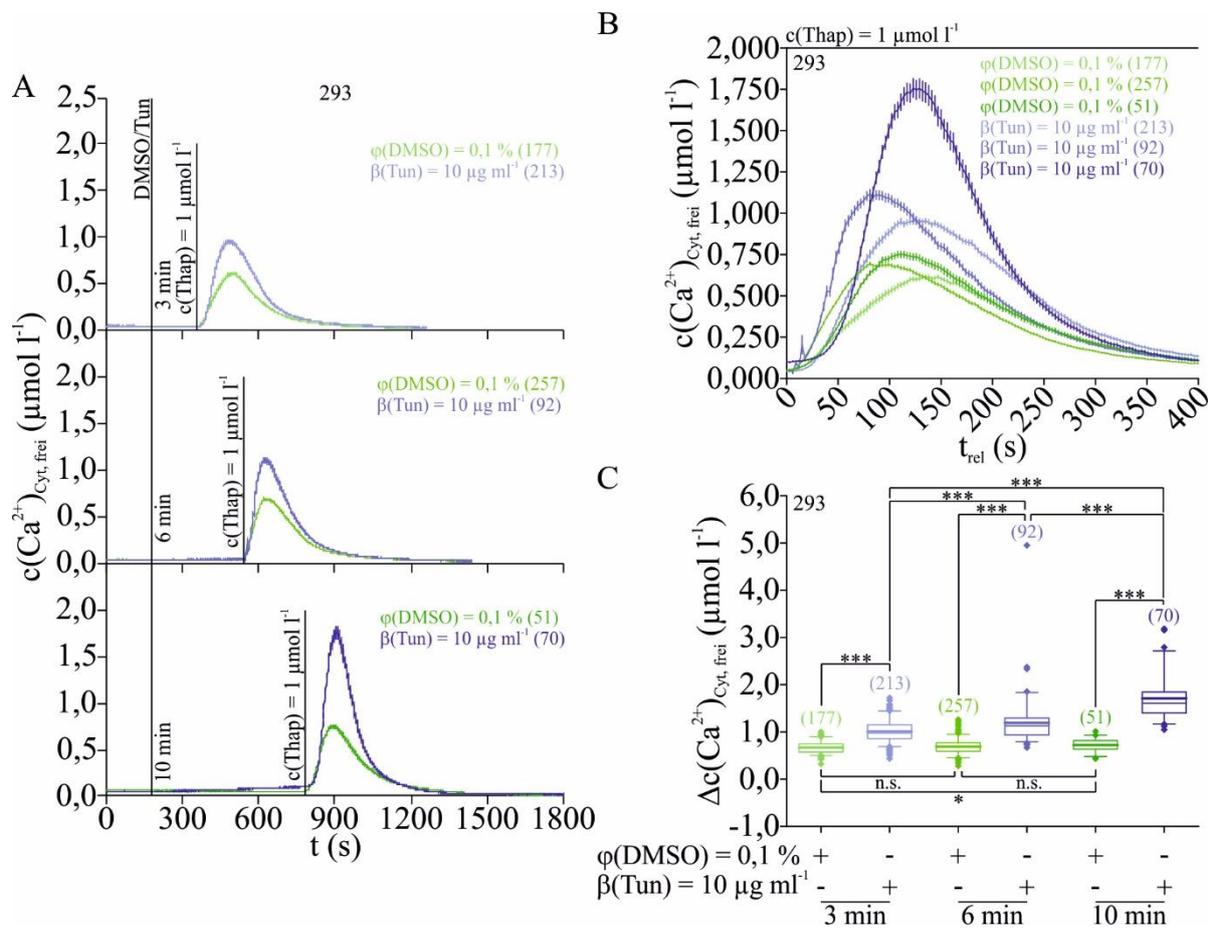


Abb. 19: Vorversuche zur Abschätzung der Tunicamycinkurzinkubationszeit in 293-Zellen

In A, B und C: Grüntöne DMSO, Blautöne Tunicamycin. A, B: Meßprotokoll (24 h nach Trypsinierung/Ausplattierung): (1.) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 3 min, 6 min und 10 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $\varphi(\text{DMSO}) = 0,2 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 20 \mu\text{g ml}^{-1}$) (3.) 24 min, 21 min und 17 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 600 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \mu\text{mol l}^{-1}$) (4.) $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(t = 6 \text{ min}, 9 \text{ min}, 13 \text{ min})$. (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, $t(\text{Belichtung}) = 25 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 0,3 \text{ Hz}$, Pixelbinning = $2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in 2,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). Dargestellt ist $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} \text{arithm} \pm s(c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} \text{arithm})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) in Abhängigkeit von t (s). B: Zusammenstellung der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} \text{arithm} \pm s(c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} \text{arithm})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) aus A in Abhängigkeit von t_{rel} (s); $t_{\text{rel}}(0 \text{ s}) \hat{=}$ Thapsigarginapplikationszeitpunkt. C: $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) in Abhängigkeit von der Kurzinkubationszeit (3 min, 6 min, 10 min). Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} . KST, TT; $p \geq 0,050 \hat{=}$ n.s., $0,010 \leq p < 0,050 \hat{=}$ *, $p < 0,001 \hat{=}$ ***. + Substanz vorhanden, - Substanz nicht vorhanden. (·): Zellzahl.

$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ wies eine direkte Proportionalität zur Tunicamycininkubationszeit auf: $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (\text{DMSO}) < \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (\text{Tun})$ (alle $p < 0,001$), $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (\text{Tun, 3 min}) < \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (\text{Tun, 6 min}) < \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (\text{Tun, 10 min})$ (alle $p < 0,001$) (Abb. 19 C). Darauf basierend wurde für die Hautfibroblasten eine Tunicamycininkubationszeit von 5 min gewählt (Kurzzeit-ER-Streß). Die Tunicamycinlanginkubationszeit betrug 24 h (Langzeit-ER-Streß). Analysiert wurden $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (Abb. 20), sowie z_0 und $\tau_{\text{V}_{\text{Ca}^{2+}} (\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ (Abb. 21).

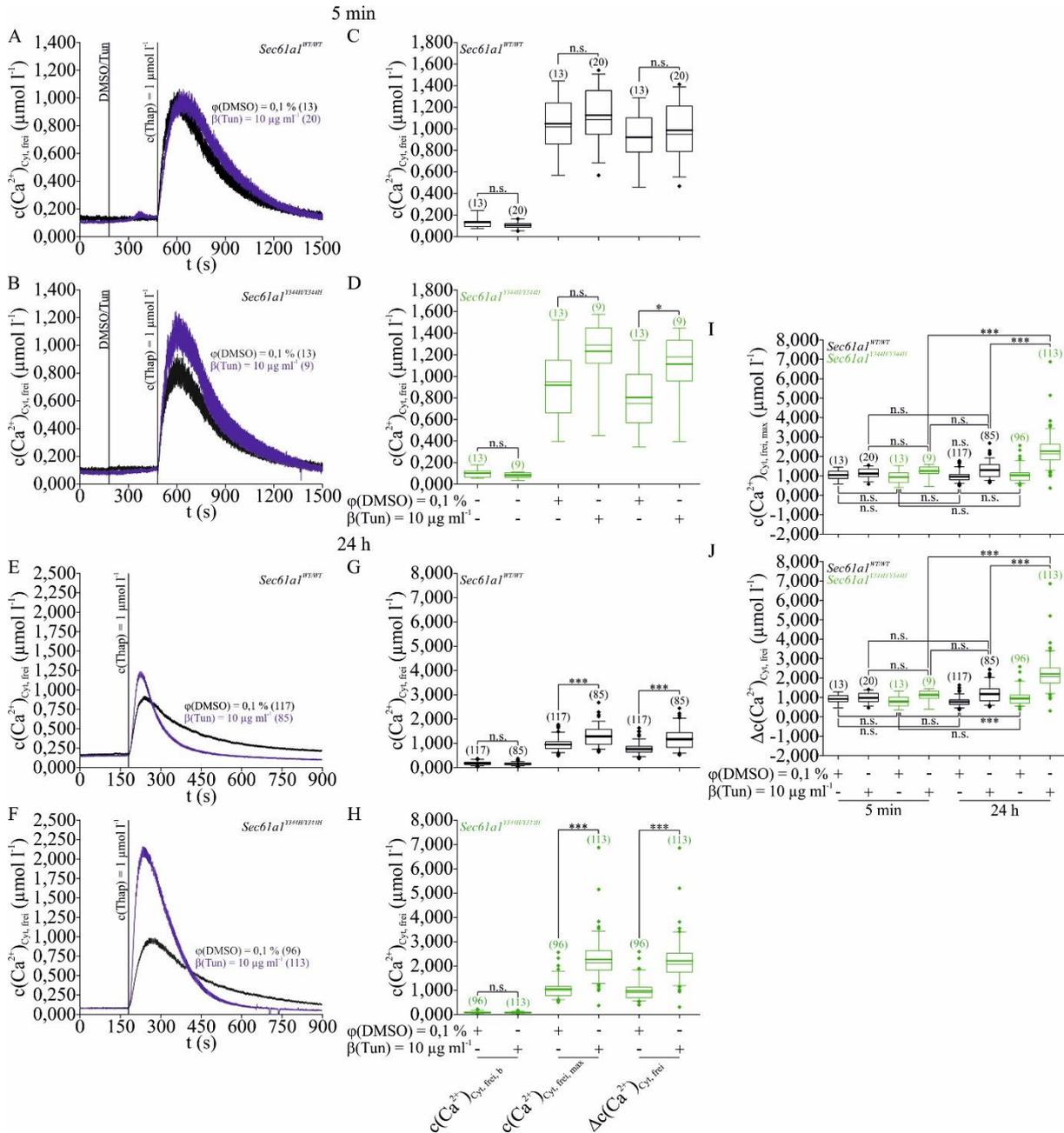


Abb. 20: Tunicamycininduzierter Kurz- und Langzeit-ER-Streß in Hautfibroblasten. In A, B, E und F: DMSO schwarz, Tunicamycin blau. In C, D, G, H, I und J

Sec61a1^{WT/WT} schwarz, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} grün. A, B: Meßprotokoll (2 d nach Trypsinierung/Ausplattierung): (1.) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) (2.) 5 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $\phi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $\phi(\text{DMSO}) = 0,2 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 20 \mu\text{g ml}^{-1}$) (3.) 17 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 600 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \mu\text{mol l}^{-1}$). (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, t (Belichtung) = 25 ms, f (Bild) = 0,3 Hz, Pixelbinning = 2 · 2, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit

Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) in Abhängigkeit von t (s). C, D: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (DMSO) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (Tun), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (DMSO) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (Tun) und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (DMSO) vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (Tun) innerhalb eines Hautfibroblastentyps unter Kurzzeit-ER-Streß. *Sec61a1*^{WT/WT} C, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} D. Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} . TT, KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $0,010 \leq p < 0,050 \hat{=} *$. + Substanz vorhanden, - Substanz nicht vorhanden. E, F: Meßprotokoll (1 d nach Trypsinierung/Ausplattierung): (1.) 24 h $\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in DMEM (Hautfibroblasten) ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% $\text{CO}_2/95 \%$ O_2) (2.) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l}$ $0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung) (3.) 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l}$ $0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung mit $c(\text{Thap}) = 2 \mu\text{mol l}^{-1}$) (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = $327,0 \text{ nm}$ bis $353,0 \text{ nm}$, λ_{ex2} -Bereich = $381,5 \text{ nm}$ bis $392,5 \text{ nm}$, λ_{em} -Bereich = $470,0 \text{ nm}$ bis $550,0 \text{ nm}$, $t(\text{Belichtung}) = 25 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 0,3 \text{ Hz}$, Pixelbinning = $2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}$ -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) in Abhängigkeit von t (s). G, H: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (DMSO) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (Tun), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (DMSO) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (Tun) und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (DMSO) vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (Tun) innerhalb eines Hautfibroblastentyps unter Langzeit-ER-Streß. *Sec61a1*^{WT/WT} G, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} H. Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} . TT, KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $p < 0,001 \hat{=} ***$. + Substanz vorhanden, - Substanz nicht vorhanden. I, J: Vergleich von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (I) bzw. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (J) zwischen den Hautfibroblastentypen bzw. zwischen Kurz- und Langzeit-ER-Streß. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, Tun), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, Tun). Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} . TT, KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $p < 0,001 \hat{=} ***$. + Substanz vorhanden, - Substanz nicht vorhanden. (·): Zellzahl.

Tab. 31 fasst die Relationen in den Diagrammen C, D, G und H, Tab. 32 die Relationen in den Diagrammen I und J aus (Abb. 20) zusammen.

Tab. 31: Relationen zwischen und p-Werte für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (DMSO) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (Tun), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (DMSO) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (Tun) und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (DMSO) vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (Tun) innerhalb eines Hautfibroblastentyps unter tunicamycininduziertem Kurz- und Langzeit-ER-Streß aus Abb. 20 C, D, G und H

$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$	Relation	$\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$	p-Wert
5 min			
<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}			
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	≈	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	$\geq 0,050$
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	≈	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	$\geq 0,050$
$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	≈	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	$\geq 0,050$
<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}			
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	≈	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	$\geq 0,050$
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	≈	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	$\geq 0,050$
$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	<	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	$0,010 \leq p < 0,050$
24 h			
<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}			
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	≈	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	$\geq 0,050$
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	<	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	$< 0,001$
$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	<	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	$< 0,001$
<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}			
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	≈	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$	$\geq 0,050$
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	<	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	$< 0,001$
$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	<	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	$< 0,001$

Tab. 32: Vergleich von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (Abb. 20 I) bzw. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (Abb. 20 J) zwischen den Hautfibroblastentypen bzw. zwischen tunicamycininduziertem Kurz- und Langzeit-ER-Streß
 (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, Tun). Rel Relation, $\approx \hat{=}$ $p \geq 0,050$, $< \hat{=}$ $p < 0,001$.

