

Aus der Fachrichtung medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Die Proteinkinase CK2,
das Endoplasmatische Retikulum
und ER-Stress:
Die Rolle der CK2 am größten Zellorganell.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der

Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2012

vorgelegt von

Dipl. Biol. Emmanuel Johannes Kwabena Ampofo

geb. am 21.06.1983 in Bexbach

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
$A\lambda$	Absorption bei der Wellenlänge λ
A. dest.	destilliertes Wasser
ADPLD	„autosomal dominant polycystic liver disease“
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATF3	„activating transcription factor 3“
ATF4	„activating transcription factor 4“
ATF6	„activating transcription factor 6“
ATP	Adenosintriphosphat
β TRCP	„F-box/WD repeat-containing protein 1A“
BAP	„BiP-associated protein“
bp	Basenpaare
BiP	„immunoglobulin heavy chain-binding protein homolog“
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CHOP	„C/EBP-homologous protein“
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
CK1	Proteinkinase CK1

Abkürzungsverzeichnis

CK2	Proteinkinase CK2
cpm	„counts per minute“
CRE	„cAMP reponse element“
CREB	„cAMP-responsive element-binding protein
C-Terminus	Carboxyterminus
D	Aspartat
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
deion.	deionisiert
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
eIF	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER vermittelte Degradation
ERj1	„ER DnaJ-like protein 1“
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f	femto

Abkürzungsverzeichnis

FCS	fötales Kälberserum
GADD34	„growth arrest and DNA damage-inducible protein“
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	„green fluorescent protein“
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
IP	Immunpräzipitat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRE1	„inositol-requiring enzyme 1“
kDa	Kilodalton
μ	micro
MeOH	Methanol
Mdm2	„double minute 2 protein“
min	Minute
MG132	Proteasom-Inhibitor
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NP-40	Nonidet P40

Abkürzungsverzeichnis

Nrf2	„nuclear factor erythroid related factor-2“
N-Terminus	Aminoterminus
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	„phosphate buffered saline“
PCA	<i>p</i> -Cumarinsäure
PERK	„double stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase“
PHD1/3	„prolyl hydroxylase domain-containing protein 1/3“
PP1	„protein phosphatase 1“
PUMA	„p53 up-regulated modulator of apoptosis“
rH	Relative Luftfeuchtigkeit
RSK2	„ribosomal S6 kinase 2“
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Sepharose
SIL1	„nucleotide exchange factor SIL1“
SRP	Signalerkennungspartikel
T	Threonin
TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin

Abkürzungsverzeichnis

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
uORF	„upstream open reading frame“
ÜS	Überstand
UPR	„unfolded protein response“
VP	Vorpräzipitat
ZE	Zellextrakt
XBP1	„X-box-binding protein 1“
YFP	„yellow fluorescent protein“
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	3
3. EINLEITUNG	5
3.1 Das ER, ER-assoziierte-Funktionen und ER-Stress	5
3.2 Die Proteinkinase CK2 und ER-Stress	13
3.3 Zielsetzung der Arbeit	15
4. MATERIALIEN.....	16
4.1 Geräte Chemikalien und Enzyme	16
4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	16
4.1.2 Chemikalien	18
4.1.3 Radiochemikalien	19
4.1.4 Enzyme	20
4.1.5 Reaktionskits	20
4.2 Nährmedien für Bakterien.....	21
4.3 Molekulargewichtsmarker	21
4.3.1 DNA-Molekulargewichtsmarker	21
4.3.2 Protein-Molekulargewichtsmarker	21
4.4 Antikörper	21
4.4.1 Primärantikörper	21
4.4.2 Sekundärantikörper.....	22
4.5 Bakterienstämme	23
4.6 Humane Zelllinien.....	23
4.7 ATF4-Primer	24
4.8 Plasmide.....	25

4.9 Gereinigte, rekombinante Proteine	26
4.10 Puffer und Lösungen	27
5. METHODEN.....	32
5.1 DNA-Techniken.....	32
5.1.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion	32
5.1.2 Überlappende-PCR zu Erzeugung von Mutationen.....	34
5.1.3 Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen	34
5.1.4 Herstellung von Agarosegelen.....	35
5.1.5 Agarosegelelektrophorese	35
5.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
5.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	35
5.1.8 DNA-Sequenzierung	36
5.1.9 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien.....	36
5.1.10 Transformation von <i>E. coli</i>	36
5.1.11 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	37
5.2 Zellkulturtechniken.....	37
5.2.1 Zellkulturbedingungen	37
5.2.2 Passagieren der Zellen.....	37
5.2.3 Einfrieren von Zellen	38
5.2.4 Auftauen von Zellen	38
5.2.5 Beseitigung von Kontaminationen	38
5.2.6 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer.....	39
5.2.7 Transiente Transfektion mittels Turbofect®	39
5.2.8 Radioaktive <i>in vivo</i> Markierung von Proteinen	39
5.2.9 Cycloheximid-Behandlung von Zellen	40
5.3 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden	40
5.3.1 Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse	40
5.3.2 Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse (Membranproteine).....	40
5.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford.....	41
5.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
5.3.5 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	42
5.3.6 Westernblot-Analyse.....	42

5.3.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen	43
5.3.8 Immunpräzipitation.....	43
5.3.9 <i>In vitro</i> Phosphorylierungs-Assay	44
5.3.10 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen mit Peptidfiltern	44
5.3.11 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von gereinigten, rekombinanten Proteinen	44
5.3.12 Autoradiographie	45
5.3.13 Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Säugerzellen	45
5.3.14 Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Säugerzellen (Sec62)	46
5.3.15 BiFC-Analyse	46
5.3.16 Luciferase-Assay.....	46
5.3.17 Caspase-3/-7-Assay	47
5.3.18 Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i>	48
5.3.19 Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen.....	48
5.3.20 GST-„pull-down-assay“.....	49
5.3.21 ELISA-basierte-Bindungsstudien.....	49
6. ERGEBNISSE:	51
6.1 Sec63 und die Proteinkinase CK2.....	51
6.1.1 <i>In silico</i> Phosphorylierung von Sec63C.....	51
6.1.2 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von Sec63C.....	52
6.1.3 Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen mittels Sec63C-Fragmenten.....	53
6.1.4 Peptidfilter zur Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen	54
6.1.5 <i>In vitro</i> Bindung von Sec63C an die Proteinkinase CK2.....	56
6.1.6 Kollokalisierung von endogenem Sec62 mit endogener CK2 α -Untereinheit	57
6.1.7 <i>In vivo</i> Bindung von Sec63 an die Proteinkinase CK2.....	58
6.1.8 Biologische Relevanz der CK2-Phosphorylierung von Sec63.....	60
6.1.8.1 Auswirkung der CK2-Phosphorylierung des Sec63 auf die Bindung mit Sec62.....	60
6.1.8.2 Auswirkung der CK2-Hemmung auf die Sec63/Sec62-Bindung <i>in vivo</i>	61
6.2 ATF4 und die Proteinkinase CK2	64
6.2.1 <i>In silico</i> Phosphorylierung von ATF4.....	64
6.2.2 Herstellung von ATF4 und ATF4-Fragmenten zur Eingrenzung der CK2- Phosphorylierungsstellen	64
6.2.3 Bakterielle Expression und Reinigung von ATF4 und ATF4-Fragmenten	66
6.2.4 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von ATF4	67

6.2.5 <i>In vitro</i> Phosphorylierung der ATF4-Fragmente zur Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen	68
6.2.6 Erzeugung der ATF4-Phosphorylierungsmutanten	69
6.2.7 Bakterielle Expression und Reinigung der ATF4 Alanin-Mutanten	71
6.2.8 <i>In vitro</i> Phosphorylierungen der Alanin-Mutanten	72
6.2.9 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von ATF4 und ATF4 S215A durch die CK2 α -Untereinheit	73
6.2.10 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von ATF4 und ATF4 S215A durch die CK2 α' -Untereinheit	74
6.2.11 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von ATF4 durch die CK α' -Untereinheit in Anwesenheit der CK2 β -Untereinheit	75
6.2.12 Einfluss der Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2 an Position S215 auf die Phosphorylierung von ATF4 durch CK1 ϵ an Position S219.....	76
6.2.13 <i>In vitro</i> Bindungsstudien.....	77
6.2.13.1 <i>In vitro</i> Bindung des CK2-Holoenzym an ATF4.....	77
6.2.13.2 <i>In vitro</i> Bindung des CK2-Holoenzym an ATF4 S215A.....	78
6.2.13.3 <i>In vitro</i> Bindung von ATF4 und ATF4 S215A an die katalytischen CK2-Untereinheiten CK2 α , CK2 α' und an das CK2-Holoenzym	79
6.2.14 <i>In vivo</i> Bindung von ATF4 an die Proteinkinase CK2	80
6.2.14.1 Kolokalisation von endogenem ATF4 mit der endogener CK2 α -Untereinheit	81
6.2.14.2 Koimmunpräzipitation von ATF4 und endogener CK2	82
6.2.14.3 Koimmunpräzipitation von ATF4 S215A und endogener CK2	83
6.2.14.4 Koimmunpräzipitation von endogenem ATF4 und endogener CK2.....	84
6.2.14.5 BiFC-Analyse zur Lokalisierung der Bindung	85
6.2.15. Biologische Auswirkung der Phosphorylierung von ATF4	89
6.2.15.1 Auswirkungen der CK2-Phosphorylierung auf die subzelluläre Lokalisation des ATF4... ..	89
6.2.15.2 Vergleich der Proteinexpression von ATF4 und ATF4 S215A	90
6.2.15.3 Bestimmung der Stabilität von ATF4 und ATF S215A.....	91
6.2.15.4 Bestimmung der Stabilität der Phosphomimetik-Mutante ATF4 S215D	95
6.2.15.5 Auswirkung der CK2-Inhibition auf endogenes ATF4	97
6.2.15.6 ATF4-Genexpression nach CK2-Hemmung.....	98
6.2.15.7 Hemmung der CK2-Aktivität mittels dominant-negativer Mutanten	99
6.2.15.8 Auswirkung von steigenden ATF4-Mengen auf dessen transkriptionelle Aktivität	101
6.2.15.9 Auswirkung der Phosphorylierung auf die transkriptionelle Aktivität von ATF4	102
6.2.15.10 Auswirkung der Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten auf die Induktion der Apoptose.....	107

7. DISKUSSION	112
8. LITERATURVERZEICHNIS	138
9. PUBLIKATIONEN	157
DANKSAGUNG	158
LEBENS LAUF	159

1. Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen Strategien, um das uneingeschränkte Tumorstadium einzugrenzen, sind in den letzten Jahren Proteinkinasen immer stärker in den Vordergrund der Forschung gerückt. Besonders die Proteinkinase CK2 stellt ein geeignetes Zielmolekül in der Tumorthherapie dar. Seit Beginn ihrer Entdeckung sind mehr als 300 Substrate der CK2 identifiziert worden. Aber nicht nur die große Vielfalt an Substraten macht die CK2 interessant für die Tumorthherapie, sondern auch die Tatsache, dass man ihre Aktivität mit Inhibitoren bzw. Aktivatoren regulieren kann. Der derzeitige Forschungsschwerpunkt liegt auf der Hemmung der CK2-Kinaseaktivität, die in den meisten Tumorzelllinien zur Apoptose führt. Die grundlegenden molekularen Mechanismen, die zur Apoptose-Induktion führen, sind bisher weitestgehend unbekannt. Unsere Arbeitsgruppe zeigte erstmals, dass die Inhibierung der CK2-Kinaseaktivität ER-Stress induziert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit die Rolle der CK2 am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem damit verbundenen Signalweg der „unfolded protein response“ (UPR) untersucht werden. Obwohl das ER das größte eukaryotische Zellorganell ist, sind bis dato nur wenige Substrate der CK2 am ER und in der UPR identifiziert worden. Die Hauptaufgabe des ER ist die Faltung und Modifizierung von Sekretions- und Membranproteinen. Bevor jedoch die Proteine im ER-Lumen prozessiert werden können, müssen sie kotranslational über die ER-Membran transloziert werden. Der Translokationskanal, bestehend aus den Membranproteinen Sec61, Sec62 und Sec63, bildet dafür den Porenkomplex. Dabei fungiert Sec63 als Ko-Chaperon, da es über seine ER-luminale Domäne das Chaperon „immunoglobulin heavy chain-binding protein homolog“ (BiP) bindet. Durch die Interaktion mit BiP wird sowohl die Translokation, als auch die Faltung, der Proteine erleichtert. *In silico*-Analysen der Polypeptidkette von Sec63 zeigten vier putative CK2-Phosphorylierungsstellen (Serin 574, Serin 576, Threonin 581 und Serin 748). Alle vier Stellen sind in der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne lokalisiert. Die nachfolgenden *in vitro*-Phosphorylierungs-Experimente sowie Peptidfilter-Experimente zeigten, dass drei der vier putativen Stellen (Serin 574, Serin 576 und Serin 748) durch das CK2-Holoenzym phosphoryliert werden. Dabei dient Sec63 der CK2 nicht nur als Substrat, *in vivo* konnte zudem die Bindung der beiden Proteine detektiert werden. Darüber hinaus fördert die CK2-Phosphorylierung des Sec63 die Komplexbildung zwischen Sec63 und Sec62. *In vivo* zeigte sich nach Hemmung der CK2-Kinaseaktivität ein erhöhter Sec63- und Sec62-Proteingehalt. Neuesten Studien zufolge ist dies ein Zeichen von ER-Stress. Als Folge des ER-Stresses kommt es zellulär zur Expression von Chaperonen, Oxigenasen und weiteren Proteinen, die zur Regulation der ER-Homöostase essentiell sind. Dabei erfolgt die Induktion der Genexpression über die „unfolded protein response“ (UPR). Ein zentrales Molekül in der UPR ist der Transkriptionsfaktor ATF4. ATF4 reguliert die Balance zwischen Stress-Überwindung und Apoptose. Interessanterweise ist, neben

Sec63, auch ATF4 Substrat der CK2. *In silico* Analysen offenbarten zwölf putative CK2-Phosphorylierungsstellen in der ATF4-Polypeptidkette. Durch Generierung von ATF4-Fragmenten konnten die putativen Phosphorylierungsstellen auf zwei Aminosäuren, Threonin 213 und Serin 215, eingegrenzt werden. Die Erzeugung von Alanin-Mutanten zeigte letztendlich, dass Serin 215 von der CK2 phosphoryliert wird. Auch im Falle von ATF4 konnte neben der Phosphorylierung durch die CK2 eine Bindung an die CK2 *in vivo* festgestellt werden. Auf zellulärer Ebene hat der Verlust der Phosphorylierung drei fundamentale Auswirkungen: (i) Der Verlust der CK2-Phosphorylierung erhöht die Stabilität von ATF4, (ii) die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität induziert die ATF4-Expression und (iii) der Verlust der Phosphorylierung reduziert die transkriptionelle Aktivität von ATF4 drastisch.

Durch die Identifizierung von ATF4 und Sec63 als Substrate der Proteinkinase CK2 und die Aufklärung der biologischen Funktion der Phosphorylierungen wurden nicht nur zwei Substrate der CK2 am ER und dem dazugehörigen ER-Stress Signalweg gefunden, vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der CK2 direkte Auswirkung auf die ER-Homöostase hat. Die Störung der Translokation und die Reprimierung der transkriptionellen Aktivität eines Schlüsselproteins in der UPR könnten ausschlaggebend für die Induktion des ER-Stress nach CK2-Hemmung sein. Vor dem Hintergrund eines, in den meisten Tumorzellen, erhöhten Gehalt an ER-Stress-Proteinen könnte hier der Schlüssel der apoptotischen Wirkung der CK2-Hemmung liegen.

2. Summary

In search of alternative strategies for the inhibition of tumor growth, protein kinases are more and more attractive to cancer research. In this case, the protein kinase CK2 is a distinguishing target molecule. Since the beginning of the discovery of CK2, more than 300 substrates have been identified. Not only the essential role and the large number of substrates of CK2 but considerably more the regulation of the kinase activity of CK2 by inhibitors or activators make them an interesting tool for tumor treatment. At this time, the focus of research is on the inhibition of the CK2 kinase activity which leads to apoptosis in the most cancer cell lines. The molecular mechanisms of apoptosis that are dependent on CK2 inhibition are still unknown. In the present study, we could show that the inhibition of CK2 kinase activity induces ER stress. Here, the role of CK2 on the endoplasmic reticulum and its associated signalling pathway along with the unfolded protein response (UPR) were analysed. Whereas, the ER is the largest organelle in the eukaryotic cell, there are only a few substrates of CK2 identified on the ER and its UPR pathway. The main function of the ER is folding and modification of secretory and membrane proteins. However, before proteins are processed in the ER lumen, first they are cotranslationally translocated across the ER membrane. Necessary for the translocation is the translocation channel which consists of the membrane proteins Sec61, Sec62 and Sec63. In this channel, the function of Sec63 (translocation protein SEC63 homolog) is to bind the co-chaperone BiP (immunoglobulin heavy chain-binding protein homolog) at about the ER-luminal domain of Sec63. The binding of BiP on the N-terminus of Sec63 is crucial for efficient translocation of the polypeptide chain in the ER lumen and for the protein folding in the ER. *In silico* analysis of the polypeptide chain of human Sec63 have shown four putative CK2 phosphorylation sites (serine 574, serine 576, threonine 581 and serine 748). All sites are located at the C-terminus of Sec63. *In vitro* experiments as well as peptide filter assays have demonstrated that three of four putative phosphorylation sites are phosphorylated by CK2. In addition, Sec63 is not only a substrate of CK2 it is also a binding partner. The phosphorylation of Sec63 *in vitro* leads to an elevated complex formation of Sec63/Sec62. *In vivo*, the inhibition of CK2 kinase activity has shown an elevated protein level of Sec63 and Sec62. It is only recently that studies could demonstrate that an increase of these proteins is coupled to ER stress. As a consequence of ER stress, there is an enhanced expression of proteins like chaperones, oxygenases and many other proteins, which are all necessary for the ER homeostasis. The expression of these proteins is regulated by the UPR. The activating transcription factor 4 (ATF4) is a central component of the UPR and regulates the balance between apoptosis and cell survival. Interestingly, besides Sec63, ATF4 is a substrate of protein kinase CK2, too. *In silico* analyses have shown twelve putative phosphorylation sites in the polypeptide chain of ATF4. Using truncated peptides of ATF4, the phosphorylation sites were narrowed down to threonine 213 and

serine 215. To discriminate these two sites, alanine mutants of threonine 213 and serine 215 were generated. Phosphorylation experiments with their mutants have shown that serine 215 is phosphorylated by CK2. Also, besides the phosphorylation of ATF4 by CK2, ATF4 binds to CK2 *in vivo*. Finally, at cellular level, the phosphorylation of ATF4 showed three fundamental effects: (i) the loss of CK2 phosphorylation of ATF4 increased the stability of ATF4 (ii) the inhibition of CK2 kinase activity induced the expression of ATF4 and (iii) the loss of CK2 phosphorylation reduced the transcriptional activity of ATF4.

It has been shown that ATF4 and Sec63 are not only substrates of protein kinase CK2 furthermore the phosphorylation of both proteins is necessary for the maintenance of the ER homeostasis. The interruption of protein translocation and the repression of transcription activity by these two proteins seem to play a crucial role for the induction of ER stress after CK2 inhibition. This mechanism could be responsible for the apoptotic effect of CK2 inhibition.

3. Einleitung

3.1 Das ER, ER-assoziierte-Funktionen und ER-Stress

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist das größte in der Zelle vorkommende Membransystem. Es besteht aus miteinander verbundenen Membranvesikeln, dessen Hauptaufgabe die Synthese von Lipiden und Proteinen ist. Das ER bildet zwei mikroskopisch sichtbare Strukturen aus, zum einen das glatte ER, welches der Synthese der Fettsäuren und Phospholipiden dient und vorwiegend in Hepatozyten zu finden ist, zum anderen das raue ER, welches in den meisten eukaryotischen Zellen vorkommt und Ribosomen gebunden hat. Am rauhen ER findet die Synthese der Membranproteine und sekretorischen Proteine statt. Neben der Synthese von Proteinen und Lipiden hat das ER noch eine weitere wichtige Funktion: es sorgt für die richtige Faltung und Modifizierung von Proteinen. Mit einem System aus Proteinen, worunter sich Isomerasen, Glykosidasen und Chaperone befinden, stellt es sicher, dass Proteine korrekt gefaltet sind. Treten im Verlauf der Synthese dennoch fehlgefaltete Proteine auf, so werden diese über die ER-vermittelte Degradation (ERAD) entfernt.

Die eukaryotische Proteinsynthese wird in drei Schritte unterteilt: die Initiierung, Elongation und Termination. Für die Initiation unerlässlich sind mRNA, aminoactetylierte tRNA und Ribosomen, die in einer großen (60S) und einer kleinen (40S) ribosomalen Untereinheit organisiert sind. Zur funktionsfähigen Proteinsynthese werden zusätzliche Faktoren benötigt, wie zum Beispiel die eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren (eIF), die für eine Initiierung der Translation unabdingbar sind. Die Initiierung stellt ein erster und wichtiger Mechanismus dar, über welchen die Zelle Einfluss auf die Regulation des Endoplasmatischen Retikulums nehmen kann. Im Jahre 2000 entdeckten Sudhakar *et al.*, dass durch die Phosphorylierung von eIF2 α die Translation drastisch reduziert wird. Verantwortlich ist eine Komplexbildung von phosphoryliertem eIF2 α und eIF2 β , wodurch eIF2 β seine Guanosin-Austausch-Aktivität verliert [1]. Neuere Studien zeigten, zusätzlich zum Aktivitätsverlust von eIF2 β , eine reduzierte Synthese der ribosomalen RNA [2]. Verantwortlich für die Phosphorylierung von eIF2 α ist die in der ER-Membran lokalisierte Kinase PERK („double stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase“). Die Regulation der Initiierung der Proteinsynthese ist von großer Bedeutung für die ER-Homöostase. Kommt es zu Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen beziehungsweise Protein-Aggregationen, so kann über diesen Mechanismus die Zahl an Proteinen im ER-Lumen kontrolliert werden und verschafft somit der Zelle Zeit, auf die geänderten Bedingungen zu reagieren.

Nach Ausbildung des 80S-Ribosoms schließt sich der Elongationsvorgang an, dabei kommt es zur Transpeptidierung der Aminosäuren der Aminoacyl-tRNA. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt bis ein Stoppcodon auf der mRNA auftritt und die Proteinsynthese beendet wird. Nach heutigem Wissensstand existiert in höheren Eukaryoten ein ausschließlich kotranslatinaler Transport ins ER, was bedeutet, dass während der Elongation die naszierenden Polypeptidketten über die ER-Membran ins ER-Lumen transloziert wird. Für eine Assoziation der Ribosomen mit dem ER besitzen viele Proteine ein Signalpeptid, eine aus 6-12 hydrophoben Aminosäuren bestehende Sequenz, die die Bindung der Ribosomen am ER unterstützt. An die Signalsequenz bindet der Signalerkennungspartikel (SRP) und rekrutiert die Ribosomen zum SRP-Rezeptor, welcher mit dem Translocon assoziiert ist. Das Translocon ist ein komplexes Gebilde, bestehend aus mehreren Untereinheiten. Die Hauptkomponente des Translocons ist der kanalbildende trimere Komplex, bestehend aus den Untereinheiten Sec61 α , β , γ , wobei Sec61 nicht nur als Pore zur Peptid-Translokation dient, sondern auch in der Lage ist, Ribosomen selbst zu binden und somit als SRP-Rezeptor zu fungieren [3]. Ein Translocon, das nur aus Sec61 besteht, ist nicht imstande die Proteine fehlerfrei zu translozieren. Hierfür müssen weitere Komponenten am Translocon assoziiert sein. Darunter befinden sich zwei HSP40-verwandte Ko-Chaperone Sec63 und ERj1 [4, 5], zwei ER-luminale Chaperone GRP78 (BiP) und GRP170 sowie die Nukleotid-Austausch-Faktoren SIL1 und BAP (Abbildung 1) [6-8]. ERj1 ist ein in der ER-Membran lokalisiertes HSP40 Chaperon, das die Membran zweimal durchspannt und mit seiner ER-luminalen Domäne BiP und mit seiner zytoplasmatischen Domäne die Ribosomen bindet [9, 10]. Sec63 gehört wie ERj1 zur Gruppe der HSP40 Chaperone, allerdings mit dem Unterschied, dass es drei Transmembrandomänen besitzt, jedoch nur die ER-luminale Domäne in der Lage ist BiP zu binden [11]. Für die Bindung an Sec61 benötigt Sec63 ein weiteres ER-Membranprotein: Sec62. Sec63 bindet über seine zytoplasmatische Domäne an Sec62, wohingegen dieses wiederum über seine N-terminale zytoplasmatische Domäne sowohl an den Tunnelausgang der Ribosomen, als auch an Sec61 bindet. So stellt der Komplex aus Sec63/Sec62 ein direktes Pendant zu ERj1 dar (Abbildung 1) [12]. Während der Translokation übernimmt das, an die J-Domänen von Sec63 beziehungsweise ERj1 gebundene, BiP mehrere Aufgaben. Es fungiert als eine Art Protein-Translokase am Sec61 Kanal und bindet die translozierende Polypeptidkette [6, 13] und reguliert die Proteintranslokation durch Konformationsänderung des Kanals [14, 15].

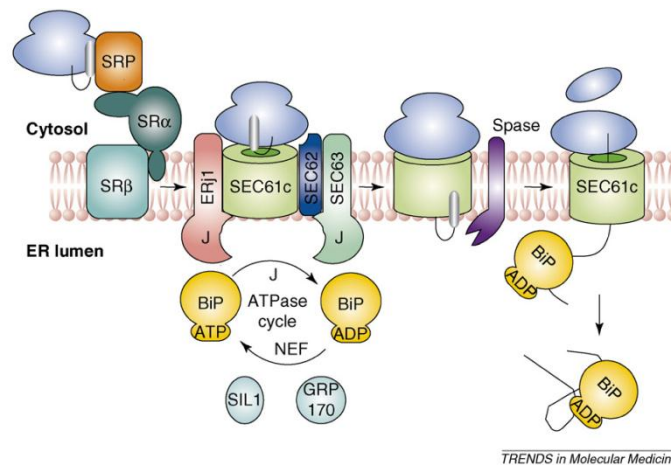


Abbildung 1: Kotranslationaler Proteintransport über die ER-Membran und die dazugehörigen Komponenten. Das SRP-Protein bindet an den SRP-Rezeptor und rekrutiert somit die Ribosomen zum Translocon. Anschließend wird die naszierende Polypeptidkette durch das Translocon ins ER-Lumen geschleust. Auf ER-luminaler Seite hilft BiP bei der Translokation und der Faltung der Polypeptidkette [16].

Gegenwärtig wird über eine Redundanz zwischen Sec63 und ERj1 diskutiert. Erste Experimente in *Saccharomyces cerevesiae* zeigten, dass humanes ERj1 vollständig die Aufgabe von Sec63p aus der Hefe übernehmen kann [17]. Allerdings spricht gegen die Theorie der Redundanz von Sec63 und ERj1, dass ein Verlust von Sec63 sich in der autosomalen dominanten polyzystischen Lebererkrankung (ADPLD) äußert. Zu dessen Ursprung führen entweder Mutationen im *PRKCSH* Gen, das für die β -Untereinheit der Glukosidase II kodiert, oder Mutationen im *Sec63* Gen, die die Akkumulation und Degradation des Proteins fördern [18]. Lange blieb die Verbindung des Verlusts von Sec63 mit der ADPLD ungeklärt. Fedeles *et al.* konnten eine Reduktion im Polycystin-1 Proteinlevel, einem für die Cilien-Morphogenese wichtigen Protein zeigen [19]. Neueste Untersuchungen zeigten, dass das „silencing“ von Sec63 zu einem verringerten Transport des Prionen Proteins führt und dass die Insertion des Wasser-spezifischen-Kanals Aquaporin 2 in die ER-Membran erleichtert ist [19]. Sec63 scheint somit für die Translokation bestimmter Proteine essentiell zu sein. Welche diese im Genauen sind, wird zurzeit mit Nachdruck erforscht.

Nach Proteinsynthese und Translokation ins ER finden im ER-Lumen fünf wichtige posttranslationale Modifikationen statt. Dazu gehören: Ausbildung der Disulfidbrücken, Faltung der Proteine, Anfügen von Kohlenhydratketten, proteolytische Prozessierung und Assemblierung multimerer Komplexe. Die Überprüfung der Faltung und Disulfidbrücken-Ausbildung gehört dabei zu den Hauptaufgaben der ER-Qualitätskontrolle. Verantwortlich für diese Prozesse sind Chaperone und Proteindisulfidisomerasen. Zu dieser Gruppe gehört auch GRP78 (BiP). Folglich ist BiP nicht nur an die J-Domänen von Sec63 und ERj1 gebunden, sondern ist auch zellulär an weiteren Stellen lokalisiert [20, 21]. Neben diesen Funktionen übernimmt BiP eine weitere überaus wichtige Funktion im ER. Es fungiert als eine Art Repressor für drei Singaltransduktoren des ER-Stress Signalweges.

ER-Stress kann durch viele Faktoren ausgelöst werden, wie zum Beispiel durch eine virale Infektion, freie Radikale, Hitze-Schock, Aminosäure-/Glukose-Mangel oder UV-Strahlung [22], und führt zwangsläufig zur Aktivierung des ER-Stress Signalwegs, der auch als „unfolded protein response“ (UPR) bezeichnet wird. Unter nicht-gestressten Bedingungen verhindert BiP die Induktion der UPR. Dies geschieht sowohl durch die ER-luminale Bindung von PERK („double stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase“) und IRE1 α/β („inositol-requiring enzyme 1“), wodurch deren Oligomerisierung und Autophosphorylierung verhindert wird, als auch durch Bindung von ATF6 („activating transcription factor 6“), einem in der ER-Membran lokalisiertem Transkriptionsfaktor. Kommt es jedoch durch einen der oben genannten Faktoren zur Induktion des ER-Stress Signalweges, so werden alle drei Induktoren aufgrund der BiP-Dissoziation aktiv, wodurch unterschiedliche Signalwege induziert werden (Abbildung 2). Allerdings spielt die Serin-/Threonin-Kinase PERK eine besondere Rolle in der Induktion der UPR, denn neben der Transkription von UPR-Zielgenen kommt es auch zu einer Reduktion der allgemeinen Proteinsynthese. Dies geschieht durch Phosphorylierung von eIF2 α an Position 51, wodurch es, wie bereits erwähnt, zur Komplexbildung zwischen eIF2 α und eIF2 β kommt und eIF2 β seine Guanosin-Austausch-Aktivität verliert [1]. Dabei konnten Harding *et al.* eine verstärkte Translation des „activating transcription factor 4“ (ATF4) feststellen [23]. Diese Beobachtungen widerlegt die bisherige Meinung, dass eine Reduktion der allgemeinen Proteinsynthese ausnahmslos alle Proteine betrifft. Weitere Analysen offenbarten einen bis dato einzigartigen Mechanismus über welchen ATF4 trotz Translationsstopp weiter synthetisiert werden kann. Die ATF4 mRNA enthält drei „upstream open reading frames“ (uORF) [23]. Die uORFs 1 und 2 befinden sich in 5'-Richtung der ATF4 codierenden Sequenz. Der uORF 3 befindet sich zu einem Teil in 5'-Richtung der codierenden Sequenz, zum anderen Teil innerhalb der Sequenz, wobei er nicht im Leserahmen der codierenden ATF4-Sequenz liegt. Unter nicht-gestressten Bedingungen werden alle drei uORFs translatiert. Kommt es jedoch durch Stress zur Aktivierung von PERK, mit nachfolgender eIF2 α Phosphorylierung und Reduzierung der aktiven ternären Komplexe, erhöht dies die Wahrscheinlichkeit der Ribosomen-Assemblierung am ATF4-Startcodon unter Verwendung der noch verbleibenden aktiven ternären Komplexe [24].

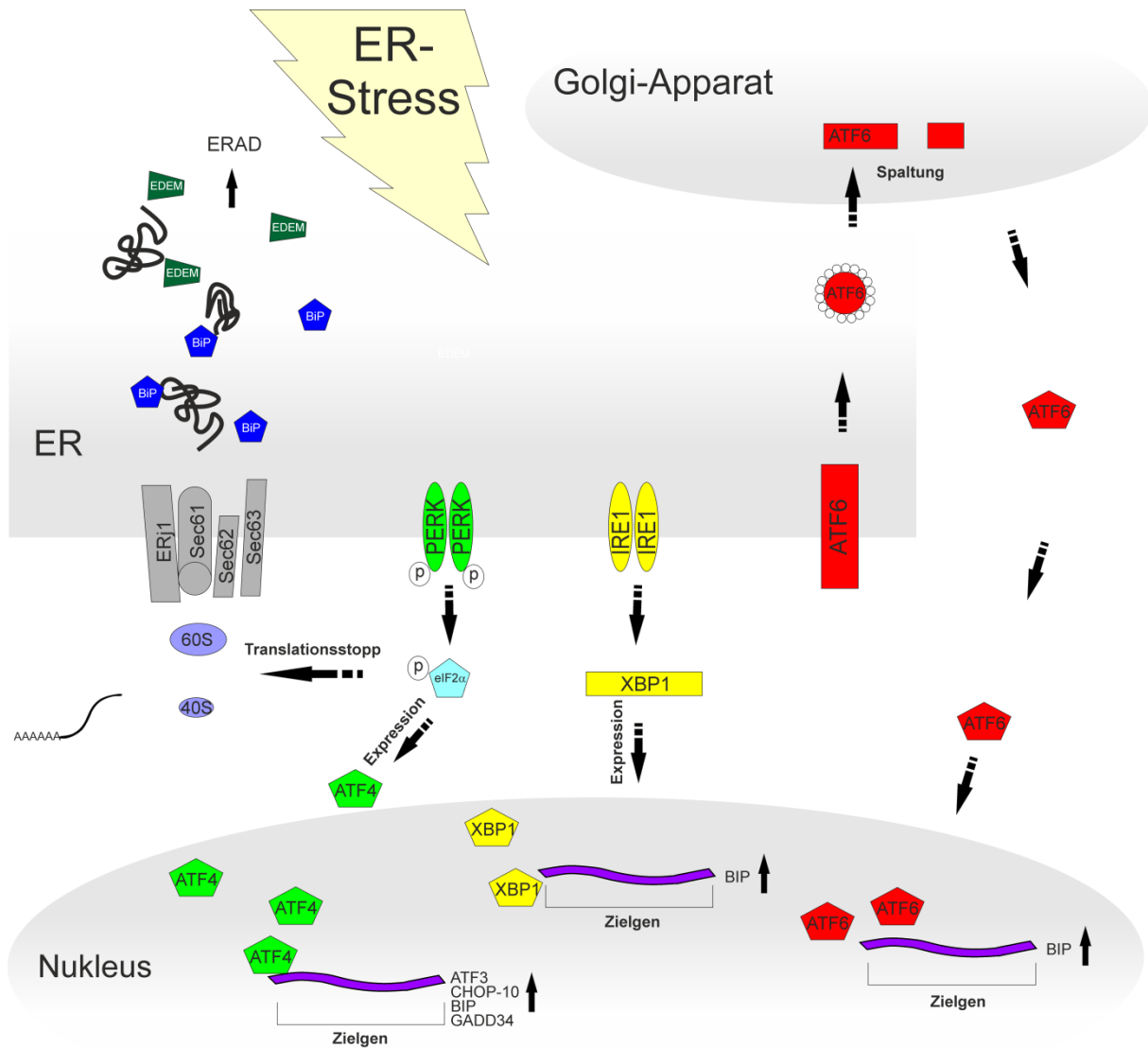


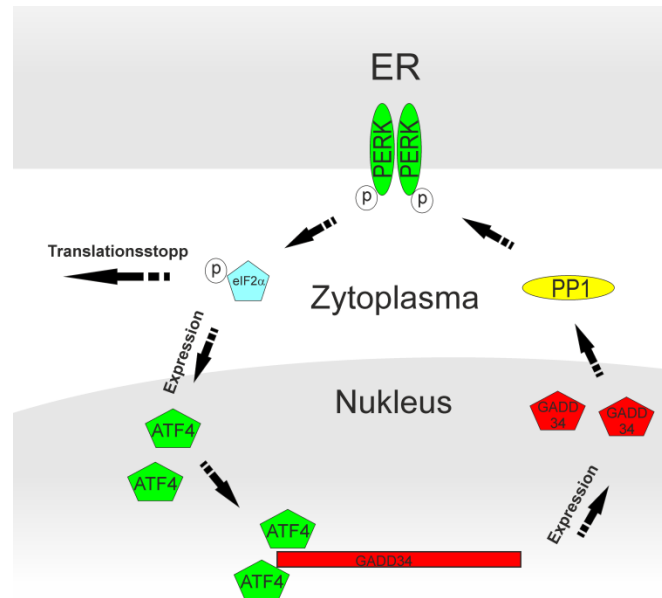
Abbildung 2: Schematischer Überblick über die einzelnen Signaltransduktionen nach ER-Stress. ER-Stress führt zur BiP-Dissoziation von den drei Signaltransduktoren (PERK, IRE1, ATF6), wodurch diese aktiv werden. Aktives PERK bewirkt die Reduktion der allgemeinen Translation. Im Zuge dessen kommt es dennoch zu Translation des Transkriptionsfaktors ATF4. Aktives IRE1 bewirkt die Translation des Transkriptionsfaktors XBP1. Aktives ATF6 wird in den Golgi-Apparat exportiert, dort prozessiert und fungiert nachfolgend wie ATF4 und XBP1 als Transkriptionsfaktor.

ATF4 ist ein Schlüsselprotein in der durch PERK induzierten UPR und gehört zur Familie der ATF/CREB Transkriptionsfaktoren, welche als Struktur einen basischen Leucin-Zipper ausbilden. Mitglieder der ATF/CREB Familie können sowohl Homodimere als auch Heterodimere bilden und auch mit anderen basischen Leucin-Zipper-Proteinen dimerisieren [25-27]. Bisher wurde ATF4 als Transkriptionsrepressor beschrieben, jedoch belegen neuere Untersuchungen vermehrt, dass ATF4 auch als Transkriptionsaktivator fungieren kann [28-34]. ATF4 ist in der Lage, wie die anderen Mitglieder der ATF-Familie, die Konsensussequenz „TGACGTCA“ zu binden, welche in den meisten cAMP responsiven Elementen (CRE) zu finden ist [35]. Durch die Bindung kommt es zur Expression

von Zielgenen wie ATF3, CHOP-10 und der Asparaginsynthetase [31, 34, 36]. Da ATF4 eine Schlüsselfunktion einnimmt, muss dessen Aktivität genauestens reguliert werden. Generell kann die Aktivität eines Proteins über dessen Expression, posttranslationale Modifizierung oder über Bindung an andere Proteine reguliert werden. Im Falle von ATF4 erfolgt die Regulation der Proteinexpression aufgrund der besonderen Promotorstruktur (uORF). Zudem kann ATF4 noch über drei weitere Mechanismen reguliert werden kann, wobei einer indirekt und zwei direkt Einfluss auf den ATF4-Proteingehalt nehmen. Indirekt bewirkt ein erhöhter ATF4-Proteingehalt eine verstärkte Transkription von ATF4-Zielgenen, worunter sich auch der Transkriptionsfaktor GADD34 befindet. GADD34 ist wiederum in der Lage, die Expression der Serin-/Threonin-Phosphatase PP1 zu induzieren, die die Phosphatgruppe an Serin 51 in der Polypeptidkette von eIF2 α entfernt [37, 38]. Auf diesem Weg wird die allgemeine Translation wieder vorangetrieben und die Translation von ATF4 erniedrigt (Abbildung 3a). Direkt wird ATF4 zum einem über Protein/Protein-Wechselwirkung reguliert. Gegenwärtig sind zwei Proteine bekannt, die mit ATF4 interagieren und somit Einfluss auf dessen Stabilität nehmen. Katschinski *et al.* konnten eine Bindung von ATF4 mit der „prolyl-4-hydroxylase domain 3“ (PHD3) nachweisen, wodurch es zu Stabilisierung von ATF4 kommt [39]. Einige Jahre später konnte auch eine Interaktion mit der „prolyl-4-hydroxylase domain 1“ (PHD1) gezeigt werden, welche eine Reduzierung der transkriptionellen Aktivität von ATF4 zur Folge hat [40]. Interessanterweise kommt es nach Bindung von PHD1 und PHD3, zu keiner Hydroxylierung von ATF4. Eventuell liegt hier ein noch völlig unbekannter Mechanismus der Regulation vor. Auch beim zweiten Protein, der Histon-Acetyltransferase p300, das ATF4 bindet und darüber stabilisiert, erfolgt dies unabhängig von deren Enzymaktivität [41, 42]. Normalerweise werden Proteine aufgrund ihrer Acetylierung stabilisiert. Ein gutes Beispiel dafür ist p53, das durch Acetylierung vor der Mdm2 vermittelten Ubiquitylierung geschützt ist [43]. Daher spekulieren die Autoren auch in diesem Fall, dass p300 über einen noch unbekanntes Mechanismus ATF4 stabilisiert. Ein weiterer und bei vielen Proteinen vorliegender Mechanismus zur Regulation der Stabilität ist die Beeinflussung der Halbwertszeit mittels Phosphorylierungen [44-46]. ATF4 ist davon nicht ausgeschlossen und wird gleich durch mehrere Kinasen phosphoryliert. Die Phosphorylierung von ATF4 durch die „ribosomal protein S6 kinase alpha 3“ (RSK2) spielt eine entscheidende Rolle in der terminalen Differenzierung von Osteoblasten. Ein Verlust der Phosphorylierung äußert sich in einer reduzierten Osteocalcin Expression [47]. Auch mehrere Phosphorylierungsstellen für „proline directed kinases“ (PDK's) wurden in der Polypeptidkette von ATF4 analysiert, welche alle nach Verlust der Phosphorylierung zu einer Stabilitätserhöhung führen [48]. Dabei ist Serin 219, in der Polypeptidkette von ATF4 zugleich, eine der am besten erforschten Phosphorylierungsstelle. Lassot *et al.* konnten in ihren Experimenten zeigen, dass das Protein β TRCP, eine Substrat-Erkennungskomponente des SCF-E3-Ubiquitin-Protein-Ligasekomplexes, mit, an Serin 219 phosphoryliertem ATF4, interagiert und es somit der

proteasomalen Degradation zuführt [49]. Allerdings konnten erst 2010 Tsai *et al.*, mit der Proteinkinase CK1, das für die Phosphorylierung verantwortliche Enzym identifizieren [48]. Abbildung 3b zeigt die Domänen in der ATF4-Polypeptidkette, welche zur direkten Proteinstabilisierung beitragen.

a)



b)

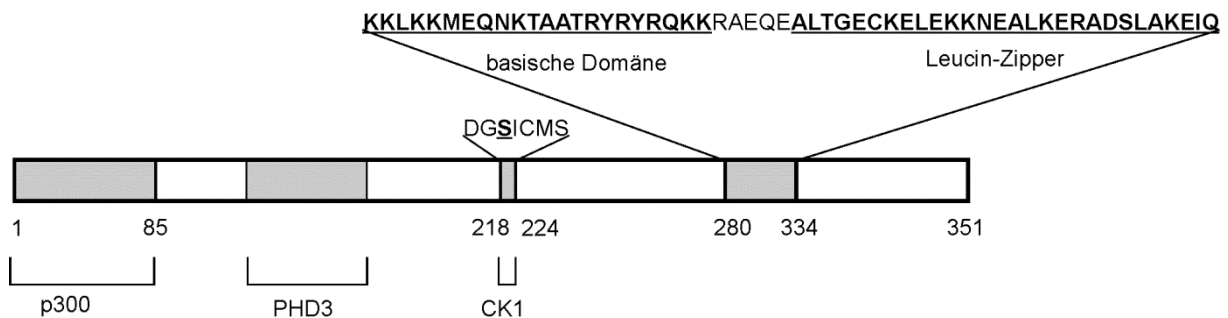


Abbildung 3: Schematische Darstellung der indirekten und direkten ATF4-Regulation **a.)** Durch die Aktivierung von PERK kommt es zur Phosphorylierung von eIF2 α . Der dadurch ausgelöste, allgemeine Translationsstopp führt zur Translation von ATF4, das wiederum die Expression von GADD34 begünstigt. GADD34 bewirkt die Expression der PP1, die anschließend PERK dephosphoryliert und somit inaktiviert. Durch die Inaktivierung von PERK wird die Translation wieder in Gang gesetzt und die ATF4-Expression wird reduziert. **b.)** Die ATF4-Polypeptidkette besteht aus 351 Aminosäuren. Die beiden linken grauen Boxen stellen die Bindungsstellen der Proteine p300 sowie PHD3 dar, die mittlere graue Box die Phosphorylierungsstelle der CK1 und die rechte graue Box die basische Domäne und Leucin-Zipper-Domäne.

ATF4 ist für die Transkription von Genen der UPR verantwortlich. Ziel der Expression ist es, der Fehlfaltung der Proteine entgegenzuwirken oder gegebenenfalls die Apoptose zu induzieren. Dabei stellen der „activating transcription factor 3“ (ATF3) und das „DNA damage-inducible transcript 3 protein“ (CHOP-10) Markerproteine der UPR dar [31, 50]. Mittlerweile konnte ein Zusammenhang zwischen der CHOP-10-Expression und der Apoptose aufgezeigt werden. Kilberg *et al.* konnten zeigen, dass CHOP-10 an den PUMA Promotor bindet und dessen Expression induziert [51]. PUMA gehört zur BH3-Familie pro-apoptotischer Proteine und wurde zunächst als Zielgen von p53 identifiziert [52]. Den direkten Zusammenhang zwischen PUMA und Apoptose demonstrierten „silencing“-Experimente der CHOP-10 mRNA, wodurch der PUMA mRNA-Gehalt und die Anzahl an apoptotischen Zellen deutlich reduziert wurde [51]. Auch ATF3 kann, wie ATF4, die Expression von UPR-Genen sowohl aktivieren als auch reprimieren. ATF3 ist ein Transkriptionsfaktor, der nicht nur in Richtung der Signaltransduktion fungiert, sondern auch die Expression von CHOP-10 und vor allem seine eigene Expression reprimieren kann [53, 54]. Dies verleiht ATF3 die Möglichkeit sowohl pro- als auch antiapoptotisch zu wirken.

Die Tatsache, dass die UPR in den meisten Tumoren gestört beziehungsweise verändert vorliegt, macht sie zu einem interessanten Zielobjekt für die Entwicklung therapeutischer Strategien. In den meisten Tumorzelllinien liegt die UPR in einem konstitutiv aktiven Zustand vor. Dies liegt zum einem an einer erhöhten sekretorischen Leistung vieler Tumoren, zum andern können hypoxische Bedingungen und eine erhöhte Stoffwechselrate die Expression von ER-Stress Genen induzieren [55-57]. Zurzeit werden mehrere Strategien getestet, Chemotherapeutika zu entwickeln, welche über Hemmung beziehungsweise Aktivierung der UPR die Apoptose induzieren. Besonders die Aktivierung der UPR ist hierbei von großem Interesse. Es scheint kontrovers zu sein, einen bereits aktiven Signalweg noch zu verstärken, jedoch ist diese Strategie im Fall der UPR sehr erfolgsversprechend. Eine zu hohe Aktivität kann die Balance zwischen Stressüberwindung hin zur Apoptose-Induktion verschieben [58-60]. Dies konnte schon mit mehreren Chemotherapeutika bestätigt werden, zum Beispiel mit dem Proteasominhibitor PS-341 (Bortezomid), sowie Brefeldin A [58, 59, 61]. Die Wissenschaft ist jedoch ständig auf der Suche nach neuen, noch effektiveren Substanzen, die das Tumorstadium arretieren oder gar die Apoptose einleiten und normales Gewebe weitestgehend unbeeinflusst lassen. Dabei haben Kinasen als chemotherapeutische Zielmoleküle in letzter Zeit immer stärker an Bedeutung gewonnen [62-65]. Dies hat zwei Gründe: (I) Viele Kinasen zeigen in Tumoren einen veränderten Proteingehalt beziehungsweise eine anormale Aktivität und (II) Ihre Aktivität lässt sich mittels spezifischer Aktivatoren oder Inhibitoren einfach regulieren. Aber nicht jede Kinase kommt als therapeutisches Zielmolekül in Frage. Interessant sind nur die Kinasen, die essentielle Funktionen in der Zelle übernehmen oder gar essentiell für das Überleben der Zellen sind. Solch eine exponierte Stellung nimmt die Proteinkinase CK2 ein. Über die Jahre sind viele

Hemmstoffe der Proteinkinase CK2 synthetisiert worden, wobei diese immer spezifischer wurden [66]. Viele Studien belegen, dass der Einsatz dieser spezifischen Hemmstoffe auch zur Induktion der Apoptose führen kann [67, 68]. Jedoch wurde bis heute der Mechanismus, über welchen die CK2-Hemmung ihre apoptotische Wirkung entfaltet, nicht geklärt. Ein erster Hinweis, dass die CK2-Hemmung ER-Stress erzeugt, konnte von unserer Arbeitsgruppe erbracht werden [69, 70]. Zudem konnten wir zeigen, dass ER-Stress, ausgelöst durch eine Hemmung der CK2, die Einleitung der Apoptose zum Teil begünstigt. Weitere Untersuchungen von Manni *et al.* bestätigten unsere Ergebnisse [71]. Allerdings konnte bis heute nicht geklärt werden, über welchen Mechanismus die CK2-Hemmung ER-Stress erzeugt. Die Klärung der Rolle der CK2 am Endoplasmatischen Retikulum und der Involvierung der CK2 in ER-assoziierten Funktionen könnte die Induktion des ER-Stresses, beziehungsweise die apoptotische Wirkung der CK2-Hemmung, erklären.

3.2 Die Proteinkinase CK2 und ER-Stress

Die Proteinkinase CK2 gehört nicht nur zu einer der ersten entdeckten Kinasen, sondern ist auch die Kinase mit den bis dato meisten Substraten [72]. Sie gehört zu Gruppe der CMCG-Kinasen und kommt in der Zelle ubiquitär vor [73]. Als Phosphotransferase kann sie neben den Aminosäuren Serin und Threonin in seltenen Fällen auch Tyrosin phosphorylieren [74], wobei sie als Konsensussequenz S/T-x-x-E/D erkennt [75]. Der CK2 kann sowohl ATP als auch GTP als Phosphatquelle dienen und ihre Aktivität ist unbeeinflusst von zyklischen Nucleosiden [76]. Jedoch haben zweiwertige Ionen wie Magnesium, Kalzium und Zink einen positiven Einfluss auf die CK2-Aktivität [77-79]. Strukturell besteht die CK2 aus zwei katalytischen α - beziehungsweise α' - Untereinheiten und zwei regulatorischen β -Untereinheiten, die zusammen ein Tetramer bilden. *In vitro* Studien belegen eine Funktion der katalytischen Untereinheiten als Monomere, allerdings ist dies *in vivo* sehr umstritten [80-82]. In den letzten 50 Jahren sind weit über 300 Substrate der CK2 identifiziert worden, die unterschiedlichste Funktionen in der Zelle übernehmen. Darunter befinden sich zum Beispiel Rezeptoren [83-85], Strukturproteine [86-88], Kanäle und deren Regulator-Proteine [89-93], sowie zahlreiche Transkriptionsfaktoren [94-97]. Aus dem überaus hohen Substratspektrum wird die essentielle Rolle der CK2 ersichtlich. Erfolglos wurden schon mehrere Versuche unternommen, „Knockout“-Mäuse für die einzelnen Untereinheiten CK2 α , CK2 α' und CK2 β zu generieren [98-100]. Ein „Knockout“ der CK2 α - und CK2 β -Untereinheit führt zur embryonalen Letalität [101], wohingegen ein „Knockout“ der CK2 α' -Untereinheit Infertilität bei männlichen Mäusen zeigt [102]. Welche Substrate die CK2 in der embryonalen Entwicklung durch Phosphorylierung oder Interaktion beeinflusst ist noch völlig unklar, jedoch konnte am Beispiel der adipogenen Differenzierung gezeigt werden, dass nach Hemmung der CK2 die Entwicklung von Fibroblasten zu Adipozyten unterbleibt

[103]. Neben der Störung der embryonalen Entwicklung durch Hemmung der CK2, führt die Hemmung dieser in den meisten Tumorzelllinien zur Induktion der Apoptose [69, 71, 98, 104, 105]. Gerade in Tumorzellen liegt im Vergleich zu normalen Zellen eine besonders hohe CK2 Kinaseaktivität vor. Worauf diese zurückzuführen ist, ist bis heute nicht geklärt, möglich wären chromosomale Aberrationen oder eine Erhöhung der Genexpression der CK2 selbst. Denkbar wäre zudem die Regulation der CK2-Aktivität durch zellulärer Faktoren, worunter mehrere Aktivatoren, aber auch Repressoren bekannt sind [106]. Aus dem großen Substratspektrum der CK2 wird allerdings nicht ersichtlich, weshalb die CK2-Hemmung erst zu ER-Stress und nachfolgend zu Apoptose führt. Grundsätzlich ist die CK2 am ER und in ER-assoziierten Funktionen wenig untersucht. Einen ersten Hinweis, dass die CK2 am ER dennoch eine wichtige Rolle spielt, konnte von unserer Arbeitsgruppe erbracht werden. Faust *et al.* konnten die Proteinkinase CK2 sowohl am Golgi als auch am ER lokalisieren [107]. Allerdings wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich der CK2 und ER-assoziierten Funktionen unternommen. In den darauffolgenden Jahren wurden zwei Hitze-Schock-Proteine (HSP), ein Hitze-Schock-Faktor (HSF) sowie ein co-HSP als Substrate der CK2 gefunden. Ein Zusammenhang zwischen CK2-Inhibition und ER-Stress war jedoch aus den Studien nicht ersichtlich [108-112]. Lediglich einige, wenige Substrate der CK2 konnten identifiziert werden, die möglicherweise, in Abhängigkeit der CK2-Phosphorylierung, Einfluss auf die Induktion von ER-Stress nehmen könnten. Dabei sind die Substrate in unterschiedlichen ER-assoziierten Ebenen angesiedelt. In der Translation, welche in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus verstärkt abläuft, konnten Substrate der CK2 identifiziert werden. Studien zeigten, dass die CK2 über Bindung und Phosphorylierung einiger eukaryotischer Translationsinitiationsfaktoren Einfluss auf die Translation nehmen kann [113-116]. Besonders interessant sind die Untersuchungen des eukaryotischen Initiationsfaktor 5 (eIF5) die zeigen, dass der Verlust der CK2-Phosphorylierung zur Zellzyklusprogression führt [117]. Im Translocon befindet sich ein weiteres Substrat der CK2. Unsere Arbeitsgruppe konnte das Transmembran Protein ERj1 als Substrat und Bindungspartner der CK2 identifizieren, wobei die Funktion dieser Phosphorylierung nicht geklärt werden konnte [118]. Es wird spekuliert, dass die CK2-Phosphorylierung von ERj1 möglicherweise Einfluss auf die Ribosomenanbindung ausübt oder die Translokation von Proteinen über die ER-Membran beeinflusst. In der UPR wurden die Transkriptionsfaktoren CHOP-10 und Nrf-2 als Substrate der CK2 identifiziert. Im Falle von CHOP-10 erniedrigt die Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität, wohingegen die Phosphorylierung von Nrf-2 zu einer verstärkten nukleären Lokalisation von Nrf2 führt [95, 97, 119].

3.3 Zielsetzung der Arbeit

Neben den weitreichend untersuchten Funktionen der CK2 in der Zelle allgemein, ist die Rolle dieser am beziehungsweise für das ER wenig erforscht. Erst die Entdeckung, dass die CK2-Hemmung ER-Stress erzeugt und diese letztlich zur Apoptose führt [69, 71], warf Fragen über die Funktion der CK2 am ER auf und führte dazu, die bekannten Fakten neu einzuordnen. Dabei stellte sich heraus, dass die apoptotische Wirkung der CK2-Hemmung möglicherweise auf Störung der UPR basiert. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Hypothese nachgegangen werden, indem weitere Substrate der CK2 aufgefunden werden sollten, die im direkten Zusammenhang mit dem ER beziehungsweise ER-assoziierten Funktionen stehen. Dabei sollten das ER-Transmembranprotein Sec63, das eine wichtige Funktion in der Translokation von Proteinen über die ER-Membran hat, und der Transkriptionsfaktor ATF4, welcher eine zentrale Komponente der UPR ist, als Substrate der CK2 identifiziert werden. Neben der Kartierung der Phosphorylierungsstellen beider Substrate, sollten auch deren zelluläre Auswirkungen analysiert werden, was dazu dienen soll, die Rolle der CK2 am ER und in ER-assoziierten Funktionen besser zu verstehen.