	5 min				24 h	
	<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	Rel	<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	Rel	<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}
$\phi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$						
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	\approx	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	\approx	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	\approx	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$
$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	\approx	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	\approx	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	$<$	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$
$\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$						
$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	\approx	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	\approx	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$	$<$	$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$
$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	\approx	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	\approx	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$	$<$	$\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$

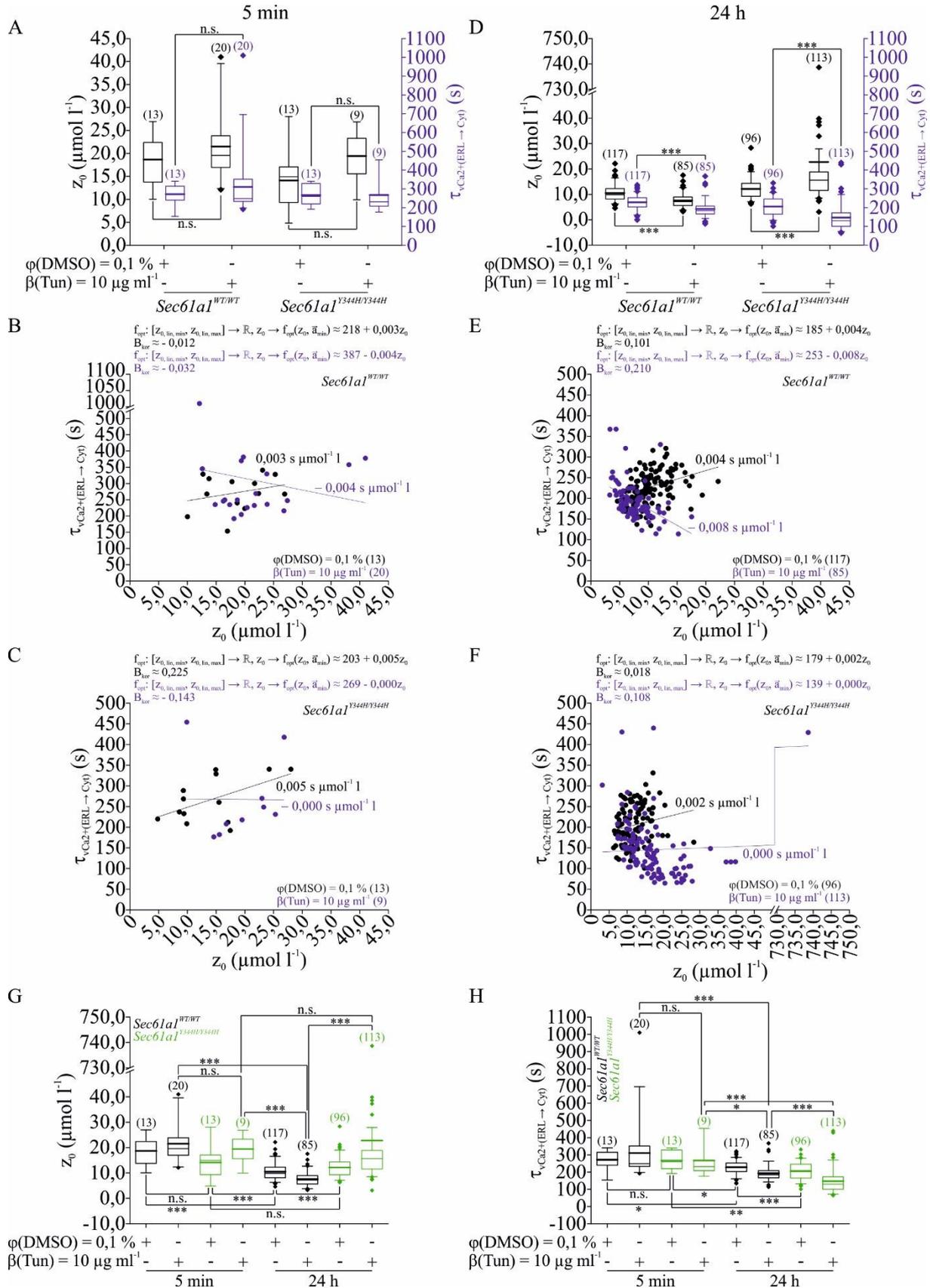


Abb. 21: z_0 und $\tau_{v\text{Ca}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ unter tunicamycininduziertem Kurz- und Langzeit-ER-Streß

z_0 und $\tau_{v\text{Ca}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ wurden unter Verwendung von $[\hat{a}_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})]_{\text{arithm}}$ (Abb. 17 H) wie in 4.2.3.10.3 und 5.2.2 beschrieben bzw. in Abb. 18 dargestellt ermittelt. A, D: z_0 ($\phi(\text{DMSO}) = 0,1\%$) ($\mu\text{mol l}^{-1}$) vs. z_0 ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$) ($\mu\text{mol l}^{-1}$), $\tau_{v\text{Ca}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ ($\phi(\text{DMSO}) = 0,1\%$) (s) vs. $\tau_{v\text{Ca}^{2+}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$) (s) bei einer

Tunicamycininkubationszeit von 5 min (A) bzw. 24 h (D) innerhalb eines Hautfibroblastentyps. Kasten: IQR mit $\bar{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\bar{x}_{0,05}$ bis $\bar{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\bar{x}_{0,75}$ bis $\bar{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\bar{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\bar{x}_{0,95}$ bis x_{max} . KST, TT; $p \geq 0,050 \hat{=} n.s.$, $p < 0,001 \hat{=} ***$. + Substanz vorhanden, - Substanz nicht vorhanden. B: $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ (s) in Abhängigkeit von z_0 ($\mu\text{mol l}^{-1}$) mit einfacher linearer Anpassung (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min): $f_{opt}: [z_0, \text{lin, min, } z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{opt}(z_0, \vec{a}_{min}) \approx 218 + 0,003z_0$ (Änderungsrate: $0,003 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$) mit $B_{kor} \approx -0,012$ ($\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$) und $f_{opt}: [z_0, \text{lin, min, } z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{opt}(z_0, \vec{a}_{min}) \approx 387 - 0,004z_0$ (Änderungsrate: $-0,004 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$) mit $B_{kor} \approx -0,032$ ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$). C: $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ (s) in Abhängigkeit von z_0 ($\mu\text{mol l}^{-1}$) mit einfacher linearer Anpassung (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min): $f_{opt}: [z_0, \text{lin, min, } z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{opt}(z_0, \vec{a}_{min}) \approx 203 + 0,005z_0$ (Änderungsrate: $0,005 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$) mit $B_{kor} \approx 0,225$ ($\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$) und $f_{opt}: [z_0, \text{lin, min, } z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{opt}(z_0, \vec{a}_{min}) \approx 269 - 0,000z_0$ (Änderungsrate: $-0,000 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$) mit $B_{kor} \approx -0,143$ ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$). E: $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ (s) in Abhängigkeit von z_0 ($\mu\text{mol l}^{-1}$) mit einfacher linearer Anpassung (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h): $f_{opt}: [z_0, \text{lin, min, } z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{opt}(z_0, \vec{a}_{min}) \approx 185 + 0,004z_0$ (Änderungsrate: $0,004 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$) mit $B_{kor} \approx 0,101$ ($\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$) und $f_{opt}: [z_0, \text{lin, min, } z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{opt}(z_0, \vec{a}_{min}) \approx 253 - 0,008z_0$ (Änderungsrate: $-0,008 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$) mit $B_{kor} \approx 0,210$ ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$). F: $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ (s) in Abhängigkeit von z_0 ($\mu\text{mol l}^{-1}$) mit einfacher linearer Anpassung (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h): $f_{opt}: [z_0, \text{lin, min, } z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{opt}(z_0, \vec{a}_{min}) \approx 179 + 0,002z_0$ (Änderungsrate: $0,002 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$) mit $B_{kor} \approx 0,018$ ($\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$) und $f_{opt}: [z_0, \text{lin, min, } z_0, \text{lin, max}] \rightarrow \mathbb{R}, z_0 \rightarrow f_{opt}(z_0, \vec{a}_{min}) \approx 139 + 0,000z_0$ (Änderungsrate: $0,000 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$) mit $B_{kor} \approx 0,108$ ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$). G, H: Vergleich von z_0 (G) bzw. $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ (H) zwischen den Hautfibroblastentypen bzw. zwischen Kurz- und Langzeit-ER-Streß. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, Tun), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, Tun). Kasten: IQR mit $\bar{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\bar{x}_{0,05}$ bis $\bar{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\bar{x}_{0,75}$ bis $\bar{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\bar{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\bar{x}_{0,95}$ bis x_{max} . TT, KST; $p \geq 0,050 \hat{=} n.s.$, $0,010 \leq p < 0,050 \hat{=} *$, $0,001 \leq p < 0,010 \hat{=} **$, $p < 0,001 \hat{=} ***$. + Substanz vorhanden, - Substanz nicht vorhanden. (·): Zellzahl.

Tab. 33 gibt die Zahlenwerte für $\overline{z_0}_{arithm} \pm s(\overline{z_0}_{arithm})$, $\overline{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}_{arithm} \pm s(\overline{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}_{arithm})$ und die Änderungsraten der Diagramme A, B, C, D, E und F aus Abb. 21 mit korrespondierenden Relationen an. Mit Änderungsraten von $-0,008 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$ bis $0,005 \text{ s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$ ist eine einfache lineare Korrelation zwischen z_0 und $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ auszuschließen.

Tab. 33: $\overline{z_0}_{arithm} \pm s(\overline{z_0}_{arithm})$, $\overline{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}_{arithm} \pm s(\overline{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}_{arithm})$ und Änderungsraten der Diagramme A, B, C, D, E und F aus Abb. 21 mit korrespondierenden Relationen (Rel)
 $\approx \hat{=} p \geq 0,050$; $<$, $> \hat{=} p < 0,001$; ⁽¹⁾ kein Bezug zum p-Wert

<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}			<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}		
$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$	Rel	$\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$	$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$	Rel	$\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$
$\overline{z_0}_{arithm} \pm s(\overline{z_0}_{arithm})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)					
5 min					
18,666 ± 1,437	≈	21,499 ± 1,658	14,120 ± 1,829	≈	19,424 ± 1,876
24 h					
10,509 ± 0,283	>	7,583 ± 0,299	12,160 ± 0,387	<	22,772 ± 6,422
$\overline{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}_{arithm} \pm s(\overline{\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}}_{arithm})$ (s)					
5 min					
272 ± 16	≈	310 ± 39	267 ± 15	≈	267 ± 33
24 h					
228 ± 4	>	193 ± 5	206 ± 5	>	147 ± 7
Änderungsrate (s $\mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$)					
5 min					
0,003	> ⁽¹⁾	-0,004	0,005	> ⁽¹⁾	-0,000
24 h					
0,004	> ⁽¹⁾	-0,008	0,002	> ⁽¹⁾	0,000

Tab. 34 fasst die Relationen in den Diagrammen G und H aus Abb. 21 zusammen.

Tab. 34: Vergleich von z_0 (Abb. 21 G) bzw. $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$ (Abb. 21 H) zwischen den Hautfibroblastentypen bzw. zwischen tunicamycininduziertem Kurz- und Langzeit-ER-Streß

(*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, DMSO) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, DMSO), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun), (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 5 min, Tun) vs. (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun), (*Sec61a1*^{WT/WT}, 24 h, Tun) vs. (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, 24 h, Tun). Rel Relation; $\approx \hat{=} p \geq 0,050$; $<$, $> \hat{=} p < 0,001$; ⁽¹⁾ $\hat{=} 0,010 \leq p < 0,050$.

5 min		24 h				
<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	Rel	<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	Rel	<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	Rel	<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}
$\phi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$						
z_0	\approx	z_0	$>$	z_0	$<$	z_0
$\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$	\approx	$\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$	$>^{(1)}$	$\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$	$>$	$\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$
$\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$						
z_0	\approx	z_0	$>$	z_0	$<$	z_0
$\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$	\approx	$\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$	$>^{(1)}$	$\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$	$>$	$\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$

Zusammenfassung (5.2.2.3): Tunicamycininduzierter Kurzzeit-ER-Streß (5 min) führte nur bei *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten zu einer Änderung bzw. Erhöhung der $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ ($0,010 \leq p < 0,050$), während tunicamycininduzierter Langzeit-ER-Streß (24 h) sowohl bei *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten als auch bei *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten eine Erhöhung von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ hervorrief ($p < 0,001$), die bei Zellen mit *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Mutation stärker ausgeprägt war, als bei Wildtypzellen ($p < 0,001$). Weiterhin führte die 24-stündige Tunicamycinbehandlung der *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten zu einer Erniedrigung von $\tau_{v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)}$, die wiederum bei Zellen mit *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Mutation stärker ausgeprägt war, als bei Wildtypzellen ($p < 0,001$), d.h. die Kinetik der $v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)$ war deutlich schneller. Somit rief tunicamycininduzierter Langzeit-ER-Streß bei *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten starke Änderungen des thapsigarginvermittelten Ca^{2+} -Signals in puncto Amplitude und Kinetik der $v_{Ca^{2+}}(ERL \rightarrow Cyt)$ hervor.

5.3 Analyse des ionomycininduzierten Fura-2-Signals zur Bestimmung der maximalen Menge an aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern mobilisierbaren Ca^{2+} -Kationen

Um die maximale Änderung der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ nach Mobilisierung der Ca^{2+} -Kationen aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (perinucleärer Raum (permanent), ER (permanent), Golgi-Apparat (permanent), Mitochondrium (transient) usw.) zu analysieren, wurden $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ in Gegenwart von Ionomycin gemäß folgendem Meßprotokoll (1 d nach Trypsinierung/Ausplattierung) bestimmt (Abb. 22):

- 24 h $\phi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in DMEM (Hautfibroblasten) ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % $\text{CO}_2/95 \text{ } \%$ O_2) (Abb. 22 D, E, G und H)
- (Abb. 22 A und B: Start ab hier) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung)

3. 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$)

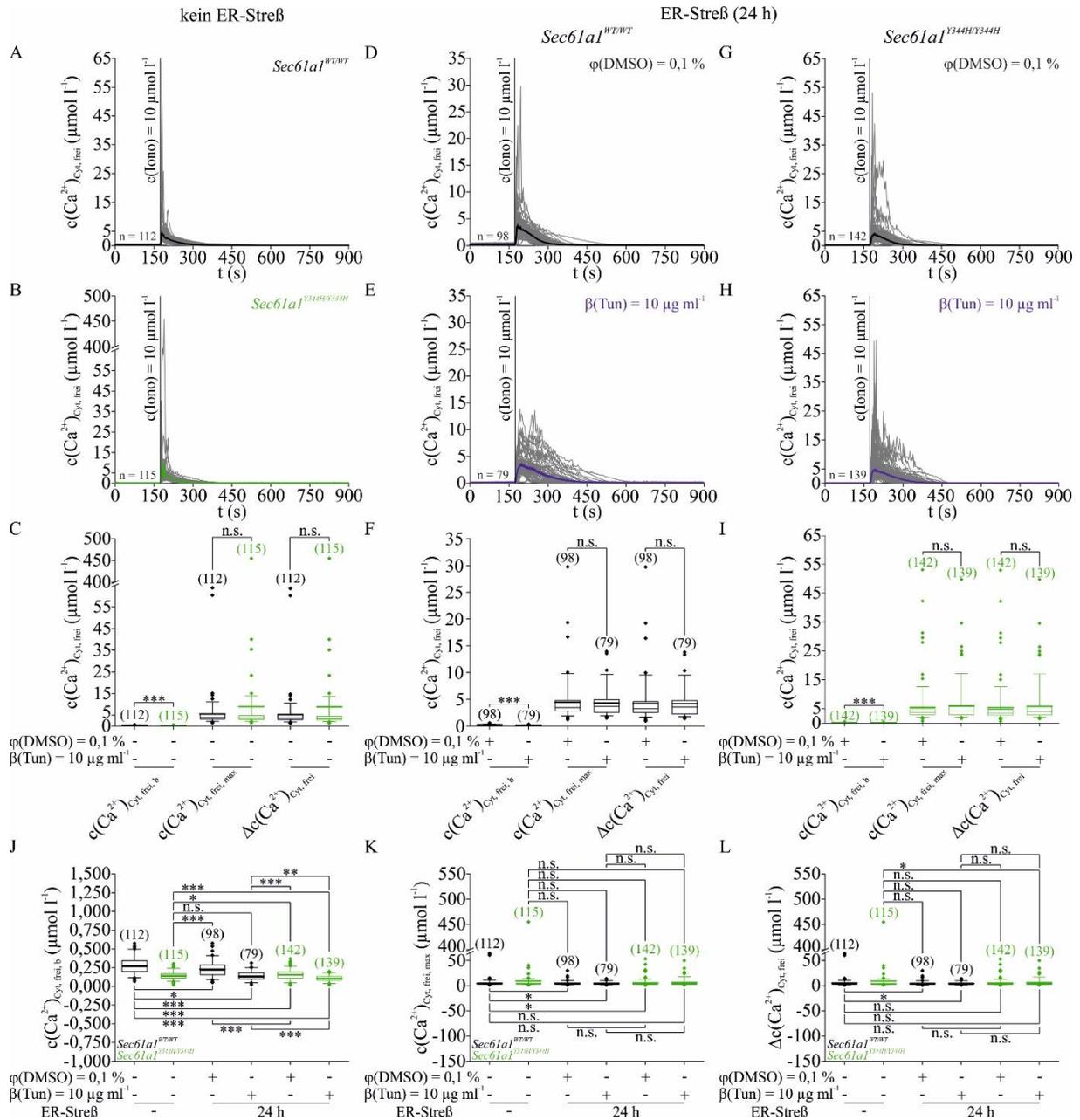


Abb. 22: Ionomycininduzierte Fura-2-Signale zur Bestimmung der maximalen Menge an aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern mobilisierbaren Ca^{2+} -Kationen

In A, B, C, F, I, J, K und L: *Sec61a1*^{WT/WT} schwarz, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} grün. A, B, D, E, G, H: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) in Abhängigkeit von t (s). Meßprotokoll (1 d nach Trypsinierung/Ausplattierung) bestimmt: (1.) 24 h $\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in DMEM (Hautfibroblasten) (37 °C, 5 % $\text{CO}_2/95 \%$ O_2) (D, E, G und H) (2.) (A und B: Start ab hier) 3 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ (300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung) (3.) 12 min $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{EZR}} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(\text{Iono}) = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: 300 μl 0,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung mit $c(\text{Iono}) = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$). (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, $t(\text{Belichtung}) = 25 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 0,3 \text{ Hz}$, Pixelbinning = $2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in 2,0 mmol l^{-1} - Ca^{2+} -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). Ca^{2+} -Signale einzelner Hautfibroblasten dünne graue Linien, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ arithm $\pm s(c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}})$ dicke schwarze/grüne/blau Linien. n: Zellzahl. C, F, I: $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$; $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ für $t = 100 \text{ s}$ bis 177 s , $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$: absolutes Maximum des globalen Maximalpunkts, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} = c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} - c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ ($t = 180 \text{ s}$). Vergleich (C): $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}), $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}). Vergleich (F): $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (*Sec61a1*^{WT/WT}),

$c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} (Sec61a1^{WT/WT})$ vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} (Sec61a1^{WT/WT})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (Sec61a1^{WT/WT})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (Sec61a1^{WT/WT})$. Vergleich (I): $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}} (Sec61a1^{Y344H/Y344H})$ vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}} (Sec61a1^{Y344H/Y344H})$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} (Sec61a1^{Y344H/Y344H})$ vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} (Sec61a1^{Y344H/Y344H})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (Sec61a1^{Y344H/Y344H})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (Sec61a1^{Y344H/Y344H})$. J, K, L: Vergleich der Werte für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (J), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (K) und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (L) untereinander: $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ ohne DMSO/Tun})$ vs. $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ DMSO (24 h)})$, $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ ohne DMSO/Tun})$ vs. $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ Tun (24 h)})$, $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ ohne DMSO/Tun})$ vs. $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ DMSO (24 h)})$, $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ DMSO (24 h)})$, $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ ohne DMSO/Tun})$ vs. $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ Tun (24 h)})$, $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ ohne DMSO/Tun})$ vs. $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ DMSO (24 h)})$, $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ ohne DMSO/Tun})$ vs. $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ Tun (24 h)})$, $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ ohne DMSO/Tun})$ vs. $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ DMSO (24 h)})$, $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ ohne DMSO/Tun})$ vs. $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ Tun (24 h)})$, $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ DMSO (24 h)})$ vs. $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ DMSO (24 h)})$, $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ Tun (24 h)})$ vs. $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ Tun (24 h)})$, $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ Tun (24 h)})$ vs. $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ DMSO (24 h)})$, $(Sec61a1^{WT/WT}, \text{ Tun (24 h)})$ vs. $(Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ Tun (24 h)})$. Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} . KST, TT; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $0,010 \leq p < 0,050 \hat{=} *$, $0,001 \leq p < 0,010 \hat{=} **$, $p < 0,001 \hat{=} ***$. + Substanz vorhanden, - Substanz nicht vorhanden. (·): Zellzahl.

Die Zahlenwerte für $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}})$, $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max arithm}}})$ und $\overline{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \pm s(\overline{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}})$ der Diagramme C, J, K und L aus Abb. 22 mit korrespondierenden Relationen und p-Werten sind Tab. 35 zu entnehmen.

Tab. 35: Zahlenwerte für $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}})$, $\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max arithm}}})$ und $\overline{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \pm s(\overline{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}})$ der Diagramme C, J, K und L aus Abb. 22 mit korrespondierenden Relationen (Rel) und p-Werten

	<i>Sec61a1</i> ^{WT/WT}	Rel	<i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H}	p-Wert
$\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}}})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)				
ohne				
$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \text{ \%}/\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$	0,267 ± 0,010	>	0,141 ± 0,005	< 0,001
$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \text{ \% (24 h)}$	0,228 ± 0,010	>	0,154 ± 0,005	< 0,001
$\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1} (24 \text{ h})$	0,136 ± 0,007	>	0,107 ± 0,003	< 0,001
$\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max arithm}}} \pm s(\overline{c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max arithm}}})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)				
ohne				
$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \text{ \%}/\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$	5,521 ± 0,755	≈	8,973 ± 3,942	≥ 0,050
$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \text{ \% (24 h)}$	4,430 ± 0,374	≈	5,407 ± 0,567	≥ 0,050
$\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1} (24 \text{ h})$	4,305 ± 0,286	≈	5,881 ± 0,538	≥ 0,050
$\overline{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}} \pm s(\overline{\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}})$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)				
ohne				
$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \text{ \%}/\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$	5,251 ± 0,755	≈	8,837 ± 3,943	≥ 0,050
$\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \text{ \% (24 h)}$	4,199 ± 0,376	≈	5,254 ± 0,568	≥ 0,050
$\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1} (24 \text{ h})$	4,166 ± 0,286	≈	5,772 ± 0,539	≥ 0,050

Zusammenfassung (5.3): Mit Ausnahme von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} (Sec61a1^{WT/WT}, \text{ ohne DMSO/Tun}) > c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} (Sec61a1^{WT/WT}, \text{ DMSO (24 h)})$ ($0,010 \leq p < 0,050$), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} (Sec61a1^{WT/WT}, \text{ ohne DMSO/Tun}) > c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}} (Sec61a1^{WT/WT}, \text{ Tun (24 h)})$ ($0,010 \leq p < 0,050$), $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (Sec61a1^{WT/WT}, \text{ ohne DMSO/Tun}) > \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (Sec61a1^{WT/WT}, \text{ DMSO (24 h)})$ ($0,010 \leq p < 0,050$) und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ ohne DMSO/Tun}) > \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}} (Sec61a1^{Y344H/Y344H}, \text{ Tun (24 h)})$ ($0,010 \leq p < 0,050$) war kein Unterschied zwischen den Werten für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ bzw. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ festzustellen (alle $p \geq 0,050$). Die Menge an Ca^{2+} -Kationen, die durch Ionomycin aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern mobilisiert werden konnte, war ohne und unter Langzeit-ER-Streßbedingungen (24 h) in *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten gleich.

5.4 Pharmakologische Modulation der $v_{Ca^{2+}}(EMAR \rightarrow Cyt)$ durch Trifluoperazin

Zum Schluß erfolgte die pharmakologische Modulation der $v_{Ca^{2+}}(EMAR \rightarrow Cyt)$ durch den CALM-Inhibitor Trifluoperazin (TFP) mit der Intention die Inhibierung des Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol von cytosolischer Seite zu inhibieren (Disinhibition) (Lang, Schäuble *et al.*, 2011). Vorversuche in 293-Zellen zeigten, dass mit steigender $c(TFP)$ ($0,00 \mu\text{mol l}^{-1}$, $0,01 \mu\text{mol l}^{-1}$, $0,10 \mu\text{mol l}^{-1}$, $1,00 \mu\text{mol l}^{-1}$, $2,50 \mu\text{mol l}^{-1}$, $5,00 \mu\text{mol l}^{-1}$, $7,50 \mu\text{mol l}^{-1}$, $10,00 \mu\text{mol l}^{-1}$) die $\Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}$ stetig zunahm (Abb. 23 A, B). Ähnliches ergab sich u.a. für die Kinetik der $v_{Ca^{2+}}(EMAR \rightarrow Cyt)$ in Hautfibroblasten (Abb. 23 C, D). Meßprotokoll (1 d (293-Zellen) bzw. 2 d (Hautfibroblasten) nach Trypsinierung/ Ausplattierung):

- 3 min $c(Ca^{2+})_{EZR} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}\text{-Lösung}$)
- 12 min (293-Zellen) bzw. 27 min (Hautfibroblasten) $c(Ca^{2+})_{EZR} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(TFP) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1}/0,01 \mu\text{mol l}^{-1}/0,10 \mu\text{mol l}^{-1}/1,00 \mu\text{mol l}^{-1}/2,50 \mu\text{mol l}^{-1}/5,00 \mu\text{mol l}^{-1}/7,50 \mu\text{mol l}^{-1}/10,00 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}\text{-Lösung}$ mit $c(TFP) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1}/0,02 \mu\text{mol l}^{-1}/0,20 \mu\text{mol l}^{-1}/2,00 \mu\text{mol l}^{-1}/5,00 \mu\text{mol l}^{-1}/10,00 \mu\text{mol l}^{-1}/15,00 \mu\text{mol l}^{-1}/20,00 \mu\text{mol l}^{-1}$)

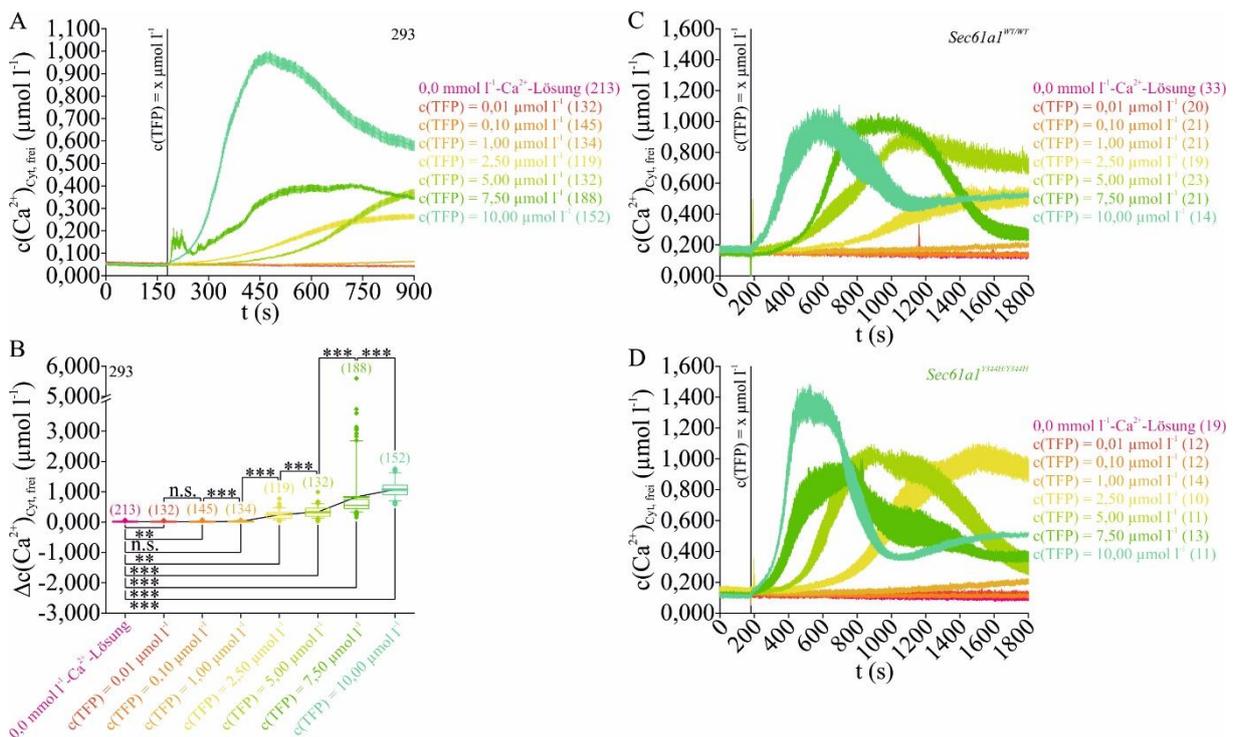


Abb. 23: Pharmakologische Modulation des Ca^{2+} -Flux vom endomembranabgegrenzten Raum ins Cytosol durch Trifluoperazin (TFP) in 293-Zellen und Hautfibroblasten

A, C, D: $c(Ca^{2+})_{Cyt, frei} (\mu\text{mol l}^{-1})$ in Abhängigkeit von $t (s)$, $\overline{c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}} \pm s(c(Ca^{2+})_{Cyt, frei})$. Meßprotokoll (1 d (293-Zellen) bzw. 2 d (Hautfibroblasten) nach Trypsinierung/Ausplattierung): (1.) 3 min $c(Ca^{2+})_{EZR} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$ ($300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}\text{-Lösung}$) (2.) 12 min (293-Zellen (A))/27 min (Hautfibroblasten (C, D)) $c(Ca^{2+})_{EZR} = 0 \text{ mmol l}^{-1}$, $c(TFP) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1}/0,01 \mu\text{mol l}^{-1}/0,10 \mu\text{mol l}^{-1}/1,00 \mu\text{mol l}^{-1}/2,50 \mu\text{mol l}^{-1}/5,00 \mu\text{mol l}^{-1}/7,50 \mu\text{mol l}^{-1}/10,00 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Applikation: $300 \mu\text{l } 0,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}\text{-Lösung}$ mit $c(TFP) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1}/0,02 \mu\text{mol l}^{-1}/0,20 \mu\text{mol l}^{-1}/2,00 \mu\text{mol l}^{-1}/5,00 \mu\text{mol l}^{-1}/10,00 \mu\text{mol l}^{-1}/15,00 \mu\text{mol l}^{-1}/20,00 \mu\text{mol l}^{-1}$). (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = $327,0 \text{ nm}$ bis $353,0 \text{ nm}$, λ_{ex2} -Bereich = $381,5 \text{ nm}$ bis $392,5 \text{ nm}$, λ_{emr} -Bereich = $470,0 \text{ nm}$ bis $550,0 \text{ nm}$, $t(\text{Belichtung}) = 25 \text{ ms}$, $f(\text{Bild}) = 0,3 \text{ Hz}$, $\text{Pixelbinning} = 2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}\text{-Ca}^{2+}\text{-Lösung}$, RT, 20 min, Dunkelheit). B: $\Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei} (\mu\text{mol l}^{-1})$ in Abhängigkeit von $c(TFP) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1}/0,01 \mu\text{mol l}^{-1}/0,10 \mu\text{mol l}^{-1}/1,00 \mu\text{mol l}^{-1}/2,50 \mu\text{mol l}^{-1}/5,00 \mu\text{mol l}^{-1}/7,50 \mu\text{mol l}^{-1}/10,00 \mu\text{mol l}^{-1}$. $\Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei} (c(TFP) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei} (c(TFP) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1})$

= 0,01 $\mu\text{mol l}^{-1}$), $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,10 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 1,00 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 5,00 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 7,50 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 10,00 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,01 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,10 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 0,10 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 1,00 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 1,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 5,00 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 5,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 7,50 \mu\text{mol l}^{-1})$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 7,50 \mu\text{mol l}^{-1})$ vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(c(\text{TFP}) = 10,00 \mu\text{mol l}^{-1})$. Kasten: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} . KST; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $0,001 \leq p < 0,010 \hat{=} **$, $p < 0,001 \hat{=} ***$. Schwarze Linie: Verbindung der $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}}$ (\cdot): Zellzahl.