4. Materialien

4.1 Geräte Chemikalien und Enzyme

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

1.5 ml / 2 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth, Karlsruhe
15 ml / 50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
6- / 24- / 96-Lochplatte	Greiner, Nürtingen
100 mm / 60 mm Kulturschalen	Greiner, Nürtingen
Autoklav Varioklav®400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman, München
Brutschrank 6220 mit CO ₂ -Begasung	Heraeus, Hanau
Corexröhrchen	Corex®, U.S.A
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Filterpapier 3MM	Macherey-Nagel, Düren
Geltrockner	Fröbel Labortechnik, Lindau
Dialyseschlauch (Ausschlussgrenze: 1200-1800 Dalton)	Serva, Heidelberg
Hamilton MICROLITER Spritze	Hamilton, Bonaduz
Heizblock	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Infinite M200 Pro	Tecan, Crailsheim
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma, München
Labor-Glaswaren	Schott, Mainz
Magnetrührer MR3000, MR3002	IKA-Labortechnik, Staufen

Halb-Mikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Milli-Q Plus Wasserfiltrations-Reinigungssystem	Millipore, Schwalbach/Ts
Nucleobond-Säulen	Macherey Nagel, Düren
PhosphorImager Typhoon 9410	GE Healthcare, München
PVDF-Membran, Nitrocellulosemembran	Roche, Mannheim
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Szintillationsanalysator 190S AB/LA	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Parafilm M	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago
PCR Reader (Mastercycler Gradient)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Petrischalen 94 mm	Greiner, Nürtingen
PhosphorImaging-Platten (Storage Phosphor Screen)	Amersham Biosciences
Pipetten	Gilson, Villiers le Bel
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt
pH-Meter (pH537)	WTW, Weilheim
poly-Prep® Chromatography Columns	Bio-Rad, München
Röntgenfilm (AGVA Cronex 5)	AGFA-Gevaert, Belgien
Röntgenfilmentwicklermaschine	AGFA-Gevaert, Belgien
Universal Hood II-System	Bio-Rad, München
Ultraschallbad Transonic 460	Elma GmbH, Singen/Htw
UV-visible Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience
Wasserbad	GFL, Burgwedel

4.1.2 Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese® Gel30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aktivkohle	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
BioRad Protein Assay	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	PAA Laboratories, Österreich
CHAPS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete™, Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250 und R250	Boehringer, Ingelheim
Cycloheximid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) Mix	Thermo scientific, St. Leon-Rot
DMEM-Medium	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid	Boehringer, Ingelheim
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, Österreich
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Generuler™ DNA 1kb Marker	Thermo scientific, St. Leon-Rot
Glutamin	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Merck, Darmstadt

LB-Medium	Sigma-Aldrich, München
Luciferase-Reagenz	Roche, Mannheim
Luminol „Lumi-Light“	Roche, Mannheim
Lysepuffer (cell culture lysis 5x)	Promega GmbH, Mannheim
MG132	ENZO life sciences, Lörrach
Quinalizarin	Labotest. OHG, Niederschonä
Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Freiburg
Streptomycin	Biochrom, Berlin
TEMED	Sigma-Aldrich, München
TBB	Merck, Darmstadt
Tetracyclin	MP Biomedicals, Heidelberg
Thapsigargin	ENZO life sciences, Lörrach
TMB	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Trypanblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Turbofect® Transfektionsreagenz	Thermo scientific, St. Leon-Rot
sonstige Chemikalien Reinheitsgrad p.A.	Merck, Darmstadt; Merck; Darmstadt; Carl Roth, Karlsruhe

4.1.3 Radiochemikalien

[³⁵ S]-L-Methionin	Hartmann Analytic, Braunschweig
[³² P]-γ-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig

4.1.4 Enzyme

BamHI	Thermo scientific, St. Leon-Rot
CK2-Holoenzym	AG Montenarh, Uds
CK2 α	AG Montenarh, Uds
CK2 α'	AG Montenarh, Uds
CK2 β	AG Montenarh, Uds
CK1 ϵ	Pro. Dr. U. Knippschild, Ulm
EcoRI	Thermo scientific, St. Leon-Rot
Lysozym	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pfu DNA-Polymerase	Thermo scientific, St. Leon-Rot
RNase A	Thermo scientific, St. Leon-Rot
RNase A	Omega (Bio-Tek), Norcross GA
T4 DNA-Ligase	Thermo scientific, St. Leon-Rot
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Trypsin	Biochrom KG, Berlin

4.1.5 Reaktionskits

Nucleobond®AX plasmid purification Kit	Macherey-Nagel, Düren
Luciferase Assay Kit	Promega GmbH, Mannheim
PeqGold Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
Caspase Glo® Assay	Promega GmbH, Mannheim

4.2 Nährmedien für Bakterien

LB -Medium und LB-Platten (Luria-Bertani): 1% Trypton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7.0. Zur Herstellung von LB-Platten werden zu einem Liter LB-Flüssigmedium 2% Agar (w/v) gegeben und anschließend autoklaviert. Zur Selektionierung wird das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin (50 µg/ml), Tetracyclin (12.5 µg/ml) oder Kanamycin 25 µg/ml) zugegeben.

4.3 Molekulargewichtsmarker

4.3.1 DNA-Molekulargewichtsmarker

Der „GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder“ (Thermo scientific) dient zum Nachweis doppelsträngiger DNA. Aufgrund der 14 diskreten Fragmente können DNA-Fragmente von einer Größe zwischen 250 bp bis 10000 bp unterschieden werden. Für eine Analyse werden 2-5 µl des Markers mit einer Konzentration von 0.5 µg/µl eingesetzt.

4.3.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ (Thermo scientific) ist ein Proteinstandard mit sechs Proteinen, die ein Molekulargewichtsspanne von 20 bis 120 kDa abdecken (117 kDa: β -Galaktosidase (*E. coli*); 85 kDa: Rinderserumalbumin (Rinderplasma); 48 kDa: Ovalbumin (Hühnereiweiß); 34 kDa: Carboanhydrase (Rindererythrocyten); 26 kDa: β -Lactoglobulin (Rindermilch); 21 kDa: Lysozym (Hühnereiweiß)). Der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ ist zur Darstellung der Proteinauftrennung während der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, zur Verifizierung der Transfereffizienz auf PVDF-, Nylon- und Nitrocellulosemembranen sowie zur Abschätzung der Proteingröße geeignet.

4.4 Antikörper

4.4.1 Primärantikörper

α -Tubulin

- α -Tubulin wird mit dem Anti- α -Tubulin-Antikörper der Firma Sigma-Aldrich detektiert.

ATF4:

- ATF4 wird mit dem polyklonalen Antikörper sc-200 der Firma Santa Cruz nachgewiesen.

ATF3:

- ATF3 wird mit dem monoklonalen Antikörper sc-188 der Firma Santa Cruz nachgewiesen.

CK2:

- Zur Detektion der katalytischen Untereinheiten CK2 α werden der monoklonale Antikörper 1A5 [120] sowie das Anti-Peptid-Serum #26 verwendet (Aminosäuren 360-371 der Polypeptidkette CK2 α -Untereinheit).
- Zur Detektion der regulatorischen Untereinheit CK2 β werden der monoklonale Antikörper 6D5 [120] sowie das Anti-Peptid-Serum #269 verwendet (Aminosäuren 206-215 der Polypeptidkette CK2 β -Untereinheit).

GFP:

- Das GFP- sowie das YFP-Protein werden mit einem anti-GFP-Antikörper (# ab1218) der Firma Abcam detektiert.

GAPDH:

- Zur Detektion der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase wird der polyklonale Kaninchenantikörper FL-335 der Firma Santa Cruz benutzt.

GST:

- Das GST-tag wird mit dem Anti-GST-Antikörper (# 27-4577) der Firma Pharmacia biotech nachgewiesen.

FLAG:

- Das FLAG-tag wird mit dem monoklonalen Anti-FLAG-Antikörper (# F 3165) der Firma Sigma-Aldrich nachgewiesen.

4.4.2 Sekundärantikörper

Für die Westernblot-Analysen mit primären Mausantikörpern wird ein Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper, für die Analysen mit primären Kaninchenantikörpern ein Ziege-

Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper der Firma Dianova (Hamburg) verwendet. Die in dieser Arbeit gebräuchlichen Verdünnung sind: 1:10.000 bzw. 1:30.000.

Zur Immunfluoreszenz werden Sekundärantikörper verwendet, an denen ein AlexaFluor-Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist. Für einen primären Mausantikörper wird ein Ziege-Anti-Maus-Ig-AlexaFluor488-Antikörper, für die primären Kaninchenantikörper ein Ziege-Anti-Kaninchen-Ig-AlexaFluor594-Antikörper (Molecular Probes, Eugene, USA), verwendet.

4.5 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1 blue: Der Bakterienstamm besitzt eine Tetracyclinresistenz und wird zur Plasmidamplifikation verwendet.

Escherichia coli BL21(DE3): Der Bakterienstamm wird zur Expression rekombinanter Proteine verwendet.

4.6 Humane Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Name	ATTC-Nummer	Beschreibung
HeLa	CCL-2	Humane epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie; wächst als Monolayer
HepG2	HB-8065	Humane hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie; epithelartige Zellen, adhären als Monolayer wachsend
HCT-116	CCL-247	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie; besitzt p53-Wildtyp; adhären als Monolayer wachsend

4.7 ATF4-Primer

Tabelle 2: Primer

Funktion	Sequenz von 5' zu 3'	Schnittstelle	Orientierung
Mutagenisierungsprimer für S215D	GCCACTATCATTATCGTCAGGG GTGTCTTCCTC	Keine	3'
Mutagenisierungsprimer für S215D	GAGGAAGACACCCCTGACGAT AATGATAGTGGC	Keine	3'
ATF-4 Rückwärtsprimer für FLAG-Vektoren	AGAGAGGGATCCCTAGGGGAC CCTTTT	BamHI	5'
Mutagenisierungsprimer für S184A/T189A	ATCTCCTTCGGCGATATCCA CGGCGCCGAGCTC	Keine	3'
Mutagenisierungsprimer für S184A/T189A	GAGCTGGGCGCCGAAGTGGAT ATCGCCGAAGGAGAT	Keine	5'
Mutagenisierungsprimer für T213A/S215A	GCCACTATCATTATCGGCAGG GGCGTCTTCCTC	Keine	3'
Mutagenisierungsprimer für T213A/S215A	GAGGAAGACGCCCTGCCGAT AATGATAGTGGC	Keine	3'
ATF-4 (Aminosäure 1-200)	AGAGAGGAATTCTCAGTAAGCA GTGTA	EcoRI	3'
ATF-4 (Aminosäure 190-351)	AGAGAGGGATCCATGGAAGGA GATAGG	EcoRI	5'
Klonierungsprimer für ATF4, mit Stopcodon	AGAGAGGAATCCTCAGGGGAC CCTTTT	EcoRI	3'
Klonierungsprimer für ATF-4 in pGEX-4T1	AGAGAGGGATCCATGACCGAA ATGAGC	BamHI	5'
Mutagenisierungsprimer für S215A	GCCACTATCATTATCGGCAGGG GTGTCTTCCTC	Keine	3'
Mutagenisierungsprimer für S215A	GAGGAAGACACCCCTGCCGATA ATGATAGTGGC	Keine	5'
Mutagenisierungsprimer für T213A	ATCATTATCTGAAGGGGCGTCT TCCTCCTTTAT	Keine	3'
Mutagenisierungsprimer für T213A	ATAAAGGAGGAAGACGCCCTT CAGATAATGAT	Keine	5'

Mutagenisierungsprimer für T189A	CTTCCTATCTCCTTCGGCGATAT CCTTCACT	Keine	3'
Mutagenisierungsprimer für T189A	AGTGAAGTGGATATCGCCGAA GGAGATAGGAAG	Keine	5'
Mutagenisierungsprimer für S184A	AGTGATATCCACTTCGGCGCCC AGCTCTAAACT	Keine	3'
Mutagenisierungsprimer für S184A	AGTTTAGAGCTGGGCGCCGAA GTGGATATCACT	Keine	5'

4.8 Plasmide

Tabelle 3: Plasmide

Name	Beschreibung	Hersteller
p3xFlag-ATF4	cDNA des humanen ATF4	E. Ampofo
p3xFlag-ATF4 S215A	cDNA des humanen ATF4 mit Austausch von Serin 215 zu Alanin	E. Ampofo
p3xFlag-ATF4 T213A/S215A	cDNA des humanen ATF4 mit Austausch von Threonin 213 zu Alanin und Serin 215 zu Alanin	E. Ampofo
p3xFlag-ATF4 S184A/S189A	cDNA des humanen ATF4 mit Austausch von Serin 184 und Serin 189 zu Alanin	E. Ampofo
pGEX4T-1 ATF4 AS 6-92	Fragment der cDNA des humanen ATF4 (codiert die AS 6-92)	G. Thiel
pGEX4T-1 ATF4 AS 94-351	Fragment der cDNA des humanen ATF4 (codiert die AS 94-351)	G. Thiel
pGEX4T-1 ATF4 AS 173-351	Fragment der cDNA des humanen ATF4 (codiert die AS 173-351)	N. Schneider
pGEX4T-1 ATF4	cDNA des humanen ATF4	E. Ampofo
pGEX4T-1 ATF4 T213A	cDNA des humanen ATF4 mit Austausch von Threonin 213 zu Alanin	E. Ampofo
pGEX4T-1 ATF4 S215A	cDNA des humanen ATF4 mit Austausch von Serin 215 zu Alanin	E. Ampofo
pGEX4T-1 ATF4 T213A/S215A	cDNA des humanen ATF4 mit Austausch von Threonin 213 zu Alanin und Serin 215 zu Alanin	E. Ampofo
pGEX4T-1 ATF4 S184A/S189A	cDNA des humanen ATF4 mit Austausch von Serin 184 und Serin 189 zu Alanin	E. Ampofo

pGEX4T-1 ATF4 AS 1-200	Fragment der cDNA des humanen ATF4 (codiert die AS 1-200)	E. Ampofo
pGEX4T-1 ATF4 AS 190-351	Fragment der cDNA des humanen ATF4 (codiert die AS 190-351)	E. Ampofo
pGEX4T-1 ATF4 AS 190-351 mit T213A	Fragment der cDNA des humanen ATF4 von AS 190-351 mit Austausch von Threonin 213 zu Alanin	E. Ampofo
pGEX4T-1 ATF4 AS 190-351 mit S215A	Fragment der cDNA des humanen ATF4 (codiert die AS 190-351) mit Austausch von Serin 215 zu Alanin	E. Ampofo
YN-CK2 α	cDNA von Huhn CK2 α mit N-terminalem Fusionsanteil von YFP (Codon 1-154)	E. Ampofo
YN-CK2 α	cDNA von Huhn CK2 α mit N-terminalem Fusionsanteil von YFP (Codon 155-238)	E. Ampofo
YN-CK2 β	cDNA von Maus CK2 β mit N-terminalem Fusionsanteil von YFP (Codon 1-154)	E. Ampofo
YN-CK2 β	cDNA von Maus CK2 β mit N-terminalem Fusionsanteil von YFP Codon (155-238)	E. Ampofo
pEYFPc1(YN)	YFP Codon (1-154)	C. Götz
pEYFPc1(YC)	YFP Codon (155-238)	C. Götz
YN-ATF4	cDNA des humanen ATF4 mit N-terminalem Fusionsanteil von YFP (Codon 1-154)	E. Ampofo
YC-ATF4	cDNA des humanen ATF4 mit C-terminalem Fusionsanteil von YFP (Codon 1-154)	E. Ampofo
pGL3-5'ATF4	uORF1 und uORF2 des Maus <i>ATF4</i> -Gens	Addgene #21850
pGL3-2xCHOP AARE	Zweifache AARE-Sequenz des CHOP-Promotors	A. Bruhat
pGL3-5'ATF3	Sequenz des ATF3-Promotors (Nukleotide -1850 bis +34)	G. Thiel
pGL4.70[hRluc]	cDNA der <i>Renilla reniformis</i>	Promega, Mannheim

4.9 Gereinigte, rekombinante Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten gereinigten, rekombinanten Sec62- und Sec63-Fusionsproteine wurden von der Arbeitsgruppe Zimmermann zur Verfügung gestellt [12]. In Tabelle 4 sind die gereinigten, rekombinanten Proteine aufgelistet.

Tabelle 4: Gereinigte, rekombinante Fusionsproteine

Name	Aminosäuren (N-Terminus nach C-Terminus)
Sec62N	1-195
GST-Sec63C	210-760
GST-Sec63C-N1	210-733
GST-Sec63C-N2	210-508
GST-Sec63C-C1	509-630
GST-Sec63C-C2	531-733
GST-Sec63C-C3	733-760

4.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
APS	Ammoniumpersulfat 10% gelöst in H ₂ O dest.
Kinasepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 50 µM ATP
Coomassie-Blau-Färbelösung	0.2% Coomassie R250 0.01% Coomassie G250 50% Methanol 10% Essigsäure 39.79% H ₂ O dest.
CK2-Reaktionsmix	41.6 mM Tris-HCl, pH 8.5 250 mM NaCl 8.4 mM MgCl ₂

	2 mM DTT 84 mM ATP 0.32 mM synthetisches Peptid (Sequenz: RRRDDDSDDD)
Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig)	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) Bisacrylamid
Blockpuffer für Westernblot	0.1% (v/v) Tween20 5% (w/v) Trockenmilch in PBS (1x), (pH 7.4)
DAPI-Stammlösung	5 µg/ml in PBS (1x), (pH 7.4)
Elektrophoresepuffer (10x)	250 mM Tris-HCl, pH 8.8 1.92 M Glycin 35 mM SDS
Extraktionspuffer (Zellfraktionierung)	25 mM Tris-HCl, pH 10.5 1 mM EDTA 0.5 M NaCl 10 mM 2-Mercaptoethanol 0.5% Triton X-100
GST-„pulldown“-Puffer (Sec62/Sec62-Bindung)	20 mM HEPES-KOH, pH 7.5 150 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 0.65% CHAPS
Neutralisationspuffer (Zellfraktionierung)	100 mM Tris-HCl, pH 7.0 10 mM 2-Mercaptoethanol 0.5% Triton X-100
Waschpuffer (Zellfraktionierung), pH 6.2	10 mM MES 10 mM NaCl 1.5 mM MgCl ₂ 10% (v/v) Glycerin 1 mM EGTA 5 mM DTT

Lysepuffer (Zellfraktionierung), pH 6.2	Zusammensetzung wie Waschpuffer +1% (v/v) NP40
Fixierlösung für Immunfluoreszenz	3.7% Formalin in PBS (1x), (pH 7.4)
Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenz)	2% BSA 0.2% Triton X-100 in PBS (1x), (pH 7.4)
PBS (1x)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , (pH 7.4)
R1-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 7.8 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 0.1% Tween 20 1 mg/ml Lysozym
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 150 mM NaCl 0.5% Natriumdesoxycholat 1% Triton X-100 0.1% SDS
RIPA-Puffer (Membranproteine)	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 150 mM NaCl 0.5% Natriumdesoxycholat 1% Triton X-100 0.1% SDS 1% NP40 0.65% CHAPS
SDS-Probenpuffer	200 mM DTT 120 mM Tris-HCl, pH 6.8 10 mM β-Mercaptoethanol

	20% (v/v) Glycerin 0.02% Bromphenolblau 4% (w/v) SDS
TAE-Puffer (10x)	400 mM Tris 10 mM EDTA 200 mM Na-Acetat
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 2 mM EDTA
TMK ₁₀₀ -Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 8.0 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂
Transferpuffer (10x)	200 mM Tris-HCl, pH 8.3 1.5 M Glycin
TfBI (Transformationspuffer für <i>E. coli</i>)	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin
TfBI (Transformationspuffer für <i>E. coli</i>)	10 mM Na-Mops, pH 7.0 10 mM KCl 75 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin
Trypsin/EDTA-Lösung	0.25% (w/v) Trypsin 0.1% (w/v) EDTA
Waschpuffer für Westernblot	0.1% (v/v) Tween20 1% bzw. 5% (w/v) Trockenmilch in 1 x PBS, pH 7.4
Extraktionspuffer für Koimmunpräzipitation	20 mM Tris-HCl, pH 7.4 137 mM NaCl

	1 mM EDTA 1.5 mM MgCl ₂ 0.2% NP40 2 mM DTT 35 μM ATP
Gellösung B	4 g SDS 181.5 g Tris-HCl, pH 8.8 ad 1000 ml H ₂ O
Gellösung C	4 g SDS 60 g Tris-HCl, pH 6.8 ad 1000 ml H ₂ O
Luminol-Lösung	1M Tris-HCl, pH 8.5 Luminol, gelöst in DMSO 250 mM PCA, gelöst in DMSO 90 mM
H ₂ O ₂ -Lösung	1 M Tris, pH 8.5 30% H ₂ O ₂
Entfärbe-Lösung	10% Eisessig 20% Methanol 70% diH ₂ O

5. Methoden

5.1 DNA-Techniken

5.1.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient dazu, DNA-Abschnitte zu modifizieren oder zu amplifizieren. Für einen PCR-Lauf benötigt man eine DNA-Matrize, zwei Primer, die die Matrize flankieren, eine temperaturstabile DNA-Polymerase, sowie Desoxyribonukleotid-Triphosphate. Die PCR besteht aus 25-30 Zyklen, wobei jeder Zyklus nochmals in drei Phasen unterteilt wird. Die erste Phase ist eine Denaturierungsphase, hierbei wird die DNA bei einer Temperatur von 94°C in Einzelstränge zerlegt. Es schließt sich eine „Annealing“-Phase an. In dieser kommt es zur Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen der Matrize. Die letzte Phase ist die Elongation, in der der Gegenstrang der Matrize synthetisiert wird. Es ist heutzutage üblich, DNA-Polymerasen zu verwenden, die eine Korrekturlese-Funktion besitzen. Dies hat den Vorteil, dass Mutationen, die während der Synthese entstehen, beseitigt werden. Lediglich bei der Überprüfung einer Klonierung (Kolonie-PCR) werden Polymerasen ohne Korrekturlese-Funktion verwendet.

Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Komponenten	50 µl Reaktionsvolumen	Endkonzentration
Nuklease-freies Wasser	ad 50 µl	
5x Phusion-Puffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM
10 µM 3' Primer	2.5 µl	0.5 µM
10 µM 5' Primer	2.5 µl	0.5 µM
Template DNA	0.5 µg	10 ng/µl
Phusion-DNA-Polymerase	0.2 µl	1 Unit

Tabelle 7: Bedingungen der PCR

Reihenfolge	Temperatur	Zeit
1	95°C	1 min
2	95°C	0.5 min
3	51°C	0.75 min
4	72°C	2.5 min
5	72°C	10 min

} (2-4) x 30 Zyklen

Die Kolonie-PCR ist eine einfache und schnelle Methode, um eine große Anzahl an Bakterien- oder Hefeklone auf Anwesenheit eines Plasmids bzw. genomischer DNA-Abschnittes zu überprüfen. Hierbei wird die Integration des Inserts in die verschiedenen Vektoren überprüft. Dazu werden die einzelnen Klone von einer Agar-Selektionsplatte „gepickt“ und mittels PCR mit vektorspezifischen Primern auf Anwesenheit des Inserts überprüft.

Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Komponenten	20 µl Reaktionsvolumen
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl
10x Taq-Puffer	2 µl
10 mM dNTPs	0.4 µl
10 µM 3' Primer	1 µl
10 µM 5' Primer	1 µl
Template DNA	variabel
Taq-DNA-Polymerase	0.4 µl

Tabelle 9: Bedingungen der PCR:

Reihenfolge	Temperatur	Zeit
1	95°C	1 min
2	95°C	0.5 min
3	51°C	0.75 min
4	72°C	1.5 min
5	72°C	5 min

} (2-4) x 30 Zyklen

5.1.2 Überlappende-PCR zu Erzeugung von Mutationen

Mit dieser Methode lassen sich an beliebigen Positionen in einem DNA-Abschnitt Mutationen einfügen. Zu Beginn werden Primer hergestellt, die sich in einem oder mehreren Nukleotiden von der zu amplifizierenden DNA-Matrize unterscheiden. Die Generierung einer oder mehrerer Mutation erfordert zwei PCR-Läufe. In der ersten PCR finden zwei parallele PCR-Läufe statt. In einem PCR-Lauf wird der Primer verwendet, der an das 5'-Ende bindet und die Mutation beinhaltet, in dem anderen PCR-Lauf wird der Primer verwendet, der an das 3'-Ende bindet und die Mutation trägt. Nach Beendigung der beiden PCR-Reaktionen werden die PCR-Produkte elektrophoretisch über ein Agarosegel aufgetrennt und gereinigt. Anschließend werden die komplementären 3'-Enden der aufgereinigten PCR-Produkten hybridisiert. Hierzu werden 60 fmol der PCR-Produkte in 20 µl TE-Puffer bei 95°C denaturiert und auf RT abgekühlt. Die nachfolgende zweite PCR mit einer Polymerase ohne Korrekturlese-Funktion dient zum Auffüllen der 3'-Enden nach der Hybridisierung und der Amplifikation des gesamten DNA-Fragments.

5.1.3 Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, bestimmte DNA-Sequenzen zu erkennen und diese durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung spezifisch zu spalten. Ein Restriktionsansatz besteht aus der zu spaltenden DNA und dem Restriktionsenzym. Gelöst ist der Ansatz in einem für die Aktivität des Restriktionsenzym spezifischen Puffer. Für eine effektive Spaltung der DNA wird der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI (Thermo scientific, St. Leon-Rot) verwendet.

5.1.4 Herstellung von Agarosegelen

Zur Herstellung eines 1% Agarosegels wird 1% Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Nach Abkühlen auf etwa 40°C wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.625 µg/ml zugegeben, wodurch doppelsträngige DNA- und RNA-Moleküle sichtbar gemacht werden. Danach wird die Agarose-/Ethidiumbromid-Lösung direkt in eine vorbereitete Gießapparatur gefüllt und unter einem Abzug abkühlen gelassen.

5.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt ein physikochemisches Verfahren zur Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld dar. Dabei wandert die DNA aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrats im elektrischen Feld durch die Poren des Agarosegels in Richtung der Anode. Zur Überprüfung einer PCR oder eines Restriktions-Verdau wird der Ansatz geleelektrophoretisch über ein 1% Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V aufgetrennt. Dazu werden die entsprechenden DNA-Mengen mit TAE-Ladepuffer versetzt. Als DNA-Marker wurde der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder verwendet. Nach der Elektrophorese wird die DNA mit dem Universal Hood II-System der Firma BioRad detektiert. Die durch Ethidiumbromid sichtbar gemachten DNA-Banden werden aus dem Agarosegel geschnitten und nachfolgend mit Hilfe des „peqGold-Gel Extraktions-Kit“ der Firma Peqlab isoliert. Die exakte Vorgehensweise kann dem Protokoll der Firma entnommen werden.

5.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm. Aus dem Verhältnis der OD_{260nm} und der OD_{280nm} erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte für DNA 1.8 sein und für RNA größer als 1.9 sein. Die DNA-Konzentration ergibt sich aus der Beziehung $OD_{260} \cdot 1 = 50 \mu\text{g/ml DNA}$.

5.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation kommt es zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem freien 5'-Phosphat-Ende und dem freien 3'-Hydroxyl-Ende der DNA. Diese Reaktion wird mittels T4-DNA-Ligase und ATP katalysiert. Die Reaktion erfolgt innerhalb einer Stunde bei 22°C.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Ligations-Ansatzes

Komponenten	40 µl Reaktionsansatz
diH ₂ O	auf 40 µl
T4-DNA-Ligase Puffer 10x	4 µl
Insert	5-facher Überschuss im Vgl. zum Vektor
Vektor	100 ng
Ligase	10 Units

5.1.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma SEQ-IT GmbH & Co. KG in Kaiserslautern durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „Bioedit“ der Firma „Ibis Biosciences“, Carlsbad CA.

5.1.9 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurde nach dem Protokoll von Hanahan durchgeführt [121]. Dazu werden 20 ml TYM-Medium mit 50 µl transformationskompetenten *E. coli* angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer optische Dichte (OD_{600nm}) von 0.4-0.5 inkubiert. Anschließend wird die Kultur auf 100 ml verdünnt und weiter inkubiert, bis sie wiederum eine OD_{600nm} von 0.4-0.5 erreicht hat. Abschließend wird die Kultur auf ein Volumen von 500 ml verdünnt und bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 kultiviert. Die Kultur wird nun in einem NaCl-Eiswasserbad rasch abgekühlt und bei 4000 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird dann in 100 ml eiskaltem TfbI-Puffer erneut zentrifugiert. Anschließend wird das Bakterienpellet in kaltem TfbII-Puffer resuspendiert, in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der kompetenten Bakterien erfolgt bei -80°C.

5.1.10 Transformation von *E. coli*

Die transformationskompetenten *E. coli* werden mit 1 µg rekombinanter Plasmid-DNA gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und danach sofort auf Eis wieder abgekühlt. Den Transformationsansätzen werden 800 µl LB-Medium hinzugefügt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Ansätze werden abzentrifugiert und 700 µl des Überstandes verworfen. Mit den restlichen 100 µl wird das Bakterien-Pellet resuspendiert. Anschließend werden die Zellen auf Selektionsplatten mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag können die

gewachsenen Klone für weitere Versuche verwendet werden, oder die Selektionsplatten bei 4°C gelagert werden.

5.1.11 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Isolation der Plasmid-DNA wird ein Klon von einer Selektionsplatte in 100 ml LB-Medium überimpft, das zuvor mit einem Selektionsantibiotikum versetzt wird. Die Lösung wird über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am folgenden Tag werden die Bakterien bei 4°C, 5300 xg für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml Puffer S1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA (Omega, Norcross GA)) resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Zu dieser Suspension werden 4 ml Puffer S2 (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 4 ml Puffer S3 (2.8 M K-Acetat, pH 5.1) zugegeben. Die Suspension wird wieder vorsichtig gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension filtriert, wodurch genomische DNA und Zelltrümmer abgetrennt werden. Das Filtrat wird auf eine Nucleobond-Säule gegeben, die zuvor mit Puffer N2 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1.15 M KCl, 0.15% Triton X-100, pH 6.3 mit H₃PO₄ eingestellt) equilibriert wird. Nach zweimaligem Waschen mit 2.5 ml Puffer N3 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1.15 M KCl, pH 6.3 mit H₃PO₄ eingestellt) wird die Plasmid-DNA mit Puffer N5 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1 M KCl, pH 8.5 mit H₃PO₄ eingestellt) in ein silanisiertes Corexröhrchen eluiert. Durch Zugabe von 3.6 ml Isopropanol wird die DNA gefällt und durch Zentrifugation (4°C, 9900 xg, 30 min) sedimentiert. Die gefällte DNA kann dann an der Luft getrocknet und in sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen werden.

5.2 Zellkulturtechniken

5.2.1 Zellkulturbedingungen

Zur Kultivierung von adhärennten Zelllinien werden verschiedene Kulturgefäße der Firma Greiner verwendet. Die Zellen werden bei einer konstanten Temperatur von 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit (rH) und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Dem verwendeten Basismedium („Dulbecco's modified Eagles medium“ (DMEM)) werden je 400 ml-Flasche noch 10% fötales Kälberserum (FCS) und 5 ml L-Glutamin (200 mM) beigelegt.

5.2.2 Passagieren der Zellen

Für die Passage der Zellen wird zunächst das Medium abgenommen. Zum Ablösen der Zellen folgt eine Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA (0.25% (w/v) Trypsin, 0.1% (w/v) EDTA) für 2-10 Minuten

(abhängig vom Zelltyp) bei 37°C, 5% CO₂, 95% rH (relative Luftfeuchtigkeit). Durch den Chelatbildner Ethylendiamintetraessigsäure (0.25% EDTA) werden die für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Ca²⁺-Ionen gebunden; die Protease Trypsin (0.1%) sorgt für das Herauslösen der Zellen aus ihrem Verband durch Spaltung der Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen und zum Gefäßboden. Nach dem Ablösen wird der Zellsuspension frisches Kulturmedium zugesetzt. Es folgt das Aussäen der Zellen in ein neues Kulturgefäß. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden.

5.2.3 Einfrieren von Zellen

Säugerzellen lassen sich in flüssigem Stickstoff einfrieren und über längere Zeit lagern. Zum Einfrieren werden die Zellen, wie oben beschrieben, vom Boden der Kulturschale mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Medium aufgenommen und für sieben Minuten bei 4°C und 250 xg zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 0.5 ml eiskaltem Zellkulturmedium mit 40% FCS resuspendiert. Danach werden unter ständigem Schütteln 0.5 ml Medium mit 20% DMSO tropfenweise zugegeben. Die Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen überführt und für 2 Stunden in der Gasphase über flüssigem Stickstoff inkubiert. Danach können die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

5.2.4 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen erfolgt möglichst schnell, indem man die Zellsuspension in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt, dann sofort in ein steriles Röhrchen überführt und sie danach durch langsame, tropfenweise Zugabe des 10-fachen Volumens an Zellkulturmedium verdünnt. Die Zellen werden 5 Minuten bei 250 xg und 4°C abzentrifugiert, das Sediment in frischem Zellkulturmedium mit 10% FCS resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

5.2.5 Beseitigung von Kontaminationen

Bei einer Kontamination durch Bakterien wird zuerst das Medium gewechselt und anschließend 10 µl Penicillin/Streptomycin (10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, Biochrom, Berlin) pro ml Zellkulturmedium hinzugegeben und inkubiert. Bei einer leichten Kontamination sollten nach circa ein bis zwei Tagen die Bakterien aus dem Medium beseitigt sein. Kontaminationen mit Hefen und Pilzen werden mittels 10 µl Amphotericin B (250 µg/ml; Biochrom, Berlin) pro ml Zellkulturmedium behandelt. Mycoplasmen werden mit dem Antibiotikum BM-Cyclin der Firma Roche nach Angaben des Herstellers beseitigt.

5.2.6 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet (Kammerfaktor = 104). Frisch abgelöste Zellen werden in circa 2 ml Kulturmedium aufgenommen und 20 µl der Suspension wird mit gleicher Menge an Trypanblau gemischt, wodurch tote Zellen angefärbt werden. Die Suspension wird zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Ausgezählt werden jeweils die äußeren 4 Quadrate. Nach Berechnung des Mittelwerts für ein Quadrat erhält man durch Multiplikation mit dem Kammerfaktor die Anzahl der Zellen pro Milliliter.

5.2.7 Transiente Transfektion mittels Turbofect®

Eine Transfektion bedeutet das Einbringen von DNA (Expressionsvektoren) in eukaryotische Zellen. Das Transfektionsreagenz Turbofect® formt stabile Komplexe mit der DNA, wodurch diese geschützt wird. Zudem wird das Einbringen der DNA in den Zellkern erleichtert.

Für eine effiziente Transfektion werden Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz zwischen 70% und 90% aufweisen. Zur Transfektion wird die entsprechende Menge DNA und Turbofect® Transfektionsreagenz in Serum-freiem Medium gemischt. Der Ansatz wird 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird der Ansatz ins Zellmedium gegeben und die Zellen für weitere 24 h oder 48 h inkubiert. In Tabelle 11 sind die Mengenverhältnisse der Transfektion für eine 6-Lochplatte und eine 60 mm Schale angegeben.

Tabelle 11: Transfektionsansätze

Kulturformat	Turbofect Reagenz [µl]	DNA [µg]	Kultivierungsmedium [ml]	Serum-freies Medium [ml]
6-Lochplatte	6	4	2	0.4
60 mm Schale	12	6	3	3

5.2.8 Radioaktive *in vivo* Markierung von Proteinen

Die Analyse der Halbwertszeiten von Proteinen kann mittels Isotopen-Markierung erfolgen. Eine gängige Methode ist dabei der Einbau von, mit [³⁵S] markiertem, Methionin in die Polypeptidkette von Proteinen. Um die Stabilität des ATF4 und der ATF4-Mutanten zu bestimmen, werden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 24 h werden die Zellen dreimal mit Methionin-freiem Medium gewaschen und in Methionin-freiem Medium für eine Stunde bei 37°C, 95% rH und 5% CO₂ gehungert. Danach werden 100 µCi [³⁵S] zu 1 ml Methionin-freiem Medium gegeben und die Zellen 30 Minuten bei 37°C, 95% rH und 5% CO₂ markiert. Nach der Inkubation wird

das Medium von den Zellen genommen und die Zellen dreimal mit dem entsprechenden Kultivierungsmedium gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen über die verschiedenen Zeiträume (0, 30, 60 und 90 Minuten) mit dem entsprechenden Kultivierungsmedium bei 37° C, 95% rH und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und geerntet. Die geernteten Zellen werden lysiert und für Folgeexperimente eingesetzt.

5.2.9 Cycloheximid-Behandlung von Zellen

Das Glutarimid-Antibiotikum Cycloheximid ist ein Antibiotikum, das die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen inhibieren kann. Heutzutage ist es ein gängiges Werkzeug in der Molekularbiologie um Halbwertszeiten von Proteinen zu bestimmen. Zur Stabilitäts-Bestimmung des ATF4 und der ATF4-Mutanten werden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 24 h wird das Medium abgenommen und durch frisches Medium, welche eine Cycloheximid-Endkonzentration von 1 µM enthält, ersetzt. Anschließend werden die Zellen für die entsprechenden Zeiträume weiter kultiviert. Die Analyse der Stabilitäten erfolgt mittels Westernblot-Analyse.

5.3 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden

5.3.1 Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse

Die gewünschten Zellen werden ausgesät und bei einer Konfluenz von circa 80% mit 1x PBS (pH 7.4) geerntet und abzentrifugiert (250 xg, 7 Minuten, 4°C). Das Zellpellet wird mit dem doppelten Volumen eines Extraktionspuffers (RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) mit zugesetztem Proteaseinhibitor (Complete 1:25) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis lysiert. Nach einer Ultraschallbehandlung (3x 1 Minute im Eiswasserbad) werden anschließend die verbliebenen Zelltrümmer abzentrifugiert (16000 xg, 30 Minuten, 4°C). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Lagerung werden sie kurzfristig bei -20°C und längerfristig bei -80°C aufbewahrt.

5.3.2 Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse (Membranproteine)

Die Extraktion der Membranproteine erfolgt wie zuvor beschrieben (s. 5.3.1), allerdings mit einem modifizierten RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.65% CHAPS).

5.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Der quantitative Nachweis des Proteingehaltes einer Proteinlösung erfolgt in der Regel mittels Farbreaktionen funktioneller Gruppen von Proteinen mit farbstoffbildenden Reagenzien. Dabei ist die Intensität des Farbstoffes direkt proportional zur Konzentration der reagierenden Gruppen. Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wird der blaue Säurefarbstoff Coomassie-Blau benutzt, dessen Absorptionsmaximum sich in Anwesenheit von Proteinen und in saurem Milieu von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Grund dafür ist die Stabilisierung des Farbstoffs durch Komplexbildung mit dem Protein. Die Bestimmung des Proteingehaltes wird mit dem, auf der Bradford-Methode basierenden, Proteinassay-Kit der Firma BioRad vorgenommen. Dazu wird je 1 µl des Zellextraktes zu 800 µl A. dest. und 200 µl Bradfordreagenz pipettiert. Nach 10 Minuten kann die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert aus A. dest. und Bradfordreagenz gemessen werden. Der Proteingehalt kann an Hand einer BSA-Eichkurve ermittelt werden.

5.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihrer Größe getrennt. Dabei zeigen große Proteine in einer Gelmatrix aus Polyacrylamid ein langsames Laufverhalten als kleine Proteine. Das Wandern in der Gelmatrix wird durch Zugabe von SDS-Probenpuffer erreicht. Dieser bewirkt, dass die Proteine in Mizellen eingeschlossen werden und eine negative Nettoladung erhalten. Die Kammer wird zu circa 75% mit dem Trenngel gefüllt und anschließend mit Isopropanol überschichtet um eine gleichmäßige Dicke des Gels zu gewährleisten. Nach dem Aushärten des Trenngels wird das Isopropanol entfernt. Das Trenngel wird nun mit dem Sammelgel überschichtet und die Kämme werden in die Gelkammern gesteckt. Nach der Polymerisation des Sammelgels können die Gele in einer feuchten Verpackung bei 4°C aufbewahrt werden. Für das Sammel- und das Trenngel wird die gebrauchsfertige Acrylamid-Stammlösung (Lösung A) mit 30% (w/v) Acrylamid und 0.8% (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid der Firma Carl Roth GmbH & Co verwendet. Für das Trenngel wird die Pufferlösung B, für das Sammelgel die Pufferlösung C, zugesetzt. Tabelle 12 zeigt die Zusammensetzungen der SDS-Polyacrylamidgele.

Tabelle 12: Zusammensetzung der verschiedenen SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel [%]	7.5	10	12.5	15	20	Sammelgel [%]	4.3
Lösung A [ml]	9	12	15	18	24	Lösung A [ml]	2.2
Lösung B [ml]	9	9	9	9	9	Lösung C [%]	3.8
Wasser [ml]	18	15	12	9	3	Wasser [ml]	9
10% APS (in di H₂O [μl])	200	200	200	200	200	APS [μl]	100
TEMED [μl]	20	20	20	20	20	TEMED [μl]	40

Die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Zellysate werden mittels Bradford Assay (Biorad) bestimmt. Gleiche Proteinmengen werden mit SDS-Gel-Probenpuffer gemischt und 10 Minuten bei 95°C gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgt im SDS-Polyacrylamidgel bei einer Stromstärke von 25 mA. Zur Referenz werden vorgefärbte Proteinmarker „Prestained Molecular Weight Marker“ der Firma Thermo scientific, St. Leon-Rot (siehe 4.3.2) verwendet.

5.3.5 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Die anzufärbenden Gele werden für 30 Minuten in der Coomassie-Blau-Färbelösung fixiert. Nach der Entfärbung des Gels in einem Gemisch aus 10% (v/v) Eisessig, 20% (v/v) Methanol und 70% (v/v) H₂O dest. werden die Proteinbanden sichtbar.

5.3.6 Westernblot-Analyse

Die über das Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden im Tank-Blot-System auf eine PVDF-Membran (Roche, Mannheim) übertragen.

Die Blotapparatur wurde für den Proteintransfer wie folgt zusammengebaut:

Schwamm	Whatman-Papier	Nitrozellulosemembran	SDS-Polyacrylamidgel	Whatman-Papier	Schwamm
---------	----------------	-----------------------	----------------------	----------------	---------

Schwamm und Whatman-Papier werden in Transferpuffer und die PVDF-Membran in Methanol getränkt. Die Proteine werden über Nacht bei einer Stromstärke von 120 mA von dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran (Roche, Mannheim) transferiert.

5.3.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die auf die PVDF-Membran geblotteten Proteine können mittels Antikörper nachgewiesen werden. Hierfür wird die PVDF-Membran für eine Stunde in Waschpuffer (0.1% (v/v) Tween 20 in PBS) mit 5% Magermilchpulver unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Membran bis zu 24 h mit einer Verdünnung der gewünschten Primäantikörper in Waschpuffer (1% (w/v) Magermilch) inkubiert. Nach der Inkubation wird die PVDF-Membran in Waschpuffer (1% (w/v) Magermilch) inkubiert, um nicht gebundene Primäantikörper zu entfernen. Es schließt sich eine Inkubation mit den Sekundäantikörpern an. Die Sekundäantikörper gegen Kaninchen und Maus bzw. Ziege werden in einer Verdünnung von 1:30.000 bzw. 1:10.000 in Waschpuffer (1% (w/v) Magermilch) eingesetzt. Detektiert wird mit dem Reagenz Luminol „Lumi-Light“ der Firma Roche. Zur Lagerung werden die Membranen kurz in Methanol geschwenkt, getrocknet und zwischen Filterpapieren bei 4°C aufbewahrt. Die Quantifizierung der Westernblots wird mit der Software Quantity One 4.6.5 (Band Analysis) der Firma Bio-Rad (München) vorgenommen.

5.3.8 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation können Proteine oder Proteinkomplexe mittels Antikörper aus einem Zellextrakt präzipitiert werden. Unter physiologischen Pufferbedingungen ist es auch möglich, die an das präzipitierte Protein gebundenen Proteine zu präzipitieren. Die präzipitierten Proteine werden mittels Westernblot identifiziert.

Für die Immunpräzipitation werden Protein-A-Sepharose und CL4B-Sepharose im Verhältnis 1:2 gemischt und dreimal mit 1x PBS (pH 7.4) gewaschen. Es werden zwei Vorpräzipitationsschritte mit je 60 µl der Sepharose und dem Proteinüberstand (1-2 mg) bei 4°C durchgeführt um unspezifisch an die Sepharose gebundene Proteine zu entfernen. Während der Vorpräzipitation wird in einem separaten Ansatz der präzipitierende Antikörper in 60 µl Sepharose inkubiert. Der Ansatz (Sepharose mit Antikörper) wird einmal mit PBS (pH 7.4) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wird der Überstand des Vorpräzipitats auf die mit Antikörper-gebundene Sepharose übertragen und mindestens 90 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach werden das zweite Vorpräzipitat und das Immunpräzipitat dreimal mit PBS (pH 7.4) gewaschen. Zur Elution der Komplexe, werden 30 µl SDS-Probenpuffer hinzugefügt und die Proben fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Folgende Kontrollen werden bei der Immunpräzipitation mitgeführt: ein Aliquot des Überstandes nach Präzipitation, ein Aliquot des Zellextraktes, ein Aliquot der Sepharose, sowie 3 µl des Antikörpers mit dem präzipitiert wurde.

5.3.9 *In vitro* Phosphorylierungs-Assay

Die Aktivität der CK2 kann mittels Phosphorylierung des spezifischen Substratpeptids mit der Sequenz RRRDDDSDD nachgewiesen werden. Dabei werden 20 µg Zellextrakt auf ein Endvolumen von 20 µl mit RIPA-Puffer aufgefüllt. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 30 µl Reaktionsmix (25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM ATP, 0.19 mM synthetisches Peptid), welcher mit 10-20 µCi [³²P]-γ-ATP pro 500 µl versetzt ist. Die Proben werden fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird auf Eis abgestoppt und jeweils 30 µl der Ansätze werden auf P81 Kationenaustausch-Filterpapier übertragen. Die Filterpapiere werden dreimal für fünf Minuten mit 85 mM Phosphorsäure und einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend werden die Filterpapiere an der Luft getrocknet und in einem Szintillationsgefäße überführt. Die Phosphorylierung des Substratpeptids wird nachfolgend im Szintillationszähler bestimmt.

5.3.10 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen mit Peptidfiltern

Das Eingrenzen von möglichen CK2-Phosphorylierungsstellen kann neben *in vitro* Phosphorylierung von Proteinfragmenten auch an Hand von Peptidfiltern erfolgen. Dabei werden die putativen CK2-Phosphorylierungsstellen als 15 Aminosäuren lange Peptide auf ein Whatman-Papierfilter gespottet. Der Filter wird für eine Stunde in Methanol bei RT inkubiert und nachfolgend wird die Membran für eine Stunde in Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl 5 mM, MgCl₂, 1 mM DTT) mit 1% BSA inkubiert. Die eigentliche Phosphorylierungsreaktion erfolgt in einem möglichst geringen Volumen Kinasepuffer mit 3 µg CK2-Holoenzym und 10 µCi [³²P]-γ-ATP für eine Stunde bei 37°C. Nachfolgend werden die Filter dreimal in Kinasepuffer mit 1 M NaCl gewaschen. Die Detektion der Radioaktivität erfolgt mittels Autoradiographie. Zur Zuordnung der radioaktiven Spots, werden die Filter zum Abschluss mit Coomassie-Blau gefärbt.

5.3.11 *In vitro* Phosphorylierung von gereinigten, rekombinanten Proteinen

In vitro Phosphorylierungen werden zellfrei mittels gereinigter rekombinanter CK2 untersucht. Dazu werden circa 3 µg der entsprechenden GST-Konstrukte mit 0.5 µg CK2 Holoenzym mit Kinase-Puffer auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und gemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µCi [³²P]-γ-ATP gestartet. Der Ansatz wird nun über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Probenpuffer gestoppt und nachfolgend bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Proben werden nun über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, getrocknet und autoradiographisch analysiert.

5.3.12 Autoradiographie

Radiomarkierte Proteine werden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und das Gel wird anschließend getrocknet (circa zwei Stunden bei 80°C unter Vakuum). Nachfolgend können die radioaktiv markierten Proteine mittels Röntgenfilm (AGFA Cronex 5, AGFA-Gevaert, Belgien) oder mit Hilfe von PhosphorImaging-Platten (Storage Phosphor Screen, Amersham Biosciences) autoradiographisch detektiert und quantifiziert werden (mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Zimmermann).

5.3.13 Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Säugerzellen

Neben der Koimmunpräzipitation können erste Hinweise einer möglichen Protein-Protein-Interaktion auch *in situ* nachgewiesen werden. Dabei wird mittels Immunfluoreszenz analysiert, ob sich zwei Proteine in räumlicher Nähe befinden (Kokolisierung), beziehungsweise in welchem zellulären Kompartiment sie sich befinden.

Hierfür werden am Vortag Zellen auf sterile Deckgläser ausgesät und bis zu einer Dichte von circa 80% kultiviert. Das Nährmedium der Zellen wird abgesaugt und durch die Fixierlösung (3.7% Formaldehyd in A. dest.) ersetzt. Nach 30 Minuten sind die Zellen fixiert und die Lösung wird durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten mit 1x PBS (pH 7.4) entfernt. Die Zellen werden 15 Minuten auf Eis mit Permeabilisierungslösung (0.2% Triton X-100; 2% BSA in 1x PBS (pH 7.4)) inkubiert. Dann werden die Zellen für 15 Minuten mit 1% BSA in (1x PBS pH 7.4) gewaschen und nachfolgend mit den verdünnten primären Antikörpern in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die primären Antikörper werden im Verhältnis 1:50 (1% BSA in PBS) eingesetzt. Die Antikörperlösung wird mit 1x PBS (pH 7.4) zweimal 10 Minuten lang ausgewaschen. Es schließt sich die einstündige Inkubation (bei RT) mit dem Sekundärantikörper an (AlexaFluor488 und AlexaFluor594), der in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wird. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern. Nach den drei anschließenden Waschrufen mit 1x PBS (pH 7.4) werden die Zellen zur Anfärbung des Zellkerns für 15 Minuten bei 37°C mit der DAPI-Lösung inkubiert. Wieder werden die Zellen dreimal mit 1x PBS (pH 7.4) gewaschen. Vor dem Überschichten mit 10 µl Mounting-Medium werden die Zellen kurz in A. dest. gewaschen. Nach etwa einer halben Stunde können die Präparate am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Um die Präparate auch noch nach einigen Tagen betrachten zu können, werden sie mit farblosem Nagellack abgeschlossen und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Bei der Analyse der Präparate verwendeten Mikroskop handelt es sich um das "Axioskop" der Firma Zeiss. Die Anregung der fluoreszierenden Farbstoff-Konjugate erfolgt bei 488 nm und 594 nm,

während DAPI im UV Bereich mit 340 nm angeregt wird. Die jeweilige Fluoreszenz liegt im roten, grünen oder blau-violetten Bereich.

5.3.14 Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Säugerzellen (Sec62)

Bei der Immunfluoreszenz-Analyse von Sec62 wird der Permeabilisierungslösung (0.2% Triton X-100; 2% BSA in 1x PBS (pH 7.4) 50 µg/ml RNase A zugesetzt. Dies bewirkt die Dissoziation der Ribosomen vom trimeren Sec-Komplex und macht somit das Epitop für den primären Antikörper zugänglich.

5.3.15 BiFC-Analyse

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation BiFC ist eine Methode, mit der direkte Protein-Protein-Interaktionen *in situ* nachweisbar sind. Die Methode basiert auf der Bindung des N-terminalen Fragments (AS 1-154) mit dem C-terminalen (AS 155-238) Fragment des gelb fluoreszierenden YFP. Die Fragmente des YFP werden an Proteine fusioniert, von denen man die Interaktion untersuchen möchte. Interagieren beide Proteine, so kommt es auch zur Interaktion der beiden YFP-Fragmente. Unter optimalen Bedingungen kann das YFP seine tertiäre Struktur ausbilden, wodurch es nach Anregung zur Emission der charakteristischen Wellenlänge kommt. Allerdings ist die Ausbildung der tertiären Struktur von vielen Parametern abhängig, sodass zur Verstärkung des Signals ein Antikörper (anti-GFP der Firma Abcam) verwendet wird, dessen Epitop sich über die Bruchstellen des YFP erstreckt.

Vor der eigentlichen Immunfluoreszenz werden die Zellen auf sterile Deckgläser ausgesät und bis zu einer Dichte von circa 60% kultiviert. Anschließend werden die Zellen mit den entsprechenden pEYFP-Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 24 h werden die Zellen für weitere 24 h bei 28°C inkubiert um die Ausbildung der richtigen YFP-Konformation zu begünstigen. Daran schließt sich eine Immunfluoreszenz-Analyse, wie unter 5.3.13 beschrieben, an.

5.3.16 Luciferase-Assay

Die Analyse der Genexpression kann nicht nur auf Protein- oder mRNA-Ebene nachgewiesen werden, sondern auch mit Hilfe von Reportergenen. Dabei wird ein regulatorisches Promotor-Element vor ein Reporter gen (*Luciferase*) kloniert. Die Expression der Luciferase steht dann im direkten Verhältnis zur Aktivität der Transkriptionsfaktoren, die das Promotor-Element regulieren. Ferner kann mit diesem System nach Überexpression von bestimmten Proteinen deren Auswirkung auf den Promotor überprüft werden. Dabei katalysiert die Luciferase die Monooxygenierung ihres Substrates Beetle-Luciferin zu Oxyluciferin. Dieser Vorgang geschieht in Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ sowie O₂. Die dabei entstehenden Lichtimpulse werden mit einem Photodetektor aufgefangen. Zusätzlich wird neben

dem Luciferase-Reportergenkonstrukt ein *Renilla*-Luciferasegenkonstrukt kotransfiziert, welches einen konstitutiv aktiven Promotor besitzt. Mit Hilfe dieser zweiten Luciferase, die ein anderes Substrat verwertet als die *Firefly*-Luciferase, kann die Transfektionseffizienz bestimmt werden, sodass verschiedene Proben vergleichbar werden.

Für eine Reportergenanalyse werden Zellen in den Vertiefungen einer 6-Lochplatte ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen mit dem Reportergenkonstrukt und den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert und über einen ausgewählten Zeitraum kultiviert. Nach Inkubation wird das Medium der Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS (pH7.4) gewaschen und pro Ansatz 500 µl 1x Lysepuffer (Promega GmbH, Mannheim) auf die Zellen gegeben. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf dem Schüttler werden die einzelnen Ansätze in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 13.000 xg 4 min zentrifugiert. Der Überstand kann anschließend für weitere Untersuchungen bei -20°C eingefroren oder direkt zu einer Messung der Luciferase-Aktivität eingesetzt werden.

Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgt mit dem DUAL-Luciferase™ Reporter Assay System am Luminometer Infinite M200 Pro von Tecan (mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Rother). Hierzu werden 20 µl des transfizierten Zelllysates pro Kavität in einer weißen 96-Lochplatte vorgelegt und diese in das Infinite M200 Pro gestellt. Dort werden automatisch 50 µl des *Firefly*-Luciferase-Reagenzes (Luciferase-Assay-System) pro Kavität zugegeben und die Lichtreaktion in Gang gesetzt. Nach zwei Sekunden Wartezeit wird die Intensität der *Firefly*-Luciferasereaktion im ersten Loch für zehn Sekunden gemessen. Anschließend injiziert das Gerät 50 µl Substrat der kotransfizierten *Renilla*-Luciferase und misst nach weiteren zwei Sekunden für zehn Sekunden die Intensität der *Renilla*-Luciferasereaktion. Je Ansatz wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Anschließend werden die Daten gemittelt und die *Firefly*-Lumineszenzwerte zu den *Renilla*-Lumineszenzwerten normiert. Die *Firefly*-Luciferase hat ein Lumineszenz-Maximum bei 560 nm, die *Renilla*-Luciferase hat ein Lumineszenz-Maximum bei 482 nm.

5.3.17 Caspase-3/-7-Assay

Die Spaltung der Caspasen 3 und 7 wird mit dem Caspase®-Glo Assay der Firma Promega durchgeführt. Das Assay enthält ein luminogenes Caspasesubstrat, das eine Caspase spezifische Peptidsequenz enthält, nach deren Abspaltung Aminoluciferin entsteht, was wiederum als Substrat für die Luciferase dient und so eine Lumineszenz erzeugt.

Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität werden die Zellen ausgesät und nach 24 h mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transfiziert. Nach 24 h beziehungsweise 48 h werden die

Zellen mit Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1×Complete®, 10 mM DTT) lysiert, fünf Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss 10 Minuten bei 16000 ×g und 4°C zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wird diese auf 1 µg/µl mit Lysepuffer eingestellt und mit Proteinpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM KCl, 5% Glycerin) auf 100 ng/µl (1:10) verdünnt. Danach werden je 20 µl der verdünnten Proteinextrakte mit je 20 µl Caspase-Glo® Reagenz eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend kann man die Lumineszenz (Extinktion: 365 nm; Emission: 410-460 nm) im Luminometer messen.

5.3.18 Induktion der Proteinexpression in *E. coli*

Kompetente BL-21 Zellen werden mit den pGEX-Plasmiden transformiert, auf Ampicillin-haltige Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je eine Kolonie wird gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium (Ampicillin) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wird mit der 5 ml Kultur eine 200 ml Hauptkultur angeimpft. Hat die Kultur eine OD von 0.5-0.6 erreicht, wird die Expression durch Zugabe von IPTG, in einer Endkonzentration von 1 mM, induziert. Anschließend wird die Kultur für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Danach können die Bakterien nach zehninütiger Zentrifugation bei 4°C und 5000 ×g sedimentiert und bis zur Proteinreinigung bei -20°C gelagert werden. Eine erfolgreiche Induktion wird überprüft, indem man 5 ml einer Probe vor der Induktion und 5 ml einer Probe nach der Induktion entnimmt, 10 Minuten bei 4°C und 5000 ×g abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Es folgt eine zehninütige Denaturierung bei 95°C. Der Zellextrakt wird über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Expression der Proteine wird mittels Coomassie-Blau-Färbung überprüft.

5.3.19 Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen

Nach vierstündiger Induktion werden die Bakterien 10 Minuten bei 4°C und 5000 ×g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 25 ml Puffer R1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) mit Protease-Inhibitor und 1 mg/ml Lysozym resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend folgt eine viermalige Ultraschallbehandlung (50%, Stufe 5) für circa 30 Sekunden. Durch erneute Zentrifugation bei 4°C und 5000 ×g wird der nun klare Überstand mit gewaschener GSH-Sepharose bei 4°C für eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Die Suspension wird im Anschluss auf eine Säule (poly-Prep® Chromatography Columns) gegeben und mit 30 ml Puffer R1 gewaschen. Das Protein wird dann mit je 3 ml 10 mM bzw. 20 mM Glutathion in Puffer R1 eluiert und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Zur Entfernung des Glutathions werden die gereinigten, eluierten GST-Proteine in einen Dialyseschlauch der Firma Serva mit einer Ausschlussgröße von 12000-18000 Dalton überführt und über Nacht gegen TMK₁₀₀-Puffer dialysiert.

5.3.20 GST-„pull-down-assay“

GST-„pull-down“-Versuche dienen dazu, die physikalische Interaktion zweier Proteine in Lösung nachzuweisen. Für die GST-„pull-down“-Analyse werden 30 µl GSH-Sepharose (pro Bindungsreaktion) eingesetzt. Zu Beginn werden die GST-Fusionsproteine (2-5 µg) an die Sepharose in 800 µl PBS-Tween immobilisiert. Anschließend folgen jeweils 3 Waschschriffe der GSH-Sepharose mit PBS (pH 7.4). Zur Protein-Protein-Bindung werden 10 µg des gereinigten, rekombinanten CK2-Holoenzym eingesetzt und mit PBS-Tween auf 800 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend folgt eine Inkubation über vier Stunden bei 4°C auf einem Schüttler. Danach wird der Ansatz dreimal mit PBS (pH 7.4) gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgt mit 30 µl SDS-Probenpuffer und fünfminütiger Denaturierung. Die Ansätze werden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mittels Westernblot analysiert. Kommt es zur Komplexbildung können die zu interagierenden Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Die „pull-down“-Analyse für die Sec63/Sec62-Interaktionen finden unter geänderten Pufferbedingungen statt als die zuvor beschriebenen „pull-down“-Analysen. Zu Beginn wird GST-Sec63C für eine Stunde bei 4°C an die GSH-Sepharose immobilisiert. Anschließend folgt die Bindung der zu interagierenden Proteine in einem Puffer bestehend aus 20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.65% CHAPS. Danach wird der Ansatz dreimal mit PBS (pH 7.4) gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgt mit 30 µl SDS-Probenpuffer und fünfminütiger Denaturierung. Die Ansätze werden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und das Gel anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Kommt es zur Bindung der Proteine untereinander, so können beide Proteine in einem Ansatz detektiert werden.

5.3.21 ELISA-basierte-Bindungsstudien

Der quantitative Nachweis der Protein-Protein-Bindung *in vitro* erfolgt mit Hilfe der ELISA-basierten-Bindungsstudie nach Hübner [122]. Dabei werden die gereinigten, rekombinanten Proteinen (CK2-Holoenzym, CK2 α , CK2 α' und CK2 β) in 50 mM NaHCO₃ (pH 9.8) aufgenommen und an den Boden der Vertiefungen einer 96-Lochplatte (Nunc, ThermoScientific, Langenselbold) gebunden (16 h, 4°C). Danach werden unspezifische Bindungsstellen für 90 Minuten mit 50 mM NaHCO₃ (pH 9.8) und 5% BSA blockiert. Zur Bindung der GST-Proteine an das CK2-Holoenzym und die CK2-Untereinheiten werden diese in 50 mM NaHCO₃ (pH 9.8) und 1% BSA aufgenommen, in die Vertiefungen der Lochplatte gegeben und für 16 h bei 4°C inkubiert. Nachfolgend werden die Vertiefungen fünfmal gewaschen. Durch Zugabe eines primären anti-GST Antikörpers und eines sekundären Antikörpers kann die Komplexbildung mittels der Westernblot-Methode detektiert werden. Die Visualisierung erfolgt hierbei durch die Zugabe von 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (TMB). Dabei wird TMB in

Gegenwart von H_2O_2 und der Peroxidase des Sekundärantikörpers oxidiert. Die daraus entstehende Blaufärbung wird durch Zugaben von Schwefelsäure (0.5 M) gestoppt. Es kommt zur Bildung stabiler gelber Farbkomplexe, die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden können.

6. Ergebnisse:

6.1 Sec63 und die Proteinkinase CK2

Neben zytoplasmatischen und nukleären Proteinen phosphoryliert die Proteinkinase CK2 auch eine große Anzahl von Membranproteinen, worunter sich beispielsweise Ionenkanäle [90, 91] und Rezeptoren [83, 123] befinden. Lokalisiert wurde die CK2 an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums bereits 2001 von Faust *et al.* [107]. Seitdem wurden lediglich zwei Membranproteine, ERj1 und ZIP7, am ER als Substrate der CK2 identifiziert [91, 118]. 2005 wurde in *Saccharomyces cerevisiae* Sec63p, ein ER-Membranprotein, das für den post- und kotranslationalen Proteintransport zuständig ist, als Substrat der Proteinkinase CK2 nachgewiesen. In Säugern ist die Rolle von Sec63 nicht vollständig geklärt. Es ist Mitglied des trimeren Komplexes bestehend aus Sec61, Sec62 und Sec63. Auch am kotranslationalen Proteintransport scheint Sec63 beteiligt zu sein [12]. Nachfolgend wurde analysiert, ob humanes Sec63 auch ein Substrat der Proteinkinase CK2 ist. Zudem wurde die biologische Relevanz der Phosphorylierung von Sec63 durch die CK2 untersucht.

6.1.1 *In silico* Phosphorylierung von Sec63C

In *S. cerevisiae* befinden sich die CK2-Phosphorylierungsstellen (CK2-Konsensussequenz: S/T-x-x-E/D) im stark aziden C-terminalen Bereich der Polypeptidkette von Sec63p. Ein Vergleich der Polypeptidketten von humanem Sec63 mit Sec63p aus der Hefe *S. cerevisiae* zeigte eine große Homologie zwischen den beiden Proteinen. Daher wurde humanes Sec63 einer *in silico* Phosphorylierung mit hoher Stringenz (scansite.mit.edu) unterzogen, woraus sich vier putative CK2-Phosphorylierungsstellen ergaben (Abbildung 4): Serin 574, Serin 576, Threonin 581 sowie Serin 748.

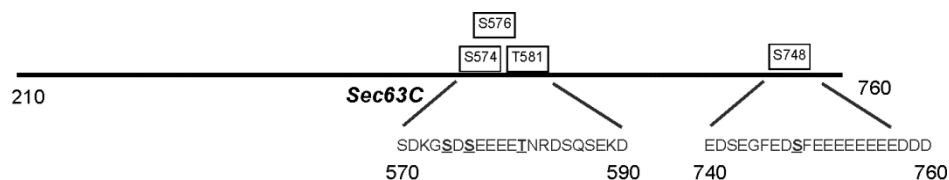


Abbildung 4: Schematische Darstellung der humanen Sec63-Polypeptidkette. Die Aminosäuren 210-760 repräsentieren den zytoplasmatischen Teil von Sec63 (Sec63C). Umrahmt sind jeweils die putativen CK2-Phosphorylierungsstellen (scansite.mit.edu).

6.1.2 *In vitro* Phosphorylierung von Sec63C

Humanes Sec63 besteht aus 760 Aminosäuren. Die N-terminale Domäne liegt auf der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums, hingegen ist die C-terminale Domäne zytoplasmatisch lokalisiert. Verankert ist Sec63 mit drei Transmembrandomänen. Angesichts der Tatsache, dass die putativen Phosphorylierungsstellen sich auf der zytoplasmatischen Seite von Sec63 befinden und sich die Lokalisierung der Proteinkinase CK2 auf das Zytoplasma und den Nukleus beschränkt, wurde für die *in vitro* Experimente ausschließlich der zytoplasmatische Teil (Aminosäuren 210-760) von Sec63 (GST-Sec63C) verwendet. Die *in silico* Phosphorylierungsergebnisse sollten nun mittels *in vitro* CK2-Phosphorylierungsassays überprüft werden. Dazu wurden gereinigtes, rekombinantes GST-Sec63C mit gereinigtem, rekombinantem CK2-Holoenzym und [³²P]- γ -ATP inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert. Zur Kontrolle wurden *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen angesetzt, in denen nur CK2-Holoenzym und [³²P]- γ -ATP, sowie CK2-Holoenzym und GST-tag und [³²P]- γ -ATP vorlagen. Die Autoradiographie in Abbildung 5 (oberer Teil) zeigt nur in der Spur CK2-Holoenzym + GST-Sec63C eine Bande bei einem Molekulargewicht von circa 90 kDa, wobei es sich um GST-Sec63C handelt. Die Kontrollspuren zeigen keine Phosphorylierung auf der Höhe von GST-Sec63C. Der untere Teil zeigt das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel.

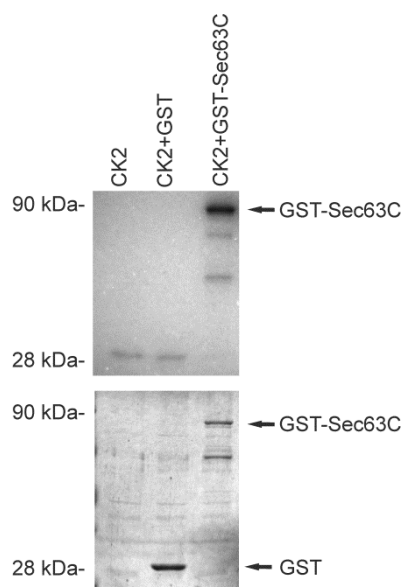


Abbildung 5: *In vitro* Phosphorylierung von Sec63C durch das CK2-Holoenzym. Die *in vitro* Phosphorylierungsansätze wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographie, der untere Teil zeigt das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel.

6.1.3 Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen mittels Sec63C-Fragmenten

Zur Kartierung der exakten Sec63/Sec62-Interaktionsdomäne wurden mehrere C-terminale Fragmente erzeugt [12]. Mit Hilfe dieser Fragmente sollten die putativen CK2-Phosphorylierungsstellen eingegrenzt werden. Dabei standen zwei N-terminale und drei C-terminale Fragmente zur Verfügung. Die Fragmente N1 und C1 beinhalten die putativen Phosphorylierungsstellen Serin 574, Serin 576 und Threonin 581, das Fragment C3 die Stelle Threonin 748 (Abbildung 6 a)). Analog zur *in vitro* Phosphorylierung von gereinigtem, rekombinantem GST-Sec63C wurden auch die gereinigten, rekombinanten GST-Sec63C-Fragmente einer *in vitro* Phosphorylierung durch das CK2-Holoenzym unterzogen. Abbildung 6 b) stellt das Ergebnis der *in vitro* Phosphorylierung dar. Man erkennt deutlich die Banden für die Fragmente GST-N1, GST-C1 und GST-C3 (oberer Teil). Die Fragmente, die keine putativen CK2-Phosphorylierungsstellen beinhalten, zeigen keine Signale in der Autoradiographie. Die unteren Teile von Abbildung 6 b) zeigen die mit Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgele. Anhand der *in vitro* Phosphorylierung konnte Threonin 748 als CK2-Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Hingegen konnte mit diesen Fragmenten nicht analysiert werden, welche der drei putativen Stellen (Serin 574, Serin 576, Threonin 581) zudem als CK2-Phosphorylierungsstellen fungieren.

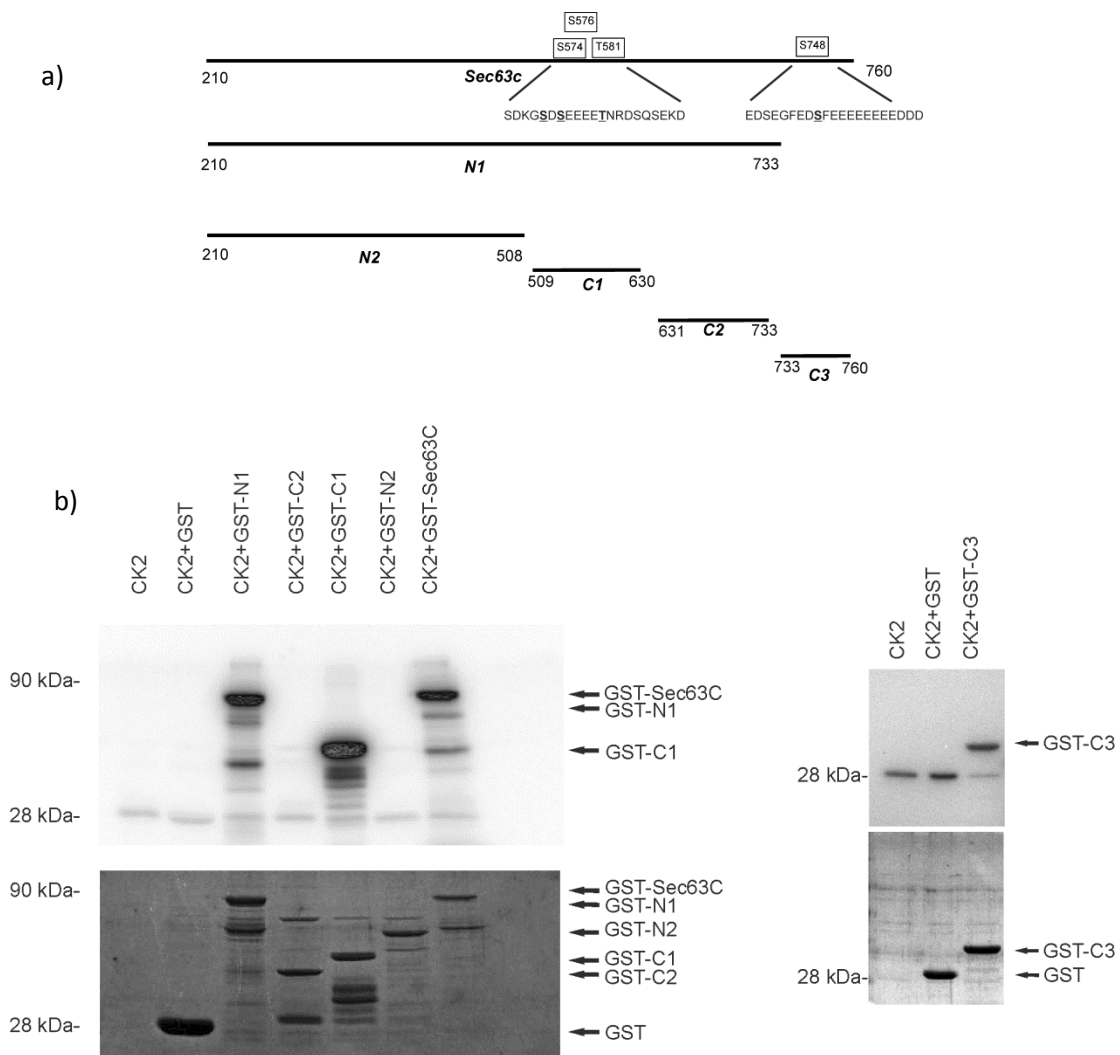


Abbildung 6: *In vitro* Phosphorylierung der Sec63C-Fragmente **a)** Schematische Darstellung der Sec63C-Fragmente zur Eingrenzung der putativen CK2-Phosphorylierungsstellen. Umrahmt sind jeweils die putativen CK2-Phosphorylierungsstellen dargestellt. **b)** Die *in vitro* Phosphorylierungsansätze wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt und getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographien, der untere Teil zeigt die mit Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgele.

6.1.4 Peptidfilter zur Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen

Die Phosphorylierung der Sec63C-Fragmente gab keinen Aufschluss darüber, welche der putativen Phosphorylierungsstellen (Serin 574, Serin 576 oder Threonin 581) durch die Proteinkinase CK2 phosphoryliert werden. An Hand einer Peptidfilter-Analyse sollten nun die CK2-Phosphorylierungsstellen eindeutig identifiziert werden. Dazu wurden jeweils fünfzehn Aminosäuren lange Peptide von Sec63C generiert, die eine oder mehrere Phosphorylierungsstellen beinhalten. Zudem wurden die Phosphorylierungsstellen (Serin oder Threonin) durch eine nicht

phosphorylierbare Aminosäure (Alanin) ersetzt. Die Peptide wurden auf einen Filter gespottet und mit gereinigtem, rekombinantem CK2-Holoenzym einer *in vitro* Kinase-Reaktion unterzogen. Als Positivkontrolle diente eine für das CK2-Holoenzym spezifische Sequenz. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Filter getrocknet und die Phosphorylierung der Spots autoradiographisch bestimmt. Die Zuordnung der Autoradiographie zu den dazugehörigen Spots erfolgte durch Coomassie-Blau-Färbung der Filter. Abbildung 7 a) (oben) zeigt die Autoradiographie der einzelnen Spots 1-3. Die Positivkontrolle Spot 3 und auch Spot 2 zeigen ein deutliches Signal in der Autoradiographie, wohingegen Spot 1 kein Signal zeigt. Damit bestätigt sich, dass Serin 748 vom CK2-Holoenzym *in vitro* phosphoryliert wird. Abbildung 7 b) zeigt die Phosphorylierung der Spots 4-13. Dabei mussten sowohl einzelne als auch doppelte Substitutionen erzeugt werden, um die genaue Phosphorylierungsstelle zu identifizieren. Es zeigte sich, dass der Ersatz der Serine 574 und 576 durch ein Alanin zu einer starken Reduktion des Phosphorylierungssignals führt (Spot 5 und 6). Nach Austausch beider Aminosäuren in einem Spot ist kein Signal mehr zu detektieren (Spot 8). Hingegen hat der Austausch von Threonin 581 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Peptide (Spot 7, 9 und 10). Die Positivkontrolle Spot 12 zeigt ein deutliches Signal in der Autoradiographie. Die unteren Teile von Abbildung 7 a) und b) zeigen die mit Coomassie-Blau gefärbten Spots. Aus den Peptidfiltern geht hervor, dass beide Phosphorylierungsstellen, Serin 574 und 576, von dem CK2-Holoenzym *in vitro* phosphoryliert werden.

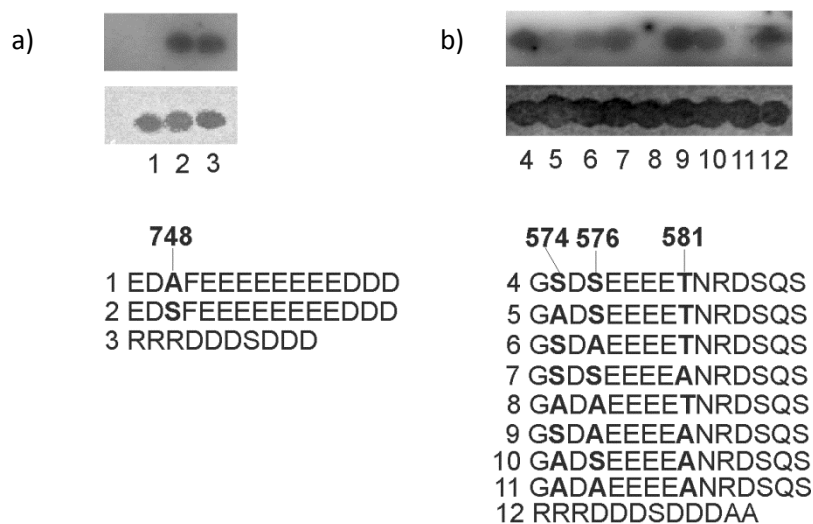


Abbildung 7: Bestimmung der CK2-Phosphorylierungsstellen mittels Peptidfiltern. Die fünfzehn Aminosäuren langen Peptide wurden auf ein Whatman-Filterpapier gespottet und mit CK2-Holoenzym in Anwesenheit von [³²P]- γ -ATP *in vitro* phosphoryliert. Die Visualisierung der phosphorylierten Peptide erfolgte mittels Autoradiographie (oberer Teil). Anschließend wurden die Filter mit Coomassie-Blau gefärbt, um die Spots den Phosphorylierungssignalen zuordnen zu können (unterer Teil). **a)** Peptidfilter mit den Spots 1-3 und **b)** Peptidfilter mit den Spots 4-13.

6.1.5 *In vitro* Bindung von Sec63C an die Proteinkinase CK2

Die Interaktion zwischen einer Kinase und ihrem Substrat, die zu Phosphorylierung führt, äußert sich nicht zwangsläufig in einer Bindung. Jedoch zeigen die meisten Substrate der Proteinkinase CK2 auch eine Bindung an die CK2. In den vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass GST-Sec63C durch die Proteinkinase CK2 phosphoryliert wird. Als nächstes soll die Bindung beider Proteine *in vitro* mittels GST-„pull-down-assay“ nachgewiesen werden. Die Methode basiert auf einer Affinitätschromatographie, bei der die gereinigten, rekombinanten GST-Fusionsproteine an GSH-Sepharose gebunden werden. Durch Zugabe eines weiteren gereinigten, rekombinanten Proteins kann es zur Bindung beider Proteine untereinander kommen. Hierzu wurde gereinigtes, rekombinantes GST-Sec63C an GSH-Sepharose gebunden und mit gereinigtem, rekombinantem CK2-Holoenzym inkubiert. Als Kontrollen wurden in einem Ansatz CK2-Holoenzym mit GSH-Sepharose inkubiert und in einem weiteren wurde CK2-Holoenzym mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-tag inkubiert. Beide Kontrollen dienten zur Identifizierung von unspezifischen Bindungen, zum einem an die GSH-Sepharose, zum andern an das GST-tag. Die Kontrolle mit GSH-Sepharose alleine diente zum Nachweis möglicher, unspezifischer Signale nach Coomassie-Blau-Färbung des SDS-Polyacrylamidgels. Als Kontrolle zur Bestimmung des gebundenen Proteins diente gereinigtes, rekombinantes CK2-Holoenzym. Nach Inkubation wurden die Ansätze mehrmals gewaschen und danach mit SDS-Probenpuffer von der GSH-Sepharose eluiert. Die Eluate wurden elektrophoretisch über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel getrennt und das Gel anschließend zur Visualisierung mit Coomassie-Blau gefärbt. Abbildung 8 zeigt in der Spur CK2 + GST-Sec63C eine deutliche Bande sowohl für die CK2 α -Untereinheit als auch für CK2 β -Untereinheit. Die Kontrollen CK2 + GST, GSH + CK2 sowie GSH alleine zeigten keine Banden. Demnach bindet das CK2-Holoenzym *in vitro* an GST-Sec63C.

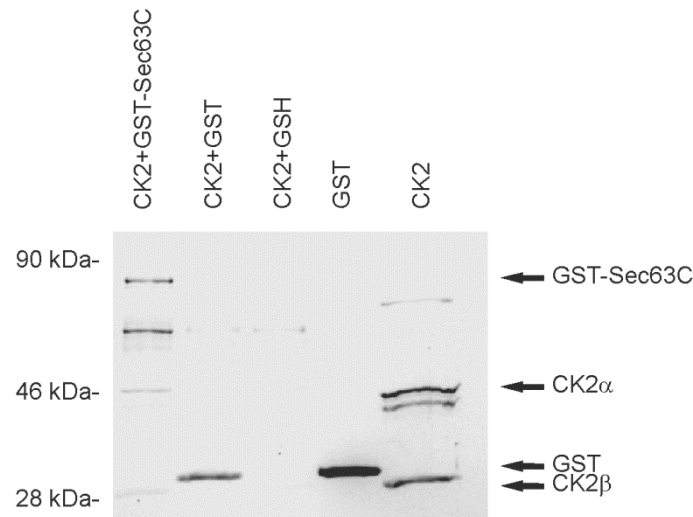


Abbildung 8: GST-„pull-down-assay“ zum Nachweis der *in vitro* Bindung von Sec63C an das CK2-Holoenzym. Gereinigtes, rekombinantes GST-Sec63C wurde an GSH-Sepharose gebunden und mit gereinigtem, rekombinantem CK2-Holoenzym inkubiert. Die Kontrollen wurden analog behandelt. Zudem diente als Kontrolle gereinigtes, rekombinantes CK2-Holoenzym. Die Ansätze wurden gewaschen, mittels SDS-Probenpuffer eluiert und anschließend über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Blau-Färbung.

6.1.6 Kolokalisation von endogenem Sec62 mit endogener CK2 α -Untereinheit

Die Assoziation von Sec61, Sec62 und Sec63 in einem trimeren Komplex wurde bereits von Meyer *et al.* nachgewiesen [5]. Darüber hinaus wurde die CK2 am ER identifiziert [107]. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen sollte nun eine mögliche Lokalisierung der CK2 am trimeren Sec-Komplex nachgewiesen werden. Zur Analyse einer Kolokalisation zweier Proteine inkubiert man Zellen mit den primären Antikörpern der gesuchten Proteine, wobei beachtet werden muss, dass die beiden primären Antikörper aus zwei verschiedenen Spezies kommen. Bei den sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpern sollte beachtet werden, dass die Emissionsspektren weit genug auseinander liegen. Visualisiert wird die Kolokalisation durch Übereinanderlegen beider Fluoreszenzkanäle. Auf Grund der hohen unspezifischen Signale des anti-Sec63 Antikörpers in der Immunfluoreszenz sollte eine Kolokalisation zwischen der CK2 α -Untereinheit und Sec62 analysiert werden. Hierzu wurden HepG2-Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den Antikörpern anti-Sec62 gegen Sec62 und 1A5 gegen die CK2 α -Untereinheit inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurden zum einen ein Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor488- und zum andern ein Ziege-anti-Maus AlexaFluor594-Antikörper benutzt. Abbildung 9 zeigt für die CK2 α -Untereinheit sowohl eine zytoplasmatische als auch nukleäre Lokalisation. Die Fluoreszenz mit dem anti-Sec62 Antikörper zeigt hingegen deutliche Signale am ER. Nach Übereinanderlegen beider Fluoreszenzkanäle ist eine sichtbare Gelbfärbung im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums zu vermerken. Die Kolokalisation zeigt, dass sich die CK2 α -Untereinheit in räumlicher Nähe zu Sec62 befindet.

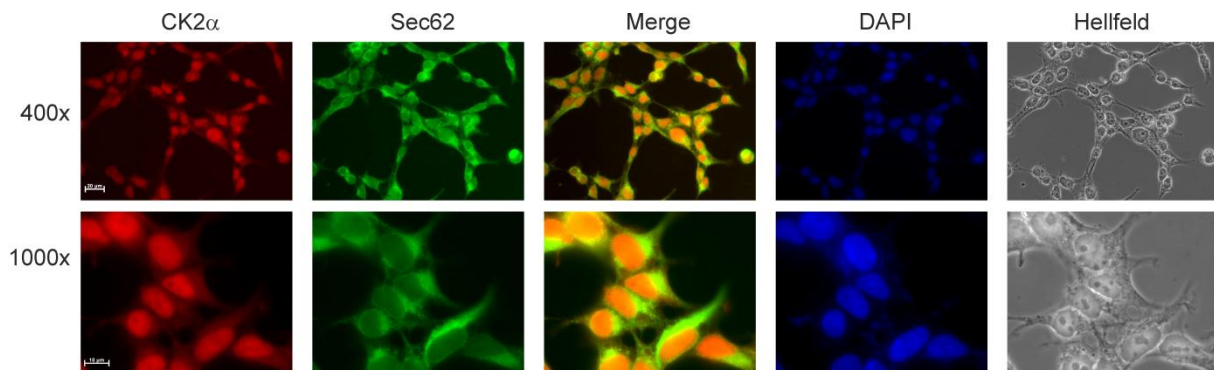


Abbildung 9: Kolokalisations-Analysen von endogenem Sec62 mit der endogenen CK2 α -Untereinheit in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät, 24 h später mit 3.7% Formaldehyd fixiert, mit 0.5% Triton X-100 permeabilisiert und mit den Antikörpern anti-Sec62 und 1A5 gegen die CK2 α -Untereinheit für 30 min bei 37°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor488- und ein Ziege-anti-Maus AlexaFluor594-Antikörper verwendet. Vergrößerungen: 400x und 1000x.

6.1.7 *In vivo* Bindung von Sec63 an die Proteinkinase CK2

Nachdem eine Kolokalisation *in vivo* gezeigt werden konnte, sollte eine Bindung der CK2 mit Sec63 *in vivo* mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Affinitätschromatographie, bei der Antikörper, auf Grund der hohen Affinität ihrer Fc-Region zu Protein-A-Sepharose, an diese binden. Mit diesen Komplexen lässt sich nun aus einem Proteingemisch das gewünschte Protein präzipitieren. Unter einer Kopräzipitation versteht man die Bindung eines oder mehrerer Proteine an das zu präzipitierende Protein. Der somit präzipitierte Proteinkomplex kann anschließend mittels Westernblot analysiert werden. Zur Analyse einer *in vivo* Bindung von Sec63 an die CK2 wurden die Proteine aus einem Zellextrakt der HepG2-Zellen präzipitiert. Zum Blockieren von unspezifischen Bindungen wurde der Zellextrakt zuerst mit einem Gemisch aus CL-4B/Protein-A-Sepharose inkubiert (Vorpräzipitat). Anschließend wurde der Zellextrakt mit Protein-A-Sepharose inkubiert, an die der spezifische Antikörper (anti-Sec63) bereits gekoppelt wurde (Immunpräzipitat). Als Kontrolle diente ein Aliquot der CL-4B/Protein-A-Sepharose, ein Aliquot des Antikörpers, mit dem präzipitiert wurde, ein Aliquot des Zellextraktes vor der Präzipitation sowie ein Aliquot des Überstandes nach der Immunpräzipitation. Die Ansätze Vorpräzipitat, Immunpräzipitat und CL-4B/Protein-A-Sepharose wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und zusammen mit den restlichen Kontrollen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, welches für die Westernblot-Analyse eingesetzt wurde. Präzipitiertes Sec63 wurde mit dem anti-Sec63 Antikörper nachgewiesen, kopräzipitierte CK2 mit den Antikörpern 1A5 gegen die CK2 α -Untereinheit und 6D5 gegen die CK2 β -Untereinheit. Abbildung 10 zeigt die Koimmunpräzipitations-Analyse. In der Spur des Immunpräzipitates (IP) ist eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht von circa 100 kDa zu erkennen. Hierbei handelt es sich um endogenes

Sec63. Auch die Spuren, in denen Zellextrakt (ZE) und Überstand nach der Präzipitation (ÜS) aufgetragen wurden, zeigen Proteinbanden für endogenes Sec63. Des Weiteren ist in der Spur des (IP) eine schwache Bande für die CK2 α -Untereinheit zu sehen. Die Spuren ZE und ÜS zeigen für die Untereinheit CK2 α deutlich stärkere Signale. Für die CK2 β -Untereinheit konnten nur Signale in den Spuren ZE und ÜS detektiert werden. Die Kontrollen Vorpräzipitat (VP) und Antikörper (AK) zeigen jeweils keine Signale. Die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation demonstrieren, dass Sec63 an die CK2 α -Untereinheit bindet, hingegen konnte die CK2 β -Untereinheit am Immunpräzipitat nicht nachgewiesen werden.

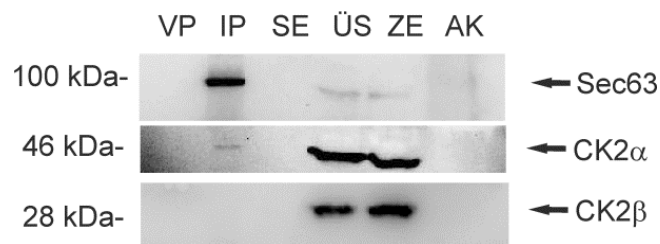


Abbildung 10: Koimmunpräzipitations-Analyse zum Nachweis einer Bindung von Sec63 an die CK2 *in vivo*. HepG2-Zellextrakte wurden mit einem Gemisch aus CL-4B/Protein-A-Sepharose vorinkubiert (VP) und danach auf, mit spezifischen Antikörpern (anti-Sec63) gebundene, CL-4B/Protein-A-Sepharose überführt (IP). Nach der Immunpräzipitation wurde ein Aliquot des Überstandes (ÜS) zur Kontrolle der Präzipitation entnommen. Ebenso diente ein Aliquot der CL-4B/Protein-A-Sepharose (SE), ein Aliquot des Zellextraktes (ZE) und ein Aliquot der Antikörper (AK) als Kontrolle. Die Präzipitate wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und mit den restlichen Ansätzen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörpern und anschließender ECL- Behandlung. Zur Detektion der CK2 α -Untereinheit und der CK2 β -Untereinheit dienten die Antikörper 1A5 und 6D5. Sec63 wurde mit dem anti-Sec63 Antikörper detektiert. VP: Vorpräzipitat, IP: Immunpräzipitat, ÜS: Überstand, SE: Sepharose, ZE: Zellextrakt, AK: Antikörper.

6.1.8 Biologische Relevanz der CK2-Phosphorylierung von Sec63

6.1.8.1 Auswirkung der CK2-Phosphorylierung des Sec63 auf die Bindung mit Sec62

Mehrere Studien konnten eine Bindung zwischen Sec63 und Sec62 nachweisen [5, 12, 124]. Die Bindung zwischen Sec62 und Sec63 *in vitro* existiert auf Grund der negativen Ladung des Sec63 C-Terminus und der positiven Ladungen des Sec62 N-Terminus. Es stellte sich nun die Frage, ob die C-terminale CK2-Phosphorylierung von Sec63 einen Einfluss auf die Bindung ausübt. Dies wurde mittels GST-„pull-down“-Experimenten analysiert. Dazu wurde gereinigtes, rekombinantes GST-Sec63C an GSH-Sepharose gebunden und mit gereinigtem, rekombinantem His-getagtem N-terminalen-Sec62 (Sec62N) inkubiert. Zur Untersuchung, ob die CK2-Phosphorylierung von Sec63 einen Einfluss auf die Sec63/Sec62-Bindung hat, wurden GST-Sec63C an GSH-Sepharose gebunden und mit CK2-Holoenzym und ATP phosphoryliert. Anschließend wurde der Ansatz mehrmals gewaschen und mit Sec62N inkubiert. Des Weiteren wurden fünf Kontrollen angesetzt. Zur Identifizierung der Proteine wurde das SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau gefärbt. Nach Inkubation wurden die Ansätze mehrmals gewaschen und mit SDS-Probenpuffer von der GSH-Sepharose eluiert. Anschließend wurden die Ansätze elektrophoretisch über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und getrocknet. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der GST-„pull-down“-Analyse. Nach vorheriger Phosphorylierung von GST-Sec63C durch das CK2-Holoenzym ist eine deutlich erhöhte Bindung von Sec62N an GST-Sec63C zu erkennen. In der Negativkontrolle ist keine Bindung von Sec62N an das GST-tag zu sehen (Abbildung 11 a). Abbildung 11 b zeigt die Mittelwerte der densitometrischen Auswertungen der SDS-Polyacrylamidgele. Es ist zu sehen, dass doppelt so viele GST-Sec63C/Sec62N-Komplexe vorliegen, wenn der C-Terminus des Sec63 vor der Bindung an Sec62 von dem CK2-Holoenzym phosphoryliert wurde. Somit hat die CK2-Phosphorylierung von Sec63 eine positive Auswirkung auf die Sec63/Sec62-Bindung.

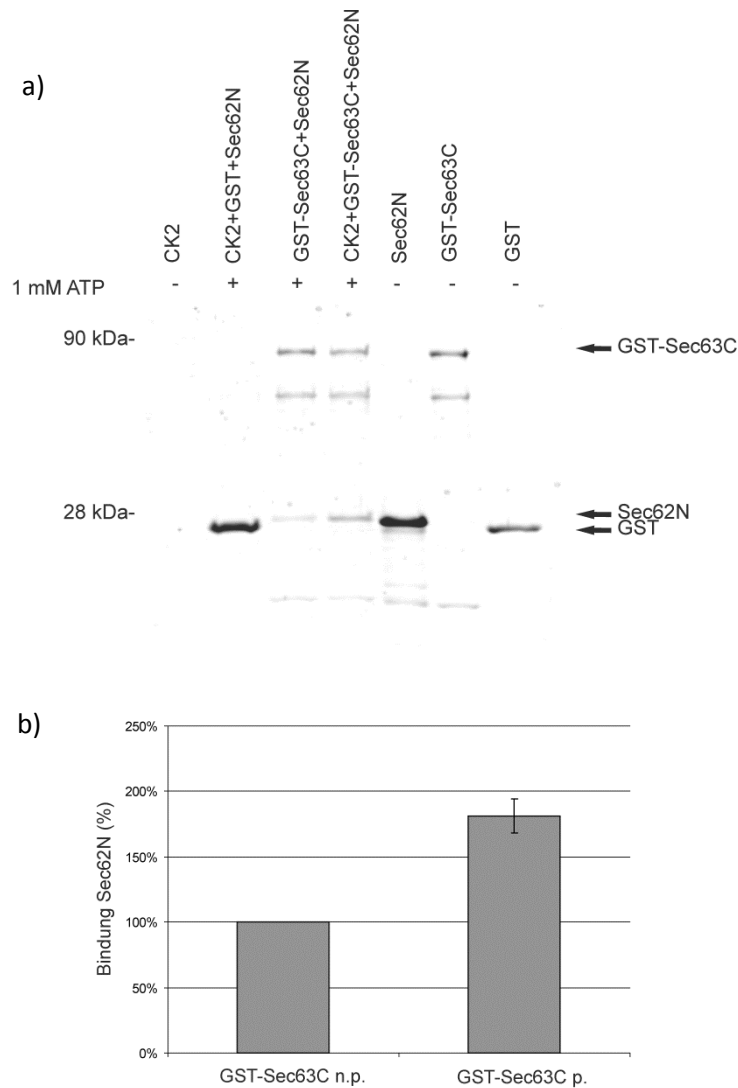


Abbildung 11: GST-„pull-down-assay“ zur Untersuchung der Sec63/Sec62-Bindung *in vitro*. **a)** Gereinigtes, rekombinantes GST-Sec63C wurde an GSH-Sepharose gebunden und mit gereinigtem, rekombinantes Sec62N inkubiert. Parallel wurde in einem Ansatz gereinigtes, rekombinantes GST-Sec63C an GSH-Sepharose gebunden und durch CK2-Holoenzym in Gegenwart von ATP phosphoryliert. Der Ansatz wurde mehrmals gewaschen und anschließend mit Sec62N inkubiert. Als Kontrolle wurde gereinigtes, rekombinantes GST-tag an GSH-Sepharose gebunden und mit Sec62N inkubiert. Zudem dienten gereinigtes, rekombinantes CK2-Holoenzym; gereinigtes, rekombinantes GST-Sec63C; gereinigtes, rekombinantes GST-tag und gereinigtes, rekombinantes Sec62N als Kontrollen. Die Ansätze wurden gewaschen, mittels SDS-Probenpuffer eluiert und anschließend über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Blau-Färbung. **b)** Die Proteinbanden wurden densitometrisch analysiert und Sec62N aus dem Ansatz ohne CK2-Holoenzym wurde 100% gesetzt. Das Balkendiagramm stellt den Mittelwert von fünf unabhängigen Experimenten dar. n.p.: nicht phosphoryliert, p.: phosphoryliert.

6.1.8.2 Auswirkung der CK2-Hemmung auf die Sec63/Sec62-Bindung *in vivo*

Als Nächstes wurde getestet, ob die Phosphorylierung von Sec63 durch die CK2 einen Einfluss auf die Sec63/Sec62-Bindung *in vivo* hat. Mit Hilfe des spezifischen CK2-Hemmstoffes Quinalizarin sollte eine mögliche Phosphorylierung von Sec63 durch die CK2 unterbleiben [125]. Dazu wurden HepG2-

Zellen über einen Zeitraum von 24 h und 48 h mit Quinalizarin (Q) behandelt und Zellextrakte generiert. Anschließend wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt, wobei Sec62 präzipitiert und Sec63 kopräzipitiert wurde. Die Zellextrakte wurden zuerst mit einem Gemisch aus CL-4B/Protein-A-Sepharose vorinkubiert (Vorpräzipitat), um unspezifische Bindungen zu blocken. Danach wurden die Zellextrakte mit Protein-A-Sepharose inkubiert, an die der spezifische Antikörper anti-Sec62 gekoppelt wurde (Immunpräzipitat). Als Kontrolle diente ein Aliquot des Antikörpers mit dem präzipitiert wurde, ein Aliquot des Überstandes nach der Immunpräzipitation (ÜS), sowie ein Aliquot des Zellextraktes vor der Präzipitation (ZE). Zur Identifizierung der Proteine im Westernblot wurden raue Mikrosomen (RM) verwendet. Die gebundenen Komplexe (IP) wurden mit einem Sec62-Peptid eluiert und anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und zusammen mit den restlichen Kontrollen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, welches für die Westernblot-Analyse eingesetzt wurde. Sec63 und Sec62 wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Abbildung 12 a) zeigt die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation nach 24 h CK2-Inhibition. In der Spur, in der raue Mikrosomen aufgetragen wurden, ist eine Bande für Sec62 auf Höhe des Molekulargewichts von circa 55 kDa zu erkennen. Die gleiche Bande ist auch in den Spuren der Immunpräzipitation (IP), der Überstände (ÜS) und der Zellextrakte (ZE) nach DMSO und Quinalizarin Behandlung zu erkennen, wobei die Spuren der Überstände ein deutlich schwächeres Signal zeigen. In den beiden Spuren der Immunpräzipitate (IP) konnte Sec63 nachgewiesen werden, was auf eine erfolgreiche Koimmunpräzipitation hinweist. Die Überstände nach Präzipitation (ÜS) zeigen gleiche Mengen an Sec63 wie der Zellextrakt (ZE). Daraus ergibt sich, dass nur ein geringer Teil des Sec63 mit Sec62 komplexiert ist. Nach der 48 h Behandlung ist ein ähnliches Bild wie nach 24 h zu erkennen, allerdings ist in den Spuren der Quinalizarin behandelten Proben ein deutlich stärkeres Signal für Sec62 und Sec63 zu erkennen (Abbildung 12 b). Aus den Koimmunpräzipitations-Experimenten geht hervor, dass Sec63 an Sec62 *in vivo* bindet, allerdings führt die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mit Quinalizarin zu keiner detektierbaren Reduktion der Bindung. Allerdings konnte ein erhöhter Proteingehalt an Sec62 und Sec63 nach CK2-Hemmung detektiert werden. Neueste Studien zeigen, dass ein erhöhter Proteingehalt an Sec63 auf eine Expansion des ER hindeutet und dies eine Folge von ER-Stress ist [126].

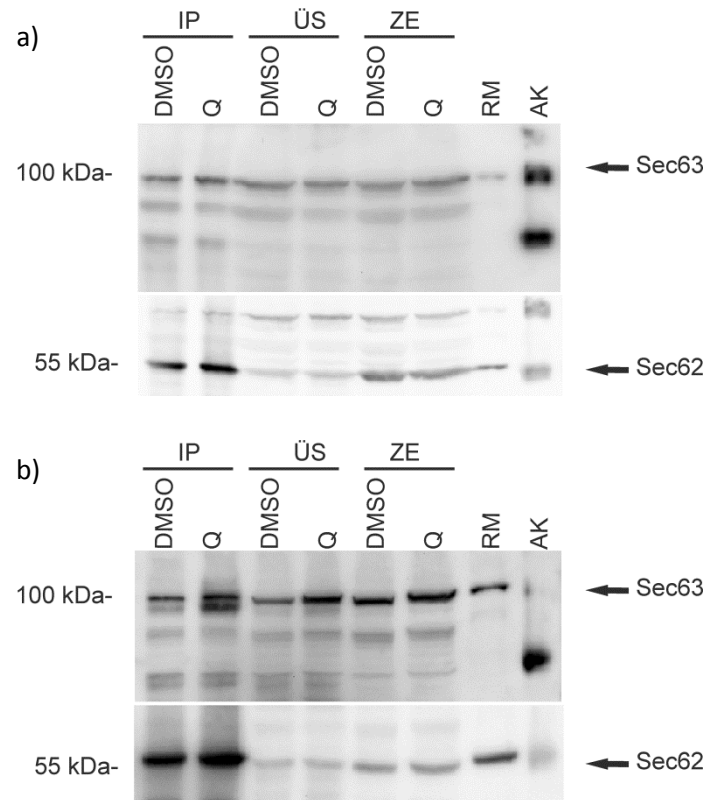


Abbildung 12: Koimmunpräzitations-Analysen zum Nachweis einer Bindung *in vivo* zwischen Sec63 und Sec62 in Abhängigkeit einer CK2-Phosphorylierung. HepG2-Zellen wurden mit Quinalizarin (Q) und DMSO über einen Zeitraum von **a)** 24 h und **b)** 48 h behandelt. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt und mit einem Gemisch aus CL-4B/Protein-A-Sepharose vorinkubiert (VP) und danach auf CL-4B/Protein-A-Sepharose überführt, an welche die spezifischen Antikörper (anti-Sec62) gebunden wurden (IP). Nach der Immunpräzitation wurde ein Aliquot des Überstandes (ÜS) zur Kontrolle der Präzitation entnommen. Ebenso diente ein Aliquot der CL-4B/Protein-A-Sepharose (SE), ein Aliquot des Zellextraktes (ZE) und ein Aliquot der Antikörper (AK) als Kontrolle. Zur Identifizierung von Sec63 und Sec62 wurden raue Mikrosomen (RM) verwendet. Die Präzipitate wurden mit einem Sec62-Peptid eluiert und mit den restlichen Ansätzen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion von Sec62 diente der Antikörper anti-Sec62. Sec63 wurde mit dem anti-Sec63 Antikörper detektiert. IP: Immunpräzipitat, ÜS: Überstand, ZE: Zellextrakt, AK: Antikörper, RM: raue Mikrosomen.

6.2 ATF4 und die Proteinkinase CK2

Mit Sec63 wurde ein Substrat der CK2 identifiziert, das für die Translokation von Proteinen über die ER-Membran eine wichtige Rolle spielt. Kommt es allerdings während oder nach der Translokation zur Störung der Proteinfaltung, so wird die „unfolded protein response“ (UPR) in Gang gesetzt. Dabei übernimmt der „activating transcription factor 4“ (ATF4) eine Schlüsselfunktion. Dieser Transkriptionsfaktor dient als Stresssensor und reguliert Wege des Zellüberlebens beziehungsweise der Apoptose. ATF4 wurde von unserer Arbeitsgruppe in einem Hefe-2-Hybrid-System als Bindungspartner der CK2 α -Untereinheit identifiziert. Es wurde nun nachfolgend analysiert, ob ATF4 als Substrat der CK2 fungiert und welchen Einfluss ATF4 als Substrat der CK2 auf die UPR nimmt.

6.2.1 *In silico* Phosphorylierung von ATF4

Als erstes wurde der Frage nachgegangen, ob es sich bei ATF4 um ein Substrat der CK2 handelt. Dafür wurde eine *in silico* Phosphorylierung durchgeführt. Die computerbasierende Analyse gibt erste Hinweise darauf, ob es sich bei dem Protein um ein Substrat der CK2 handeln könnte. Im Falle von ATF4 konnten mittels *in silico* Phosphorylierungsanalyse mit einer niedrigen Stringenz (scansite.mit.edu) zwölf putative Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Abbildung 13 zeigt die schematische Darstellung der ATF4-Polypeptidkette mit den zwölf putativen CK2-Phosphorylierungsstellen.

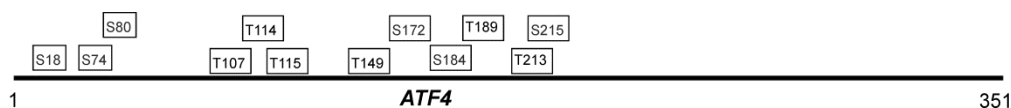


Abbildung 13: Schematische Darstellung der humanen ATF4-Polypeptidkette, bestehend aus 351 Aminosäuren. Umrahmt sind jeweils die putativen CK2-Phosphorylierungsstellen der Analyse (scansite.mit.edu) dargestellt.

6.2.2 Herstellung von ATF4 und ATF4-Fragmenten zur Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen

Auf Grund der hohen Anzahl möglicher CK2-Phosphorylierungsstellen wurden fünf Fragmente von ATF4 generiert, welche die Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen erleichtern sollen. Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung der Fragmente. Das Fragment N1 beinhaltet die N-terminalen Aminosäuren 6-92, das Fragment N2 die Aminosäuren 1-200. Das Fragment C1 schließt die C-terminalen Aminosäuren 94-351 ein, das Fragment C2 die Aminosäuren 173-351 und das Fragment C3 die Aminosäuren 190-351.

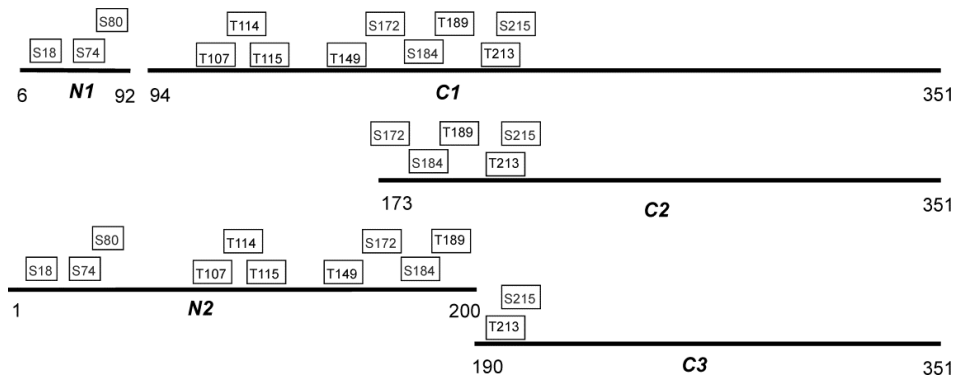


Abbildung 14: Schematische Darstellung der ATF4-Fragmente (N1, N2, C1, C2 und C3) zur Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen. Umrahmt sind jeweils die putativen CK2-Phosphorylierungsstellen dargestellt.

In einem ersten Schritt wurden die ATF4-Fragmente kloniert, die zur späteren Proteinexpression verwendet wurden. Die PCR-Primer wurden so ausgewählt, dass der 5'-Primer eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI und der 3'-Primer eine für das Restriktionsenzym EcoRI einfügt. Die Produkte wurden über ein 1.5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden mit dem entsprechenden Molekulargewicht wurden aus dem Gel geschnitten und die DNA daraus isoliert. Abbildung 15 zeigt am Beispiel der Fragmente N2 und C3 die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Spur 1 dient als Positivkontrolle und zeigt das PCR-Produkt der ATF4-cDNA. In den Spuren 2-5 sind die PCR-Produkte der Fragmente N2 und C3 aufgetragen, welche nachfolgend zur Klonierung verwendet wurden

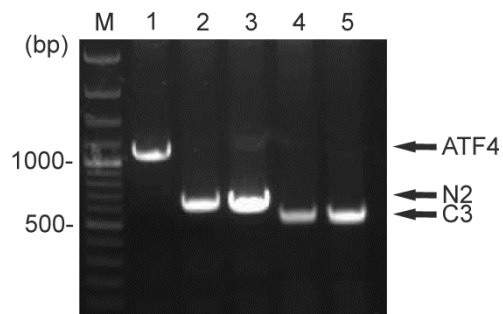


Abbildung 15: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente. Die PCR-Produkte wurden mit TAE-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch über ein 1.5% Agarosegel aufgetrennt. M: 1 kb DNA-Marker; Spur 1: Positivkontrolle; Spuren 2-3: PCR-Produkte des Fragments N2; Spuren 4-5: PCR-Produkte des Fragments C3.

Volllängen ATF4 und die ATF4-Fragmente wurden mit dem EcoRI- und BamHI-linearisierten Expressionsvektor pGEX-4T-1 ligiert und die Ligationsansätze zur Transformation eingesetzt. Die Integration des Inserts wurde mit Hilfe der Kolonie-PCR analysiert. Die positiven Klone der Kolonie-PCR wurden sequenziert. Abbildung 16 zeigt am Beispiel der Fragmente N2 und C3 die elektrophoretische Auftrennung der Kolonie-PCR-Produkte (Spuren 1-8). Es sind deutliche Banden für die PCR-Produkte zu erkennen, lediglich in Spur sieben ist eine, im Vergleich zu den restlichen Banden, schwächere Bande zu erkennen. Aus der elektrophoretischen Auftrennung der Kolonie-PCR-

Produkte geht hervor, dass die Fragmente N2 und C3 erfolgreich in den Vektor pGEX-4T-1 ligiert wurden.

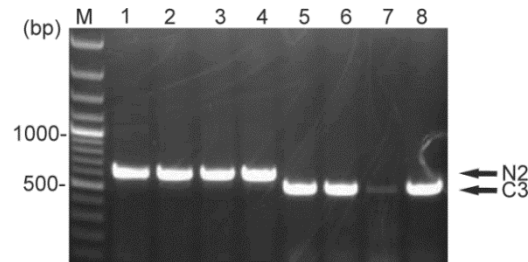


Abbildung 16: Elektrophoretische Auftrennung der Kolonie-PCR-Produkte über ein 1.5% Agarosegel. M: 1 kb DNA-Marker; Spuren 1-4: PCR-Produkte des Fragments N2; Spuren 5-8: PCR-Produkte des Fragments C3.

6.2.3 Bakterielle Expression und Reinigung von ATF4 und ATF4-Fragmenten

Zur Herstellung von rekombinantem ATF4 und rekombinanter ATF4-Fragmente wurden *E. coli* BL21 (DE3) mit den zuvor generierten Expressionsvektoren transformiert. Anschließend wurden Vorkulturen mit den Transformationsansätzen angeimpft. Nach 24 h Kultivierung wurde mit jeder Vorkultur eine Hauptkultur angeimpft. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde jeder Hauptkultur eine Probe entnommen (V: vor der Induktion). Die Hauptkultur wurde anschließend mit IPTG induziert und weitere 4 h kultiviert (N: nach der Induktion). Abbildung 17 zeigt am Beispiel des Fragments N2 die Proteinexpression. Nach Induktion der Proteinexpression (N) ist eine deutliche Proteinbande bei einem Molekulargewicht von circa 49 kDa zu erkennen, die dem Fragment GST-N2 entspricht.

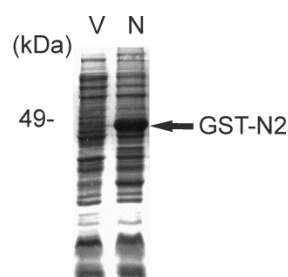


Abbildung 17: Expressionskontrolle von GST-N2 vor und nach Induktion der Proteinexpression. Mit pGEX-4T-1 N2 transformierte *E. coli* BL21 (DE3) wurden 4 h mit 1 mM IPTG induziert. Je ein Aliquot wurden vor und 4 h nach der Induktion entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Detektiert wurden die Proteinbanden mittels Coomassie-Blau-Färbung. V: vor der Induktion; N: nach der Induktion.

Die Aufreinigung von GST-ATF4 und der GST-ATF4-Fragmente erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Die Bakterien-Hauptkulturen wurden abzentrifugiert und die Bakterienpellets lysiert. Nach der Zelllyse erfolgte die Bindung der rekombinanten GST-

Fusionsproteine an ein Trägermaterial, der sogenannten Glutathion-Sepharose (GSH-Sepharose), die eine sehr hohe Affinität zu GST-Fusionsproteinen aufweist. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden gereinigt und mit Hilfe von Glutathion eluiert. Jeweils vier Eluate wurden entnommen, dialysiert und anschließend eingengt. Die Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine wurde mittels einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit darauffolgender Coomassie-Blau-Färbung überprüft. In Abbildung 18 ist das Ergebnis einer Aufreinigung am Beispiel des N2-Fragments dargestellt. Die Spuren 1-4 zeigen Aliquots der vier Eluate. In allen Spuren ist eine starke Bande bei einem Molekulargewicht von circa 49 kDa zu erkennen, welche dem Molekulargewicht des ATF4-Fragments N2 (20 kDa) fusioniert mit dem GST-tag (29 kDa) entspricht.

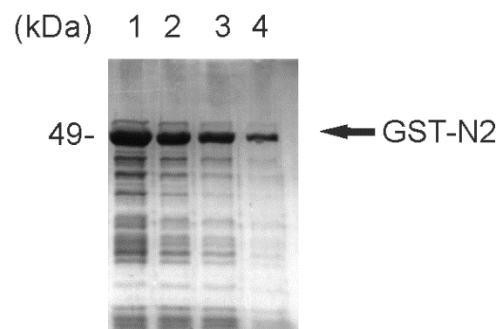


Abbildung 18: Kontrolle der Aufreinigung des Fragments GST-N2. Ein Aliquot der Fraktionen 1-4 wurde in einem 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt.

6.2.4 *In vitro* Phosphorylierung von ATF4

Zwölf putative CK2-Phosphorylierungsstellen wurden nach Durchführung einer *in silico* Phosphorylierung in der Polypeptidkette von ATF4 identifiziert. Jedoch ist eine *in silico* Phosphorylierungs-Analyse kein Garant für eine Phosphorylierung eines Proteins *in vitro* beziehungsweise *in vivo*. Daher sollte überprüft werden, ob ATF4 auch *in vitro* ein Substrat der CK2 ist. Dies geschah unter Zuhilfenahme eines *in vitro* CK2-Phosphorylierungsassay. Dabei wurde gereinigtes, rekombinantes GST-ATF4 mit gereinigtem, rekombinatem CK2-Holoenzym und [³²P]-γ-ATP inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und die Phosphorylierung wurde mittels Autoradiographie detektiert. Zur Kontrolle wurden *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen angesetzt, in welchen nur CK2-Holoenzym + [³²P]-γ-ATP, CK2-Holoenzym + GST-tag + [³²P]-γ-ATP und GST-ATF4 + [³²P]-γ-ATP vorlagen. Die Kontrollen dienten zur eindeutigen Identifizierung der Phosphorylierung durch das CK2-Holoenzym (Abbildung 19). Die Autoradiographie (oberer Teil) zeigt nur in der Spur GST-ATF4 + CK2-Holoenzym eine Bande bei einem Molekulargewicht von circa 66 kDa, wobei es sich um GST-ATF4 handelt. Die Kontrollspuren

zeigen keine Phosphorylierung auf der Höhe von GST-ATF4. Auch die Kontrolle CK2-Holoenzym + GST-tag + [³²P]-γ-ATP zeigt, dass die CK2 einzig und allein ATF4 phosphoryliert und nicht das GST-tag. Der untere Teil zeigt das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel, wodurch demonstriert wird, dass gleiche Proteinmengen zur *in vitro* Phosphorylierung eingesetzt wurden. Folglich wird ATF4 von dem CK2-Holoenzym *in vitro* phosphoryliert.

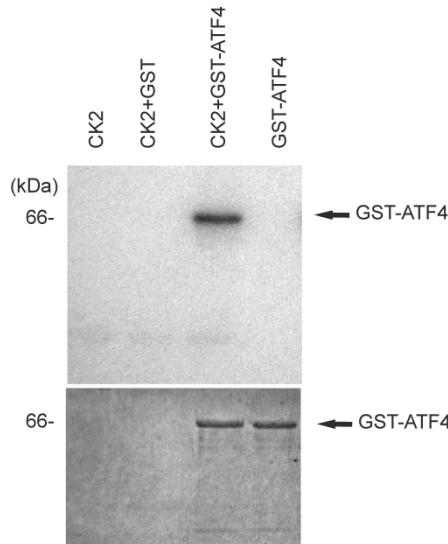


Abbildung 19: *In vitro* Phosphorylierung von ATF4 durch das CK2-Holoenzym. Die *in vitro* Phosphorylierungsansätze wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographie, der untere Teil zeigt das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel.

6.2.5 *In vitro* Phosphorylierung der ATF4-Fragmente zur Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstellen

Die *in vitro* Phosphorylierung von ATF4 bestätigt das Ergebnis der *in silico* Analyse, jedoch konnte keine Aussage darüber getroffen werden, welche der 12 putativen CK2-Phosphorylierungsstellen phosphoryliert wird bzw. werden. Die Kartierung der CK2-Phosphorylierungsstellen in der Polypeptidkette von ATF4 sollte daher unter Zuhilfenahme der ATF4-Fragmente geschehen. Wie schon bei der *in vitro* Phosphorylierung von ATF4 durch das CK2-Holoenzym, so wurden auch die ATF4-Fragmente einer *in vitro* Phosphorylierung unterzogen. Abbildung 20 a) zeigt schematisch die putativen Phosphorylierungsstellen in den Fragmenten von ATF4. Die Autoradiographien in Abbildung 20 b) zeigen, welche der gereinigten, rekombinanten GST-ATF4-Fragmente durch gereinigtes, rekombinantes CK2-Holoenzym *in vitro* phosphoryliert wurden. Als Kontrollen wurden auch in diesem Experiment CK2-Holoenzym + [³²P]-γ-ATP, CK2-Holoenzym + [³²P]-γ-ATP + GST-tag sowie die ATF4-Fragmente + [³²P]-γ-ATP verwendet. Die Autoradiographien zeigen deutliche Banden

in den Spuren der ATF4-Fragmente CK2 + GST-C1, CK2 + GST-C2 und CK2 + GST-C3. Die N-terminalen Fragmente GST-N1 und GST-N3 zeigten keine Banden in den Autoradiographien. Mit Hilfe der ATF4-Fragmente konnte die Phosphorylierungsstellen auf die Aminosäuren Threonin 213 und Serin 215 eingegrenzt werden. Der untere Teil zeigt das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel, wodurch gezeigt wird, dass gleiche Proteinmengen zur *in vitro* Phosphorylierung eingesetzt wurden.

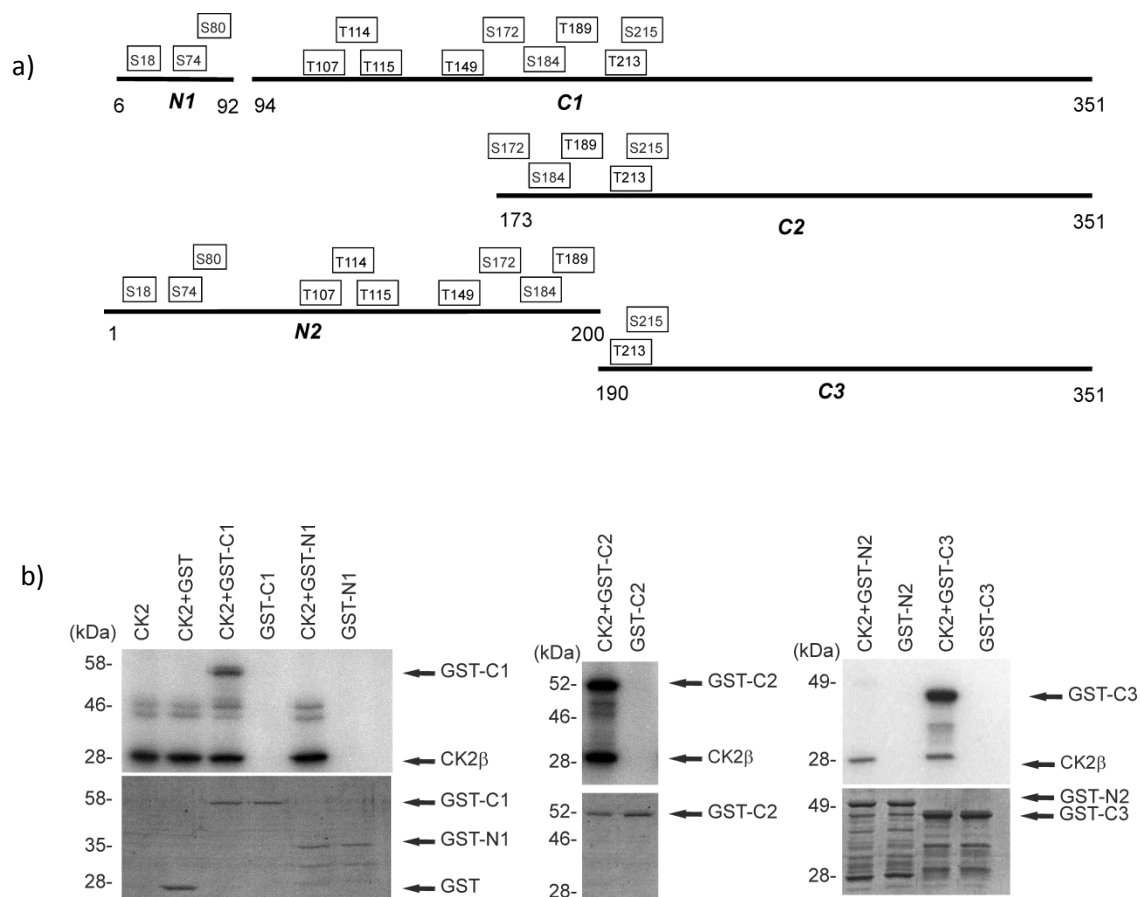


Abbildung 20: *In vitro* Phosphorylierung der ATF4-Fragmente **a)** Schematische Darstellung der ATF4-Fragmente zur Eingrenzung der putativen CK2-Phosphorylierungsstellen. Umrahmt sind jeweils die putativen CK2 Phosphorylierungsstellen dargestellt. **b)** Die *in vitro* Phosphorylierungsansätze wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und über 12.5% SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt und getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographien, der untere Teil zeigt die mit Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen.

6.2.6 Erzeugung der ATF4-Phosphorylierungsmutanten

Mit den *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten konnten die zwölf putativen Phosphorylierungsstellen auf zwei mögliche Phosphorylierungsstellen reduziert werden. Um genau zu bestimmen, welche der beiden Stellen von der CK2 phosphoryliert werden, wurden Alanin-Mutanten erzeugt. Die Einführung eines Alanins anstelle eines Threonins oder Serins in die spezifische CK2-Konsensussequenz des Substrates führt dazu, dass die Phosphorylierung des Substrates durch die

CK2 unterbleibt. Die Alanin-Mutanten wurden mittels „overlapping“-PCR generiert. Dieses Verfahren erfordert drei PCR-Reaktionen. In den ersten beiden PCR-Reaktionen wurden zwei Fragmente erzeugt, die im überlappenden Bereich die gewünschte Mutation besitzen. Anschließend wurden die PCR-Produkte über ein 1.5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen die Herstellung einer Alanin-Mutante am Beispiel der Mutation Serin 215 zu Alanin (S215A). Abbildung 21 zeigt in den Spuren 1 und 2 die Ergebnisse der ersten beiden PCR-Reaktionen. Sie dienten zur Erzeugung der Mutation S215A, bei der das Serin in Position 215 zu einem Alanin getauscht wurde. In Spur 1 ist das PCR-Produkt des Fragments 1 aufgetragen. Es hat eine Größe von circa 660 bp. In Spur 2 ist das PCR-Produkt des Fragments 2 aufgetragen mit einer Größe von circa 393 bp.

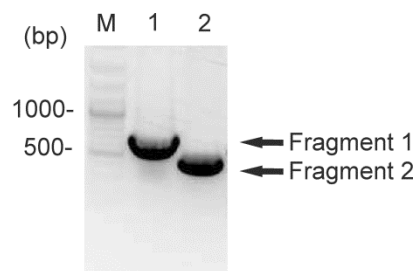


Abbildung 21: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die PCR-Produkte (Fragment 1 und Fragment 2) wurden mit TAE-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch über ein 1.5% Agarosegel aufgetrennt. M: 1 Kb DNA-Marker; Spur 1: Fragment 1; Spur 2 Fragment 2.

Die Fragmente wurden aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Zur Hybridisierung der komplementären 3'-Enden wurden die beide Fragmente vereint, denaturiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Hybridisierungsansatz wurde im Anschluss für die dritte PCR eingesetzt. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der dritten PCR.

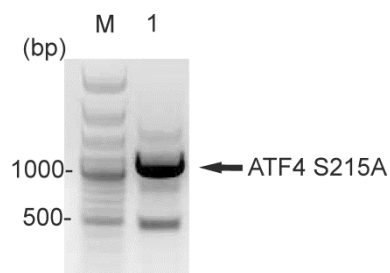


Abbildung 22: Überlappende PCR. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1.5% Agarosegel. M: 1 Kb DNA-Marker; Spur 1: ATF4 S215A

Das dritte PCR-Produkt wurde aus dem 1.5% Agarosegel isoliert, aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI verdaut, um es nachfolgend in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 zu klonieren. Das Expressionskonstrukt wurde anschließend in *E. coli* XL1 blue transformiert und durch die Kolonie-PCR wurden positive Klone identifiziert. Der Erfolg der gerichteten Mutagenese

wurde mittels Sequenzierung überprüft. Neben der Mutante ATF4 S215A wurden mit demselben Verfahren auch eine Mutante generiert, welche an Position 213 anstelle eines Threonin ein Alanin besitzt (ATF4 T213A).

6.2.7 Bakterielle Expression und Reinigung der ATF4 Alanin-Mutanten

E. coli BL21 (DE3) wurde mit den Expressionskonstrukten der ATF4 Alanin-Mutanten transformiert und wie zuvor beschrieben kultiviert. Abbildung 23 zeigt am Beispiel der Alanin-Mutante ATF4 S215A eine elektrophoretische Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel. In der Spur N (nach der Induktion) ist eine deutliche Bande auf der Höhe des Molekulargewichtes von GST-ATF4 S215A zu erkennen. Die Spur V (vor der Induktion) zeigt keine Bande bei diesem Molekulargewicht.

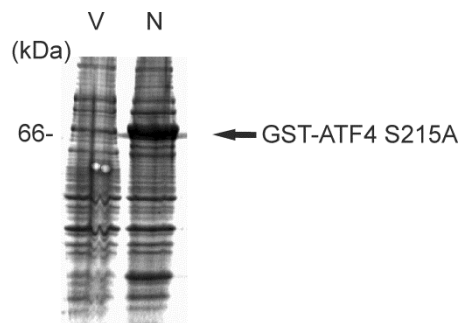


Abbildung 23: Expression von GST-ATF4 S215A. Mit pGEX-4T-1 ATF4 S215A transformierte *E. coli* BL21 (DE3) wurden mit 1 mM IPTG induziert und weitere 4 h kultiviert. Ein Aliquot vor und nach der Induktion wurden entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Visualisiert wurden die Proteinbanden mit Coomassie-Blau-Färbung. V: vor der Induktion; N: nach der Induktion.

Die Aufreinigung der ATF4 Alanin-Mutanten erfolgte analog zur Aufreinigung des ATF4 mittels Affinitätschromatographie. In Abbildung 24 ist das Ergebnis einer Aufreinigung am Beispiel der Alanin-Mutante ATF4 S215A dargestellt. In den Spuren 1-4 sind Aliquots der vier Elutionen von GST-ATF4 S215A aufgetragen. Lediglich in Spur 1 ist eine Bande auf Höhe des Molekulargewichtes von GST-ATF4 S215A zu erkennen. Die Spuren 2-4 zeigen keine Bande auf Höhe des rekombinanten Fusionsproteins.

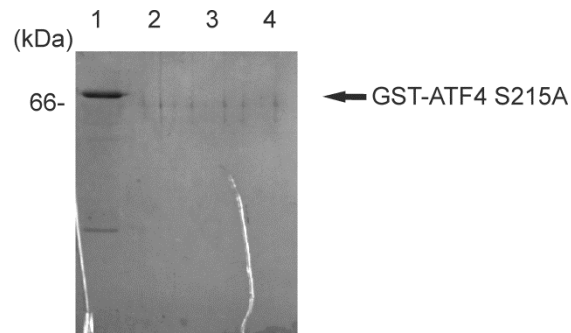


Abbildung 24: Nachweis der Aufreinigung von GST-ATF4 S215A. Ein Aliquot der jeweiligen Elutionen wurden in Spur 1-4 über einem 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt.

6.2.8 *In vitro* Phosphorylierungen der Alanin-Mutanten

Auf Grund der Phosphorylierung der ATF4-Fragmente konnten die putativen CK2-Phosphorylierungsstellen auf zwei mögliche Phosphorylierungsstellen begrenzt werden. Mit den Alanin-Mutanten ATF4 T213A und ATF4 S215A sollte nun die endgültige CK2-Phosphorylierungsstelle identifizieren werden. Der Nachweis erfolgte wie schon im Falle der ATF4-Fragmente mittels *in vitro* Phosphorylierung. Hierbei wurden die gereinigten, rekombinanten Fusionsproteine GST-ATF4, GST-ATF4 T213A und GST-ATF4 S215A mit gereinigtem, rekombinantem CK2-Holoenzym und [³²P]- γ -ATP inkubiert und anschließend die Reaktionsansätze über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert. Man erkennt in der Autoradiographie (Abbildung 25; oberer Teil) deutliche Banden bei einem Molekulargewicht von circa 66 kDa in den Spuren CK2+GST-ATF4 und CK2+GST-ATF4 T213A. In der Spur CK2+GST-ATF4 S215A ist lediglich eine schwache Bande in der Autoradiographie zu detektieren. Das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zeigt, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden (unterer Teil). Folglich ist Serin 215 in der Polypeptidkette von ATF4 die Hauptphosphorylierungsstelle für das CK2-Holoenzym.

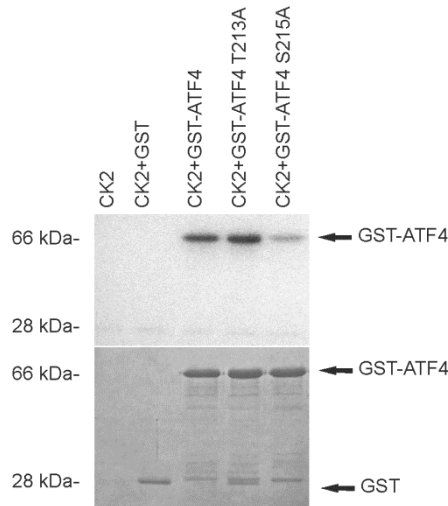


Abbildung 25: *In vitro* Phosphorylierung der Alanin-Mutanten. Die Reaktionsansätze der *in vitro* Phosphorylierung wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographie, der untere Teil zeigt die Coomassie-Blau-Färbung.

6.2.9 *In vitro* Phosphorylierung von ATF4 und ATF4 S215A durch die CK2 α -Untereinheit

Aus Abbildung 25 geht hervor, dass ATF4 von dem CK2-Holoenzym an Serin 215 *in vitro* phosphoryliert wird. Aber nicht nur das CK2-Holoenzym ist in der Lage, Proteine mit der für die CK2 spezifischen Konsensussequenz (S/T-X-X-D/E) zu phosphorylieren, sondern auch die freien katalytischen Untereinheiten CK2 α und CK2 α' können Proteine mit derselben Konsensussequenz phosphorylieren. Da die meisten Substrate des CK2-Holoenzym auch von den freien Untereinheiten phosphoryliert werden, soll nun in einem nächsten Experiment analysiert werden, ob ATF4 auch Substrat der CK2 α -Untereinheit und ob Serin 215 auch für die CK2 α -Untereinheit die Hauptphosphorylierungsstelle ist. Zudem soll durch Zugabe der regulatorischen CK2 β -Untereinheit eine mögliche Veränderung bezüglich der Phosphorylierung von ATF4 untersucht werden. Um diese drei Fragen zu beantworten wurde gereinigtes, rekombinantes GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A mit gereinigter, rekombinanter CK2 α -Untereinheit allein und nach Zugabe der CK2 β -Untereinheit einer *in vitro* Phosphorylierung unterzogen. Die Ansätze wurden mit [32 P]- γ -ATP inkubiert. Als Kontrollen wurden in diesem Experiment CK2 α + [32 P]- γ -ATP, sowie CK2 α + [32 P]- γ -ATP + GST-tag verwendet. Anschließend wurden die Reaktionsansätze über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nachfolgend mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert. Aus der Autoradiographie (Abbildung 26; oberer Teil) geht hervor, dass GST-ATF4 auch von der CK2 α -Untereinheit alleine phosphoryliert wird. Es ist eine eindeutige Bande in der Autoradiographie bei circa 66 kDa zu sehen. Die Alanin-Mutante (GST-ATF4 S215A) zeigt hingegen nur eine sehr schwache Bande. Des Weiteren ist zu erkennen, dass

die Zugabe der CK2 β -Untereinheit die Phosphorylierung von ATF4 deutlich erhöht. In den Kontrollspuren wurden keine Banden bei einem Molekulargewicht von circa 66 kDa detektiert. Der untere Teil von Abbildung 26 zeigt das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Hieraus geht hervor, dass gleiche Proteinmengen für die *in vitro* Phosphorylierung eingesetzt wurden. Somit wird Serin 215 auch von der CK2 α -Untereinheit *in vitro* phosphoryliert und die Zugabe der CK2 β -Untereinheit erhöht die Phosphorylierung des GST-ATF4 durch die CK2 α -Untereinheit.

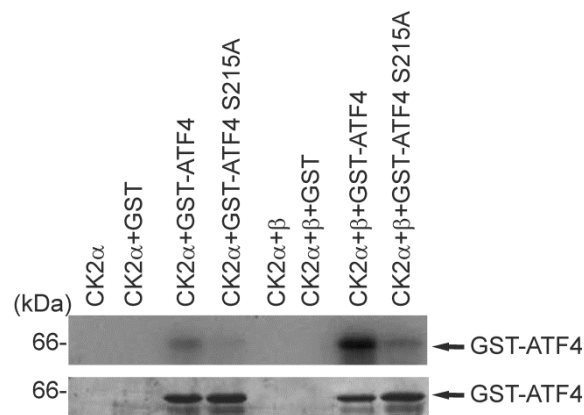


Abbildung 26: *In vitro* Phosphorylierung von ATF4 und ATF4 S215A durch die CK2 α -Untereinheit in Abhängigkeit von CK2 β . Die Reaktionsansätze der *in vitro* Phosphorylierung wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine wurden mit Coomassie-Blau visualisiert und das SDS-Polyacrylamidgel wurde getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographie, der untere Teil zeigt die Coomassie-Blau-Färbung.

6.2.10 *In vitro* Phosphorylierung von ATF4 und ATF4 S215A durch die CK2 α' -Untereinheit

Zuvor konnte gezeigt werden, dass ATF4 sowohl durch das CK2-Holoenzym als auch durch die CK2 α -Untereinheit phosphoryliert werden kann und zudem Serin 215 für beide die Hauptphosphorylierungsstelle darstellt. Im nächsten Experiment wurde überprüft, ob ATF4 auch von der CK2 α' -Untereinheit phosphoryliert werden kann und ob Serin 215 auch hier die Hauptphosphorylierungsstelle ist. Wie auch in den vorherigen Experimenten wurde dies mittels *in vitro* Phosphorylierung untersucht. Dazu wurde rekombinantes, gereinigtes GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A mit rekombinanter, gereinigter CK2 α' -Untereinheit, an welche ein Maltosebindeprotein fusioniert ist (MBP-tag), einer *in vitro* Phosphorylierung unterzogen. Als Kontrollen dienten MBP-CK2 α' + [32 P]- γ -ATP, sowie MBP-CK2 α' + [32 P]- γ -ATP + GST-tag. Die Reaktionsansätze wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert. Abbildung 27 zeigt das Ergebnis der *in vitro* Phosphorylierung. Wie schon im Fall der CK2 α -Untereinheit, so ist auch die CK2 α' -Untereinheit in der Lage, GST-ATF4 zu phosphorylieren. GST-ATF4 S215A zeigt nach der *in vitro* Phosphorylierung durch die CK2 α' -Untereinheit nur eine schwache Bande bei einem

Molekulargewicht von 66 kDa (Autoradiographie; oberer Teil). Die Kontrollen zeigen jeweils keine Banden auf Höhe der GST-Fusionsproteine.

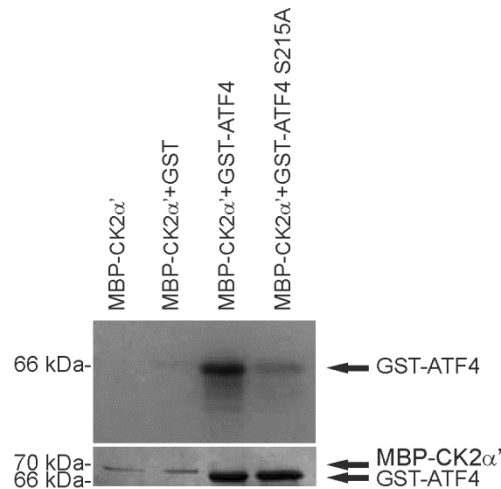


Abbildung 27: *In vitro* Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2 α' -Untereinheit. Die Reaktionsansätze der *in vitro* Phosphorylierung wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt und das SDS-Polyacrylamidgel wurde getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographie, der untere Teil zeigt die Coomassie-Blau-Färbung.

6.2.11 *In vitro* Phosphorylierung von ATF4 durch die CK α' -Untereinheit in Anwesenheit der CK2 β -Untereinheit

Auch im Falle der CK2 α' wurde der Frage nachgegangen, ob die Zugabe der CK2 β -Untereinheit die Phosphorylierungsintensität von ATF4 erhöht. Allerdings standen für dieses Experiment lediglich gereinigte, rekombinante CK2 α' -Fusionsproteine (MBP-CK2 α' oder GST-CK2 α') zur Verfügung. Um eine mögliche Beeinflussung der Phosphorylierung durch die „tags“ auszuschließen, wurde der Einfluss der ATF4-Phosphorylierung durch die CK2 α' -Untereinheit nach Zugabe der der CK2 β -Untereinheit an Hand beider CK2 α' -Fusionsproteine untersucht. Die rekombinanten, gereinigten CK2 α' -Fusionsproteine wurden mit rekombinantem, gereinigtem GST-ATF4 und gereinigter, rekombinanter CK2 β -Untereinheit *in vitro* phosphoryliert. Die Reaktionsansätze wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert. Das Experiment in Abbildung 28 zeigt, dass ATF4 nur sehr schwach durch die CK2 α' -Untereinheit alleine phosphoryliert wird. Die Zugabe der CK2 β -Untereinheit führt zu einer deutlich verbesserten Phosphorylierung von ATF4. Ein „tag“ (MBP oder GST) hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ATF4.

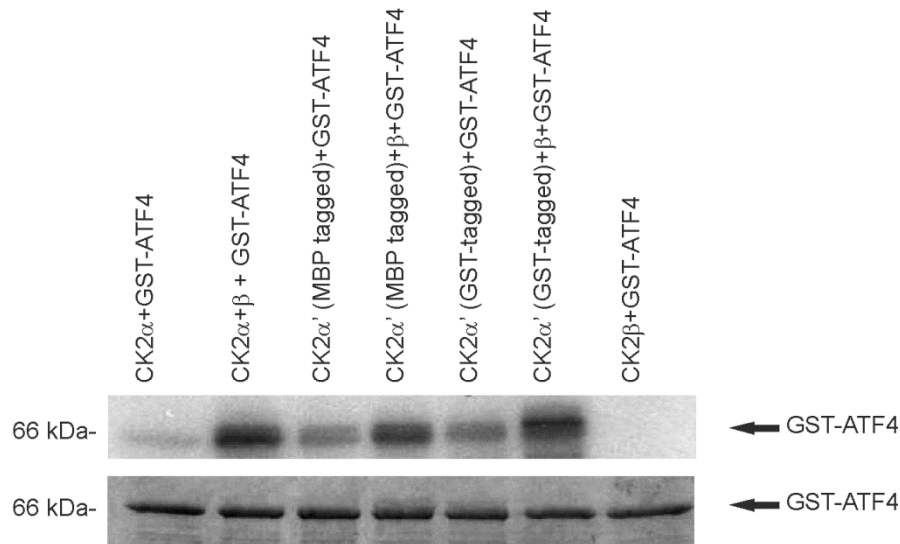


Abbildung 28: *In vitro* Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2 α' -Untereinheit in Abhängigkeit der CK2 β -Untereinheit. Die Reaktionsansätze der *in vitro* Phosphorylierung wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau visualisiert und das Gel wurde getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographie, der untere Teil zeigt die Coomassie-Blau-Färbung.

6.2.12 Einfluss der Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2 an Position S215 auf die Phosphorylierung von ATF4 durch CK1 ϵ an Position S219

Es wurden in den letzten Jahren viele Phosphorylierungsstellen in der Polypeptidkette von ATF4 identifiziert und ihre biologischen Funktionen untersucht. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in der humanen Polypeptidkette von ATF4, Serin 219 im phosphorylierten Zustand die Degradation begünstigt [49]. Li-Huei Tsai *et al.* konnten die CK1 ϵ als diejenige Kinase identifizieren, die Serin 219 phosphoryliert [48]. Daher sollte nun untersucht werden, ob die Phosphorylierung von Serin 215 durch die CK2 nachfolgend die Phosphorylierung von Serin 219 durch die CK1 ϵ beeinflusst. Dazu wurde das *in vitro* CK2-Phosphorylierungsassay mit dem GST-„pull-down-assay“ kombiniert. Rekombinantes, gereinigtes GST-ATF4 oder GST-ATF4 S215A wurden mit GSH-Sepharose inkubiert. Anschließend wurden die an der GSH-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteine mit rekombinatem, gereinigtem CK2-Holoenzym in Gegenwart von ATP inkubiert. Danach wurden ATP, sowie rekombinantes, gereinigtes CK2-Holoenzym durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Ansätze mit rekombinanter, gereinigter CK1 ϵ und [32 P]- γ -ATP inkubiert. Als Kontrolle dienten *in vitro* Phosphorylierungsansätze mit rekombinanter, gereinigter CK1 ϵ + GST-ATF4 bzw. GST-ATF4 S215A + [32 P]- γ -ATP, sowie mit rekombinatem, gereinigtem CK2-Holoenzym + GST-ATF4 bzw. GST-ATF4 S215A + [32 P]- γ -ATP. Die Ansätze wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert. Abbildung 29 zeigt, nach Vorphosphorylierung von GST-ATF4 und GST-

ATF4 S215A durch das CK2-Holoenzym und anschließender Phosphorylierung durch die CK1 ϵ , zwei gleichmäßig starke Banden in der Autoradiographie. Die Kontrollen, in der GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A allein durch die CK1 ϵ phosphoryliert wurden, zeigen autoradiographisch keinen Unterschied in der Bandenintensität. Nur die Kontrolle GST-ATF4 S215A zeigt nach Phosphorylierung durch das CK2-Holoenzym eine deutliche Reduktion der Bandenintensität im Vergleich zu GST-ATF4. Letztendlich konnte keine Beeinflussung der Phosphorylierung von GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A durch die CK1 ϵ nach Vorphosphorylierung durch das CK2-Holoenzym festgestellt werden. Jedoch konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, das Serin 215 nur von der CK2 und nicht von der CK1 ϵ als Phosphorylierungsstelle *in vitro* erkannt wird.

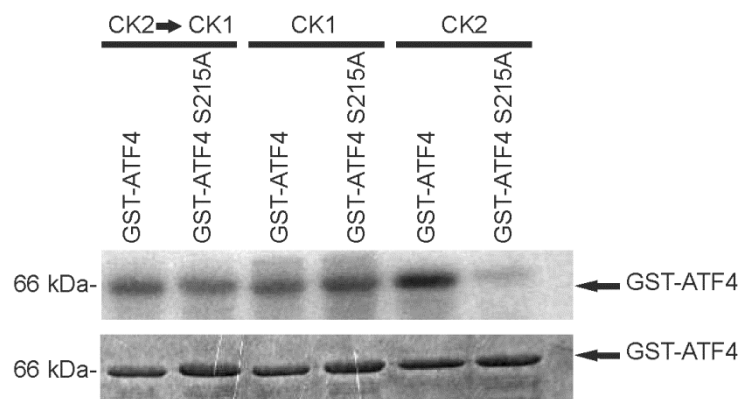


Abbildung 29: Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung der CK1- und der CK2-Phosphorylierung von ATF4. Die rekombinanten, gereinigten GST-Fusionsproteine wurden mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gebunden. Die Ansätze wurden mit CK2-Holoenzym vorphosphoryliert und anschließend mit CK1 ϵ und [32 P]- γ -ATP einer *in vitro* Phosphorylierung unterzogen. Die Reaktionsansätze der *in vitro* Phosphorylierung wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau gefärbt und das SDS-Polyacrylamidgel wurde getrocknet. Der obere Teil zeigt die Autoradiographie, der untere Teil zeigt die Coomassie-Blau-Färbung.

6.2.13 *In vitro* Bindungsstudien

6.2.13.1 *In vitro* Bindung des CK2-Holoenzym an ATF4

Mit den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass GST-ATF4 von der CK2 phosphoryliert wird. Es sollte nun analysiert werden, ob die Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2 auch mit einer Bindung von ATF4 an die CK2 einhergeht. Dies wurde mit der GST-„pull-down“-Methode analysiert. Zuerst wurde die Bindung zwischen GST-ATF4 und dem CK2-Holoenzym nachgewiesen. Dazu wurde gereinigtes, rekombinantes GST-ATF4 an GSH-Sepharose gebunden und mit gereinigtem, rekombinantes CK2-Holoenzym inkubiert. Des Weiteren wurden vier Kontrollen angesetzt. In einem Kontrollansatz wurde nur CK2-Holoenzym mit GSH-Sepharose inkubiert, in einem weiteren wurde CK2-Holoenzym mit GSH-Sepharose, an die ein GST-„tag“ gebunden war, inkubiert und als letzte

Kontrolle wurde GSH-Sepharose alleine verwendet. Um die gebundenen Proteine zuordnen zu können, bestand ein Ansatz aus dem CK2-Holoenzym allein. Nach Inkubation wurden die Ansätze mehrmals gewaschen und danach mit SDS-Probenpuffer von der GSH-Sepharose eluiert. Die Proben wurden mit Hilfe der Westernblot-Methode analysiert. Hierfür wurden die Ansätze elektrophoretisch über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde zur Identifizierung der gebundenen Proteine mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Für die Detektion des Holoenzym wurden die Seren #212 (CK2 α) und #269 (CK2 β) und zur Detektion von GST-ATF4 wurde der polyklonale ATF4 Antikörper sc-200 benutzt. Aus Abbildung 30 geht hervor, dass das CK2-Holoenzym nur in dem Ansatz gebunden hat, in dem GST-ATF4 an die GSH-Sepharose gebunden ist. In den Kontrollspuren ist keine Bindung des CK2-Holoenzym zu erkennen. Die Spur, in der sich nur CK2-Holoenzym befindet, diente zur eindeutigen Identifizierung des gebundenen CK2-Holoenzym.

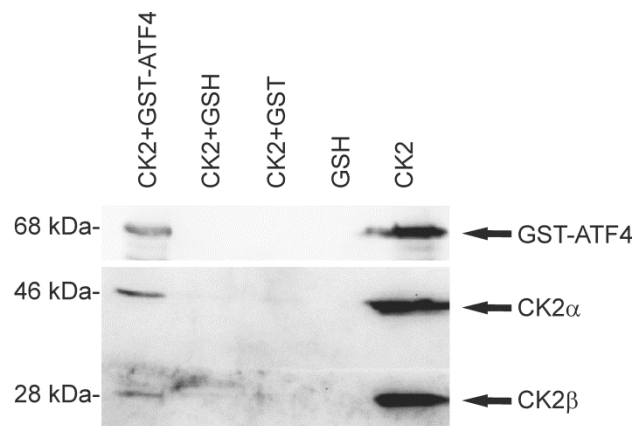


Abbildung 30: GST-„pull-down-assay“ zum Nachweis einer Bindung des CK2-Holoenzym an GST-ATF4 *in vitro*. Gereinigtes, rekombinantes GST-ATF4 wurde an GSH-Sepharose gebunden und mit gereinigtem, rekombinantem CK2-Holoenzym inkubiert. Die Kontrollen wurden analog behandelt. Die Ansätze wurden gewaschen, mittels SDS-Probenpuffer eluiert und anschließend über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Komplexe mittels Westernblot analysiert. Als Kontrolle zur Identifizierung des gebundenen CK2-Holoenzym diente gereinigtes, rekombinantes CK2-Holoenzym. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion des gereinigten, rekombinanten CK2-Holoenzym wurde Serum #212 gegen die CK2 α -Untereinheit und Serum #269 gegen CK2 β -Untereinheit eingesetzt. Rekombinantes GST-ATF4 wurde mit dem polyklonalen Antikörper sc-200 detektiert.

6.2.13.2 *In vitro* Bindung des CK2-Holoenzym an ATF4 S215A

Die Bindung des CK2-Holoenzym an ATF4 wurde im vorherigen Abschnitt gezeigt. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob die fehlende CK2-Phosphorylierung des ATF4 eine Beeinträchtigung der Komplexbildung mit dem CK2-Holoenzym mit sich bringt. Hierzu wurde ein GST-„pull-down-assay“ nach dem gleichen Schema wie im vorherigen Experiment durchgeführt. Anstelle

von gereinigtem, rekombinantem GST-ATF4 wurde gereinigtes, rekombinantes GST-ATF4 S215A mit CK2-Holoenzym inkubiert. Aus Abbildung 31 erkennt man, dass auch das CK2-Holoenzym an ATF4 S215A bindet. Die Kontrollen zeigen jeweils keine Bindung des CK2-Holoenzym. Somit scheint die Bindung unabhängig von der Phosphorylierung zu sein.

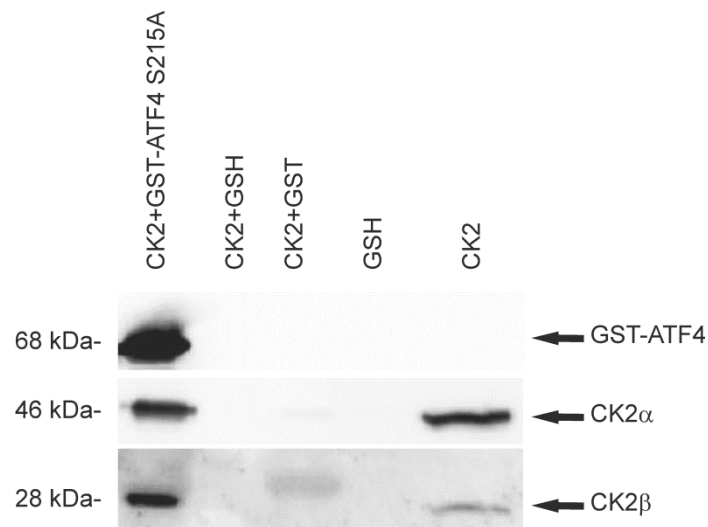


Abbildung 31: GST-„pull-down-assay“ zum Nachweis einer Bindung des CK2-Holoenzym an GST-ATF4 S215A *in vitro*. Gereinigtes, rekombinantes GST-ATF4 S215A wurde an GSH-Sepharose gebunden und mit gereinigtem, rekombinantem CK2-Holoenzym inkubiert. Die Kontrollen wurden analog behandelt. Die Ansätze wurden gewaschen, mittels SDS-Probenpuffer eluiert und anschließend über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Komplexe mittels Westernblot analysiert. Zur Identifizierung des gebundenen CK2-Holoenzym diente gereinigtes, rekombinantes CK2-Holoenzym. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion des gereinigten, rekombinanten CK2-Holoenzym wurde Serum #212 gegen die CK2 α -Untereinheit und Serum #269 gegen die CK2 β -Untereinheit eingesetzt. Gereinigtes, rekombinantes GST-ATF4 S215A wurde mit dem polyklonalen Antikörper sc-200 detektiert.

6.2.13.3 *In vitro* Bindung von ATF4 und ATF4 S215A an die katalytischen CK2-

Untereinheiten CK2 α , CK2 α' und an das CK2-Holoenzym

Mit der GST-„pull-down“-Analyse konnte eine Bindung von ATF4 beziehungsweise der Phosphorylierungsmutante ATF4 S215A an das CK2-Holoenzym *in vitro* nachgewiesen werden. Aufgrund der Bindung der CK2-Untereinheiten CK2 α und CK2 α' an die GSH-Sepharose konnte eine Bindung zwischen den regulatorischen Untereinheiten und ATF4 bzw. ATF S215A mit dieser Methode nicht analysiert werden. Eine weitere, etablierte Methode um Protein-Protein-Bindungen *in vitro* zu untersuchen ist der ELISA-basierte-Bindungs-assay [122]. Dabei lässt sich neben einer Komplexbildung zweier oder mehrerer Proteine eine Aussage über die Menge der vorliegenden Komplexe treffen. Die Basis dieser Methode ist die Bindung eines Proteins an eine speziell beschichtete Oberfläche mit hoher Affinität für hydrophile und hydrophobe Moleküle. Durch Zugabe

eines weiteren Proteins können Komplexe entstehen, die man unter Zuhilfenahme eines Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers und anschließender Zugabe von TMB detektieren kann. Die Bindung von gereinigtem, rekombinantem GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A an gereinigte, rekombinante CK2 α -Untereinheit, CK2 α' -Untereinheit und an gereinigtes, rekombinantes CK2-Holoenzym wurde mit dem ELISA-basierten Bindungsassay analysiert. Abbildung 32 zeigt die prozentualen Bindungsintensitäten von GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A an die Untereinheiten CK2 α , CK2 α' und das CK2-Holoenzym. Im Vergleich zur Kontrolle sieht man nur eine schwache Bindung von GST-ATF4 und GST-ATF S215A an die CK2-Untereinheiten CK2 α und CK2 α' , jedoch binden beide gleichermaßen stark. Eine deutlich stärkere Bindung zeigen die GST-Fusionsproteine an das CK2-Holoenzym. Hier liegt die Bindungsintensität bei circa 350% im Vergleich zur Kontrolle, allerdings binden auch hier beide Proteine (GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A) vergleichbar stark an das CK2-Holoenzym.

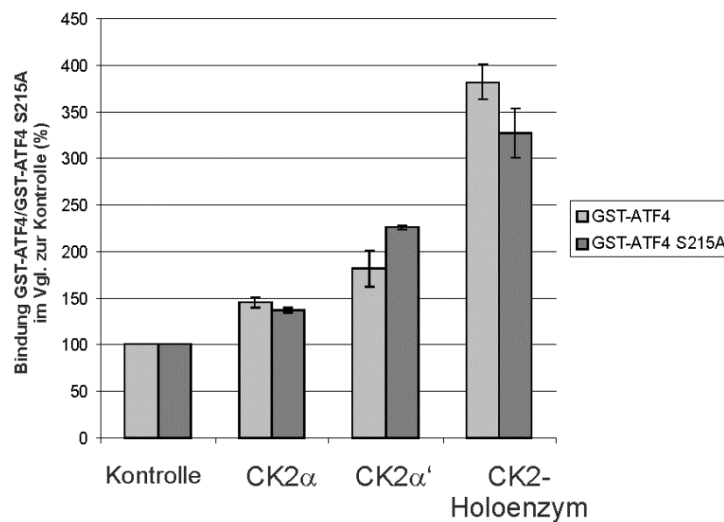


Abbildung 32: ELISA-basierter Bindungsassay zum Nachweis der Bindung von GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A an CK2 α , CK2 α' und CK2-Holoenzym *in vitro*. Die rekombinanten, gereinigten Proteine CK2 α , GST-CK2 α' und CK2-Holoenzym wurden in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte gebunden. Zur Kontrolle dienten Vertiefungen ohne gebundenes Protein oder mit GST-tag gebundene Vertiefungen. Anschließend wurden die Vertiefungen mit gereinigtem, rekombinantem GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A inkubiert. Es folgten mehrere Waschschriffe und die Bindung wurde mittels eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers und anschließender TMB-Behandlung visualisiert. Zur Detektion des gebundenen, gereinigten, rekombinanten GST-ATF4 und GST-ATF4 S215A wurde der polyklonale Antikörper sc-200 verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

6.2.14 *In vivo* Bindung von ATF4 an die Proteinkinase CK2

In vitro Bindungsstudien geben einen ersten Hinweis darauf, ob zwei Proteine auch in der eukaryotischen Zelle *in vivo* binden. Zelluläre Barrieren wie zum Beispiel der Nukleus, das

endoplasmatische Retikulum oder die Mitochondrien können jedoch eine tatsächliche Bindung innerhalb der Zelle verhindern. Die Proteinkinase CK2 kommt sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus vor [127]. ATF4 ist hauptsächlich in Nukleus lokalisiert [49]. Folglich wäre eine Bindung beider Proteine im Nukleus denkbar. Am Zellsystem der epithealen Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa soll eine Bindung *in vivo* zwischen ATF4 und der CK2 nachgewiesen werden.

6.2.14.1 Kolokalisation von endogenem ATF4 mit der endogener CK2 α -Untereinheit

Einen ersten Hinweis einer Interaktion zweier Proteine *in vivo* erhält man über Kolokalisations-Studien. Der Nachweis von ATF4 und der CK2 α -Untereinheit wurde in HeLa-Zellen in einer Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Der Gehalt von ATF4 in der Zelle ist ohne Stressestimulation sehr gering. Durch Behandlung der Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit MG132 [128], einem Proteasominhibitor, kann der endogene Proteingehalt an ATF4 hochreguliert werden [48]. Für die Kolokalisation der CK2 α -Untereinheit mit ATF4 wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem Kaninchenantikörper sc-200 gegen ATF4 und dem Mausantikörper 1A5 gegen die CK2 α -Untereinheit inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden zum einen ein anti-Kaninchen AlexaFluor488- und zum andern ein anti-Maus AlexaFluor594-Antikörper benutzt. In den Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 33 sieht man, dass nach MG132-Behandlung der ATF4-Gehalt deutlich ansteigt, wobei das meiste ATF4 im Nukleus lokalisiert werden kann. Auch ist nach 24-stündiger MG132-Behandlung ein erhöhter Gehalt an CK2 α -Untereinheit zu detektieren. Nach Überlagerung des grünen und roten Fluoreszenzkanals ist eine deutliche Gelbfärbung und damit Kolokalisation der beiden Proteine im Kern zu beobachten. In den Zellen, welche zur Kontrolle mit äquimolarer Menge an DMSO behandelt wurden, kann keine Kolokalisation des endogenen ATF4 mit endogener CK2 α -Untereinheit detektiert werden.

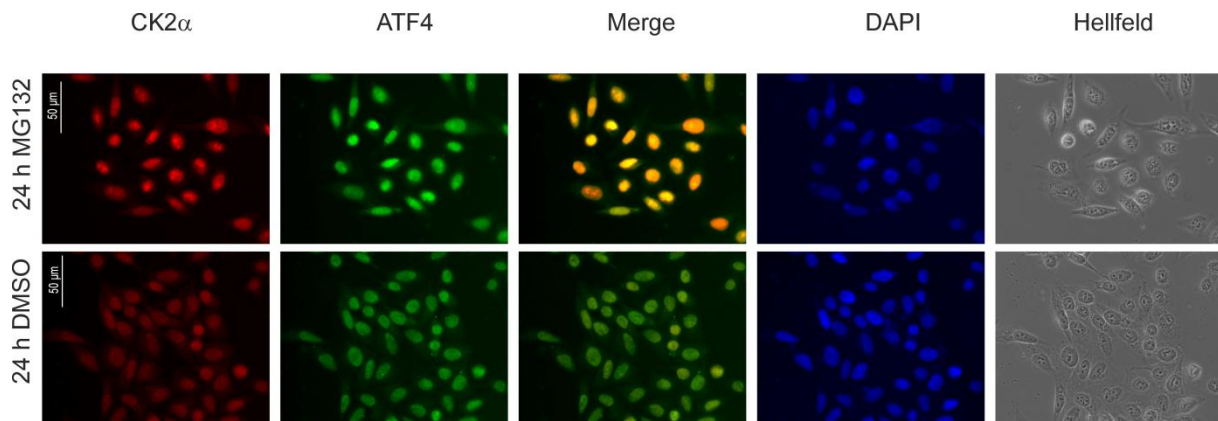


Abbildung 33: Kolokalisation von endogenem ATF4 und endogener CK2 α -Untereinheit in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und am nächsten Tag mit MG132 für 24 h behandelt. Zur Analyse wurden die Zellen mit 3.7% Paraformaldehyd fixiert, mit 0.5% Triton X-100 permeabilisiert und mit den Antikörpern sc-200 gegen ATF4 und 1A5 gegen CK2 α für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde zum einen ein anti-Kaninchen AlexaFluor488- und zum andern ein anti-Maus AlexaFluor594-Antikörper verwendet. Maßstab: 50 μ m

6.2.14.2 Koimmunpräzipitation von ATF4 und endogener CK2

Die Kolokalisations-Experimente lassen die Vermutung zu, dass eine *in vivo* Interaktion zwischen ATF4 und der CK2 existiert. Der Nachweis einer Bindung von ATF4 an die CK2 *in vivo* sollte mit einer Koimmunpräzipitations-Analyse erbracht werden. Hierzu sollte ATF4 präzipitiert und die CK2 kopräzipitiert werden. Damit ausreichend große Mengen an ATF4 für die Präzipitation vorhanden sind, sollte es überexprimiert werden. Dafür wurde ATF4 in das eukaryotische Expressionsplasmid p3xFLAG-CMV-7.1 kloniert und für die Koimmunpräzipitations-Experimente HeLa-Zellen mit dem Expressionsplasmid p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 für 24 h transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Koimmunpräzipitation erfolgte nach demselben Protokoll wie schon zuvor beschrieben. Präzipitiert wurde mit dem Antikörper sc-200 gegen ATF4, wobei der Nachweis mit dem anti-FLAG Antikörper erfolgte. Kopräzipitierte CK2 α -Untereinheit wurde mit dem Antikörper 1A5 und die CK2 β -Untereinheit mit den Antikörpern 6D5 nachgewiesen (Abbildung 34). In der Spur des Vorpräzipitates (VP) sind keine Banden zu erkennen, FLAG-ATF4 und die CK2 zeigen folglich keine unspezifische Bindung an die CL-4B/Protein-A-Sepharose. In der Spur des Immunpräzipitates (IP) sind zwei deutliche Banden zu sehen, eine bei einem Molekulargewicht von circa 53 kDa, wobei es sich um präzipitiertes FLAG-ATF4 handelt und eine zweite bei einem Molekulargewicht von circa 46 kDa. Hierbei handelt es sich um die kopräzipitierte CK2 α -Untereinheit. In der Spur des Überstandes (ÜS) konnte keine Bande für FLAG-ATF4 detektiert werden. Es wurde vollständig präzipitiert, jedoch konnten beide CK2-Untereinheiten, CK2 α und CK2 β , detektiert werden. Dies spricht dafür, dass nur ein geringer Teil der in der Zelle vorliegenden CK2 mit FLAG-ATF4 komplexiert ist. Die beiden Kontrollen, Sepharose und Antikörper, zeigen jeweils keine unspezifischen Signale. Mit dem

Koimmunpräzitations-Experiment konnten die *in vitro* GST-„pull-down“-Ergebnisse bestätigt werden. Es konnte eine Bindung an die CK2 α -Untereinheit nachgewiesen werden. Demnach existiert auch *in vivo* eine Bindung von ATF4 an die CK2.

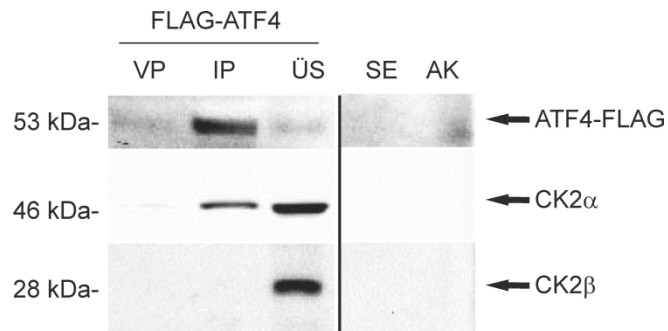


Abbildung 34: Koimmunpräzitations-Analyse zum Nachweis einer Bindung der CK2 an FLAG-ATF4 *in vivo*. HeLa-Zellen wurden dem Expressionsplasmid p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden mit einem Gemisch aus CL-4B/Protein-A-Sepharose vorinkubiert (VP) und danach auf, mit spezifischen Antikörpern (sc-200) gebundene, CL-4B/Protein-A-Sepharose überführt und inkubiert (IP). Nach der Immunpräzitation wurde ein Aliquot des Überstandes (ÜS) zur Kontrolle der Präzitation entnommen. Ebenso dienten ein Aliquot der CL-4B/Protein-A-Sepharose (SE) und ein Aliquot der Antikörper (AK) als Kontrollen. Die Präzitate wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und mit den Kontrollen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend der Westernblot-Analyse unterzogen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion der CK2 wurden die Antikörper 1A5 gegen CK2 α -Untereinheit und 6D5 gegen CK2 β -Untereinheit eingesetzt. FLAG-ATF4 wurde mit dem anti-FLAG Antikörper detektiert. VP: Vorpräzitat, IP: Immunpräzitat, ÜS: Überstand, SE: Sepharose, AK: Antikörper.

6.2.14.3 Koimmunpräzitation von ATF4 S215A und endogener CK2

Die *in vitro* GST-„pull-down“-Bindungsexperimente zeigten, dass sowohl ATF4 als auch ATF4 S215A an die CK2 bindet. Somit sind Phosphorylierung und Bindung von ATF4 durch die CK2 zwei voneinander unabhängige Ereignisse. Daher sollte analysiert werden, ob die CK2 auch die Alanin-Mutante ATF4 S215A binden kann. Dazu wurde auch schon wie im vorangegangenen Experiment ATF4 S215A in den eukaryotischen Expressionsvektor p3xFLAG-CMV-7.1 kloniert. Parallel zu dem Koimmunpräzitations-Experiment mit FLAG-ATF4, wurde eine Koimmunpräzitation mit FLAG-ATF4 S215A durchgeführt (Abbildung 35). Die daraus gewonnenen Ergebnisse ähneln der Koimmunpräzitation von FLAG-ATF4 mit endogener CK2. Die Kontrollen VP, SE und AK zeigen jeweils keine unspezifischen Signale. Die Spur des Immunpräzitates zeigt eine starke Bande für ATF4-FLAG S215A und eine etwas schwächere für die CK2 α -Untereinheit. Die CK2 β -Untereinheit konnte am Immunpräzitat nicht nachgewiesen werden. Die Analyse des Überstandes (ÜS) zeigt, dass FLAG-ATF4 S215A vollständig präzitiert wurde, hingegen nur ein geringer Teil der CK2 α -

Untereinheit mit ATF4 komplexiert ist. Auch die *in vivo* Bindungsexperimente zeigen, dass die Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2 unabhängig von der Bindung an die CK2 ist.

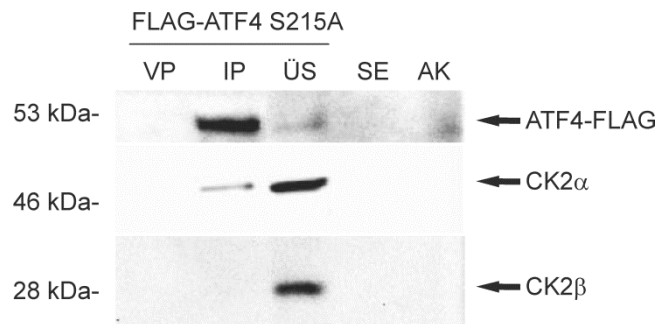


Abbildung 35: Koimmunpräzitations-Analyse zum Nachweis einer Bindung der CK2 an FLAG-ATF4 S215A *in vivo*. HeLa-Zellen wurden dem Expressionsplasmid p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden mit einem Gemisch aus CL-4B/Protein-A-Sepharose vorinkubiert (VP) und danach auf, mit spezifischen Antikörpern (sc-200) gebundene, CL-4B/Protein-A-Sepharose übertragen (IP). Nach der Immunpräzitation wurde ein Aliquot des Überstandes (ÜS) zur Kontrolle der Präzitation entnommen. Ebenso diente ein Aliquot der CL-4B/Protein-A-Sepharose (SE) und ein Aliquot der Antikörper (AK) als Kontrolle. Die Präzitate wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und mit den Kontrollen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend der Westernblot-Analyse unterzogen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion der CK2 wurden die Antikörper 1A5 gegen die CK2 α -Untereinheit und 6D5 gegen die CK2 β -Untereinheit eingesetzt. FLAG-ATF4 S214A wurde mit dem anti-FLAG Antikörper detektiert. VP: Vorpräzipitat, IP: Immunpräzipitat, ÜS: Überstand, SE: Sepharose, AK: Antikörper.