Die den Diagrammen C und D (Abb. 23) entsprechenden TFP-induzierten Fura-2-Signale einzelner Hautfibroblasten wurden durch eine modifizierte binäre logistische Anpassungsfunktion analysiert (Abb. 24 A):

$$f_{\text{opt}}: [189 \text{ s}, t_{\text{max}}] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_2 + \frac{a_1 - a_2}{1 + \left(\frac{t}{t_{0,5a_2}}\right)^p} \quad (\text{Gl. 51}),$$

$$f_{\text{opt}}(189 \text{ s}) = a_1 \quad (\text{Gl. 52}) \quad (\text{Abb. 24 B}), \quad \lim_{t \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(t) = a_2 \quad (\text{Gl. 53})$$

$$(f_{\text{opt}}(t) = a_2 \quad (\text{Gl. 54}) \text{ Asymptote für } t \rightarrow \infty).$$

Da erst ab $c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1}$ aufwärts ein sigmoider Graphenverlauf zu verzeichnen war, wurden nur TFP-induzierte Fura-2-Signale für $c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1}/5,00 \mu\text{mol l}^{-1}/7,50 \mu\text{mol l}^{-1}/10,00 \mu\text{mol l}^{-1}$ ausgewertet. Um applikative Fura-2-Signalartefakte auszuschließen, wurde für t_{min} nicht der TFP-Applikationszeitpunkt $t = 180 \text{ s}$ sondern $t = 189 \text{ s}$ gewählt ($[189 \text{ s}, t_{\text{max}}]$). Für TFP-induzierte Fura-2-Signale, die während der Meßung nicht in ein Plateau mündeten galt $t_{\text{max}} = 1800 \text{ s}$, für TFP-induzierte Fura-2-Signale, die vor Meßende in ein Plateau mündeten, wurde das Fura-2-Signal kurz nach Erreichen des Plateaus an dieser Stelle trunziert und die logistische Funktion nur bis zu diesem Zeitpunkt angepaßt ($t_{\text{max}} < 1800 \text{ s}$) (vergl. Beispiel-Fura-2-Signal eines *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(\text{TFP}) = 7,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ in Abb. 24 A). Die abgeleiteten Variablen $0,2t_{\text{max}}$ und $0,8t_{\text{max}}$ ergaben sich durch:

$$t_{0,2a_2} = 10^{\log_{10}(t_{0,5a_2}) + \frac{\log_{10} 0,25}{p}} \quad (\text{Gl. 159})$$

$$t_{0,8a_2} = 10^{\log_{10}(t_{0,5a_2}) + \frac{\log_{10} 4}{p}} \quad (\text{Gl. 160})$$

(OriginLab, 2020). Da $f_{\text{opt}}(t) = a_2$ (Gl. 54) Asymptote für $t \rightarrow \infty$ ist, erfolgte eine Extrapolation zum Grenzwert $\lim_{t \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(t) = a_2$ (Gl. 53), woraus die teils hohen theoretischen Werte der Variablen a_2 (Abb. 24 C), $t_{0,2a_2}$ (Abb. 24 E), $t_{0,5a_2}$ (Abb. 24 F) und $t_{0,8a_2}$ (Abb. 24 G), insbesondere für Fura-2-Signale, die nur im exponentiellen Anfangsteil des logistischen Anpassungsgraphen verliefen, resultierten. Bei Fura-2-Signalen, die in ein Plateau mündeten galt somit $f(t_{\text{max}}) \approx a_2$. p (Abb. 24 D) ist ein Maß für die Steigung des logistischen Anpassungsgraphen. $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})$ ergab sich durch:

$$v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt}) = \frac{d}{dt} \left(a_2 + \frac{a_1 - a_2}{1 + \left(\frac{t}{t_{0,5a_2}}\right)^p} \right) \quad (\text{Gl. 161}) \quad \text{für } [189 \text{ s}, t_{\text{max}}]$$

(linke y-Achse in Abb. 24 A) mit

$$v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}} = \max((v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_t)_{t=189 \text{ s}, \dots, t_{\text{max}}}) \quad (\text{Gl. 162})$$

(Abb. 24 H).

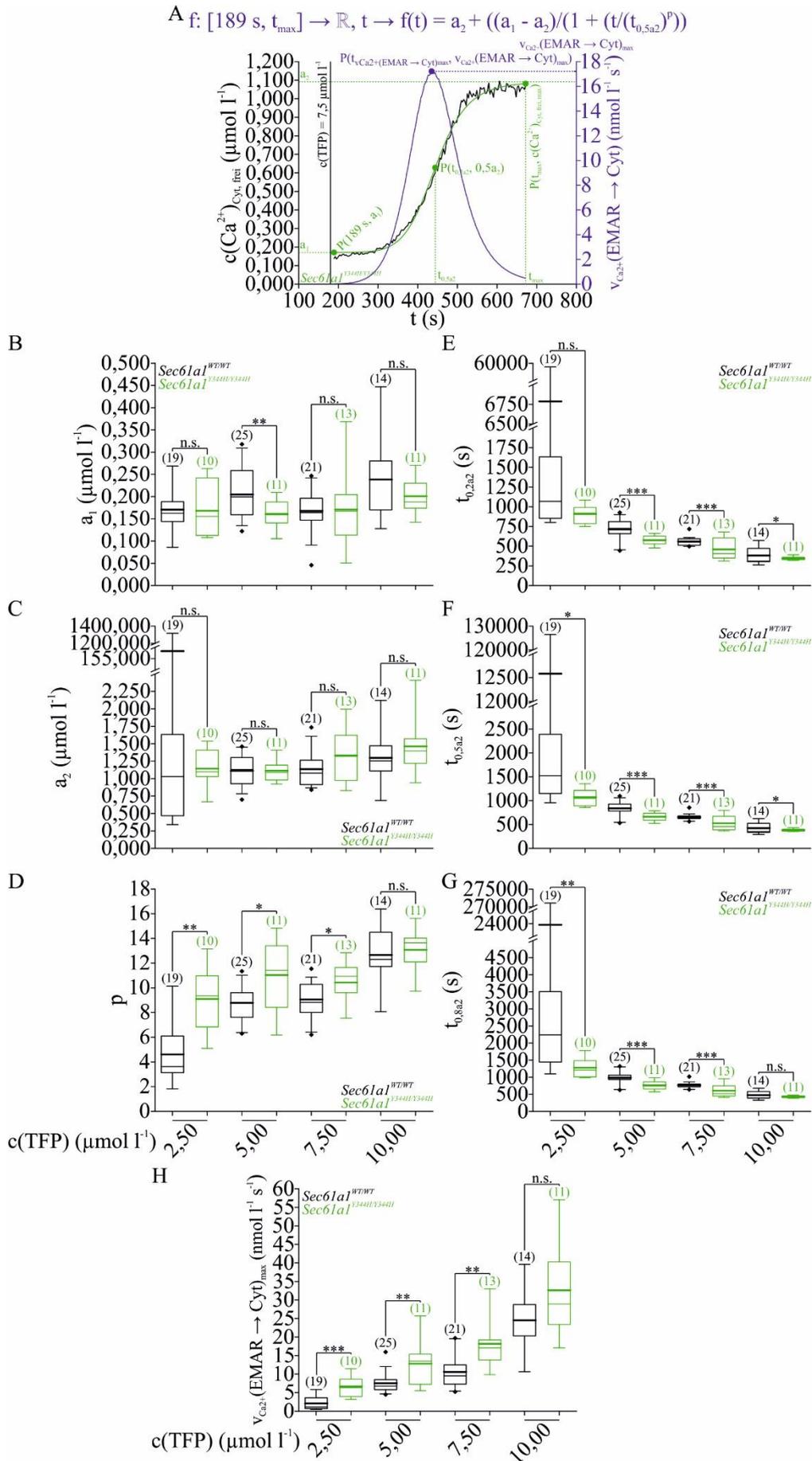


Abb. 24: Analyse der einzelnen TFP-induzierten Fura-2-Signale der Hautfibroblasten deren $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}} \pm s(c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}})$ in den Diagrammen C und D der Abb. 23 dargestellt sind

A: Analyse eines Beispiel-Fura-2-Signals eines *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(\text{TFP}) = 7,5 \mu\text{mol l}^{-1}$. (Systemeinstellung: λ_{ex1} -Bereich = 327,0 nm bis 353,0 nm, λ_{ex2} -Bereich = 381,5 nm bis 392,5 nm, λ_{em} -Bereich = 470,0 nm bis 550,0 nm, t (Belichtung) = 25 ms, f (Bild) = 0,3 Hz, Pixelbinning = $2 \cdot 2$, Vergr. 20-fach; Beladung der Hautfibroblasten mit Fura-2-AM: $c(\text{Fura-2-AM}) = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$ in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ - Ca^{2+} -Lösung, RT, 20 min, Dunkelheit). Modifizierte binäre logistische Anpassungsfunktion: $f_{\text{opt}}: [189 \text{ s}, t_{\text{max}}] \rightarrow \mathbb{R}, t \mapsto f_{\text{opt}}(t) = a_2 + \frac{a_1 - a_2}{1 + (\frac{t}{t_{0,5a_2}})^p}$ (Gl. 51), $f_{\text{opt}}(189 \text{ s}) = a_1$ (Gl. 52), $\lim_{t \rightarrow \infty} f_{\text{opt}}(t) = a_2$

(Gl. 53) ($f_{\text{opt}}(t) = a_2$ (Gl. 54) Asymptote für $t \rightarrow \infty$). $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$) (linke y-Achse) bzw. $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt}) = \frac{d}{dt} (a_2 + \frac{a_1 - a_2}{1 + (\frac{t}{t_{0,5a_2}})^p})$ (Gl. 161) ($\text{nmol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$) für $[189 \text{ s}, t_{\text{max}}]$ in Abhängigkeit von t (s). $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}} = \max(v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{t=189 \text{ s}, \dots, t_{\text{max}}})$. Zu Variablen gehörende Punkte: $P(189 \text{ s}, a_1)$, $P(t_{0,5a_2}, 0,5a_2)$, $P(t_{\text{max}}, c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}})$, $P(t_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}}, v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}})$. B, C, D, E, F, G, H: a_1 ($\mu\text{mol l}^{-1}$) (B), a_2 ($\mu\text{mol l}^{-1}$) (C), p (D), $t_{0,2a_2}$ (s) (E), $t_{0,5a_2}$ (s) (F), $t_{0,8a_2}$ (s) (G), $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}$ ($\text{nmol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (H) in Abhängigkeit von $c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1}/5,00 \mu\text{mol l}^{-1}/7,50 \mu\text{mol l}^{-1}/10,00 \mu\text{mol l}^{-1}$. Kästen: IQR mit $\tilde{x}_{0,50}$ (dünne Linie) und \bar{x}_{arithm} (dicke Linie); untere Antenne: $\tilde{x}_{0,05}$ bis $\tilde{x}_{0,25}$; obere Antenne: $\tilde{x}_{0,75}$ bis $\tilde{x}_{0,95}$; untere Rauten: x_{min} bis $\tilde{x}_{0,05}$; obere Rauten: $\tilde{x}_{0,95}$ bis x_{max} . KST, TT; $p \geq 0,050 \hat{=} \text{n.s.}$, $0,010 \leq p < 0,050 \hat{=} *$, $0,001 \leq p < 0,010 \hat{=} **$, $p < 0,001 \hat{=} ***$. *Sec61a1*^{WT/WT} schwarz, *Sec61a1*^{Y344H/Y344H} grün. (·): Zellzahl.

Mit Ausnahme von a_1 (*Sec61a1*^{WT/WT}, $c(\text{TFP}) = 5,00 \mu\text{mol l}^{-1}$) $>$ a_1 (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}, $c(\text{TFP}) = 5,00 \mu\text{mol l}^{-1}$) ($0,001 \leq p < 0,010$) gab es keinen Unterschied zwischen den Variablen a_1 und a_2 (alle $p \geq 0,050$). Für $t_{0,2a_2}$, $t_{0,5a_2}$ und $t_{0,8a_2}$ war mit steigender $c(\text{TFP})$ eine Abnahme der Werte für *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten zu beobachten, stets galt $t_{0,2/0,5/0,8a_2}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) > t_{0,2/0,5/0,8a_2}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ (alle mindestens $p < 0,050$) (Ausnahmen: $t_{0,2a_2}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}, c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1}) \approx t_{0,2a_2}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}, c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1})$, $t_{0,8a_2}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}, c(\text{TFP}) = 10,00 \mu\text{mol l}^{-1}) \approx t_{0,8a_2}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}, c(\text{TFP}) = 10,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ (beide $p \geq 0,050$)). p und $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}$ nahmen bei *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten mit steigender $c(\text{TFP})$ zu, es galt p bzw. $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) <$ p bzw. $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ (alle mindestens $p < 0,050$) (Ausnahmen: p bzw. $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}, c(\text{TFP}) = 10,00 \mu\text{mol l}^{-1}) \approx p$ bzw. $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}, c(\text{TFP}) = 10,00 \mu\text{mol l}^{-1})$ (beide $p \geq 0,050$)).

Zusammenfassung (5.4): Bei TFP-Applikation war die Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}$ der Zellen mit *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Mutation schneller als die der Wildtypzellen.

6 Diskussion

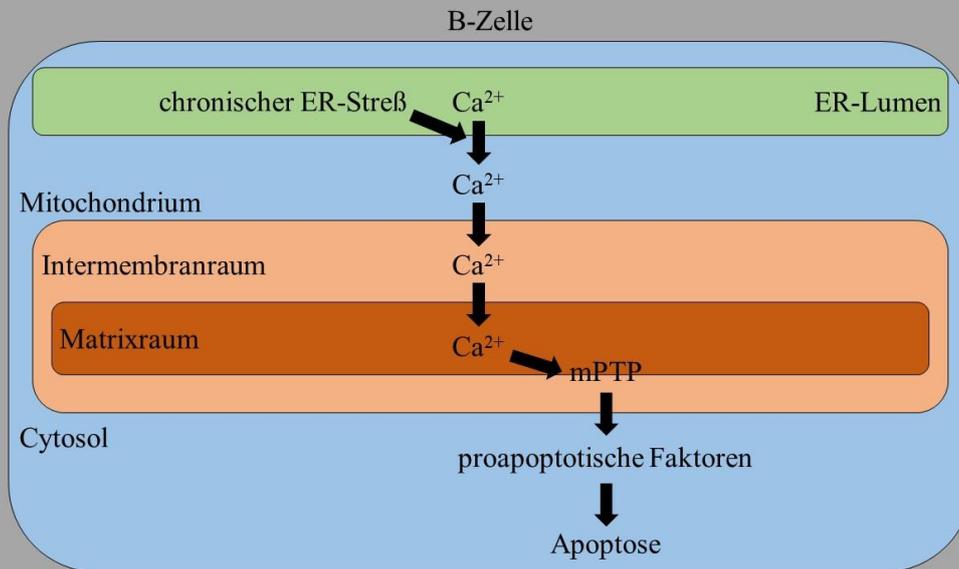
Mit $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{Cyt, frei, b arithm}} \approx 0,0963 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Abb. 7 A) und $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{ERL, frei, b arithm}} \approx 476,6 \mu\text{mol l}^{-1}/454,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Abb. 9 F) zeigten die Werte der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten lediglich in Bezug auf $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{Cyt, frei, b arithm}}$ einen Unterschied zu denen der *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten mit $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{Cyt, frei, b arithm}} \approx 0,1210 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Abb. 7 A) und $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{ERL, frei, b arithm}} \approx 476,6 \mu\text{mol l}^{-1}/454,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Abb. 9 F) ($c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) > c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($0,010 \leq p < 0,050$) (Abb. 7 B)). Alle Stoffmengenkonzentrationen der freien Ca^{2+} -Kationen lagen bei den in der Literatur beschriebenen Werten von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}} \approx 0,100 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Spannweite ca. $0,020 \mu\text{mol l}^{-1}$ bis $0,300 \mu\text{mol l}^{-1}$) und $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{ERL, frei, b}} \approx 500 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Spannweite ca. $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ bis $5000 \mu\text{mol l}^{-1}$) (Bootman und Bultynck, 2020; Bygrave und Benedetti, 1996; Meldolesi und Pozzan, 1998; Nakajima, Harada *et al.*, 1993; Westerblad und Allen, 1994; Helmchen, Imoto *et al.*, 1996; Kennedy und Thomas, 1996; Maravall, Mainen *et al.*, 2000). Auch war die Menge an Ca^{2+} -Kationen, die durch Ionomycin aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern mobilisiert werden konnte (sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter tunicamycininduzierten Langzeit-ER-Streßbedingungen ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$, 24 h)) in *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten gleich (Abb. 22). Aus $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{Cyt, frei, b arithm}}$ und $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{ERL, frei, b arithm}}$ ergaben sich $U(\text{Ca}^{2+})$ zu 105,3 mV bis 105,7 mV (*Sec61a1*^{WT/WT})/105,8 mV bis 107,5 mV (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) (Tab. 26) und $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ zu -69,6 J mol⁻¹ bis -69,3 J mol⁻¹ (*Sec61a1*^{WT/WT})/-70,7 J mol⁻¹ bis -69,6 J mol⁻¹ (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) (Tab. 28), d.h. die Werte der *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten waren kaum unterschiedlich. Mit annähernd gleichen Werten für $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{Cyt, frei, b arithm}}$, $\overline{c(\text{Ca}^{2+})}_{\text{ERL, frei, b arithm}}$, $U(\text{Ca}^{2+})$ und $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ stimmt die ER-Lumen \rightarrow Cyt-gerichtete elektrochemische Triebkraft des passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol in *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten überein, d.h. im Folgenden beschriebene Unterschiede im passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol (temporaler Verlauf des thapsigargininduzierten Ca^{2+} -Signals ($c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$, $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$, Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$) sind somit (höchstwahrscheinlich) auf die in (Schäuble, Lang *et al.*, 2012) beschriebene $K_d(\text{S7, HSPA5})$ -Abnahme bzw. die damit einhergehende Änderung in der Regulation des SEC61A1-Gatings (HSPA5 als allosterischer Inhibitor des SEC61A1 nach Proteinfreisetzung in ER-Lumen/ER-Membran) zurückzuführen. In der ER-GCaMP6-150-Konstrukt- Ca^{2+} -Bildgebung wies die normierte und durch Thapsigarginapplikation demaskierte $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv}}$ der *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten eine schnellere Kinetik als die der *Sec61a1*^{WT/WT}-Hautfibroblasten auf ($t_{90/50/37}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) > t_{90/50/37}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$), ein Unterschied, der mit Erhöhung von $c(\text{Thap}) = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ auf $c(\text{Thap}) = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$ geringer ausfiel (Abb. 11, Abb. 12). Dabei lies sich der $\frac{\Delta F}{\Delta F_{10}} \downarrow_{\text{passiv, tot dem}}$ (Abb. 13) in 88,9 % bis 90,9 % (*Sec61a1*^{WT/WT})/72,2 % bis 85,2 % (*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) der Einzelmessungen besser durch eine einfache exponentielle Anpassungsfunktion und in 9,1 % bis 11,1 % (*Sec61a1*^{WT/WT})/14,8 % bis 27,8 %

(*Sec61a1*^{Y344H/Y344H}) besser durch eine zweifache exponentielle Anpassungsfunktion charakterisieren (Tab. 29). Das biologische Korrelat der einfachen exponentiellen Anpassungsfunktion wäre 1 Pool an freien Ca²⁺-Kationen mit homogenen physikochemischen Eigenschaften im Rahmen des passiven Ca²⁺-Flux vom ER-Lumen ins Cytosol. Da eine zweifache exponentielle Anpassungsfunktion aus der Superposition zweier einfacher exponentieller Anpassungsfunktionen resultiert, entspräche das biologische Korrelat 2 distinkten Pools an freien Ca²⁺-Kationen mit jeweils homogenen physikochemischen Eigenschaften im Rahmen des passiven Ca²⁺-Flux vom ER-Lumen ins Cytosol, der eine schneller der andere (möglicherweise auf Grund von Bindung an Ca²⁺-Signalmodulatoren im ER-Lumen (siehe Tab. 10)) langsamer mobilisierbar, analogisch zum Poolmodell neuronaler synaptischer Vesikel mit schnell freisetzbarem Pool (RRP), Recyclingpool und Reservepool (Denker und Rizzoli, 2010). Bei der Komplementationsanalyse in (Schäuble, Lang *et al.*, 2012) kam es bei Komplementation mit SEC61A1^{Y344H} (verglichen mit der Komplementation durch SEC61A1) unter basalen Bedingungen zu einer (ca. 25 %-igen) Erhöhung des thapsigargininduzierten passiven Ca²⁺-Flux vom ER-Lumen ins Cytosol ($\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$), während die bei der Komplementation mit SEC61A1 zu beobachtende Erhöhung des thapsigargininduzierten passiven Ca²⁺-Flux vom ER-Lumen ins Cytosol ($\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$) unter Kurzzeit-ER-Streßbedingungen ($c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol l}^{-1}$ bzw. $\beta(\text{Tun}) = 10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 3 min) aufgehoben wurde. Die Primärzellen der C57BL/6J-*Sec61a1*^{m1Gek/J}-Maus (verglichen mit denen der C57BL/6J-Maus) zeigten ein anderes Antwortverhalten, dessen Ursache wahrscheinlich im verwendeten Modellsystem (HeLa-Zelle vs. Primärzelle) und experimentellen Ansatz (Komplementationsanalyse vs. C57BL/6J-*Sec61a1*^{m1Gek/J}-Maus) zu suchen ist, denn unter basalen Bedingungen war $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) > \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($0,001 \leq p < 0,010$) (Abb. 7 A, B) (bzw. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) \approx \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($p \geq 0,050$) (Abb. 20), wobei die in Abb. 7 aufgeführten Werte auf Grund der höheren Zellzahl statistisch mehr Aussagekraft besitzen) und unter Kurzzeit-ER-Streßbedingungen ($\beta(\text{Tun}) = 10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 5 min) war $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}}) \approx \Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($p \geq 0,050$) (Abb. 20). Durch die in 4.2.3.10.3 beschriebene Methode der $\tau_{\text{v}_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ -Bestimmung mittels Fura 2-Ca²⁺-Bildgebung ergab sich unter basalen Bedingungen mit $\overline{\tau_{\text{v}_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \text{ arithm} \pm s(\overline{\tau_{\text{v}_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \text{ arithm}) \approx 179 \text{ s} \pm 5 \text{ s}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}})/186 \text{ s} \pm 7 \text{ s}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($p \geq 0,050$) (Abb. 18 E, Tab. 30) und unter Kurzzeit-ER-Streßbedingungen ($\beta(\text{Tun}) = 10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 5 min) mit $\overline{\tau_{\text{v}_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \text{ arithm} \pm s(\overline{\tau_{\text{v}_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \text{ arithm}) \approx 310 \text{ s} \pm 39 \text{ s}(\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}})/267 \text{ s} \pm 33 \text{ s}(\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($p \geq 0,050$) (Abb. 21 A, H; Tab. 33; Tab. 34) kein Unterschied zwischen den Werten der *Sec61a1*^{WT/WT}- und *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten. Tunicamycininduzierter Langzeit-ER-Streß ($\beta(\text{Tun}) = 10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 24 h), der in Bezug auf *Sec61a1*^{Y344H} bis jetzt nicht untersucht wurde, rief hingegen sowohl bei *Sec61a1*^{WT/WT}- Hautfibroblasten als auch bei *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Hautfibroblasten eine Erhöhung von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ hervor ($p < 0,001$), die bei Zellen mit *Sec61a1*^{Y344H/Y344H}-Mutation stärker ausgeprägt war, als bei Wildtypzellen ($p < 0,001$) (Abb. 20). Zusätzlich führte

tunicamycininduzierter Langzeit-ER-Streß ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$, 24 h) (verglichen mit den Kontrollmessungen ($\varphi(\text{DMSO}) = 0,1 \%$, 24 h)) zu einer Erniedrigung von $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$, die mit $\overline{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \text{ arithm} \pm s(\overline{\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}} \text{ arithm}) \approx 193 \text{ s} \pm 5 \text{ s} (\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}})/147 \text{ s} \pm 7 \text{ s} (\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($p < 0,001$) bei Zellen mit $\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$ -Mutation stärker ausgeprägt war, als bei Wildtypzellen (Abb. 21 D, H; Tab. 33; Tab. 34), d.h. $\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$ -Hautfibroblasten zeigten starke Änderungen des thapsigarginvermittelten Ca^{2+} -Signals in puncto Amplitude und eine deutlich schnellere Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$. Mit Änderungsraten von $1,4 \text{ s } \mu\text{mol l}^{-1} (\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}})/3,6 \text{ s } \mu\text{mol l}^{-1} (\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ (basale Bedingungen) (Abb. 18 F, G), $-0,004 \text{ s } \mu\text{mol l}^{-1} (\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}})/-0,000 \text{ s } \mu\text{mol l}^{-1} (\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$, 5 min) (Abb. 21 B, C; Tab. 33) und $-0,008 \text{ s } \mu\text{mol l}^{-1} (\text{Sec61a1}^{\text{WT/WT}})/0,000 \text{ s } \mu\text{mol l}^{-1} (\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}})$ ($\beta(\text{Tun}) = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$, 24 h) (Abb. 21 E, F; Tab. 33) war eine einfache lineare Korrelation zwischen z_0 und $\tau_{v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})}$ auszuschließen. Bei der pharmakologischen Modulation der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})$ durch aufsteigende Stoffmengenkonzentrationen des CALM-Inhibitors TFP erwies sich nach Analyse der (abgeleiteten) Variablen der modifizierten binären logistischen Anpassungsfunktion ($t_{0,2a_2}$, $t_{0,5a_2}$, $t_{0,8a_2}$, $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})_{\text{max}}$, ab $c(\text{TFP}) = 2,50 \mu\text{mol l}^{-1}$) die Kinetik der $v_{\text{Ca}^{2+}}(\text{EMAR} \rightarrow \text{Cyt})$ der Zellen mit $\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$ -Mutation schneller als die der Wildtypzellen (Abb. 23 C, D; Abb. 24 E, F, G, H). Dies ist wahrscheinlich damit zu begründen, dass durch Inhibition von CALM, dem zweiten wesentlichen Inhibitor des Sec61a1-vermittelten passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol neben Hspa5, kaum noch eine Limitierung des Sec61a1-vermittelten passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol besteht, ein zusätzliches Indiz dafür, dass durch Y344H-(S)-AS-Substitution in S7 (Hspa5-Bindestelle) von Sec61a1 der inhibierende Effekt von Hspa5 bez. des Sec61a1-vermittelten passiven Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol (partiell) aufgehoben wird.

Unterm Strich reagierte der passive Ca^{2+} -Flux vom ER-Lumen ins Cytosol der $\text{Sec61a1}^{\text{Y344H/Y344H}}$ -Hautfibroblasten sensibler auf chronischen ER-Streß, analogisch der Sensibilisierung von MIN6-Zellen (B-Zelle (Langerhans-Insel, Pankreas) aus *M. musculus* mit Insulinom (Miyazaki, Araki *et al.*, 1990)) gegenüber Auswirkungen von ER-Streß in (Lloyd, Wheeler *et al.*, 2010). Da nach (Lloyd, Wheeler *et al.*, 2010) die B-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas Zeichen $\text{Sec61}^{\text{Y344H}}$ -induzierten ER-Streßes aufwiesen, der jedoch nicht auf gestörter Ins-Biosynthese bzw. -Sekretion beruhe, wird auf Grund der in dieser Arbeit vorliegenden Daten, überträgt man diese von Hautfibroblasten auf B-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas, in Anlehnung an (Schäuble, Lang *et al.*, 2012) ebenfalls eine mögliche Störung der zellulären Ca^{2+} -Kationenhomöostase als alternativer/zusätzlicher pathobiophysikalischer Mechanismus des $\text{Sec61}^{\text{Y344H}}$ -assoziierten Diabetes mellitus Typ 1 vorgeschlagen. Ein putativer alternativer/zusätzlicher pathobiophysikalischer Mechanismus könnte evtl. nach Schema 18 verlaufen.

**Schema 18: Putativer alternativer/zusätzlicher pathobiophysikalischer Mechanismus
des Sec61^{Y344H}-assoziierten Diabetes mellitus Typ 1 in *M. musculus***



chronischer ER-Streß \Rightarrow gestörter passiver Ca²⁺-Flux vom ER-Lumen ins Cytosol \Rightarrow Ca²⁺-Flux vom Cytosol über äußere und innere Mitochondrienmembran via Vdac und Mcu, insbesondere in räumlicher Nähe zu den Membrankontaktstellen zwischen ER-Membran und äußerer Mitochondrienmembran (auch mitochondrien-assoziierte Membran (MAM)), steigt \Rightarrow mitochondriale Ca²⁺-Überladung \Rightarrow Ausbildung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) \Rightarrow Freisetzung proapoptischer Faktoren ins Cytosol \Rightarrow B-Zell-Apoptose \Rightarrow Diabetes mellitus Typ 1

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematisches Kasten-Antenne-Diagramm (eigene Abb.)	52
Abb. 2: Thapsigargininduzierte Fura-2-Signale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Trypsinierung bzw. Ausplattierung der Hautfibroblasten	75
Abb. 3: $K_{d,app}([CaFura-2]^2)$ -Bestimmung	77
Abb. 4: Definition: R_{max} , R_b , $\Delta R(Iono)$, R_{min}	78
Abb. 5: R_{max}/R_{min} -Bestimmung	80
Abb. 6: Umrechnung $R \rightarrow c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}$ und Bestimmung von $c(Ca^{2+})_{Cyt, frei, b}$, $c(Ca^{2+})_{Cyt, frei, max}$ und $\Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}$	81
Abb. 7: $c(Ca^{2+})_{Cyt, frei, b}$, $c(Ca^{2+})_{Cyt, frei, max}$ und $\Delta c(Ca^{2+})_{Cyt, frei}$ für Hautfibroblasten 2 d bzw. 3 d nach Trypsinierung/ Ausplattierung	83
Abb. 8: Relative <i>ER-GCaMP6-150</i> -Konstrukt-Genexpression (<i>ER-GCaMP6-150</i> -Konstrukt- Genexpression _{rel})	91
Abb. 9: $c(Ca^{2+})_{ERL, frei, b}$ -Bestimmung	94
Abb. 10: Normierung der Funktionswerte $f(t)$ am Bsp. der Ca^{2+} -Signale zweier <i>Sec61a1</i> ^{WT/WT} - Hautfibroblasten	101
Abb. 11: Demaskierung der $\Delta F\Delta F10_{\downarrow passiv}$ in <i>Sec61a1</i> ^{WT/WT} - und <i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H} - Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(Thap) = 1 \mu mol l^{-1}$ bzw. $50 \mu mol l^{-1}$	102
Abb. 12: Empirische (ohne Anpassungsfunktion) Analyse der exponentiellen Abnahme von $\Delta F\Delta F10$ der einzelnen Hautfibroblasten aus Abb. 11 A, B, D, E	104
Abb. 13: Bestimmung und Charakterisierung der $\Delta F\Delta F10_{\downarrow passiv}$ in totaler Abwesenheit von Atp2a-Aktivität ($\Delta F\Delta F10_{\downarrow passiv, tot dem}$) am Bsp. des Ca^{2+} -Signals eines <i>Sec61a1</i> ^{WT/WT} - Hautfibroblasten in Gegenwart von $c(Thap) = 50 \mu mol l^{-1}$	107
Abb. 14: Gegenüberstellung der Parameter sowie deren Quotienten (a_{12} , a_{22} , a_{12a22} , τ_1 , τ_2 , $\tau_2\tau_1$), die in der einfachen bzw. zweifachen exponentiellen Anpassungsfunktion der Ca^{2+} -Signale aus Tab. 29 auftraten, in Gegenwart von $c(Thap) = 1 \mu mol l^{-1}$ bzw. $50 \mu mol$ l^{-1} von <i>Sec61a1</i> ^{WT/WT} - und <i>Sec61a1</i> ^{Y344H/Y344H} -Hautfibroblasten (Zusätzlich wurden die Daten bei Thapsigarginapplikation mit $c(Thap) = 1 \mu mol l^{-1}$ und $50 \mu mol l^{-1}$ innerhalb eines Hautfibroblastentyps vereinigt (1 + 50))	111
Abb. 15: Bestimmung des Proportionalitätsfaktors $k_{ddt}(\Delta F\Delta F10_{arithm}(SGM(5, 25)))(SGM(5, 100))$ (Transportgeschwindigkeits- faktor)	114
Abb. 16: Bestimmung des Proportionalitätsfaktors $k_{vCa2 + (Cyt \rightarrow EZR)arithm}$ (Transportgeschwindigkeitsfaktor)	117
Abb. 17: $\tau_{vCa2 + Cyt \rightarrow EZR} - 1$ - und $a_2(Cyt \rightarrow EZR)$ -Bestimmung	122
Abb. 18: z_0 - und $\tau_{vCa2 + (ERL \rightarrow Cyt)}$ -Bestimmung	124

Abb. 19: Vorversuche zur Abschätzung der Tunicamycininkurzinkubationszeit in 293-Zellen.....	126
Abb. 20: Tunicamycininduzierter Kurz- und Langzeit-ER-Streß in Hautfibroblasten. In A, B, E und F: DMSO schwarz, Tunicamycin blau. In C, D, G, H, I und J.....	127
Abb. 21: z_0 und $\tau_{Ca^{2+}}$ + (ERL \rightarrow Cyt) unter tunicamycininduziertem Kurz- und Langzeit-ER- Streß.....	130
Abb. 22: Ionomycininduzierte Fura-2-Signale zur Bestimmung der maximalen Menge an aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern mobilisierbaren Ca^{2+} -Kationen.....	133
Abb. 23: Pharmakologische Modulation des Ca^{2+} -Flux vom endomembranabgegrenzten Raum ins Cytosol durch Trifluoperazin (TFP) in 293-Zellen und Hautfibroblasten.....	135
Abb. 24: Analyse der einzelnen TFP-induzierten Fura-2-Signale der Hautfibroblasten deren $c(Ca^{2+})_{Cyt}$, frei arithm \pm $s(c(Ca^{2+})_{Cyt}$, frei arithm) in den Diagrammen C und D der Abb. 23 dargestellt sind.....	139

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Natürlich und künstlich vorkommende Ca-Isotope (Wiberg, Wiberg <i>et al.</i> , 2017).....	17
Tab. 2: Ca-Elementeigenschaften (Wiberg, Wiberg <i>et al.</i> , 2017)	17
Tab. 3: Metallatomradius (r für Ca) und effektive Ionenradii (r für Ca ²⁺) bei entsprechenden Koordinationszahlen (KZ) (Wiberg, Wiberg <i>et al.</i> , 2017)	17
Tab. 4: Standardelektrodenpotentialdifferenz (E ⁰) in wässriger Lösung bei pH = 0 und pH = 14 für das Redoxsystem Ca/Ca ²⁺ (Wiberg, Wiberg <i>et al.</i> , 2017)	18
Tab. 5: Eigenschaften des hydratisierten Ca ²⁺ -Kations (Schwenk und Rode, 2004)	18
Tab. 6: Zellulärer Ca ²⁺ -Signalwerkzeugkasten (Schwaller, 2012)	19
Tab. 7: Kompartimente mit korrespondierender c(Ca ²⁺) _{frei, b} (Bootman und Bultynck, 2020; Barak und Parekh, 2020; Pizzo, Lissandron <i>et al.</i> , 2011)	19
Tab. 8: Eigenschaften von Ca ²⁺ -Signalmodulatoren und Ca ²⁺ -Sensoren (Wang, Agellon <i>et al.</i> , 2019).....	21
Tab. 9: Eigenschaften ausgewählter Ca ²⁺ -bindender Proteine des Cytosols, die u.a. als Ca ²⁺ -Signalmodulatoren fungieren (Schwaller, 2020).....	22
Tab. 10: Eigenschaften ausgewählter Ca ²⁺ -bindender Proteine des ER (endoplasmatisches Retikulum) und Golgi-Apparats, die u.a. als Ca ²⁺ -Signalmodulatoren fungieren (Wang, Agellon <i>et al.</i> , 2019).....	22
Tab. 11: Charakteristika einer Ca ²⁺ -Nanodomäne (ungefähre Werte) (Wang und Augustine, 2014)	24
Tab. 12: Ausgewählte Proteine mit Ca ²⁺ -Sensormotiv und korrespondierender Funktion samt übergeordneten Prozeß in Klammern (Chavez-Abiega, Mos <i>et al.</i> , 2020; Wolfes und Dean, 2020; Gauthier und Wollheim, 2008; Li und Hwang, 2015; Li, Jia <i>et al.</i> , 2009; Roy und Cyert, 2020; Müller und Rao, 2010; Halling, Liebeskind <i>et al.</i> , 2016; Burgoyne, Helassa <i>et al.</i> , 2019; Boeckel und Ehrlich, 2018; Prole und Taylor, 2019; Santulli, Lewis <i>et al.</i> , 2018).....	26
Tab. 13: SA-Proteinzielfindung (Jiang, 2021)	31
Tab. 14: Ausgewählte co- bzw. posttranslationale Proteinmodifikationen während bzw. unmittelbar nach der Proteintranslokation durch den SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplex (Nach UniProtKB 2021-Einträgen P67812, Q9BY50, P11021, P46977, Q8TCJ2, P07237, Q13087, P30101, P13667, Q14554, Q15084, P23284, Q92643, Q969N2 (Zugriff 09.03.2021) und (Ellgaard, McCaul <i>et al.</i> , 2016; Gamage und Hendrickson, 2013)).....	32
Tab. 15: Allosterische Effektoren des SEC61A/SEC61B/SEC61G-Komplexes (Lang, Nguyen <i>et al.</i> , 2019).....	34

Tab. 16: Durchmesser der Pore des SEC61A bei $\gamma_H \approx 165 \text{ pS} \pm 10 \text{ pS}$ (d γ H) und $\gamma_N \approx 733 \text{ pS} \pm 16 \text{ pS}$ (d γ N) und des Ca ²⁺ -Kations mit 1. ($d_{1, \text{Hydr}}(\text{Ca}^{2+})$) und 2. Hydrathülle ($d_{2, \text{Hydr}}(\text{Ca}^{2+})$) (Lang, Pfeffer <i>et al.</i> , 2017; Schwenk und Rode, 2004)	34
Tab. 17: Zusammenstellung ausgewählter Proteine des direkten HSPA5-Interaktionsnetzwerks (direktes HSPA5-Interaktom) und den wichtigsten korrespondierenden HSPA5-Proteinwechselwirkungsfunktionen (Pobre, Poet <i>et al.</i> , 2019; Behnke, Feige <i>et al.</i> , 2015; Lang, Pfeffer <i>et al.</i> , 2017; Lang, Nguyen <i>et al.</i> , 2019; Haßdenteufel, Johnson <i>et al.</i> , 2018; Preissler und Ron, 2019)	37
Tab. 18: PBS-Zusammensetzung	42
Tab. 19: Zusammensetzungen der Lösungen der Ca ²⁺ -Bildgebung	43
Tab. 20: Definition verwendeter Parameter der deskriptiven/induktiven Statistik (Backhaus, Erichson <i>et al.</i> , 2018; Cramer und Kamps, 2020; Messer und Schneider, 2019; Köhler, Schachtel <i>et al.</i> , 2012; Rüschemdorf, 2014; Puhani, 2020; OriginLab, 2020)	45
Tab. 21: p-Wertintervalle und deren Symbole	57
Tab. 22: Verwendete optische Filter. Optische Exzitationsfilter, dichroitische Strahlteiler, optische Emissionsfilter.....	66
Tab. 23: Systemeinstellungen für die Ca ²⁺ -Bildgebung mit Fura-2 bzw. ER-GCaMP6-150.....	67
Tab. 24: Lösungen (jeweils 1 ml) des Fura-2 Kalibrierkit für die Calciumbildung (null bis 10 mM CaEGTA, 50 μ M Fura-2) (Nr. F6774; life technologies TM , Darmstadt, Deutschland).....	76
Tab. 25: Eigenschaften des ER-GCaMP6-150-Konstrukts aus <i>in vitro</i> -Experimenten (de Juan-Sanz, Holt <i>et al.</i> , 2017).....	88
Tab. 26: Nernst-Spannung für Ca ²⁺ -Kationen zwischen ER-Lumen und Cytosol U(Ca ²⁺) (mV).....	98
Tab. 27: $c(\text{Na}^+)_{\text{Cyt, frei}}$ (mmol l ⁻¹) und $c(\text{K}^+)_{\text{Cyt, frei}}$ (mmol l ⁻¹) in Extrazellulärraum (EZR) und Intrazellulärraum (IZR) des Säugerskelettmuskels (Hille, 2001).....	98
Tab. 28: Chemisches Potential für Ca ²⁺ -Kationen über die ER-Membran $\Delta\mu(\text{Ca}^{2+})$ (J mol ⁻¹).....	100
Tab. 29: Anzahl der Ca ²⁺ -Signale mit korrekter exponentieller (exp.) Anpassung, sowie Anzahl der Ca ²⁺ -Signale, die besser durch eine einfache bzw. zweifache Anpassungsfunktion charakterisiert werden.....	108
Tab. 30: Zusammenfassung der statistischen Charakteristika (Relation, korrespondierender p-Wert, $\bar{x} \pm s(\bar{x})$) von $a_2(\text{Cyt} \rightarrow \text{EZR})$, z_0 und $\tau_{\text{Ca}^{2+}}(\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$	125
Tab. 31: Relationen zwischen und p-Werte für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (DMSO) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b}}$ (Tun), $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (DMSO) vs. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (Tun) und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (DMSO) vs. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (Tun) innerhalb eines Hautfibroblastentyps unter tunicamycininduziertem Kurz- und Langzeit-ER-Streß aus Abb. 20 C, D, G und H.....	128

Tab. 32: Vergleich von $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max}}$ (Abb. 20 I) bzw. $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei}}$ (Abb. 20 J) zwischen den Hautfibroblastentypen bzw. zwischen tunicamycininduziertem Kurz- und Langzeit-ER-Streß.....	129
Tab. 33: $z_0 \text{ arithm} \pm s(z_0 \text{ arithm})$, $\tau \nu \text{Ca}^{2+} + (\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt}) \text{ arithm} \pm s(\tau \nu \text{Ca}^{2+} + (\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt}) \text{ arithm})$ und Änderungsraten der Diagramme A, B, C, D, E und F aus Abb. 21 mit korrespondierenden Relationen (Rel).....	131
Tab. 34: Vergleich von z_0 (Abb. 21 G) bzw. $\tau \nu \text{Ca}^{2+} + (\text{ERL} \rightarrow \text{Cyt})$ (Abb. 21 H) zwischen den Hautfibroblastentypen bzw. zwischen tunicamycininduziertem Kurz- und Langzeit-ER-Streß.....	132
Tab. 35: Zahlenwerte für $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}} \pm s(c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, b arithm}})$, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max arithm}} \pm s(c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei, max arithm}})$ und $\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}} \pm s(\Delta c(\text{Ca}^{2+})_{\text{Cyt, frei arithm}})$ der Diagramme C, J, K und L aus Abb. 22 mit korrespondierenden Relationen (Rel) und p-Werten	134
Tab. 36: Proteinogene (S/R)- α -Aminosäuren im 3- und 1-Buchstabencode (siehe Lehrbücher der Biochemie)	152
Tab. 37: Genetischer Code auf DNA- und RNA-Level (siehe Lehrbücher der Genetik)	153
Tab. 38: SI-Basisgröße, SI-Basisgrößensymbol, SI-Einheit, SI-Einheitenzeichen (siehe Lehrbücher der Physik)	154
Tab. 39: SI-Präfixe mit Namen, Zahlenwert	154

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
®	registered
Ω	Ohm
5'AMP	Adenosin-5'-monophosphat
(5')ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Abk.	Abkürzung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AG	Arbeitsgemeinschaft
allg.	allgemein
AMPylierung	Adenylierung
AO	Atomorbital
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
AWP	Anfangswertproblem
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
bez.	bezüglich
BS	Bindestelle
Bsp.	Beispiel
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C-terminales Ende	Carboxy-terminales Ende
ca.	circa
CAD/SOAR	CRAC activation domain/STIM ORAI activating region
CALR-SP	Calreticulinsignalpeptid
CC1	coiled coil 1
CCD	charge coupled device
CDI	Ca ²⁺ dependent inhibition
cEF	canonical EF hand
CICR	Ca ²⁺ induced Ca ²⁺ release
CMV	Cytomegalovirus
cpEGFP	circularly permuted enhanced green fluorescent protein
CTS	C-terminale Sequenz
Cyt	Cytosol
d	dies (Tag); Abstand
d.h.	das heißt

De-AMPylierung	De-Adenylierung
D-Glc	D-Glucose
DGL	Differentialgleichung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
EA	Elektronenaffinität
EC	enzyme commission
ECA	enterobacterial common antigen
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
elektr.	elektrisch
EMAR	endomembranabgegrenzter Raum
EMW	elektromagnetische Welle
EN	Elektronegativität
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERL	Endoplasmatisches-Retikulum-Lumen
ERM	Endoplasmatisches-Retikulum-Membran
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EU	Europäische Union
evtl.	eventuell
EZR	Extrazellulärraum
FBS	fetales bovines Serum
FP	fluoreszierendes Protein
geb.	geboren
GECI	genetically encoded Ca ²⁺ indicator
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
Gll.	Glandulae
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPCR	G protein coupled receptor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Grp.	Gruppe
h	hora (Stunde)
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HAdV-5	humanes Adenovirus 5
HEK-293	Human Embryonic Kidney-293
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethansulfonsäure

HO	Hybridorbital
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPV16	humanes Papillomavirus 16
i.A.	im Allgemeinen
IE	Ionisierungsenergie
IICR	inositol-1,4,5-trisphosphate induced Ca ²⁺ release
J	Joule
KÄ	Konformationsänderung
KG	Körpergewicht
konst.	konstant
KST	Kolmogorov-Smirnoff-Test
LCAO-MO	linear combination of atomic orbitals to molecular orbitals
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
M13	M13-Peptid (Teil der Myosin-Leichte-Kette-Kinase)
MII	Erdalkalimetall
Mr.	Mister
magnet.	magnetisch
MCS	membrane contact site
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
MKQ	Methode der kleinsten Quadrate
MO	Molekülorbital
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
n	einfacher Chromosomensatz
N-terminales Ende	Amino-terminales Ende
n.s.	nicht signifikant
Nr.	Nummer
PAFP	photoaktivierbares fluoreszierendes Protein
PBS	phosphate buffered saline
PCFP	photokonvertierbares fluoreszierendes Protein
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PTFP	phototransformierbares fluoreszierendes Protein
r	Radius
RNA	ribonucleic acid

RSFP	reversibel schaltbares fluoreszierendes Protein
RT	Raumtemperatur 20 °C (293,15 K)
S	Svedberg (1 S = 10 ⁻¹³ s); Schleife; Siemens
SA	Schwanzankerprotein
SI	Système international d'unités
siRNA	small interfering RNA
SLC	solute carrier
sog.	sogenannt
SOICR	store overload induced Ca ²⁺ release
SRP	signal recognition particle
STT	Student-t-Test
TFP	Trifluoperazin
TierSchG	Tierschutzgesetz
TM	trademark; Transmembran-
TMD	Transmembrandomäne
u.a.	unter anderem
u.v.a.m.	und vieles andere mehr
USA	United States of America
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
V.	Vena
VE	Valenzelektron
Vergr.	Vergrößerung
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
Y344H	Substitution Y344→H344
z.B.	zum Beispiel

Tab. 36: Proteinogene (S/R)- α -Aminosäuren im 3- und 1-Buchstabencode (siehe Lehrbücher der Biochemie)

proteinogene (S/R)- α -Aminosäuren		
Name	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
(S)-Alanin	Ala	A
(S)-Arginin	Arg	R
(S)-Asparagin	Asn	N
(S)-Asparaginsäure / (S)-Aspartat	Asp	D
(R)-Cystein	Cys	C
(S)-Glutamin	Gln	Q

(S)-Glutaminsäure / (S)-Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
(S)-Histidin	His	H
(S)-Isoleucin	Ile	I
(S)-Leucin	Leu	L
(S)-Lysin	Lys	K
(S)-Methionin	Met	M
(S)-Phenylalanin	Phe	F
(S)-Prolin	Pro	P
(S)-Pyrrolysin	Pyl	O
(S)-Selenocystein	Sec	U
(S)-Serin	Ser	S
(S)-Threonin	Thr	T
(S)-Tryptophan	Trp	W
(S)-Tyrosin	Tyr	Y
(S)-Valin	Val	V

Tab. 37: Genetischer Code auf DNA- und RNA-Level (siehe Lehrbücher der Genetik)

genetischer Code (DNA/RNA)							
		2. Base					
		T/U	C	A	G		
1. Base (5'-Ende)	T / U	Phe	Ser	Tyr	Cys	T/U	2. Base (3'-Ende)
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C	
		Leu	Ser	STOP	STOP	A	
		Leu	Ser	STOP	Trp	G	
	C	Leu	Pro	His	Arg	T/U	
		Leu	Pro	His	Arg	C	
		Leu	Pro	Gln	Arg	A	
		Leu	Pro	Gln	Arg	G	
	A	Ile	Thr	Asn	Ser	T/U	
		Ile	Thr	Asn	Ser	C	
		Ile	Thr	Lys	Arg	A	
		Met	Thr	Lys	Arg	G	
	G	Val	Ala	Asp	Gly	T/U	
		Val	Ala	Asp	Gly	C	
		Val	Ala	Glu	Gly	A	
		Val	Ala	Glu	Gly	G	

Tab. 38: SI-Basisgröße, SI-Basisgrößensymbol, SI-Einheit, SI-Einheitenzeichen (siehe Lehrbücher der Physik)

SI-Basisgröße	SI-Basisgrößensymbol	SI-Einheit	SI-Einheitenzeichen
Länge	l	Meter	m
Masse	m	Kilogramm	kg
Zeit	t	Sekunde	s
thermodynamische Temperatur	T	Kelvin	K
elektrischer Strom	I	Ampere	A
Stoffmenge	n	Mol	mol
Lichtstärke	I _v	Candela	cd

Tab. 39: SI-Präfixe mit Namen, Zahlenwert

Präfix	Name	Zahlenwert
Y	yotta	10 ²⁴
Z	zetta	10 ²¹
E	exa	10 ¹⁸
P	peta	10 ¹⁵
T	tera	10 ¹²
G	giga	10 ⁹
M	mega	10 ⁶
k	kilo	10 ³
h	hecto	10 ²
da	deca	10 ¹
-	-	10 ⁰
d	deci	10 ⁻¹
c	centi	10 ⁻²
m	milli	10 ⁻³
μ	mikro	10 ⁻⁶
n	nano	10 ⁻⁹
p	piko	10 ⁻¹²
f	femto	10 ⁻¹⁵
a	Aatto	10 ⁻¹⁸
z	zepto	10 ⁻²¹
y	yokto	10 ⁻²⁴

10 Literaturverzeichnis

1. Agbeboh NI, Oladele IO, Daramola OO, Adediran AA, Olasukanmi OO, Tanimola MO (2020) Environmentally sustainable processes for the synthesis of hydroxyapatite. *Heliyon* 6: e03765
2. Akerboom J, Rivera JD, Guilbe MM, Malave EC, Hernandez HH, Tian L, Hires SA, Marvin JS, Looger LL, Schreier ER (2009) Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J Biol Chem* 284: 6455-6464
3. Andersen TB, López CQ, Manczak T, Martinez K, Simonsen HT (2015) Thapsigargin--from Thapsia L. to mipsagargin. *Molecules* 20: 6113-6127
4. Backhaus K, Erichson B, Plinke W, Weiber R (2018) *Multivariate Analysemethoden Eine anwendungsorientierte Einführung*. 15., vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Verlag, Deutschland
5. Bagur R, Hajnóczky G (2017) Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell* 66: 780-788
6. Barak P, Parekh AB (2020) Signaling through Ca(2+) Microdomains from Store-Operated CRAC Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12
7. Behnke J (2015) *Logistische Regressionsanalyse Eine Einführung*. 1. Auflage. Springer-Verlag, Deutschland
8. Behnke J, Feige MJ, Hendershot LM (2015) BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions. *J Mol Biol* 427: 1589-1608
9. Bergling S, Dolmetsch R, Lewis RS, Keizer J (1998) A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores. *Cell Calcium* 23: 251-259
10. Bhattacharyya M, Karandur D, Kuriyan J (2020) Structural Insights into the Regulation of Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12
11. Boeckel GR, Ehrlich BE (2018) NCS-1 is a regulator of calcium signaling in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865: 1660-1667
12. Bootman MD, Bultynck G (2020) *Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer*. Cold Spring Harb Perspect Biol 12
13. Borgese N, Coy-Vergara J, Colombo SF, Schwappach B (2019) The Ways of Tails: the GET Pathway and more. *Protein J* 38: 289-305
14. Bourier G (2018) *Wahrscheinlichkeitsrechnung und schließende Statistik Praxisorientierte Einführung - Mit Aufgaben und Lösungen*. 9., aktualisierte Auflage. Springer-Verlag, Deutschland
15. Bravo-Sagua R, Parra V, Muñoz-Cordova F, Sanchez-Aguilera P, Garrido V, Contreras-Ferrat A, Chiong M, Lavandero S (2020) Sarcoplasmic reticulum and calcium signaling in muscle cells: Homeostasis and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 350: 197-264
16. Brini M, Calì T, Ottolini D, Carafoli E (2014) Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 71: 2787-2814
17. Burgoyne RD, Helassa N, McCue HV, Haynes LP (2019) Calcium Sensors in Neuronal Function and Dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11
18. Bygrave FL, Benedetti A (1996) What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell Calcium* 19: 547-551
19. Carafoli E, Krebs J (2016) Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem* 291: 20849-20857
20. Carreras-Sureda A, Pihán P, Hetz C (2018) Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium* 70: 24-31
21. Casson J, McKenna M, Haßdenteufel S, Aviram N, Zimmerman R, High S (2017) Multiple pathways facilitate the biogenesis of mammalian tail-anchored proteins. *J Cell Sci* 130: 3851-3861
22. Chavez-Abiega S, Mos I, Centeno PP, Elajnaf T, Schlattl W, Ward DT, Goedhart J, Kallay E (2020) Sensing Extracellular Calcium - An Insight into the Structure and Function of the Calcium-Sensing Receptor (CaSR). *Adv Exp Med Biol* 1131: 1031-1063

23. Chen J, Sitsel A, Benoy V, Sepúlveda MR, Vangheluwe P (2020) Primary Active Ca(2+) Transport Systems in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12
24. Chen W, Wang R, Chen B, Zhong X, Kong H, Bai Y, Zhou Q, Xie C, Zhang J, Guo A, Tian X, Jones PP, O'Mara ML, Liu Y, Mi T, Zhang L, Bolstad J, Semeniuk L, Cheng H, Zhang J, Chen J, Tieleman DP, Gillis AM, Duff HJ, Fill M, Song LS, Chen SR (2014) The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca²⁺ waves and Ca²⁺-triggered arrhythmias. *Nat Med* 20: 184-192
25. Christensen SB, Rasmussen U, Christophersen C (1980) Thapsigargin, constitution of a sesquiterpene lactone histamine liberator from thapsia garganica. *Tetrahedron Letters* 21: 3829-3830
26. Cleff T (2019) *Angewandte Induktive Statistik und Statistische Testverfahren Eine computergestützte Einführung mit Excel, SPSS und Stata*. 1. Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
27. Cramer E, Kamps U (2020) *Grundlagen der Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik Eine Einführung für Studierende der Informatik, der Ingenieur- und Wirtschaftswissenschaften*. 5., erweiterte und korrigierte Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
28. de Juan-Sanz J, Holt GT, Schreiter ER, de Juan F, Kim DS, Ryan TA (2017) Axonal Endoplasmic Reticulum Ca(2+) Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals. *Neuron* 93: 867-881.e866
29. Demtröder W (2016) *Experimentalphysik 3 Atome, Moleküle und Festkörper*. 5., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. Springer Spektrum. Berlin, Deutschland
30. Denker A, Rizzoli SO (2010) Synaptic vesicle pools: an update. *Front Synaptic Neurosci* 2: 135
31. Ding J, Luo AF, Hu L, Wang D, Shao F (2014) Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6. *Sci China Life Sci* 57: 269-274
32. Doan NT, Paulsen ES, Sehgal P, Møller JV, Nissen P, Denmeade SR, Isaacs JT, Dionne CA, Christensen SB (2015) Targeting thapsigargin towards tumors. *Steroids* 97: 2-7
33. Duan C, Adam V, Byrdin M, Bourgeois D (2014) Structural basis of photoswitching in fluorescent proteins. *Methods Mol Biol* 1148: 177-202
34. Duksin D, Mahoney WC (1982) Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. *J Biol Chem* 257: 3105-3109
35. Dupont G, Falcke M, Kirk V, Sneyd J (2016) *Models of Calcium Signalling*. 1. Auflage. Springer-Verlag. Schweiz
36. Elíes J, Yáñez M, Pereira TMC, Gil-Longo J, MacDougall DA, Campos-Toimil M (2020) An Update to Calcium Binding Proteins. *Adv Exp Med Biol* 1131: 183-213
37. Ellgaard L, McCaul N, Chatsisvili A, Braakman I (2016) Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER. *Traffic* 17: 615-638
38. Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR (1994) Ca²⁺ transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system. *Biophys J* 66: 1678-1693
39. Fließbach T (2018) *Quantenmechanik Lehrbuch zur Theoretischen Physik III*. 6. Auflage. Springer Spektrum. Berlin, Deutschland
40. Forrester MT, Hess DT, Thompson JW, Hultman R, Moseley MA, Stamler JS, Casey PJ (2011) Site-specific analysis of protein S-acylation by resin-assisted capture. *J Lipid Res* 52: 393-398
41. Foufelle F, Fromenty B (2016) Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect* 4: e00211
42. Frias C, Pampalona J, Genesca A, Tusell L (2012) Telomere dysfunction and genome instability. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17: 2181-2196
43. Gabso M, Neher E, Spira ME (1997) Low mobility of the Ca²⁺ buffers in axons of cultured Aplysia neurons. *Neuron* 18: 473-481
44. Gamage DG, Hendrickson TL (2013) GPI transamidase and GPI anchored proteins: oncogenes and biomarkers for cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48: 446-464
45. Garcia AM, Miller C (1984) Channel-mediated monovalent cation fluxes in isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Gen Physiol* 83: 819-839

46. Gauthier BR, Wollheim CB (2008) Synaptotagmins bind calcium to release insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1279-1286
47. Geddes AJ, Sheldrick B, Stevenson WT, Steinrauf LK (1974) The crystal structure of the potassium salt of nigericin. *Biochem Biophys Res Commun* 60: 1245-1251
48. Genesca A, Pampalona J, Frias C, Dominguez D, Tusell L (2011) Role of telomere dysfunction in genetic intratumor diversity. *Adv Cancer Res* 112: 11-41
49. Gérard SF, Hall BS, Zaki AM, Corfield KA, Mayerhofer PU, Costa C, Whelligan DK, Biggin PC, Simmonds RE, Higgins MK (2020) Structure of the Inhibited State of the Sec Translocon. *Mol Cell* 79: 406-415.e407
50. Gey MH (2015) *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. 3. Auflage. Springer Spektrum. Berlin, Deutschland
51. Gilibert JA (2020) Cytoplasmic Calcium Buffering: An Integrative Crosstalk. *Adv Exp Med Biol* 1131: 163-182
52. Gilbert G, Demydenko K, Dries E, Puertas RD, Jin X, Sipido K, Roderick HL (2020) Calcium Signaling in Cardiomyocyte Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12
53. Gilbert SL, Pehrson JR, Sharp PA (2000) XIST RNA associates with specific regions of the inactive X chromatin. *J Biol Chem* 275: 36491-36494
54. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450
55. Gustavsson M, Verardi R, Mullen DG, Mote KR, Traaseth NJ, Gopinath T, Veglia G (2013) Allosteric regulation of SERCA by phosphorylation-mediated conformational shift of phospholamban. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 17338-17343
56. Hakii H, Fujiki H, Suganuma M, Nakayasu M, Tahira T, Sugimura T, Scheuer PJ, Christensen SB (1986) Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 111: 177-181
57. Halling DB, Liebeskind BJ, Hall AW, Aldrich RW (2016) Conserved properties of individual Ca²⁺-binding sites in calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E1216-1225
58. Haßdenteufel S, Johnson N, Paton AW, Paton JC, High S, Zimmermann R (2018) Chaperone-Mediated Sec61 Channel Gating during ER Import of Small Precursor Proteins Overcomes Sec61 Inhibitor-Reinforced Energy Barrier. *Cell Rep* 23: 1373-1386
59. Heinrich PCH, Müller MH, Graeve LH (2014) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
60. Heisenberg W (1927) Über den anschaulichen Inhalt der quantentheoretischen Kinematik und Mechanik. *Zeitschrift für Physik* 43: 172-198
61. Helmchen F, Imoto K, Sakmann B (1996) Ca²⁺ buffering and action potential-evoked Ca²⁺ signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys J* 70: 1069-1081
62. Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. USA
63. Hou X, Pedi L, Diver MM, Long SB (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* 338: 1308-1313
64. Inesi G, Sagara Y (1992) Thapsigargin, a high affinity and global inhibitor of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *Arch Biochem Biophys* 298: 313-317
65. Janczyk M, Pfister R (2020) *Inferenzstatistik verstehen Von A wie Signifikanztest bis Z wie Konfidenzintervall*. 3. Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
66. Jiang H (2021) Quality control pathways of tail-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868: 118922
67. Jin H, Komita M, Aoe T (2017) The Role of BiP Retrieval by the KDEL Receptor in the Early Secretory Pathway and its Effect on Protein Quality Control and Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci* 10: 222
68. Jungnickel D (2015) *Optimierungsmethoden Eine Einführung*. 3., neu bearbeitete Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
69. Kennedy HJ, Thomas RC (1996) Effects of injecting calcium-buffer solution on [Ca²⁺]_i in voltage-clamped snail neurons. *Biophys J* 70: 2120-2130
70. Kleinbaum DG, Klein M (2010) *Logistic Regression A Self-Learning Text*. 3. Edition. Springer-Verlag. USA

71. Köhler W, Schachtel G, Voleske P (2012) Biostatistik Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler. 5., aktualisierte und erweiterte Auflage. Springer-Verlag Deutschland
72. Komorek J, Kuppaswamy M, Subramanian T, Vijayalingam S, Lomonosova E, Zhao LJ, Mymryk JS, Schmitt K, Chinnadurai G (2010) Adenovirus type 5 E1A and E6 proteins of low-risk cutaneous beta-human papillomaviruses suppress cell transformation through interaction with FOXK1/K2 transcription factors. *J Virol* 84: 2719-2731
73. Kosfeld R, Eckey H-F, Türck M (2019) Wahrscheinlichkeitsrechnung und Induktive Statistik Grundlagen - Methoden - Beispiele. 3. Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
74. Kubota T, Matsutani S (1970) Studies on the antibiotic nigericin (polyetherin A). *J Chem Soc Perkin 1* 5: 695-703
75. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132
76. Lam AK, Galione A (2013) The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2542-2559
77. Lang S, Nguyen D, Pfeffer S, Förster F, Helms V, Zimmermann R (2019) Functions and Mechanisms of the Human Ribosome-Translocon Complex. *Subcell Biochem* 93: 83-141
78. Lang S, Pfeffer S, Lee PH, Cavalié A, Helms V, Förster F, Zimmermann R (2017) An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Front Physiol* 8: 887
79. Lang S, Schäuble N, Cavalié A, Zimmermann R (2011) Live cell calcium imaging combined with siRNA mediated gene silencing identifies Ca²⁺ leak channels in the ER membrane and their regulatory mechanisms. *J Vis Exp*: e2730
80. Lechner MD (2017) Einführung in die Quantenchemie Aufbau der Atome und Moleküle, Spektroskopie. 1. Auflage. Springer Spektrum. Berlin, Deutschland
81. Lewis RS (2020) Store-Operated Calcium Channels: From Function to Structure and Back Again. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12
82. Li J, Jia Z, Zhou W, Wei Q (2009) Calcineurin regulatory subunit B is a unique calcium sensor that regulates calcineurin in both calcium-dependent and calcium-independent manner. *Proteins* 77: 612-623
83. Li MX, Hwang PM (2015) Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs. *Gene* 571: 153-166
84. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 5: 4767
85. Liu C, Hermann TE (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 253: 5892-5894
86. Liu WC, Slusarchyk DS, Astle G, Trejo WH, Brown WE, Meyers E (1978) Ionomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 31: 815-819
87. Lloyd DJ, Wheeler MC, Gekakis N (2010) A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes* 59: 460-470
88. Lottspeich F, Engels JW (2018) Bioanalytics Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology. 1st edition. WILEY-VCH. Weinheim, Deutschland
89. Lutz WK, Wipf H-K, Simon W (1970) Alkalikationen-Spezifität und Träger-Eigenschaften der Antibiotica Nigericin und Monensin. 53: 1741-1746
90. Machida K, Liu JC, McNamara G, Levine A, Duan L, Lai MM (2009) Hepatitis C virus causes uncoupling of mitotic checkpoint and chromosomal polyploidy through the Rb pathway. *J Virol* 83: 12590-12600
91. Maravall M, Mainen ZF, Sabatini BL, Svoboda K (2000) Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J* 78: 2655-2667
92. Meir YJ, Weirauch MT, Yang HS, Chung PC, Yu RK, Wu SC (2011) Genome-wide target profiling of piggyBac and Tol2 in HEK 293: pros and cons for gene discovery and gene therapy. *BMC Biotechnol* 11: 28
93. Meldolesi J, Pozzan T (1998) The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* 23: 10-14

94. Messer M, Schneider G (2019) Statistik Theorie und Praxis im Dialog. 1. Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
95. Michelangeli F, East JM (2011) A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochem Soc Trans* 39: 789-797
96. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127: 126-132
97. Møller JV, Olesen C, Winther AM, Nissen P (2010) The sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase: design of a perfect chemi-osmotic pump. *Q Rev Biophys* 43: 501-566
98. Müller CS, Haupt A, Bildl W, Schindler J, Knaus HG, Meissner M, Rammner B, Striessnig J, Flockerzi V, Fakler B, Schulte U (2010) Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14950-14957
99. Müller MR, Rao A (2010) NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10: 645-656
100. Nakajima K, Harada K, Ebina Y, Yoshimura T, Ito H, Ban T, Shingai R (1993) Relationship between resting cytosolic Ca²⁺ and responses induced by N-methyl-D-aspartate in hippocampal neurons. *Brain Res* 603: 321-323
101. Naraghi M (1997) T-jump study of calcium binding kinetics of calcium chelators. *Cell Calcium* 22: 255-268
102. Narayanan D, Adebisi A, Jaggar JH (2012) Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H2190-2210
103. Norris LA (2003) Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17: 369-383
104. Olive DJ (2017) Linear Regression. 1. Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
105. OriginLab (2020) Handbuch. V2020, unter Hilfe in: ORIGIN 2016 Graphing & Analysis (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA).
106. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, Verkhratsky A (2003) P2X receptor-mediated excitatory synaptic currents in somatosensory cortex. *Mol Cell Neurosci* 24: 842-849
107. Papageorgiou M, Leibold M, Martin Buss M (2015) Optimierung Statische, dynamische, stochastische Verfahren für die Anwendung. 4., korrigierte Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
108. Pape H-S, Kurtz A, Silbernagl S (2019) Physiologie. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag. Deutschland
109. Papula L (2017) Mathematische Formelsammlung Für Ingenieure und Naturwissenschaftler. 12., überarbeitete Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
110. Perera LA, Rato C, Yan Y, Neidhardt L, McLaughlin SH, Read RJ, Preissler S, Ron D (2019) An oligomeric state-dependent switch in the ER enzyme FICD regulates AMPylation and deAMPylation of BiP. *Embo j* 38: e102177
111. Petersen OH, Courjaret R, Machaca K (2017) Ca²⁺ tunnelling through the ER lumen as a mechanism for delivering Ca²⁺ entering via store-operated Ca²⁺ channels to specific target sites. *J Physiol* 595: 2999-3014
112. Pizzo P, Lissandron V, Capitanio P, Pozzan T (2011) Ca²⁺ signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium* 50: 184-192
113. Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM (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: 2098-2108
114. Prabhananda BS, Ugrankar MM (1991) Nigericin-mediated H⁺, K⁺ and Na⁺ transports across vesicular membrane: T-jump studies. *Biochim Biophys Acta* 1070: 481-491
115. Preissler S, Ron D (2019) Early Events in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11
116. Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP (2007) NUMERICAL RECIPES The Art of Scientific Computing. 3. Edition. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. UK
117. Prole DL, Taylor CW (2019) Structure and Function of IP(3) Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11
118. Puhani J (2020) Statistik Einführung mit praktischen Beispielen. 13., erweiterte und überarbeitete Auflage.

119. Puri BK (2020) Calcium Signaling and Gene Expression. *Adv Exp Med Biol* 1131: 537-545
120. Ravishankar H, Pedersen MN, Eklund M, Sitsel A, Li C, Duelli A, Levantino M, Wulff M, Barth A, Olesen C, Nissen P, Andersson M (2020) Tracking Ca(2+) ATPase intermediates in real time by x-ray solution scattering. *Sci Adv* 6: eaaz0981
121. Reinhardt R, Hoffmann A, Gerlach T (2013) Nichtlineare Optimierung Theorie, Numerik und Experimente. 1. Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
122. Reinhold J (2015) Quantentheorie der Moleküle Eine Einführung. 5., überarbeitete Auflage. Springer Spektrum. Wiesbaden, Deutschland
123. Rizo J, Südhof TC (1998) C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 273: 15879-15882
124. Roth S, Stahl A (2018) Elektrizität und Magnetismus Experimentalphysik - anschaulich erklärt. 1. Auflage. Springer Spektrum. Berlin, Deutschland
125. Roy J, Cyert MS (2020) Identifying New Substrates and Functions for an Old Enzyme: Calcineurin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12
126. Rüschemeyer L (2014) Mathematische Statistik. 1. Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
127. Sabała P, Czarny M, Woronczak JP, Barańska J (1993) Thapsigargin: potent inhibitor of Ca²⁺ transport ATP-ases of endoplasmic and sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochim Pol* 40: 309-319
128. Santulli G, Lewis D, des Georges A, Marks AR, Frank J (2018) Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Subcell Biochem* 87: 329-352
129. Sather WA, McCleskey EW (2003) Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol* 65: 133-159
130. Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, Linxweiler J, Dudek J, Blum R, Helms V, Paton AW, Paton JC, Cavalié A, Zimmermann R (2012) BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *Embo j* 31: 3282-3296
131. Schiebler TH, Korf H-W (2007) Anatomie. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Steinkopff-Verlag. Deutschland
132. Schwaller B (2012) The regulation of a cell's Ca(2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome. *Adv Exp Med Biol* 740: 1-25
133. Schwaller B (2020) Cytosolic Ca(2+) Buffers Are Inherently Ca(2+) Signal Modulators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12
134. Schwenk CF, Rode BM (2004) Ab initio QM/MM MD simulations of the hydrated Ca²⁺ ion %J Pure and Applied Chemistry. 76: 37-47
135. Smedler E, Uhlén P (2014) Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochim Biophys Acta* 1840: 964-969
136. Stein O (2018) Grundzüge der Nichtlinearen Optimierung. 1. Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
137. Südhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27: 509-547
138. Toeplitz BK, Cohen AI, Funke PT, Parker WL, Gougoutas JZ (1979) Structure of ionomycin - a novel diacidic polyether antibiotic having high affinity for calcium ions. *Journal of the American Chemical Society* 101: 3344-3353
139. Toutenburg H, Heumann C (2008) Induktive Statistik Eine Einführung mit R und SPSS. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
140. Ulbrich M, Ulbrich S (2012) Nichtlineare Optimierung. 1. Auflage. Birkhäuser, Springer-Verlag. Deutschland
141. Urban D, Mayerl J (2018) Angewandte Regressionsanalyse: Theorie, Technik und Praxis. 5., überarbeitete Auflage. Springer-Verlag. Deutschland
142. Valeur B, Berberan-Santos MN (2012a) Absorption of Ultraviolet, Visible, and Near-Infrared Radiation. In *Molecular Fluorescence*, pp 31-51. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA. Weinheim, Deutschland
143. Valeur B, Berberan-Santos MN (2012b) Characteristics of Fluorescence Emission. In *Molecular Fluorescence*, pp 53-74. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA. Weinheim, Deutschland
144. van Roy F, Berx G (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65: 3756-3788

145. Vangeel L, Voets T (2019) Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11
146. Vetter I, Carter D, Bassett J, Deuis JR, Tay B, Jami S, Robinson SD (2020) High-Throughput Fluorescence Assays for Ion Channels and GPCRs. *Adv Exp Med Biol* 1131: 27-72
147. Wang LY, Augustine GJ (2014) Presynaptic nanodomains: a tale of two synapses. *Front Cell Neurosci* 8: 455
148. Wang QC, Zheng Q, Tan H, Zhang B, Li X, Yang Y, Yu J, Liu Y, Chai H, Wang X, Sun Z, Wang JQ, Zhu S, Wang F, Yang M, Guo C, Wang H, Zheng Q, Li Y, Chen Q, Zhou A, Tang TS (2016) TMCO1 Is an ER Ca(2+) Load-Activated Ca(2+) Channel. *Cell* 165: 1454-1466
149. Wang WA, Agellon LB, Michalak M (2019) Organellar Calcium Handling in the Cellular Reticular Network. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11
150. Westerblad H, Allen DG (1994) Methods for calibration of fluorescent calcium indicators in skeletal muscle fibers. *Biophys J* 66: 926-928
151. Wiberg E, Wiberg N, Holleman AF (2017) ANORGANISCHE CHEMIE BAND 1: GRUNDLAGEN UND HAUPTGRUPPENELEMENTE. 103. Auflage. DE GRUYTER. Berlin, Deutschland
152. Wieder N, Fink RHA, von Wegner F (2020) Simulation Strategies for Calcium Microdomains and Calcium Noise. *Adv Exp Med Biol* 1131: 771-797
153. Winther AM, Liu H, Sonntag Y, Olesen C, le Maire M, Soehoel H, Olsen CE, Christensen SB, Nissen P, Møller JV (2010) Critical roles of hydrophobicity and orientation of side chains for inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with thapsigargin and thapsigargin analogs. *J Biol Chem* 285: 28883-28892
154. Wolfes AC, Dean C (2020) The diversity of synaptotagmin isoforms. *Curr Opin Neurobiol* 63: 198-209
155. Wootton LL, Michelangeli F (2006) The effects of the phenylalanine 256 to valine mutation on the sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) Ca²⁺ pump isoforms 1, 2, and 3 to thapsigargin and other inhibitors. *J Biol Chem* 281: 6970-6976
156. Wu J, Yan N, Yan Z (2017) Structure-Function Relationship of the Voltage-Gated Calcium Channel Ca(v)1.1 Complex. *Adv Exp Med Biol* 981: 23-39
157. Wu X, Bers DM (2006) Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected Ca²⁺ store throughout cardiac myocyte. *Circ Res* 99: 283-291
158. Yamaguchi N (2020) Molecular Insights into Calcium Dependent Regulation of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Adv Exp Med Biol* 1131: 321-336
159. Yamamoto K, Ichikawa S (2019) Tunicamycin: chemical synthesis and biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)* 72: 924-933
160. Yelshanskaya MV, Nadezhdin KD, Kurnikova MG, Sobolevsky AI (2020) Structure and function of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *J Physiol*

11 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Adolfo Cavalié für die Möglichkeit zur Promotion danken. Mein nächster Dank geht an Univ.-Prof. Dr. Richard Zimmermann für die Übernahme des Zweitgutachtens. Zum Schluß möchte ich meinen Eltern Karin Tinschert und Werner Tinschert danken, die mich all die Zeit unterstützt haben.

12 Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 14.12.2021
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. M. D. Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. Adolfo Cavalié
Prof. Dr. Barbara Anne Niemeyer-Hoth