6.2.14.4 Koimmunpräzitation von endogenem ATF4 und endogener CK2

Die zellulären Bedingungen heraus zu finden, unter denen zwei endogene Proteine interagieren, stellt sich oft als schwieriges Unterfangen dar. So zum Beispiel bindet die CK2 an den Zinkkanal (ZIP7) nur in einem Zeitraum weniger Minuten nach Stimulation [91]. Welches Ereignis zur Bindung zwischen endogenem ATF4 und endogener CK2 führt ist jedoch noch völlig unklar, da ATF4 unter nicht-gestressten Bedingungen in sehr geringer Konzentration vorliegt. Um dennoch ausreichende Mengen an ATF4 zu bekommen, welche für eine Bindung von endogenem ATF4 an endogene CK2 unabdingbar sind, musste die ATF4-Expression induziert werden. Dafür wurden HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit Thapsigargin behandelt. Thapsigargin ist ein Sesquiterpen-Lakton aus der Pflanze *Thapsia garganica* und hemmt spezifisch die Ca²⁺ATPasen des Sarcoplasmatischen/Endoplasmatischen Retikulums (SERCA). Dadurch kommt es zu einer erhöhten zyttoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration, welche ER-Stress auslöst und die Genexpression von ATF4 begünstigt [129]. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und Extrakte generiert, die dann zur Koimmunpräzitation eingesetzt wurden. Es wurde nach demselben Protokoll wie im vorherigen Experiment vorgegangen, allerdings mit dem Unterschied, dass die CK2 α -Untereinheit präzipitiert und ATF4 kopräzipitiert wurde. Die präzipitierte CK2 α -Untereinheit wurde mit dem Serum #212 nachgewiesen, kopräzipitierte CK2 β -Untereinheit mit

dem Serum #269 und kopräzipitiertes ATF4 mit dem Antikörper sc-200. Wie aus Abbildung 36 hervorgeht, konnte die CK2 α -Untereinheit präzipitiert werden. Zudem ist auch eine schwache Bande für die kopräzipitierte CK2 β -Untereinheit und das kopräzipitierte ATF4 zu erkennen (IP). Die Antikörper- und Sepharose-Kontrollen (SE, AK) zeigen keine Banden bei dem Molekulargewicht der präzipitierten Proteine. Hingegen ist in der Spur der Vorpräzipitation (VP) eine schwache Bande für die CK2 α -Untereinheit und ATF4 zu sehen. Die Spur des Überstandes (ÜS) zeigt, dass auch nach der Immunpräzipitation alle Proteine in ausreichender Menge vorliegen. Das Koimmunpräzipitations-Experiment bestätigt eine Bindung der endogenen CK2 α -Untereinheit an endogenes ATF4 *in vivo*.

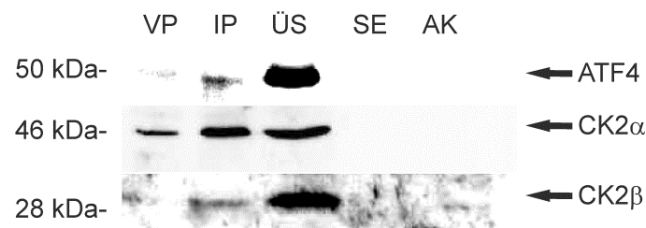


Abbildung 36: Koimmunpräzipitations-Analyse zum Nachweis der Bindung von ATF4 an die CK2 *in vivo*. HeLa-Zellen wurden für 24 h mit Thapsigargin behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden mit einem Gemisch aus CL-4B/Protein-A-Sepharose vorinkubiert (VP) und danach auf, mit spezifischen Antikörpern (1A5) gebundene, CL-4B/Protein-A-Sepharose übertragen (IP). Nach der Immunpräzipitation wurde ein Aliquot des Überstandes (ÜS) zur Kontrolle der Präzipitation entnommen. Ebenso diente ein Aliquot der CL-4B/Protein-A-Sepharose (SE) und ein Aliquot der Antikörper (AK) als Kontrolle. Die Präzipitate wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und mit den restlichen Ansätzen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion der CK2 α -Untereinheit und der CK2 β -Untereinheit dienten die Seren #212 und #269. ATF4 wurde mit dem Antikörper sc-200 detektiert. VP: Vorpräzipitat, IP: Immunpräzipitat, ÜS: Überstand, SE: Sepharose, AK: Antikörper.

6.2.14.5 BiFC-Analyse zur Lokalisierung der Bindung

Eine Bindung von ATF4 an die freie CK2 α -Untereinheit oder an das CK2-Holoenzym via CK2 α -Untereinheit konnte mit Hilfe der Koimmunpräzipitations-Experimente bestätigt werden. Die Methode gibt allerdings keinen Hinweis darauf, in welchem Kompartiment die Bindung stattfindet. Auf Grund der Kolokalisations-Experimente kann vermutet werden, dass ATF4 und die CK2 im Nukleus interagieren. Mit Hilfe des BiFC-Systems sollte das genaue Kompartiment der Bindung lokalisiert werden. Das BiFC-System basiert auf einer Immunfluoreszenz-Analyse. Zu Beginn werden von beiden potentiellen Interaktionspartnern Fusionsproteine generiert, welche am N- oder am C-Terminus ein YFP-Fragment haben (YN, YC). Laudet *et al.* nutzten das System erfolgreich um die Interaktion zwischen der CK2 α -Untereinheit und der CK2 β -Untereinheit nachzuweisen [130]. Im vorliegenden Experiment wurde ATF4 in die Vektoren pEYFPc1 kloniert, so dass es an ein N- oder C-

terminales Fragment des YFP fusioniert war. Die Expression der YN-ATF4 und YC-ATF4 Konstrukte wurde vorab mittels Westernblot-Analyse überprüft. Parallel dazu wurde auch die Expression der YN-CK2 α und YC-CK2 α sowie YN-CK2 β und YC-CK2 β Konstrukte überprüft. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert, nach 24 h lysiert, über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die ATF4-Fusionsproteine wurden mit dem ATF4 Antikörper sc-200 nachgewiesen, die Fusionsproteine der CK2 α -Untereinheit mit dem Antikörper 1A5 und die der CK2 β -Untereinheit mit dem Antikörper 6D5 (Abbildung 37). Das YN-ATF4 und das YC-ATF4 Fusionsprotein konnte erfolgreich exprimiert werden, was aus Spur 1 und Spur 2 hervorgeht. Auch die beiden CK2 α -Konstrukte konnten exprimiert werden (Spuren 3 und 5). Im Falle der CK2 β -Konstrukte zeigte nur das Konstrukt YN-CK2 β in Spur 4, nicht aber das Konstrukt YC-CK2 β in Spur 6, eine starke Expression im Westernblot.

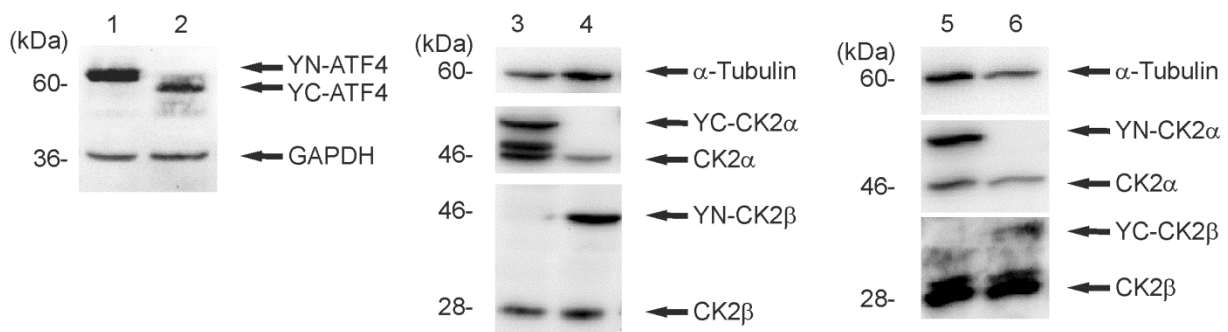


Abbildung 37: Nachweis der Expression der YN- und YC-Fusionsproteine. HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmiden YN-ATF4, YC-ATF4, YN-CK2 α , YC-CK2 α , sowie YN-CK2 β und YC-CK2 β für 24 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend der Westernblot-Analyse unterzogen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit Hilfe von Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL- Behandlung. Zur Detektion der ATF4-Fusionsproteine YN-ATF4 und YC-ATF4 wurde der ATF4 Antikörper sc-200, zur Detektion der YN-CK2 α und YC-CK2 α der Antikörper 1A5 und zur Detektion der YN-CK2 β und YC-CK2 β der Antikörper 6D5. Die Ladekontrolle GAPDH wurde mit dem Antikörper sc-25778 und α -Tubulin mit dem anti- α -Tubulin Antikörper detektiert. Spur 1: Überexpression von YN-ATF4; Spur 2: Überexpression von YC-ATF4; Spur 3: Überexpression von YC-CK2 α ; Spur 4: Überexpression von YN-CK2 β ; Spur 5: Überexpression von YN-CK2 α ; Spur 6: Überexpression von YC-CK2 β .

Um eine mögliche Interaktion nachweisen zu können, mussten verschiedene Kombinationen der YN- und YC-Fusionsproteine ausgetestet werden. Tabelle 13 zeigt die Transfektionsansätze und zugleich die Kombinationen, welche positive Signale in den Immunfluoreszenz-Analysen lieferten.

Tabelle 13: Transfektionsansätze für die BiFC-Analyse mit den dazugehörigen Fluoreszenzsignalen.

N-terminal mit YFP-Fragment fusioniert (YN)	C-terminal mit YFP-Fragment fusioniert (YC)	Fluoreszenzsignal
YN-CK2 α	YC-CK2 β	+
YN-CK2 β	YC-CK2 α	+
YN-ATF4	YC-CK2 α	+
YN-ATF4	YC-CK2 β	-
YN-CK2 α	YC-ATF4	-
YN-CK2 β	YC-ATF4	-
YN-ATF4	YC-Leervektor	-
YN-Leervektor	YC-ATF4	-
YN-CK2 α	YC-Leervektor	-
YN-CK2 β	YC-Leervektor	-
YN-Leervektor	YC-CK2 α	-
YN-Leervektor	YC-CK2 β	-

+ : Fluoreszenzsignal, - : kein Fluoreszenzsignal

Für die BiFC-Analyse wurden HeLa-Zellen gemäß den Ansätzen aus Tabelle 13 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 24 h bei 28°C inkubiert um die richtige Konformation des YFP zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem anti-GFP Antikörper inkubiert, der als Epitop die Bruchstelle der beiden YFP-Fragmente erkennt. Als Sekundärantikörper wurde der anti-Maus-AlexaFluor594 Antikörper benutzt. Allerdings konnte nur in bestimmten Transfektionsansätzen ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Abbildung 38 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen mit positiven Signalen. Die Fluoreszenzaufnahme YN-ATF4 mit YC-CK2 α zeigten einige positive Fluoreszenzsignale. In der Vergrößerung (weiß umrahmter Bereich) wird deutlich, dass sich das Signal auf den Nukleus beschränkt. Als Positivkontrolle diente die Detektion der Interaktion zwischen YN-CK2 α und YC-CK2 β . Hier sind deutliche Fluoreszenzsignale, sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus zu erkennen. In den Negativkontrollen YN-ATF4 und YC-Leervektor, sowie YC-ATF4 und YN-Leervektor wurden keine Fluoreszenzsignale detektiert. Die Fluoreszenzaufnahmen der DAPI-Färbung erleichtern die nukleäre Zuordnung der Signale. Aus der BiFC-Analyse geht hervor, dass Bindung zwischen ATF4 und der CK2 α -Untereinheit im Nukleus stattfindet.

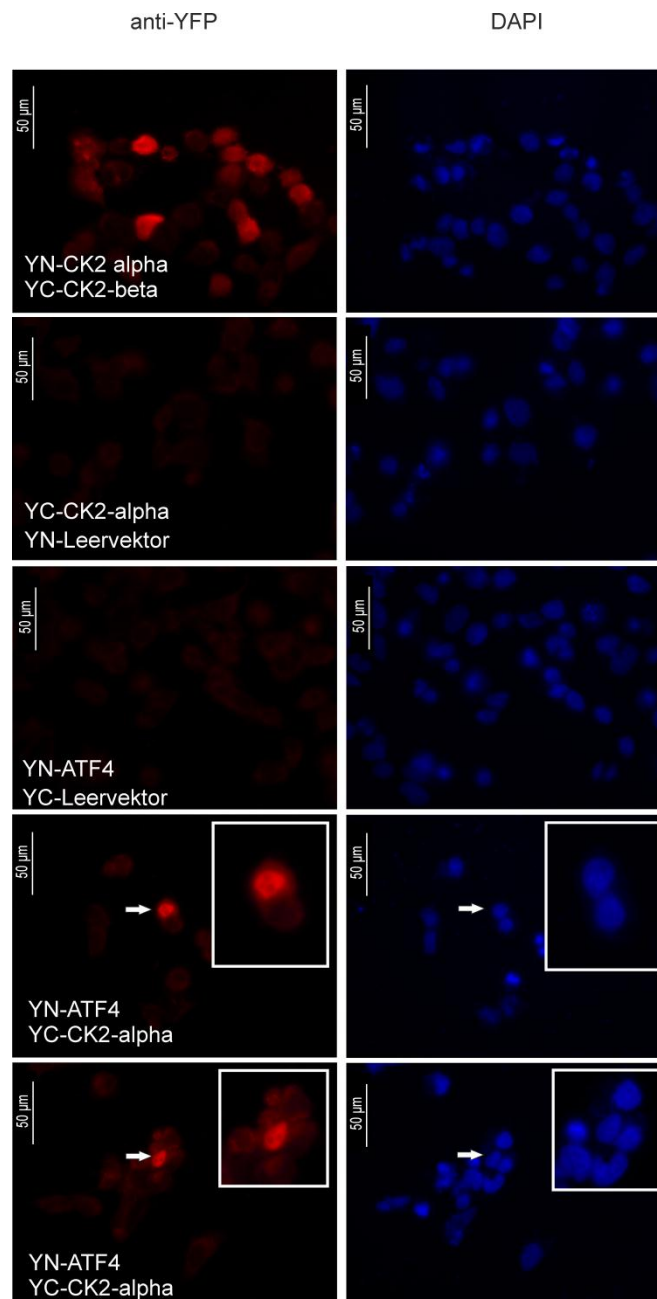


Abbildung 38: BiFC-Analysen in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät, und 24 h später mit den Expressionsplasmiden YN-CK2 α und YC-CK2 β , YN-CK2 α und YC-Leervektor, YN-ATF4 und YC-Leervektor, sowie YN-ATF4 und YC-CK2 α transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 24 h bei 28°C inkubiert. Danach wurden sie mit 3.7% Formaldehyd fixiert, mit 0.5% Triton X-100 permeabilisiert und mit den Antikörpern Maus-anti-GFP gegen YFP für 30 min bei 37°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde der anti-Maus AlexaFluor594 Antikörper verwendet. Die weiß umrahmten Bildausschnitte stellen Vergrößerungen der mit Pfeilen markierten Bereiche dar. Maßstab: 50 μ m

6.2.15. Biologische Auswirkung der Phosphorylierung von ATF4

6.2.15.1 Auswirkungen der CK2-Phosphorylierung auf die subzelluläre Lokalisation des

ATF4

Posttranslationale Modifikationen eines Proteins, wie zum Beispiel Phosphorylierungen durch die Proteinkinase CK2, können unterschiedliche Funktionen haben. Sie können die subzelluläre Lokalisation von Proteinen beeinflussen [131, 132], können Proteine stabilisieren [44, 46, 133] und können Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität nehmen [97]. Eine veränderte subzelluläre Lokalisation nach Phosphorylierung durch die CK2 konnte bereits von unserer Arbeitsgruppe für die Proteinphosphatase cdc25C gezeigt werden, wobei der Verlust der CK2-Phosphorylierung zu einer erhöhten nukleären Lokalisation führt [134]. Daher wurde untersucht werden, ob der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 auch Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von ATF4 nimmt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem Mausantikörper anti-FLAG inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Maus Alexafluor594-Antikörper benutzt. Aus Abbildung 39 geht hervor, dass sowohl die Überexpression von ATF4, als auch die der Alanin-Mutante, ausschließlich Fluoreszenzsignale im Nukleus liefert. Die Phosphorylierung führt dementsprechend zu keiner Änderung der subzellulären Lokalisation. Allerdings zeigen die Fluoreszenzanalysen deutlich mehr ATF4-FLAG S215A positive Zellen im Vergleich zu ATF4.

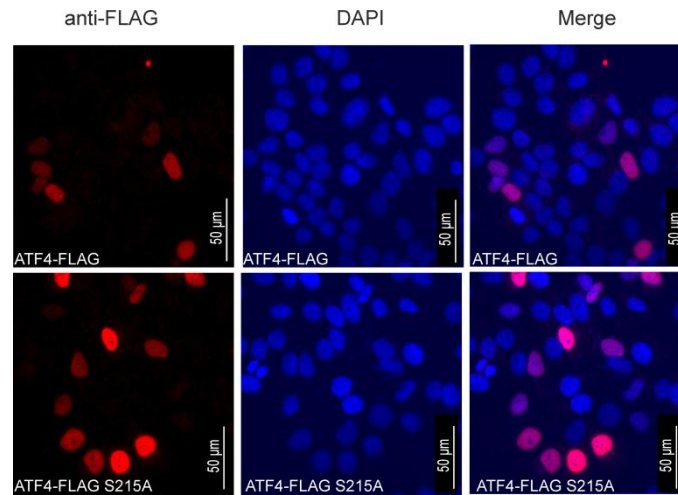


Abbildung 39: Nachweis der subzellulären Lokalisation von ATF4 und der Alanin-Mutante ATF4 S215A. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 3.7% Formaldehyd fixiert, mit 0.5% Triton X-100 permeabilisiert und mit den Antikörpern sc-200 gegen ATF4 für 30 min bei 37°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein Ziege-anti-Maus Alexafluor594 Antikörper benutzt. Maßstab: 50 µm

6.2.15.2 Vergleich der Proteinexpression von ATF4 und ATF4 S215A

Die Phosphorylierung von ATF4 zeigte keine Änderung in der subzellulären Lokalisation von ATF4, allerdings war die Zahl an ATF4 S215A positiven Zellen im Vergleich zu ATF4 positiven Zellen erhöht. Dies legte den Verdacht nahe, dass die CK2-Phosphorylierung von ATF4 möglicherweise dessen Stabilität beeinflusst. Der Einfluss der Phosphorylierung wurde in einem ersten Experiment an Hand der ATF4-Proteinexpression überprüft. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und als Kontrolle mit dem Leervektor p3xFLAG-CMV-7.1 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteinextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mit der Westernblot-Methode analysiert. Die Expression der FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A Proteine wurde mit dem anti-FLAG Antikörper, die Expression der GAPDH mit dem anti-GAPDH Antikörper nachgewiesen. In den Spuren FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A ist bei einem Molekulargewicht von circa 53 kDa jeweils eine Bande zuerkennen. Dabei handelt es sich um die Proteine FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A (Abbildung 40 a)). Allerdings ist ein deutlich stärkeres Signal in der Spur FLAG-ATF4 S215A zu vermerken, was auf einen erhöhten Proteingehalt hindeutet. In der Leervektorkontrolle „Mock“ ist keine Bande bei gleichem Molekulargewicht zu erkennen. Die Ladekontrolle GAPDH zeigt in allen drei Spuren eine relativ gleichmäßige Bande. Für Abbildung 40 b) wurden die Proteinbanden densitometrisch gescannt und ausgewertet. Das Balkendiagramm stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar, aus denen der erhöhte ATF4 S215A Proteingehalt ersichtlich wird.

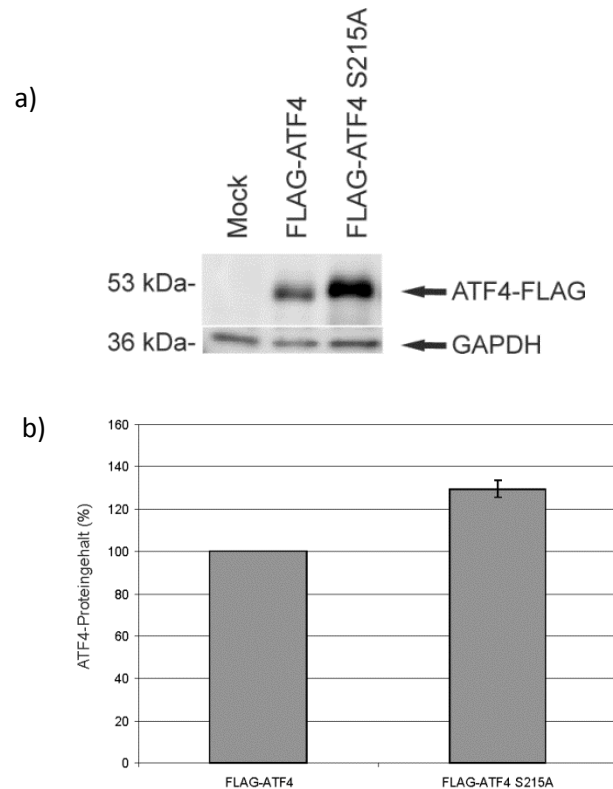


Abbildung 40: Vergleich der FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A Proteinexpression. **a)** HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A sowie p3xFLAG-CMV-7.1 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend der Westernblot-Analyse unterzogen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion von FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A wurde der anti-FLAG Antikörper, zur Detektion der GAPDH wurde der Antikörper sc-25778 eingesetzt. **b)** Die Proteinbanden wurden densitometrisch analysiert und FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A wurde zur GAPDH normalisiert. FLAG-ATF4 wurde 100% gesetzt. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

6.2.15.3 Bestimmung der Stabilität von ATF4 und ATF S215A

Die erhöhte Menge an ATF4 S215A-Protein drängt die Frage auf, ob der Verlust der Phosphorylierung mit einer Stabilisierung des Proteins einhergeht. Bereits Untersuchungen bezüglich der Phosphorylierungsstelle S219 in der Polypeptidkette von ATF4 zeigten, dass der Verlust der Phosphorylierung zu einer erhöhten Stabilität führt [49]. Endogenes ATF4 hat unter normalen zellulären Bedingungen eine Halbwertszeit von circa einer Stunde. In einem ersten Experiment wurde die Halbwertszeit mittels Cycloheximid bestimmt. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit dem Expressionsplasmid p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 oder p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A transfiziert und nach 24 Stunden mit Cycloheximid über verschiedene Zeiträume (0, 45 und 90 Minuten) behandelt. Die Zellen wurden im Anschluss geerntet und daraus Zellextrakte generiert. Es folgte eine elektrophoretische Auftrennung der Zellextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel mit

anschließender Westernblot-Analyse. Die Expression der Proteine FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A wurde mit dem anti-FLAG Antikörper, die der GAPDH mit dem anti-GAPDH Antikörper bestätigt. Abbildung 41 a) zeigt die Westernblot-Analyse der Cycloheximid-Behandlung. Vergleicht man die Intensitäten der Proteinbanden für FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A, so sieht man nach 90 Minuten im Falle von FLAG-ATF4 S215A eine stärkere Bande. Daraus geht hervor, dass nach Hemmung der allgemeinen Proteinsynthese der Verlust der CK2-Phosphorylierung zu einer erhöhten ATF4 S215A Proteinmenge führt. Folglich führt die Phosphorylierung an Stelle Serin 215 in der Polypeptidkette von ATF4 durch die CK2 zu einer reduzierten Stabilität von ATF4. Um die erhöhte Stabilität der Alanin-Mutante zu quantifizieren, wurden die Banden densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm in Abbildung 41 b) repräsentiert den Mittelwert aus sechs unabhängigen Messungen. Die Reduktion der Proteinmenge von FLAG-ATF4 auf 50% nach circa 60 Minuten entspricht den Literaturwerten [48, 49]. Hingegen ist FLAG-ATF4 S215A weit über 90 Minuten hinaus stabil. Die CK2-Phosphorylierungsmutante FLAG-ATF4 S215A zeigt folglich eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu FLAG-ATF4.

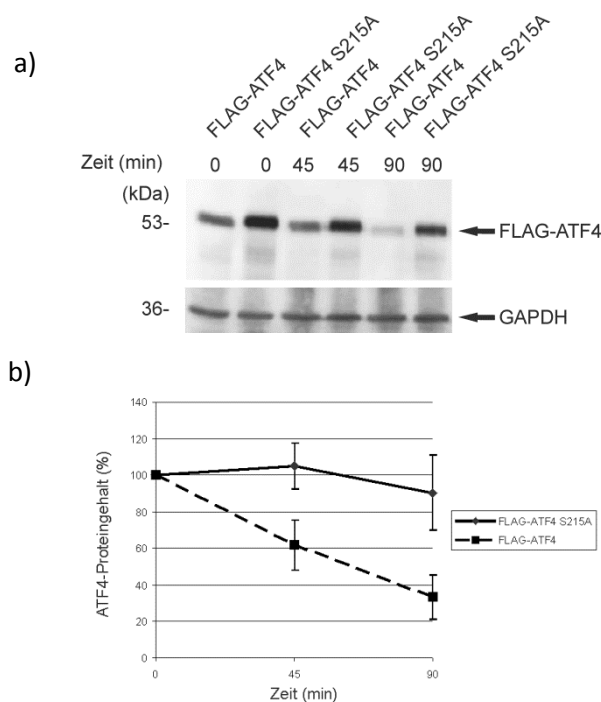


Abbildung 41: Bestimmung der Stabilität der Proteine FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A. **a)** HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen über einen Zeitraum von 0, 45 und 90 Minuten mit Cycloheximid inkubiert und geerntet. Danach wurden die Zellen lysiert und die Zellextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion von FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A wurde der anti-FLAG Antikörper, zur Detektion der GAPDH wurde der Antikörper sc-25778 eingesetzt. **b)** Die Proteinbanden wurden densitometrisch analysiert und FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A wurden zur GAPDH normalisiert. FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A zum Zeitpunkt 0 Minuten wurden 100% gesetzt. Das Liniendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Experimenten dar.

Bei einer Translationshemmung durch ER-Stress ist Translation von endogenem ATF4 nicht betroffen. Ganz im Gegenteil, durch drei „upstream open reading frames“ (uORF) im 5'-untranslatierten Bereich der ATF4-mRNA kommt es zu einer verstärkten Translation von ATF4 [135]. Im vorangegangenen Experiment wurde die Stabilität von ATF4 mittels Cycloheximid bestimmt. Allerdings kann auch die Hemmung der Translation durch Cycloheximid einen Einfluss auf die Translation von ATF4 nehmen [136]. Um auszuschließen, dass die Stabilität von ATF4 nicht von sekundären Effekten der Cycloheximid-Behandlung beeinflusst wird, wurde die Stabilität mit einer „pulse-chase“ Markierung mit [³⁵S]-Methionin analysiert. Zu Beginn des Experiments wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für zwei Stunden in Methionin-freiem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit Medium inkubiert, welches [³⁵S]-Methionin enthielt.

Nach der Markierung wurden die Zellen mehrmals mit Methionin-freiem Medium gewaschen und über einen Zeitraum von 0, 45 und 90 Minuten in frischem DMEM inkubiert und anschließend geerntet. Die Zellen wurden lysiert und die markierten FLAG-Proteine präzipitiert. Das Gel wurde getrocknet und die Detektion der [³⁵S]-Methionin markierten Proteine FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A erfolgte autoradiographisch (Abbildung 42 a)). In den Spuren 45 und 90 Minuten von FLAG-ATF4 S215A sind im Vergleich zu FLAG-ATF4 stärkere Signale zu sehen. Um auch in diesem Experiment die stärkeren Signale der Phosphorylierungsmutante (S215A) hervorzuheben, wurden die Banden densitometrisch ausgewertet und der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 42 b)). Aus diesem geht hervor, dass FLAG-ATF4 S215A eine deutlich erhöhte Stabilität im Vergleich zu FLAG-ATF4 zeigt. Die Ergebnisse der „pulse-chase“ Markierung korrelieren mit den Ergebnissen der Cycloheximid-Behandlung und bekräftigen somit, dass der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 zu einer Stabilisierung von ATF4 führt.

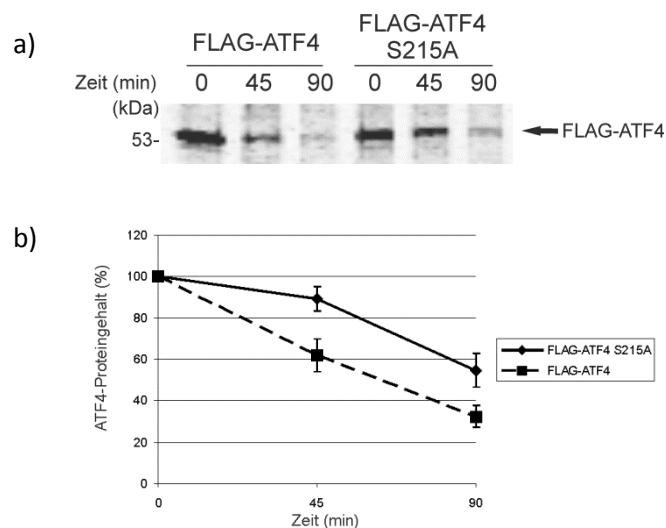


Abbildung 42: „Pulse-chase“ Markierung mit [³⁵S]-Methionin zur Bestimmung der Stabilität von FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A. **a)** HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A transfiziert, nach 24 h wurden die Zellen für zwei Stunden in Methionin-freiem Medium inkubiert, woran sich eine zehnmütige Inkubation in [³⁵S]-Methionin-Medium anschloss. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 0, 45 und 90 Minuten in frischem Medium inkubiert, geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden mit einem Gemisch aus CL-4B/Protein-A-Sepharose vorinkubiert und danach auf, mit spezifischen Antikörpern (sc-200) gebundene, CL-4B/Protein-A-Sepharose übertragen. Die Präzipitate wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel getrocknet. Die Visualisierung der präzipitierten Proteine FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A erfolgte mittels Autoradiographie. **b)** Die Signale der Autoradiographie wurden densitometrisch analysiert und FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde 100% gesetzt. Das Liniendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dar.

6.2.15.4 Bestimmung der Stabilität der Phosphomimetik-Mutante ATF4 S215D

Alanin besitzt keine freie Hydroxyl-Gruppe und kann somit von der CK2 nicht phosphoryliert werden. Dadurch entfällt die negative Ladung der Phosphorylierung. Um zu unterscheiden, ob die negative Ladung ausschlaggebend für die erhöhte Stabilität von ATF4 ist, wurde eine Phosphomimetik-Mutante erzeugt. Wie schon zuvor für die Alanin-Mutante geschildert, wurde mit derselben Methode eine Aspartat-Mutante (S215D) generiert und in das Expressionsplasmid p3xFLAG-CMV-7.1 kloniert. Die Expression der generierten Aspartat-Mutante sollte nachgewiesen und zugleich der Proteingehalt bestimmt werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D, sowie als Kontrolle mit dem Leervektor p3xFLAG-CMV-7.1 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteinextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend im Westernblot analysiert. Die Expression der Proteine FLAG-ATF4, FLAG-ATF4 S215A und FLAG-ATF4 S215D wurde mit dem anti-FLAG Antikörper detektiert, die Expression der Ladekontrolle GAPDH mit dem anti-GAPDH Antikörper. Für die Aspartat-Mutante FLAG-ATF4 S215D konnte bei einem Molekulargewicht von circa 53 kDa eine Proteinbande detektiert werden. Allerdings wurde ein deutlich schwächeres Signal detektiert als für die Mutante FLAG-ATF4 S215A (Abbildung 43).

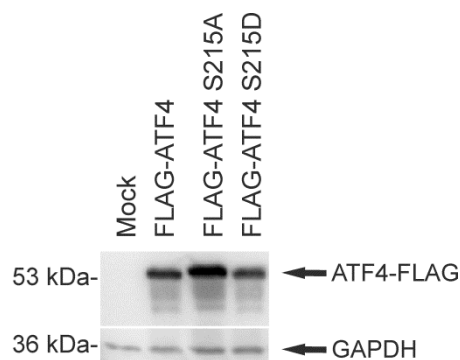


Abbildung 43: Nachweis der Expression von FLAG-ATF4 S215D und Vergleich der Expression zu FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D und p3xFLAG-CMV-7.1 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Westernblot-Methode analysiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion der FLAG-Proteine wurde der anti-FLAG Antikörper, zur Detektion der GAPDH wurde der Antikörper sc-25778 eingesetzt.

Auch mit der Phosphomimetik-Mutante FLAG-ATF4 S215D wurden Studien zur Stabilität von ATF4 durchgeführt. Zuerst mit Hilfe von Cycloheximid und anschließend mittels [³⁵S]-Methionin-Markierung. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert und nach 24 h mit Cycloheximid über einen Zeitraum von 0, 45 und 90 Minuten behandelt. Die Zellen wurden im Anschluss geerntet und daraus

Zellextrakte generiert. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung der Zellextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel und anschließend eine Westernblot-Analyse (Abbildung 44). Die Expression der Proteine FLAG-ATF4 S215A und FLAG-ATF4 S215D wurde mit dem anti-FLAG Antikörper, die Expression der GAPDH mit dem anti-GAPDH Antikörper bestätigt. Es ist eine deutlich schwächere Proteinbande zum Zeitpunkt Null für FLAG-ATF4 S215D zuerkennen, als für FLAG-ATF4 S215A. In den Spuren der Aspartat-Mutante ist nach 90 Minuten keine Reduktion der Proteinmenge zu detektieren. Folglich zeigt FLAG-ATF4 S215D einen, im Vergleich zu Alanin-Mutante, schwächeren aber dennoch stabilen Proteingehalt über einen Zeitraum von 90 Minuten.

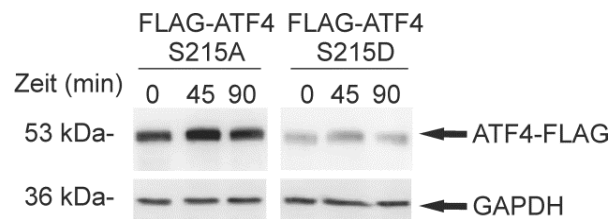


Abbildung 44: Bestimmung der Proteinmenge von FLAG-ATF4 S215A und FLAG-ATF4 S215D nach einer Cycloheximid-Behandlung. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen über einen Zeitraum 0, 45, und 90 Minuten in frischem Medium mit Cycloheximid inkubiert und geerntet. Danach wurden die Zellen lysiert und die Zellextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und der Westernblot-Analyse unterzogen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion von FLAG-ATF4 S215A und FLAG-ATF4 S215D wurde der anti-FLAG Antikörper, zur Detektion der GAPDH wurde der Antikörper sc-25778 eingesetzt.

Analog zu dem in Abbildung 44 dargestellten Experiment wurde eine „pulse-chase“ Markierung mit [35 S]-Methionin durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert anschließend mittels [35 S]-Methionin markiert. Die markierten FLAG-Proteine wurden präzipitiert. Die gebundenen FLAG-Proteine wurden eluiert und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die mit [35 S]-Methionin markierten FLAG-ATF4 S215D Proteine autoradiographisch detektiert. Wie aus Abbildung 45 hervorgeht, ist keine Reduktion des Signals nach 90 Minuten zu vermerken. Aspartat-Mutante zeigt folglich einen gleichmäßigen Proteingehalt über den gesamten Zeitraum.

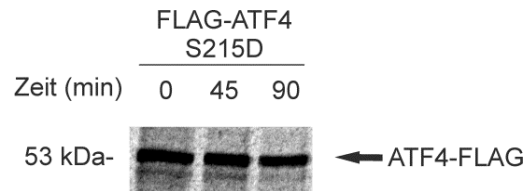


Abbildung 45: „Pulse-chase“ Markierung mit [³⁵S]-Methionin zur Bestimmung der FLAG-ATF4 S215D Proteinmenge. HeLa-Zellen wurden dem Expressionsplasmid p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert. Danach wurden die Zellen für zwei Stunden in Methionin-freiem Medium inkubiert. Daran schloss sich eine zehnminütige Inkubation in [³⁵S]-Methionin-Medium an. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 0, 45, 90 Minuten in frischem Medium inkubiert, geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden mit einem ATF4-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel getrocknet. Die Visualisierung des präzipitierten Proteins FLAG-ATF4 S215D erfolgte mittels Autoradiographie.

6.2.15.5 Auswirkung der CK2-Inhibition auf endogenes ATF4

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ATF4 eine Halbwertszeit von circa 60 Minuten aufweist. Zudem konnte demonstriert werden, dass die Alanin-Mutante ATF4 S215A eine erhöhte Stabilität aufzeigt, wohingegen die Überexpression der Aspartat-Mutante ATF4 S215D einen konstant, geringen Proteingehalt zeigt. Wegen des geringen Gehalts an endogenem ATF4 wurde für die vorangegangenen Experimente ATF4 überexprimiert. In einem nächsten Schritt soll die Auswirkung der CK2-Hemmung auf endogenes ATF4 analysiert werden. Die meisten CK2-Inhibitoren besitzen eine hohe Spezifität, jedoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass neben der CK2 noch weitere Kinasen gehemmt werden. Um zu vermeiden, dass die Hemmung einer anderen Kinase, nach Anwendung eines spezifischen CK2-Hemmstoffes, Einfluss auf endogenes ATF4 nimmt, wurden zwei spezifische CK2-Inhibitoren verwendet: Quinalizarin [125] und TBB [137]. Für die Experimente wurden HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit den Inhibitoren Quinalizarin beziehungsweise TBB behandelt. Als Kontrolle dienten äquimolare Mengen DMSO. Die Zellextrakte wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mittels Westernblot analysiert. Die Detektion von endogenem ATF4 erfolgte mit dem Antikörper sc-200, die Detektion der Ladekontrolle α -Tubulin mit dem Antikörper anti- α -Tubulin. Es ist sowohl nach Quinalizarin-, als auch nach TBB-Behandlung eine deutliche Proteinbande bei einem Molekulargewicht von circa 50 kDa zu erkennen, welche endogenes ATF4 repräsentiert (Abbildung 46 a) und b)). Die Ladekontrolle α -Tubulin zeigt in beiden Abbildungen einen relativ gleichmäßigen Proteingehalt bei circa 60 kDa. Demzufolge kommt es nach CK2-Inhibition zu einer Akkumulation von ATF4.

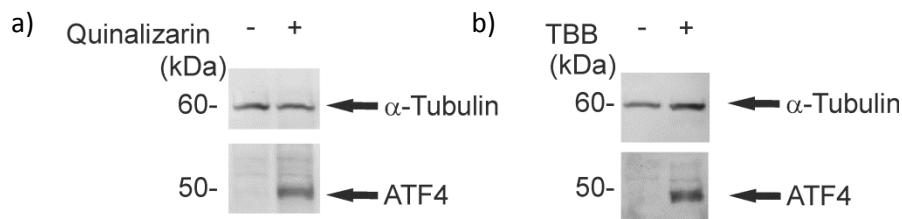


Abbildung 46: ATF4-Proteingehalt nach CK2-Hemmung mittels Quinalizarin und TBB: **a)** HeLa-Zellen wurden mit Quinalizarin (+) und äquimolaren Mengen an DMSO (-) behandelt. **b)** HeLa-Zellen wurden mit TBB (+) und äquimolaren Mengen an DMSO (-) behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen aus a.) und b.) geerntet und lysiert. Danach wurden die Zellextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mittels Westernblot analysiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion des ATF4 wurde der Antikörper sc-200, zur Detektion von α -Tubulin der anti- α -Tubulin Antikörper eingesetzt.

6.2.15.6 ATF4-Genexpression nach CK2-Hemmung

Aus dem gesteigerten ATF4-Proteingehalt (Abbildung 46) geht nicht hervor, ob dieser auf eine erhöhte Stabilität oder eine erhöhte Genexpression von ATF4 zurückzuführen ist. Mit Hilfe einer Luciferase-Reportergen-Analyse sollte die Möglichkeit einer erhöhten Genexpression von ATF4 analysiert werden. Dafür wurde ein Reportergenkonstrukt (ATF4 Promoter Luc.) benutzt, welches aus dem 272 bp großen Bereich der 5' UTR des *ATF4*-Mausgens und der cDNA der *Firefly*-Luciferase besteht (Abbildung 47 a)) [23]. HeLa-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt ATF4 Promoter Luc. transfiziert, sowie mit dem Kontroll-Reportergenkonstrukt, welches eine Luciferase aus der *Renilla reniformis* beinhaltet, kotransfiziert. Dabei dient die Luciferaseaktivität der *Renilla* zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 24 h mit den Inhibitoren Quinalizarin oder TBB behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die *Firefly* und *Renilla* Luciferaseaktivität wurde luminometrisch bestimmt. In Abbildung 47 b) ist für die Reportergenanalysen eine erhöhte Luciferaseaktivität nach 24-stündiger Inhibitor-Behandlung zu erkennen. Nach Hemmung mit Quinalizarin wird eine zehnfache Aktivitäts-Steigerung im Vergleich zur Kontrolle gemessen, die Hemmung der CK2-Aktivität mittels TBB zeigt eine Aktivitäts-Steigerung um etwa das dreieinhalbfache im Vergleich zur Kontrolle. Daraus ergibt sich, dass die Hemmung der CK2 mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren den ATF4-Proteingehalt über zwei unabhängige Wege erhöht: einerseits durch Stabilisierung von ATF4, andererseits über eine erhöhte Transkription von ATF4.

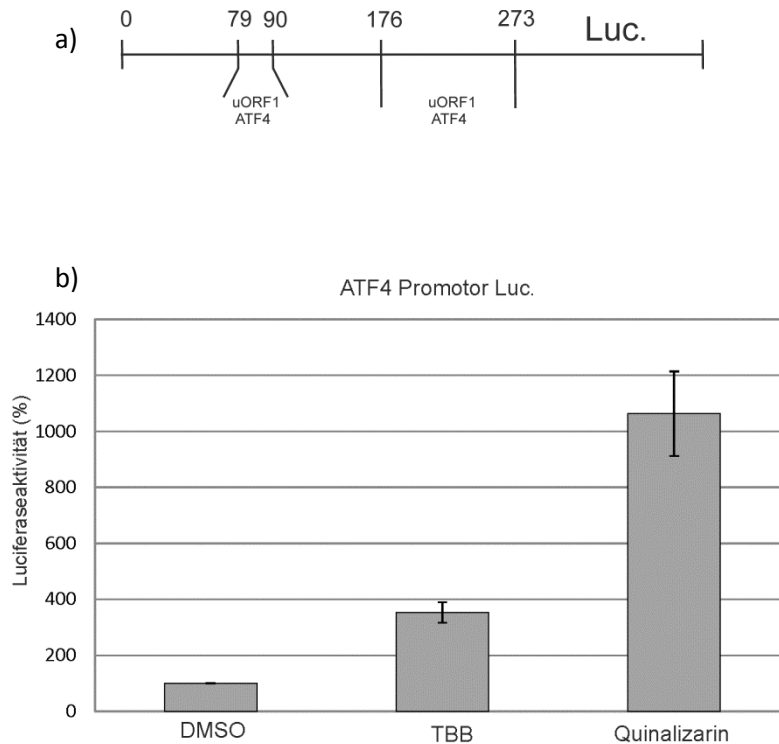


Abbildung 47: Reporteranalysen zur Bestimmung der *ATF4*-Gentranskription nach Hemmung der CK2-Aktivität. **a)** Schematische Abbildung des *ATF4* Reportergenkonstrukts (*ATF4* Promoter Luc.). **b)** HeLa-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt *ATF4* Promoter Luc. transfiziert und mit dem *Renilla*-Reportergenkonstrukt kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Quinalizarin, TBB oder mit der entsprechenden äquimolaren Mengen an DMSO behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und anschließend wurde die Luciferaseaktivität in einem Luminometer gemessen. Die Luciferaseaktivität der *Firefly* wurde auf die Luciferaseaktivität der *Renilla* bezogen. Die Werte der Lösungsmittelkontrolle DMSO wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

6.2.15.7 Hemmung der CK2-Aktivität mittels dominant-negativer Mutanten

Die Hemmung der CK2-Aktivität durch spezifische Inhibitoren führte zu einem erhöhten *ATF4*-Proteingehalt. Allerdings handelt es sich bei diesen Inhibitoren um ATP-Analoga, wodurch die Hemmung anderer Kinasen nicht komplett ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund sollte die Auswirkung der Inhibition der CK2-Aktivität auf den *ATF4*-Proteingehalt mit dominant-negativen Mutanten der *CK2 α* - und *CK2 α'* -Untereinheit überprüft werden. Dafür wurden die dominant-negativen Mutanten *CK2 α* K68M und *CK2 α'* K69M verwendet. In der dominant-negativen Mutante K68M wurde Lysin an Position 68 in Polypeptidkette der *CK2 α* -Untereinheit zu Methionin mutiert, in der dominant-negativen Mutante K69M an Position 69 in der Polypeptidkette der *CK2 α'* -Untereinheit. Beide Mutationen befinden sich innerhalb der ATP-Bindedomäne, was zu einer drastisch reduzierten Kinaseaktivität führt [138]. Zur vollständigen Reduktion der CK2-Kinaseaktivität wurden für die nachfolgenden Experimente HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden der dominant-negativen Mutanten *CK2 α* K68M und *CK2 α'* K69M in einem Transfektionsansatz, sowie

den entsprechenden Leervektoren (Mock), transfiziert. Die Analyse der Effizienz der Hemmung der CK2-Aktivität nach Überexpression der dominant-negativen Mutanten wurde mittels eines CK2-Kinaseaktivitätstest durchgeführt. Dabei wird der Einbau von radioaktivem Phosphat aus [^{32}P]- γ -ATP in das CK2 spezifische Substratpeptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD gemessen. Der Einbau ist dabei proportional zu Kinaseaktivität. Die Strahlung wurde in einem Szintillationszähler detektiert und graphisch in einem Balkendiagramm dargestellt. Unter Verwendung der dominant-negativen Mutanten der CK2 α - und der CK2 α' -Untereinheit konnte die CK2-Aktivität auf etwa 60% Restaktivität gehemmt werden (Abbildung 48).

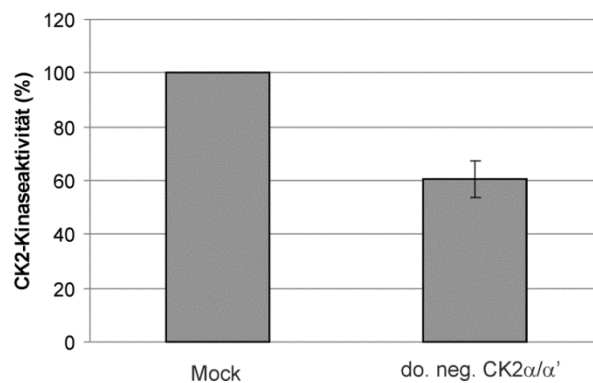


Abbildung 48: Hemmung der CK2-Aktivität mit Hilfe von dominant-negativen Mutanten. HeLa-Zellen wurden mit den dominant-negativen Mutanten CK2 α K68M und CK2 α' K69M transfiziert. Nach Generierung der Zellextrakte wurden diese zur Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität benutzt. Dies erfolgte über den Einbau von [^{32}P]- γ -ATP in das CK2 spezifische Substratpeptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD. Anschließend wurde die Radioaktivität in einem Szintillationszähler detektiert. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der Messdaten von drei unabhängigen Ergebnissen dar.

Nachdem gezeigt wurde, dass mit den dominant-negativen Mutanten CK2 α K68M und CK2 α' K69M die CK2-Kinaseaktivität erfolgreich reduziert werden konnte, wurden die Zellextrakte aus dem vorherigen Experiment und zur Kontrolle ein Zellextrakt von HeLa-Zellen, die mit Thapsigargin behandelt wurden, über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis des endogenen ATF4 erfolgte mit dem Antikörper sc-200, die Detektion der Ladekontrolle α -Tubulin mit dem anti- α -Tubulin Antikörper und die Detektion der dominant-negativen Mutanten CK2 α und CK2 α' mit dem anti-FLAG Antikörper. Die Spuren der Zellextrakte der dominant-negativen Mutanten weisen einen deutlich erhöhten ATF4-Proteingehalt auf. In der Kontrollprobe, die mit Thapsigargin behandelten Zellen, wurde eine starke Proteinbande für endogenes ATF4 detektiert. Die Kontrollspuren der Zellextrakte, die mit dem Leervektor transfizierten oder nicht-transfiziert wurden, zeigen einen deutlich geringeren ATF4 Proteingehalt (Abbildung 49 a)). Zur graphischen Darstellung des erhöhten ATF4-Proteingehalts wurden die Proteinbanden von vier unabhängigen Experimenten densitometrisch

gescannt und ausgewertet (Abbildung 49 b)). Das Balkendiagramm zeigt einen um etwa 60% erhöhten ATF4-Proteingehalt nach Überexpression der dominant-negativen Mutanten CK2 α K68M und CK2 α' K69M im Vergleich zu mit Leervektor („Mock“) transfizierten Zellen.

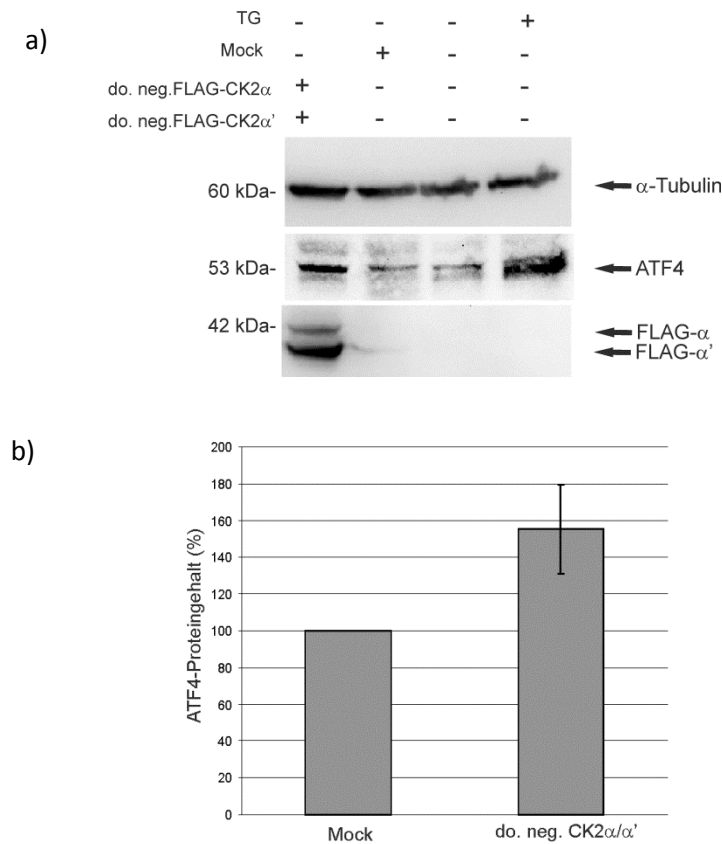


Abbildung 49: Erhöhung des ATF4-Proteingehalts nach Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mittels dominant-negativer Mutanten. **a)** HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden der dominant-negativen Mutanten CK2 α K68M und CK2 α' K69M transfiziert. Parallel wurden HeLa-Zellen mit Thapsigargin behandelt um ER-Stress auszulösen. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL-Behandlung. Zur Detektion der FLAG-Proteine wurde der anti-FLAG Antikörper, zur Detektion von α -Tubulin wurde der anti- α -Tubulin Antikörper benutzt. ATF4 wurde mit dem Antikörper sc-200 nachgewiesen. **b)** Die Proteinbanden wurden densitometrisch analysiert und ATF4 wurde im Vergleich zu α -Tubulin normalisiert. Mit Leervektor transfizierte Zellen („Mock“) wurden 100% gesetzt. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten dar.

6.2.15.8 Auswirkung von steigenden ATF4-Mengen auf dessen transkriptionelle Aktivität

Steigende Mengen eines Transkriptionsfaktors können die Zielgenexpression beeinflussen. Dies kann durch veränderte Komplexbildung mit sich selbst oder mit anderen Transkriptionsfaktoren geschehen. Im Falle von ATF4 konnte gezeigt werden, dass steigende Proteinmengen von ATF4 dessen transkriptionelle Aktivität negativ beeinflussen können [139]. Inwiefern nun steigende Proteinmengen von ATF4 und der ATF4-Mutanten die Zielgenexpression beeinflussen, sollte an Hand

eines „amino acid reponse element“ (AARE) analysiert werden. Als AARE-Reportergenkonstrukt diente eine zweifach wiederholte 19 bp lange Sequenz des CHOP-Promotors (2xAARE-Luc.), die vor ein *Firefly*-Luciferase-Gen kloniert ist. Diese Sequenz wird von ATF4 als Konsensussequenz benutzt, wodurch die Transkription in Gang gesetzt wird [140]. Zur Überprüfung, ob erhöhte Mengen an ATF4 beziehungsweise der ATF4-Mutanten die Transkription beeinflussen, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Expressionsplasmiden (p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A, und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D), sowie dem Reportergenkonstrukt 2xAARE-Luc. und dem *Renilla*-Reportergenkonstrukt, transfiziert. Nach 24 wurden die Zellen lysiert und die *Firefly*- und *Renilla*-Luciferaseaktivität luminometrisch bestimmt. Es ist keine Repression der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit des ATF4-Proteingehalts zu sehen. (Abbildung 50). Die Proteine FLAG-ATF4, FLAG-ATF4 S215A und FLAG-ATF4 S215D zeigten mit steigendem Proteingehalt eine steigende Luciferaseaktivität.

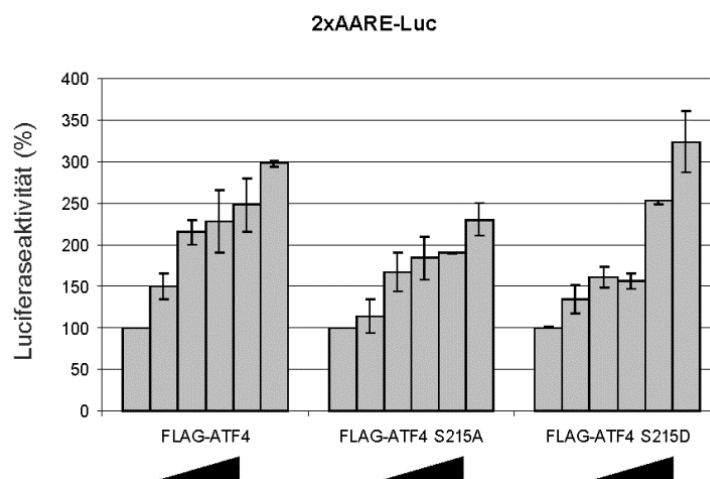


Abbildung 50: Auswirkungen steigender Proteinmengen von ATF4 und der ATF4-Mutanten auf deren transkriptionelle Aktivität. HeLa-Zellen wurden mit 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 1 µg und 2 µg der Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert und mit dem 2xAARE-Luc.- und dem *Renilla*-Reportergenkonstrukt kotransfiziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und anschließend wurde die Luciferaseaktivität in einem Luminometer gemessen. Die Luciferaseaktivität der *Firefly* wurde auf die Luciferaseaktivität der *Renilla* bezogen. Die 50 ng Werte der jeweiligen FLAG-Proteine wurden 100% gesetzt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

6.2.15.9 Auswirkung der Phosphorylierung auf die transkriptionelle Aktivität von ATF4

Der Verlust der CK2-Phosphorylierung führt zu einem gesteigerten ATF4-Proteingehalt. Inwiefern dieser die transkriptionelle Aktivität von ATF4 verändert, wurde nachfolgend untersucht. Es gibt mehrere Beispiele, in denen die CK2-Phosphorylierung von Proteinen Einfluss auf deren transkriptionelle Aktivität nimmt [97, 141]. Allerdings muss beachtet werden, dass nicht jede Tumorzelllinie gleich auf Veränderungen, welche durch posttranslationale Modifikationen

hervorgerufen werden, reagiert. Daher wurden die Experimente parallel in drei verschiedenen Tumorzelllinien durchgeführt. Neben der schon in den vorherigen Experimenten verwendeten HeLa-Zelllinie wurden noch zwei weitere Zelllinien verwendet: die humane Leberzellkarzinom-Zelllinie HepG2 und die humane Kolonkarzinom Zelllinie HCT116 p53^{+/+}. Dabei sollte die transkriptionelle Aktivität von ATF4, in Abhängigkeit der CK2-Phosphorylierung, mittels zweier unterschiedlich großer Reportergergenkonstrukte getestet werden. Zum einen wurde das kurze Reportergergenkonstrukt 2xAARE-Luc. verwendet, das einen 19 bp langen Bereich des CHOP-Promotors repräsentiert [140], zum anderen wurde das Reportergergenkonstrukt 5'ATF3-Luc. verwendet, das die Sequenz -1850 bis +34 der 5'UTR des *ATF3*-Gens repräsentiert und folglich einen relativ großen Promotorbereich darstellt [142]. Alle drei Zelllinien wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert und mit dem 5'ATF3-Luc.- sowie dem 2xAARE-Luc.- und dem *Renilla*-Reportergergenkonstrukt kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die *Firefly* und *Renilla* Luciferaseaktivität luminometrisch bestimmt. Für die Luciferaseaktivität des 5'ATF3-Luc.-Reportergergenkonstrukt lässt sich nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten folgendes erkennen (Abbildung 51 a-c)): Die Überexpression von FLAG-ATF4 zeigt in HeLa- und HCT116 p53^{+/+}-Zellen mit circa 700% die größte Luciferaseaktivität, in HepG2-Zellen zeigt die Überexpression von FLAG-ATF4 lediglich eine Luciferaseaktivität von etwa 200%. Die Überexpression der Alanin-Mutante FLAG-ATF4 S215A zeigt in HeLa- und HCT116 p53^{+/+}-Zellen einen starken Rückgang der Luciferaseaktivität auf circa 300%. In HepG2-Zellen ist nach Überexpression von FLAG-ATF4 S215A sogar eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf unter 100% zu vermerken. Die Überexpression der Phosphomimetik-Mutante ATF4-S215D führt nur in HeLa-Zellen zu einer, im Vergleich zu FLAG-ATF4 S215A, erhöhten Luciferaseaktivität (circa 600%). In HCT116 p53^{+/+}-Zellen zeigt die Überexpression von ATF4 S215D eine, nochmals zur Alanin-Mutante, reduzierte Luciferaseaktivität (circa 150%), wohingegen in HepG2-Zellen eine leichte Steigerung der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Alanin-Mutante vorliegt (circa 150%). Für das 2xAARE-Luc.-Reportergergenkonstrukt zeigte die Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten eine relativ ähnliche Verteilung der Luciferaseaktivität. Allerdings ist die Luciferaseaktivität um das Zehnfache erhöht (Abbildung 51 d-f)). Im Falle des Reportergergenkonstrukts 2xAARE-Luc. führt die Überexpression von FLAG-ATF4 in HCT116 p53^{+/+}-Zellen zu der, mit etwa 9000%, höchsten Luciferaseaktivität. In HeLa- und HepG2-Zellen ist lediglich eine Luciferaseaktivität von circa 3000% beziehungsweise 2000% zu vermerken. Die Überexpression der Alanin-Mutante zeigt in allen drei Zelllinien eine deutliche Reduktion der Luciferaseaktivität um etwa zwei Drittel im Vergleich zur Luciferaseaktivität nach Überexpression von FLAG-ATF4. Die Phosphomimetik-Mutante ATF4-S215D zeigt nach Überexpression nur in der Zelllinie HCT116 p53^{+/+} eine Steigerung der Luciferaseaktivität auf etwa 5000% im Vergleich zu FLAG-ATF4. In HeLa und HepG2-Zellen führt die Überexpression zu

keiner Änderung der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Alanin-Mutante. Aus den Reporteranalysen (Abbildung 51 a-f)) geht hervor, dass die Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten in allen drei Zelllinien, die Reporterexpression des kurzen Reportergenkonstrukts (2xAARE-Luc.) um das Zehnfache erhöht im Vergleich zu dem langen Reportergenkonstrukt (5'ATF3-Luc.). Zudem zeigen die einzelnen Zelllinien untereinander unterschiedlich hohe Luciferaseaktivitäten nach Überexpression der drei ATF4-Proteine. Des Weiteren zeigt die Überexpression von ATF4 in allen drei Zelllinien eine deutlich erhöhte Luciferaseaktivität im Vergleich zur Alanin-Mutante ATF4-S215A. Die Aspartat-Mutante zeigt nach Überexpression innerhalb der einzelnen Zelllinien im Vergleich zur Alanin-Mutante starke Schwankungen. Zusammenfassend kann aus den Reporteranalysen geschlossen werden, dass der Verlust der CK2-Phosphorylierung zu einer reduzierten transkriptionellen Aktivität von ATF4 führt.

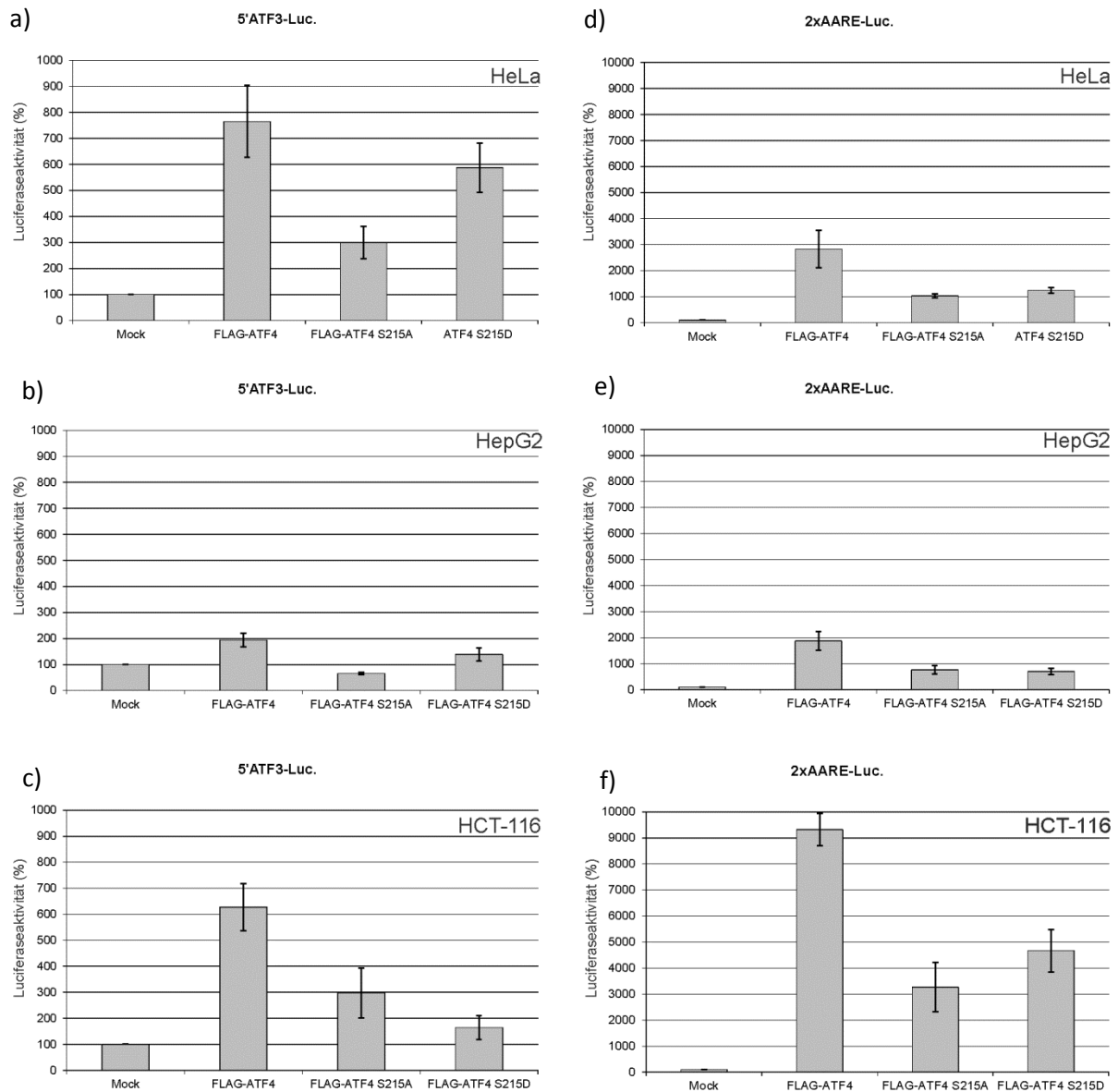


Abbildung 51: Auswirkung der CK2-Phosphorylierung auf die transkriptionelle Aktivität von ATF4 in den verschiedenen Zelllinien unter Verwendung von zwei Reportergerkonstrukten. Die Zelllinien **a)-b)** HeLa **c)-d)** HepG2 und **e)-f)** HCT116 $p53^{+/+}$ wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert und mit den Reportergerkonstrukten 5'ATF3-Luc. sowie 2xAARE-Luc kotransfiziert. Zusätzlich wurde das *Renilla*-Reportergerkonstrukt zur Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und anschließend wurde die Luciferaseaktivität in einem Luminometer gemessen. Die Luciferaseaktivität der *Firefly* wurde zuerst auf die Luciferaseaktivität der *Renilla* und anschließend auf die Expression der FLAG-Proteine bezogen. Die Werte der Leervektoren („Mock“) wurden 100% gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

Aufgrund der geänderten transkriptionellen Aktivität von ATF4 durch die CK2-Phosphorylierung wurde die endogene Zielgenexpression auf Proteinebene analysiert. Die Luciferaseaktivitäten der 5'ATF3- und 2xAARE-Reportergerkonstrukte zeigen nach Überexpression von FLAG-ATF4 eine starke, wohingegen nach Überexpression von FLAG-ATF4 S215A eine deutlich reduzierte,

Reporterexpression. Daher wurde überprüft, inwiefern die Luciferaseaktivität des 2xARE-Luc.-Reporterkonstruktes, das die 19 bp lange Sequenz des CHOP-10 Promotors besitzt, nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten mit dem CHOP-10-Proteingehalt korreliert. Zudem wurde analysiert, ob die Luciferaseaktivität des 5'ATF3-Luc. nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten mit dem ATF3-Proteingehalt korreliert. Dafür wurden die drei Zelllinien mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert und die generierten Zellextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des endogenen ATF3 erfolgte durch den Antikörper sc-188, die Detektion des endogenen CHOP-10 mit dem Antikörper B-3, die Detektion der Ladekontrolle mit einem GAPDH-spezifischen Antikörper. Die FLAG-Proteine wurden mit dem anti-FLAG Antikörper detektiert. Die Westernblot-Analysen zeigen die erfolgreiche Expression der FLAG-Proteine und jeweils gleichmäßige Proteinbanden für die Ladekontrolle GAPDH. Für den ATF3-Proteingehalt sind starke Schwankungen unter den Zelllinien zu vermerken. Die HeLa-Zellen zeigen nach Überexpression von FLAG-ATF4 und FLAG-ATF4 S215A einen erhöhten ATF3-Proteingehalt, hingegen zeigt die Überexpression von FLAG-ATF4 S215D einen stark erniedrigten Proteingehalt im Vergleich zu mit dem Leervektor („Mock“) transfizierten Zellen (Abbildung 52 a)). HepG2-Zellen weisen nach Überexpression von FLAG-ATF4, sowie den ATF4-Mutanten einen im Vergleich zum Leervektor („Mock“), erniedrigten Proteingehalt auf (Abbildung 52 b)). Ganz im Gegenteil dazu führt die Überexpression der FLAG-Proteine in HCT116 p53^{+/+} zu einem gesteigerten ATF3-Proteingehalt (Abbildung 52 c)). Die Expression von CHOP-10 konnte in keiner Zelllinie detektiert werden. Die Reporterstudien (Abbildung 51) und die Analysen der Proteinexpression (Abbildung 52) zeigen, dass ATF4 an der Genexpression von *ATF3* und *CHOP-10* beteiligt ist, jedoch auf genomischer Ebene noch viele weitere Faktoren zur Proteinexpression beitragen.

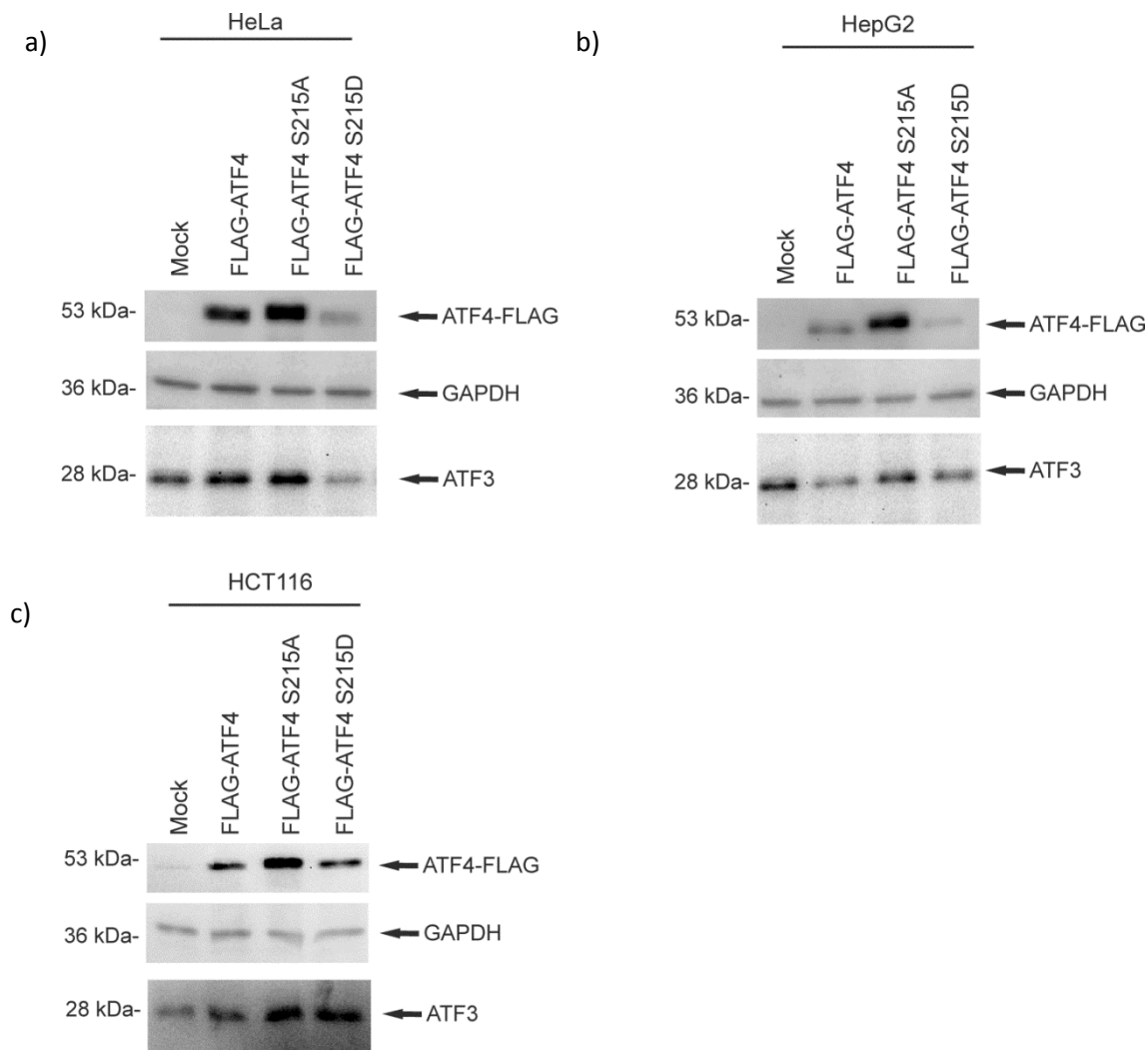


Abbildung 52: Auswirkung der Überexpression von FLAG-ATF4, FLAG-ATF S215A und FLAG-ATF4 S215D auf den endogenen ATF3-Proteingehalt. **a)** HeLa-Zellen **b)** HepG2-Zellen und **c)** HCT116 $p53^{+/+}$ wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Anschließend wurden die Zellextrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern mit nachfolgender ECL-Behandlung. Zur Detektion der FLAG-Proteine wurde der anti-FLAG Antikörper, zur Visualisierung der GAPDH der Antikörper sc-25778 eingesetzt. ATF3 wurde mit dem sc-188 Antikörper nachgewiesen.

6.2.15.10 Auswirkung der Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten auf die

Induktion der Apoptose

In der UPR fungiert ATF4 als zentrales Protein, über welches das Überleben der Zellen oder die Einleitung der Apoptose reguliert wird [48, 51]. Zuvor konnte in dieser Arbeit gezeigt werden: (i) Der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 erhöht die Stabilität von ATF4, (ii) die Hemmung der CK2 mittels spezifischer Inhibitoren induziert die *ATF4*-Genexpression und (iii) der Verlust der CK2-Phosphorylierung reduziert die transkriptionelle Aktivität von ATF4. Abschließend wurde überprüft,

inwiefern FLAG-ATF4, beziehungsweise die Mutanten, nach Überexpression in der Lage sind, die Apoptose zu induzieren. Der Nachweis der Apoptose-Induktion erfolgte an Hand eines frühen sowie eines späten zellulären Markers. Als frühes Apoptose-Ereignis diente die Spaltung der Pro-Caspase 3 durch die Caspasen 8, 9 und 10, sowie die darauffolgende Spaltung der Pro-Caspase 7 durch die Caspase 3. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 kann nachfolgend als früher Nachweis der induzierten Apoptose angesehen werden. Die Zelllinien HeLa, HepG2 und HCT116 p53^{+/+} wurden mit den Expressionsplasmiden der FLAG-Proteine (ATF4, ATF4 S215A und ATF4 S215D), sowie dem Leervektor („Mock“) transfiziert. Nach 24 und 48 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Mit Hilfe des Caspase-3/7-Assays wurde die proteolytische Aktivität der Caspasen 3 und 7 luminometrisch bestimmt. Abbildung 53 a) zeigt nach Überexpression von FLAG-ATF4 S215A nach 24 h in HeLa-Zellen die höchste Caspase-3/-7-Aktivität (circa 200%), gefolgt von FLAG-ATF4 mit circa 150%. Die Überexpression von FLAG-ATF4 S215D zeigt eine geringere Aktivität vergleichend zu mit Leervektor („Mock“) transfizierten Zellen. Nach 48 h Transfektion ist eine drastisch reduzierte Caspasen-3/-7-Aktivität für die FLAG-Proteine zu vermerken, wobei nur FLAG-ATF4 S215A eine im Vergleich zu Mock erhöhte Aktivität aufweist. Abbildung 53 b) zeigt die Caspase-3/-7-Aktivität nach Überexpression der FLAG-Proteine in HepG2-Zellen. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion konnte keine geänderte Aktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen werden. Erst nach 48 h Überexpression der Proteine ATF4, ATF4 S215A, sowie ATF4 S215D ist ein Anstieg der Caspase-3/-7-Aktivitäten zu beobachten. Dabei zeigt die Aspartat-Mutante mit etwa 300% den höchsten Wert. HCT116 p53^{+/+}-Zellen in Abbildung 53 c) zeigen ein völlig anderes Bild. Hier weist nach 24 h die Alanin-Mutante beziehungsweise die Aspartat-Mutante eine drastisch erhöhte Caspase-3/-7-Aktivität auf, im Vergleich zur Caspase-3/-7-Aktivität der mit Mock und FLAG-ATF4 transfizierten Zellen. Nach 48 h ist die Caspase-3/-7-Aktivität der beiden Mutanten deutlich reduziert jedoch immer noch deutlich höher als FLAG-ATF4. Wie auch die Experimente bezüglich der transkriptionellen Aktivität von ATF4 und der ATF4-Mutanten, so zeigt auch Abbildung 53 a) - c) einen Zelltyp-abhängigen Einfluss der Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten. Der Verlust der CK2-Phosphorylierung führt lediglich in den Zelllinien HCT116 p53^{+/+} zu einer erhöhten Caspase-3/-7-Aktivität. In HeLa- und HepG2-Zellen zeigt weder die Überexpression von ATF4 noch der Verlust der ATF4-Phosphorylierung einen deutlichen Einfluss auf die Spaltung der Pro-Caspasen 3 und 7.

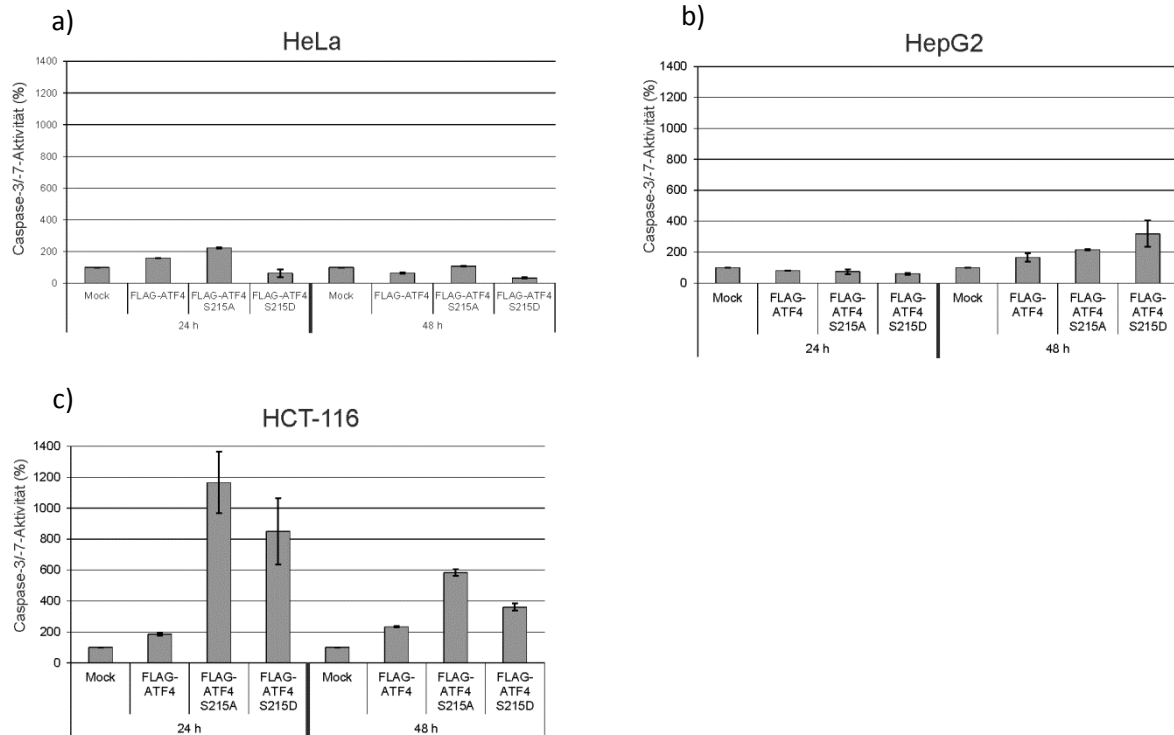


Abbildung 53: Auswirkung der CK2-Phosphorylierung von ATF4 auf die Aktivierung der Caspasen 3 und 7. **a)** HeLa-Zellen **b)** HepG2-Zellen und **c)** HCT116 p53^{+/+} wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert. Nach 24 h und 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und anschließend die Caspase-3/-7-Aktivität in einem Luminometer gemessen. Die Werte der Leervektoren (Mock) wurden 100% gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Spaltung der Caspasen 3 und 7 spiegeln frühe Ereignisse im Apoptose-Programm einer Zelle wider. Der vollständige Abbau einer Zelle erfolgt jedoch nicht ohne die Fragmentierung der DNA. Dabei spielt die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) als spätes Ereignis eine wesentliche Rolle. Sie ist in der Lage, Einzelstrangbrüche über Basenaustausch zu reparieren. Die Spaltung von PARP durch die Caspasen drei und sieben muss demnach erfolgen um den vollständigen Abbau der DNA zu gewährleisten. Das Vollängen PARP-Protein mit einem Molekulargewicht von circa 116 kDa wird dabei in zwei Fragmente mit den Molekulargewichten 89 kDa und 24 kDa gespalten. Die PARP-Spaltung wurde parallel zu den Caspase-3/-7-Experimenten durchgeführt. Die Zellextrakte der lysierten Zellen wurden über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mittels Westernblot analysiert. Das Vollängen PARP-Protein und das 86 kDa Spaltprodukt wurden mit dem anti-PARP Antikörper, die FLAG-Proteine mit dem anti-FLAG und die Ladekontrolle α -Tubulin mit dem anti- α -Tubulin Antikörper nachgewiesen. HeLa-Zellen zeigen nach 24 h und 48 h Transfektion in allen Spuren, sowohl nach Überexpression der FLAG-Proteine (ATF4, ATF4 S215A und ATF4 S215D), als auch in den mit Leervektor transfizierten Zellen das PARP-Spaltprodukt (Abbildung 54a)). HepG2-Zellen zeigen hingegen in keiner der Spuren eine

Proteinbande auf Höhe des PARP-Spaltproduktes (Abbildung 54b)). Einzig und allein die HCT116 p53^{+/+} Zellen zeigen eine Korrelation zu den Ergebnissen des Caspase-3/-7-assays. Die Überexpression von FLAG-ATF4 S215A und FLAG-ATF4 S215D bewirkt die Spaltung von PARP nach 24 h und nach 48 h, wobei nach 24 h eine stärkere Proteinbande für das Spaltprodukt zu sehen ist (Abbildung 54c)). Die Ergebnisse der PARP-Spaltung nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten zeigen in der Zelllinie HCT116 p53^{+/+} eine Korrelation mit der Spaltung der Caspasen 3 und 7, woraus hervorgeht, dass der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 lediglich in HCT116 p53^{+/+}-Zellen zu einer erhöhten Spaltung der Caspasen 3 und 7 führt, gefolgt von einer Spaltung von PARP. Neben der Änderung der Proteinstabilität und der transkriptionellen Aktivität von ATF4 durch die CK2-Phosphorylierung, so führt auch die CK2-Phosphorylierung von ATF4 zur Beeinflussung der Induktion der Apoptose. Allerdings zeigen sich unter Verwendung unterschiedlicher Zelllinien auch unterschiedliche Ergebnisse. Daraus wird ersichtlich, dass die Apoptose-Induktion von vielen weiteren Faktoren beeinflusst werden kann, die möglicherweise den Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 kompensieren können und somit davon unabhängig die Apoptose regulieren.

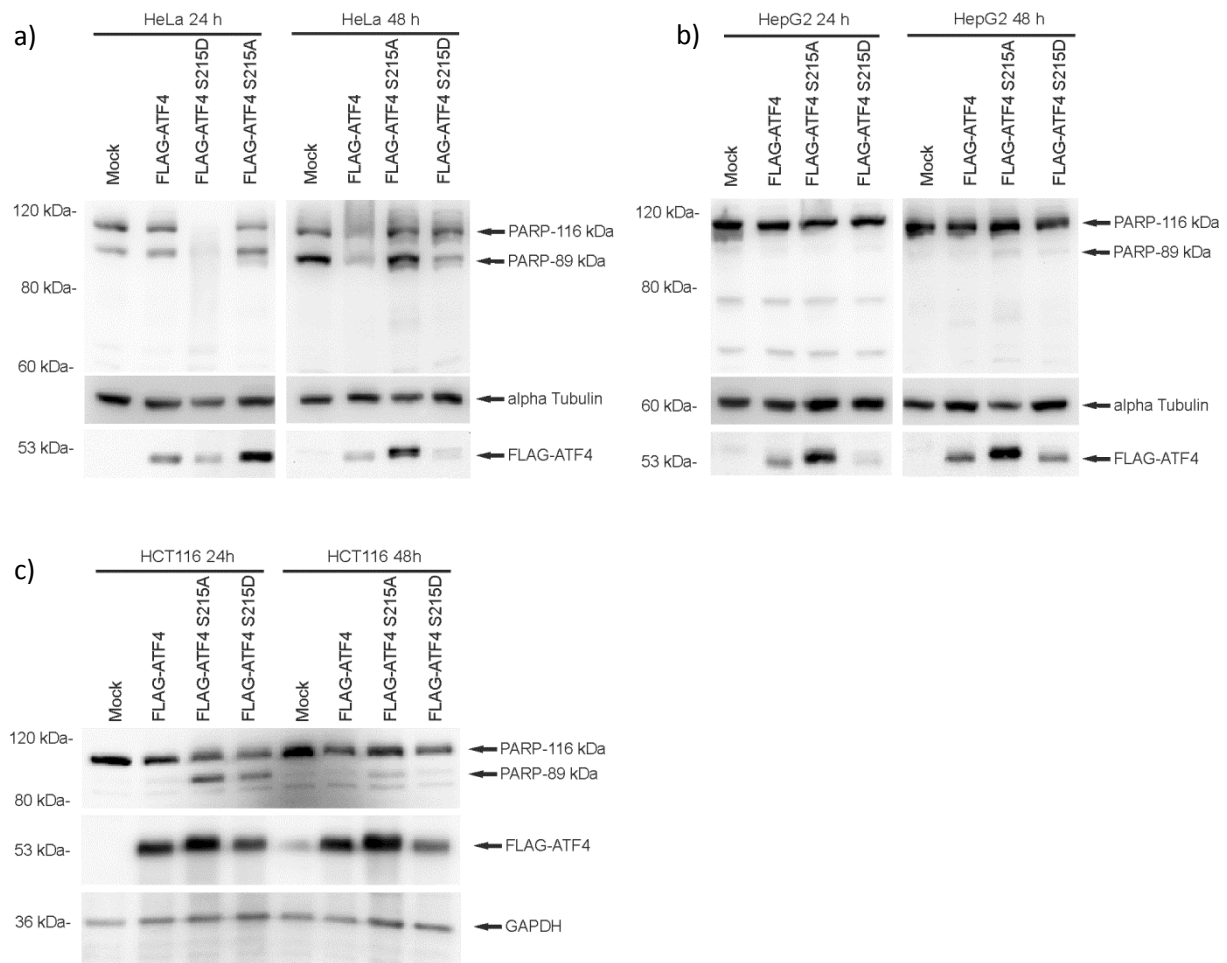


Abbildung 54: Auswirkung der CK2-Phosphorylierung von ATF4 auf die Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) in verschiedenen Zelllinien. **a)** HeLa-Zellen und **b)** HepG2-Zellen und **c)** HCT116 $p53^{+/+}$ wurden mit den Expressionsplasmiden p3xFLAG-CMV-7.1, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4, p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215A und p3xFLAG-CMV-7.1 ATF4 S215D transfiziert. Nach 24 h und 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und anschließend mittels Westernblot analysiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern mit nachfolgender ECL-Behandlung. Zur Detektion der FLAG-Proteine wurde der anti-FLAG Antikörper, zur Detektion der GAPDH der Antikörper sc-25778 und zur Detektion der Ladekontrolle α -Tubulin der anti- α -Tubulin Antikörper eingesetzt. Volllängen PARP (116 kDa) und dessen Spaltprodukt (89 kDa) wurde mit dem anti-PARP Antikörper nachgewiesen.

7. Diskussion

Im Jahre 1945 entdeckten Keith Porter, Ernest Fullam und Albert Claude das Endoplasmatische Retikulum (ER) [143]. Es ist das größte in der Zelle vorkommende Organell und liegt als System von miteinander verbundenen Membranvesikeln vor. Es nimmt etwa 10% des zellulären Volumens ein und erstreckt sich über das gesamte Zytoplasma. Die Hauptaufgabe des ER ist die Modifizierung und Faltung von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen. Aber auch zur Aufrechterhaltung des Ionen-Haushalt der Zelle trägt das ER maßgeblich bei. In den späten 70er Jahren machte der Biochemiker Günther Blobel die Entdeckung, dass vom ER ausgehend Proteine durch bestimmte Signalsequenzen zu ihrem Zielort in der Zelle gelangen. Dies bescherte ihm im Jahre 1999 den Nobelpreis [144]. Bis heute ist das Endoplasmatische Retikulum immer noch ein intensiv untersuchtes Zellorganell, da viele Funktionen des ER bis dato nur teilweise beziehungsweise unzureichend geklärt sind. Besonders die Beteiligung des ER an zellulärem Stress gewinnt zunehmend an Bedeutung [145]. Zu den Faktoren, die zur Induktion von ER-Stress führen gehören virale Infektionen, Aminosäuren-Mangel, Hypoxie oder Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration [146]. 2011 identifizierte unsere Arbeitsgruppe einen weiteren Faktor, welcher zur Induktion von ER-Stress führt [69]. In Experimenten konnten wir zeigen, dass die Hemmung der Proteinkinase CK2 zu ER-Stress führt und dadurch die Apoptose induziert werden kann. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der CK2-Hemmung und die damit verbundene Induktion des ER-Stress völlig unklar. Die CK2 ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die eine essentielle Rolle für das Überleben der Zelle spielt und ein überaus großes Substratspektrum aufweist. Jedoch sind am Endoplasmatischen Retikulum und dem damit eng verbundenen Signalweg der „unfolded protein response“ (UPR) nur wenige Substrate der CK2 bekannt. Schon vor mehr als zehn Jahren konnte unsere Arbeitsgruppe die CK2 am Endoplasmatischen Retikulum identifizieren, allerdings war zu diesem Zeitpunkt noch kein Substrat der CK2 am ER bekannt. Erst in den darauffolgenden Jahren konnten einige Substrate am ER und dem damit eng verbundenen Signalweg der UPR identifiziert werden. Jedoch verhalfen diese Substrate zu keiner einheitliche Zuordnung der Funktion der CK2 am ER. Erst die Entdeckung unserer Arbeitsgruppe, dass die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität ER-Stress erzeugt, deutete darauf hin, dass die CK2 am ER möglicherweise eine oder mehrere essentielle Funktionen übernimmt. Die Identifizierung von neuen Substraten der CK2 in ER-assoziierten Funktionen und die Einordnung von bereits bekannten Substraten in den Kontext des ER-Stresses, könnte wesentlich dazu beitragen, die Rolle der CK2 am größten Zellorganell aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei, bis dato, unbekannte Substrate der CK2 identifiziert werden. Die Klärung der biologischen Funktion der Phosphorylierung beider Proteine brachte weitreichende Erkenntnisse, welche Rolle die CK2 am ER und in der UPR spielt.

Membranproteine beziehungsweise Kanäle stellen eine kleine Gruppe an CK2 Substraten dar [91, 118, 147, 148]. Gegenwärtig sind weniger als zehn Kanäle bekannt, die entweder Substrate oder Bindungspartner der CK2 sind. Die CK2 konnte beispielsweise am postsynaptischen Natrium-/Kalium-Kanal 2 (SK2) lokalisiert werden [149]. Jedoch konnte keine Phosphorylierung des Kanals festgestellt werden. Interessanterweise bindet die CK2 nicht alleine an den SK2-Kanal, sondern in einem komplexen Netzwerk, in dem sich zwei weitere Bindungspartner der CK2 befinden: zum einen Calmodulin und zum anderen die Proteinphosphatase PP2A. Am Endoplasmatischen Retikulum ist, im Vergleich zu anderen Zellorganellen, eine weitaus geringere Zahl an Kanälen bzw. Membranproteinen identifiziert, die Substrate der CK2 darstellen. Derzeit sind lediglich zwei Membranproteine des ER bekannt, die als Substrate der CK2 fungieren. Kathryn Taylor entdeckte mit dem Zinkkanal ZIP7 einen in der ER-Membran lokalisierten Ionenkanal, über welchen mittels CK2-Phosphorylierung die Zink-Freisetzung ins Zytoplasma gesteuert wird. Die Phosphorylierung des ZIP7-Kanals erfolgt innerhalb weniger Minuten nach Erhöhung der zytoplasmatischen Zink-Konzentration [91]. Diese Ergebnisse sind aber kritisch zu bewerten, denn nach heutigem Wissensstand existieren keine freien Zink-Ionen in der Zelle [150]. Weshalb die CK2 die Zinkfreisetzung aus dem ER reguliert, konnte nicht geklärt werden. Denkbar wäre, dass durch den zytoplasmatischen Zinkanstieg die Bildung des CK2-Holoenzym begünstigt wird. Cochet *et al.* identifizierten bei strukturellen Analysen der CK2 β -Untereinheit ein Zink-Finger-Motiv, welches für die Dimerisierung der CK2 β -Untereinheiten essentiell ist [79]. Die Arbeitsgruppe um Litchfield bestätigte die Hypothese. Sie konnten auf zellulärer Ebene zeigen, dass Zinkfingermutanten weder in der Lage waren, ein CK2 β -Dimer zu bilden noch mit den katalytischen Untereinheiten CK2 α oder CK2 α' zu interagieren [151]. Unsere Arbeitsgruppe identifizierte mit ERj1 ein weiteres ER-Membranprotein als Substrat der CK2. Allerdings konnte die Funktion der Phosphorylierung nicht geklärt werden. Auch die grundsätzliche Funktion von ERj1 ist noch nicht vollständig erforscht. Es wurde von Blond *et al.* gezeigt, dass humanes ERj1 die Funktion von Sec63p in Hefen vollständig ersetzen kann [17]. Zudem konnte eine direkte Assoziation von ERj1 mit Ribosomen nachgewiesen werden. Es scheint somit ähnliche Funktionen wie Sec63p im Transloconkomplex der Hefen auszuüben. Über die biologische Funktion der CK2-Phosphorylierung von ERj1 kann bisher nur spekuliert werden. Die Autoren nehmen an, dass die CK2-Phosphorylierung von ERj1 möglicherweise Einfluss auf die Ribosomenanbindung ausübt oder die Translokation von Proteinen über die ER-Membran beeinflusst. Ein solches Szenario wurde bereits für Sec63p in Hefen beschrieben. In *Saccharomyces cerevisia* sind der Translokations-Mechanismus und die dazu gehörigen Proteine gut charakterisiert. Der Sec-Komplex besteht aus dem Kanal-bildenden Protein Sec61p, welches wiederum aus drei Untereinheiten (Sec61p α , Sec61p β und Sec61p γ) aufgebaut ist, sowie den Proteinen Sec62p und Sec63p. Dabei interagiert der C-terminale, negative Bereich des Sec63p direkt mit dem N-terminalen positiven Bereich des Sec62p [152]. Sec63p ist, wie humanes

ERj1 ein DnaJ Protein. Diesen Proteinen ist gemeinsam, dass sie über ihre J-Domäne ER-luminale Chaperone, zur Unterstützung der Translokation eines Proteins durch die ER-Membran rekrutieren können [10, 153]. Johnsson *et al.* konnten zeigen, dass die Interaktion zwischen Sec63p und Sec62p abhängig von der Phosphorylierung des Sec63p ist. Als verantwortliche Kinase, für die Phosphorylierung des Sec63p identifizierten die Autoren die Proteinkinase CK2. Dabei machten die Autoren eine interessante Entdeckung: Die Phosphorylierung von Sec63p erhöht nicht nur die Bindung an Sec62p, sondern ist auch für die Translokation von Proteinen über die ER-Membran notwendig. Das Einfügen eines Alanins, anstelle der Aminosäuren Threonin 652 und 654 in der Polypeptidkette von Sec63p, äußerte sich in einer verminderten Translokation über die ER-Membran [124]. Bei Säugern ist der Proteintransport über die ER-Membran weitaus weniger gut untersucht. Dies ist damit zu begründen, dass im Säuger ein ausschließlich kotranslational verlaufender Proteintransport zu existieren scheint [154]. Zudem unterscheiden sich die einzelnen Proteine des Translokationskomplexes im Säuger teilweise von denen in der Hefe. Vor allem Sec63 nimmt hierbei eine exponierte Stellung ein. Sec63p der Hefe *Saccharomyces cerevisia* ist ein essentieller Bestandteil des Translokationskomplexes, was auch lange Zeit von humanem Sec63 angenommen wurde. Dies beruht darauf, dass es in der polyzystischen Lebererkrankung (ADPLD) zur Akkumulation und Degradation des Sec63-Vorläuferproteins kommt, ausgelöst durch Mutationen im Sec63-Gen [155]. Neuere *in vitro* Untersuchungen zeigten hingegen, dass ein Verlust von Sec63 weder mit einem anormalen Proteintransport noch mit Apoptose einhergeht. Allerdings spiegeln die Proteintransportstudien nur einen kleinen Teil aller zellulären Proteine wider. Somit besteht die Möglichkeit, dass gerade die für die Entstehung der ADPLD spezifischen Proteine, gegenwärtig noch nicht identifiziert sind. Humanes Sec63 durchspannt, wie das Sec63p der Hefe, dreimal die ER-Membran, wobei der N-Terminus im Zytosol und der C-Terminus im ER-Lumen lokalisiert sind. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Zimmermann demonstrierten, dass die negative N-terminale Region für eine Interaktion mit Sec62 notwendig ist [12]. Die große Homologie der Primärstruktur zu Sec63p und die Möglichkeit Komplexe mit Sec62 zu bilden, deutete darauf hin, dass die CK2, ebenfalls wie in Hefen, auch an der humanen Sec63/Sec62-Interaktion beteiligt ist. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in silico* Analysen von Sec63 (scansite.mit.edu) zeigten vier putative CK2-Phosphorylierungsstellen (Serin 574, Serin 576, Threonin 581 und Serin 748), dabei befindet sich Serin 748 in der stark negativ geladenen C-terminalen Region von Sec63 (Sec63C). Analysen bezüglich der Homologie zeigten, dass die putativen Phosphorylierungsstellen innerhalb der Säugetiere stark konserviert sind. Die anschließenden *in vitro* Phosphorylierungen von Sec63C, sowie den Sec63C-Fragmenten demonstrierten die Phosphorylierung durch das CK2-Holoenzym. Auf Grund der Nähe der putativen Phosphorylierungsstellen Serin 574, Serin 576 und Threonin 581 zueinander, konnte mit den Fragmenten keine Vorhersage getroffen werden, welche der drei putativen

Phosphorylierungsstellen *in vitro* phosphoryliert wird, beziehungsweise werden. Für eine Peptidfilteranalyse wurden daher Peptide, die jeweils fünfzehn Aminosäuren lang waren und je nur eine Phosphorylierungsstelle repräsentieren, synthetisiert. Schließlich konnten Serin 574 und Serin 576 als CK2-Phosphorylierungsstellen *in vitro* identifiziert werden. Im Oktober 2011 wurden von Phanstiel *et al.* eine *in vivo* Phosphorylierung von Sec63 bestätigt. Die Arbeitsgruppe untersuchte das gesamte humane Phosphoproteom von embryonalen Stammzellen sowie induzierten pluripotenten Stammzellen. Dabei fanden sie mittels MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation) eine Phosphatgruppe an Serin 748 in der Polypeptidkette von Sec63 ohne die verantwortliche Kinase zu identifizieren [156]. Abbildung 55 zeigt die, in der vorliegenden Arbeit, identifizierten CK2-Phosphorylierungsstellen in der Polypeptidkette von Sec63.

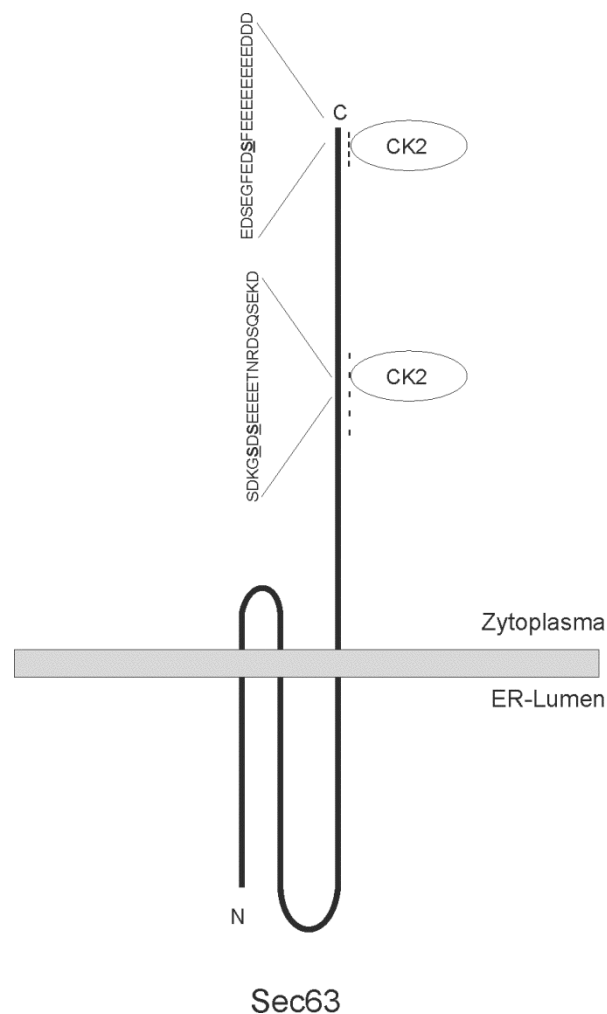


Abbildung 55: Schematische Darstellung des ER-Membranproteins Sec63. Die C-terminale Domäne von Sec63 ist auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert, wohingegen die N-terminale Domäne sich auf ER-luminaler Seite befindet. Die Aminosäuresequenz ist im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Die fettgedruckten und unterstrichenen Buchstaben repräsentieren die jeweiligen CK2-Phosphorylierungsstellen.

Weitere Untersuchungen von uns demonstrierten, dass Sec63 nicht nur ein Substrat der CK2 *in vitro* ist, sondern auch ein Interaktionspartner der CK2 *in vitro* darstellt. Die GST-„pull-down“-Experimente zeigten eine Bindung des CK2-Holoenzym an den C-terminalen Bereich des Sec63. Kolokalisationsstudien scheiterten auf Grund unspezifischer Signale in der Immunfluoreszenz-Analyse. Daher wurde Sec63, welches im Komplex mit Sec62 vorliegt, indirekt über dieses nachgewiesen. Die Kolokalisation beschränkte sich ausschließlich auf ER-Strukturen, die sich in direkter Nukleus-Nähe befinden. Weshalb die Kolokalisation in diesen Bereichen vorliegt ist schwierig zu analysieren. Denkbar wäre eine höhere Dichte an Translocon-Kanälen in diesem Bereich, wodurch es nur dort zu einer sichtbaren Kolokalisation kommt. Nachfolgend wurde die direkte Interaktion zwischen Sec63 und der CK2 analysiert. Die durchgeführten Koimmunpräzipitations-Experimente bestätigten die Ergebnisse der Kolokalisations-Experimente. Es konnte eine direkte Interaktion von Sec63 mit der CK2 α -Untereinheit gezeigt werden. Inwiefern eine Interaktion mit dem CK2-Holoenzym oder nur mit der CK2 α -Untereinheit *in vivo* stattfindet, konnte nicht geklärt werden. Dies ist auch nicht ohne weiteres möglich, da gegenwärtig nicht eindeutig geklärt ist, ob die CK2-Untereinheiten immer im CK2-Holoenzym komplexiert sind oder auch frei vorliegen können [80-82]. Dass in der vorliegenden Arbeit *in vivo* nur die CK2 α -Untereinheit nachgewiesen werden konnte, ist möglicherweise auf methodische Gründe zurückzuführen. Hierbei konnte eine verringerte Affinität des CK2 β Antikörpers für das Epitop ausschlaggebend gewesen sein.

Johnsson *et al.* stellten in ihren Experimenten eine verbesserte Bindung von Sec63p an Sec62p in Hefen fest, wenn Sec63p durch die CK2 phosphoryliert ist [124]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von humanem Sec63 an humanes Sec62 nach Phosphorylierung von humanem Sec63 durch die CK2 analysiert. Die *in vitro* GST-„pull-down“-Studien zeigten eine deutlich erhöhte Komplexbildung von Sec63 mit Sec62 nach Phosphorylierung von Sec63 durch das CK2-Holoenzym. Eine solche Auswirkung einer CK2-Phosphorylierung war bisweilen lediglich für den Transkriptionsfaktor Sp1 bekannt. So erniedrigt beispielsweise die Phosphatgruppe in der Polypeptidkette von Sp1 die Bindung an die DNA [157]. Ein Zellkultur-Modell diente zur Verifizierung der erniedrigte Bindung von Sec63 an Sec62 nach CK2-Inhibierung *in vivo*. Es konnte keine Änderung der Bindung zwischen Sec63 und Sec62 festgestellt werden, jedoch wurde eine erhöhte Menge an Sec62 und Sec63 nach CK2-Hemmung detektiert. Dieser erhöhte Proteingehalt an Sec62 und Sec63 hängt möglicherweise mit der Variabilität des ER-Volumens zusammen. Ein Anstieg der ER-luminalen Proteine ist aus dem Bereich der Immunologie bekannt. Dort kommt es während der Differenzierung von inaktiven B-Zellen zu reifen sekretorischen Plasmazellen zu einem drastischen Anstieg von BIP (GRP-78) und weiteren Chaperonen, was die Volumenvergrößerung des ER begründen soll [158]. Die essentielle Rolle der UPR bei einer eventuellen ER-Volumenvergrößerung demonstrierten „knockout“-Experimente mit den, für die UPR-Induktion notwendigen, Komponenten IRE1 und XBP1.

Hierbei stellte sich heraus, dass die Zellen nicht in der Lage waren die ER-Homöostase aufrechtzuerhalten [159]. Wie es im Detail zu einer ER-Membranvergrößerung kommt ist jedoch noch völlig unklar. Ein möglicher Ansatzpunkt kommt von der Arbeitsgruppe um Shaffer. Sie fanden heraus, dass XBP1 zur Biogenese und Größe der Zellorganellen beiträgt [160]. Weitere Studien, bezüglich ER-Stress und ER-Vergrößerung, wurden von Schuck *et al.* durchgeführt. Sie konnten als erste einen direkten Zusammenhang zwischen der UPR und der Vergrößerung des ER ausfindig machen. Dabei wurde endogenes Sec63p durch ein GFP-fusioniertes Sec63p ersetzt und somit die Zunahme an Sec63 nach ER-Stress verfolgt [126]. Über welchen Mechanismus ER-Stress letztendlich zur Expansion des ER führt konnte nicht geklärt werden, jedoch konnte eine Vergrößerung nach ER-Stress bestätigt werden. Zur Frage nach der biologischen Funktion der ER-Vergrößerung diskutierten die Autoren mehrere Möglichkeiten. Zum Beispiel könnte eine erhöhte Toleranz gegenüber falsch gefalteten Proteinen erzeugt oder die Aggregation von Proteinen während ihrer Faltung reduziert werden [126]. Abbildung 56 zeigt zusammenfassend einen schematischen Überblick über die Lokalisierung der CK2 in der Zelle mit dem Focus auf das ER, sowie die Bindung der CK2 an in der ER-Membran lokalisierte Substrate.

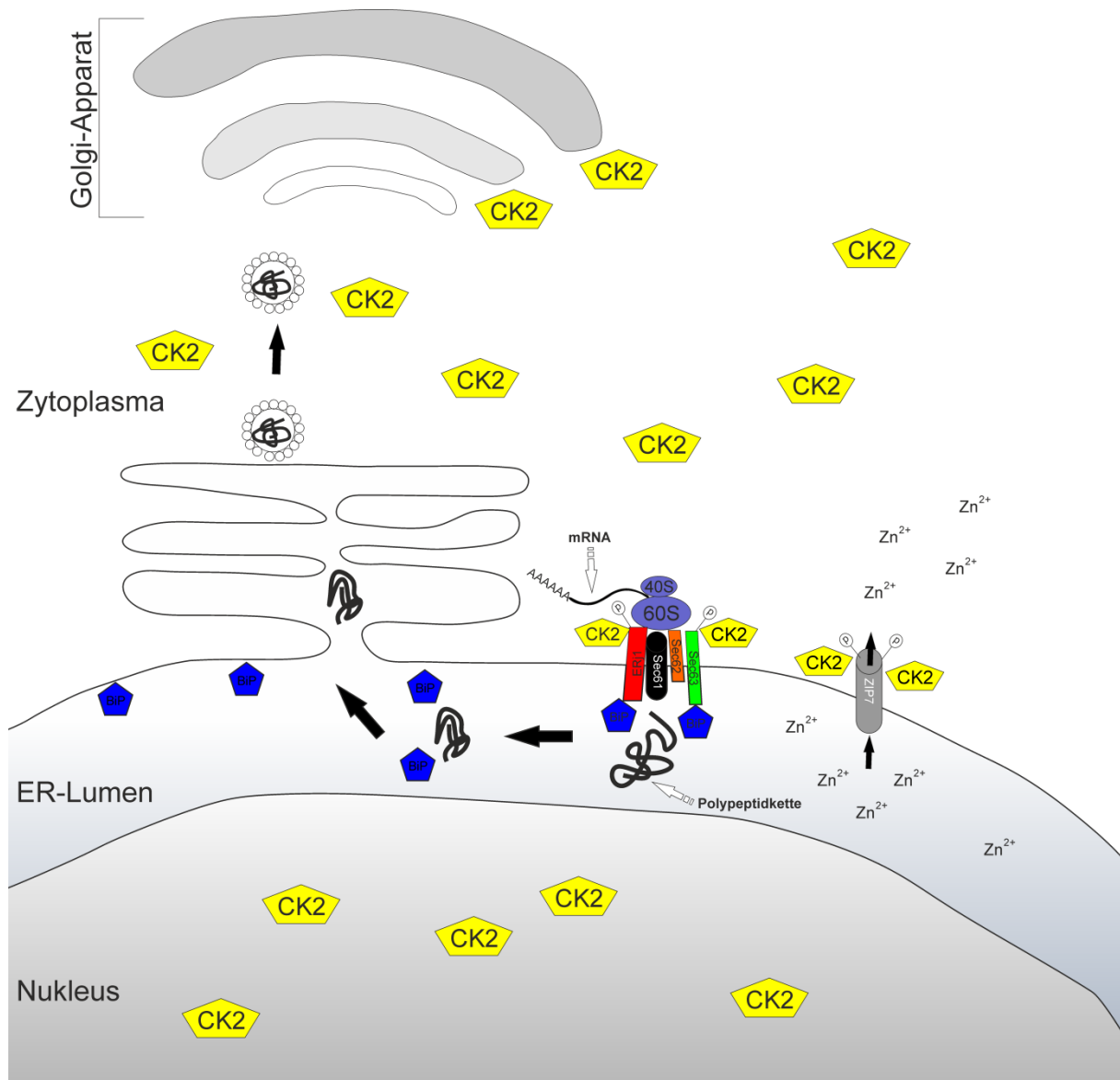


Abbildung 56: Schematischer Überblick über die Lokalisierung der CK2 in der Zelle und die Bindung der CK2 an die Substrate Sec63, ERj1 und ZIP7. Die Proteinkinase CK2 ist hauptsächlich im Zytoplasma und im Nucleus lokalisiert, allerdings konnte sie auch am Golgi-Apparat und am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert werden. Sec61, Sec62, Sec63 sowie ERj1 sind Komponenten des Translokationskanals. Die Ribosomen (40S/60S) binden an den Translokationskanal und translozieren die naszierende Proteinkette über die ER-Membran ins ER-Lumen. Im ER-Lumen unterstützt BiP die Translokation sowie die Faltung der Proteine. Anschließend werden die modifizierten Proteine über die Zisternen des ER zum Golgi-Apparat transportiert. Am Endoplasmatischen Retikulum konnten Sec63, ERj1 und ZIP7 als Substrate der CK2 identifiziert werden. Die Phosphorylierung von Sec63 erhöht die Bindung an Sec62, wohingegen die Funktion der Phosphorylierung von ERj1 durch die Proteinkinase CK2 nicht geklärt ist. Die Phosphorylierung von ZIP7 durch die CK2 erhöht die Zn^{2+} Konzentration im Zytoplasma.

Welche Funktion übernimmt nun die CK2 bei der Aufrechterhaltung der ER-Homöostase? Einen ersten Hinweis, dass die CK2 an der ER-Homöostase beteiligt ist zeigen Experimente in denen die CK2-Aktivität inhibiert wurde, wobei aber der zu Grunde liegende Mechanismus in diesen Studien nicht eindeutig geklärt werden konnte [69-71]. Die Phosphorylierung des Sec63 und seine

verbesserte Interaktion mit Sec62 könnte hierbei eine mögliche Rolle spielen. Für eine korrekte Translokation von Proteinen über die ER-Membran werden Chaperone benötigt. Eines dieser Chaperone ist BiP. Im Gegensatz zu ERj1, das in der Lage ist über seinen zytoplasmatischen Teil die Ribosomen und über seinen ER-luminalen Teil BiP zu binden, ist Sec63 lediglich in der Lage über seine J-Domäne BiP zu binden. Die Ribosomenbindung verläuft über Sec62. Zudem kann Sec63 nicht direkt Sec61 binden, sondern bindet es indirekt über Sec62. Unter Berücksichtigung dessen könnte ein Verlust der Sec63-Phosphorylierung die Affinität zu Sec62 verringern. Demzufolge könnte an Sec63 gebundenes BiP nicht mehr in die Nähe des Translokationskanals gelangen, was eine Störung der Translokation mit nachfolgender Induktion der UPR zur Folge haben könnte. Eine interessante Verknüpfung zwischen dem, durch CK2-Hemmung induzierten, ER-Stress und der Sec63/Sec62 Interaktion beziehungsweise der ER-Vergrößerung ergibt sich aus der Tatsache, dass eine CK2-Hemmung den BiP-Proteingehalt erniedrigt [71]. Nicht nur eine mögliche Delokalisation von BiP am Translokationskanal nach CK2-Hemmung wäre somit denkbar, sondern auch eine erniedrigte Expression von BiP selbst. Dass die Induktion der BiP-Expression direkt mit einem in der UPR ansässigen Protein verknüpft ist, konnten Lou *et al.* zeigen. In ihrer Arbeit demonstrierten die Autoren eine direkte Bindung von ATF4 an den BiP-Promotor. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von ATF4 die BiP-Expression reduziert [32]. Dies ist daher von Bedeutung, da in der vorliegenden Arbeit neben Sec63 auch ATF4 als Substrat der Proteinkinase CK2 identifiziert wurde.

Der Transkriptionsfaktor ATF4 wurde von unserer Arbeitsgruppe in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System als Bindungspartner der CK2 α -Untereinheit gefunden. Er gehört zur Familie der ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren, die eine Leucin-Zipper-Struktur ausbilden [161]. Die basische Zipper-Struktur dient zur DNA-Bindung und über die Leucin-Zipperdomäne können sowohl Homo- als auch Heterodimere ausgebildet werden. Als Konsensussequenz benutzen die ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren eine aus acht Basen bestehende CRE-Sequenz (TGACGTCA) [33]. Diese Sequenz ist häufig in Promotoren von Genen, die durch Hypoxie, Aminosäuremangel oder Stress induziert werden [34, 135, 162-164]. Aber auch in den Promotoren der ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren selbst, konnte die Konsensussequenz nachgewiesen werden [165]. Wie im Falle der CK2, so wurde auch für ATF4 in Tumorgewebe ein verändertes Vorkommen festgestellt. In hypoxischen Bereichen primärer Tumore wurde ein erhöhter ATF4-Proteingehalt beobachtet [55, 166]. Ferner wurde in Brustkrebs ein erhöhter Gehalt an phosphoryliertem ATF4 identifiziert [167]. Welche Aufgaben ATF4 in Tumorgewebe übernimmt und welche Signalwege dadurch beeinträchtigt werden, wird zurzeit von vielen Arbeitsgruppen untersucht. ATF4 ist ein multiphosphoryliertes Protein, wobei die Phosphorylierungen in den unterschiedlichen Geweben verschiedene Aufgaben übernehmen [48, 49, 168]. So wurden bei Untersuchungen des „cowry lowry Syndroms (CLS)“ die

Phosphorylierung von ATF4 an Serin 245 und Serin 251 durch die RSK2 als essentieller Bestandteil der Osteoblasten-Differenzierung entdeckt. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der ATF4-Phosphorylierung durch die RSK2 zur Entstehung des CLS beiträgt [47]. Aber nicht nur die transkriptionelle Aktivität wird durch Phosphorylierungen von ATF4 reguliert, sondern auch dessen Halbwertszeit. Lassot *et al.* machten dazu erste Untersuchungen und fanden mit Serin 219 eine für die Modulation der Degradation benötigte Phosphorylierungsstelle in der Polypeptidkette von ATF4 [49]. 2010 wurden weitere Phosphorylierungsstellen identifiziert und deren Auswirkung auf die neuronale Entwicklung untersucht [48]. Abbildung 57 zeigt die bisher bekannten Phosphorylierungsstellen in der Polypeptidkette von ATF4.

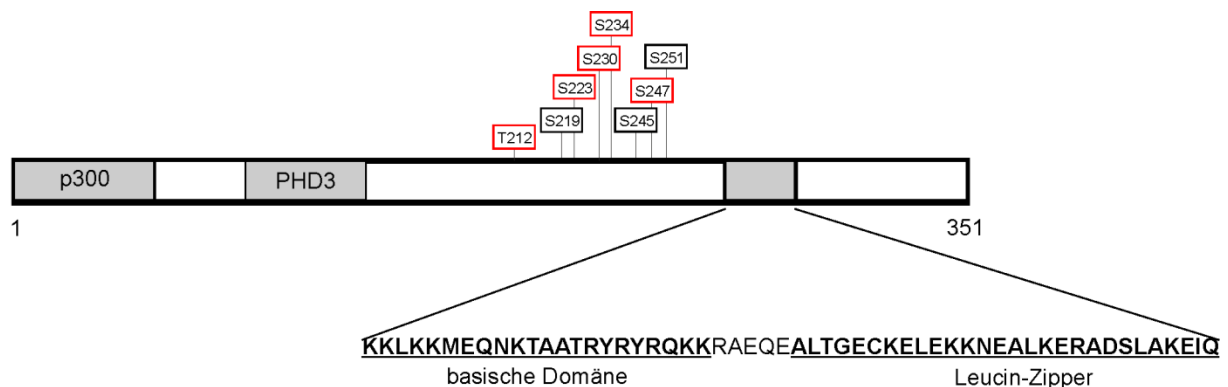


Abbildung 57: Schematische Darstellung der ATF4-Polypeptidkette mit den bisher bekannten Phosphorylierungsstellen. Grau hinterlegt sind die Interaktionsdomänen mit den Proteinen p300, PHD3 sowie die basische Domäne und die Leucin-Zipper-Domäne. Rot umrahmt sind die Phosphorylierungsstellen, die in der Maus identifiziert wurden. Schwarz umrahmt sind die Phosphorylierungsstellen, welche im Menschen identifiziert wurden.

ATF4 ist eine zentrale Komponente im ER-Stress Signalweg (UPR). Unter nicht-gestressten Bedingungen ist der ATF4-Proteingehalt sehr gering. Kommt es allerdings durch Aminosäuren-Depletion, Hypoxie, Temperaturerhöhung oder oxidativen Stress zu fehlerhafter Proteinfaltung, so wird über Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor α (eIF2 α) die allgemeine Proteinsynthese reduziert. Ungeachtet dessen wird ATF4 über einen einzigartigen Mechanismus, bestehend aus drei „upstream open reading frames“ (uORF), weiter translatiert. Der damit verbundene erhöhte ATF4-Proteingehalt führt zur Aktivierung unterschiedlicher Zielgene, die zur Überwindung des Stresses benötigt werden, oder gegebenenfalls die Apoptose induzieren.

Als erstes wurden in der vorliegenden Arbeit die CK2-Phosphorylierungsstellen in der Polypeptidkette von ATF4 identifiziert. An Hand der *in silico* Phosphorylierung konnten zwölf putative Phosphorylierungsstellen ausfindig gemacht werden (scansite.mit.edu). Durch die anschließenden *in vitro* Phosphorylierungs-Experimente mit dem CK2-Holoenzym, konnten die Phosphorylierungsstellen auf Serin 215 eingegrenzt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der katalytischen CK2-Untereinheiten, beispielsweise in Regionen des

menschlichen Gehirns [169], wurde untersucht, ob ATF4 ein Substrat von nur einer der katalytischen CK2-Untereinheiten, CK2 α oder CK2 α' , oder beiden ist. Es zeigte sich, dass Serin 215 sowohl von dem CK2-Holoenzym, als auch von beiden katalytischen CK2-Untereinheiten phosphoryliert werden kann. Vor dem Hintergrund, dass über die Existenz der katalytischen CK2 α -Untereinheit und CK2 α' -Untereinheit als freie in der Zelle fungierende Enzyme seit langem diskutiert wird [80-82], wurde analysiert, in wie weit die Zugabe der regulatorischen CK2 β -Untereinheit, zu den katalytischen Untereinheiten, die Phosphorylierung von ATF4 an der Stelle Serin 215 positiv beeinflusst. Die *in vitro* Phosphorylierungsexperimente demonstrierten, dass es nach Zugabe der CK2 β -Untereinheit zu einer deutlich erhöhten Phosphorylierung des ATF4 kommt. Daraus konnte geschlossen werden, dass ATF4 *in vitro* zwar auch von den einzelnen katalytischen Untereinheiten phosphoryliert werden kann, bevorzugt aber von dem CK2-Holoenzym phosphoryliert wird. Um Substrate der CK2 besser zuordnen zu können, unterteilten Pinna *et al.* die Substrate der CK2 in drei verschiedene Klassen. Klasse I sind Substrate, die von den freien katalytischen Untereinheiten CK2 α und CK2 α' phosphoryliert werden, jedoch besser vom CK2 Holoenzym phosphoryliert werden. Klasse II Substrate werden ausschließlich von den freien katalytischen Untereinheiten CK2 α und CK2 α' phosphoryliert. Klasse III Substrate werden von den freien katalytischen Untereinheiten CK2 α und CK2 α' nur in Gegenwart der regulatorischen CK2 β -Untereinheit phosphoryliert [170]. Unter Berücksichtigung dieser Klassifizierung kann ATF4 als Substrat der Klasse I angesehen werden.

Eine Möglichkeit, Funktionen eines Proteins direkt zu regulieren, ist die Kombination mehrerer Phosphorylierungen durch verschiedene Kinasen, was als Synergie bezeichnet wird. Der Transkriptionsfaktor CREB, welcher zur selben Familie wie ATF4 gehört, wird über synergistische Phosphorylierungen reguliert. Dabei wird CREB durch die Kinasen CK1 und CK2 phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen sind nachfolgend wiederum für die Phosphorylierung durch die ATM-Kinase notwendig [96]. Ein solcher Regulationsmechanismus wäre auch für ATF4 denkbar, da es wie CREB, ein multiphosphoryliertes Protein darstellt. Insofern könnte die Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2 an Serin 215 Einfluss auf die Phosphorylierungsstelle Serin 219 nehmen. Die Arbeitsgruppe um Frank konnte mit den CK1-Isoformen δ und ϵ , die für die Serin 219-Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen identifizieren [48]. Basierend auf den Ergebnissen von Frank *et al.* wurde in dieser Arbeit mittels *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten der Einfluss der CK2-Phosphorylierung von ATF4 auf die Phosphorylierung von ATF4 durch die CK1 ϵ untersucht. Jedoch konnte diesbezüglich kein synergistischer Effekt zwischen den beiden Phosphorylierungsstellen ermittelt werden.

Aufgrund der Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems, in dem ATF4 als Bindungspartner der CK2 α -Untereinheit gefunden wurde, sollte als nächstes analysiert werden, ob ATF4 auch ein Bindungspartner der CK2 *in vitro* als auch *in vivo* ist. Die Experimente bezüglich der Bindung von ATF4

an die CK2 legten dar, dass ATF4 ein Substrat und auch ein Bindungspartner der CK2 ist. Die *in vitro* Bindungsstudien, die mittels „pull-down-assay“ durchgeführt wurden, demonstrierten, dass sowohl ATF4 als auch die Alanin-Mutante von ATF4 an das CK2-Holoenzym binden. Allerdings konnte zuvor, in den Untersuchungen der Substrateigenschaft von ATF4 gezeigt werden, dass die CK2 α - und CK2 α' -Untereinheit ebenfalls in der Lage sind, ATF4 zu phosphorylieren. Inwiefern nun auch die katalytischen Untereinheiten an ATF4 und ATF4 S215A binden, wurde mit ELISA-basierten Bindungsstudien analysiert. Es konnte eine Bindung mit den Untereinheiten CK2 α und CK2 α' nachgewiesen werden, wobei sich die Bindung zwischen ATF4 und den katalytischen Untereinheiten als geringer erwies als zwischen ATF4 und dem CK2-Holoenzym. Dies korreliert mit den Ergebnissen der *in vitro*-Phosphorylierung und bekräftigen die Vermutung, dass ATF4 *in vivo* von dem CK2-Holoenzym phosphoryliert wird. Dennoch ist eine Bindung *in vitro* ist noch lange kein Garant für eine Bindung *in vivo*. Zu viele störende Effekte können eine Bindung *in vivo* beeinflussen, angefangen bei Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine über zu zellulären Kompartimentsgrenzen, die eine Bindung verhindern können. Allerdings ließ sich für ATF4 und die CK2 auch eine Bindung *in vivo* nachweisen. Auch hier zeigte sich, dass sowohl ATF4 als auch die Alanin-Mutante ATF4 S215A an die CK2 binden. Die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien demonstrieren eindeutig, dass die Bindung und Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2 zwei voneinander unabhängige Ereignisse sind.

Nachdem die Bindung von ATF4 mit der Proteinkinase CK2 *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden konnte, wurde analysiert, in welchem Kompartiment es zur Bindung zwischen ATF4 und der CK2 kommt. ATF4 ist hauptsächlich im Nukleus lokalisiert. Thiel *et al.* fanden zwei Cluster aus basischen Aminosäuren (Aminosäuren 280-284 und 296-300), die zur effizienten Translokation in der Zellkern benötigt werden [171]. Dagegen ist die Proteinkinase CK2 in der ganzen Zelle zu finden, lediglich zelluläre Faktoren und Bindungspartner können die Lokalisation der CK2 beeinflussen [127]. Zudem konnte eine Assoziation der CK2 mit dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden [107]. Immunfluoreszenzuntersuchungen gaben erste Hinweise darauf, dass ATF4 und die CK2 α -Untereinheit im Nukleus kolokalisiert sind. Mit der BiFC-Analyse wurde anschließend die direkte Protein/Protein-Interaktion analysiert. Zu Grunde liegt dieser Methode, dass zwei unterschiedliche Fragmente eines fluoreszierenden Proteins, beispielsweise des „yellow fluorescent protein“ (YFP), an zwei zu untersuchende Proteine fusioniert werden. Neben der Interaktion von zwei Proteinen kann mit dieser Methode auch das Kompartiment der Interaktion lokalisiert werden [172-175]. Die Entstehung positiver BiFC-Signale in der Immunfluoreszenz ist von mehreren Parameter abhängig: (i) Transfektionseffizienz, (ii) Expression der Fusionsproteine, (iii) räumliche Nähe der Fusionsproteine, (iv) posttranslationale Modifikationen, sowie (v) die Ausbildung der nativen Konformation des YFP [176]. Die Interaktion der CK2 α -Untereinheit und CK2 β -

Untereinheit wurde von Laudet *et al.* bereits mittels BiFC-Methode analysiert [130]. Die Generierung und Expression der BiFC-ATF4-Konstrukte verlief erfolgreich, allerdings lieferten die nachfolgenden BiFC-Analysen nur in einer Kombination ein positives Signal für eine Interaktion beider Proteine. Zudem zeigten nur wenige Zellen ein positives Fluoreszenzsignal. Möglicherweise beeinflussen einige, der zuvor erwähnten Parameter die Entstehung positiver BiFC-Signale.

Die ersten in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente bezüglich der biologischen Funktion der CK2-Phosphorylierung von ATF4 betrafen die subzelluläre Lokalisation. Posttranslationale Modifikationen, vor allem Phosphorylierungen, können das Wandern von Proteinen zwischen zellulären Kompartimenten beeinflussen. Mehrere Substrate der CK2 sind bekannt, bei denen durch Phosphorylierung die zelluläre Lokalisation reguliert wird. Die Inositol-Phosphat-Multikinase wird zum Beispiel an Serin 248 phosphoryliert, wodurch eine zytoplasmatische Lokalisation begünstigt wird [131]. Hingegen kann für den Transkriptionsfaktor Nrf2 eine verstärkt nukleäre Lokalisation nach Phosphorylierung durch die Proteinkinase CK2 beobachtet werden [95]. Transkriptionsfaktoren wie ATF4 sind hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Eine nukleäre Lokalisation von ATF4 und eine Interaktion mit β TrCP im Nukleus wurde bereits beschrieben [49, 171]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten keine Änderung der subzellulären Lokalisation durch Verlust der Phosphorylierung. Allerdings wurden mehrere ATF4 S215A positive Zellen detektiert, als ATF4 positive. Auch die darauffolgenden Westernblot-Analysen demonstrierten einen erhöhten ATF4 S215A Proteingehalt im Vergleich zu ATF4.

Eine häufige Konsequenz von Phosphorylierungen ist die Modifizierung einer, für die Ubiquitylierung durch β TrCP wichtigen, Sequenz (DSGXXS). Das F-Box-Protein β TrCP ist ein Substrat-Erkennungs-Faktor des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Durch Bindung an phosphoryliertes Serin in der Konsensussequenz kommt es zur Interaktion von β TrCP mit dem Substrat. Dies begünstigt anschließend die proteasomale Degradation [177-181]. Etliche Proteine, die über diesen Mechanismus abgebaut werden, sind bereits identifiziert. Lassot *et al.* entdeckten solch eine Konsensussequenz auch in der Polypeptidkette von ATF4 (Serin 219), konnten die dazu gehörige Kinase jedoch nicht identifizieren [49]. Erst einige Jahre später zeigten Untersuchungen, dass Serin 219 von den CK1 Isoformen CK1 δ und CK1 ϵ phosphoryliert wird [48]. Daher lag die Vermutung nahe, dass der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 zu einer Stabilisierung dessen führt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Stabilität mittels Cycloheximid demonstrierten, dass der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 zu einer Erhöhung der Stabilität führt. Die Stabilität von ATF4 wurde schon in mehreren Arbeiten mittels Cycloheximid bestimmt [48, 49]. Allerdings ist diese Methode bei Proteinen des UPR-Signalweges eher kritisch zu beurteilen, da bekannt ist, dass Cycloheximid sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die

Transkription haben kann [182, 183]. Im Falle von ATF4 konnten Talukter *et al.* zeigen, dass eine Cycloheximid-Behandlung den mRNA-Gehalt von ATF4 drastisch erhöht [183]. Um auszuschließen, dass Cycloheximid nicht auch auf Proteinebene Einfluss auf die ATF4-Stabilität nimmt, wurde die Stabilität zusätzlich mittels „pulse-chase“ Markierung mit [³⁵S]-Methionin bestimmt. Auch mit dieser Methode konnte eine Stabilisierung des ATF4 nach Verlust der Phosphorylierung an Serin 215 detektiert werden.

Ob die Phosphorylierung oder lediglich eine negative Ladung für die geringe Stabilität von ATF4 verantwortlich ist wurde mit einer phosphomimetischen Mutante ATF4 S215D analysiert werden. Die Mutante zeigte in ersten Überexpressionsexperimenten einen im Vergleich zu ATF4 erniedrigten Proteingehalt. Die durchgeführten Stabilitätsstudien zeigten allerdings, dass das Einfügen der sauren Aminosäure Aspartat an Stelle des Serins 215 zu einem, im Vergleich zum Wildtyp, erniedrigten Proteingehalt führt. Zudem war nur ein geringer Rückgang in der Stabilität zu verzeichnen. Es ist häufiger zu beobachten, dass Aspartat (D)-Mutanten sich in ihrer Funktion nicht wie Wildtyp-Proteine verhalten [184]. Die phosphomimetische Mutante S269D des p53 zeigt ganz andere Eigenschaften als Wildtyp-p53, wobei die Funktion eher mutiertem p53 ähnelt [185]. Chandrasekaran *et al.* beschäftigten sich in ihrer Arbeit mit der Phosphorylierung von Cdt1, einem für die Replikation wichtigen Protein. Sie konnten zeigen, dass die D-Mutante eine weitaus höhere Stabilität aufweist als Wildtyp-Cdt1, jedoch in seiner Funktion, im Vergleich zu Cdt1, vermindert war. Sie schlossen daraus, dass Stabilisierung und Funktion zwei voneinander unabhängige Prozesse seien [186]. In welcher Form ATF4 zellulär vorliegt, geht aus den Experimenten nicht hervor. Denkbar wäre eine Mischpopulation aus phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem ATF4. Fakt ist, dass ATF4 unter nicht-gestressten zellulären Bedingungen nur in geringer Konzentration vorliegt und die Induktion von ER-Stress innerhalb weniger Stunden zu einem Anstieg des ATF4-Proteingehalts führt [187]. Das legt die Vermutung nahe, dass die Zelle durch ein Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen innerhalb kürzester Zeit den Proteinlevel von ATF4 erhöhen kann, bevor die Protein-Neusynthese einsetzt.

Über den Signalweg der UPR werden nach ER-Stress Faktoren induziert, die das Überleben oder das Einleiten der Apoptose bestimmen. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits analysieren, dass es in der humanen Prostatakrebszelllinie LNCaP nach Hemmung der CK2 zur Induktion der Apoptose kommt [69]. Ferner konnte von uns gezeigt werden, dass es in Folge der CK2-Hemmung, mit nachfolgender Apoptose-Induktion, zu einem erhöhten ATF4- und CHOP-10-Proteingehalt kommt [69, 70]. Auch die Arbeitsgruppe um Galehdar demonstrierte in ihren Studien zur neuronalen Apoptose, dass sowohl ATF4 als auch CHOP-10 zur Einleitung der Apoptose benötigt werden. Ebenfalls konnte von ihnen eine erhöhte Transkription von PUMA, einem zur Unterfamilie der Bcl-2-Proteine gehörendem

Protein, detektiert werden [51]. Unklar ist jedoch, inwiefern ATF4 in die durch CK2-Hemmung induzierte Apoptose involviert ist. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Alanin-Mutante ATF4 S215A eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu ATF4 hat. Um eine Stabilisierung von endogenem ATF4 durch den Verlust der CK2-Phosphorylierung zu überprüfen, wurde die CK2-Kinaseaktivität mittels zwei spezifischer Inhibitoren gehemmt: Quinalizarin [125] und TBB [137]. Beide Inhibitoren besitzen eine hohe Spezifität, jedoch zeigen sie unterschiedliche Auswirkungen auf weitere getestete Kinasen [125, 137]. Durch die Anwendung von zwei spezifischen Hemmstoffen wird die Wahrscheinlichkeit einer CK2-spezifischen Funktion erhöht. Auch nach Hemmung der CK2-Kinaseaktivität konnte ein erhöhter Proteingehalt von endogenem ATF4 detektiert werden. Der erhöhte ATF4-Proteingehalt könnte jedoch auch das Resultat einer erhöhten *ATF4*-Genexpression sein. Berücksichtigt man, dass im UPR-Signalweg mehrere Substrate der CK2 bekannt sind, die sich „upstream“ von ATF4 befinden, so könnte eine Phosphorylierung dieser Substrate zur verstärkten *ATF4*-Genexpression führen. Die eukaryotischen Translations-Initiationsfaktoren stellen essentielle Komponenten der Translation dar und können, da sie die Translation direkt beeinflussen, als „upstream“-Faktoren von ATF4 angesehen werden. Innerhalb dieser eukaryotischen Translations-Initiationsfaktoren identifizierten Homma *et al.* den eukaryotischen Translation-Initiationsfaktor 5 (eIF5) als Substrat der CK2 [117]. In ihren Studien konnten sie zeigen, dass der Verlust der CK2-Phosphorylierung von eIF5 zu einer Zellzyklus-Progression führt. Des Weiteren könnte Sec63, das in der vorliegenden Arbeit als Substrat der CK2 identifiziert wurde als „upstream“-Faktor von ATF4 angesehen werden. Der Verlust der Sec63-Phosphorylierung könnte sich in einer gestörten Translokation der Proteine über die ER-Membran äußern, wodurch nachfolgend ER-Stress induziert werden könnte. Die Untersuchungen bezüglich der *ATF4*-Genexpression nach Einsatz der spezifischen Inhibitoren bestätigten den Verdacht, dass auch „upstream“ von ATF4 Substrate der CK2 Einfluss auf die ATF4-Expression nehmen. Neueste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die CK2-Hemmung zur Phosphorylierung von eIF2 α führt und nachfolgend die ATF4-Proteinexpression induziert wird (Doktorarbeit Tasja Sokolowsky; in Vorbereitung). Somit liegt der Verdacht nahe, dass die CK2-Hemmung zur Aktivierung von PERK führt. All diese Ergebnisse zeigen, dass zwei Mechanismen zur Erhöhung des ATF4-Proteinlevel beitragen. Zum einen die Stabilisierung, durch den Verlust der CK2-Phosphorylierung, und zum anderen eine gesteigerte Genexpression. Abbildung 58 zeigt schematisch die Wege, die zu einem erhöhten ATF4-Proteingehalt nach CK2-Hemmung führen könnten.

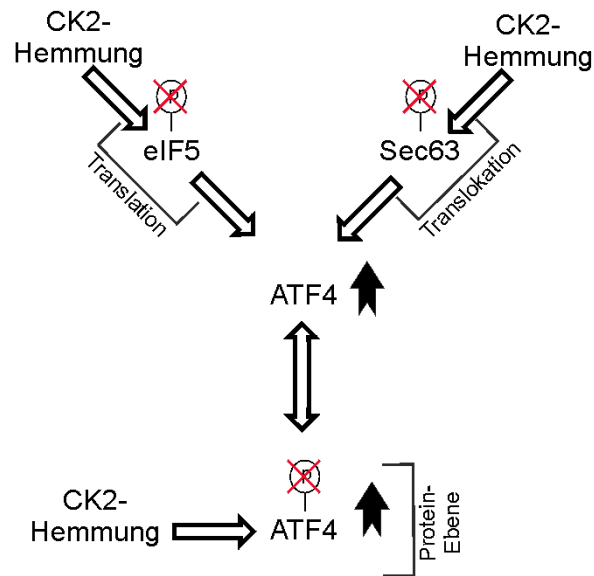


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Wege, die nach CK2-Hemmung zu einem erhöhten ATF4-Proteingehalt führen können. Der Verlust der CK2-Phosphorylierung von eIF5 führt zu einer Zellzyklusprogression, die zu einem erhöhten ATF4-Proteingehalt führen könnte. Auch eine Störung der Translokation von Proteinen über die ER-Membran auf Grund der nicht vorhandenen CK2-Phosphorylierung von Sec63 wäre denkbar. Auf Proteinebene führt der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 zu einer erhöhten Stabilität.

Denkbar wäre allerdings noch ein weiterer Mechanismus, welcher nach CK2-Hemmung den ATF4-Proteingehalt erhöht. 2002 wurde von Sempici *et al.* das Ubiquitin-konjugierende-Enzym UBC3 als Substrat der CK2 identifiziert. Hierbei begünstigt die CK2-Phosphorylierung von UBC3 die Interaktion mit β TrCP, das für die Erkennung und den Abbau phosphorylierter Proteine notwendig ist [188]. Die Autoren vermuten, dass der Komplex aus UBC3 und β TrCP notwendig für die Substraterkennung der F-Box Proteine ist. Folglich könnte die Hemmung der CK2-Aktivität zu einer verringerten Bindung zwischen UBC3 und β TrCP führen, wodurch an Serin 219-phosphoryliertes ATF4 vermindert abgebaut wird.

Der Einsatz von Inhibitoren ist unter den oben erwähnten Bedingungen kritisch zu sehen, denn es kann nicht garantiert werden, dass nicht auch noch weitere Kinasen inhibiert werden. Dies kann, wie in der vorliegenden Arbeit zum Teil umgangen werden, indem die Auswirkungen einer Hemmung an Hand von zwei Hemmstoffen überprüft wird. Allerdings ist auch hierbei ein unspezifischer Effekt nicht ganz auszuschließen. Auf den Einsatz von siRNA wurde vollständig verzichtet, denn dadurch wird nicht nur die Kinaseaktivität der CK2 reduziert, sondern auch die Proteinmenge der CK2. Gerade die Änderung des CK2-Proteingehaltes ist, für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit, nicht erwünscht, denn die CK2 reguliert auch zelluläre Funktionen nur über Protein-Protein-Bindung [189]. Eine spezifische Methode um die Aktivität der CK2 zu regulieren, ohne den Proteingehalt der CK2 selbst oder die Aktivität anderer Kinasen zu beeinflussen, ist die Verwendung von dominant-negativen Mutanten. Im Falle der CK2 wurde eine Punkt-Mutation (Lysin zu Methionin) in der ATP-

Bindedomäne der katalytischen CK2 α - und CK2 α' -Untereinheiten eingefügt, was ihre Kinaseaktivität drastisch reduziert [170]. ATF4 wird sowohl von der CK2 α -, der CK2 α' -Untereinheit als auch von dem CK2-Holoenzym phosphoryliert. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Kinaseaktivität mit Hilfe von beiden dominant-negativen Mutanten inhibiert. Auch hierbei zeigte die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mittels dominant-negativer Mutanten einen erhöhten ATF4-Proteingehalt. Dies bestätigt, dass die CK2 durch Phosphorylierung von ATF4 den Proteingehalt von ATF4 beeinflusst. Des Weiteren kann ausgeschlossen werden, dass die Bindung der CK2 an ATF4 eine regulatorische Bedeutung hat. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl nach Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mittels spezifischer Inhibitoren als auch unter Anwendung von dominant-negativen Mutanten der CK2 α - und der CK2 α' -Untereinheiten ein erhöhter ATF4-Proteingehalt identifiziert werden. Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mit Hilfe des spezifischen CK2-Inhibitors TBB die Proteinexpression von ATF4 in LNCaP-Zellen induziert [70]. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ATF4 eine zentrale Rolle für die Signaltransduktion nach CK2-Hemmung spielt.

Die Phosphorylierung von ATF4 durch die Proteinkinase CK2 äußert sich in einer erhöhten Stabilität. Völlig unklar ist jedoch, inwiefern die Stabilisierung Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität nimmt. Ein aktivierender beziehungsweise reprimierender Effekt von ATF4 auf bestimmte Zielgene ist hinreichend untersucht. ATF4 begünstigt beispielweise die Transkription von TRB3, Parkin, Snat1, FGF21, CHOP-10 und ATF3 [31, 33, 36, 164, 190, 191] und übt auf die Transkription von Enkephalin, Chromogranin B und Secretogranin II einen hemmenden Effekt aus [28-30]. Auch ein zeitlicher Verlauf der aktivierenden bzw. reprimierenden Wirkung der ATF4-Bindung wurde für den Asparaginsynthetase-Promoter gezeigt [24]. 1997 beschrieb die Arbeitsgruppe um Liang, dass ATF4 Mengen-abhängig einen aktivierenden oder reprimierenden Effekt auf Zielgene haben kann („squelching“) [139]. Dieses Phänomen wurde für ATF4 und dessen Mutanten an Hand des Promoters (2xAARE-Luc.) überprüft werden. Allerdings konnte weder für ATF4 noch für die ATF4-Mutanten dieser Effekt nachgewiesen werden. Das kann damit zusammenhängen, dass das von Liang benutzte Reportergenkonstrukt drei artifizielle ATF-Bindestellen, sowie eine E1B-TATA Box besitzt, wohingegen das in der vorliegenden Arbeit benutzte 2xAARE-Luc.-Reportergenkonstrukt das „amino acid response“-Element (19 bp) des CHOP-10-Promotors besitzt. Beide Promotoren unterscheiden sich auf Grund ihrer Nukleotidsequenz und dienen nicht nur ATF4, sondern auch noch weiteren Transkriptionsfaktoren, als Bindestelle. Somit könnten an das von Liang *et al.* benutzte Reportergenkonstrukt, in Abhängigkeit von der ATF4-Proteinmenge, weitere Transkriptionsfaktoren binden, die einen reprimierenden Effekt ausüben.

Schon 1996 wurde von Thiel *et al.* für ATF4 eine Zellsystem-abhängige transkriptionelle Aktivität beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des „cAMP enhancer element“ (CRE), an welches Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB Familie binden, abhängig ist von der benutzten Zelllinie [28]. Beispielsweise ist CREB in der Lage, mit anderen Mitgliedern der ATF/CEBP Familie, Heterodimere zu bilden. Folglich ist die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren ein essentieller Punkt in der Regulation von Genen. Montminy *et al.* zeigten, dass cAMP die Aktivierung der *Somastatin*-Gen-Transkription in PC12-Zellen aktiviert [192], wohingegen in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie die Aktivierung unterbleibt [193]. Auf Grund der Tatsache, dass ATF4 als Repressor und Aktivator fungieren kann und dies möglicherweise von gewebsspezifischen Interaktionspartnern abhängig ist, wurden drei Tumorzelllinien aus unterschiedlich stammenden Geweben zur transkriptionellen Analyse der ATF4-Aktivität herangezogen: HeLa (epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie), HepG2 (hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie) und HCT-116 p53^{+/+} (Kolonkarzinom-Zelllinie). Zur Analyse der transkriptionellen Aktivität wurden in dieser Arbeit die Reporterengenkonstrukte 5'UTR ATF3-Luc. und 2XAARE-Luc verwendet. Kilberg *et al.* konnten nach Analysierung der ATF3-Promoterregion sowohl eine Aktivierung des Promoters durch ATF4, als auch eine Bindung von ATF4 an den Promoter feststellen. Dabei erstreckt sich die ATF4-Bindungsstelle über den Bereich der Nukleotide -93 bis -15 [50]. Für beide Reporterengenkonstrukte (5'UTR ATF3-Luc. und 2XAARE-Luc.) konnte nach Überexpression von ATF4 und den ATF4-Mutanten in allen drei Zelllinien eine erhöhte Luciferaseaktivität gemessen werden. Allerdings zeigte die Alanin-Mutante ATF4 S215A eine, im Vergleich zu ATF4-Wildtyp, deutlich reduzierte Luciferaseaktivität. Daraus lässt sich schließen, dass der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 die transkriptionelle Aktivität von ATF4 drastisch erniedrigt. Zudem zeigten beiden Reporterengenkonstrukte untereinander verschieden starke Luciferaseaktivitäten. Für das 2XAARE-Luc.-Reporterengenkonstrukt wurden zehnfach höhere Werte gemessen als für das 5'UTR ATF3-Luc.-Reporterengenkonstrukt. Dies ist möglicherweise auf die Größe der beiden Reporterengenkonstrukte zurückzuführen. Das Reporterengenkonstrukt 5'UTR ATF3-Luc. repräsentiert einen ausgesprochen großen Promotorbereich (-1850 bis +34) und dient somit noch weiteren Transkriptionsfaktoren als Bindestelle, die einen aktivierenden oder reprimierenden Effekt auf die Genexpression haben können. Das Reporterengenkonstrukt 2XAARE-Luc. besteht nur aus wenigen Nukleotiden und dient überwiegend Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB-Familie als Bindestelle. Keine Korrelation konnte zwischen dem ATF4-Proteingehalt und der Luciferaseaktivität der Reporterengenkonstrukte festgestellt werden. Obwohl der Proteingehalt der Alanin-Mutante ATF4 S215A im Vergleich zum Proteingehalt von ATF4 deutlich erhöht ist, zeigt ATF4 S215A im Vergleich zu ATF4 eine reduzierte Luciferaseaktivität. Folglich ist die Beeinflussung der Stabilität von ATF4-Wildtyp durch die CK2-Phosphorylierung unabhängig von der transkriptionellen Funktion des ATF4. Die Ergebnisse in dieser Arbeit ähneln denen von Frase

und Chandrasekaran, die sich in Ihren Arbeiten ebenso mit der Stabilität und Funktion von Proteinen nach Phosphorylierung beschäftigt haben. Auch sie schlussfolgerten, dass eine geänderte Stabilität in Folge einer Phosphorylierung nicht direkt Auswirkung auf die Funktion haben muss [185, 186]. Ebenfalls zeigten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reporterstudien keine Korrelation zwischen Promotoraktivität der Gene *ATF3* und *CHOP-10* und dem dazugehörigen Proteingehalt nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten. Das komplizierte Netzwerk der UPR, in dem sich Transkriptionsfaktoren gegenseitig beeinflussen, kann dazu führen, dass Reporteranalysen, gerade unter Benutzung artifizierender, kurzer Reportergenelemente nicht mit den Proteinexpressionen korrelieren. Dies könnte auch in der vorliegenden Arbeit der Grund gewesen sein, weshalb es trotz erhöhter Luciferaseaktivität des Reportergenkonstrukts 2xAARE-Luc. nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten zu keiner Proteinexpression von CHOP-10 gekommen ist. Diese Beobachtung ist daher kontrovers, da gerade ATF4 die Expression von CHOP-10 induziert [31, 36]. Interessanterweise konnte von Wolfgang *et al.* gezeigt werden, dass ATF3 in der Lage ist, die Expression von CHOP-10 zu reprimieren. Dies konnten die Autoren sowohl auf Reportergenebene als auch auf Proteinebene bestätigen [53]. Weiterhin könnte die Expression von CHOP-10 durch das „tribbles homolog 3“ (TRB3) unterdrückt sein. Studien demonstrierten eine direkte Interaktion von ATF4 und TRB3, wodurch die *CHOP-10*-Genexpression negativ beeinflusst wird. Hingegen übt TRB3 keinen Einfluss auf die ATF3-Expression aus [33, 194]. Besonders interessant sind die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe. Wir konnten bereits zeigen, dass die CK2-Hemmung die Expression von CHOP-10 in LNCaP-Zellen induziert, wohingegen die Expression in PC-3-Zellen unterbleibt [69]. Des Weiteren konnten wir demonstrieren, dass nach CK2-Hemmung in LNCaP-Zellen die Proteinexpression von CHOP-10 von ATF4 abhängig ist [70]. Somit kann ATF4 die Genexpression von *CHOP-10* begünstigen, allerdings existieren noch viele weitere Faktoren, welche die *CHOP-10*-Genexpression negativ regulieren. Eine Expression von ATF3 nach Überexpression von ATF4 konnte nachgewiesen werden. Allerdings existierte nur in den Zelllinien HeLa und HCT-116 p53^{+/+} ein erhöhter ATF3-Proteinlevel nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten. Eine Korrelation zwischen den ATF3-Reporteranalysen und dem endogenen ATF3-Proteingehalt war nicht ersichtlich. Gründe hierfür könnten zum einen der eingegrenzte Promotorbereich des ATF3-Reportergenkonstrukts sein, wobei möglicherweise auf genomischer Ebene weitere regulatorische Elemente im ATF3-Promoter liegen, zum anderen könnten auch posttranslationale Modifikation von ATF3 den Proteingehalt regulieren. Der grundsätzlich erhöhte ATF3-Proteingehalt, nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten in HCT-116 p53^{+/+} Zellen, könnte auch in Verbindung mit p53 stehen. Zhang *et al.* konnten einen direkten Zusammenhang zwischen ATF3 und p53 zeigen. Sie identifizierten eine erhöhte *ATF3*-Genexpression in Anwesenheit von Wildtyp-p53. Ebenso konnte eine Interaktion mit p53 und einer daraus resultierenden Stabilisierung von ATF3

nachgewiesen werden [195, 196]. Auch ein Mechanismus über welchen ATF3 degradiert wird, konnte von Mo *et al.* geklärt werden. Sie zeigten, dass ATF3, wie p53, über die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 abgebaut wird. Dies demonstriert, dass nicht nur ATF4 in der Lage ist die Expression von ATF3 zu regulieren, sondern auch noch viele weitere Faktoren Einfluss auf die Regulation von ATF4-Zielgenen nehmen.

In Abhängigkeit des Zelltyps können, ausgelöst durch ER-Stress, innerhalb der UPR proapoptotische Proteine induziert werden, die nachfolgend die Apoptose einleiten. ATF4 wird unter Stress-Bedingungen verstärkt exprimiert und aktiviert dabei mehrere Zielgene, worunter sich neben Enzymen und Strukturproteinen auch Transkriptionsfaktoren befinden [31, 36]. Diese können sich wiederum in einem komplexen Netzwerk gegenseitig regulieren. So bewirkt ATF4 etwa die Expression von CHOP-10 und ATF3. ATF3 ist wiederum in der Lage, die Expression von CHOP-10 und von sich selbst zu reprimieren [31, 50, 53]. Bisher war nicht bekannt, über welche Faktoren, die durch ER-Stress ausgelöst, Apoptose induziert wird. Mehrere Studien zeigten bereits, dass die Überexpression von ATF4 Apoptose induziert [36, 51]. ATF4-„knockout“-Mäuse zeigten bei Induktion von Stress durch Oxidationsmittel eine reduzierte neuronale Apoptose [197]. Epitheliales Brustgewebe von Mäusen, in dem ATF4 überexprimiert wurde, zeigte eine reduzierte Proliferation, sowie eine verstärkte Apoptose [198]. Jedoch konnte erst die Arbeitsgruppe um Gelehdar eine Induktion des proapoptotischen Genes *PUMA* in Abhängigkeit von ATF4 und CHOP-10 in neuronalem Gewebe feststellen [51]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten keine Induktion der CHOP-10-Proteinexpression beobachtet werden, jedoch konnten Änderungen in allen drei Zelllinien bezüglich des ATF3-Proteingehaltes nach Überexpression nachgewiesen werden. Die Rolle des ATF3 in der Apoptose wird kontrovers diskutiert. ATF3 wird sowohl als proapoptotischer, als auch als antiapoptotischer Faktor beschrieben. So begünstigt die Überexpression von ATF3 die Apoptose in Ovarialkarzinom-Zellen [199] und erhöht die Resistenz gegen Tumortheraeutika in HeLa-Zellen [200]. Dagegen inhibiert die ATF3-Überexpression die Adramycin-induzierte Apoptose in Cardiomyozyten [201]. Die Induktion der Apoptose wurde im Rahmen dieser Arbeit mit zwei Methoden analysiert. Als erstes wurde die Spaltung der Caspasen 3 und 7 zur Induktion der Apoptose untersucht. Apoptose, ausgelöst durch ER-Stress, stellt eine besondere Form dar, denn neben dem extrinsischen durch Caspase 8 und dem intrinsischen durch Caspase 9 ausgelösten Signalweg, existiert noch ein alternativer durch ER-Stress ausgelöster Signalweg. Dieser über Caspase 12 verlaufende Signalweg wurde jedoch nur im Mausmodell gefunden [202, 203]. Allen drei Signalwegen ist gemeinsam, dass es im Verlauf zur Spaltung der Caspase-3/-7 kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte in HeLa-Zellen durch Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten die Spaltung der Caspasen 3/7 induziert werden. Schon Fan *et al.* beobachten nach Überexpression von ATF3 eine Progression des Zellzyklus in HeLa-Zellen [204].

Somit liegt der Verdacht nahe, dass HeLa-Zellen sensitiv auf die Überexpression von ATF4 und der damit verbundenen ATF3-Expression reagieren. Eine besonders interessante Entdeckung machten Lu *et al.*, sie untersuchten die Ras-vermittelte Zelltransformation und stellten fest, dass die Überexpression von ATF3 einer Ras-vermittelten Zellproliferation entgegen wirkt [205]. HCT-116 p53^{+/+} Zellen besitzen ebenfalls einen erhöhten Ras-Proteingehalt [206]. Somit wäre eine Induktion der Caspase-3/-7-Spaltung in HCT-116 p53^{+/+} Zellen aufgrund einer ATF4-Überexpression mit nachfolgender ATF3-Expression denkbar. Allerdings ist nur nach Überexpression der ATF4-Mutanten eine gesteigerte Caspase-3/-7-Aktivität in der vorliegenden Arbeit zu beobachten. Auch das späte Einleiten der Caspasen-3/-7-Spaltung in HepG2-Zellen ist möglicherweise auf den gesteigerten ATF4-Proteingehalt und den reduzierten ATF3-Proteinlevel zurückzuführen. HepG2-Zellen zeigen eine gesteigerte Proliferation nach Überexpression von ATF3. Diese erhöhte Expression konnten Allan *et al.* auf die Expression von Cyclin D1 zurückführen, an dessen Promotor ATF3 bindet und dadurch die Transkription positiv beeinflusst [207]. Demzufolge könnte der reduzierte ATF3-Proteingehalt der Proliferation entgegen wirken und die Induktion der Apoptose begünstigen.

Als zweiter Apoptosenachweis diene die Spaltung der Poly-(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1). PARP-1 übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Reparatur von DNA Einzelstrangbrüchen, welche auf Grund von oxidativem Stress entstehen können. Im Zuge der Apoptose kommt es nach Aktivierung der Caspase-3/-7 zur Spaltung von PARP-1 und somit zur seiner Inaktivierung [208, 209]. Interessant ist, dass in HeLa-Zellen nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten durchgehend PARP-1 gespalten wird. HeLa-Zellen müssen demzufolge über einen Caspase-3/-7-unabhängigen Mechanismus zur PARP-1 Inaktivierung verfügen. Schon Delic *et al.* demonstrierten in ihrer Arbeit eine Unterstützung der Caspase-3/-7-Spaltung durch Ubiquitylierung des 85 kDa Spaltproduktes von PARP-1 [210]. Des Weiteren konnten Yang *et al.* eine durch TGF- β 1 induzierte PARP-1-Spaltung bei gleichzeitiger Hemmung der Caspase-3/-7 mittels spezifischer Inhibitoren nachweisen [211]. Zudem könnten HeLa-Zellen sensitiv auf die Transfektion reagieren, wobei es zur Spaltung von PARP-1 kommen könnte. Hingegen zeigen HepG2-Zellen in der vorliegenden Arbeit nach Überexpression von ATF4 und der ATF4-Mutanten keine PARP-1-Spaltung. HepG2-Zellen scheinen demzufolge resistent gegen die durch ATF4-Überexpression induzierte PARP-1-Spaltung zu sein. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Piret *et al.* [212]. Sie untersuchten die Induktion der Apoptose mittels Etoposid unter normalen Sauerstoffbedingungen, sowie Hypoxie in HepG2-Zellen. Die Autoren konnten unter Hypoxie eine stark reduzierte Apoptose vermerken, welche auf eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktor AP-1 zurückzuführen ist. Somit könnte in HepG2-Zellen eine anormale Expression von Transkriptionsfaktoren vorliegen, die eine Spaltung von PARP-1 verhindert. Einzig in HCT-116 p53^{+/+} Zellen ließ sich in der vorliegenden Arbeit eine, über Caspase-3/-7-Aktivierung mit nachfolgender Spaltung von PARP-1 verlaufende, Induktion der Apoptose erkennen.

Wie schon mehrfach erwähnt, sind Aktivierung und Reprimierung von Signalwegen abhängig vom Zellsystem. Davon ist auch die Induktion der Apoptose nicht ausgeschlossen. Die Induktion des Apoptose-Signalwegs ist ein gut erforschtes Gebiet, mit dem sich auch die Arbeitsgruppe um Michiels beschäftigt. Sie erforschten die durch Hypoxie und Etoposid induzierte Apoptose und zogen zum Vergleich drei unterschiedliche Zelllinien heran. Mit ihren Ergebnissen konnten sie zeigen, dass neben HIF-1 und AP-1 auch p53 eine entscheidende Rolle in der Einleitung der Apoptose spielt [213]. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte, nach Hemmung der CK2, eine vom Zellsystem abhängige Induktion der Apoptose zeigen [214, 215]. Daher wird in der Tumorthherapie in den letzten Jahren immer zunehmender eine patientenbezogene Anwendung von Zytostatika propagiert. Denn nicht nur jeder Mensch reagiert unterschiedlich auf Chemotherapeutika, vielmehr müssen die molekularen Mechanismen der unterschiedlichen Tumore bestimmt werden, um den Einsatz beziehungsweise die Entwicklung der Zytostatika effizienter zu machen. Abbildung 59 zeigt schematisch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2.

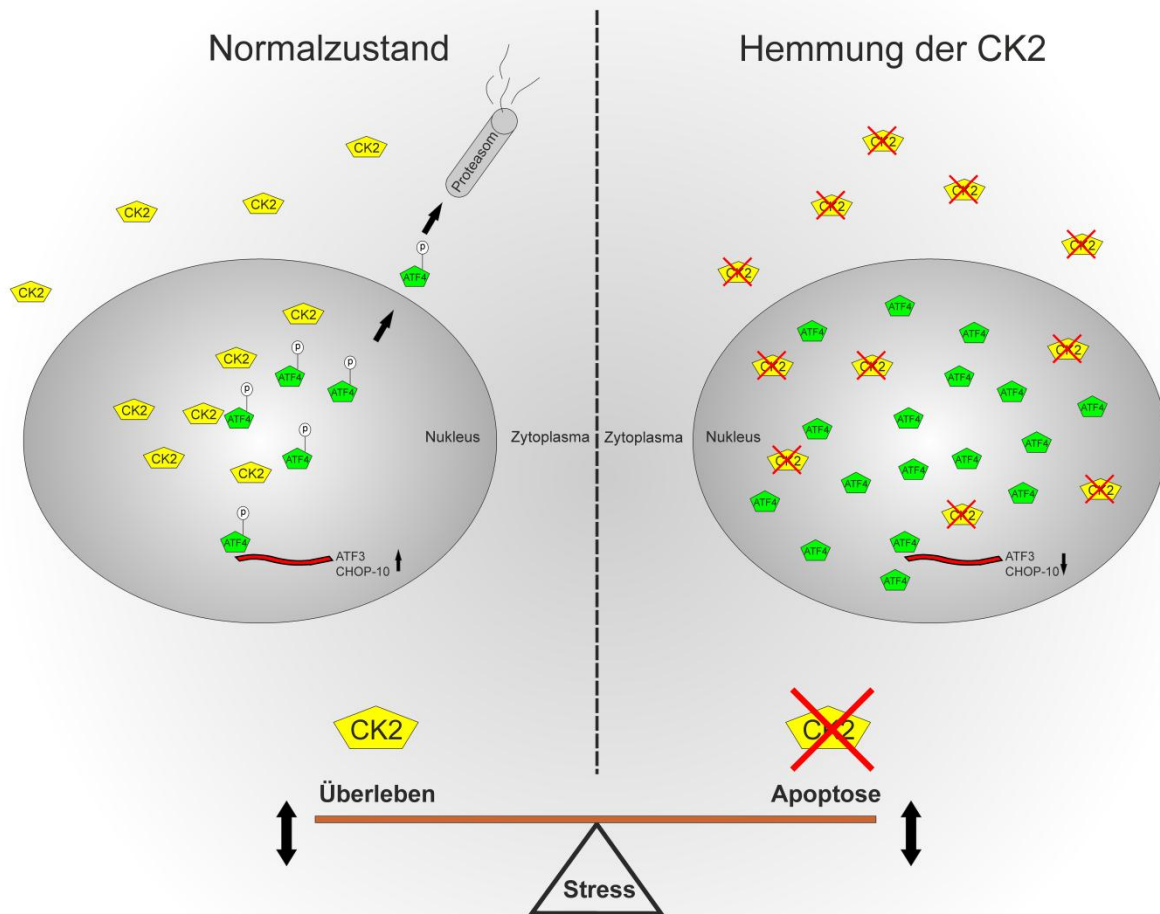


Abbildung 59: Schematische Darstellung der Auswirkung der Phosphorylierung von ATF4 durch die CK2. Unter normalen zellulären Bedingungen kommt es zur Phosphorylierung von ATF4, wodurch der ATF4-Proteingehalt reduziert und die transkriptionelle Aktivität erhöht wird. Der Verlust der CK2-Phosphorylierung führt zu einem Anstieg des ATF4-Proteingehalts und zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität. Des Weiteren führt die CK2-Hemmung zu ER-Stress, wodurch es, in Abhängigkeit des Zelltyps, zur Induktion der Apoptose kommen kann.

Mit Sec63 und ATF4 konnten zwei Substrate der CK2 identifiziert werden, die an der ER-Homöostase beteiligt sind. In welchem Zusammenhang stehen nun ATF4 und Sec63, beziehungsweise welche Folgen hat die Hemmung der CK2 auf beide Proteine? Unter nicht-gestressten zellulären Bedingungen (Normalzustand) könnte die Phosphorylierung von Sec63 durch die CK2 für eine stabile Interaktion zwischen Sec63 und Sec62 sorgen, so dass BiP am Translocon die Faltung der Proteine übernehmen kann. Kommt es durch Hemmung der CK2 hingegen zum Verlust der Sec63-Phosphorylierung, so könnte dies negative Auswirkungen auf Faltung und Translokation der Proteine haben, wodurch ER-Stress erzeugt werden könnte. Zudem bindet Sec63 neben Sec62 auch

Nucleoredoxin (NRX). Die Arbeitsgruppe Zimmermann konnte NRX als Interaktionspartner von Sec63 identifizieren, wobei eine Interaktion nur unter oxidativen Bedingungen vorlag [216]. Diese Interaktion liefert einen weiteren Hinweis, dass die CK2-Hemmung möglicherweise oxidativen Stress erzeugt. Nucleoredoxin ist ein Mitglied der Thioredoxin-Familie und Interaktionspartner von Dvl1 [217]. Unter reduzierenden Bedingungen kommt es zu einer Bindung von NRX und Dvl1, wodurch der Wnt/ β -Catenin Signalweg inaktiv ist. Kommt es zellulär zu oxidativen Bedingungen, so unterbleibt die Interaktion von NRX und Dvl1 und der Wnt/ β -Catenin Signalweg ist aktiv. In der NRX-Interaktionsdomäne von Sec63 befinden sich die beiden CK2-Phosphorylierungsstellen Serin 574 und Serin 576. Denkbar wäre, dass die Phosphorylierung beider Stellen die Interaktion zwischen NRX und Sec63 verhindert und unter Stressbedingungen beide Phosphorylierungsstellen dephosphoryliert werden. Die Dephosphorylierung von Sec63 könnte hierbei die PP2A übernehmen, da sie als Interaktionspartner von NRX identifiziert wurde und in der Lage ist, phosphoryliertes Serin oder Threonin in der Konsensussequenz der CK2 zu dephosphorylieren [218]. So könnte unter oxidativen Bedingungen der Komplex, bestehend aus NRX und PP2A, Sec63 dephosphorylieren, so dass der Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiv ist. Zudem spricht für eine CK2 abhängige Sec63/NRX-Interaktion, dass die Hemmung der CK2 ER-Stress erzeugt. Eine allgemeine Induktion von ER-Stress durch Inhibierung der CK2, konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits analysiert werden [69, 70]. Welche Art von ER-Stress erzeugt wird, ist nicht genau bekannt. Oxidativer Stress spielt dabei wahrscheinlich eine wichtige Rolle, denn Park *et al.* zeigten, dass die Phosphorylierung der NADPH-Oxidase durch die CK2 dessen Aktivität reduziert [219]. Auch die inhibierte Translokation von Nrf2, einem für die Transkription von Oxigenasen essentiellen Faktor, in den Nukleus wird durch CK2-Hemmung begünstigt [95]. Somit könnte die CK2 Hemmung nicht nur oxidativen Stress erzeugen, sondern sie würde auch die NRX/Sec63-Interaktion infolge der nicht vorhandenen Sec63-Phosphorylierung begünstigen.

Allerdings ist die katalytische Aktivität der CK2 nicht nur für die Sec63/Sec62 Interaktion verantwortlich, sondern reguliert auch den damit verknüpften ER-Stress Signalweg. Wie schon erwähnt sind CHOP-10 und Nrf2 zwei Transkriptionsfaktoren des ER-Stress Signalweges, die durch Phosphorylierung der CK2 ihre vollständige Aktivität erhalten. Mit ATF4 wurde ein weiteres Substrat in diesem Signalweg identifiziert, welches von großer Bedeutung ist. Unter normalen zellulären Bedingungen wird der ATF4-Proteingehalt, im Zuge reduzierter Translation und erhöhter Degradation, auf einem niedrigen Level gehalten. Hierzu trägt die CK2-Phosphorylierung einen großen Teil bei. Die Inhibierung der CK2-Aktivität führt indes zu einem erhöhten ATF4-Proteingehalt, der mit einer geänderten transkriptionellen Aktivität einhergeht. Mit ATF3 konnte ein Protein identifiziert werden, was für die Einleitung der Apoptose, in Abhängigkeit der CK2-Phosphorylierung von ATF4, eine wichtige Rolle spielt. Unter Berücksichtigung, dass ATF4 durch den Verlust der CK2-

Phosphorylierung stabilisiert wird, wäre die Untersuchung der BiP-Expression nach ATF4-Überexpression ein interessanter Punkt. Lee *et al.* konnten zeigen, dass ATF4 an den BiP-Promotor bindet und die Transkription sowie Expression begünstigt [32]. Somit könnte ein direkter Zusammenhang zwischen ATF4 und Sec63 nach Hemmung der CK2 bestehen. Der Verlust der katalytischen Aktivität der CK2 führt zur Störung der Translokation, woraus ER-Stress resultiert. Des Weiteren führt die CK2-Hemmung zu einer verstärkten Expression und Stabilisierung von ATF4. Die Stabilisierung äußert sich allerdings in einer erniedrigten transkriptionellen Aktivität von ATF4. In Folge dessen könnte auch die *BIP*-Genexpression reduziert sein. Abbildung 60 zeigt graphisch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und deren hypothetische Einordnung in den ER-Stress-Signalweg.

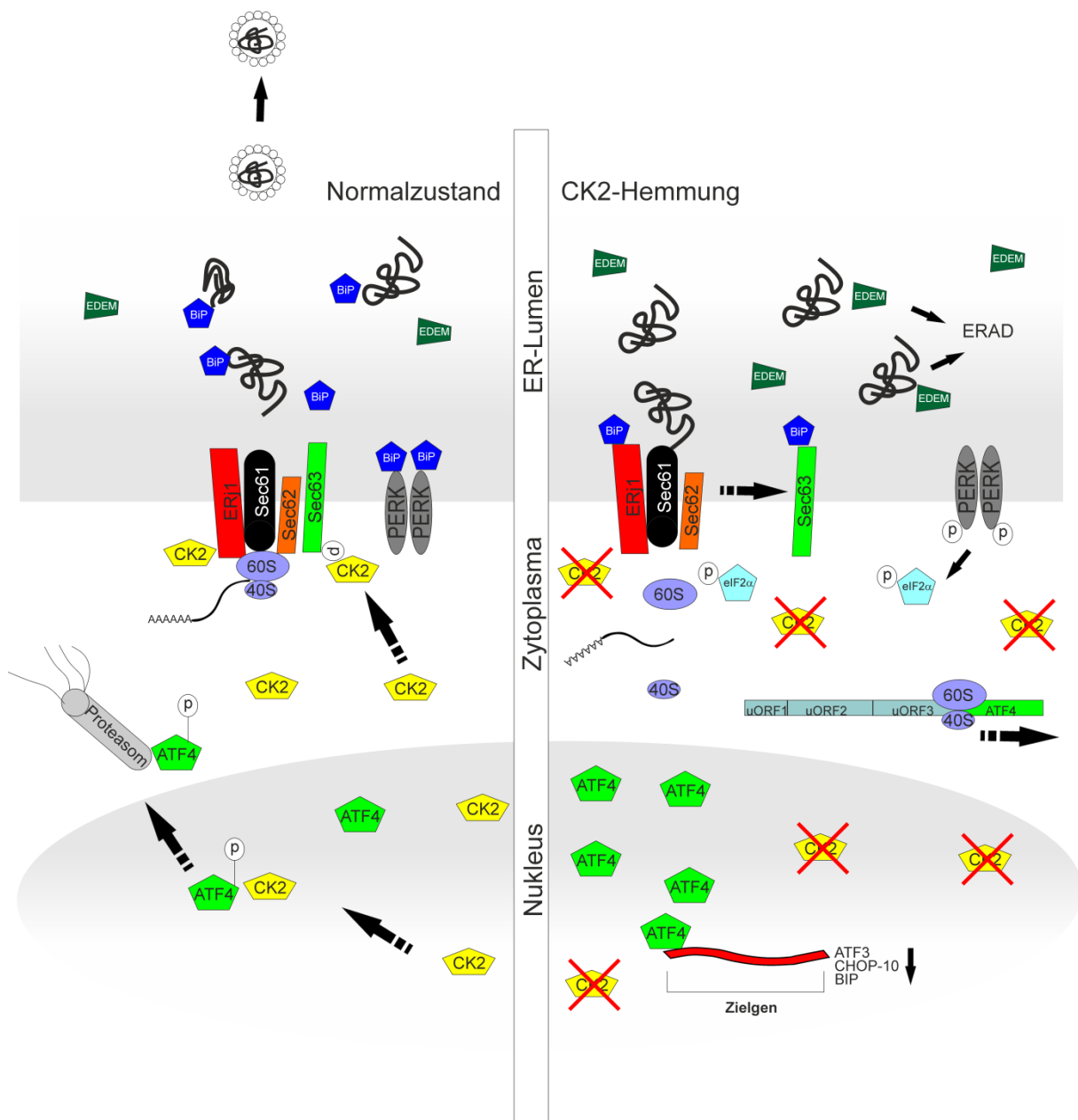


Abbildung 60: Graphische Darstellung von ER-Stress ausgelöst durch CK2-Hemmung. Unter nicht-gestressten Bedingungen (Normalzustand) phosphoryliert die CK2 Sec63, wodurch die Komplexbildung mit Sec62 begünstigt wird. Zudem wird ATF4 von der CK2 phosphoryliert, was die Stabilität von ATF4 erniedrigt. Die CK2-Hemmung führt möglicherweise zu einer gestörten Translokation aufgrund einer erniedrigten Sec63/Sec62-Interaktion. In Folge dessen könnte es zu einer Aktivierung von PERK mit nachfolgender Phosphorylierung von eIF2 α kommen, wodurch die Proteinsynthese reduziert wird. Desweitern zeigt die CK2 Hemmung einen erhöhten EDEM-Proteinlevel, der auf einen ERAD-bedingten Proteinabbau hindeutet. Daneben führt die CK2-Hemmung zu einer erhöhten ATF4-Genexpression und der Verlust der CK2-Phosphorylierung von ATF4 äußert sich in einer erniedrigten transkriptionellen Aktivität von ATF4. Diese erniedrigte transkriptionelle Aktivität könnte sich in einem erniedrigten BiP-Proteinexpression widerspiegeln

Mit der Identifizierung von Sec63 und ATF4 als Substrate der Proteinkinase CK2 sowie der Untersuchung der biologischen Funktionen der Phosphorylierungen, konnte die Rolle der CK2 am ER

und dem damit eng verbundenen ER-Stress Signalweg weiter aufgeklärt werden. Zudem konnten in der Arbeit weitere molekulare Mechanismen, über welche die CK2-Hemmung ihre chemotherapeutische Wirkung entfaltet, entschlüsselt werden. Basierend auf diesen Daten könnten weitere Untersuchungen bezüglich CK2-Hemmung und ER-Stress erfolgen. Dabei wäre ein interessanter Punkt, verschiedene Tumorzelllinien auf ER-Stress und die Apoptose-Induktion nach CK2-Hemmung zu testen, denn in vielen Tumorzellen ist die UPR hochreguliert. Dies hängt zum Teil mit einer erhöhten sekretorischen Aktivität, die ein ausgeprägtes ER/Golgi Netzwerk benötigt, zusammen. Aber auch Hypoxie-Faktoren und Proteine der UPR, wie ATF4, zeigen ein erhöhtes Vorkommen in primären Tumoren. Zurzeit werden viele chemotherapeutische Agenzien untersucht und entwickelt, welche in die UPR eingreifen und so das Tumorstadium verringern sollen. Dabei wird ausgenutzt, dass in den meisten Tumorzellen die UPR ohnehin schon eine höhere Aktivität aufweist. Durch Substanzen, die ER-Stress induzieren, soll somit in Tumorzellen die Apoptose induziert werden. Hierin könnte auch ein Teil der zytostatischen Wirkung der CK2-Hemmung liegen. Durch Störung der Translokation, sowie die Reprimierung der transkriptionellen Aktivität von ATF4 nach Hemmung der CK2, könnte die UPR in Tumorzellen so stark aktiviert werden, so dass die Apoptose eingeleitet wird und dies letztlich zum Untergang der Tumorzelle führt.

Obwohl das Endoplasmatische Retikulum das größte Zellorganell ist und mitunter mehrere essentielle Funktionen besitzt, ist es hinsichtlich der CK2-Substrate weniger gut untersucht. Die CK2 besitzt mehr als 300 Substrate in der gesamten Zelle, allerdings wurde bis heute nur ein geringer Teil, davon am ER beziehungsweise in ER-assoziierten Funktionen, gefunden. Die Identifizierung von Sec63 und ATF4 als Substrate der CK2 ist lediglich die Spitze des Eisberges. Um die endgültige Rolle der CK2 am ER zu verstehen, müssen weitere Substrate der CK2 am ER und in ER-assoziierten Funktionen aufgefunden gemacht werden. Doch schon jetzt lässt sich erahnen, dass das Endoplasmatische Retikulum nicht nur eine große Rolle für die Zelle spielt, sondern auch die CK2 eine große Rolle für das Endoplasmatische Retikulum spielt.

8. Literaturverzeichnis

1. Sudhakar, A., A. Ramachandran, S. Ghosh, S.E. Hasnain, R.J. Kaufman und K.V. Ramaiah, *Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B*. *Biochemistry*, 2000. **39**(42): p. 12929-38.
2. DuRose, J.B., D. Scheuner, R.J. Kaufman, L.I. Rothblum und M. Niwa, *Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(15): p. 4295-307.
3. Hanein, D., K.E. Matlack, B. Jungnickel, K. Plath, K.U. Kalies, K.R. Miller, T.A. Rapoport und C.W. Akey, *Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation*. *Cell*, 1996. **87**(4): p. 721-32.
4. Blau, M., S. Mullapudi, T. Becker, J. Dudek, R. Zimmermann, P.A. Penczek und R. Beckmann, *ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(11): p. 1015-6.
5. Meyer, H.A., H. Grau, R. Kraft, S. Kostka, S. Prehn, K.U. Kalies und E. Hartmann, *Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(19): p. 14550-7.
6. Dierks, T., J. Volkmer, G. Schlenstedt, C. Jung, U. Sandholzer, K. Zachmann, P. Schlotterhose, K. Neifer, B. Schmidt und R. Zimmermann, *A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum*. *EMBO J*, 1996. **15**(24): p. 6931-42.
7. Hamman, B.D., L.M. Hendershot und A.E. Johnson, *BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation*. *Cell*, 1998. **92**(6): p. 747-58.
8. Chung, K.T., Y. Shen und L.M. Hendershot, *BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(49): p. 47557-63.
9. Dudek, J., M. Greiner, A. Müller, L.M. Hendershot, K. Kopsch, W. Nastainczyk und R. Zimmermann, *ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(11): p. 1008-14.
10. Dudek, J., J. Volkmer, C. Bies, S. Guth, A. Müller, M. Lerner, P. Feick, K.H. Schafer, E. Morgenstern, F. Hennessy, G.L. Blatch, K. Janoscheck, N. Heim, P. Scholtes, M. Frien, W. Nastainczyk und R. Zimmermann, *A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes*. *EMBO J*, 2002. **21**(12): p. 2958-67.

11. Tyedmers, J., M. Lerner, C. Bies, J. Dudek, M.H. Skowronek, I.G. Haas, N. Heim, W. Nastainczyk, J. Volkmer und R. Zimmermann, *Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7214-9.
12. Müller, L., M.D. de Escuriaza, P. Lajoie, M. Theis, M. Jung, A. Müller, C. Burgard, M. Greiner, E.L. Snapp, J. Dudek und R. Zimmermann, *Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(5): p. 691-703.
13. Tyedmers, J., M. Lerner, M. Wiedmann, J. Volkmer und R. Zimmermann, *Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum*. EMBO Rep, 2003. **4**(5): p. 505-10.
14. Alder, N.N., Y. Shen, J.L. Brodsky, L.M. Hendershot und A.E. Johnson, *The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2005. **168**(3): p. 389-99.
15. Haigh, N.G. und A.E. Johnson, *A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane*. J Cell Biol, 2002. **156**(2): p. 261-70.
16. Zimmermann, R., L. Müller und B. Wullich, *Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies*. Trends Mol Med, 2006. **12**(12): p. 567-73.
17. Kroczyńska, B., C.M. Evangelista, S.S. Samant, E.C. Elguindi und S.Y. Blond, *The SANT2 domain of the murine tumor cell DnaJ-like protein 1 human homologue interacts with alpha1-antichymotrypsin and kinetically interferes with its serpin inhibitory activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11432-43.
18. Davila, S., L. Furu, A.G. Gharavi, X. Tian, T. Onoe, Q. Qian, A. Li, Y. Cai, P.S. Kamath, B.F. King, P.J. Azurmendi, P. Tahvanainen, H. Kaariainen, K. Hockerstedt, O. Devuyst, Y. Pirson, R.S. Martin, R.P. Lifton, E. Tahvanainen, V.E. Torres und S. Somlo, *Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 575-7.
19. Fedeles, S.V., X. Tian, A.R. Gallagher, M. Mitobe, S. Nishio, S.H. Lee, Y. Cai, L. Geng, C.M. Crews und S. Somlo, *A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation*. Nat Genet, 2011. **43**(7): p. 639-47.
20. Delpino, A. und M. Castelli, *The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BiP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation*. Biosci Rep, 2002. **22**(3-4): p. 407-20.
21. Lee, A.S., *The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress*. Methods, 2005. **35**(4): p. 373-81.

22. Wek, R.C., H.Y. Jiang und T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 1): p. 7-11.
23. Harding, H.P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira und D. Ron, *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells*. Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1099-108.
24. Kilberg, M.S., J. Shan und N. Su, *ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(9): p. 436-43.
25. Vallejo, M., D. Ron, C.P. Miller und J.F. Habener, *C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4679-83.
26. Vlahopoulos, S.A., S. Logotheti, D. Mikas, A. Giarika, V. Gorgoulis und V. Zoumpourlis, *The role of ATF-2 in oncogenesis*. Bioessays, 2008. **30**(4): p. 314-27.
27. Ameri, K. und A.L. Harris, *Activating transcription factor 4*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(1): p. 14-21.
28. Cibelli, G., S. Jungling, S. Schoch, H.H. Gerdes und G. Thiel, *Identification of a functional cAMP response element in the secretogranin II gene*. Eur J Biochem, 1996. **236**(1): p. 171-9.
29. Jungling, S., G. Cibelli, M. Czardybon, H.H. Gerdes und G. Thiel, *Differential regulation of chromogranin B and synapsin I gene promoter activity by cAMP and cAMP-dependent protein kinase*. Eur J Biochem, 1994. **226**(3): p. 925-35.
30. Karpinski, B.A., G.D. Morle, J. Huggenvik, M.D. Uhler und J.M. Leiden, *Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 4820-4.
31. Averous, J., A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, G. Thiel und P. Fournoux, *Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5288-97.
32. Luo, S., P. Baumeister, S. Yang, S.F. Abcouwer und A.S. Lee, *Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37375-85.
33. Ohoka, N., S. Yoshii, T. Hattori, K. Onozaki und H. Hayashi, *TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death*. EMBO J, 2005. **24**(6): p. 1243-55.

34. Siu, F., P.J. Bain, R. LeBlanc-Chaffin, H. Chen und M.S. Kilberg, *ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24120-7.
35. Benbrook, D.M. und N.C. Jones, *Heterodimer formation between CREB and JUN proteins*. Oncogene, 1990. **5**(3): p. 295-302.
36. Jiang, H.Y., S.A. Wek, B.C. McGrath, D. Lu, T. Hai, H.P. Harding, X. Wang, D. Ron, D.R. Cavener und R.C. Wek, *Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(3): p. 1365-77.
37. Ma, Y. und L.M. Hendershot, *Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 34864-73.
38. Novoa, I., H. Zeng, H.P. Harding und D. Ron, *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1011-22.
39. Koditz, J., J. Nesper, M. Wottawa, D.P. Stiehl, G. Camenisch, C. Franke, J. Myllyharju, R.H. Wenger und D.M. Katschinski, *Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3610-7.
40. Hiwatashi, Y., K. Kanno, C. Takasaki, K. Goryo, T. Sato, S. Torii, K. Sogawa und K. Yasumoto, *PHD1 interacts with ATF4 and negatively regulates its transcriptional activity without prolyl hydroxylation*. Exp Cell Res, 2011. **317**(20): p. 2789-99.
41. Lassot, I., E. Estrabaud, S. Emiliani, M. Benkirane, R. Benarous und F. Margottin-Goguet, *p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41537-45.
42. Suzuki, T., N. Osumi und Y. Wakamatsu, *Stabilization of ATF4 protein is required for the regulation of epithelial-mesenchymal transition of the avian neural crest*. Dev Biol, 2010. **344**(2): p. 658-68.
43. Li, M., J. Luo, C.L. Brooks und W. Gu, *Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50607-11.
44. Ampofo, E., T. Kietzmann, A. Zimmer, M. Jakupovic, M. Montenarh und C. Götz, *Phosphorylation of the von Hippel-Lindau protein (VHL) by protein kinase CK2 reduces its protein stability and affects p53 and HIF-1alpha mediated transcription*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(10): p. 1729-35.
45. He, H., M. Tan, D. Pamarthy, G. Wang, K. Ahmed und Y. Sun, *CK2 phosphorylation of SAG at Thr10 regulates SAG stability, but not its E3 ligase activity*. Mol Cell Biochem, 2007. **295**(1-2): p. 179-88.

46. Torres, J. und R. Pulido, *The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation.* J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 993-8.
47. Yang, X., K. Matsuda, P. Bialek, S. Jacquot, H.C. Masuoka, T. Schinke, L. Li, S. Brancorsini, P. Sassone-Corsi, T.M. Townes, A. Hanauer und G. Karsenty, *ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome.* Cell, 2004. **117**(3): p. 387-98.
48. Frank, C.L., X. Ge, Z. Xie, Y. Zhou und L.H. Tsai, *Control of activating transcription factor 4 (ATF4) persistence by multisite phosphorylation impacts cell cycle progression and neurogenesis.* J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 33324-37.
49. Lassot, I., E. Segeval, C. Berlioz-Torrent, H. Durand, L. Groussin, T. Hai, R. Benarous und F. Margottin-Goguet, *ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2192-202.
50. Pan, Y.X., H. Chen, M.M. Thiaville und M.S. Kilberg, *Activation of the ATF3 gene through a coordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation.* Biochem J, 2007. **401**(1): p. 299-307.
51. Galehdar, Z., P. Swan, B. Fuerth, S.M. Callaghan, D.S. Park und S.P. Cregan, *Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA.* J Neurosci, 2010. **30**(50): p. 16938-48.
52. Nakano, K. und K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53.* Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
53. Wolfgang, C.D., B.P. Chen, J.L. Martindale, N.J. Holbrook und T. Hai, *gadd153/Chop10, a potential target gene of the transcriptional repressor ATF3.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6700-7.
54. Wolfgang, C.D., G. Liang, Y. Okamoto, A.E. Allen und T. Hai, *Transcriptional autorepression of the stress-inducible gene ATF3.* J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16865-70.
55. Bi, M., C. Naczki, M. Koritzinsky, D. Fels, J. Blais, N. Hu, H. Harding, I. Novoa, M. Varia, J. Raleigh, D. Scheuner, R.J. Kaufman, J. Bell, D. Ron, B.G. Wouters und C. Koumenis, *ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth.* EMBO J, 2005. **24**(19): p. 3470-81.
56. Blais, J.D., C.L. Addison, R. Edge, T. Falls, H. Zhao, K. Wary, C. Koumenis, H.P. Harding, D. Ron, M. Holcik und J.C. Bell, *Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(24): p. 9517-32.

57. Xing, X., M. Lai, Y. Wang, E. Xu und Q. Huang, *Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer*. Clin Chim Acta, 2006. **364**(1-2): p. 308-15.
58. Fribley, A.M., B. Evenchik, Q. Zeng, B.K. Park, J.Y. Guan, H. Zhang, T.J. Hale, M.S. Soengas, R.J. Kaufman und C.Y. Wang, *Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma cells by induction of Noxa*. J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 31440-7.
59. Nawrocki, S.T., J.S. Carew, K. Dunner, Jr., L.H. Boise, P.J. Chiao, P. Huang, J.L. Abbruzzese und D.J. McConkey, *Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11510-9.
60. Shuda, M., N. Kondoh, N. Imazeki, K. Tanaka, T. Okada, K. Mori, A. Hada, M. Arai, T. Wakatsuki, O. Matsubara, N. Yamamoto und M. Yamamoto, *Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis*. J Hepatol, 2003. **38**(5): p. 605-14.
61. Healy, S.J., A.M. Gorman, P. Mousavi-Shafaei, S. Gupta und A. Samali, *Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy*. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 234-46.
62. Castillo, J.J., M. Furman und E.S. Winer, *CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110-delta inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies*. Expert Opin Investig Drugs, 2012. **21**(1): p. 15-22.
63. Stone, A., R.L. Sutherland und E.A. Musgrove, *Inhibitors of cell cycle kinases: recent advances and future prospects as cancer therapeutics*. Crit Rev Oncog, 2012. **17**(2): p. 175-98.
64. Takeuchi, K. und F. Ito, *Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics*. Biol Pharm Bull, 2011. **34**(12): p. 1774-80.
65. Zhang, L. und R.J. Daly, *Targeting the human kinome for cancer therapy: current perspectives*. Crit Rev Oncog, 2012. **17**(2): p. 233-46.
66. Perez, D.I., C. Gil und A. Martinez, *Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases*. Med Res Rev, 2011. **31**(6): p. 924-54.
67. Hanif, I.M., M.A. Shazib, K.A. Ahmad und S. Pervaiz, *Casein Kinase II: an attractive target for anti-cancer drug design*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(10): p. 1602-5.
68. Sarno, S. und L.A. Pinna, *Protein kinase CK2 as a druggable target*. Mol Biosyst, 2008. **4**(9): p. 889-94.
69. Hessenauer, A., C.C. Schneider, C. Götz und M. Montenarh, *CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response*. Cell Signal, 2011. **23**(1): p. 145-51.
70. Schneider, C.C., E. Ampofo und M. Montenarh, *CK2 regulates ATF4 and CHOP transcription within the cellular stress response signalling pathway*. Cell Signal, 2012. **24**(9): p. 1797-802.

71. Manni, S., A. Brancalion, L.Q. Tubi, A. Colpo, L. Pavan, A. Cabrelle, E. Ave, F. Zaffino, G. Di Maira, M. Ruzzene, F. Adami, R. Zambello, M.R. Pitari, P. Tassone, L.A. Pinna, C. Gurrieri, G. Semenzato und F. Piazza, *Protein kinase CK2 protects multiple myeloma cells from ER stress-induced apoptosis and from the cytotoxic effect of HSP90 inhibition through regulation of the unfolded protein response*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(7): p. 1888-900.
72. Meggio, F. und L.A. Pinna, *One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?* FASEB J, 2003. **17**(3): p. 349-68.
73. Martin, M.E., A. Alcazar und M. Salinas, *Subcellular and regional distribution of casein kinase II and initiation factor 2 activities during rat brain development*. Int J Dev Neurosci, 1990. **8**(1): p. 47-54.
74. Marin, O., F. Meggio und L.A. Pinna, *Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein kinases-1 and -2*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **198**(3): p. 898-905.
75. Meggio, F., O. Marin und L.A. Pinna, *Substrate specificity of protein kinase CK2*. Cell Mol Biol Res, 1994. **40**(5-6): p. 401-9.
76. Niefind, K., M. Putter, B. Guerra, O.G. Issinger und D. Schomburg, *GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(12): p. 1100-3.
77. Charriaut-Marlangue, C., S. Otani, C. Creuzet, Y. Ben-Ari und J. Loeb, *Rapid activation of hippocampal casein kinase II during long-term potentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10232-6.
78. Edelman, A.M., D.K. Blumenthal und E.G. Krebs, *Protein serine/threonine kinases*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 567-613.
79. Chantalat, L., D. Leroy, O. Filhol, A. Nueda, M.J. Benitez, E.M. Chambaz, C. Cochet und O. Dideberg, *Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization*. EMBO J, 1999. **18**(11): p. 2930-40.
80. Guerra, B., S. Siemer, B. Boldyreff und O.G. Issinger, *Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles*. FEBS Lett, 1999. **462**(3): p. 353-7.
81. Salvi, M., S. Sarno, O. Marin, F. Meggio, E. Itarte und L.A. Pinna, *Discrimination between the activity of protein kinase CK2 holoenzyme and its catalytic subunits*. FEBS Lett, 2006. **580**(16): p. 3948-52.
82. Stigare, J., N. Buddelmeijer, A. Pigon und E. Egyhazi, *A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit*. Mol Cell Biochem, 1993. **129**(1): p. 77-85.

83. Paramanik, V. und M.K. Thakur, *Estrogen receptor beta and its domains interact with casein kinase 2, phosphokinase C and N-myristoylation sites of mitochondrial and nuclear proteins in mouse brain*. J Biol Chem, 2012.
84. Juhl, C., K. Morl und A.G. Beck-Sickinger, *Adiponectin receptor 1 interacts with both subunits of protein kinase CK2*. Mol Cell Biochem, 2011. **356**(1-2): p. 185-9.
85. Kimura, R. und N. Matsuki, *Protein kinase CK2 modulates synaptic plasticity by modification of synaptic NMDA receptors in the hippocampus*. J Physiol, 2008. **586**(13): p. 3195-206.
86. Lim, A.C., S.Y. Tiu, Q. Li und R.Z. Qi, *Direct regulation of microtubule dynamics by protein kinase CK2*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4433-9.
87. Faust, M., J. Günther, E. Morgenstern, M. Montenarh und C. Götz, *Specific localization of the catalytic subunits of protein kinase CK2 at the centrosomes*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(12): p. 2155-64.
88. Raleigh, D.R., D.M. Boe, D. Yu, C.R. Weber, A.M. Marchiando, E.M. Bradford, Y. Wang, L. Wu, E.E. Schneeberger, L. Shen und J.R. Turner, *Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function*. J Cell Biol, 2011. **193**(3): p. 565-82.
89. Venerando, A., M.A. Pagano, K. Tosoni, F. Meggio, D. Cassidy, M. Stobbart, L.A. Pinna und A. Mehta, *Understanding protein kinase CK2 mis-regulation upon F508del CFTR expression*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2011. **384**(4-5): p. 473-88.
90. Luz, S., P. Kongsuphol, A.I. Mendes, F. Romeiras, M. Sousa, R. Schreiber, P. Matos, P. Jordan, A. Mehta, M.D. Amaral, K. Kunzelmann und C.M. Farinha, *Contribution of casein kinase 2 and spleen tyrosine kinase to CFTR trafficking and protein kinase A-induced activity*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(22): p. 4392-404.
91. Taylor, K.M., S. Hiscox, R.I. Nicholson, C. Hogstrand und P. Kille, *Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7*. Sci Signal, 2012. **5**(210): p. ra11.
92. Brechet, A., M.P. Fache, A. Brachet, G. Ferracci, A. Baude, M. Irondelle, S. Pereira, C. Leterrier und B. Dargent, *Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G*. J Cell Biol, 2008. **183**(6): p. 1101-14.
93. Bachhuber, T., J. Almaca, F. Aldehni, A. Mehta, M.D. Amaral, R. Schreiber und K. Kunzelmann, *Regulation of the epithelial Na⁺ channel by the protein kinase CK2*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13225-32.
94. Meng, R., F. Al-Quobaili, I. Müller, C. Götz, G. Thiel und M. Montenarh, *CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(14): p. 2481-9.

95. Apopa, P.L., X. He und Q. Ma, *Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells*. J Biochem Mol Toxicol, 2008. **22**(1): p. 63-76.
96. Shanware, N.P., L. Zhan, J.A. Hutchinson, S.H. Kim, L.M. Williams und R.S. Tibbetts, *Conserved and distinct modes of CREB/ATF transcription factor regulation by PP2A/B56gamma and genotoxic stress*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12173.
97. Ubeda, M. und J.F. Habener, *CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40514-20.
98. Deshiere, A., E. Duchemin-Pelletier, E. Spreux, D. Ciais, C. Forcet, C. Cochet und O. Filhol, *Regulation of epithelial to mesenchymal transition: CK2beta on stage*. Mol Cell Biochem, 2011. **356**(1-2): p. 11-20.
99. Dominguez, I., I.R. Degano, K. Chea, J. Cha, P. Toselli und D.C. Seldin, *CK2alpha is essential for embryonic morphogenesis*. Mol Cell Biochem, 2011. **356**(1-2): p. 209-16.
100. Landesman-Bollag, E., A. Belkina, B. Hovey, E. Connors, C. Cox und D.C. Seldin, *Developmental and growth defects in mice with combined deficiency of CK2 catalytic genes*. Mol Cell Biochem, 2011. **356**(1-2): p. 227-31.
101. Escalier, D., D. Silvius und X. Xu, *Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha': failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus*. Mol Reprod Dev, 2003. **66**(2): p. 190-201.
102. Xu, X., P.A. Toselli, L.D. Russell und D.C. Seldin, *Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 118-21.
103. Wilhelm, N., K. Kostelnik, C. Götz und M. Montenarh, *Protein kinase CK2 is implicated in early steps of the differentiation of pre-adipocytes into adipocytes*. Mol Cell Biochem, 2012. **365**(1-2): p. 37-45.
104. Pierre, F., P.C. Chua, S.E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M.K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J.P. Whitten, T.K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, W.G. Rice, D.M. Ryckman und K. Anderes, *Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer*. Mol Cell Biochem, 2011. **356**(1-2): p. 37-43.
105. Schneider, C.C., S. Kartarius, M. Montenarh, A. Orzeszko und Z. Kazimierczuk, *Modified tetrahalogenated benzimidazoles with CK2 inhibitory activity are active against human prostate cancer cells LNCaP in vitro*. Bioorg Med Chem, 2012. **20**(14): p. 4390-6.
106. Montenarh, M., *Cellular regulators of protein kinase CK2*. Cell Tissue Res, 2010. **342**(2): p. 139-46.

107. Faust, M., M. Jung, J. Günther, R. Zimmermann und M. Montenarh, *Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus*. Mol Cell Biochem, 2001. **227**(1-2): p. 73-80.
108. Ishihara, K., N. Yamagishi und T. Hatayama, *Protein kinase CK2 phosphorylates Hsp105 alpha at Ser509 and modulates its function*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 3): p. 917-25.
109. Miyata, Y., *Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: the kinase controlling the Hsp90 chaperone machinery*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(11-12): p. 1840-9.
110. Miyata, Y. und E. Nishida, *Analysis of the CK2-dependent phosphorylation of serine 13 in Cdc37 using a phospho-specific antibody and phospho-affinity gel electrophoresis*. FEBS J, 2007. **274**(21): p. 5690-703.
111. Miyata, Y. und E. Nishida, *Evaluating CK2 activity with the antibody specific for the CK2-phosphorylated form of a kinase-targeting cochaperone Cdc37*. Mol Cell Biochem, 2008. **316**(1-2): p. 127-34.
112. Soncin, F., X. Zhang, B. Chu, X. Wang, A. Asea, M. Ann Stevenson, D.B. Sacks und S.K. Calderwood, *Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(2): p. 700-6.
113. Llorens, F., N. Roher, F.A. Miro, S. Sarno, F.X. Ruiz, F. Meggio, M. Plana, L.A. Pinna und E. Itarte, *Eukaryotic translation-initiation factor eIF2beta binds to protein kinase CK2: effects on CK2alpha activity*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 623-31.
114. Llorens, F., S. Sarno, E. Sarro, A. Duarri, N. Roher, F. Meggio, M. Plana, L.A. Pinna und E. Itarte, *Cross talk between protein kinase CK2 and eukaryotic translation initiation factor eIF2beta subunit*. Mol Cell Biochem, 2005. **274**(1-2): p. 53-61.
115. Poletto, G., J. Vilardell, O. Marin, M.A. Pagano, G. Cozza, S. Sarno, A. Falques, E. Itarte, L.A. Pinna und F. Meggio, *The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 contributes to the recognition of the substrate consensus sequence. A study with an eIF2 beta-derived peptide*. Biochemistry, 2008. **47**(32): p. 8317-25.
116. Riera, M., N. Roher, F. Miro, C. Gil, R. Trujillo, J. Aguilera, M. Plana und E. Itarte, *Association of protein kinase CK2 with eukaryotic translation initiation factor eIF-2 and with grp94/endoplasmic reticulum chaperone*. Mol Cell Biochem, 1999. **191**(1-2): p. 97-104.
117. Homma, M.K., I. Wada, T. Suzuki, J. Yamaki, E.G. Krebs und Y. Homma, *CK2 phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 5 potentiates cell cycle progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15688-93.

118. Götz, C., A. Müller, M. Montenarh, R. Zimmermann und J. Dudek, *The ER-membrane-resident Hsp40 ERj1 is a novel substrate for protein kinase CK2*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(4): p. 637-42.
119. Pi, J., Y. Bai, J.M. Reece, J. Williams, D. Liu, M.L. Freeman, W.E. Fahl, D. Shugar, J. Liu, W. Qu, S. Collins und M.P. Waalkes, *Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(12): p. 1797-806.
120. Nastainczyk, W., I. Schmidt-Spaniol, B. Boldyreff und O.G. Issinger, *Isolation and characterization of a monoclonal anti-protein kinase CK2 beta-subunit antibody of the IgG class for the direct detection of CK2 beta-subunit in tissue cultures of various mammalian species and human tumors*. Hybridoma, 1995. **14**(4): p. 335-9.
121. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
122. Hubner, S., C.Y. Xiao und D.A. Jans, *The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17191-5.
123. Gibson, A.W., X. Li, J. Wu, J.G. Baskin, C. Raman, J.C. Edberg und R.P. Kimberly, *Serine phosphorylation of FcγRI cytoplasmic domain directs lipid raft localization and interaction with protein 4.1G*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(1): p. 97-103.
124. Wang, X. und N. Johnsson, *Protein kinase CK2 phosphorylates Sec63p to stimulate the assembly of the endoplasmic reticulum protein translocation apparatus*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 4): p. 723-32.
125. Cozza, G., M. Mazzorana, E. Papinutto, J. Bain, M. Elliott, G. di Maira, A. Gianoncelli, M.A. Pagano, S. Sarno, M. Ruzzene, R. Battistutta, F. Meggio, S. Moro, G. Zagotto und L.A. Pinna, *Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2*. Biochem J, 2009. **421**(3): p. 387-95.
126. Schuck, S., W.A. Prinz, K.S. Thorn, C. Voss und P. Walter, *Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response*. J Cell Biol, 2009. **187**(4): p. 525-36.
127. Faust, M. und M. Montenarh, *Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function?* Cell Tissue Res, 2000. **301**(3): p. 329-40.
128. Kamynina, E., K. Kauppinen, F. Duan, N. Muakkassa und D. Manor, *Regulation of proto-oncogenic dbp by chaperone-controlled, ubiquitin-mediated degradation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(5): p. 1809-22.

129. Lytton, J., M. Westlin und M.R. Hanley, *Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17067-71.
130. Laudet, B., C. Barette, V. Dulery, O. Renaudet, P. Dumy, A. Metz, R. Prudent, A. Deshiere, O. Dideberg, O. Filhol und C. Cochet, *Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction*. Biochem J, 2007. **408**(3): p. 363-73.
131. Meyer, R., M.M. Nalaskowski, P. Ehm, C. Schroder, X. Naj, M.A. Brehm und G.W. Mayr, *Nucleocytoplasmic shuttling of human inositol phosphate multikinase is influenced by CK2 phosphorylation*. Biol Chem, 2012. **393**(3): p. 149-60.
132. Yang, L., N. Liu, X. Hu, W. Zhang, T. Wang, H. Li, B. Zhang, S. Xiang, J. Zhou und J. Zhang, *CK2 phosphorylates TNFAIP1 to affect its subcellular localization and interaction with PCNA*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(6): p. 2967-73.
133. Mueller, T., P. Breuer, I. Schmitt, J. Walter, B.O. Evert und U. Wullner, *CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(17): p. 3334-43.
134. Schwindling, S.L., A. Noll, M. Montenarh und C. Götz, *Mutation of a CK2 phosphorylation site in cdc25C impairs importin alpha/beta binding and results in cytoplasmic retention*. Oncogene, 2004. **23**(23): p. 4155-65.
135. Ye, J. und C. Koumenis, *ATF4, an ER stress and hypoxia-inducible transcription factor and its potential role in hypoxia tolerance and tumorigenesis*. Curr Mol Med, 2009. **9**(4): p. 411-6.
136. Yu, S., R.T. Franceschi, M. Luo, X. Zhang, D. Jiang, Y. Lai, Y. Jiang, J. Zhang und G. Xiao, *Parathyroid hormone increases activating transcription factor 4 expression and activity in osteoblasts: requirement for osteocalcin gene expression*. Endocrinology, 2008. **149**(4): p. 1960-8.
137. Sarno, S., H. Reddy, F. Meggio, M. Ruzzene, S.P. Davies, A. Donella-Deana, D. Shugar und L.A. Pinna, *Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2')*. FEBS Lett, 2001. **496**(1): p. 44-8.
138. Penner, C.G., Z. Wang und D.W. Litchfield, *Expression and localization of epitope-tagged protein kinase CK2*. J Cell Biochem, 1997. **64**(4): p. 525-37.
139. Liang, G. und T. Hai, *Characterization of human activating transcription factor 4, a transcriptional activator that interacts with multiple domains of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 24088-95.
140. Bruhat, A., C. Jousse, V. Carraro, A.M. Reimold, M. Ferrara und P. Fournoux, *Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7192-204.

141. Wierstra, I., *The transcription factor FOXM1c is activated by protein kinase CK2, protein kinase A (PKA), c-Src and Raf-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **413**(2): p. 230-5.
142. Mayer, S.I., V. Dexheimer, E. Nishida, S. Kitajima und G. Thiel, *Expression of the transcriptional repressor ATF3 in gonadotrophs is regulated by Egr-1, CREB, and ATF2 after gonadotropin-releasing hormone receptor stimulation*. Endocrinology, 2008. **149**(12): p. 6311-25.
143. Palade, G.E., *Albert Claude and the beginnings of biological electron microscopy*. J Cell Biol, 1971. **50**(1): p. 5d-19d.
144. Blobel, G., *Unidirectional and bidirectional protein traffic across membranes*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1995. **60**: p. 1-10.
145. Gorman, A.M., S.J. Healy, R. Jager und A. Samali, *Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis*. Pharmacol Ther, 2012. **134**(3): p. 306-16.
146. Boelens, J., S. Lust, F. Offner, M.E. Bracke und B.W. Vanhoecke, *Review. The endoplasmic reticulum: a target for new anticancer drugs*. In Vivo, 2007. **21**(2): p. 215-26.
147. Cai, Y., G. Anyatonwu, D. Okuhara, K.B. Lee, Z. Yu, T. Onoe, C.L. Mei, Q. Qian, L. Geng, R. Witzgall, B.E. Ehrlich und S. Somlo, *Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19987-95.
148. Hu, J., Y.K. Bae, K.M. Knobel und M.M. Barr, *Casein kinase II and calcineurin modulate TRPP function and ciliary localization*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(5): p. 2200-11.
149. Allen, D., B. Fakler, J. Maylie und J.P. Adelman, *Organization and regulation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel multiprotein complexes*. J Neurosci, 2007. **27**(9): p. 2369-76.
150. Maret, W., *Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals*. Biometals, 2009. **22**(1): p. 149-57.
151. Canton, D.A., C. Zhang und D.W. Litchfield, *Assembly of protein kinase CK2: investigation of complex formation between catalytic and regulatory subunits using a zinc-finger-deficient mutant of CK2beta*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 87-94.
152. Willer, M., A.J. Jermy, B.P. Young und C.J. Stirling, *Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane*. Yeast, 2003. **20**(2): p. 133-48.
153. Brodsky, J.L. und R. Schekman, *A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome*. J Cell Biol, 1993. **123**(6 Pt 1): p. 1355-63.
154. Rapoport, T.A., M.M. Rolls und B. Jungnickel, *Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(4): p. 499-504.

155. Rothblatt, J.A., R.J. Deshaies, S.L. Sanders, G. Daum und R. Schekman, *Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2641-52.
156. Phanstiel, D.H., J. Brumbaugh, C.D. Wenger, S. Tian, M.D. Probasco, D.J. Bailey, D.L. Swaney, M.A. Tervo, J.M. Bolin, V. Ruotti, R. Stewart, J.A. Thomson und J.J. Coon, *Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells*. Nat Methods, 2011. **8**(10): p. 821-7.
157. Armstrong, S.A., D.A. Barry, R.W. Leggett und C.R. Mueller, *Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13489-95.
158. van Anken, E., E.P. Romijn, C. Maggioni, A. Mezghrani, R. Sitia, I. Braakman und A.J. Heck, *Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 243-53.
159. Reimold, A.M., N.N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E.M. Gravalles, D. Friend, M.J. Grusby, F. Alt und L.H. Glimcher, *Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 300-7.
160. Shaffer, A.L., M. Shapiro-Shelef, N.N. Iwakoshi, A.H. Lee, S.B. Qian, H. Zhao, X. Yu, L. Yang, B.K. Tan, A. Rosenwald, E.M. Hurt, E. Petroulakis, N. Sonenberg, J.W. Yewdell, K. Calame, L.H. Glimcher und L.M. Staudt, *XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation*. Immunity, 2004. **21**(1): p. 81-93.
161. Persengiev, S.P. und M.R. Green, *The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(3): p. 225-8.
162. Fels, D.R. und C. Koumenis, *The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(7): p. 723-8.
163. Blais, J.D., V. Filipenko, M. Bi, H.P. Harding, D. Ron, C. Koumenis, B.G. Wouters und J.C. Bell, *Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7469-82.
164. De Sousa-Coelho, A.L., P.F. Marrero und D. Haro, *Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation*. Biochem J, 2012. **443**(1): p. 165-71.
165. Buganim, Y., E. Kalo, R. Brosh, H. Besserglick, I. Nachmany, Y. Rais, P. Stambolsky, X. Tang, M. Milyavsky, I. Shats, M. Kalis, N. Goldfinger und V. Rotter, *Mutant p53 protects cells from 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced death by attenuating activating transcription factor 3 induction*. Cancer Res, 2006. **66**(22): p. 10750-9.

166. Ameri, K., C.E. Lewis, M. Raida, H. Sowter, T. Hai und A.L. Harris, *Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells*. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1876-82.
167. Fan, C.F., X.Y. Mao und E.H. Wang, *Elevated p-CREB-2 (ser 245) expression is potentially associated with carcinogenesis and development of breast carcinoma*. *Mol Med Report*, 2012. **5**(2): p. 357-62.
168. Komatsuzaki, E., T. Kitamura, I. Murayama, Y. Saigo, K. Ojima, N. Akatsuka, J. Iwabuchi und S. Miyata, *Characterization of an activating transcription factor 4 gene containing a consensus phosphorylation site for PKA in the gonads of Xenopus embryos*. *Zoolog Sci*, 2010. **27**(1): p. 19-23.
169. Ceglia, I., M. Flajolet und H. Rebholz, *Predominance of CK2alpha over CK2alpha' in the mammalian brain*. *Mol Cell Biochem*, 2011. **356**(1-2): p. 169-75.
170. Pinna, L.A., *Protein kinase CK2: a challenge to canons*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 20): p. 3873-8.
171. Cibelli, G., S. Schoch und G. Thiel, *Nuclear targeting of cAMP response element binding protein 2 (CREB2)*. *Eur J Cell Biol*, 1999. **78**(9): p. 642-9.
172. Kilpatrick, L.E. und N.D. Holliday, *Dissecting the pharmacology of G protein-coupled receptor signaling complexes using bimolecular fluorescence complementation*. *Methods Mol Biol*, 2012. **897**: p. 109-38.
173. He, J., T. Yu, J. Pan und H. Li, *Visualisation and identification of the interaction between STIM1s in resting cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33377.
174. Haider, A.J., D. Briggs, T.J. Self, H.L. Chilvers, N.D. Holliday und I.D. Kerr, *Dimerization of ABCG2 analysed by bimolecular fluorescence complementation*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25818.
175. Grinberg, A.V., C.D. Hu und T.K. Kerppola, *Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(10): p. 4294-308.
176. Kerppola, T.K., *Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation*. *Chem Soc Rev*, 2009. **38**(10): p. 2876-86.
177. Busino, L., M. Donzelli, M. Chiesa, D. Guardavaccaro, D. Ganoth, N.V. Dorrello, A. Hershko, M. Pagano und G.F. Draetta, *Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage*. *Nature*, 2003. **426**(6962): p. 87-91.
178. Frescas, D. und M. Pagano, *Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(6): p. 438-49.
179. Nakayama, K.I. und K. Nakayama, *Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases*. *Semin Cell Dev Biol*, 2005. **16**(3): p. 323-33.

180. Tan, M., J.R. Gallegos, Q. Gu, Y. Huang, J. Li, Y. Jin, H. Lu und Y. Sun, *SAG/ROC-SCF beta-TrCP E3 ubiquitin ligase promotes pro-caspase-3 degradation as a mechanism of apoptosis protection*. *Neoplasia*, 2006. **8**(12): p. 1042-54.
181. Winston, J.T., P. Strack, P. Beer-Romero, C.Y. Chu, S.J. Elledge und J.W. Harper, *The SCFbeta-TrCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro*. *Genes Dev*, 1999. **13**(3): p. 270-83.
182. Bodeker, H., S. Vasseur, N.J. Dusetti, J.C. Dagorn und J.L. Iovanna, *PAP gene transcription induced by cycloheximide in AR4-2J cells involves ADP-ribosylation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **251**(3): p. 710-3.
183. Weihua, X., V. Kolla und D.V. Kalvakolanu, *Interferon gamma-induced transcription of the murine ISGF3gamma (p48) gene is mediated by novel factors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(1): p. 103-8.
184. Greif, D.M., D.B. Sacks und T. Michel, *Calmodulin phosphorylation and modulation of endothelial nitric oxide synthase catalysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(5): p. 1165-70.
185. Fraser, J.A., A. Madhumalar, E. Blackburn, J. Bramham, M.D. Walkinshaw, C. Verma und T.R. Hupp, *A novel p53 phosphorylation site within the MDM2 ubiquitination signal: II. a model in which phosphorylation at SER269 induces a mutant conformation to p53*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(48): p. 37773-86.
186. Chandrasekaran, S., T.X. Tan, J.R. Hall und J.G. Cook, *Stress-stimulated mitogen-activated protein kinases control the stability and activity of the Cdt1 DNA replication licensing factor*. *Mol Cell Biol*, 2011. **31**(22): p. 4405-16.
187. Hamamura, K. und H. Yokota, *Stress to endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts induces apoptosis and transcriptional activation for bone remodeling*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(9): p. 1769-74.
188. Semplici, F., F. Meggio, L.A. Pinna und S. Oliviero, *CK2-dependent phosphorylation of the E2 ubiquitin conjugating enzyme UBC3B induces its interaction with beta-TrCP and enhances beta-catenin degradation*. *Oncogene*, 2002. **21**(25): p. 3978-87.
189. Lebrin, F., L. Bianchini, T. Rabilloud, E.M. Chambaz und Y. Goldberg, *CK2alpha-protein phosphatase 2A molecular complex: possible interaction with the MAP kinase pathway*. *Mol Cell Biochem*, 1999. **191**(1-2): p. 207-12.
190. Bouman, L., A. Schlierf, A.K. Lutz, J. Shan, A. Deinlein, J. Kast, Z. Galehdar, V. Palmisano, N. Patenge, D. Berg, T. Gasser, R. Augustin, D. Trumbach, I. Irrcher, D.S. Park, W. Wurst, M.S. Kilberg, J. Tatzelt und K.F. Winklhofer, *Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence*

- for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress.* Cell Death Differ, 2011. **18**(5): p. 769-82.
191. Gjymishka, A., S.S. Palii, J. Shan und M.S. Kilberg, *Despite increased ATF4 binding at the C/EBP-ATF composite site following activation of the unfolded protein response, system A transporter 2 (SNAT2) transcription activity is repressed in HepG2 cells.* J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27736-47.
192. Montminy, M.R. und L.M. Bilezikjian, *Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene.* Nature, 1987. **328**(6126): p. 175-8.
193. Vallejo, M., M.E. Gosse, W. Beckman und J.F. Habener, *Impaired cyclic AMP-dependent phosphorylation renders CREB a repressor of C/EBP-induced transcription of the somatostatin gene in an insulinoma cell line.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 415-24.
194. Jousse, C., C. Deval, A.C. Maurin, L. Parry, Y. Cherasse, C. Chaveroux, R. Lefloch, P. Lenormand, A. Bruhat und P. Fafournoux, *TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway.* J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15851-61.
195. Yan, C. und D.D. Boyd, *ATF3 regulates the stability of p53: a link to cancer.* Cell Cycle, 2006. **5**(9): p. 926-9.
196. Yan, C., D. Lu, T. Hai und D.D. Boyd, *Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination.* EMBO J, 2005. **24**(13): p. 2425-35.
197. Lange, P.S., J.C. Chavez, J.T. Pinto, G. Coppola, C.W. Sun, T.M. Townes, D.H. Geschwind und R.R. Ratan, *ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo.* J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1227-42.
198. Bagheri-Yarmand, R., R.K. Vadlamudi und R. Kumar, *Activating transcription factor 4 overexpression inhibits proliferation and differentiation of mammary epithelium resulting in impaired lactation and accelerated involution.* J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17421-9.
199. Syed, V., K. Mukherjee, J. Lyons-Weiler, K.M. Lau, T. Mashima, T. Tsuruo und S.M. Ho, *Identification of ATF-3, caveolin-1, DLC-1, and NM23-H2 as putative antitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling.* Oncogene, 2005. **24**(10): p. 1774-87.
200. Mashima, T., S. Udagawa und T. Tsuruo, *Involvement of transcriptional repressor ATF3 in acceleration of caspase protease activation during DNA damaging agent-induced apoptosis.* J Cell Physiol, 2001. **188**(3): p. 352-8.
201. Nobori, K., H. Ito, M. Tamamori-Adachi, S. Adachi, Y. Ono, J. Kawachi, S. Kitajima, F. Marumo und M. Isobe, *ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: a novel cardioprotective role of ATF3.* J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(10): p. 1387-97.

202. Fatma, N., P. Singh, B. Chhunchha, E. Kubo, T. Shinohara, B. Bhargavan und D.P. Singh, *Deficiency of Prdx6 in lens epithelial cells induces ER stress response-mediated impaired homeostasis and apoptosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(4): p. C954-67.
203. Szegezdi, E., U. Fitzgerald und A. Samali, *Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 186-94.
204. Fan, F., S. Jin, S.A. Amundson, T. Tong, W. Fan, H. Zhao, X. Zhu, L. Mazzacurati, X. Li, K.L. Petrik, A.J. Fornace, Jr., B. Rajasekaran und Q. Zhan, *ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth*. Oncogene, 2002. **21**(49): p. 7488-96.
205. Lu, D., C.D. Wolfgang und T. Hai, *Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10473-81.
206. Crowley-Weber, C.L., C.M. Payne, M. Gleason-Guzman, G.S. Watts, B. Futscher, C.N. Waltmire, C. Crowley, K. Dvorakova, C. Bernstein, M. Craven, H. Garewal und H. Bernstein, *Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate*. Carcinogenesis, 2002. **23**(12): p. 2063-80.
207. Allan, A.L., C. Albanese, R.G. Pestell und J. LaMarre, *Activating transcription factor 3 induces DNA synthesis and expression of cyclin D1 in hepatocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27272-80.
208. Javle, M. und N.J. Curtin, *The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation*. Br J Cancer, 2011. **105**(8): p. 1114-22.
209. Boucher, D., V. Blais und J.B. Denault, *Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(15): p. 5669-74.
210. Masdehors, P., S. Glaisner, Z. Maciorowski, H. Magdelenat und J. Delic, *Ubiquitin-dependent protein processing controls radiation-induced apoptosis through the N-end rule pathway*. Exp Cell Res, 2000. **257**(1): p. 48-57.
211. Yang, Y., S. Zhao und J. Song, *Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor beta1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(2): p. 223-34.
212. Piret, J.P., J.P. Cosse, N. Ninane, M. Raes und C. Michiels, *Hypoxia protects HepG2 cells against etoposide-induced apoptosis via a HIF-1-independent pathway*. Exp Cell Res, 2006. **312**(15): p. 2908-20.
213. Cosse, J.P., A. Sermeus, K. Vannuvel, N. Ninane, M. Raes und C. Michiels, *Differential effects of hypoxia on etoposide-induced apoptosis according to the cancer cell lines*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 61.

214. Schneider, C.C., A. Hessenauer, M. Montenarh und C. Götz, *p53 is dispensable for the induction of apoptosis after inhibition of protein kinase CK2*. *Prostate*, 2010. **70**(2): p. 126-34.
215. Hessenauer, A., M. Montenarh und C. Götz, *Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells*. *Int J Oncol*, 2003. **22**(6): p. 1263-70.
216. Müller, L., Y. Funato, H. Miki und R. Zimmermann, *An interaction between human Sec63 and nucleoredoxin may provide the missing link between the SEC63 gene and polycystic liver disease*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(4): p. 596-600.
217. Funato, Y., T. Michiue, M. Asashima und H. Miki, *The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(5): p. 501-8.
218. Lechward, K., E. Sugajska, I. de Baere, J. Goris, B.A. Hemmings und S. Zolnierowicz, *Interaction of nucleoredoxin with protein phosphatase 2A*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(15): p. 3631-7.
219. Park, H.S., S.M. Lee, J.H. Lee, Y.S. Kim, Y.S. Bae und J.W. Park, *Phosphorylation of the leucocyte NADPH oxidase subunit p47(phox) by casein kinase 2: conformation-dependent phosphorylation and modulation of oxidase activity*. *Biochem J*, 2001. **358**(Pt 3): p. 783-90.

9. Publikationen

Ampofo E, Kietzmann T, Zimmer A, Jakupovic M, Montenarh M und Götz C, (2010) *Phosphorylation of the von Hippel-Lindau protein (VHL) by protein kinase CK2 reduces its protein stability and affects p53 and HIF-1alpha mediated transcription*. Int. J. Biochem. Cell Biol. **42**(10): p. 1729-1735

Schneider CC, **Ampofo E** und Montenarh M, (2012) *CK2 regulates ATF4 and CHOP transcription within the cellular stress response signalling pathway*. Cellular signaling. **24**(9): p. 1797-1802

Ampofo E, Götz C und Montenarh M., (2012) *Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response*. Submitted

Ampofo E, Jung M, Müller L, Greiner M, Zimmermann R und Montenarh M, (2012) *CK2 phosphorylation of human Sec63 regulates its interaction with Sec62*. Submitted

Danksagung

Ein besonderes Dankeschön geht an Herr Prof. Dr. M. Montenarh. Ich danke ihm für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas sowie für die intensiven Bemühungen bei der Umsetzung dieser Arbeit. Besonders möchte ich mich bei ihm für den nötigen Freiraum bedanken, der zur Entwicklung des meines wissenschaftliches Denkens maßgeblich beitrug. Zudem bedanke ich mich für die jahrelange Unterstützung auf vielen Ebenen. Danke, dass sie mir den Weg für meinen weiteren wissenschaftlichen Wertegang bereitet haben.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Grässer bedanke ich mich für die Übernahme der Zweitberichterstattung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. C. Götz. Sie war ein wertvoller Ansprechpartner bei der Umsetzung vieler Experimente. Zudem möchte ich mich bei ihr für die intensiven Diskussionen bedanken, welche mein wissenschaftliches Denken entscheidend geprägt haben.

Außerdem möchte ich Frau S. Kartarius für die Einarbeitung und Weitergabe von Erfahrungen danken.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Zimmermann und Herrn PD. Dr. M. Jung für die Bereitstellung der Sec-Proteine sowie für die Nutzung ihrer Geräte bedanken. Darüber hinaus bedanke ich mich besonders bei PD. Dr. M. Jung, dessen Kooperationsinteresse große Teile der vorliegenden Arbeit erst ermöglicht haben.

Des Weiteren möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Montenarh für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie der Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, deren Vertrauen und Hilfe zum Gelingen des Studium und der Promotion maßgeblich beigetragen haben. Meinen Freunden gilt Dank für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

Besonders bedanke ich mich bei Nadine Wilhelm, die mich durch das Studium und die Promotion begleitet hat. Ich bin ihr zu großem Dank verpflichtet, denn sie war auch nach der Arbeit immer für eine wissenschaftliche Diskussion bereit.

Lebenslauf

Name: Emmanuel Johannes Kwabena Ampofo
Adresse: Luftbahnweg 16
66450 Bexbach
Geburtsort: Bexbach
Geburtsdatum: 21.06.1983
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

06/1993 - 06/2003
Gymnasium Johanneum, Homburg (Saar)
Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/2003 - 06/2004
Arbeiterwohlfahrt, Homburg (Saar)

Hochschulausbildung

10/2004 – 07/2009
Studium der Biologie mit dem Schwerpunkt:
Human- und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes
Abschluss als Diplom-Biologe

02/2008 - 04/2008

Forschungspraktikant

Thema: *Die Bedeutung der CK2 für den Spleißprozess*
AG Prof. Dr. Montenarh
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes

12/2008 - 07/2009

Diplomand

Thema: *„Crosstalk between VHL and p53“*
AG Prof. Dr. Montenarh
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes

Beruflicher Werdegang

Seit 09/2009

Doktorand

Thema: *Die Proteinkinase CK2, das Endoplasmatische Retikulum und ER-Stress: Die Rolle der CK2 am größten Zellorganell.*
AG Prof. Dr. Montenarh
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes