

Aus dem Bereich Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Pharmakologische Modulation des Ca²⁺-Leckstroms aus dem Endoplasmatischen Retikulum mittels chemischer Chaperone

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von: Sebastian Tobias Bender

geb. am: 16.02.1991 in Wuppertal

Tag der Promotion: 14. Oktober 2022

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Adolfo Cavalié

Prof. Dr. Martin van der Laan

Meiner geliebten Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>XI</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>XIII</i>
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. <i>Das Endoplasmatische Retikulum (ER)</i>	3
2.2. <i>Proteintransport ins ER</i>	4
2.2.1. <i>Cotranslationale Translokation</i>	4
2.2.1. <i>Posttranslationale Translokation</i>	7
2.3. <i>Molekulare Chaperone</i>	9
2.3.1. <i>BiP/GRP78</i>	10
2.3.2. <i>Calretikulin und Calnexin (CRT/CNX)</i>	15
2.3.3. <i>Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI)</i>	17
2.3.4. <i>GRP94</i>	17
2.4. <i>Ca²⁺-Homöostase</i>	18
2.4.1. <i>Pumpen und Kanäle der Zellmembran</i>	21
2.4.1.1. <i>Ca²⁺-Einstrom-Kanäle</i>	21
2.4.2. <i>Pumpen und Kanäle der ER-Membran</i>	22
2.4.2.1. <i>Der Sec61-Komplex als Ca²⁺-leitender Ionenkanal</i>	22
2.4.3. <i>Ca²⁺-bindende Proteine des ER</i>	24
2.5. <i>Modulatoren der Ca²⁺-Homöostase</i>	25
2.6. <i>Protein-Homöostase</i>	27
2.6.1. <i>ER quality control (ERQC)</i>	27
2.6.2. <i>ER associated degradation (ERAD)</i>	29

2.6.3. <i>Unfolded protein response</i> (UPR).....	30
2.7. <i>Niedermolekulare Chaperone</i>	31
2.7.1. <i>4-Phenylbutyrat</i> (4-PBA) als Beispiel für niedermolekulare Chaperone....	37
2.7.2. Pharmakologische Anwendung von <i>4-Phenylbutyrat</i> (4-PBA): Stand der Forschung.....	39
2.7.3. Pharmakologische Anwendung von <i>Azoramide</i> (AZO): Stand der Forschung.....	41
2.8. <i>Ziele der Arbeit</i>	42
3. <i>Material und Methoden</i>	44
3.1. <i>Geräte und Software</i>	44
3.1.1. Geräte und Materialien.....	44
3.1.2. Imaging-System	45
3.1.3. Software	46
3.2. <i>Chemikalien</i>	46
3.3. <i>Substanzen und Wirkstoffe</i>	48
3.4. <i>Verwendete Lösungen für die zytosolische Ca²⁺-Messungen</i>	49
3.5. <i>Zelllinien und Primärzellen</i>	49
3.5.1. Humane epitheliale Zelllinie (HEK-293).....	49
3.5.2. Murine-Hautfibroblasten (Y344H)	49
3.5.3. Kultivierung der verwendeten Zelllinien	50
3.6. <i>Ca²⁺-Imaging</i>	51
3.6.1. Aufbau und Funktionsweise des verwendeten Zweikanal-Imagingsystems	51
3.6.2. Fura-2 AM.....	52
3.6.3. Kalibrierung der Fura-2 Ratio-Werte.....	54
3.7. <i>Berechnung der Ca²⁺-Konzentration</i>	58
3.8. <i>Statistische Datenanalyse</i>	59
3.9. <i>Vorversuche zur Bestimmung optimaler Messparameter</i>	61

3.9.1. Bestimmung der Dosiswirkungskurve für Thapsigargin und Ionomycin ...	61
3.9.2. Bestimmung der Ca^{2+} -Abhängigkeit von Thapsigargin- und Ionomycin-Effekten	63
3.9.3. Messung der Ca^{2+} -Einströme	65
3.9.4. Messung des Tunicamycin-Effektes auf Ca^{2+} -Signale.....	66
3.9.5. Messung des Effektes von Trifluoperazine und Ophiobolin A auf Ca^{2+} -Signale	68
3.9.6. Messung des ER Ca^{2+} -Lecks und des Ca^{2+} -Gehalts von murinen-Hautfibroblasten.....	72
4. Ergebnisse.....	75
4.1. <i>Änderung der Ca^{2+}-Homöostase nach 4-Phenylbutyrat (4-PBA)-Inkubation</i>	<i>75</i>
4.1.1. Messung des Thapsigargin induzierten Ca^{2+} -Efflux nach 4-PBA Inkubation.....	75
4.1.2. Effekt von 4-PBA auf den zellulären Ca^{2+} -Gehalt.....	78
4.1.3. Zeitabhängigkeit des Effektes von 4-PBA auf die Ca^{2+} -Homöostase.....	80
4.1.4. Dosisabhängigkeit des Effektes von 4-PBA auf die Ca^{2+} -Homöostase..	82
4.2. <i>Beeinflussung des ER-Stresses durch 4-PBA</i>	<i>87</i>
4.2.1. Effekte von 4-PBA auf den Tunicamycin-induzierten ER-Stress.....	87
4.2.2. Effekte von 4-PBA auf den Dithiothreitol-induzierten ER-Stress	91
4.2.3. Effekte von 4-PBA auf den Trifluoperazine-induzierten ER-Stress.....	93
4.3. <i>Effekt des aktiven 4-PBA-Metaboliten Phenylacetic Acid (PAA) auf die Ca^{2+}-Homöostase</i>	<i>96</i>
4.4. <i>Änderung der Ca^{2+}-Homöostase nach Azoramide (AZO)-Inkubation.....</i>	<i>100</i>
4.4.1. Dosisabhängigkeit des Effektes von AZO auf die Ca^{2+} -Homöostase...	100
4.4.2. Effekte von AZO auf den Tunicamycin-induzierten ER-Stress.....	104
5. Diskussion.....	109
5.1. <i>Zeit- und Dosisabhängige Effekte von 4-PBA auf Ca^{2+}-Homöostase.....</i>	<i>109</i>
5.2. <i>Hypothesen zu den Wirkmechanismen von 4-PBA.....</i>	<i>111</i>

Inhaltsverzeichnis

5.3. Wechselwirkung von 4-PBA mit Stress-Induktoren.....	116
5.4. Wechselwirkung des aktiven 4-PBA-Metaboliten PAA auf die Ca^{2+} -Homöostase	117
5.5. Modifikation der Ca^{2+} -Homöostase durch Azoramide (AZO)	118
5.6. Hypothese zu den Wirkmechanismen von AZO	119
5.7. Wechselwirkung von AZO mit Stress-Induktoren.....	121
5.8. Fazit.....	122
6. Literaturverzeichnis.....	126
7. Danksagung.....	144
8. Curriculum vitae.....	146

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ATF	Activating Transcription Factor
ATF6LD-Gluc	ATF6 luminal domain - Cypridina noctiluca
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
AS	Aminosäure
ASGR	Asialoglykoprotein Rezeptor
ATP	Adenosintriophosphat
AZO	Azoramid
BAPTA	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'
	Tetraessigsäure
BAX	bcl-2-associated X Protein (Apoptose-Mediator)
BiP	engl. „immunoglobulin heavy chain binding protein“, ebenso GRP78 oder in Prokaryonten HSPA5
Ca ²⁺	Calciumionen
[Ca ²⁺] _{ER/i/e}	Ca ²⁺ Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum/Zytosol/Extrazellularraum
[Ca ²⁺] _{frei}	Konzentration der freien Calciumionen
CaM	Calmodulin
CCE	kapazitiver Ca ²⁺ -Einstrom
CGN	cis-Golgi-Netzwerk
CHOP	engl. „C/EBP-homologous protein“
CKD	Chronische Nieren Erkrankung (engl. „Chronic Kidney Disease“)
cm ²	Quadratzentimeter
CNX	Calnexin
COP	Mantel-Protein-Komplex (engl. „coat protein complex“)
CRT	Calretikulin
CRT/CNX-Zyklus	Calretikulin/Calnexin-Zyklus
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Δ [Ca] _i /Delta	Zunahme der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration in Abhängigkeit der basalen zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration
de novo	lat. „neu“
DERLIN	engl. „degradation in endoplasmic reticulum protein“

Abkürzungsverzeichnis

dFIC	drosophila filamentation induced by cAMP (FIC Homolog und Interaktionsprotein von BiP während der UPR)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „desoxyribonucleic acid“)
DPP 4-Inhibitor	First-line Antidiabetikum (z.B. Sitagliptin)
DTT	Dithiothreitol
EDEM	engl. „ER-degradation enhancing α -mannosidase like protein“
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
eIF	engl. „eukaryotic translation initiation factor“)
END	Endkonzentration
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Protein-Degradation
ERES	engl. „ER Exit Sites“
ERj (ERdj/DnaJ)	engl. „ER-associated dnaJ protein“, auch DnaJ oder ERDJ
ERMan	ER Mannosidase
ERp	ER Protein-Disulfid Oxidoreduktase/Isomerase
ERQC	ER Qualitäts-Kontrollbereich (engl. „ER quality compartment“)
ERSE	engl. „ER stress response element“
EZR	Extrazellularraum
F	Fluoreszenzintensität
FABP	engl. „fatty acid-binding protein“
FCS	Fetales Kälberserum (engl. „fetal calve serum“)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
Fura-2 (AM)	Fura-2 (Acetoxymethylester)
g	Gramm
GABA	γ -aminobutyric acid
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GLP-1	Glucagon-like Peptid 1 (Peptidhormon)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRP	Glukose-reguliertes Protein 94 (engl. glucose-regulated protein 94) „glucose-regulated protein“ z.B. 94
GTP	Guanosintriphosphat
h	lat. „hora“ (Stunde(n))

Abkürzungsverzeichnis

HbA1c	HämoglobinA1c“ (= Blutzuckergedächtnis)
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK-293	humane embryonische Niere-293(-Zellen) (engl. „human embryonic kidney-293“)
HeLa	Cervix Karzinomzelllinie, benannt nach der Spenderin <u>Henrietta Lacks</u>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
Herp	engl. „homocystein-responsive ER resident protein“
high AZO	hohe Applikationsmenge von Azoramide (> 10 µM)
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus
HPV	Humane Papillomviren
HSP	Hitzeschock-Protein (engl. „heat shock protein“)
Hrd	engl. „HMG-CoA reductase degradation“
Huh7	engl. “human hepatoma cell line-7”
HYPE	engl. “huntington yeast-interacting protein E”
Ig	Immunglobulin
in vitro	lat. „im Glas“ (organische Vorgänge außerhalb eines Organismus)
in vivo	lat. „im Lebendigen (organische Vorgänge innerhalb eines lebenden Organismus)
IONO	Ionomycin
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-(Rezeptor)
IQ-Motiv	Isoleucin-Glutamin Motiv (Calmodulin Erkennungsbereich)
IRE	engl. „inositol requiring element“
IZR	Intrazellularraum
K ⁺	Kaliumionen
K _d	Dissoziationskonstante
K' _d	Dissoziationskonstante des Fura-2 Ca
kDa	Kilodalton
l	Liter
LHS	Heat shock protein 70 Homolog (Hefe-Ortholog)
low AZO	geringe Applikationsmenge von Azoramide (≤ 10 µM)
µ	mikro
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromol
m	milli
M	Molarität (mol/l)
MCS	Membran Kontakt Stelle (engl. „membrane contact sides“)
MEM	engl. „Minimum essentiell medium“
Mg ²⁺	Magnesiumion
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
ms	Millisekunde
mRNA	engl. „messenger“-Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
MYOC	Myocilin Gen
n	nano
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NCaF	nominal Ca ²⁺ -freie Lösung
NC(K)X	Natrium-Calcium-(Kalium)-Austauscher
NE	engl. „nuclear envelope“ äußere Kernmembran
NEF	engl. „nucleotide exchange factor“
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NMDA	N-Methyl-D-Asparta
N-Terminus	Amino-Terminus
OPHIO	Ophiobolin A
OS-9	engl. „osteosarcoma amplified“
OST	Oligosaccharyltransferase
OSR	Oligosaccharylresten
P/S	Penicillin/Streptomycin
p53	Transkriptionsfaktor Protein (Apoptose-Mediator)
PAA	Phenylacetat
PBA/4-PBA	Sodium Phenylbutyrat
PBS	„phosphate buffered saline“ Phosphatgepuffertes Salzlösung
PDI	Proteindisulfidisomerase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PPK	Polypeptidkette
PERK	engl. PKR-like ER kinase
PLL	Poly-l-lysine
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ ATPase
PCR	engl. „polymerase chain reaction“

Abkürzungsverzeichnis

R	„ratio“ (= Verhältnis)
rER	engl. „rough ER“ raues ER
RNC	„ribosome-nascent chain complex“ Ribosom-naszierende-Kette-Komplex (engl. ribosome-nascent chain complex)
ROS	radikale Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde(n)
S	Svedberg
S1P/S2P	engl. „site 1/2 protease“
SBD	Substrat-Bindedomäne
Sel	engl. „suppressor/enhancer of Lin“
sER	engl. „smooth ER“ bzw. „agranuläre“
SERCA	Sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SD	Varianz (engl. „standard deviation“)
SEM	Standardfehler einer Stichprobenmenge (engl. „standard error of the mean“)
SH-Gruppen	Thiol-/Sulphydrylgruppen
SH-SY5Y	Humane Neuroblastom-Zelllinie
SOCE	engl. „store-operated Ca ²⁺ entry“
SPC	Signal Peptidase Komplex
SPP	Sekretorische Perkursor Polypeptid
SPPase	Signalpeptidpeptidase
SPase	Signalpeptidase
SR	SRP-Rezeptor
SRP	„signal recognition particle“ Signalerkennungspartikel
STIM	engl. „stromal interaction molecule“
TFP	Trifluoperazin
TG	Thapsigargin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNI	Tunicamycin
TUDCA	Tauroursodesoxycholsäure
TMAO	Trimethylamin Noxide
TMH	Transmembran-Helices
TRAM	engl. „translocating chain-associated membrane protein“
TRAP	engl. „translocon-associated protein complex“
tRNA	Transfer-RNA
UDCA	Ursodesoxycholsäure

Abkürzungsverzeichnis

UDP	Uridin Diphospat
UdS	Universität des Saarlandes
UE	Untereinheit
UGGT	Uridin Diphospat Glukose-Glykoprotein Transferase
UP	ungefaltete Proteine
UPR	engl. „unfolded protein response“
USA	United States of Amerika
VD	Verschlussdomäne
VIMP	engl. „valosin-containing protein (VCP)- Interacting membrane protein“
XTP3-B	engl. „Xanthosine 5'-triphosphate 3-transactivated protein B“
XBP	engl. „X-box binding protein“
zero[Ca ²⁺] _{ext}	Konzentration von 0,5 mM EGTA in extrazellulärer Lösung
Zn ²⁺	Zinkion
ZNS	Zentrales-Nerven-System

Ein- und Dreibuchstabencodierung für Aminosäuren

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

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Cotranslationale Translokation von naszierenden Polypeptidketten in das ER (Nach Park und Rapoport, 2012; Zimmermann et al., 2011 modifizierte Abbildung).	6
Abbildung 2.2:	Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von BiP im ER (Nach Behnke et al., 2015; Mayer und Kityk, 2015; Pobre et al., 2019 modifizierte Abbildung).	14
Abbildung 2.3:	Prozessierung von Proteinen (Nach Zimmermann et al., 2011 modifizierte Abbildung).	16
Abbildung 2.4:	Aufrechterhaltung der $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase der Zelle.	20
Abbildung 2.5:	2D und 3D Strukturformel 4-Phenylbutyrat (4-PBA) (modifizierte Abbildung aus PubchemCID 4775, Abgerufen am 22.08.2021 - https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4775#section=2D-Structure und https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4775#section=3D-Conformer).	38
Abbildung 2.6:	2D und 3D Strukturformel von Azoramide (AZO) (modifizierte Abbildung aus PubchemCID 7518316, Abgerufen am 22.08.2021 - https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7518316#section=2D-Structure und https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7518316#section=3D-Conformer).	42
Abbildung 3.1:	Schematischer Aufbau des verwendeten Ca^{2+} -Imagingsystems.	52
Abbildung 3.2:	Beispielhafte Darstellung der logarithmischen Ratios bei 340 nm sowie 387 nm gegen die Ca^{2+} -Konzentration in Molar (sog. Kalibrierungsgerade).	56
Abbildung 3.3:	Ermittlung der R_{min} -Werte von HEK-293 Zellen zur Berechnung der entsprechenden Ca^{2+} -Konzentration.	57
Abbildung 3.4:	Ermittlung von R_{max} -Werten zur Berechnung der entsprechenden Ca^{2+} -Konzentration.	58
Abbildung 3.5:	Berechnung von Fura-2 Signalen in die korrespondierende Ca^{2+} -Konzentration.	59
Abbildung 3.6:	Ermittlung einer Dosiswirkungskurve von Thapsigargin und Ionomycin für HEK-293 Zellen.	61
Abbildung 3.7:	Analyse der Ca^{2+} -Homöostase in HEK-293 Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin und Ionomycin in unterschiedlichen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen.	63
Abbildung 3.8:	Messung des „store operated calcium entry“ (SOCE).	65
Abbildung 3.9:	Effekt von Tunicamycin auf die Ca^{2+} -Homöostase in HEK-293 Zellen.	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.10: Effekt der Calmodulin-Inhibitoren Trifluoperazine und Ophiobolin A auf die Ca^{2+} -Homöostase in HEK-293 Zellen.	69
Abbildung 3.11: Minimale, Maximale und ΔCa^{2+} -Werte von HEK-293 Zellen nach vorheriger Inkubation mit den Calmodulin Antagonisten Trifluoperazin und Ophiobolin A.	70
Abbildung 3.12: Ausschnitt der frühen zytosolischen Ca^{2+} -Werte von HEK-293 Zellen nach Gabe der Calmodulin Antagonisten Trifluoperazine und Ophiobolin A.	71
Abbildung 3.13: Analyse der Ca^{2+} -Homöostase in Hautfibroblasten vom Wildtyp und einer Y344H _(+/+) -Mutante nach Behandlung mit Thapsigargin.	72
Abbildung 3.14: Analyse der Ca^{2+} -Homöostase in Hautfibroblasten vom Wildtyp und einer Y344H _(+/+) -Mutante nach Behandlung mit Ionomycin.	73
Abbildung 4.1: Effekt einer 12-minütigen Inkubation von 4-PBA auf den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER.	77
Abbildung 4.2: Effekt einer 12-minütigen Inkubation von 4-PBA auf den zellulären Ca^{2+} -Gehalt nach Behandlung mit 4-PBA und Zugabe von Ionomycin.	79
Abbildung 4.3: Effekt einer 30-minütigen Inkubation von 4-PBA auf die ER Ca^{2+} -Homöostase.	81
Abbildung 4.4: Konzentrationsabhängiger Effekt von 4-PBA auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase.	83
Abbildung 4.5: Dosiswirkungskurve von 1 mM, 5 mM und 10 mM 4-PBA Inkubation.	86
Abbildung 4.6: Effekt auf das Ca^{2+} -Leck bei Tunicamycin-induziertem ER-Stress.	88
Abbildung 4.7: Statistische Analyse der Versuche aus Abbildung 4.6.	90
Abbildung 4.8: Effekt auf den Ca^{2+} -Leck bei Dithiotreitol-induziertem ER-Stress.	92
Abbildung 4.9: Effekt auf das Ca^{2+} -Leck bei Trifluoperazine-induziertem ER-Stress.	94
Abbildung 4.10: Statistische Analyse der Versuche aus Abbildung 4.8.	95
Abbildung 4.11: Analyse der Ca^{2+} -Homöostase in HEK293 Zellen nach 5 mM Phenylacetic Acid Inkubation.	97
Abbildung 4.12: Effekt von PAA auf die ER- Ca^{2+} -Homöostase.	98
Abbildung 4.13: Effekt von AZO auf die Ca^{2+} -Homöostase.	101
Abbildung 4.14: Statistik der in Abbildung 4.13 gezeigten Graphen.	103
Abbildung 4.15: Effekt von AZO auf die Ca^{2+} -Homöostase während TUNI-induziertem ER-Stress.	105
Abbildung 4.16: Statistik der in Abbildung 4.15 gezeigten Graphen.	107
Abbildung 5.1: Hypothesen der 4-PBA Wirkung auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$	115
Abbildung 5.2: Hypothese der konzentrationsabhängigen AZO-Wirkung.	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Einteilung der „niedermolekularen Chaperone“ (nach Ringe und Petsko, 2009; Cortez und Sim, 2014)	36
Tabelle 3.1:	Verwendete Geräte und Materialien.....	44
Tabelle 3.2:	Aufzählung der Bestandteile des Imaging-Systems des Experimentellen-Setups, das für die Fura-2 Fluoreszenzaufnahmen genutzt wurde.....	45
Tabelle 3.3:	Aufzählung der in dieser Arbeit benutzten Software und deren Fabrikanten.. ..	46
Tabelle 3.4:	Aufzählung der in dieser Arbeit benutzten Chemikalien und deren Fabrikanten.	46
Tabelle 3.5:	Aufzählung der in dieser Arbeit genutzten Substanzen, Wirkstoffe und deren Spezifikationen.	48
Tabelle 3.6:	Aufzählung der in dieser Arbeit genutzten Lösungen.	49
Tabelle 3.7:	Probelösungen des Fura-2 Kalibrierkits (Invitrogen) zur Ermittlung der systemspezifischen K_d	55
Tabelle 4.1:	Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.1 D-E.....	76
Tabelle 4.2:	Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.2 D-E.....	78
Tabelle 4.3:	Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.3 D-E.....	80
Tabelle 4.4:	Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.5 D-F.....	85
Tabelle 4.5:	Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.7 D-F.....	89
Tabelle 4.6:	Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.7 C-D.	98
Tabelle 4.7:	$\Delta 1$ -Werte der Versuche aus Abbildung 4.14 B.....	102
Tabelle 4.8:	$\Delta 2$ -Werte der Versuche aus Abbildung 4.14 C.....	103
Tabelle 4.9:	$\Delta 1$ -Werte der Versuche aus Abbildung 4.15 A.	106
Tabelle 4.10:	$\Delta 2$ -Werte der Versuche aus Abbildung 4.15 B.....	107

1. Zusammenfassung

In allen eukaryotischen Zellen fungiert das Endoplasmatische Retikulum (ER) als Zellorganell der Proteinsynthese und als Hauptspeicherorganell für Ca^{2+} und ist somit entscheidend für die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle. Der in der ER-Membran befindliche Sec61-Komplex dient hierzu als Proteintranslokase und wurde zudem als ein Ca^{2+} -Leckkanal beschrieben, durch den Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol permeieren. Zur Regulation dieses Ca^{2+} -Efflux stehen im Zytosol und ER-Lumen Proteine zur Verfügung, zu denen auch das im ER befindliche BiP gehört.

BiP zählt zu der Gruppe von Faltungshilfsprotein, die sog. Chaperone, und unterdrückt darüber hinaus das Ca^{2+} -Leck aus dem ER. ER-Stress führt zu einem ungewollten Ca^{2+} -Leck aus dem ER in das Zytosol, was die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle bis hin zur Apoptose verändert. Es hat sich gezeigt, dass chemisch hergestellte Chaperone unter anderem auch über dem Mechanismus der Proteinfaltung Zellen vor ER-Stress schützen können. Bisher ist jedoch der direkte Effekt von chemischen Chaperonen auf die Ca^{2+} -Homöostase und das Ca^{2+} -Leck von Zellen unzureichend untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit war es das Ca^{2+} -Leck durch Verwendung von bekannten Sec61-Modulatoren gesondert, sowie in Kombination mit zwei chemischen Chaperone 4-Phenylbutyrat (4-PBA) und Azoramid (AZO) vergleichend und funktionell zu erforschen. Hierzu wurden Ca^{2+} -Imaging-Experimente mittels des zytosolischen Ca^{2+} -Indikators Fura-2 an humanen HEK-293 Zellen durchgeführt und die Ca^{2+} -Homöostase dieser Zellen sowie deren Änderungen nach Behandlung mit obengenannten pharmakologischen Stoffen charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine 12-minütige Behandlung mit 4-PBA oder AZO zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Lecks bis hin zu ~75% führte. Auch nach pharmakologische induzierte ER-Stress führte die Behandlung mit den beiden chemischen Chaperonen zu einer deutlichen Reduktion des Ca^{2+} -Lecks ebenfalls bis hin zu ~75% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich ließ sich ein dosisabhängiger Effekt für 4-PBA und AZO herausstellen, wohingegen die Verlängerung der Behandlung mit 4-PBA auf 30 Minuten in einer geringeren Senkung des Ca^{2+} -Efflux resultierte. Der aktive Metabolit Phenylacetat (PAA) verringerte das zytosolische Ca^{2+} -Leck um mehr als ~50%. Ferner zeigte sich, dass die Inkubation mit 4-PBA zu einer Verringerung des gesamten zellulären Ca^{2+} -Gehaltes um ~50% führte. Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, das chemische Chaperone möglicherweise einen protektiven Effekt auf unter ER-Stress stehende Zellen aufweisen und die Ca^{2+} -Homöostase bzw. das Ca^{2+} -Leck positiv beeinflussen.

Abstract

In all eukaryotic cells, the endoplasmic reticulum (ER) functions as a major site of protein synthesis and as main releasable Ca^{2+} storage organelle. Thus, ER is crucial for the cellular Ca^{2+} -homeostasis in which the Sec61 complex, located in the ER membrane, serves as a protein translocase while also acting as Ca^{2+} leak channel allowing Ca^{2+} ions permeate into the cytosol. This aforementioned effect is referred to as Ca^{2+} efflux which is known to utilize regulatory proteins available in the cytosol and ER lumen including, but not limited to the ER luminal protein termed BiP. BiP belongs to the protein folding group named chaperones which assist in protein folding and also suppresses Ca^{2+} leak from the ER.

Furthermore, ER stress may cause Ca^{2+} leak from the ER into the cytosol altering cellular Ca^{2+} homeostasis to the point of apoptosis. Among other mechanisms, chemically produced chaperones, which induce protein folding, have also been shown to protect cells from ER stress. However, to this date studies are insufficient in identifying possible direct effects of chemical chaperones on cellular Ca^{2+} homeostasis and Ca^{2+} leak.

This scientific research aims to explore and characterize comparatively and functionally the Ca^{2+} leak by using known Sec61 modulators independently, as well as in combination with two chemical chaperones known as 4-phenylbutyrate (4-PBA) and azoramide (AZO). For this purpose, Ca^{2+} imaging experiments using the cytosolic Ca^{2+} indicator Fura-2 were performed on human HEK-293 cells and their cellular Ca^{2+} homeostasis.

A 12-minute treatment with aforementioned pharmacological agents 4-PBA or AZO resulted in a reduction of Ca^{2+} leak up to ~75%. Also, after pharmacological induced ER stress, treatment with the two chemical chaperones resulted in a significant reduction of Ca^{2+} leak also up to ~75% compared against the control group. In addition, a dose-dependent effect could be highlighted for 4-PBA and AZO, whereas prolongation of treatment with 4-PBA to 30 minutes resulted in a smaller reduction of Ca^{2+} efflux. The active metabolite phenyl acetate (PAA) decreased cytosolic Ca^{2+} leak by more than ~50%. Furthermore, incubation with 4-PBA was shown to result in a ~50% reduction in total cellular Ca^{2+} content.

In conclusion these results indicate that chemical chaperones may have a protective effect on ER-stressed cells and positively influence Ca^{2+} homeostasis and/or Ca^{2+} leak.

2. Einleitung

2.1. Das Endoplasmatische Retikulum (ER)

Im Jahre 1945 beschrieb Keith R. Porter et al. die uns heute als *endoplasmatische Retikulum* (ER) bekannte Struktur; er führte seine Experimente damals unter dem Elektronenmikroskop an Fibroblasten von Hühnern durch. In der Originalliteratur heißt es „a granular background and details of a darker lace-like reticulum which in places appears to be made up of chains of ‘vesicles’“, zu Deutsch frei übersetzt: “ein körniger Hintergrund mit Details eines dunkleren spitzenartigen kleineren Netzes, das stellenweise aus kleinen blässchenförmigen Ketten zu bestehen scheint“ (Porter et al., 1945; Puri und Morris, 2018). Heute wissen wir, dass in eukaryotischen Zellen das ER ein weitläufiges, dynamisches intrazelluläres, retikuläres (netzartiges) Membranennetzwerk ist (Friedman und Voeltz, 2011; Zimmermann, 2016). Zelltypabhängig stellt es mit > 10% des kompletten Zellvolumens (Voeltz et al., 2002) das größte membranhaltige Zellorganell dar (Phillips und Voeltz, 2016). Das ER als solches kommt essentiellen Funktionen innerhalb der Biogenese (Synthese und Translokation) von sekretorischen und Plasmamembranproteinen, deren Insertion in die ER-Membran, und der zellulären Ca^{2+} -Homöostase nach (Zimmermann, 2016; Zimmermann et al., 2011). Um die verschiedenen Aufgaben auszuüben, ist es in spezielle, morphologisch unterschiedliche Strukturen untergliedert. Hierzu zählt die äußere Kernmembran (NE) des Nukleus; das glatte „agranuläre“, bzw. „smooth“ *ER* (sER) ohne anhaftende Ribosomen; das transitionale ER (tER) und das raue, „rough“ *ER* (rER), an dem auf zytosolischer Seite Ribosomen gebunden sind (Puri und Morris, 2018; Schwarz und Blower, 2016). Aus diesen Einheiten bildet sich ein polygonales Netzwerk von tubulären, flachen „sheet“-ähnlichen, kurvigen und zisternenförmigen Membranen, die einen gemeinsamen luminalen Raum Formen und mit andere Zellorganellen über die sogenannte *Membran Kontakt Stelle* (MCS; engl. „membrane contact sides“) in Kontakt stehen (English und Voeltz, 2013; Friedman und Voeltz, 2011; Phillips und Voeltz, 2016). Durch die Verbindung von Ribosomen direkt mit der Membran des rER können Polypeptidketten parallel in das Lumen des rER translatiert und transloziert werden, von luminalen Chaperonen bei der Faltung unterstützt und posttranslationale Modifikationen unterzogen werden. Die drei großen Gruppen der vom rER synthetisierten Moleküle sind Sekretorische Proteine, integrale Membranproteine und luminal-residente Proteine des ER, des Golgi-Apparates, der Kernhülle und der Lysosomen (Mandon et al., 2013). Im Unterschied dazu bildet das sER den Platz der Synthese von Fettsäureabkömmlingen wie Cholesterol, Triacylglycerol, Phospholipide und Steroidmoleküle (darunter auch

Steroidhormone) sowie der Detoxifikation (McMaster, 2001; Puri und Morris, 2018). Darüber hinaus kommt das ER ebenfalls der wichtigen Funktion der *ER-Qualitätskontrolle* (ERQC) bei der Proteinassemblierung nach, die sich in drei Abschnitte gliedert: (I) Beschleunigung der Faltung, (II) Aktivierung der *unfolded protein response* (UPR) und (III) Demontage und Wiederverwertung der pathologisch gefaltete Substrate im Zuge der sogenannten *ER-assoziierten Degradation* (ERAD) bzw. der Ausschleusung ins Zytosol zur Autophagy (Moon et al., 2018; Morito und Nagata, 2015; Yoo et al., 2017). Durch die Vernetzung und Koordination mit intrazellulären Organellen übt das ER seine facettenreiche Rolle aus. Hierzu zählt insbesondere intrinsische und extrinsische Störungen wahrzunehmen, Stress Signale zu kombinieren und zu lenken, zelluläre Prozesse zu steuern und als zentraler Koordinator der Zelle, die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten (Moon et al., 2018).

2.2. Proteintransport ins ER

Um neu synthetisierte oder noch zu synthetisierende Vorläuferproteinen für die weitere Prozessierung in das Lumen des ER zu schleusen, stehen in Säugetierzellen zwei bekannte Wege zur Verfügung: cotranslationale und posttranslationale Translokation. Während der posttranslationale Weg über zytosolische Chaperone den *Hitzeschockproteinen* (HSP) der HSP Familie 70 und 90 funktioniert, basiert der cotranslationale Transportmechanismus auf dem *signal recognition particle* (SRP) (Abb. 2.1) (Lang et al., 2017; Zimmermann, 2016; Zimmermann et al., 2011). Der cotranslationale Transport scheint der in Säugetierzellen bevorzugte Importmechanismus von Proteinen zu sein (Zimmermann und Blatch, 2009).

2.2.1. Cotranslationale Translokation

Mit Beginn der Translation des Ribosoms im Zytosol der Zelle, entsteht eine naszierende *Polypeptidkette* (PPK), die aus der Unterseite der großen 60 *Svedberg* (S) *Untereinheit* (UE) des Ribosoms durch einen Tunnel nach außen tritt (Greber, 2016; Jha und Komar, 2011). Der SRP, ein 11S konservierter Ribonukleotidkomplex, bindet reversibel an eine spezifische hydrophobe Signalsequenz aus 15 bis zu 50 Aminosäuren (AS) am N-Terminus der naszierenden Aminosäurekette, sobald diese erscheint (Dudek et al., 2015; Martoglio und

Dobberstein, 1998; Walter und Blobel, 1983; Zimmermann et al., 2011). Die Signalsequenz weist einen positiv geladenen N-terminalen Abschnitt und eine polare C-terminale Region auf (Martoglio und Dobberstein, 1998), welche vom SRP erkannt und gebunden wird und zu zwei bekannten Interaktionen führt. Zum einen kommt es durch die Bindung von SRP an die großen UE des Ribosoms zu einer verzögerten oder pausierten Proteinsynthese, zum anderen vermittelt er die reversible Bindung des sogenannte *Ribosom-Nascent-Complex* (RNC) bestehend aus Ribosom, *Ribonukleinsäure* (RNA, engl. ribonucleic acid) und PPK mit *Signalpeptid* (SP) (Saraogi und Shan, 2011). SRP-vermittelt kommt es zum Transport und zur Bindung an die Ziel ER-Membran über die Interaktion zwischen SRP und der α -UE des *signal-recognition-particle receptor* (SR) (Saraogi und Shan, 2011). Dieser heterodimere SR-Komplex aus zytosolischer α -UE und ER-membranständiger β -UE überführt den RNC zielführend zum Sec61-Komplex (Shan et al., 2009). Dort angekommen vermittelt der SR den Transfer des RNC auf den Sec61-Komplex, wobei der Tunnel der 60S UE mit der PPK über die Pore des Sec61-Komplexes platziert wird (Jadhav et al., 2015). Gleichzeitig hydrolysiert der SRP-SR Komplex gebundenes *Guanosintriphosphat* (GTP) zu *Guanosindiphosphat* (GDP), der Komplex dissoziiert voneinander, wodurch die naszierende PPK dann die ER-Membran passieren oder als Transmembranprotein in diese inseriert werden kann (Lang et al., 2017). Kernkomponente des ER-Translokons bildet in Säugetieren der heterotrimere Sec61-Komplex, bestehend aus den drei UE Sec61 α , β , γ (Dudek et al., 2015). Für den Import von Proteinen in das ER-Lumen werden weitere Komponenten, wie das luminaire Chaperon *immunoglobulin heavy chain binding Protein* (BiP) oder ebenso *Glukose reguliertes Protein 78-kDa* (GRP78) genannt, BiPs Co-Chaperone und Membran-Rezeptoren Sec62/Sec63-Komplex und *ER-associated dnaJ protein* (ERj1), sowie dessen *nukleotid-exchanging-faktors* (NEF) *silence growth defects of IRE1 LHS1 double deleted strain* (Sil1) und *glucose-regulated protein 170* (GRP170) benötigt (Zimmermann et al., 2011). Anders als bei der posttranslationalen Translokation wird die naszierende PPK bis auf 70 AS, davon 40 AS im Ribosom und 30 AS um die ER-Membran zu überbrücken, mittels der Synthese am Ribosom aktiv in die Translokationspore eingeführt und so ein gerichteter Import ermöglicht (Beckmann et al., 1997; Liao et al., 1997; Ooi und Weiss, 1992).

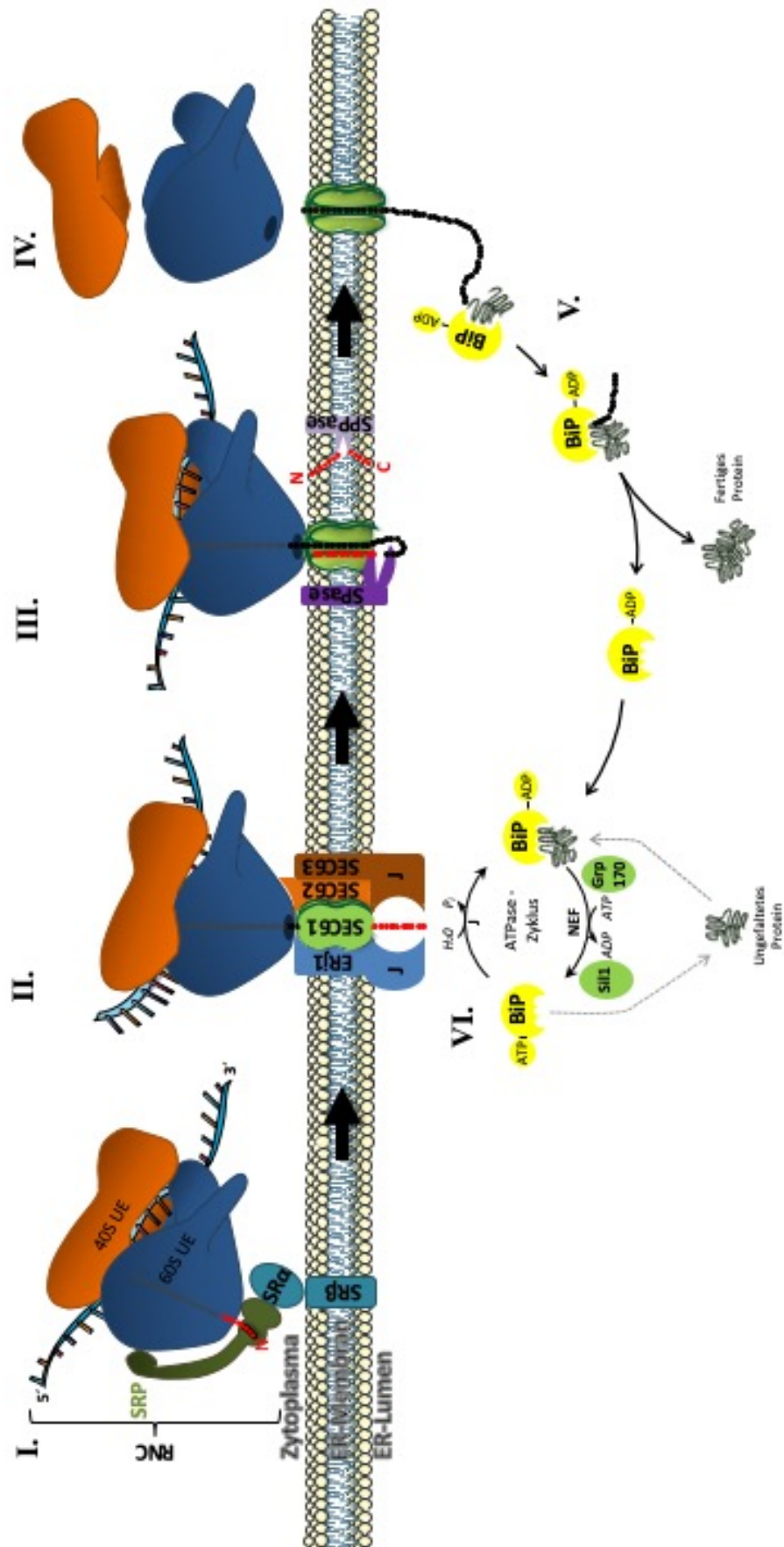


Abbildung 2.1: Cotranslationale Translokation von naszierenden Polypeptidketten in das ER (Nach Park und Rapoport, 2012; Zimmermann et al., 2011 modifizierte Abbildung).

I. Der *ribosom-nascent-complex* (RNC) bestehend aus kleiner und großer ribosomaler *Untereinheit* (UE: 40S/60S), RNA (hell blau), aus der 60S UE ragenden Polypeptidkette (grau) mit Signalsequenz (rot) und diese bindende *signal-recognition-particle* (SRP); bindet an die zytosolische α -UE des in der ER-Membrangebundenen *SRP-Rezeptor* (SR). Dieser Komplex wird durch die membrangebundene β -UE des SR zum Sec61-Translokon transportiert. **II.** Hier wird die Signalsequenz in die Kernkomponente des Sec61-Komplexes überführt und das Ribosom translatiert das Polypeptid weiter durch die Sec61 α -UE. **III.** Die Signalsequenz legt sich mit dem N-terminalen Ende in Richtung zytosolischer Seite des Sec61-Komplexes und die *Polypeptidkette* (PPK) wird zunehmend synthetisiert. Die Signalsequenz wird durch Hydrolyse von der *Signalpeptidase* (SPase) vom Rest der Aminosäurekette getrennt und wird im Anschluss innerhalb der ER-Membran mittels der *Signalpeptidpeptidase* (SPPase) ein letztes Mal hydrolysiert. **IV.** Nach vollständiger Translation der Polypeptidkette in das Lumen des ER löst sich das Ribosom von diesem und zerfällt in seine zwei UE. **V.** Auf ER-luminaler Seite nimmt das molekulare Chaperon *immunoglobulin heavy chain binding Protein* (BiP) die PPK entgegen und überführt dieses von einer ungefalteten in eine gefaltete Form. **VI.** Der *Adenosintriphosphat* (ATP)ase-Zyklus von BiP, der die Faltung der PPK beschleunigt, benötigt für den Zyklus sogenannte *Nukleotid Exchanging Faktoren* (NEFs) *Silence growth defects of IRE1, LHS1 double deleted strain* (Sil1) und Glukose *reguliertes Protein 170* (GRP170). Darüber hinaus sind die beiden zytosolischen J-Domänen des Sec61-Komplexes Erj1 und Sec62/Sec63 an der Hydrolyse von ATP zu *Adenosindiphosphat* ADP beteiligt. Im Detail wird der BiP-ATPase-Zyklus in Abbildung 2.2 erläutert.

2.2.1. Posttranslationale Translokation

Neben dem cotranslationalen Transportweg in das ER, welcher bevorzugt für exkretorische Proteine verwendet wird, steht der Zelle auch die posttranslationale bzw. SRP-unabhängige Translokation zur Verfügung, welche insbesondere der Substratversorgung für das ER selber dient (Muller und Zimmermann, 1987; Rapoport et al., 2017). In Säugetierzellen werden die Vorläuferproteine bereits im Zytosol an freien Ribosomen synthetisiert und dann von den dortigen HSP70 Chaperone samt derer HSP40 Cochaperone gebunden (Zimmermann et al., 2011). Durch diese Hilfsproteine, wozu auch *Calmodulin* (CaM) zu fallen scheint, wird zum einen die Faltung und Aggregation der Polypeptidketten unterbunden und gleichzeitig ein Transport zur zytosolischen Membranoberfläche des ERs ermöglicht (Ast et al., 2013; Rapoport et al., 2017). An dieser entsteht ein für die Translokation der PPK notwendiger Komplex, bestehend aus dem Sec61-Kanal mit Sec62/63-Komplex, welcher als erster Schritt das Sec61-Translokon in eine aktive Form mit geöffnetem Kanal überführt (Dudek et al., 2015; Linxweiler et al., 2017; Meyer et al., 2000; Tyedmers et al., 2000; Wu et al., 2019). Eine ER-spezifische Signalsequenz des Polypeptids, das sogenannte *Sekretorische Perkursor Polypeptid* (SPP) fungiert als Mediator für die Bindung zwischen der zu translozierenden Aminosäurekette und dem Sec61-Translokon/Sec62/Sec63-Komplex, wobei dieser zusammen mit BiP die Insertion von SPP in das Translokon erleichtert (Hassdenteufel et al., 2018). So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von SPP an ein Translokon Subkomplex BiP-reguliert

stattfindet (Lyman und Schekman, 1997) und es nach erfolgter Bindung zur Ablösung der Chaperone auf zytosolischer Seite kommt, wohingegen auf ER luminaler Seite das Chaperon BiP die PPK entgegennimmt und so das Protein vollständig in das Lumen des ER gelangt (Plath und Rapoport, 2000). Während das Polypeptid im Rahmen des cotranslationalen Transportes aktiv durch die Pore geschoben wird, fungiert im posttranslationalen Transportmodus BiP in Form einer molekularen Zahnrad-Ratsche, wodurch die Aminosäurekette mittels sukzessiver Assoziation mehrerer als Cluster gebündelter BiP-Proteine in das ER-Lumen importiert wird (Griesemer et al., 2014; Liebermeister et al., 2001; Matlack et al., 1999). Entsprechend des BiP-ATPase Zyklus sind bei diesem Vorgang ER luminaler Co-Chaperone und NEFs beteiligt, um das Protein zu internalisieren, wobei das Polypeptid noch während oder nach der Translokation entsprechend seiner Aufgabe und seines Zielortes auf luminaler Seite der ER Membran prozessiert wird (Zimmermann et al., 2011). Dazu stehen der *Signal Peptidase Complex* (SPC) sowie *Oligosaccharyl Transferase* (OST) und/oder die *Glykosylphosphatidylinositol* (GPI)-Transamidase zur Verfügung. Die posttranslationale oder auch SRP-unabhängige genannte Translokation ist die seltener genutzte Transportvariante in Säugetierzellen; wenn auch GPI-verankerten Membranproteine, wie z.B. spezifische Oberflächen Proteine auf Zellen wie Erythrozyten, nur über diesen Transportweg in die Membran inseriert werden (Zimmermann et al., 2011). Das Erkennen der mittels GPI-Transmembrandomäne zu verankernden Proteinen ist auf Grund einer speziellen weniger hydrophoben Signalsequenz gegenüber der nicht mittels GPI-Anker zu inserierender Membranproteine zu erklären (Goldshmidt et al., 2008; Zimmermann und Blatch, 2009). Um während der posttranslationalen und cotranslationalen Translokation einen Verschluss der Pore gegenüber einem ungewolltem Ca^{2+} -Verlust (Ca^{2+} -Leck) zu bewirken, sind zum einen BiP zusammen mit dessen Co-Chaperonen ERj3 und ERj6, sowie Ca^{2+} -*Calmodulin* (CaM) in Kollaboration mit dem Sec62-Protein als allosterische Effektoren, als auch zum anderen die Kanalstruktur selbst für den Verschluss des Kanals gegenüber dem Ca^{2+} -Leck und Stabilisierung der Ca^{2+} -Homöostase des ER beteiligt (Zimmermann, 2016).

2.3. Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone sind wichtige Enzyme der Proteinbiosynthese, welche einer strengen Transkriptionskontrolle unterstehen und verstärkt bei Glukose- und Ca^{2+} -Mangel, oxidativem oder ER-Stress, Toxin-Exposition oder einer Überlastung der Proteinsynthesekapazität im Rahmen einer übermäßigen Biosynthese exprimiert werden (Mattoo und Goloubinoff, 2014). Aktuell sind ~150 Gene für molekulare Chaperone auf dem menschlichen Genom bekannt, welche sich aus den HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP 40, HSP27 und vielen weiteren Co-Chaperonen zusammensetzten (Gestwicki und Shao, 2019; Hageman und Kampinga, 2009; Kampinga et al., 2009). Die wohl bekanntesten Vertreter sind die ER-residenten Chaperone BiP, *Proteindisulfidisomerasen* (PDI), *Calretikulin* (CRT) und dessen membrangebundenes Homolog *Calnexin* (CNX) (Dudek et al., 2009b).

Für die Proteinbiogenese kommen alle zelleigenen Faltungshilfsproteine drei additiven Aufgabenbereichen nach:

(I) Der *Adenosintriphosphat* (ATP)-abhängigen Faltung und dem Zusammenbau von neu importierten, naszierenden Polypeptidketten während der *de novo* Synthese oder der Auflösung von zusammengelagerten, metastabilen, möglicherweise toxischen Proteinaggregaten zur Ermöglichung der spontanen, nativen Neufaltung (Finka et al., 2016; Mattoo und Goloubinoff, 2014). Diese Mechanismen kommen sowohl bei korrekt synthetisierten als auch bei fehlerhaften Substraten zum Tragen, um sie in einen dennoch funktionierenden Zustand zu überführen. Fehlerquellen bei der Proteinfaltung können vielseitiger Herkunft sein und beispielsweise durch genetische Mutationen, fehlerhafte Transkription/Translation, zellulärer Stress oder toxische Metaboliten entstehen (Vembar und Brodsky, 2008). Dies führt dann wiederum zu exponierten, nicht nativen, hydrophoben oder hypoglykolisierten Bereichen innerhalb der Polypeptidkette der Proteine, an welche molekulare Chaperone binden, um eine Neufaltung zu initiieren und eine Aggregation zu verhindern (Behnke et al., 2015; Mekahli et al., 2011).

(II) Der Proteinqualitätskontrolle, so z.B. durch den Export von fehlerhaften oder nicht in ihre native Konformation zu überführende Polypeptide in das Zytosol für den dortigen Abbau durch Proteasomen (ERAD) (Dudek et al., 2009b).

(III) Einfluss auf die UPR durch Signaltransduktion zu Ribosom und Genom, falls das Proteinqualitätskontrolle-System durch fehlgefaltete und aggregierte Polypeptide überlastet wird (Oh et al., 2011). Auch weitere Chaperone kommen ebenfalls einer Ca^{2+} -bindenden Komponente nach und bilden somit im ER ein stark Ca^{2+} -haltiges Milieu, welches für die

korrekte Proteinfaltung notwendig ist (siehe Dudek et al., 2009b; Miyake et al., 2000). So könnte ihre Aktivität auf Ca^{2+} angewiesen sein, da drastische Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration im ER ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) zur Fehlfaltung von Polypeptiden führt, sowie ein Überschreiten der Proteinfaltungskapazität in die Induktion der UPR oder Apoptose übergehen kann (Romisch, 2004; Walter und Ron, 2011). Für Säugetierzellen sind drei ER-Membranständige UPR-Sensoren als zentrale Regulatoren der UPR bekannt (Fribley et al., 2009; Shu et al., 2018): Die zwei Kinasen *Proteinkinasen RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase* (PERK) und *Inositol-requiring Enzyme 1* (IRE1) sowie der Transkriptionsfaktor *Activating Transcription Factor 6* (ATF6). Diese besitzen jeweils eine ER-luminale Domäne für die Interaktion mit BiP, sowie zytosolische Domänen die entweder selektiv Transkription induzieren (IRE1/ATF6/XBP1-Signalweg) (Uemura et al., 2009; Yoshida et al., 2001) oder die globale Transkription und Translation verringern können (PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP-Signalweg) (Durose et al., 2009; Guan et al., 2014). Im Anschluss an die Translokation müssen insbesondere sekretorisch bestimmte Polypeptide, die etwa ein Drittel aller auf dem menschlichen Genom codierten Proteine ausmachen, für die jeweiligen speziellen Funktionen weiter prozessiert werden (Behnke et al., 2015). Zentrales Augenmerk liegt auf der korrekten Überführung in die Tertiär- und Quartärstruktur Struktur des Proteins, durch die im ER befindlichen Chaperone, zu denen insbesondere BiP, PDI und CRT/CNX zählen. PDI bildet Disulfidbrücken innerhalb des Polypeptids aus, CRT und CNX interagieren mit glykosylierten Kettenabschnitten (Mekahli et al., 2011). In diesem Zusammenspiel helfen sie gemeinsam die naszierenden Polypeptidketten und bereits im ER-Lumen vorkommende, ungefalteten Proteine in ihre richtige Konformation zu überführen. Gleichzeitig überwachen sie die Qualität dieses Prozesses und führen das Protein bei Versagen der Faltung dem Abbau über ERAD zu (Behnke et al., 2015). Dieser gesamte Prozess ist bekannt als ERQC.

2.3.1. BiP/GRP78

Das im ER-Lumen vorkommende, Ca^{2+} -abhängige, molekulare Chaperon BiP/GRP78 und in prokaryonten HSPA5 genannte Protein, ist Bestandteil der sogenannten *heat shock proteine 70-kDa* (HSP70) Familie (Dudek et al., 2009b; Howell, 2017; Melnyk et al., 2015). Der Name GRP78 ist auf die Experimente von Shiu et al. (1977) zurückzuführen, in der schnellwachsende Tumorzellen Zellen einer Depletion von Glukose ausgesetzt und GRP78 daraufhin verstärkt

exprimiert wurde (Shiu et al., 1977). Später wurde festgestellt, dass das im Nachhinein gleiche Protein, sich nicht-kovalent an inkomplett zusammengebaute, schwere Ketten von *Immunglobulinen* (Ig) innerhalb von prä-B-Lymphozyten band und auf den Namen BiP getauft wurde (Haas und Wabl, 1983). Wie wichtig dieses Protein für das Leben ist, zeigten Luo et al. (2006) im Rahmen ihrer Arbeit am Mausmodell, bei der die Deletion des BiP-Genlokus letal für die Versuchstiere endete (Luo et al., 2006). Sie zeigten, dass BiP für Zellproliferation und als Apoptoseschutz in der frühen Embryonalentwicklung von Mäusen notwendig ist. Die allgemeine Struktur von BiP besteht aus zwei Untereinheiten (siehe Mayer, 2010; Morshauer et al., 1995; Xu et al., 2018; Zhu et al., 1996): Zum einen aus einer ~ 44kDa großen am N-Terminus befindlichen Nukleotid-Binde-Domäne (NBD), die eine leichte ATP-Hydrolyse-Aktivität aufweist und in α -helikalen Strukturkonformationen angeordnet ist. Zum anderen aus einer ~ 25kDa großen Substrat-Binde-Domäne (SBD), die erstens aus einer β -Faltblattstruktur reichen Bindetasche (SBD β), zweitens aus einer beweglichen C-terminalen ~ 10kDa großen α -helikalen Verschluss-Domäne (SBD α), die je nach Funktionszustand die Peptidbindetasche öffnen oder verschließen kann, sowie drittens eine ungeordnete aus ~ 30AS bestehende Schwanzdomäne besteht. BiP kommt als zentrales Protein vielfältigen Zellfunktionen nach wie der co- und posttranslationalen Proteinsynthese, ERAD, der Ca²⁺-Bindung und Minimierung des Ca²⁺-Lecks aus dem ER via Sec61 α , sowie der Adaption auf ER-Stress mittels der UPR. So besitzt BiP als Chaperon die Fähigkeit fehlgefaltete und ungefaltete Proteine (UP) von ihrer primären in die korrekte Tertiär- und Quartärstruktur zu überführen und wird in seiner Funktionsweise von weiteren Interaktionspartnern wie Co-Chaperone, NEFs und Signalpeptiden beeinflusst (Dudek et al., 2009a; Melnyk et al., 2015). BiP erkennt dafür ungefaltete, hydrophobe Bereiche naszierender Polypeptidketten, mit Ausnahme von Glykoproteinen bei denen die meisten N-Glykosylierungsstellen spät in der AS-Sequenz auftreten (Behnke et al., 2015; Clerico et al., 2015; Griesemer et al., 2014; Pobre et al., 2019). Für glykosylierte Proteine stehen dafür die Lektine, lösliches CRT und membrangebundenes CNX zur Faltung in die native Konfirmation zur Verfügung (Melnyk et al., 2015; Molinari und Helenius, 2000). Die Eignung UPs transient, allosterisch zu binden und abzugeben, wird durch einen Zyklus von ATP-Bindung, Hydrolyse und Nukleotid Austausch reguliert, der zusätzlichen Co-Faktoren unterliegt (siehe Pobre et al., 2019). Dazu gehören sieben ER-localized DnaJ-like proteins (ERdjs/ERjs), welche als Co-Chaperone der klassischen HSP40 Familie zugerechnet werden und membrangebunden (ERj1, ERj2/Sec63, ERj4, ERj7) oder luminal (ERj3, ERj5, ERj6/p58^{IPK}) vorliegen (siehe Behnke et al., 2015; Melnyk et al., 2015). Diese können mittels ihrer J-Domäne mit BiP interagieren und so bei

dessen Funktionen während der Proteinfaltung (ERj3 und 6), ERAD (ERj4 und 5), Proteintranslokation (ERj1 und ERj2/Sec63), sowie UPR (ERj1) assistieren und beeinflussen. Es zeigte sich, dass unter ER-Stress, Glukose-Deprivation oder im Rahmen der UPR, BiP und seine Co-Chaperone zunehmend synthetisiert werden (Melnyk et al., 2015).

Nach aktuellem Forschungsstand geht man davon aus, dass BiP je nach Bedingung der Zelle mehrere Zustände einnehmen kann. In einer nativen Zelle mit normaler Homöostase bindet und verschließt BiP Sec61 α und liegt im Zytosol als *Adenosindiphosphat* (ADP)-ribosyliertes (Chambers et al., 2012) und möglicherweise phosphoryliertes Protein vor. In dieser Form könnte es als inaktiver BiP-Pool oligomerischer Moleküle im ER-Lumen gelöst sein und schnell bei sich ändernden Bedingungen (z.B. Ca²⁺-Verlust) reaktiviert werden (Behnke et al., 2015; Weitzmann et al., 2007). Beispielsweise wurden in zwei Studien an menschlichem und tierischem BiP (*Drosophila*) zwei Enzyme (*drosophila filamentation induced by cAMP* [dFIC] und *huntington yeast-interacting protein E* [HYPE]) detektiert, die durch ER-Stress zunehmen und die NBD von BiP mittels Ampylation modifizierten (Ham et al., 2014; Sanyal et al., 2015); das heißt sie spalten ein *Adenosinmonophosphat* (AMP). BiP ist entsprechend der HSP70 Familie ein ATP-abhängiges molekulares Chaperon, welches über eine niedrige intrinsische *Magnesium* (Mg²⁺)-abhängige ATPase-Aktivität verfügt und worüber die Funktion und Regulation der Bindung von Polypeptiden geschieht (Behnke et al., 2015; Xu et al., 2018). So kommt es mit Bindung von ATP zum Verschluss der NBD und dann zum allosterischen Informationsaustausch zur SBD, was mit Bindung von Substraten reziprok von der SBD zurück zur NBD verläuft (Mayer, 2013). Sobald der Energieträger ATP eine Bindung mit der NBD eingeht, induziert dies eine erhöhte Flexibilität der SBD, genauer der Bindetasche (SBD β), bei gleichzeitiger Öffnung der α -helikalen Verschlussdomäne (SBD α) (Pobre et al., 2019). Zudem wird die Substratbindetasche der SBD deutlich affiner für Polypeptide (10x - 50x) und die Assoziations- und Dissoziationsrate von Polypeptiden nimmt stark ab (9x – 400x) (Kityk et al., 2018). In Kristallstrukturmodellen konnte gezeigt werden, dass bei der ATP-gebundenen Form von BiP die *Verschlussdomäne* (VD) von der SBD an eine Struktur der NBD bindet und so eine feste, reversible Einheit aus NBD-SBD entsteht, welche mit der Hydrolyse von ATP erneut in unabhängig voneinander fungierende Enzymanteile zerfällt (Behnke et al., 2015). Durch diesen Vorgang verschließt sich die VD und die SBD geht in einen hoch-affinen Zustand für gebundene Polypeptide mit langsamen Binde- und Löseraten (Mayer, 2013). Neben der konformationsbedingten Regulation des ATPase-Zyklus von BiP wird dieser ebenfalls durch die aus der HSP40 Familie stammenden Co-Chaperone ERjs (syn. ERdjs/DnaJ) Proteine beeinflusst. Im Lumen des ER binden sie direkt an ungefaltete Peptide (Substrate) regulieren

deren Substrattransfer zur ATP-gebundenen Form von BiP und auch die Initiation der ATP-Hydrolyse, bei gleichzeitiger Fixation des Peptides durch den Schluss der VD (Behnke et al., 2015; Pobre et al., 2019). Einen großen Stellenwert nehmen bei diesen Prozessen die katalytisch aktive J-Domänen der vier luminalen ERjs 3 bis 6 ein (Melnik et al., 2015; Misselwitz et al., 1999) und üben wie im Folgenden beschrieben noch weiteren Einfluss auf die Faltung von Polypeptiden aus. So können sie die Affinität von BiP für ATP und dessen ATPase-Aktivität steigern, Substrate in dessen ADP-Status einschleusen, deren Anlieferung regulieren und dabei mithelfen an welcher Position, mit welcher Geschwindigkeit, welches Substrat von HSP70s gebunden wird (Behnke et al., 2015; Guo und Snapp, 2013; Melnik et al., 2015; Pobre et al., 2019). Wenn auch der genaue Mechanismus noch unklar ist, binden ERjs direkt an Peptide und transportieren sie zu BiP, um sie in den ATPase-Zyklus zu integrieren (Mayer und Kityk, 2015). Als ein Haupt Co-Chaperon konnte das luminaire ERj3 *in vitro* aufgezeigt werden, welches wie BiP unter ER-Stress verstärkt exprimiert wird, durch das konservierte *Histidin-Prolin-Aspartat* (HPD)-Motif der J-Domäne BiP's ATPase-Aktivität stimuliert, Substrate direkt bindet und zu BiP transportiert, wobei es die VD der SBD öffnet und somit die Bindung des beförderten Substrates erleichtert (Behnke et al., 2015; Jin et al., 2009; Marcinowski et al., 2011; Melnik et al., 2015; Shen und Hendershot, 2005).

Darüber hinaus zeigte sich, dass die hohe Ca^{2+} -Konzentration auf die ATPase-Aktivität von BiP hemmend wirken. Dies unterstreicht das erforderliche Zusammenspiel von BiP mit seinen Co-Chaperonen als Hilfsproteine (siehe Behnke et al., 2015; Lamb et al., 2006). So führt Ca^{2+} zu einer fast 1000-fach höheren Affinität von BiP für ADP und dadurch bedingt zur Verhinderung des Nukleotidaustausches mit verminderter ATPase-Aktivität. Für die Freisetzung eines gebundenen Proteins und den Wiedereintritt in den ATPase-Zyklus muss das in der NBD befindliche ADP gegen ATP getauscht werden, was unter physiologischen ATP-Bedingungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Substratfreisetzung und dessen Trennung von BiP Co-Chaperone abhängig ist (Marcinowski et al., 2011; Mayer und Kityk, 2015). Diese gleichzeitig stattfindenden Vorgänge machen den Bedarf einer weiteren Klasse regulatorische Enzyme notwendig, den sogenannten NEFs. Die zwei NEFs, S11 und GRP170, begünstigen schließlich durch ihre hohe Affinität BiP-ADP die Ablösung von ADP und die $\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Neubindung von ATP an die NBD und somit die Freisetzung des Substrates oder dessen Übermittlung zur Degradation (Behnke et al., 2015; Weitzmann et al., 2007).

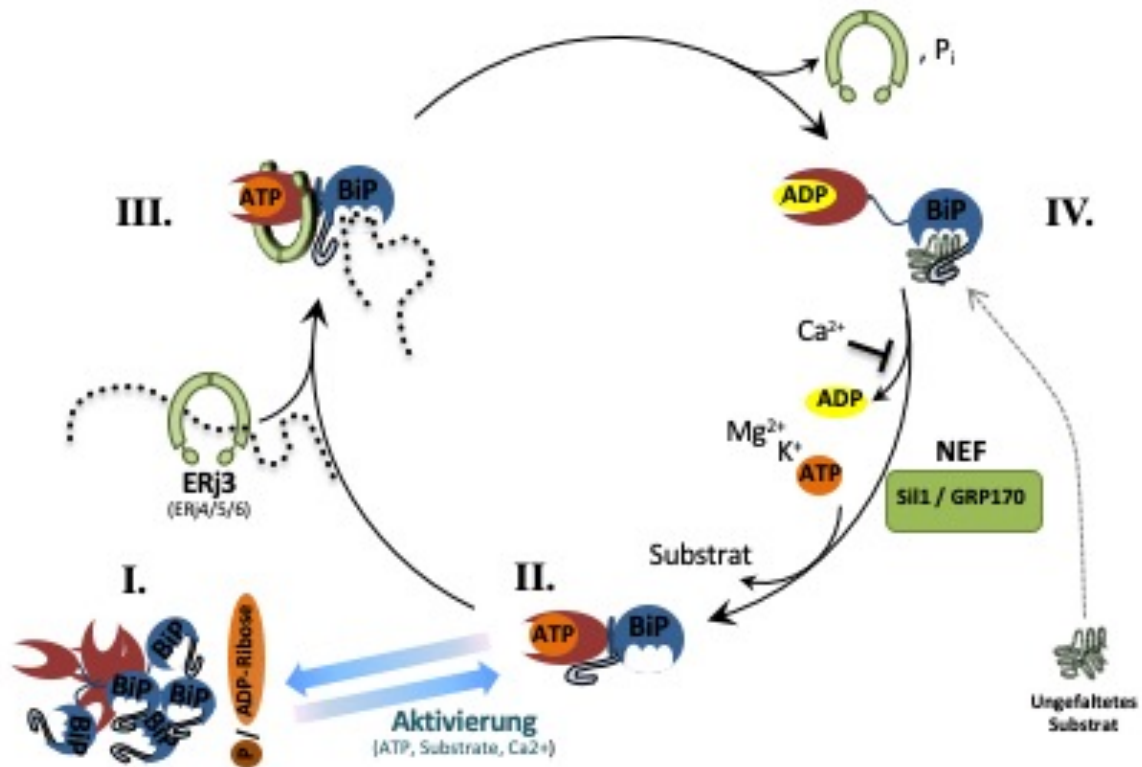


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von BiP im ER (Nach Behnke et al., 2015; Mayer und Kityk, 2015; Pobre et al., 2019 modifizierte Abbildung).

I. In der Abwesenheit von hohen Mengen ungefalteter Proteine (Substrate) wird BiP posttranslational durch Ampylylation modifiziert und dadurch inaktiviert. Ampyliertes BiP nimmt eine Struktur mit „Angedockter-Domäne“ ein, ähnlich dem ATP-gebundenen Status und liegt in multimerischer Form vor, in der es keine produktive Interaktion mit ERjs eingehen kann. Wenn der Bedarf an BiP steigt, werden die Modifikationen entfernt und so ein leicht zugänglicher Pool an BiP für eine mögliche Reaktivierung freigegeben. **II.** Sobald BiP ATP und K⁺ gebunden hat, kommt es zu einer Konformationsänderung die zu einer Struktur führt, in der sich BiPs SBD β (blau) und NBD (rot) in engem, kompaktem Kontakt zueinander und mit offener α -helikal Verschlussdomäne (SBD α = grauer haken) befinden. Die Kombination überführt BiP in eine Form, in der es ungefaltete Proteine (Substrate) mit leichter Affinität bindet und dessen Konformation dazu gedacht ist, das Substrat „herauszudrücken“. **III.** Substrate (gepunktete Linie) die mit J-Domäne enthaltenen Proteinen assoziiert sind, wie z.B. das DnaJ-like Co-Chaperone ERdj3 (grün), binden mit hoher Rate an die offene Konformation von HSP70, wodurch sie in den BiP-ATPase-Zyklus eingeführt und darüber auch der Zyklus reguliert werden kann. Nachdem das ungefaltete Protein initial von diesem gebunden und zu BiP transportiert wurde, steigert es die BiPs ATPase Aktivität während es gleichzeitig das Substrat an BiP anheftet. Die Substratbindung induziert den Verschluss der SBD und die Dissoziation der SBD von der NBD bei erhaltener Verbindung über die konservierte interdomäne Verbindung (dunkel blau), was zu einer Rotation der NBD Bindetasche hin zu einer Stellung führt, die optimal für die ATP-Hydrolyse ist (Mayer und Kityk, 2015). **IV.** Nach der Mg²⁺-abhängigen Hydrolyse von ATP, geht BiP in einen Status mit geringer Bindung und Freisetzung von Substraten über. Um das Substrat freizusetzen und für ein anderes Protein empfänglich zu sein, also BiP einen Wiedereintritt in den ATPase-Zyklus zu gewähren, muss ADP durch ATP ersetzt werden. Da das Ca²⁺-reiche Milieu des ER die ADP-Bindung begünstigt, wird die ADP Dissoziation durch die NEFs GRP170 und Sii1 katalysiert. Die Nukleotidaustausch-Reaktion von ADP mit ATP führt zur Insertion der interdomänen Verlinkung bei kompaktem Kontakt der NBD mit der SBD β mit Öffnung der SBD α und dadurch induzierten Freisetzung des Substrates bei hohen Raten.

2.3.2. *Calretikulin und Calnexin (CRT/CNX)*

Substrate die speziellen Aufgaben nachkommen sollen (z.B. Export, Transmembranproteine [Glykokalix] oder lysosomale Proteine), werden während der Translation im ER-Lumen mittels der *N-Oligosaccharyltransferase* (OST) mit *Oligosaccharylresten* (OSR) glykosyliert (Ellgaard und Frickel, 2003). Diese OSR sind mittels eines Dolichylrestes in der Membran verankert und binden mittels zwei Phosphat-Atomen den Oligosaccharylrest. Während des Transfers wird der OSR dann an das *Asparagin* (Asn) des *Asn-X-Ser/Thr*-Motif (Serin/Threonin) gebunden (Behnke et al., 2015; Gavel und Von Heijne, 1990). Anschließend werden durch die Glukosidase I & II jeweils eins der drei Glukose Moleküle entfernt bis nur noch ein Glukose-Molekül übrigbleibt und durch diese Modifikation die Polypeptidkette für die Lektine CRT und CNX markiert ist (Abb. 2.3) (Hammond et al., 1994; Vassilakos et al., 1998; Ware et al., 1995). CRT ist ein 46kDa, multifunktionales, Ca^{2+} -bindendes Chaperon, welches frei im Lumen des ER vorliegt (Michalak et al., 1999); wohingegen das 90kDa CNX als dessen membrangebundenes Homolog mittels einer zusätzlichen membrangebunden Domäne in das ER-Lumen ragt (Michalak et al., 2009). Die beiden verfügen über weitere Bindungsstellen für ATP, Ca^{2+} , Zink (Zn^{2+}), nicht-native Polypeptide und das Enzym *ER Protein-Disulfid Oxidoreduktase/Isomerase 57-kDa* (ERp57), was ein Interaktionspartner der zwei Lektine darstellt (Williams, 2006). So sind CRT/CNX für die Bindung und Faltung eines ungefalteten Glykopeptides nicht-kovalent an das Co-Chaperon ERp57 gebunden, welches über Disulfidbrücken das zu faltenden Substrat zentriert (Ellgaard und Frickel, 2003). Gemeinsam bilden diese 3 Moleküle den sogenannten „*Calretikulin/Calnexin-Zyklus*“ (CRT/CNX-Zyklus), welcher für die Faltung *de novo* synthetisierter (Glyko)-Proteine und die Qualitätskontrolle verantwortlich ist (Gelebart et al., 2005; Trombetta, 2003). Nach korrekter Faltung wird mittels Glukosidase II der letzte Glukoserest entfernt, das Substrat aus dem Lektin-Chaperon-Zyklus freigesetzt und entlang des sekretorischen Proteinsignalweges weiter transportiert, wobei der verbleibende OSR erst im Golgi-Apparat entfernt wird (siehe Behnke et al., 2015). Bei unvollständiger Faltung der Polypeptidketten im ER können die Substrate den Zyklus im Rahmen der ERQC-Maschinerie bis zu einer ausreichenden Konfiguration mehrfach durchlaufen, beziehungsweise bei Misserfolg der korrekten Faltung der ERAD zugeführt werden.

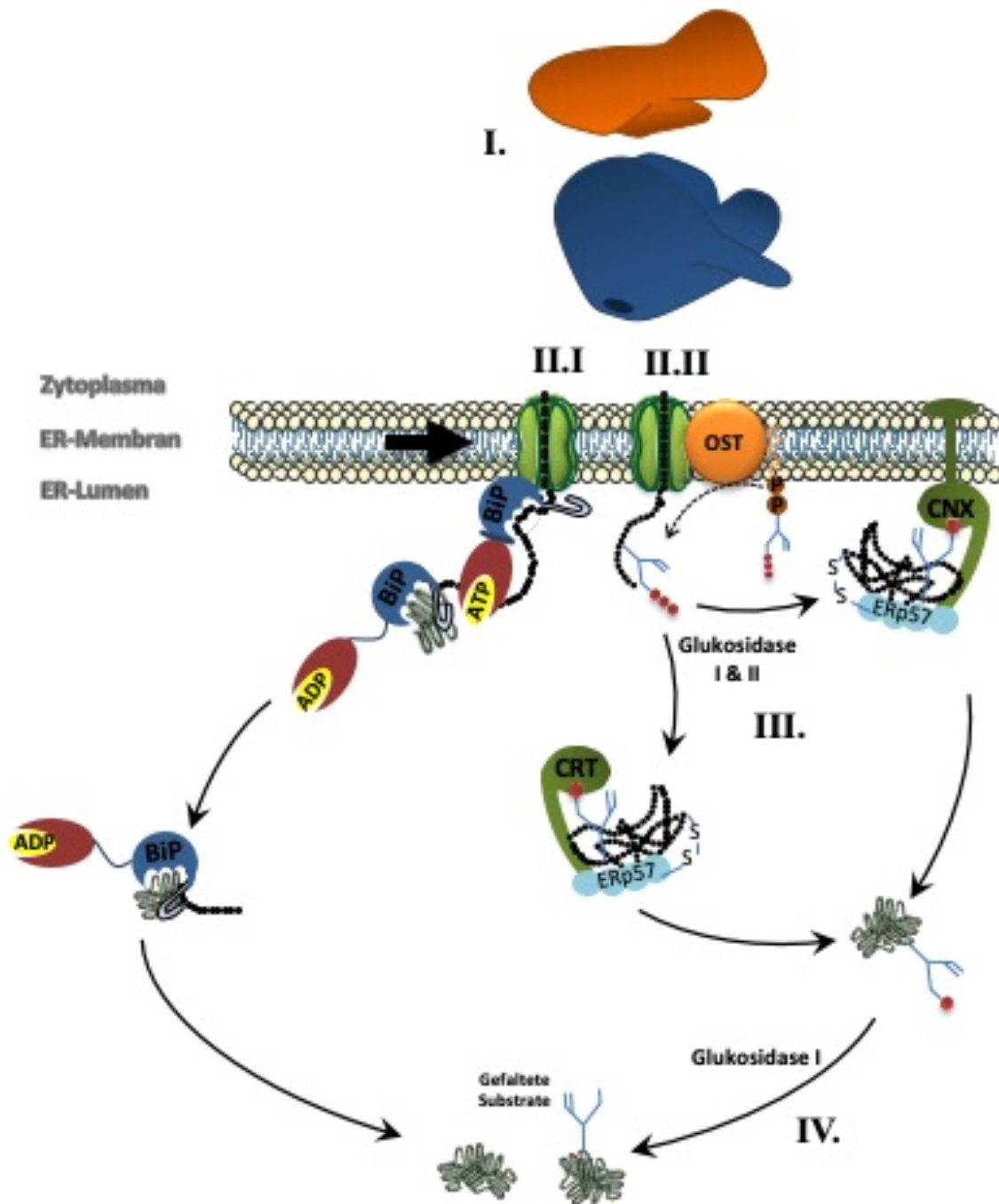


Abbildung 2.3: Prozessierung von Proteinen (Nach Zimmermann et al., 2011 modifizierte Abbildung).

I. Nach vollendeter Translation löst sich das Ribosom von Sec61 und zerfällt in seine beiden Untereinheiten. Für die weitere Faltung von der Polypeptidkette (PPK) stehen je nach Endziel des Substrates zwei Stoffwechselwege zur Verfügung. Für vornehmlich das ER bestimmte Substrate steht II.I. und für exokrine Substrate II.II. zur Verfügung. **II.I.** Das freie HSP70 Chaperon BiP nimmt luminal die naszierende und nicht glykosylierte PPK auf und hilft bei der weiteren Faltung. **II.** Den durch die *N-Oligosaccharyltransferase* (OST) glykosylierte PPK werden mittels Glukosidase I & II jeweils ein Glukose-Molekül entfernt. **III.** Anschließend bindet die letzte Glukose-Molekül reversibel an freies *Calretikulin* (CRT) oder membrangebundene *Calnexin* (CNX). Für die Bindung und Faltung ist die PPK neben den beiden Lektinen zur Zentrierung zusätzlich über Disulfidbrücken mit *ER Protein-Disulfid Oxidoreduktase/Isomerase 57-kDa* (ERp57) gebunden. **IV.** Nach vollendeter Faltung wird mittels Glukosidase II der letzte Glukoserest entfernt. Der verbleibende Oligosaccharylrest wird nach dem Transport in den Golgi-Apparat entfernt.

2.3.3. *Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI)*

Innerhalb der PDI-Familie von Säugetieren sind aktuell 20 Proteine bekannt, die verschiedene Funktionen in oxidativer Faltung von Proteinen im ER erfüllen (Kozlov et al., 2010). Das lösliche, heterodimere ERp57, auch *Glukose reguliertes Protein* 58 kDa (GRP58) oder *Protein Disulfid-Isomerase A3* (PDIA3) genannt, stellt den bekanntesten Vertreter der humanen PDI dar, welche aus 4 Thiothredoxin-ähnlichen Domänen bestehen (a, a' und b, b') (Ellgaard und Ruddock, 2005; Turano et al., 2011). So können dessen 2 katalytischen Domänen (a, a') oxidative Faltung, Reduktion und Isomerisation von *N*-Glykoproteine vollziehen (Dong et al., 2009; Frickel et al., 2004; Williams, 2006). Dazu muss ERp57 im Falle des CRX/CNX-Zyklus zunächst mit den positiv geladenen Abschnitten der beiden Domänen (b, b') eine Verbindung mit dem negativ geladenen Abschnitt der P-Domäne von den Lektinen CRX/CNX eingehen (Kozlov et al., 2006). Dies geschieht auf der einen Seite durch Isomerisierung nicht-nativer, sowie den Austausch bestehender Disulfidbrücken und auf der anderen Seite durch Oxidation von Thiol-/*Sulphydrylgruppen* (SH-Gruppen) (Ali Khan und Mutus, 2014). Es wurde gezeigt, dass PDI eine von der Isomeraseaktivität unabhängige, intrinsische Chaperonaktivität besitzt und dessen Promotor ein *ER stress response element* (ERSE) darstellt, das wie bei diversen Chaperone eine gesteigerte Eigenproduktion in Anpassung an ER-Stress und die UPR ermöglicht (Castillo et al., 2015; Wang et al., 2015). Es gibt noch weitere Oxidoreduktasen im ER-Lumen wie z.B. ERCalcistorin/PDI und ERp72, welche ebenfalls der Rolle von Ca²⁺-Bindung (Pufferung) nachkommen und so einen wesentlichen Bestandteil des Gleichgewichtes der Ca²⁺-Homöostase des ER bilden (Coe und Michalak, 2009).

2.3.4. **GRP94**

Glukose reguliertes Protein 94-kDa (GRP94), auch als Endoplasmin und *Heat shock protein 90-kDa beta member 1* (HSP90B1) bezeichnet, ist ein ER-residentes molekulares Chaperon der HSP90 Familie (Chen et al., 2005). Anders als BiP spielt es eine wichtige Rolle in der Proteinfaltung von sekretorischen und membranspezifischen Proteinen, wie beispielsweise Toll-Like-Rezeptoren auf Immunzellen, wohingegen sich in der gleichen Arbeit von Randow et al. (2001), kein Einfluss von GRP94 auf die ER-Stress-Toleranz der Zellen zeigte (Randow und Seed, 2001). Dennoch gehört GRP94 zu den ER-Stress Genen, welche im Rahmen der UPR hochreguliert werden; dies erklärt sich aufgrund seiner Funktion im Rahmen der ERQC

(Ostrovsky et al., 2009). Ebenfalls kann es im Rahmen der Proteinfaltung spezieller Proteine wie beispielsweise Ig zu direkter, ternärer Komplexbildung zwischen GRP94 und BiP mit dem Substrat kommen; auch weitere Studien haben ein funktionelles Zusammenspiel zwischen HSP70 (BiP) und HSP90 (GRP94) gezeigt (Ostrovsky et al., 2009; Sun et al., 2019). So konnten Sun et al. (2019) herausstellen, dass (1) BiP die ATPase-Aktivität von GRP94 erhöht, (2) die Interaktion zwischen diesen nukleotidspezifisch ist (20-fach höher, wenn BiP ADP gebunden hat) und die Bindung zwischen der NBD von BiP und der mittleren Domäne von GRP94 stattfindet, (3) BiPs SBD konformationsbedingt verantwortlich ist für die niedrige Affinität von GRP94 in BiPs ATP-gebundenen Zustand, (4) BiP und GRP94 nur in Verbindung gehen können, wenn BiP in der ADP-Konfiguration ist. Darüber hinaus zeigt GRP94 eine Funktion als Immun-Chaperon, ähnlich einem Zytokin fungierend. Es wird von nekrotischen Zellen freigesetzt, durch spezifische CD91 Rezeptoren auf dendritischen Immunzellen in diese internalisiert und induziert dadurch die angeborene sowie die erworbene Immunantwort mit Ausschüttung von IL-12 und TNF α (Schild und Rammensee, 2000). GRP94 ist eines der am meisten vorkommenden Ca²⁺-puffernden Proteine im ER, welches zwar eine geringe Affinität, dafür aber eine hohe Kapazität mit 15 Ca²⁺-Bindungsstellen aufweist (Coe und Michalak, 2009).

2.4. Ca²⁺-Homöostase

Für Aufrechterhaltung und Funktionsfähigkeit intrazellulärer Stoffwechselprozesse und Signalwege stellt Ca²⁺ einen universellen und unerlässlichen Botenstoff dar (Berridge et al., 2000). So spielt Ca²⁺ bei verschiedensten physiologischen Prozessen in unterschiedlichen Zelltypen eine zentrale Rolle. Das breite Spektrum reicht von Transmitterausschüttung in Synapsen von Neuronen und damit verbundenen Lern- und Gedächtnisprozessen, Proteintransport, Transkription, Muskelkontraktion (Berridge et al., 2003; Berridge et al., 2000), Sekretionsprozesse wie Endo- und Exozytose (Clapham, 2007), über Zellproliferation, Differenzierung bis zur Aktivierung von zytotoxischen T- und Killerzellen im Rahmen einer Immunreaktion (Schwarz et al., 2013). Der Einfluss von Ca²⁺ auf Enzyme, Transporter und Ionenkanäle als auch die Tatsache, dass eine Hyperkalzämie toxische Folgen bis hin zur Induktion der Apoptose für die Zelle zur Folge haben kann (Clapham, 2007; Pinton et al., 2008; Shah et al., 2006), unterstreicht die Wichtigkeit ein intrazelluläres Ca²⁺-Gleichgewicht zu

erhalten. Dafür hat jede Zelle die Möglichkeit mittels chemischer und physikalischer Signale intrazellulär gelegene Ca^{2+} -Speicher zu entleeren oder aus dem *Extrazellularraum* (EZR) zusätzliches Ca^{2+} über Kanäle direkt zu rekrutieren und mit Ca^{2+} -puffernden Proteinen zu binden (Arruda und Hotamisligil, 2015; Clapham, 2007) (Abb. 2.4). Jeder Zelltyp weist entsprechend seiner physiologischen Anforderungen eine einzigartige Kombination dieser Pumpen und Kanäle (Berridge et al., 2000), Proteine und intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher auf. Säugetieren besitzen neben dem ER, als größtes Ca^{2+} -Hauptspeicherorganell, das Mitochondrium, den Golgi-Apparat sowie den Zellkern zur Ca^{2+} -Speicherung (Phillips und Voeltz, 2016), die alle membrangebunden mit dem ER via MCS in Kontakt stehen (English und Voeltz, 2013; Prakriya und Lewis, 2015). Während die freie Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol, in dieser Arbeit als $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dargestellt, nur bei ~ 100 nM (50–200 nM) liegt, zeigt sich ein etwa 5,000 – 60,000-facher Unterschied zum totalen luminalen Ca^{2+} -Gehalt im ER, der bei 1–3 mM liegt, wobei das freie, nicht gebundene Ca^{2+} , in dieser Arbeit als $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ benannt, im Mittel auf ~ 400 μM (von 50 - 800 μM) geschätzt wird (Carreras-Sureda et al., 2018; Coe und Michalak, 2009; Michalak et al., 2009; Yang et al., 2019). Die Ca^{2+} -Konzentration im EZR, in dieser Arbeit als $[\text{Ca}^{2+}]_e$ beschrieben, weist eine Konzentration von 1-2 mM auf und ist damit je nach Literatur zwischen 5000- und 40000-fach größer im Vergleich zur $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Carreras-Sureda et al., 2018; Clapham, 2007).

Folgende Krankheiten können hieraus beispielhaft pathomechanisch abgeleitet werden: Die Fehlregulation der Ca^{2+} -Homöostase kann neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Chorea Huntington begünstigen (Bezprozvanny, 2010; Demuro et al., 2010) und fehlerhafte spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle Migräne, Epilepsie, Ataxie und muskuläre Paralysen sowie Herzrhythmusstörungen bedingen (Lorenzon und Beam, 2008; Zamponi et al., 2010). Dass ein Abfall von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ eher als ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Apoptose induziert (Mekahli et al., 2011), zeigt wie wichtig es für das ER ist, die Ca^{2+} -Homöostase aufrechtzuerhalten.

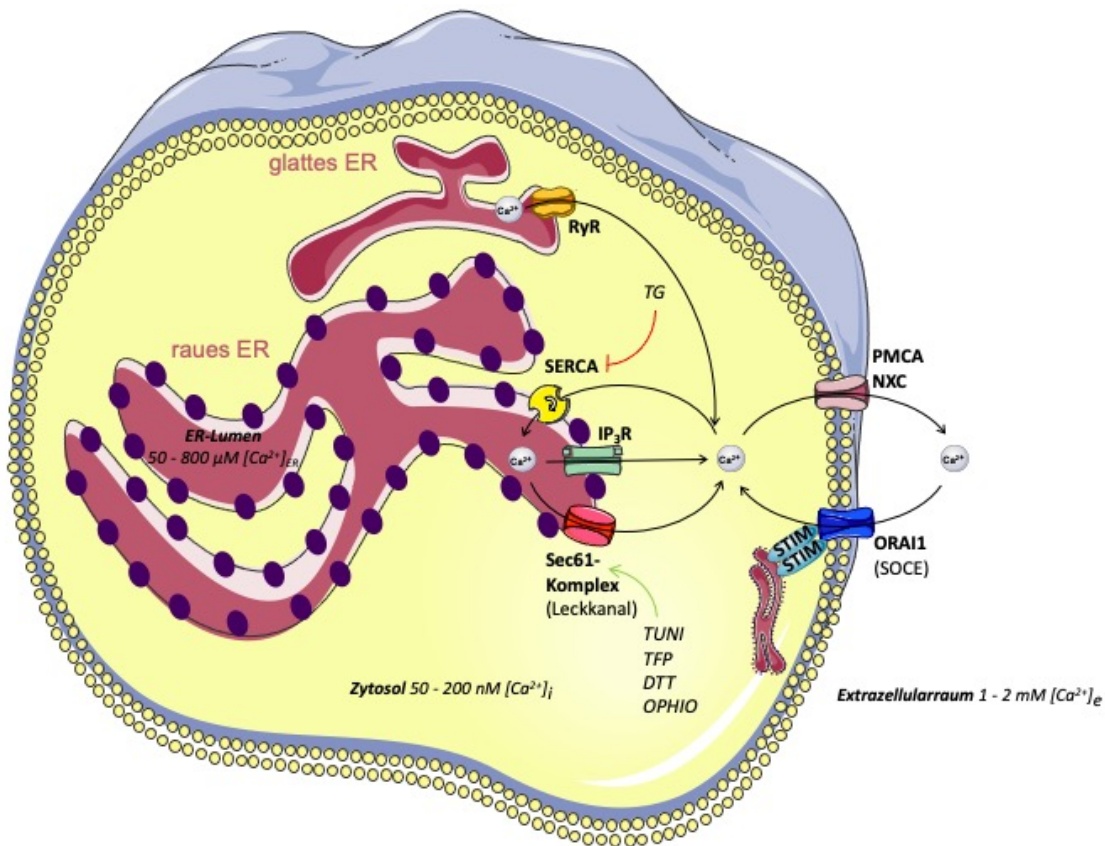


Abbildung 2.4: Aufrechterhaltung der $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase der Zelle.

Schematische Darstellung von Ionen-Transportern/Kanälen die an der Aufrechterhaltung der $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase entgegen der Konzentrationsgradienten beteiligt sind. Die in ruhenden Zellen bestehende zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von ~ 100 nM/l ist im Vergleich zur Konzentration des Extrazellulärraum (EZR) ~ 1 mM/l und dem Lumen des ER ~ 200 μ M/l deutlich niedriger. Für einen gerichteten Ca^{2+} -Efflux aus dem Zytosol sorgen ATP-abhängig zum einen die Ca^{2+} -ATPasen SERCA (ER) sowie PMCA (Plasmamembran) als auch energieunabhängig über den Na^+/Ca^{2+} -Exchanger (NCX) (Plasmamembran), der drei Na^+ -Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion tauscht. Für einen aktiven Ca^{2+} -Influx in das Zytosol sorgen in der ER Membran des rauhen ER der ligandgesteuerte Inositol 1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor (IP_3R), sowie passiv als Leck-Kanal der Sec61-Komplex (Ca^{2+} -Leck). Eine sinkende $[Ca^{2+}]_{ER}$ führt zur Oligomerisation zweier STIM Molekül, die nach anschließender Diffusion der ER-Membran zur Plasmamembran durch Interaktion mit den dort resident vorliegenden Orai-Kanälen zu deren Aktivierung führen. Dies bewirkt einen aktiven Ca^{2+} -Influx aus dem EZR in das Zytosol, dem store operated calcium entry (SOCE), und ermöglicht mit Hilfe der SERCA ein Nachfüllen des wichtigsten Ca^{2+} -Speicherorganells der Zelle, dem ER. Zur Unterbrechung dieses Vorganges und Demaskierung des sogenannten Ca^{2+} -Lecks, kam bei den Experimenten der SERCA-Pumpen Inhibitor Thapsigargin (TG) zum Einsatz. Zur Vergrößerung des Ca^{2+} -Lecks und Induktion von ER-Stress auf die Zelle, wurden die ER-Stressoren Ophiobolin A (OPHIO) und Trifluoperazin (TFP) als CaM-Antagonisten sowie Tunicamycin (TUNI) und Dithiothreitol (DTT) verwendet, welche dagegen ER-Stress durch Anhäufung missgefalteter Proteine verursachen. Das glatte ER dient insbesondere in Muskel- und Nervenzellen als Ca^{2+} -Speicher. In diesen erfolgt die Freisetzung von gespeichertem Ca^{2+} in das Zytosol, über den in der ER-Membran befindlichen Ryanodin-Rezeptoren (RyR).

2.4.1. Pumpen und Kanäle der Zellmembran

Weil das $[Ca^{2+}]_i$ bei 50 - 200 nM und das $[Ca^{2+}]_e$ bei ~ 1-2 mM liegt, pumpt die sogenannte *Plasma Membrane Calcium-ATPase* (PMCA) kontinuierlich unter Energie (ATP)-Verbrauch Ca^{2+} gegen den Konzentrationsgradienten aus dem *Intrazellularräum* (IZR) in den EZR (Brini und Carafoli, 2009). Darüber hinaus ist in der Plasmamembran der *Natrium-Calcium-Exchanger* (NCX) lokalisiert, der Ca^{2+} gegen Natrium (Na^+) aus dem EZR austauscht und in der Regulation des $[Ca^{2+}]_i$ mit der PMCA kooperiert (Brini und Carafoli, 2011). Dessen Aktivität wird ebenfalls durch die Interaktion mit dem zytosolischen Ca^{2+} -Sensorprotein CaM reguliert (Chou et al., 2015). Neben dem NCX gibt es beispielsweise ebenfalls liganden- bzw. rezeptorgesteuerte oder auch spannungsgesteuerte Kanäle. Ein Beispiel für rezeptorgesteuerte Kanäle sind Glutamatrezeptoren, welche agonistisch durch *α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure* (AMPA), *N-Methyl-D-Asparta* (NMDA) und Kainate aktiviert werden können und als zentraler Baustein bei der Langzeitpotenzierung und Gedächtnisbildung im menschlichen Gehirn eine Rolle spielen (Traynelis et al., 2010). Ein Beispiel für ligandengesteuerte Kanäle ist der *γ -aminobutyric acid* (GABA)-Rezeptor in der Plasmamembran von Nervenzellen (Rudolph und Knoflach, 2011). Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, die nach elektrischer Stimulation für einen Ca^{2+} -Influx sorgen, finden sich vermehrt z.B. in endokrinen, exzitatorischen, neurokrinen Zellen oder in Herzmuskelzellen (Catterall, 2011).

2.4.1.1. Ca^{2+} -Einstrom-Kanäle

An dieser Stelle ist der in der Zell-Plasmamembran befindliche Orai-Kanal zu erwähnen, der zusammen mit dem in der ER-Membran befindlichen *stromal interaction molecule 1* (STIM1) in Interaktion steht (Putney, 2009). Demnach fungiert STIM1 als ER-luminaler Ca^{2+} -Sensor, der bei zu niedriger $[Ca^{2+}]_{ER}$ in eine ungefaltete Konfiguration übergeht. Durch die Konfigurationsänderung kann das oligomerisierte STIM1 über eine STIM1-Orai Kopplung zur Aktivierung und Permeation von Orai-Kanäle führen (Fahrner et al., 2013). Dies führt zu einer Permeabilitätszunahme der Zellmembran für Ca^{2+} und somit zu einem starkem Ca^{2+} -Influx aus dem EZR in das Zytosol (Stathopoulos und Ikura, 2013). Dieser zelluläre Mechanismus trägt den Namen *store operated calcium entry* (SOCE) oder auch *kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom* (CCE) und wurde schon 1990 von James W. Putney in einer Hypothese erarbeitet (Putney, 1990).

2.4.2. Pumpen und Kanäle der ER-Membran

Das ER benötigt mindestens drei Proteine, um als intrazelluläres Ca^{2+} -Reservoir gerecht zu werden. Diese sind in der zellulären Plasmamembran und der Membran des ER lokalisiert. Als wichtigster Vertreter ist hier die *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Calcium-ATPase* (SERCA-Pumpe) zu nennen. Diese sorgt ebenfalls wie PMCA unter Energieverbrauch für einen kontinuierlichen, gerichteten Einstrom von Ca^{2+} aus dem Zytosol in das mit höherer Ca^{2+} -Konzentration vorliegende ER-Lumen (Berridge et al., 2003; Clapham, 2007). Für die Freisetzung von gespeichertem Ca^{2+} in das Zytosol befinden sich zum einen in der ER-Membran der *Ryanodin-Rezeptoren* (RyR), welcher insbesondere in Muskel- und Nervenzellen exprimiert wird und zum anderen der unspezifische Kationenkanal bzw. der *Inositol 1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor* (IP₃R); dieser kommt ubiquitär in Zellen vor, die unter anderem über einen zytosolischen, als auch einen ER-luminalen Ca^{2+} -Sensor Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration wahrnehmen und danach ihre Porenöffnung mit verschiedenen Öffnungsgrade regulieren oder die Sensitivität für deren Liganden durch Konfigurationsänderung des Komplexes modulieren (Miyakawa et al., 2001; Paknejad und Hite, 2018; Seo et al., 2015). Die Folge der Öffnung dieser Kanäle ist ein gerichteter Ca^{2+} -Efflux aus dem ER in den IZR (Prakriya und Lewis, 2015). Um die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ konstant zu bewahren, halten sich Ca^{2+} -Einstrom über die SERCA sowie der Ca^{2+} -Leckstrom und gezielte Ausstrom über verschiedene Kanäle die Waage (Camello et al., 2002). So gibt es Kanäle in der ER-Membran, die zu einem passiven Ausstrom, dem sogenannten Ca^{2+} -Leck aus dem ER führen, worunter der Sec61-Komplex gezählt wird (Lang et al., 2011).

2.4.2.1. Der Sec61-Komplex als Ca^{2+} -leitender Ionenkanal

Für die Translokation eines naszierenden Proteins vom Zytosol in das ER-Lumen nimmt der heterotrimere Sec61-Komplex als Translokase eine fundamentale Rolle ein (siehe Abb. 2.1, II.) (Zimmermann et al., 2011). Die Pore dieses beweglichen, protein-leitenden Kanals setzt sich bei Eukaryonten aus den drei Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β sowie Sec61 γ zusammen (Gorlich et al., 1992; Gorlich und Rapoport, 1993; Lang et al., 2017). Die größte und auch Pore-bildende Untereinheiten (Sec61 α , besteht aus zehn *Transmembrandomänen* (TMD) sowie einer zytosolischen C- und N-Domäne (Voorhees und Hegde, 2016). Sie wiederum ist von den einzelnen peripheren Untereinheiten Sec61 β und Sec61 γ umgeben (Pfeffer et al., 2015). Der

zentrale Sec61 α -Kanal (Eukaryonten), Sec61Y in Prokaryonten, wird im inaktiven Zustand von einer in der TMD2a befindlichen „Plug“-Helix verschlossen und muss für den Proteintransport verlagert werden (Lang et al., 2017). Darüber hinaus bildet der Bereich, in denen sich die *Transmembran-Helices* (TMH) 2/3 mit den TMH 7/8 berühren, ein sogenanntes „laterale gate“, was den Übertritt von naszierenden Proteinen in die Membran ermöglicht (Lang et al., 2017; Voorhees und Hegde, 2016). Daneben liegt der heterotrimere Sec61-Komplex in direkter Nachbarschaft zu den in Dimer vorliegenden Sec62/Sec63-Komplex. Auch die Interaktion weiterer Transportkomponenten mit dem Sec61-Komplex spielen eine wichtige Rolle für die Überführung gelöster Proteine in das ER-Lumen, sowie deren laterale Integration als Membranproteine. So kann der heterotetramere *Translokation assoziiertes Protein*-Komplex (TRAP) allosterisch zur Öffnung der Pore beitragen, weshalb ihm eine noch unbekannte substratspezifische Funktion beigemessen wird (Lang et al., 2017). Der sogenannten OST-Komplex kann Polypeptidketten in das ER-Lumen immigrieren bzw. diese schon während der Membraninsertion durch das Anknüpfen von Oligosacchariden, der sogenannten kovalenten cotranslationalen N-Glykosylierung, modifizieren und prozessieren (siehe Abb. 2.3) (Pfeffer et al., 2014). Neben den beiden Komplexen nimmt ebenfalls das im ER luminal gelegene HSP70 Chaperon BiP eine zentrale Rolle bei der reibungslosen Translokation und Faltung ein (siehe Abb. 2.1, 2.3) (Schorr et al., 2015). Es wird postuliert, dass der Sec61 α -Kanal undurchlässig für Ca²⁺-Ionen während der Translokation ist, wenn das Polypeptid den Kanal füllt. Nach der Translokation befindet sich der Sec61 α -Kanal in einem geöffneten Zustand, wodurch es zu einem passiven Ca²⁺-Efflux kommt (Lang et al., 2017). Dadurch permeieren die Kationen dem hohen Gradienten folgend [ca. 400 μ M [Ca²⁺]_{ER} und ca. 100 nM [Ca²⁺]_i] aus dem ER in das Zytosol, was als Ca²⁺-Leck bezeichnet wird. Deshalb liegt es nahe, dass eine Vielzahl von akzessorischen Substraten den Offenheitszustand von Sec61 α regulieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das ER luminal gelegene HSP70 Chaperon BiP gemeinsam mit den luminalen HSP40 Cochaperonen ERj3/ERj6, aber auch das Ca²⁺-Sensorproteins CaM, allosterische Effektoren für den Verschluss des Sec61-Komplexes darstellen (Erdmann et al., 2011; Linxweiler et al., 2013; Schauble et al., 2012). Letztere beide binden dafür am zytosolischen IQ-Motiv des Sec61-Komplexes. Im Gegensatz dazu kann BiP zusammen mit seinem HSP40 Typ Cochaperone Sec63, welches zusammen mit Sec62 in der ER Membran vorliegt, zu einer Öffnung des Kanals führen. Dies geschieht durch die Bindung von BiP an ein Di-Tyrosin-Motiv enthaltende mini-Helix ER luminal von Loop 7 der Sec61 α Untereinheit, und dadurch bedingten Konformationsänderung (siehe Dudek et al., 2015; Linxweiler et al., 2017; Schauble et al., 2012). Innerhalb der letzten Jahre haben sich diverse

Erkrankungen mit dem Sec61-Komplex in Verbindung bringen lassen, die seither als Sec61-Kanalopathien bezeichnet werden (Zimmermann, 2016). Beispielsweise führt die Deletion von ERj6 zu einer pathologischen Pankreas β -Zellfunktion mit Diabetes *in vivo* bei Mäusen (Ladiges et al., 2005). Daraus schlossen Schorr et al. (2015), dass eine funktionierende Co-Chaperone kontrollierte Öffnung des Sec61-Kanals insbesondere für Zellen mit hoher Proteinsekretion von großer Bedeutung ist und ein Verlust dieses Mechanismus zu Apoptose und Krankheit führen (Schorr et al., 2015).

2.4.3. Ca^{2+} -bindende Proteine des ER

Damit das ER seiner Aufgabe als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher nachkommen kann, braucht es luminaire Ca^{2+} -bindende Proteine, die als Ca^{2+} -Puffer fungieren können. Die bis jetzt bekanntesten sind das im Herz- und Skelettmuskelzellen vorkommenden Calsequestrin, sowie ubiquitär in anderen Geweben vorkommenden Faltungsenzyme CRT/CNX, BiP, PDIs und GRP94 (Prins und Michalak, 2011). Sie alle haben gemeinsam, dass sie eine verhältnismäßig niedrige Affinität bei gleichzeitig hohen Bindungskapazitäten gegenüber Ca^{2+} aufweisen (Coe und Michalak, 2009). Das wohl wichtigste Protein ist CRT, da es über eine Bindungsdomäne mit hoher Kapazität (25 mol Ca^{2+} per mol Protein) fast die Hälfte des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ bindet (Michalak et al., 2009; Nakamura et al., 2001) und bei dem Ca^{2+} als Cofaktor eine modulierende Eigenschaft auf die Thermostabilität und Konformationsflexibilität auswirkt (Li et al., 2001). BiP stellt etwa 25% der Ca^{2+} -Bindungskapazität des ER und ist ein weiterer wichtiger Puffer für Ca^{2+} , dessen Funktionsfähigkeit als Faltungsprotein unter anderem auf Ca^{2+} beruht (Lamb et al., 2006). Darüber hinaus fungiert BiP ebenfalls als Verschluss-, „Deckel“ der Sec61 α -Pore, was den Ca^{2+} -Leckstrom durch die selbige vermindert (Alder et al., 2005; Schauble et al., 2012). All diese Proteine kommen mindestens zwei der drei folgenden Aufgaben nach: (1) Regulation der Ca^{2+} -Homöostase des ER durch Bindung und Abgabe von Ca^{2+} , (2) Regulation von Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -Ausschüttungskanälen zur Aufrechterhaltung der ER Ca^{2+} -Homöostase, (3) der Funktion als Chaperon bei der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle von Polypeptiden, was die Wichtigkeit der wechselseitigen Beziehung zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ und ER-Funktion unterstreicht (Berridge, 2002; Mekahli et al., 2011; Papp et al., 2003). Neben der Aufrechterhaltung einer adäquaten Ca^{2+} -Homöostase für den Erhalt von Ca^{2+} -regulierten

Signalkaskaden im ER, sind die hier beschriebenen Ca^{2+} -bindenden Proteine auch Mitspieler im Rahmen der ERQC von neu synthetisierten Substraten.

2.5. Modulatoren der Ca^{2+} -Homöostase

Thapsigargin

Thapsigargin (TG) ist ein Inhibitor der membrangebundenen SERCA, der ursprünglich aus der Pflanze *Thapsia garganica* extrahiert wurde (Thastrup et al., 1990). So interagiert TG sehr stark mit der Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und führt darüber hinaus zur Blockade der Transportfunktion von Ca^{2+} aus dem Zytosol zurück in das ER, wodurch es zu einer Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase und über einen längeren Zeitraum, aufgrund von Ca^{2+} -Depletion und der UPR, Zelltod verursacht; sodass eine TG-Inkubation von Zellen zu einer sofortigen Depletion von im ER befindlichem Ca^{2+} führt (siehe Abb. 2.4) (Sehgal et al., 2017).

Ionomycin

Ionomycin (IONO) ist ein Ca^{2+} -Ionophor welches ein Polyether-Antibiotikum ist, dass von dem Bakterium *Streptomyces conglobatus* gebildet wird (Beeler et al., 1979). So kommt es bei Inkubation der Zellen zu einer Ca^{2+} -Depletion, was zu ineffektiver Sekretion, Aggregation und Degradation von missgefalteten Proteinen führt (Gaut und Hendershot, 1993). Es hat sich gezeigt, dass IONO sich in biologischen Membranen (ER, Mitochondrium) lagert und dadurch Ca^{2+} -Ionen über diese transportieren kann (Liu und Hermann, 1978) (siehe Abb. 2.4).

Tunicamycin

Tunicamycin (TUNI), ein Gemisch homologer Nucleosidantibiotika unter anderem produziert durch das Bakterium *Streptomyces lysosuperificus*, gehört zur Gruppe der nukleosidisch gebundenen Zucker und ist eine Mischung aus Antibiotikum mit Uracil, *N-Acetylglucosamin* (GlcNAc), ein 11-Carbonaminodialdose Zucker (Tunicamine) und einer Fettsäure, die an die Aminogruppe gebunden ist (Goddard-Borger und Withers, 2012; Price und Tsvetanova, 2007). Die Funktionsweise liegt in der Inhibierung der bakteriell und eukaryotischen

N-Acetylglucosamin Transferase und damit der Biosynthese von Dolicholpyrophosphat-N-Acetylglucosamin, wobei genauer der Transfer von N-Acetylglucosamin 1-phosphat von UDP-N-Acetylglucosamin zu Dolichol-Monophosphat im ersten Schritt der Glykoproteinsynthese unterbunden wird (Yoo et al., 2018). Dieses wiederum ist als fundamentaler Bestandteil für die Bereitstellung von *N*-glykosylierten Glykoproteinen zu sehen und resultiert in eukaryotischen Mikroorganismen in wenig beziehungsweise vollständig unglykosylierten Proteinen (Dricu et al., 1997). All dies führt zur Akkumulation fehlgefalteter nicht-glykosylierter Proteinen im ER-Lumen. Falls dies die ER-eigenen Faltungskapazitäten (Chaperone) übersteigt kommt es zu zwei möglichen zellulären Reaktionen: (1) Das HSP70 Protein BiP wird verstärkt mobilisiert und es kommt zur Induktion der UPR (Schorr et al., 2015) oder (2) zur Retrotanslokation durch Sec61 α der fehlgefalteten Proteine, um sie der ERAD zuzuführen mit konsekutiven Ca²⁺-Leck durch die Pore (siehe Abb. 2.4) (Schauble et al., 2012).

1,4-Dithiothreitol

1,4-Dithiothreitol (DTT) findet als reduzierendes Detergens Anwendung im Bereich der Proteinbiochemie zur Isolierung von Proteinen oder anderen biochemischen Prozeduren, wobei die zugrunde liegende Funktion von DTT ist, dass es SH-Gruppen vor der Oxidation durch Sauerstoff bewahrt und somit Disulfidbrückenbindungen reduziert (siehe Alliegro, 2000). DTT ist wie TUNI ein typisches Reagenz was durch Zunahme missgefalteter Proteine im ER, zu ER-Stress der Zelle mit erhöhtem Ca²⁺-Leck führt (siehe Abb. 2.4) (Osowski und Urano, 2011; Schauble et al., 2012).

Ophiobolin A

Ophiobolin A (OPHIO) gehört zur Gruppe der trizyklischen Sesterpene und geht als Metabolit auf den Pilz *Ophiobolus graminis* zurück, welches als Phytotoxin wirkt und ein potenter kovalenter Inhibitor von Calmodulin (CaM) in Eukaryoten ist (Leung et al., 1984).

CaM stellt ein im Zytosol vorkommendes, Ca²⁺-abhängiges Molekül dar, welches an der Modulation diverser Proteine beteiligt ist (Cheung, 1980). Es hat sich gezeigt, dass Ionenkanäle eine der Hauptklassen CaM-regulierter Zielproteine darstellen wozu auch der Sec61-Komplex gehört (Kovalevskaya et al., 2013). Elektrophysiologische Experimente

zeigten ferner, dass CaM eine Ca^{2+} -abhängige Inhibierung der Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes in rauen Mikrosomen bewirkt. In diesem Zusammenhang wurde darüber hinaus *in vitro* nachgewiesen, dass ein spezifisches IQ-Motiv im zytosolischen N-Terminus von Sec61 mit CaM interagiert (Erdmann et al., 2011).

OPHIO wird ein Anti-karzinogener Effekt zugeschrieben, da ein signifikanter Effekt gegenüber Apoptose-resistenten Glioblastom-Zellen durch die Induktion eines nicht-apoptotischen Zelltodes beobachtet wurde (Dasari et al., 2015; Masi et al., 2019). In der Arbeit von Erdmann et al. (2010) wurde in Ca^{2+} -Imaging Experimenten an HeLa-Zellen gezeigt, dass eine 10-minütige Inkubation mit OPHIO zu einem signifikant verstärkenden Effekt auf den TG-induzierten Ca^{2+} -Efflux und damit zu einer Zunahme des ER Ca^{2+} -Lecks führte, was vergleichbar mit der Trifluoperazine Dihydrochlorid Inkubation ausfiel (siehe Abb. 2.4) (Erdmann et al., 2011).

Trifluoperazine

Trifluoperazine (TFP) lässt sich zur Gruppe der CaM-Antagonisten rechnen und stellt ein FDA-zugelassenes antipsychotisches Medikament dar, wobei ebenfalls über starke karzinogen-hemmende (z.B. Bronchial-, Hepatozelluläre-Karzinom, T-Zell-Lymphom) Eigenschaften für TFP als CaM-Inhibitor berichtet wurde (Kang et al., 2017). Schlussendlich wurde gezeigt, dass die Behandlung mit dem CaM-Inhibitor TFP den üblichen Verschluss von Sec61 α durch CaM unterbindet und es so zu einem erhöhten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER kommt (siehe Abb. 2.4) (Linxweiler et al., 2013; Schauble et al., 2012; Sicking et al., 2021).

2.6. Protein-Homöostase

2.6.1. ER quality control (ERQC)

Die ERQC ist ein fundamentaler Bestandteil der Proteinsynthese und besteht aus drei Achsen: (1) Beschleunigung der adäquaten Proteinfaltung, (2) Aktivierung der UPR (3) und Proteinbeseitigung über ERAD, oder die Autophagie (Moon et al., 2018). Im Rahmen der ERQC von Proteinen sind bis dato der CNX/CRT und der BiP Signalweg bekannt. Für den CNX/CRT-Weg steht als erster Kooperationspartner das Faltungssensorprotein *Uridin Diphosphat (UDP)-Glukose-Glykoprotein Transferase* (UGGT) zur Verfügung, was bei

Faltungsmisserfolg erneut ein einzelnes Glucosemoleküle an das Substrat anfügt, wodurch das Substrat erneut einen CNX/CRT-Faltungszyklus durchläuft (Aebi et al., 2010). Wenn das Substrat nach mehrmaligen Zyklen eine absolute Faltungsschwäche aufzeigt, wird es mittels enzymatischer Glykoproteintrimmung durch *ER mannosidase I* (ERManI) und/oder *ER-degradation enhancing α -mannosidase like protein 1* und 3 (EDEM1/EDEM3) den Lektinen *osteosarcoma amplified 9* (OS-9) und *Xanthosine 5'-triphosphate 3-transactivated protein B* (XTP3-B) zugänglich gemacht (Behnke et al., 2015; Trombetta, 2003). Diese wiederum führen das Substrat dann zum noch nicht identifizierten Retrotranslokation zu und ermöglichen der ERAD-Maschinerie den Abbau des Substrates im Zytosol (Moon et al., 2018). Eben dieser Retrotranslokation wird auch bei Misserfolg der Substratfaltung von nicht-glykosylierten Proteinen im BiP-Faltungsweg zusammen mit dessen Co-Chaperonen ERDj4 und ERDj5 angesteuert und das Substrat zum Abbau im Rahmen der ERAD in dieses weitergeleitet (Behnke et al., 2015; Lai et al., 2012). So konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an ERDj4 als BiP Co-Chaperone zu ER-Stress und metabolischen Störungen führt (Fritz et al., 2014).

Im Falle einer korrekten posttranslationalen Modifikation und damit korrekten Faltung, Assemblierung und Glykosylierung neu synthetisierten Proteine, können die Substrate durch Transport zu den Zellorganellen des sekretorischen Stoffwechselweges diesem zugeführt werden (Behnke et al., 2015). Da zwischen 20% und 30% des Proteomes für die extrazelluläre oder internale Endomembransysteme bestimmt ist, bildet der Transport vom ER zum Golgi-Apparat den wichtigen Schritt des sekretorischen Stoffwechselweges (Gomez-Navarro und Miller, 2016a). Die für den Export bestimmten Proteine erreichen den Golgi-Apparat, wo sie nach ihrer spezifischen Modifizierung an deren vorgesehenen Zielort transportiert werden (Gomez-Navarro und Miller, 2016b; Huang und Wang, 2017; Lord et al., 2013; Van Leeuwen et al., 2018; Zhang und Wang, 2016).

Falls ein Substrat die ERQC auch nach rezidivierende Faltungszyklen nicht bestehen sollte, wird es wie oben beschrieben der sogenannten ERAD zugeführt, welche nun genauer dargestellt wird.

2.6.2. *ER associated degradation (ERAD)*

Proteine aus dem Zytosol, der ER-Membran und dem Lumen des ER können grundsätzlich als fehlgefaltet identifiziert und zum Abbau der ERAD zugeführt werden. Diese verhindert die ungewollte Aggregation der potenziell zytotoxischen, missgefalteten Proteine und schützt somit die Zell- und ER-Homöostase. ERAD wird in ERAD-M für ER-Membran Proteine mit fehlgefalteter Membran-Domäne, ERAD-C für ER-Membran Proteine mit zytosolischer Domäne und ERAD-L für ER-luminal vorliegende fehlgefaltete Proteine unterteilt (Berner et al., 2018). Falls Substrate entsprechend der ERAD-L aus dem ER in das Zytosol disloziert werden sollen, transportieren die beiden Chaperon-Systeme diese zur ERAD-Maschinerie, bei der die Retrotranslokation in das Zytosol durch einen Komplex aus einigen Transmembranproteinen unter anderem *suppressor/enhancer of Lin* (Sel1), *degradation in endoplasmic reticulum proteins* (Derlins), *valosin-containing protein (VCP)-Interacting membrane protein* (VIMP), *homocystein-responsive ER resident protein* (Herp) and *HMG-CoA reductase degradation 1* (Hrd1) stattfindet (Behnke et al., 2015).

Eine weitere Möglichkeit, die in der Forschung diskutiert wird, ist die Retrotranslokation über den Sec61-Komplex, wenn sie auch keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation in Dendritischen Zellen mittels des ERAD-Mechanismus nach Mycolacton-induzierter Blockade von Sec61-Komplexen zeigte (Grotzke et al., 2017). Für die Hypothese sprechen wiederum Experimente, die eine Interaktion zwischen Sec61-Komplexen und ERAD-Substraten sowie dem Proteosom aufzeigten (Sun und Brodsky, 2019). Der Retrotranslokation wiederum stellt die Verbindung zur E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex des Zytosols dar, wobei letzterer das fehlgefaltete Polypeptid polyubiquitiniert und so von der p97-hexameren ATPase wahrgenommen werden kann (Preston und Brodsky, 2017). Diese stellt die Energie bereit, um das Protein aus dem ER zu extrahieren und es an den 26S-Proteasomkomplex für die Degradierung zugänglich zu machen, wobei physiochemische Analysen aufgedeckt haben, dass der korrekte Sedimentkoeffizient annähernd bei 30S liegt (Behnke et al., 2015; Yoshimura et al., 1993).

Das Proteasom ist eine multikatalytische Proteinase, degradiert ATPase-abhängig aussortierte Proteine und besteht aus 3 UE; zwei 19S-Komplexe, die in der Lage sind mittels Rezeptoren polyubiquitinierte Substrate im Zytosol zu erkennen, die Polyubiquitin-Sequenzen enzymatisch zu entfernen, das Polypeptid zu entfalten, den α -Ring der dritten 20S-UE zu öffnen und das Substrat in diese zu transferieren. Hier angekommen befindet sich das Substrat im proteolytischen Zentrum des Ubiquitin-Proteasom-Systems, wo es zerlegt wird und dessen

freiwerdenden Fragmente zurückgewonnen und recycelt werden (siehe Dahlmann, 2016; Tanaka, 2009). Dass die Aufrechterhaltung der ER-Homöostase für das Zellüberleben unabdingbar ist, zeigen die enge Verzahnung und Interaktion von Schlüsselkomponenten der ERAD mit der ER-Phagy und der UPR. Die ER-Phagy stellt neben dem Ubiquitin-Proteasom-System einen zweiten Mechanismus innerhalb des ER dar, um luminal missgefaltete Proteine lysosomal zu degradieren (Chino und Mizushima, 2020).

Des Weiteren vermag der SEL1L-HRD1-Komplex, wie auch ERdj4, die Aktivität von IRE1 α direkt zu modulieren und zielt darauf ab IRE1 α unter normalen, basalen Bedingungen zu degradieren, um dessen IRE1 α Signalweg und damit eine Einschränkung der UPR zu gewährleisten. Andererseits ist die Expression von vielen ERAD-Genen durch die UPR reguliert (Hwang und Qi, 2018), welche nun im Weiteren detaillierter dargestellt wird.

2.6.3. *Unfolded protein response (UPR)*

Wie bereits beschrieben, fungiert das ER als wichtige Proteinbiosynthesestation der Zelle und als wichtiger Ca²⁺-Speicher. Durch eine Vielzahl von Mechanismen kann dieses Gleichgewicht gestört werden, wodurch es zu Fehlern während der Faltung und Assemblierung von Proteinen kommen kann, wie z.B. durch gesteigerte Level von Protein-Synthese, Energiemangel, inflammatorische Prozesse, Hypoxie, Hitze und viele weitere (Wang und Kaufman, 2016). Dieser Zustand, der zu einem Anstieg und Akkumulation von ungefalteten bzw. fehlgefalteten Proteinen im ER führt, wird als ER-Stress bezeichnet und tritt medizinisch z.B. bei Alzheimer, Parkinson, Diabetes, Herz- und Lebererkrankungen, aber auch bei Tumoren auf (Kraskiewicz und Fitzgerald, 2012). Unter normalen Umständen werden diese fehlerhaften Proteine in das Zytosol zurück transportiert und durch das Proteasom abgebaut. Kann die Zelle die Akkumulation dieser fehlgefalteten Proteine nicht mehr kompensieren, so wird die UPR aktiviert. Dieser Prozess soll zum einen die allgemeine Proteinsynthese inhibieren, die ERAD und Autophagy aktivieren und die Synthese faltungskatalysierender Chaperone und Enzyme hochregulieren und so das ER-Milieu wiederherstellen (Wang und Kaufman, 2016). Diese UPR basiert in Säugetierzellen aus drei Klassen von ER-Stress-Sensoren die als integrale ER-Transmembranproteine ihre dazugehörigen Signalkaskaden aktivieren: PERK, IRE1 α sowie ATF6 α (Hetz et al., 2013; Wang und Kaufman, 2016). Allen gemein ist die Initiation der Signalwege durch das molekulare Chaperon BiP, was bei normaler Homöostase assoziiert mit

diesen UPR-Sensoren vorliegt und diese in inaktiviertem Zustand bewahrt (Fribley et al., 2009; Fu et al., 2015; Shu et al., 2018). Durch die Akkumulation fehlgefalteter Proteine kommt es zur Dissoziation dieser Verbindung und folglich zur Aktivierung der UPR (Wang und Kaufman, 2016). PERK wird genau wie IRE1 α durch Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung aktiviert (Hetz et al., 2013). Anschließend phosphoryliert PERK eIF2, was zu einem generellen Translationsstopp und zur bevorzugten und selektiven Translation von zur UPR gehörenden Genen, wie beispielsweise *activating transcription factor 4* (ATF4), führt (siehe Sano und Reed, 2013). Dieses UPR-Gen kontrolliert im Folgenden die Expression pro-apoptotischer Komponente, wie unter anderem CHOP. Aktiviertes IRE1 α spleißt ein 26-Nukleotid langes Intron aus der mRNA, die für den Transkriptionsfaktor XBP1 codiert und so zu XBP1s (gespleißte Form) wird (Uemura et al., 2009). Dieses wiederum führt zur Aktivierung weitere UPR-regulierter Genloci von Chaperonen und Proteinen zur Entfernung missgefalteter Proteine durch ERAD (Chang et al., 2018). Im Gegensatz dazu transloziert das ER-lokalisierte Proteine ATF6 α bei ER-Stress in den Golgi-Apparat, wo es erst an der luminalen Domäne durch die Golgi-residente *site 1 protease* (S1P) gespalten wird. Die Transmembrandomäne verbleibt in der Membran, wo es durch Golgi-residente *site 2 protease* (S2P) gespalten wird, sodass die zytosolische Domäne als lösliches *ATF6-Fragment* (ATF6f) und Transkriptionsfaktor freigesetzt wird (Chen et al., 2002; Shen et al., 2002; Shen et al., 2004; Ye et al., 2000). Dieses migriert anschließend in den Nukleus, wo es an Gen-Promotoren von UPR-induzierenden Genen, die sogenannte *ER stress response elements* (ERSE-I und -II) enthalten, bindet und diese aktiviert (Forouhan et al., 2018). Wenn all diese Adaptionenmechanismen zu keiner Verbesserung der ER-Homöostase führen, resultiert dies in der Apoptose der Zelle.

2.7. Niedermolekulare Chaperone

Als niedermolekulare Chaperone (engl. „*small molecule chaperones*“) wird eine Gruppe von niedermolekularen Verbindungen bezeichnet, die eine im Verhältnis zu anderen Proteinen geringe molekulare Masse aufweisen, wobei sie mit nicht-nativen Faltungsformen von zelleigenen Proteinen interagieren und deren Faltung und/oder Stabilität verbessern (Hartl et al., 2011; Papp und Csermely, 2006; Ringe und Petsko, 2009). Zusammengefasst als eine Gruppe setzen sie sich aus mehreren Kategorien von Molekülen zusammen, die über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Proteinstabilität und -konfiguration haben. Sie

halten mittels molekularer Interaktionen (Elektrostatisch, Van-der-Waals- und Wasserstoffbrückenbindungen) diverse Bereiche der Proteinstruktur zusammen (Ringe und Petsko, 2009). Dadurch sind sie in der Lage pathologische Situationen innerhalb der Zelle, in der sich fehlgefaltete Proteine beispielsweise durch pathologischer Krankheitsprozesse anhäufen und aggregieren, zu kompensieren und helfen diese Proteine zu stabilisieren, in deren korrekte Konformation zu überführen und machen sie gleichzeitig löslicher und weniger anfällig für Aggregation (siehe Mamipour et al., 2017). Wenn fehlgefaltete Proteine anfallen, liegen statt hydrophilen Seitenketten hydrophobe Bereiche exponiert vor, welche unter normalen Bedingungen im Kern der Proteinstruktur liegen (Bowler, 2012; Dyson et al., 2006; Yoda et al., 2010). Auf Grund dieser nicht nativen Formation kommt es zu atypischen Wechselwirkungen und pathologischen Aggregation, was zusätzlich durch Mutationen verstärkt werden kann (Russo et al., 2018). Diese Prozesse können zu einer veränderten, toxischen Struktur des Proteins führen oder wie in diversen Proteopathien als Proteinaggregate die Ursache für Entzündungen und dadurch bedingten Apoptose sein (siehe Ringe und Petsko, 2009; Romisch, 2004; Thiel et al., 2017). Die Induktion dieser Reaktion geschieht im Rahmen der ER-Overload-Response über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher wiederum die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine aufgrund der Akkumulation missgefalteter sekretorischer Proteine im ER, wie beispielsweise in Hepatozyten der Leber bei α 1-Antitrypsin Mangel oder den Lungenfibroblasten bei Mukoviszidose-Patienten (Knorre et al., 2002; Lawless et al., 2004). *In vitro* und *in vivo* Studien und Therapieansätze haben gezeigt, dass pharmakologische und chemische Chaperone zu einer Verbesserung der Krankheitsausprägung verschiedener Erkrankungen führen, insbesondere wenn ihre Pathologie sich im Rahmen von Proteinefehlfaltung manifestiert (siehe Tao und Conn, 2018). Hierunter zählen vererbte metabolische Störungen, Tumorerkrankungen, sowie Proteinefehlfaltungskrankheiten wie zum Beispiel Alzheimer, Parkinson, Morbus Huntington, Amyothrophe Lateralsklerose, Amyloidosen, Mukoviszidose (Arakawa et al., 2006; Ringe und Petsko, 2009). Darüber hinaus werden sie ebenfalls im Rahmen der Produktion von rekombinanten Proteinen medizinischer Therapeutika eingesetzt (Rajan et al., 2011).

Wenn auch keine eindeutigen Parameter für die Definition der verschiedenen Chaperon-Gruppen festgelegt wurde, hat sich zum aktuellen Stand der Forschung folgende Einteilung der drei großen „small-molecule Chaperone“-Klassen etabliert (Tabelle 2.1):

(I) Molekulare Chaperone sind definiert als Proteine, die mit anderen Proteinen, die sich noch im Faltungsprozess in ihre native Ursprungsstruktur und damit nicht-aktive Konformation befinden, interagieren, assistieren, sowie stabilisieren. Zu dessen Vertretern gehören z.B. die zelleigenen HSPs, klassifiziert nach ihrem Molekulargewicht in die Familien der HSP90, HSP70, HSP60 und HSP40 (Ellis, 1987; Smith et al., 2015).

(II) Chemische Chaperone sind universelle Faltungshelfer, die auf eine Polypeptidstruktur einen unspezifischen Effekt ausüben. Durch sie wird die Löslichkeit der Proteine gesteigert, die Aggregation missgefalteter Proteine unterbunden und fehlgefaltete Proteine zu und durch den sekretorischen Stoffwechselweg transportiert (Romisch, 2004). Im Gegensatz zu den pharmakologischen Chaperonen haben sie normalerweise keine besondere Bindedomäne, sodass sie prinzipiell jedes Protein binden und stabilisieren. Chemische Chaperone lassen sich nochmal in zwei Untergruppen unterteilen: Osmolytische sowie hydrophobische Chaperone (Perlmutter, 2002).

Die zellulären Osmolyte sind in verschiedenen niedermolekularen Unterklassen zu unterteilen: Freie Aminosäuren und Aminosäurederivaten (z.B. β -Alanin, Glyzin, Taurin), den Polyolen (z.B.: Saccharose, Glycerol) und den Methyl-Aminen (z.B. *Trimethylamin Noxide* (TMAO)), welche die Zelle bei mechanischer Stresssituation unterstützen (siehe Cortez und Sim, 2014). So schützen Polyole vor den Auswirkungen bei extremen Temperaturen, Dehydration oder sich ändernder Ionenkonzentrationen, wohingegen Aminosäuren bei einer salzreichen extrazellulären Umgebung protektiv wirken. Methylamine sind dagegen in Harnstoffreichen Zellen vorzufinden, um die Proteinstruktur vor dem Harnstoff zu schützen (Cortez und Sim, 2014; Romisch, 2004). Des Weiteren wird den Osmolyten ein modulierender Effekt auf ER-eigene Chaperone zugesprochen und es kommt zu einem Anstieg deren Konzentrationen bei Bakterien und Hefen, wenn die Zelle beispielweise oben genannten Umwelteinflüssen ausgesetzt werden (Romisch, 2004).

Zur zweiten Gruppe der chemischen Chaperone gehört das in dieser Arbeit verwendete *Sodium (4-)Phenylbutyrat* (4-PBA) sowie Lipide und Detergenzien (z.B. Gallensäuren) (Papp und Csermely, 2006). Diese Moleküle binden an hydrophobe Segmente fehlgefalteter Proteine und verhindern so deren Aggregation. Die genauen molekularen Mechanismen sind noch unklar, jedoch liegen für 4-PBA Daten zu einigen Aktionsmechanismen vor. So reguliert es mittels einer *Histon-Deacetylase* (HDAC) inhibitorischen Eigenschaft epigenetisch die Transkription von Genen der UPR (Ren et al., 2004; Wright et al., 2004). Des Weiteren vermindert 4-PBA die allgemeine Synthese weiterer Proteine, während die Produktion

endogener, molekularer Chaperone aus der HSP70 Familie zeitabhängig hochreguliert wird. Daneben geht man von einer direkten Chaperon-ähnlichen Interaktion mit fehlgefalteten Proteinketten aus (Mimori et al., 2013), was in dieser Arbeit untersucht werden sollte. Eine weitere Gruppe chemischer Chaperone entstammt der Gruppe der Gallensäuren. Die Gallensäure ist eine Steroid-Säure, die energieaufwendig in der Leber aus Cholesterin synthetisiert wird und als sogenannte primäre Gallensäure nach fettreicher Nahrung über die Galle in den intestinalen Trakt sezerniert wird, um Fette und fettlösliche Vitamine (A, D, E, K) besser resorbierbar zu machen (siehe Kusaczuk, 2019). Im intestinalen Trakt findet dann durch diverse Gruppen von Bakterien enzymatisch Epimerisation von Hydroxygruppen statt, wodurch sogenannte sekundären Gallensäuren wie *Deoxycholsäure* (DCA) bzw. *Ursodesoxycholsäure* (UDCA) entstehen (Ridlon und Bajaj, 2015). Als solche werden sie resorbiert, zur Leber rücktransportiert und dort mit *Aminosäuren* (AS) konjugiert (siehe Cortez und Sim, 2014). Aus der AS Taurin entsteht so z.B.: *Taurin-Ursodesoxycholsäure* (TUDCA), die dann dem körpereigenem Gallensäurekreislauf erneut zugeführt wird. TUDCA findet neben 4-PBA im klinischen Alltag als ein Leber-schützendes Agens bei cholestatischen Lebererkrankungen Anwendung (Engin und Hotamisligil, 2010).

(III) Pharmakologische Chaperone sind Substrate, die spezifisch mit ihrer Bindedomäne an ausgewählte Zielmoleküle binden, deren Rückfaltung in die native Struktur fördern und stabilisieren, sowie deren Ausschleusung aus dem ER fördern (Ringe und Petsko, 2009; Romisch, 2004). Sie können Enzyme, Rezeptor-Liganden, Inhibitoren/Antagonisten oder Moleküle sein, welche sich mit einer spezifischen Proteinkonformation von instabilen Enzymen, Transmembrankanälen oder Rezeptoren wie beispielsweise G-Protein-gekoppelte Rezeptoren verbinden und dessen Strukturstabilität steigern (Bernier et al., 2004a; Bernier et al., 2004b; Bernier et al., 2004c; Bernier et al., 2006; Cortez und Sim, 2014; Perlmutter, 2002; Romisch, 2004). Während molekularen Chaperonen beim Faltungsprozess assistieren, stabilisieren pharmakologische Chaperone bereits gefaltete Makromoleküle, indem sie an diese binden und sie so vor thermaler Denaturierung beziehungsweise proteolytischer Degradation bewahren (Parenti et al., 2015). Durch ihre Substratspezifität sind pharmakologische Chaperone bereits in sehr geringen Konzentrationen effizient, weshalb sie in Verbindung mit geringen Neben- bzw. Wechselwirkungen im Gegensatz zu chemischen Chaperonen das Potential für ein therapeutischen Einsatz als Medikament erfüllen (Perlmutter, 2002; Romisch, 2004). Das erste in Europa zugelassene pharmakologische Chaperon erschien 2009 und ist Sapropterin, was bei der *Phenylketonurie* (PKU), die sich schon im Kindesalter manifestiert, zum Einsatz kommt

(Sanford und Keating, 2009). Als pharmakologisches Chaperon stabilisiert es verschiedene defekte Mutationsformen der Phenylalaninhydroxylase und schafft so eine erhöhte Restaktivität des defekten Enzyms bei milden Formen der PKU (Hole et al., 2016). Ein weiteres Beispiel ist der Iminozucker 1-Deoxygalactonoirimycin (Handelsname: Migalastat), der sich bis Ende 2017 noch in der klinischen Phase III befand und in den USA für die Therapie der seltenen hereditären lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Fabry zugelassen ist (Mccafferty und Scott, 2019).

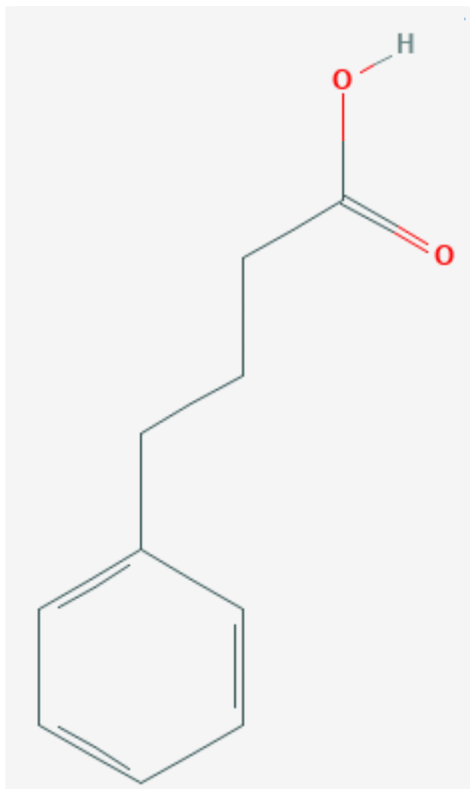
Einleitung

Tabelle 2.1: Einteilung der „niedermolekularen Chaperone“ (nach Ringe und Petsko, 2009; Cortez und Sim, 2014)

Chaperon-Gruppe	Molekulare Chaperone	Pharmakologische Chaperone	Chemische Chaperone			
Chaperon Untergruppe	-	-	Osmolytische Chaperone			Hydrophobe Chaperone
Niedermolekulare Untergruppe	-	- Proteine - Liganden - Cofaktoren - Kompetitive Inhibitoren - niedermolekulare Moleküle	- freie Aminosäuren - Aminosäure-Derivate	Methyl-Amine	Polyole	-
Beispiel Vertreter	Zelleigene Hitzeschockproteine	-	- Arginin - Glyzin - Taurin - β -Alanin - Prolin	Trimethylamin Noxide	- Glycerol - Sucrose	- Gallensäure (-Derivate) - 4-Phenylbutyrat
Effekt	Unterstützung von Faltungsprozessen	Bsp.: - Faltungsunterstützung lysosomaler Proteine mit Mutation - Translationsunterstützung bei Nonsense-Codon oder defektem Stop-Codon	Osmolytische Stresssituation			- Korrekturfaltung missgefalteter Proteinen - Aggregationsverhinderung
			Glycin/Prolin: - Osmotisch- und Temperaturinduzierter Stress (Osmoprotektoren)	- Proteinschutz in Harnstoffreichem Milieu	- Extreme Temperaturen - Dehydration - Ionenkonzentrationsänderung	
Interaktionspartner	Universell jedes Protein	spezifische Proteine	Universell jedes Protein			
Interaktionsbereiche	Im Faltungsprozess befindliche Proteinabschnitte	Substrat- oder allosterisch-gebunden	-			Hydrophobe Segmente

2.7.1. *4-Phenylbutyrat (4-PBA) als Beispiel für niedermolekulare Chaperone*

4-Phenylbutyrat (4-PBA) ist ein in der Medizin verwendetes Arzneimittel, mit der molaren Masse von $186 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und der Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{Na}$, welches eine aromatische substituierte Fettsäure darstellt (Abb. 2.5) (PubchemCID 4775, 22.08.2021). Es findet seine Anwendung in der Therapie von Hyperammonämien sowie erhöhten Glutaminwerten im Blutserum und besitzt die Fähigkeit die Bluthirnschranke zu überqueren (Kolb et al., 2015; Mimori et al., 2012). Physiologisch fällt im Körper nach dem Verzehr und Abbau von Proteinen verstärkt Ammoniak als Abbauprodukt an (Weiner et al., 2015). Dieses kann folglich bei Enzymmangel im Harnstoffzyklus vermindert neutralisiert werden und durch die höhere Blutserumkonzentration verstärkt das Endothel der Blut-Hirn-Schranke überwinden (Assentoft et al., 2016). Als Folge dessen kommt es zu einer Anhäufung im zentralen Nervensystem (ZNS) und pathologischen, konsekutiven Schwellung der Astroglia mit Funktionseinschränkung der Astrozyten (Norenberg et al., 2005). Diese neurotoxische Wirkung des Ammoniaks auf das ZNS kann unbehandelt zu Retardierung, Koma oder im schlimmsten Fall zum Tode führen (Blair et al., 2015; Bosoi und Rose, 2009). In Verbindung mit einer proteinarmeren Diät und gegebenenfalls mit Nahrungsergänzungsmitteln ist 4-PBA oral in Form von Tablette oder Granulat für die chronische Langzeittherapie bei seltenen hereditären Enzymdefekten des Harnstoffzyklus unter dem Handelsnamen Ammonaps [EU], Buphenyl [USA] zugelassen (Pena-Quintana et al., 2017). Zum Transport bindet 4-PBA als sogenanntes Pro-Drug im menschlichen Blutserum an Fettsäurebindungsstellen des Albumins (Roy et al., 2015) und wird in den Mitochondrien der Leberhepatozyten und Nierenzellen rasch mittels β -Oxidation in Phenylacetat (PAA) metabolisiert (Carducci et al., 1996). Im nächsten Schritt wird es mittels Acetylierung mit Glutamin konjugiert, wodurch Phenylacetylglutamin entsteht, was an Stickstoffmoleküle im Harnstoff bindet und schließlich über die Nieren ausgeschieden wird (Luo et al., 2015). Auf diesem Weg wird das gebundene Glutamin und Stickstoff aus dem Körper eliminiert, wodurch sich der Serum-Ammoniak, -Glutamin Blutspiegeln wieder normalisieren.



4-phenylbutyrate



Molekular Gewicht: 164.20 g/mol

Molekular Formel: $C_{10}H_{12}O_2$

Abbildung 2.5: 2D und 3D Strukturformel 4-Phenylbutyrat (4-PBA) (modifizierte Abbildung aus PubchemCID 4775, Abgerufen am 22.08.2021 - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4775#section=2D-Structure> und <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4775#section=3D-Conformer>).

Die chemische Strukturformel von Natrium (4-) Phenylbutyrat (= dem Salz von 4-PBA). Wenn 4-PBA in gelöste Form übergeht, entfernt sich das Na^+ -Ion von der Carboxylgruppe und es liegt als negativ geladenes Ion in Lösung vor.

Neben den bereits genannten 4-PBA sind TUDCA bzw. UDCA, die am meisten im Zusammenhang mit Krankheiten und in vivo getesteten chemischen Chaperone. TUDCA wird klinisch bereits in der Therapie der primären biliären Zirrhose und der primär sklerosierenden Cholangitis eingesetzt (Hetz et al., 2013). Bereits 2006 wurde gezeigt, dass chemische Chaperone in der Lage sind, bei fettleibigen und diabetischen Mäusen die körperliche Gesamtsituation zu verbessern (siehe Ozcan et al., 2006). Das heißt, die körpereigene Insulinsensitivität stieg, während sich die Hyperglykämie normalisierte. Dazu erholte sich die Fettleber der Versuchstiere und parallel verbesserte sich die Insulinwirkung im Muskel, sowie in der Leber.

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass chemische Chaperone durch eine rückläufige Leptinresistenz einen positiven Effekt auf den Fettstoffwechsel der Versuchstiere bewirken

(Ozcan et al., 2009). In einem weiteren Mausmodell wurde dargestellt, dass 4-PBA und vor allem TUDCA Inflammation, Apoptose und Nekrose reduzierten und so protektiv gegenüber Steatosis Hepatis (Fettleber) wirkten (Ben Mosbah et al., 2010). TUDCA und UDCA werden in zahlreichen Studien eine Reduktion der Akkumulation toxischer Aggregate bei neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Prionen, ein zytoprotektiver Effekt durch Reduktion radikaler Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS), sowie Prävention vor Apoptose bzw. mitochondrialer Dysfunktion zugeschrieben (Cortez und Sim, 2014). Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2018 vergleicht den positiven Effekt einer zusätzlichen Einnahme von UDCA zu dem first-line Antidiabetikum Sitagliptin (DPP 4-Inhibitor) bei Typ-2 Diabetikern mit chronischer Lebererkrankung (Shima et al., 2018). Die Patientengruppe, die zusätzlich UDCA erhielt, zeigte auf der einen Seite eine erhöhte Blutaktivität von Glucagon like Peptide-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum anderen eine stärkere Verminderung des *Hämoglobin-A1c* (HbA1c)-Blutwertes (Blutzuckergedächtnis). Beide Effekte sind als prognostische Verbesserung eines Diabetes Mellitus zu werten.

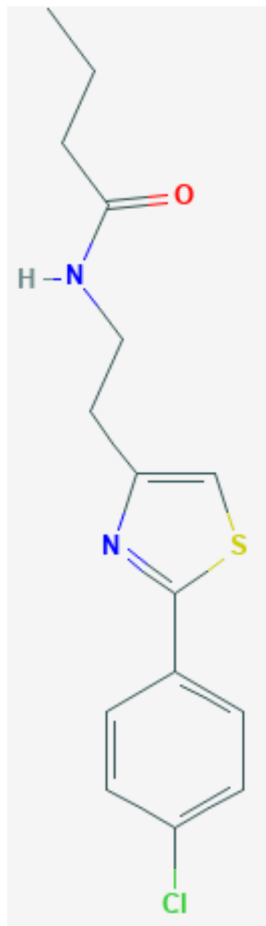
2.7.2. Pharmakologische Anwendung von 4-Phenylbutyrat (4-PBA): Stand der Forschung

Neben der zugelassenen, therapeutischen Anwendung von 4-PBA bei Enzymdefekten des Harnstoffzyklus haben sich ebenfalls die Funktionen als Inhibitor des Enzyms *Histon-Deacetylase* (HDAC) und damit der Genaktivierung gezeigt (siehe Cousens et al., 1979; Ma et al., 2016; Shi et al., 2018). Dies geschieht durch das Zusammenspiel von Acetylierung (Aktivierung durch Histone Acetyltransferase) und Deacetylierung (Deaktivierung durch HDAC) von N-terminal gelegener Lysinresten der Histone (Seto und Yoshida, 2014; Wang et al., 2013). Inzwischen ist es klar, dass die Regulation der Chromatinstruktur wesentlicher Bestandteil in der Kontrolle der Genexpression darstellt (Carducci et al., 1996; Kazantsev und Thompson, 2008). Bereits 1996 wurde beschrieben, dass 4-PBA potenter als sein Metabolit PAA wirkt und beide in humanen Prostata-Zellen Apoptose induzieren (Carducci et al., 1996). Inzwischen wurde 4-PBA in zahlreichen Studien im Zusammenhang mit Krebserkrankung getestet und befindet sich teilweise bereits in klinischen Studien der Phase II (Iannitti und Palmieri, 2011); die Arbeit von Iannitti und Palmieri stellte heraus, dass 4-PBA Einfluss auf Wachstumsinhibierung und Differenzierung von verschiedenen Tumor-Entitäten aufweist. Dazu zählen das Hepato-Zelluläres-Karzinom, Kolon- und Prostata-Karzinom,

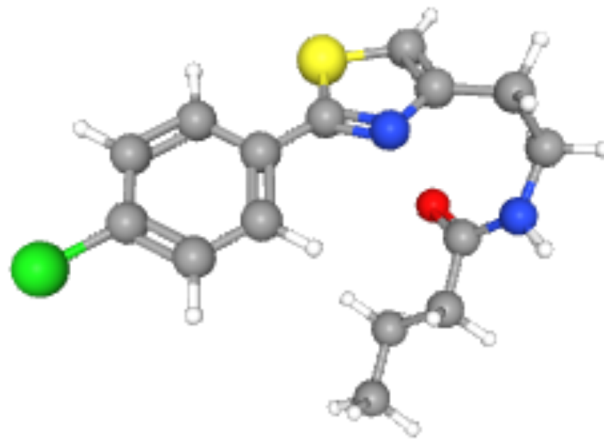
Burkitt-Lymphom, primären Akuten Myeloischen Leukämie, Retino- und Medulloblastom, Gliomen und in klinischen Phase II Testungen bei soliden Tumoren sowie high-grade Astrozytomen. Außerdem liegt auch im Feld neurologischer und neurodegenerativer Erkrankungen ein großer Fokus auf 4-PBA, wie z.B. bei Morbus Huntington oder den motoneuronalen Erkrankungen Amyotrophe Lateral Sklerose und Spinale Muskelatrophie; auch bei Multiple Sklerose hat 4-PBA die Neuroinflammation und den allgemeinen Krankheitsfortschritt senken können (Chen et al., 2019). Mimori et al. (2012) zeigten, dass 4-PBA in humanen Neuroblastoma SH-SY5Y Zellen, *in vitro* eine Akkumulation von Parkin-associated endothelin receptor-like receptor verringerte. Zusätzlich kam es durch Verminderung des ER-Stresses zur Reduktion apoptotischer Zellen. Des Weiteren stellten die Autoren fest, dass die Potenz dieser Inhibierung, mit der Länge der Fettsäureschwänze in den Fettsäuren anstieg. Hier wurden ferner weitere Krankheiten aufgeführt, bei denen sich 4-PBA mit positiver Wirkung auf die Pathogenese auswirkte: Zystische Fibrose, Sichelzellanämie, Thalassämien (Mimori et al., 2012; Powell und Zeitlin, 2002). Die Arbeiten von Xiao et al. (Xiao et al., 2011), Ferriero und Brunetti-Pierri (Ferriero und Brunetti-Pierri, 2013), Zode et al. (Zode et al., 2012) sowie Mohammed-Ali et al. (Mohammed-Ali et al., 2017) unterstreichen, dass der positive Effekt unter anderem in Verbindung mit der Funktion von 4-PBA als chemisches Chaperon steht. Durch 4-PBA gesenkter ER-Stress reduziert die durch Fett induzierte Insulinresistenz, sowie β -Zell-Dysfunktion im Menschen (Xiao et al., 2011). Ferner ermöglicht das chemische Chaperon bei Pyruvat-Dehydrogenase-Mangel eine verbesserte Restaktivität des Enzyms, vor allem im betroffenen Cerebrum (Ferriero und Brunetti-Pierri, 2013). Zode et al. (2012) fanden im *myocilin gene* (MYOC) Mausmodell heraus, dass 4-PBA in Form von topisch, okkular verabreichte Augentropfen eine signifikante Verringerung der Auftrittswahrscheinlichkeit eines erhöhten Augeninnendrucks bewirkte. Die Pathogenese des Offenwinkelglaukoms ist auf die Agglutination von fehlgefalteten Myocilins innerhalb des ER zurückzuführen. Die Folge ist die Induktion von ER-Stress und die Aktivierung der UPR. Da der *MYOC*-Defekt bis jetzt der bekannteste Grund für die Entstehung eines primär chronischen Offenwinkelglaukoms ist (Zode et al., 2012), gibt 4-PBA Hoffnung auf weitere Therapieansätze bei dieser Erkrankung. Mohammed et al. (2017) untermauerten in einer Studie zu *chronischen Nierenerkrankungen* (CKD), dass 4-PBA als molekulares Chaperon die Proteinfaltung im ER unterstützt und so den ER-Stress senkt. Ferner hemmt es die Hochregulierung von Schlüsselgenen der UPR und wirkt so protektiv im klinischen Verlauf der CKD (Mohammed-Ali et al., 2017).

2.7.3. Pharmakologische Anwendung von *Azoramide* (AZO): Stand der Forschung

Ähnlich wie 4-PBA wird *Azoramide* (AZO), mit dem Molekulargewicht von $308,8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ und der Molekularformel $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{OS}$ (PubchemCID 7518316, 22.08.2021), als chemisches Chaperon bzw. Modulator der UPR beschrieben (Abb. 2.6). Experimentell konnte gezeigt werden, dass es zum einen die Proteinfaltung verbessert und zum anderen die Expression molekularer Chaperone des ER stimuliert, wodurch der ER-Stress geringer gehalten werden kann, indem die Faltungskapazität erhöht und somit die ER-Funktion aufrechterhalten wird (Siehe Fu et al., 2015; Guillen, 2016). So zeigte sich, dass nach einer Inkubation mit AZO und der anschließenden Behandlung mit dem ER-Stress induzierenden TG, der ER-Stress Indikator CHOP im Gegensatz zur Kontrolle nicht hochreguliert wurde und Zellen vor Dysfunktionen und Apoptose bewahrt wurden. Neben den positiven Wirkungen auf ER-Stress zeigt AZO diverse antidiabetische Effekte, gesteigerte Insulinsensitivität, Kardioprotektion auf Insulin resistenten Herzmuskelzellen, pankreatischen β -Zell Erhalt, aber auch eine positive Beeinflussung auf erhöhte Blutfette und dadurch hervorgerufen histopathologische Änderungen (Bagci et al., 2019; Fu et al., 2015; Okatan et al., 2019; Ruan et al., 2018). So senkt AZO ferner durch eine Chlamydia pneumoniae Infektion induzierte ER-Stress/UPR-anhängige Lipolyse und fatty acid-binding protein 4-Sekretion von Adipozyten (Walenna et al., 2020). In der neuesten Arbeit zu dem noch wenig erforschten small molecule Azoramide beobachteten Ke et al. (2020), dass Azoramide wie 4-PBA neuroprotektive Eigenschaften auf pathologische Morbus Parkinson auslösende dopaminerge Neuronen aufweist. Genauer fanden sie heraus, dass AZO die UPR moduliert, ER-Stress abwendet, die Ca^{2+} -Homöostase moduliert und die mitochondriale Funktion aufrechterhält, was in der Summe in einer erhöhten Widerstandsfähigkeit und Überleben der Zellen resultiert (Ke et al., 2020; Kitakaze et al., 2019).



Azoramide:
 N-[2-[2-(4-chlorophenyl)-
 1,3-thiazol-4-yl]ethyl]butanamide



Molekular Gewicht: 308.8 g/mol

Molekular Formel: C₁₅H₁₇ClN₂OS

Abbildung 2.6: 2D und 3D Strukturformel von Azoramide (AZO) (modifizierte Abbildung aus PubchemCID 7518316, Abgerufen am 22.08.2021 - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7518316#section=2D-Structure> und <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7518316#section=3D-Conformer>).

2.8. Ziele der Arbeit

Das ER fungiert als zentrales, wesentliches Zellorganell der Proteinsynthese und dient als Hauptspeicherorganell für Ca²⁺ (siehe Kapitel 2.1). Der in der ER-Membran befindliche ubiquitär vorkommende Sec61-Komplex wurde als Proteintranslokase naszierender Polypeptidketten identifiziert. Darüber hinaus fungieren Sec61-Komplexe als Ca²⁺-Leckkanäle und stellen somit einen wesentlichen Bestandteil der Ca²⁺-Homöostase dar (siehe Kapitel 2.4.2.1). Es konnten auf zellulärer Ebene einige Regulatorproteine für das durch Sec61-Komplexe vermittelten Ca²⁺-Leck (Ca²⁺-Efflux) identifiziert werden (siehe Kapitel 2.4.2.1). Entsprechend der nachgewiesenen Regulatorproteine lässt sich beispielsweise das Ca²⁺-Leck durch die CaM-Antagonisten (Ophiobolin A und Trifluoperazin) sowie durch die Induktion von ER Stress durch Anhäufung unvollständig gefalteter Proteine

(Tunicamycin und Dithiothreitol) vergrößern (siehe Kapitel 2.5). Das Ca^{2+} -Leck wird innerhalb des ER unter anderem durch das zentrale Chaperone BiP limitiert (siehe Kapitel 2.3.1). In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, inwieweit chemische Chaperone das Ca^{2+} -Leck aus dem ER beeinflussen können. Als Vertreter der chemischen Chaperone wurden 4-Phenylbutrate (4-PBA) und Azoramide (AZO) gewählt.

Neben weiteren epigenetischen und molekularen Effekten wurde für 4-PBA beschrieben, dass es neben der Hochregulierung von Schlüsselgenen der UPR auch als molekulares Chaperon die Proteinfaltung im ER unterstützt und dadurch ER-Stress der Zellen senkt (Mohammed-Ali et al., 2017). Auch für Azoramide konnte gezeigt werden, dass neben einer verbesserten Proteinfaltung und erhöhten Expression molekularer Chaperone, die UPR und Ca^{2+} -Homöostase moduliert, ER-Stress abgewendet und somit ein protektiver Effekt für das Zellüberleben und -funktion erbracht wird (Ke et al., 2020; Kitakaze et al., 2019). Die positiven Effekte der beiden chemischen Chaperone auf unterschiedliche Pathogenesen und Krankheiten sind in den Kapitel 2.7.2 und 2.7.3 detaillierter beschrieben.

Um mögliche Effekte von 4-PBA und Azoramide auf den Ca^{2+} -Leck zu detektieren, wurden Ca^{2+} -Imaging-Experimente mittels Fura-2 an HEK-293 durchgeführt. Dabei wurde der SERCA-Inhibitor Thapsigargin verwendet, um zytosolische Ca^{2+} -Transienten zu erzeugen, welche das Ausmaß des Ca^{2+} -Lecks widerspiegeln. In ähnlicher Weise wurde das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin verwendet, um den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt zu bestimmen. ER-Stress wurde pharmakologisch mit Hilfe der bekannten Sec61-Modulatoren Tunicamycin, Dithiothreitol und Trifluoperazine induziert.

So legt diese Arbeit ihren Fokus auf die Erforschung möglicher Effekte von 4-PBA und Azoramide auf das Ca^{2+} -Leck unter pharmakologisch induziertem ER-Stress. Das Ziel besteht darin grundlegende Rückschlüsse auf mögliche Effekte chemischer Chaperone auf die Ca^{2+} -Homöostase und insbesondere direkte Effekte auf den Ca^{2+} -Leck aus dem ER und Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Gehalts im ER zu ziehen.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Software

3.1.1. Geräte und Materialien

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte und Materialien.

Hersteller	Produkt
Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	Nitril Handschuhe (Einweg)
Corning (Kaiserslautern)	Zell-Schaber (Einweg)
Dumont (Schweiz)	Pinzette
Duran-Schott (Wertheim)	Deckglas (Ø 25 mm), Laborflasche (250 ml; 500 ml), Messkolben (250 ml; 500 ml)
Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)	Galaxy® 14 S CO ₂ -Inkubator, Tischzentrifuge Minispin plus
Falcon (Kaiserslautern)	Zellkulturschalen (35 mm x 10 mm)
Grainer Bio-One GmbH (Frickenhausen)	Serologische Pipetten (1 ml; 2ml; 5 ml; 10 ml; 25ml), Zentrifugenröhre (15 ml; 50 ml)
Heidolph (Schwabach)	Magnetrührer
INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal)	Halton LaminAir (Sterilwerkbank), Pipet-Boy (Akku Pipettierhilfe)
Junghans (Schramberg)	Stoppuhr
Kinesis GmbH (Langenfeld)	HTL Single Channel Pipetten (2 - 20 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl)
Machery-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)	Wägebapier (90 x 115 mm)
Merck Millipore (Darmstadt)	Milli-Q (Wasseraufbereitungssystem)
Miele (Gütersloh)	Spülmaschine
MS Laborgeräte Schroeder OHG (Dielheim)	Absaugsystem; SANYO CO ₂ Incubator (Brutschrank)
neoLab Migge GmbH (Heidelberg)	Vortex Mixer

Sarstedt (Numbrecht)	Pipettenspitzen (200 µl; 1000 µl), SafeSeal Reagiergefäße (1,5 ml; 2 ml), Serologische Pipetten (1 ml; 2 ml; 25 ml), TC Flasche (TC 75), Zentrifugenröhre (15 ml)
Sartorius AG (Göttingen)	Feinwaage
Systec GmbH (Linden)	Systec VX-95 (Autoklaviergerät)
VWR (Darmstadt)	Einfache einlagige Tissue-Wischer, Erlenmyerkolben (250 ml; 500 ml), Becherglas (250 ml; 500 ml), Mikroröhrchen, Pasteurpipetten
WTW (Weilheim)	pH 526 (pH-Meter), pH Elektrik SenTix41 (pH-Meter Spitze)
Zeiss (Jena)	Axiovert 25 (Auflichtmikroskop)

3.1.2. Imaging-System

Tabelle 3.2: Aufzählung der Bestandteile des Imaging-Systems des Experimentellen-Setups, das für die Fura-2 Fluoreszenzaufnahmen genutzt wurde.

Gerät	Fabrikant	Benennung
Mikroskop	Zeiss (Jena)	Inverses Fluoreszenz-Mikroskop
Kamera	Zeiss (Jena)	AxioCAM
Metallhalogenid Lichtquelle	Zeiss (Jena)	HXP 120C
Chroma Technology GmbH (Olching)	Filter Visitron (T510/80m; T400lp)	Chroma Technology GmbH (Olching)
Attofluor™ CellChamber	Life Technologies (Darmstadt)	Calcium-Imaging-Messkammer

AHF Analystechnik (Tübingen-Pfrondorf)	Visitron Filter (340/26 BrightLine HC; 387/11 BrightLine HC)	Visitron-Filtersystem
Sutter Instruments Company (Hofheim)	Sutter Instruments Company	Xenon-Gasentladungslampe (Lambda DG-4)

3.1.3. Software

Tabelle 3.3: Aufzählung der in dieser Arbeit benutzten Software und deren Fabrikanten.

Software	Fabrikant
VisiView	Visitron Systems GmbH
Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation
Microsoft Powerpoint 2019	Microsoft Corporation
OriginPro 8.6	OriginLab Corporation
SigmaPlot 10.0	Systat Software, Inc
CoralDRAW X4	Coral Corporation
EndNote X9	Clarivate Analytics

3.2. Chemikalien

Tabelle 3.4: Aufzählung der in dieser Arbeit benutzten Chemikalien und deren Fabrikanten.

Hersteller	Produkt
Acros Organics (New Jersey, USA)	Dimethylsulfoxid (DMSO)
ENZO Life Sciences GmbH (Lörrach)	Ophiobolin A (OPHIO)
Invitrogen™/ThermoFischer Scientific (Suzhou, China)	Minimum essentiell medium (MEM),

Material und Methoden

	fetales Kälberserum (FCS), Fura-2 AM, Fura-2 Ca ²⁺ Imaging Calibration Kit, Ionomycin (IONO), Thapsigargin (TG)
Merck Millipore (Darmstadt)	D ⁽⁺⁾ -Glucose-Monohydrat
Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)	Dithiothreitol (DTT)
Sigma Aldrich (Taufkirchen)	4-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), Calciumchlorid (CaCl ₂), Dimethylsulfoxid (DMSO), Emetine (EME), Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA), Kaliumchlorid (KCl), Magnesiumchlorid (MgCl ₂), Phenylacetic acid (PAA), Sodium Phenylbutyrate (4-PBA), Trifluoperazine (TFP), Trypsin, Tunicamycin (TUNI) Azoramide (AZO)
UdS (Saarbrücken)	Ethanol, Methanol
VWR (Leuven, Belgien)	Natriumchlorid

3.3. Substanzen und Wirkstoffe

Tabelle 3.5: Aufzählung der in dieser Arbeit genutzten Substanzen, Wirkstoffe und deren Spezifikationen.

Substanz	Wirkung	Konzentration/Stocklösung (Lösungsmittel)	Endkonzentration
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Lösemittel		
Fura-2-AM (Fura)	Zytosolischer Ca ²⁺ -Indikator	1 mM (DMSO)	4 µM
Thapsigargin (TG)	Irreversibler SERCA-Inhibitor	1 mM (DMSO)	1 µM
Ionomycin (IONO)	Ca ²⁺ -Ionophor	10 mM (DMSO)	10 µM
Tunicamycin (TUNI)	N-Glykosylationinhibitor	10 mg/mL (DMSO)	10 µg/mL
Dithiothreitol (DTT)	Detergens (Reduziert Disulfidbrückenbindungen)	1 M (DMSO)	10 µg/mL
Sodium-Phenybutyrat (4-PBA)	Co-Chaperon, Histon Deacetylase Inhibitor	1 M (H ₂ O)	1-, 5-, 10 mM
Phenylacetic Acid (PAA)	Co-Chaperon, Histon Deacetylase Inhibitor	5 M (H ₂ O)	1-5 mM
Azoramide (AZO)	Co-Chaperon	1 mM (DMSO)	5-, 10-, 20-, 50-, 100 µM
Ophiobolin A (OPHIO)	Calmodulininhibitor	100 mM (DMSO)	100 µM
Trifluoperazine (TFP)	Calmodulininhibitor	10mM (DMSO)	10 µM

3.4. Verwendete Lösungen für die zytosolische Ca²⁺-Messungen

Tabelle 3.6: Aufzählung der in dieser Arbeit genutzten Lösungen.

	Ca ²⁺ -freie Lösung (ZCa)	Ca ²⁺ -Lösung (1Ca)	nominal Ca ²⁺ -freie Lösung (NCaF)
NaCl	140 mM	140 mM	140 mM
KCl	4 mM	4 mM	4 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM
D-Glukose	10 mM	10 mM	10 mM
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM
EGTA	0,5 mM	-----	-----
CaCl ₂	-----	1 mM	-----
pH	7,42	7,42	7,42

3.5. Zelllinien und Primärzellen

3.5.1. Humane epitheliale Zelllinie (HEK-293)

Zur Durchführung aller Experimente in Bezug auf die chemischen Chaperone 4-PBA und Azoramide, kam die etablierte, humane epitheliale Zelllinie „*human embryonic kidney*“ HEK-293 zum Einsatz. Diese entstammt ursprünglich einer menschlichen, femininen, embryonalen Nierenzelle, welche durch Insertion von DNA-Sequenzen des humanen Adenovirus 5 künstlich transformiert und dadurch sehr robust gegen äußere Umweltfaktoren gemacht wurde (Graham et al., 1977). Die Zellen wurden von American Type Culture Collection (ATCC) erworben.

3.5.2. Murine-Hautfibroblasten (Y344H)

Zur Durchführung einer Experimentreihe der Vorversuche, wurden murine-Hautfibroblasten von homozygoten Mäusen mit einer Punktmutation im Sec61a1^{Y344H} (Y344H) Gen, der Firma

The Jackson Laboratory verwendet. Diese Primärzellen wurden im Vorfeld aus 5 Mäusen präpariert, gepoolt und bis zur Verwendung tiefgefroren. Die Versuche erfolgten gemäß dem Tierschutzgesetz und wurden durch den Amtstierärztlichen Dienst des Landesamts für Verbraucherschutz des Saarlandes offiziell genehmigt (Versuchsvorhaben Nr. 25/2014 vom 25.10.2014).

Die Entwicklung der Mausmutante geht auf Erfahrungen von Lloyd et al., 2010 zurück, die eine homozygote Maus mit einer Punktmutation im Di-Tyrosin-Motiv des SEC61A1-GEN etablierten. Hierzu wurde das stark konservierte Tyrosin an Stelle 344 durch Histidin ersetzt; In der Wissenschaft wird dies als Sec61a1^{Y344H} Mutation bezeichnet. Die Mausmutante Y344H zeigte in ihren Experimenten eine Hyperglykämie, die als Folge einer Insulininsuffizienz, durch ER-Stress induzierte β -Zell-Apoptose resultierte (Lloyd et al., 2010). Neben diesem Typ-II-Diabetes führt eine Mutation in der Sec61 α -UE ebenfalls zu einem Variablen Immundefektsyndrom (Zimmermann, 2016).

3.5.3. Kultivierung der verwendeten Zelllinien

Für die Zellkultivierung wurden die Zellen in spezielle 75 cm² Kulturflaschen appliziert und mit ca. 8 ml standardisiertem Zellmedium „Minimum essentiell medium“ (MEM), 10% hitzeinaktivierten *fötalem Kälberserum* (FCS,) sowie 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) supplementiert. Danach wurden die Kulturflaschen in einen luftbefeuchteten Inkubator platziert und unter diesen Wachstumsbedingungen bei 5% CO₂ und 37°C belassen.

Das Zellwachstum wurde anschließend manuell kontrolliert, wobei alle 48 h – 72 h bei Erreichen von 80% Zelldichte die Zellen passagiert und dann entweder wie oben beschrieben kultiviert oder für Experimente in kleine Petrischalen vereinzelt wurden. Bei der Passage wurde zunächst das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen dreimal mit *Phosphatgepufferter Salzlösung* (PBS) gewaschen. Danach wurden die Zellen mittels 3 ml Trypsin-EDTA (*Ethylendiamintetraacetat*,) behandelt. Die physiologisch im Verdauungstrakt vorkommende alkalische Protease Trypsin initiiert den Abbauprozess der Zell-Matrix-Kontakte. Über diese extrazelluläre Matrix, verbinden sich die adhärenen Zellen mit dem Kunststoff der Zellkulturflasche. Nach der proteolytischen Ablösung kann EDTA dann als Ca²⁺-Chelator die Zell-Zell-Verbindungen trennen. Alle Kulturmedien wurden bei 2-8 °C

im Kühlschrank gelagert und kurz vor Gebrauch mittels eines Wasserbades langsam auf 37 °C erwärmt.

Für die Ca²⁺-Imaging Experimente wurden die Zellen auf 25 mm Deckgläser („Coverslips“) ausplattiert. Die Coverslips sind in einem vorausgegangenen Schritt für 20 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) mit 0,1 mg/ml Poly-l-lysine (PLL) inkubiert worden, um eine adhärentere Oberfläche für das Wachstum der Zellen bieten zu können. Danach wurden die Coverslips dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem Ausplattieren wurden die Coverslips auf dem Boden einer 35 mm Kunststoff Petrischalen platziert und mit 1,5 ml MEM + 10% fötales Kälberserum überdeckt. Anschließend wurden sie unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben inkubiert.

3.6. Ca²⁺-Imaging

3.6.1. Aufbau und Funktionsweise des verwendeten Zweikanal-Imagingsystems

Zur Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kam ein Live Cell Ca²⁺-Imaging Setup von „Visitron Imaging System“ zur Anwendung (Abb. 3.1). Der gesamt Systemaufbau beinhaltet ein inverses Fluoreszenzmikroskop, eine semi-konfokale Komponente (X-Light), die Kamera-Einheit (ORCA-D2), zwei Lichtquellen Xenon-Gasentladungslampe (Lambda DG-4) und eine LED-Lampe (Spectra-5). Spectra-5 ist während der Fura-Messungen (siehe Kapitel 3.6.2) außer Betrieb und der Filterwürfel der X-Light-Einheit – bestehend aus einer Spinningdisk, einem dichroischem Spiegel und Emissionsfilter – ist aus dem Strahlengang geklappt, um das Licht unbeeinflusst passieren zu lassen.

Für die Experimente wird durch die Xenon-Gasentladungslampe (DG-4) Licht erzeugt. Der Exzitationsfilter wiederum lässt nur Licht einer vom Versuchsaufbau abhängigen Wellenlänge zum Mikroskop und von dort über einen dichroischen Spiegel weiter zur Messkammer passieren. Die hier befindlichen Zellen der Probe, die vorab mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM beladen wurden, emittieren und reflektieren daraufhin Licht einer anderen Wellenlänge. Dieses passiert den dichroischen Spiegel und den Emissionsfilter im Mikroskop, wodurch nur Licht einer bestimmten Wellenlänge weitergeleitet wird. Unbeeinflusst durchdringt dieses den freien Strahlengang des X-Light, um nach letzter Passage von dichroischen Spiegel und Emissionsfilter innerhalb der ORCA-D2-Einheit auf das „Charge-coupled Device“ 1 (CCD1) zu treffen. Hier wird das Lichtsignal von Kamera 2 detektiert und mittels der Software „VisiView“

in eine elektronische Information umgewandelt. Die so erhobenen Daten in Verknüpfung mit Microsoft Excel 2019 sind einerseits Grundlage der Analyse und dienen andererseits der Visualisierung der gewonnenen Informationen

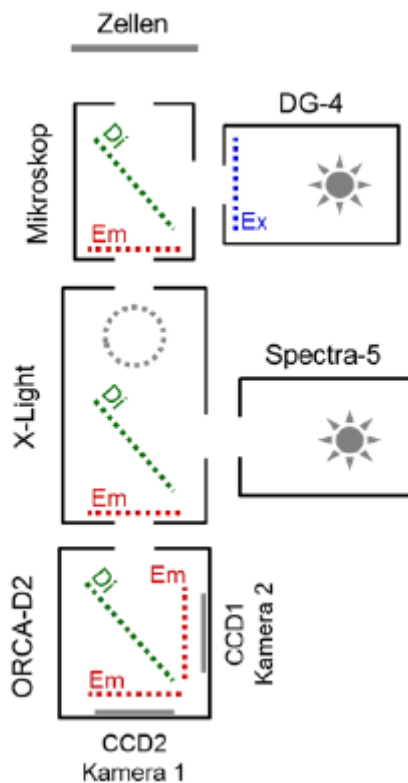


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des verwendeten Ca^{2+} -Imagingsystems.

Das System basiert auf fünf Komponenten: Den Zwei Lichtquelle DG-4 mit Exzitationsfilter (Ex = blau) und Spectra-5, sowie Mikroskop, X-Light, ORCA-D2. Bis auf die Lichtquellen bestehen die Komponenten aus einem Filterwürfel, der sich aus dichroitischem Spiegel (Di = grün Linie) und 1 bzw. 2 Emissionsfilter (Em = rote Linie) zusammensetzt. In der X-Light Einheit ist zusätzlich ein Spinningdisk (grauer Kreis) verbaut. Die Bildverarbeitungseinheit ORCA-D2 dient der Detektion der Lichtsignale, mittels zwei verbauter Kamerasensoren CCD1 und 2. (Zur Verfügung gestellt von der Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes).

3.6.2. Fura-2 AM

Für die ratiometrischen Ca^{2+} -Imaging Experimente zur Ermittlung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationsänderung ist Fura-2 verwendet worden. Fura-2 ist eine sogenannte Ca^{2+} -Indikators substanz, mithilfe derer sich, nach vorheriger Kalibrierung, qualitative

Änderungen sichtbar und quantitative Ca^{2+} -Werte berechnen lassen. Dieses Molekül wurde 1985 von Roger Tsien etabliert und stellt in seiner Grundform ein Derivat des Ca^{2+} -Chelators *1,2-Bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N' Tetraessigsäure* (BAPTA) dar, das nur schlecht Membranen überwinden kann (Grynkiewicz et al., 1985). Durch die Kopplung von *Acetoxymethylester* (AM), werden die vier negativen, hydrophilen Ca^{2+} -bindenden Carboxylgruppen besetzt und die Permeation über die Plasmamembran der Zelle ermöglicht. Nach erfolgreicher Diffusion von Fura-2-AM in das Zytosol, werden die Estergruppen von ubiquitären, unspezifischen Esterasen abgespalten und der „aktive“ Indikator-Farbstoff Fura-2 verbleibt im Intrazellularraum. Während einer ratiometrischen Messung wird Fura-2 mit UV-Licht der Wellenlängen 340 nm sowie 380 nm angeregt und die Emission von Fura-2 bei 510 nm detektiert. Dabei macht man sich den spektralen Charakter von Fura-2 zunutze: Mit der Bindung eines Ca^{2+} -Ions geht eine Verschiebung des Fura-2 Fluoreszenzexcitationsmaximum von 380nm (wenn kein Ca^{2+} gebunden) auf 340 nm (wenn Ca^{2+} gebunden) einher. Die Emissionswellenlänge in beiden Fällen bleibt konstant bei 510 nm. Auf diese Weise wirkt Fura-2 als ratiometrischer Ca^{2+} -Sensor. Denn folglich heißt das: Wenn die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol zunimmt, steigt ebenso die Intensität der Fluoreszenzemission bei 510 nm nach Anregung mit 340 nm, wohingegen sich die Intensität im Gegenzug bei Anregungen von 380 nm vermindert.

Nach anschließender Quotientenbildung (= Ratio, R) der unterschiedlichen Emissionen bei 340 nm und 380 nm (F340/F380), ergibt sich ein Wert als Messgröße, der auf der freien Ca^{2+} -Konzentration basiert. In dem hier verwendeten Zweikanal-Imagingsystem (Abb. 3.1) wird Fura-2 aus technischen Gründen mit Wellenlängen von 340 und 387 nm angeregt und die Emission bei 510 nm detektiert. Daher wird die Ratio F340/F387 gebildet. Vorteilhaft ist, dass auf diese Weise keine anderen Faktoren wie Farbstoffkonzentration oder Beleuchtungsstärke Einfluss auf die Ratio ausüben (Barreto-Chang und Dolmetsch, 2009). Ferner weist Fura-2 eine Ca^{2+} -Affinität ($K_d \sim 145$ nM) auf, die dem endogenen Ca^{2+} -Level einer im Ruhezustand befindlichen Zelle entspricht, und andererseits eine Sensitivität für ein weites Spektrum an Ca^{2+} -Konzentrationen ~ 50 nM bis $\sim 1,5$ μM (Grynkiewicz et al., 1985; Paredes et al., 2008). Beides macht Fura-2 zu einem idealen zytosolische Ca^{2+} -Sensor.

3.6.3. Kalibrierung der Fura-2 Ratio-Werte

Bestimmung der K_d . Für eine systemunabhängige, quantitative Vergleichbarkeit der Ca^{2+} -Konzentration durch die in den Experimenten erhobenen Ratio F340/F387, wurde eine Kalibrierung entsprechend einer etablierten Methode durchgeführt (e.g., Lang et al., 2011). Dadurch lässt sich sowohl eine systemspezifische Dissoziationskonstante K_d von Fura-2 für Ca^{2+} bestimmen, als auch der zelltypspezifische minimal (R_{min}) und maximal (R_{max}) detektierbare Ratiowert aufklären. Anschließend besteht die Möglichkeit, diese in eine dafür geeignete Umrechnungsvorschrift einzufügen und so eine aussagekräftige Ca^{2+} -Konzentration für willkürliche Ratio-Werte im linearen Bereich zu berechnen. Mittels eines Fura-2 Ca^{2+} -Imaging-Kalibrierkits (Invitrogen), das auf einer definierten Ca^{2+} -Verdünnungsreihe (0-39 μM) (Probelösungen 1-11) basiert, wurde die systemspezifische, von der Messapparatur abhängige K_d von Fura-2 für Ca^{2+} ermittelt.

Diese Ca^{2+} -Standardlösungen sind mit 50 μM Fura-2 und 15 μM Polystyren-Mikropartikeln versetzt, was einen immer gleichmäßigen Flüssigkeitsraum zwischen zwei Deckgläsern und daher auch eine identische Fokusebene zur Standardisierbarkeit ergibt. Eine weitere Probe liegt ohne Fura-2 vor (Probelösung 12), um anhand derselben die Hintergrundfluoreszenz (HG_{387} , HG_{340}) abzugleichen.

Für die Kalibrierung wurden 5 μl eines der Kalibrierstandard-Lösungen auf ein vorab in die Messkammer des Visitransystem eingespanntes Deckglas (\varnothing 25 mm) pipettiert und mittels eines zweiten, schmaleren Deckglases (\varnothing 10 mm) überdeckt. Anschließend erfolgte die ratiometrische Messung der Fluoreszenzintensität bei 510 nm nach Exzitation mit 340 nm (F_{340}) und 387 nm (F_{387}) jeweils eine der 12 Ca^{2+} -Probelösungen:

Tabelle 3.7: Probelösungen des Fura-2 Kalibrierkits (Invitrogen) zur Ermittlung der systemspezifischen K_d .

Probelösung	Fura-2 (μM)	freies Ca^{2+} (μM)
1	50	0
2	50	0,017
3	50	0,038
4	50	0,065
5	50	0,1
6	50	0,15
7	50	0,225
8	50	0,351
9	50	0,602
10	50	1,35
11	50	39
12	---	39

Die dadurch entstehende Konstante spiegelt den Zusammenhang der experimentell erhobenen Fluoreszenz-/Emissionssintensitäten und der freien Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$) wider. Die so gemessenen Werte können dann mittels der durch Grynkiewicz et al. (1985) etablierten Formel folgendermaßen kalkuliert werden (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = K_d \times \left(\frac{F_{387 \text{ max}}}{F_{387 \text{ min}}} \right) \times \left(\frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R} \right) \quad \left| \quad \begin{aligned} R &= \left(\frac{F_{340} - HG_{340}}{F_{387} - HG_{387}} \right) \\ K_d' &= K_d \times \left(\frac{F_{387 \text{ max}}}{F_{387 \text{ min}}} \right) \end{aligned} \right.$$

Wird die Formel durch Logarithmieren und Umformen in eine lineare Geradengleichung der Form $y = mx + b$ überführt, resultiert aus der Nullstelle dieser Geraden ($y = 0$), demnach der Schnittpunkt aus der Geraden und x-Achse. Dies ist der Logarithmus der K_d . Dieser wiederum ergibt schließlich durch Exponenzieren, die systemspezifische K_d von Fura-2 für Ca^{2+} . Die systemspezifische K_d wurde mehrmals während der Untersuchung ermittelt. Die ermittelten K_d lagen zwischen $3,74 \mu\text{M}$ und $5,37 \mu\text{M}$. Für die Umrechnung der Daten wurde $3,74 \mu\text{M}$ verwendet.

Abbildung 3.2. zeigt exemplarisch die Anwendung dieses Verfahrens bei dem der Schnittpunkt bei -5,38 lag und dementsprechend die K_d 4,11 μM war.

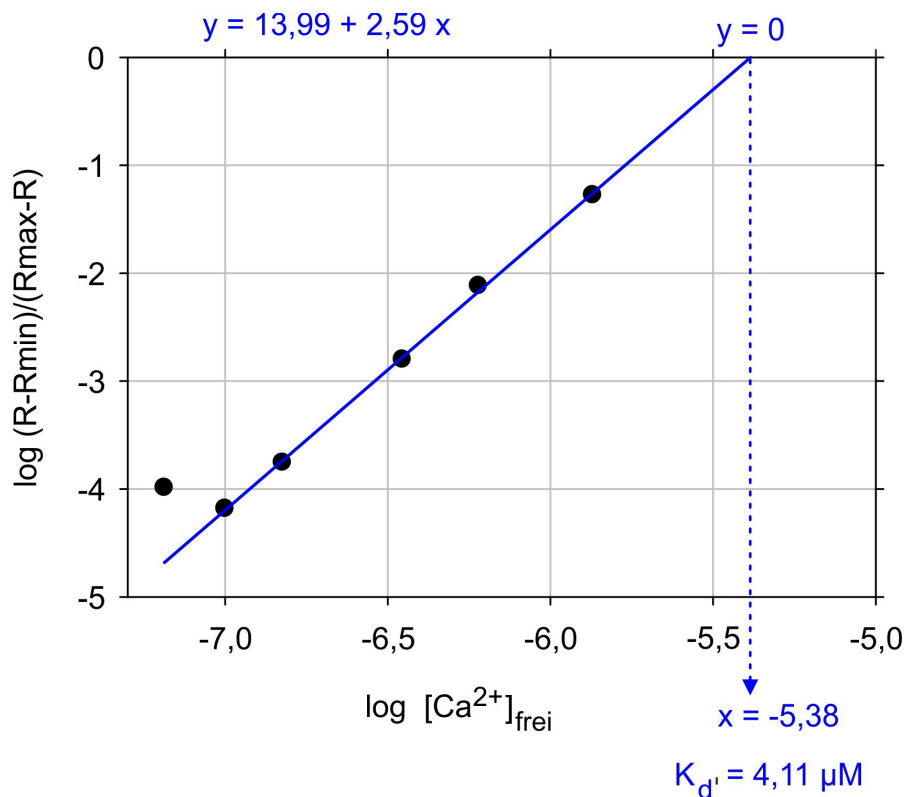


Abbildung 3.2: Beispielhafte Darstellung der logarithmischen Ratios bei 340 nm sowie 387 nm gegen die Ca^{2+} -Konzentration in Molar (sog. Kalibrierungsgerade).

Die lineare Regression mit den erhaltenen Daten ist in blau dargestellt. Für die Anfertigung der Kalibrierungsgeraden, wurden zusätzliche Fluoreszenzintensitäten von vorgefertigten Lösungen des Fura-2-Calcium-Imaging-Calibration-Kit (Invitrogen) bestimmt und im Graphen zur Darstellung gebracht. Die Standard-Lösungen enthalten vordefinierte Ca^{2+} -Konzentrationen und entsprechen 0 bis 39 μM . Die dazu gehörigen Ratios wurden wie oben beschrieben berechnet und anschließend logarithmisch gegen die Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen. Mittels SigmaPlot10 wurden die Kalibrierungsgeraden $y = y_0 + ac$ erstellt. Auf Grund der bekannten Ca^{2+} -Konzentrationen der Standard-Lösungen, bestand die Möglichkeit, durch Verwendung und Umformung der Gleichung aus (Grynkiewicz et al., 1985), eine systemspezifische K_d für FURA-2 von 4,11 μM für das zugrunde liegende Versuchs-Aufbau zu berechnen. Dadurch konnten, mittels der gemessenen Intensitäten, die Ca^{2+} -Konzentrationen aller folgenden Experimente berechnet werden.

Bestimmung von Rmin und Rmax: Für die zugrunde liegenden Versuchsreihe wurden HEK-293 Zellen zuvor für zwei Tage auf Deckgläsern kultiviert und mit einer 1 mM Ca^{2+} -Lösung (1Ca) und einer Konzentration von 4 μM Fura-2-AM für 20 min bei Dunkelheit und RT beladen.

Für Rmin wurden die Zellen auf dem Deckglas mit einer 10 μM IONO und 300 μl 15 mM EGTA-Ringerlösung (EGTA) für 10 min inkubiert und anschließend durch neues EGTA ersetzt. Nach 4-maliger Wiederholung wurde der Coverslip in das Mikroskop eingespannt, mit 300 μl 15 mM EGTA-Ringerlösung (ZCa) bedeckt und die ratiometrische Messung alle 3 s bei einer Belichtungszeit von 10 ms (binning: 4x) für 5 min durchgeführt. Die statistische Analyse in Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch, dass Rmin bei einem Wert von 0,544 lag.

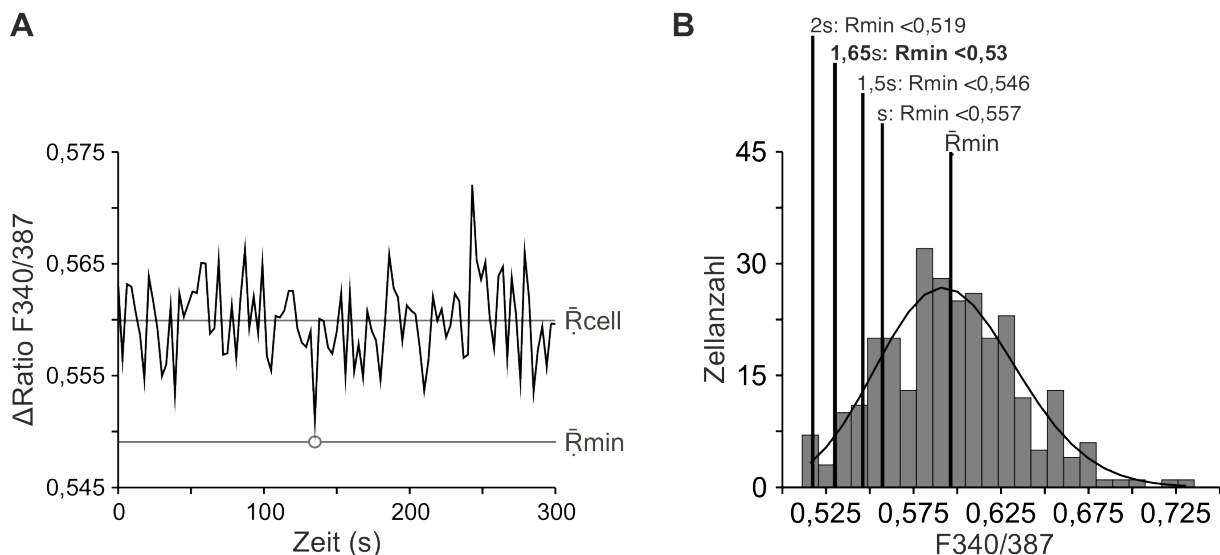


Abbildung 3.3: Ermittlung der Rmin-Werte von HEK-293 Zellen zur Berechnung der entsprechenden Ca^{2+} -Konzentration.

(A) Rmin einer Zelle nach Applikation von 10 μM IONO und 300 μl 15 mM Ca^{2+} -freiem Pufferlösung ab 0s bis 300s. (B) Verteilungsdiagramm aller Messschalen und Zellen zur Ermittlung von Rmin für die Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration der angeschlossenen Untersuchungsreihen.

Für Rmax wiederum wurden die Zellen auf dem Coverslip zunächst mit einer nominal Calcium-freien Lösung (NCaF) dreimal gewaschen und anschließend 300 μl der NCaF in die Messkammer pipettiert. Nach 180 s Messdauer wurden 300 μl einer 10 μM IONO und

50 mM Calcium-Lösung beigefügt, so dass für die restlichen 12 min Messdauer eine Endkonzentration von 25 mM Calcium-Ionen (Ca^{2+}) vorlag.

Nach Subtraktion der durch drei Messpunkte ermittelten Hintergrundintensität und anschließender Quotientenbildung aus F340/F387 konnten so maximale, sowie minimale Fluoreszenzintensitäten erhoben werden. Die statistische Analyse in Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch, dass R_{max} bei einem Ratio-Wert von 6,247 lag.

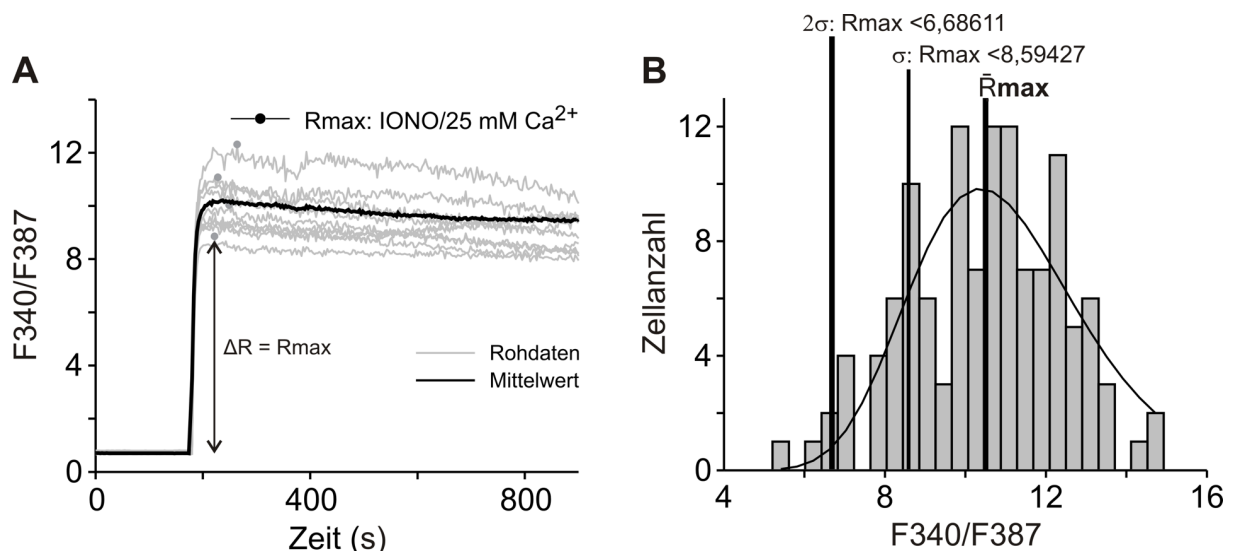


Abbildung 3.4: Ermittlung von R_{max} -Werten zur Berechnung der entsprechenden Ca^{2+} -Konzentration.

(A) Beispieldarstellung der ermittelten Ratios F340/F387 von R_{max} einer Messschale nach Zugabe der 10 μM IONO und 50 mM Ca^{2+} -Lösung bei 180s. (B) Verteilungsdiagramm aller Messschalen und Zellen zur Ermittlung von R_{max} für die Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration der angeschlossenen Untersuchungsreihen.

3.7. Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration

Die ermittelten Parameter K_{d} , R_{min} und R_{max} , die für die Berechnung ausgewählt worden sind, wurde erhoben, wie in Abbildungen 3.2, 3.3 und 3.4 gezeigt wird. Die Konzentration der freien Calciumionen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ wurde hieraus (nach Grynkiewicz et al., 1985) mit der folgenden Formel berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = K_{\text{d}}' \frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R} \quad \left| \begin{array}{l} K_{\text{d}}' = 3742,5 \text{ nM} \\ R_{\text{min}} = 0,544 \\ R_{\text{max}} = 6,247 \end{array} \right.$$

Dabei entspricht K_d der empirischen K_d , R dem Verhältnis der Fluoreszenz bei 340 nm zu der Fluoreszenz bei 387 nm (F_{340}/F_{387}), R_{min} der Ratio in der Abwesenheit von Ca^{2+} und R_{max} der Ratio bei saturiertem Ca^{2+} .

Abbildung 3.5 zeigt exemplarisch die Fura-2-Signale nach einer Speicherentleerung, hervorgerufen durch Thapsigargin (TG) und der korrespondierenden berechneten Ca^{2+} -Konzentration.

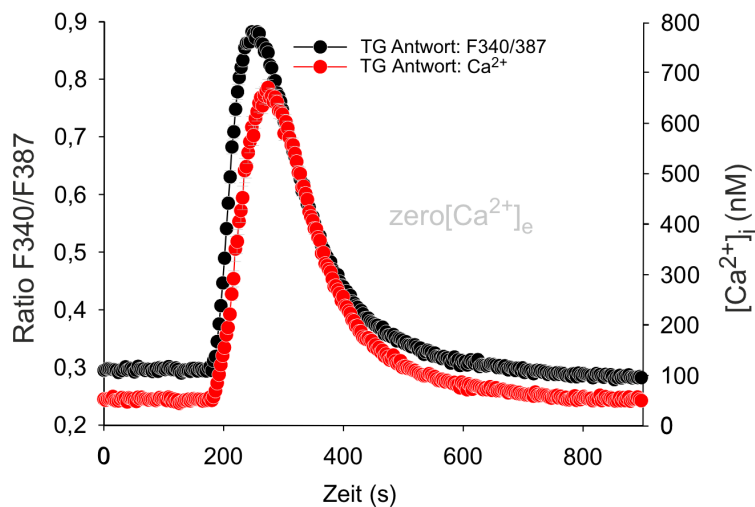


Abbildung 3.5: Berechnung von Fura-2 Signalen in die korrespondierende Ca^{2+} -Konzentration.

Beispiel für die Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration auf Basis der Fura-2 Ratiowerte F_{340}/F_{387} . Gezeigt werden die Ratios F_{340}/F_{387} nach Applikation von $1 \mu M$ Thapsigargin (TG). Zur Induktion eines Ca^{2+} -Efflux wurden bei $180 s$ $2 \mu M$ TG appliziert, welches in 0.2% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde. Um die Endkonzentration von $1 \mu M$ TG zu erreichen, wurde eine $2 \mu M$ TG-Lösung in $0.5 mM$ EGTA-Ringerlösung (ZCa) in die Messkammer gegeben, wobei die Verdünnung $1:2$ war. Dadurch resultiert eine END von DMSO von 0.1% . TG induziert den ER-Stress und demaskiert den Ca^{2+} -Leckstrom in das Zytosol. Die gemessenen Ratios F_{340}/F_{387} (schwarz) wurden anschließend in die dafür korrespondierende Calcium-Konzentration (rot) umgerechnet. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

3.8. Statistische Datenanalyse

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung der Programme SigmaPlot 10.0, Excel 2010 und 2019, OriginPro 8.6 durchgeführt. Von den gewonnenen Daten wurde der Mittelwert und dessen Standardfehler (SEM, „*standard error of the mean*“) berechnet. Dieser steht für den Umfang an Streubreite um den Mittelwert der gesamten Stichprobenmenge. In der vorliegenden

3.9. Vorversuche zur Bestimmung optimaler Messparameter

3.9.1. Bestimmung der Dosiswirkungskurve für Thapsigargin und Ionomycin

Um zu untersuchen, welche Konzentrationen von dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin und dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin am besten für HEK-293 Zellen geeignet sind, wurde experimentell eine Dosiswirkungskurve ermittelt, wobei Konzentrationen von 0,01-10 μM verwendet wurden. Mit Hilfe von Fura-2 wurde die Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration detektiert (Abb. 3.6).

Hierbei zeigte sich eine hyperbolische Dosiswirkungskurve von TG, mit dem größten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER bei einer Applikation von 1 μM TG (Abb. 3.6 A, B).

Für die Versuche mit IONO zeigte sich eine sigmoidale Dosiswirkungskurve mit der größten Ca^{2+} -Mobilisierung bei einer Applikation von 10 μM IONO (Abb. 3.6 C, D).

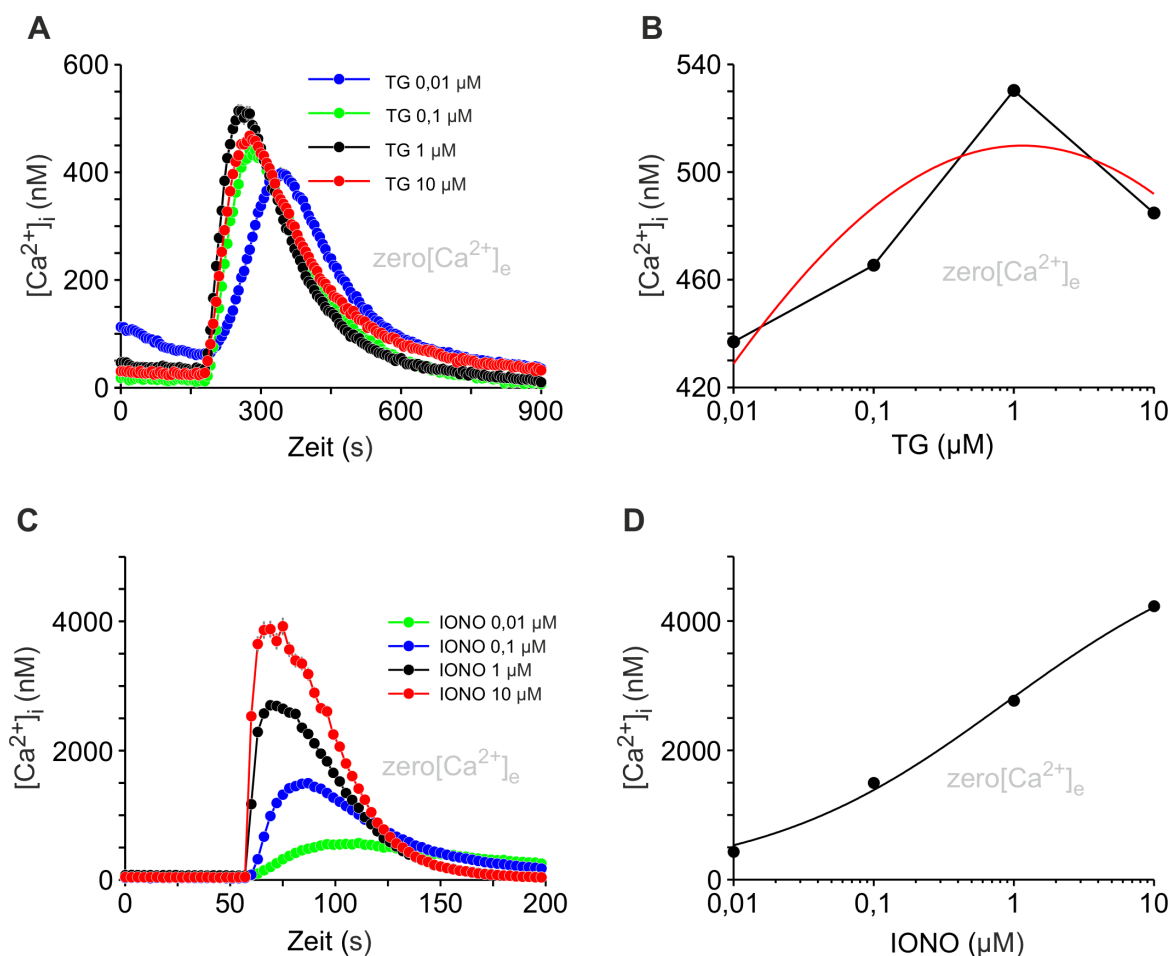


Abbildung 3.6: Ermittlung einer Dosiswirkungskurve von Thapsigargin und Ionomycin für HEK-293 Zellen.

Für die Versuchsreihe wurden einen Tag alte, auf mit Poly-L-Lysine beschichteten Deckgläsern kultivierte, HEK-293 Zellen verwendet. Diese wurden mit einer 1 mM Ca^{2+} -Lösung (1Ca) und einer Konzentration von 4 μM Fura-2-AM für 20 min bei Dunkelheit und RT beladen. Für die Messung wurden die Zellen auf dem Coverslip zunächst mit einer 0,5 mM EGTA-Ringerlösung (ZCa) zweimal gewaschen. Daraufhin wurden 300 μl ZCa in die Messkammer pipettiert und die ratiometrische Messung gestartet. Diese lief über 15 min, wobei alle 3 s bei einer Belichtungszeit von 25 ms (binning: 4) jeweils ein Datenpunkt erfasst wurde. Verglichen wurden die quantitativen Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Ca^{2+}_i , (nM)) bei Änderung der Thapsigargin- (TG) bzw. Ionomycin- (IONO) Konzentration, in Abhängigkeit der Zeit. Die Endkonzentrationen (END) von TG und IONO wurden in einfachen Exponentenschritten von 0,01 μM bis auf 10 μM gesteigert. TG wurde nach 180 s, IONO nach 60 s, in Form einer der vier Stocklösungen von 0,02 μM ; 0,2 μM ; 2 μM ; 20 μM (TG, IONO), mit dem verwendeten Lösungsmittel 0.2% Dimethylsulfoxid (DMSO), in 300 μl ZCa in die Messkammer appliziert. Durch die Verdünnung im Verhältnis 1:2 resultiert eine Endkonzentration (END) von 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM (TG, IONO) und eine END von DMSO von 0.1%. Die restliche Messdauer der TG-Experimente betrug 12 min, die der IONO-Experimente 4 min. Die Experimente wurden zwei- bis dreimal wiederholt und es wurden 57-110 Zellen analysiert.

Zur besseren Darstellung wurde für (A) und (C) nur jeder zweite Messpunkt aufgetragen und die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. **(A)** Graphische Darstellung der unterschiedlichen Ca^{2+} -Effluxes der vier Konzentrationen von TG. **(B)** Zeigt die hyperbolische Dosiswirkungskurve von TG. Zur vereinfachten Darstellung, wurden zwei Graphen aufgetragen (schwarz, rot): Der schwarze Graph, dessen Messpunkte linear verbunden wurden als auch, zur Verdeutlichung des hyperbolischen Kurvenverlaufes, der rote Graph, der die logistische Regression des schwarzen Graphen ist. **(C)** Graphische Darstellung der unterschiedlichen Ca^{2+} -Effluxes der vier Konzentrationen von IONO. **(D)** Zeigt die sigmoidale Dosiswirkungskurve von IONO.

3.9.2. Bestimmung der Ca^{2+} -Abhängigkeit von Thapsigargin- und Ionomycin-Effekten

Um die Eigenschaften der Ca^{2+} -Homöostase in HEK-293 bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zu charakterisieren, wurde der TG- und IONO-Effekt in verschiedenen Ca^{2+} -Lösungen getestet (Abb. 3.7).

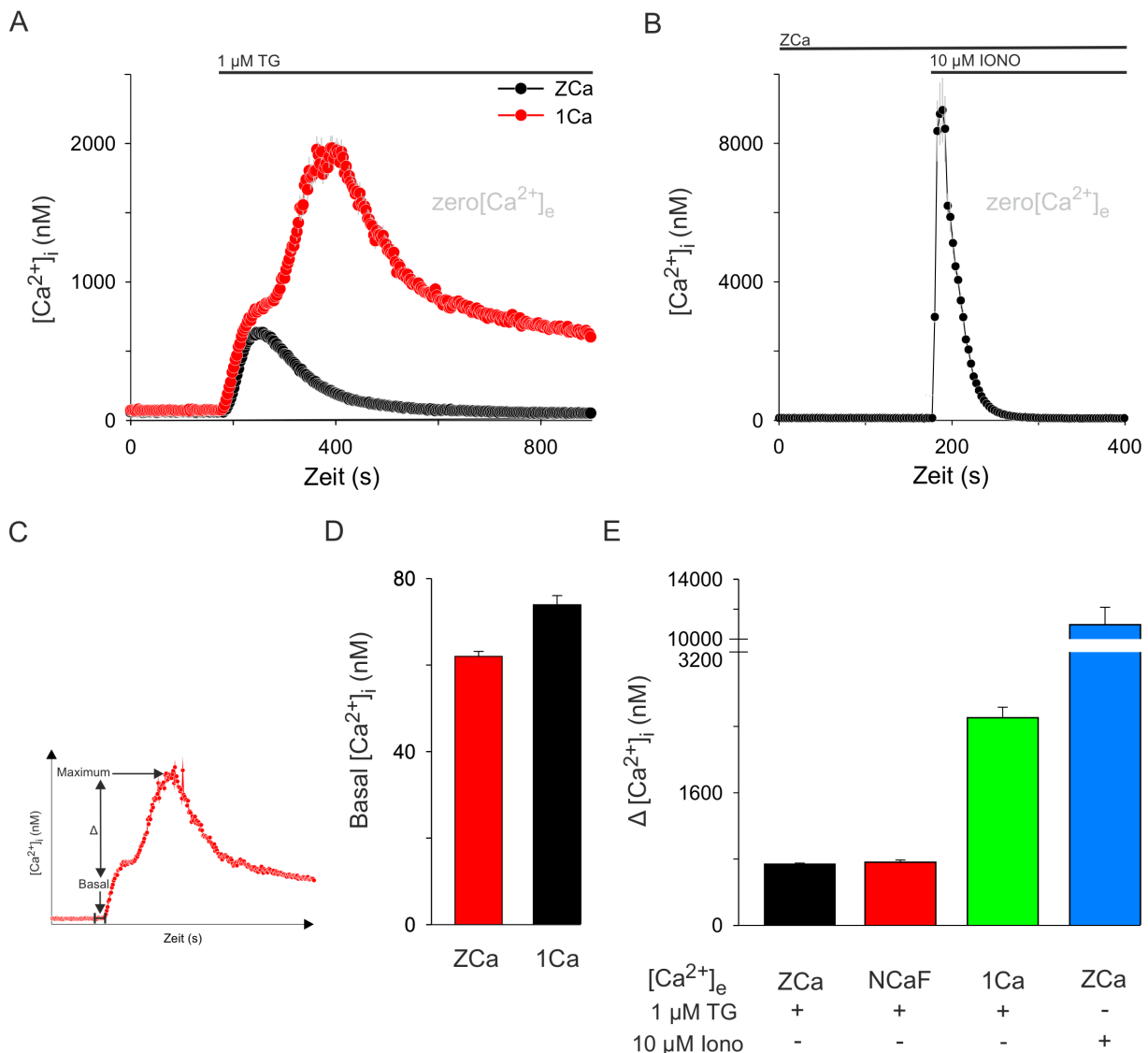


Abbildung 3.7: Analyse der Ca^{2+} -Homöostase in HEK-293 Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin und Ionomycin in unterschiedlichen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen.

Für die Versuchsreihe wurden zwei Tage alte auf Deckgläsern kultivierte HEK-293 Zellen mit einer 1 mM Ca^{2+} -Lösung (1Ca) und einer Konzentration von 4 μM Fura-2-AM für 20 min bei Dunkelheit und RT beladen. Für die Messung wurden die Zellen auf dem Deckglas zunächst mit einer nominal Calcium-freien Lösung (NCaF) dreimal gewaschen. Daraufhin wurden je nach Versuch 300 μl einer 1Ca-Lösung oder einer 0,5 mM EGTA-Ringerlösung (ZCa) in die Messkammer pipettiert und die Messung gestartet. Diese lief über 15 min, wobei alle 3 s bei einer Belichtungszeit von 25 ms (binning: 4x) jeweils ein Datenpunkt erfasst wurde. Verglichen wurden

Material und Methoden

die Änderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($\text{Ca}^{2+}_i, (\text{nM})$) in den Ursprungslösungen 1Ca und ZCa nach TG- bzw. IONO-Gabe in Abhängigkeit der Zeit. **(A)** Für die Induktion eines Ca^{2+} -Efflux wurden bei 180 s $1 \mu\text{M}$ TG hinzugegeben, woraus eine DMSO-Konzentration von 0,1% resultiert. Die Messung wurde durchgeführt in Anwesenheit von 1 mM extrazelluläres Ca^{2+} (1Ca, rot) oder in 0,5 mM EGTA (ZCa, schwarz). **(B)** Um den gesamten Ca^{2+} -Gehalt der Zelle zu messen, wurde nach 180 s $10 \mu\text{M}$ IONO in ZCa hinzugegeben. **(C)** Definiert wurden hier die basale Ca^{2+} -Konzentration ($\text{basal} [\text{Ca}^{2+}]_i$) und die Differenz zwischen dieser und der maximalen Ca^{2+} -Konzentration ($\text{peak}[\text{Ca}^{2+}]_i$), die als $(\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i)$ in den Analysen Abbildung D und E graphisch dargestellt wurden. **(D)** Statistische Analyse der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus Abbildung A. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. **(E)** Statistische Analyse der Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der in A und B gezeigten Graphen. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

3.9.3. Messung der Ca^{2+} -Einströme

Der „store operated calcium entry“ (SOCE) ist ein Mechanismus, den die Zelle nutzt, um entleerte, zelleigene Ca^{2+} -Speicher wiederaufzufüllen. Dieser wurde in HEK-293 Zellen untersucht, in die zunächst nominal Ca^{2+} -freie-Lösung (NCaF) plus TG appliziert und im Anschluss 1 mM Ca^{2+} -Lösung (1Ca) hinzugefügt wurde. Erst nach Ca^{2+} -Gabe im Extrazellularraum kommt es zu Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, was als SOCE bezeichnet wird (Abb. 3.8).

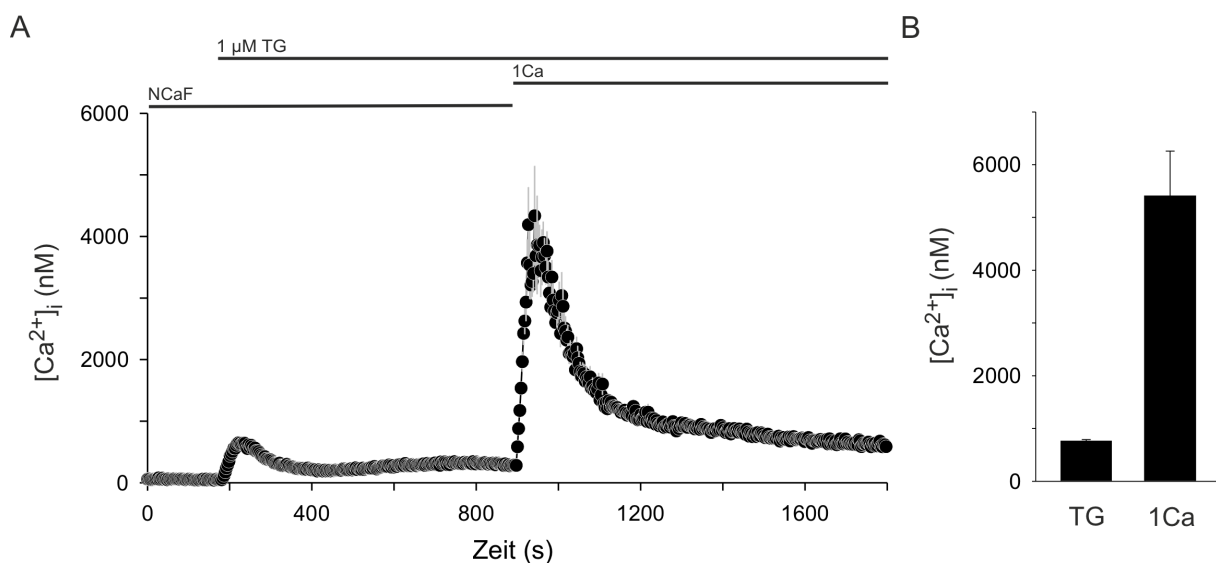


Abbildung 3.8: Messung des „store operated calcium entry“ (SOCE).

Hierfür wurden die Messungen in einer NCaF begonnen und nach 180 s 1 μM TG appliziert. Der SOCE wurde sichtbar, nach Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) auf 1 mM. Darstellung der Ca^{2+} -Konzentration in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit der Zeit. Für die Versuchsreihe wurden zwei Tage alte, auf Deckgläsern kultivierte, HEK-293 Zellen mit einer 1 mM Ca^{2+} -Lösung und einer Konzentration von 4 μM Fura-2-AM für 20 min bei Dunkelheit und RT beladen. Für die Messung wurden die Zellen auf dem Deckglas zunächst mit einer NCaF dreimal gewaschen und anschließend wurden 300 μl dieser Lösung in die Messkammer pipettiert. **(A)** Nach Einfügen der Messkammer in das Mikroskop des Visitranssystems wurde die ratiometrische Messung alle 3 s bei einer Belichtungszeit von 25 ms für 30 min durchgeführt. Nach 180 s wurde 1 μM TG hinzugeben und nach weiteren 750 s 1 mM Ca^{2+} . Durch die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_e$ wurde ein weiterer Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle detektiert. **(B)** Statistische Analyse der maximalen Ca^{2+} -Zunahme nach TG-Gabe, sowie des Effekts des SOCE nach 1 mM Ca^{2+} -Applikation. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

3.9.4. Messung des Tunicamycin-Effektes auf Ca^{2+} -Signale

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben, führt TUNI, über die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen, zu ER-Stress und induziert eine Erhöhung des Ca^{2+} -Lecks in HeLa-Zellen innerhalb von Minuten (Schauble et al., 2012).

Um diesen TUNI-Effekt auf HEK-293 Zell zu testen, wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Abbildung 3.9 zeigt, dass TUNI in HEK-293 Zellen eine Erhöhung der TG-induzierten Ca^{2+} -Mobilisation aus dem ER hervorruft und somit den Ca^{2+} -Leck aus dem ER erhöht.

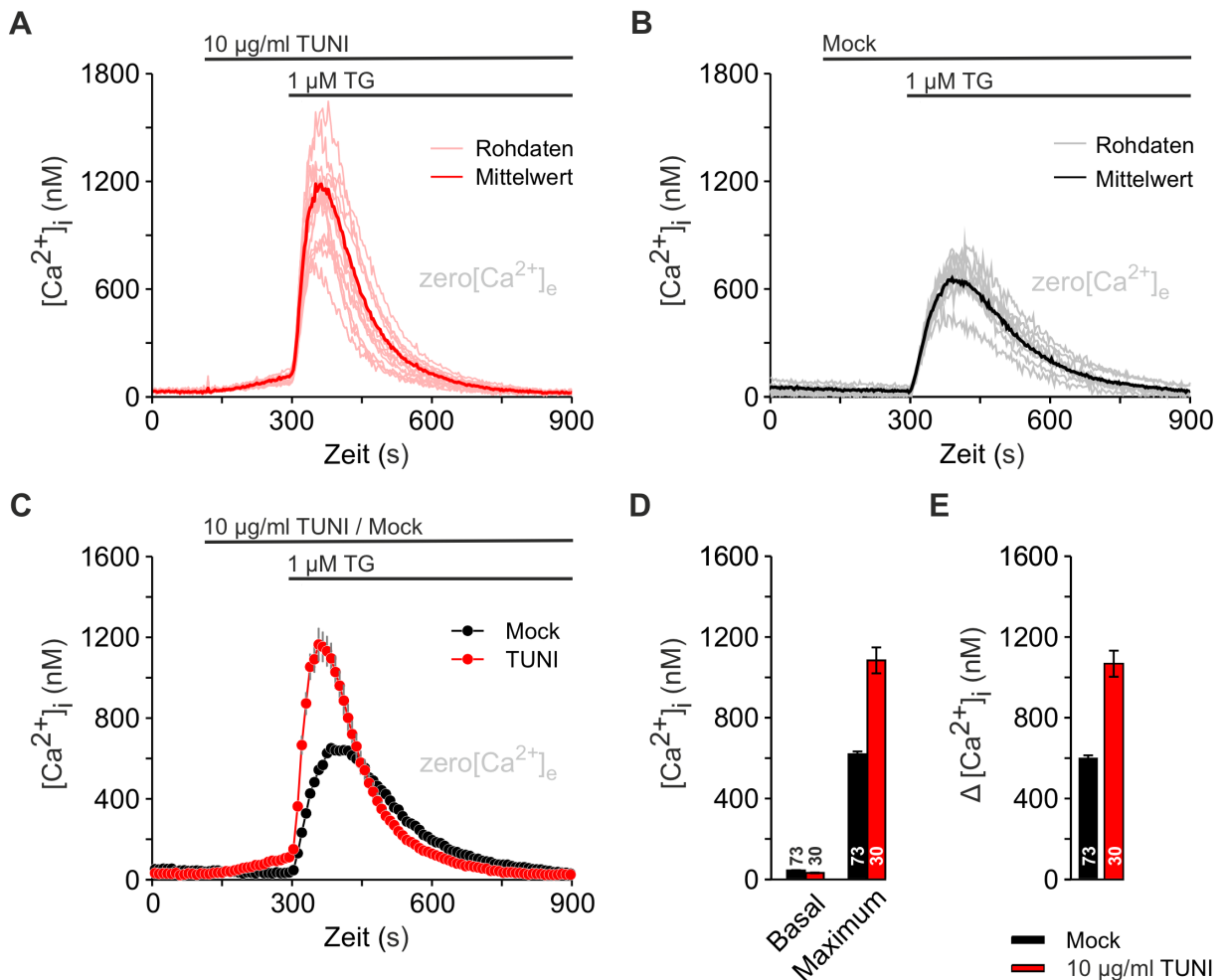


Abbildung 3.9: Effekt von Tunicamycin auf die Ca^{2+} -Homöostase in HEK-293 Zellen.

Für die Versuchsreihe wurden 1 Tag alte, auf Deckgläsern kultivierte, HEK-293 Zellen mit einer 1 mM Ca^{2+} -Lösung (1Ca) und einer Konzentration von 4 μM Fura-2-AM für 20 min bei Dunkelheit und RT beladen. Für die Messung wurden die Zellen auf dem Deckglas zunächst mit einer 0,5 mM EGTA-Ringerlösung (ZCa) zweimal gewaschen und anschließend wurden 300 μl ZCa in die Messkammer pipettiert und die ratiometrische Messung begonnen. Diese lief über 15 min, wobei alle 3 s bei einer Belichtungszeit von 25 ms (binning: 4x) jeweils eine

Messung stattfand. Verglichen wurden die Änderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Ca^{2+}_i , (nM)) in ZCa nach TUNI in Abhängigkeit der Zeit. **(A)** Es wurde der Effekt von TUNI auf den durch TG bewirkten Ca^{2+} -Efflux bei extrazellulärer ZCa ermittelt. Hierzu wurde bei 120 s 20 $\mu\text{g/ml}$ TUNI in 300 μM ZCa Lösung, zu den in der Messkammer befindlichen 300 μM ZCa Lösung appliziert. Durch die Verdünnung im Verhältnis 1:2 resultiert eine Endkonzentration (END) von 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI und eine END des für TUNI verwendeten Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) von 0,1%. Für die Induktion eines Ca^{2+} -Efflux wurden 3 min später 600 μl einer 2 μM TG ZCa-Lösung appliziert. Dadurch entstand eine Endkonzentration von 1 μM TG. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert (rot) und als Rohdaten zehn exemplarisch gewählter Zellen (hellrot) **(B)** Der verstärkte Ca^{2+} -Efflux der mit 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI behandelten Zellen wurde durch den Kontrollversuch (Kontrolle/MOCK) gezeigt. Hierbei wurde TUNI durch DMSO in der Konzentration von 0,1% in EGTA ersetzt und bei 180 s appliziert. Die DMSO-Gabe verlief entsprechend der Vorversuche in Abbildung A. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert (schwarz) und als Rohdaten zehn exemplarisch gewählter Zellen (grau). **(C)** Zusammen dargestellt sind die Graphen aus A und B **(D)** Statistische Analyse der basalen Ca^{2+} -Konzentration (Basal) sowie der maximalen Ca^{2+} -Konzentration (Maxima) in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM), der Kontrolle und der Versuche mit 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI. Die Anzahl der Zellen wurde als weiße Zahlen im oder als schwarze Zahlen über dem jeweiligen Balken illustriert. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. **(E)** Statistische Analyse der aus den Ratios ermittelten Ca^{2+} -Konzentration ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) in (nM). Die Anzahl der Zellen wurde in und über dem jeweiligen Balken illustriert. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

3.9.5. Messung des Effektes von Trifluoperazine und Ophiobolin A auf Ca²⁺-Signale

Neben TUNI wurden auch OPHIO und TFP als Substanzen identifiziert, die als CaM-Antagonisten zu einer Zunahme des ER Ca²⁺-Lecks führen (siehe Kapitel 2.5). In Ca²⁺-Imaging Experimenten an HeLa-Zellen zeigte eine 10-minütige Inkubation mit OPHIO einen verstärkenden Effekt auf den TG-induzierten Ca²⁺-Efflux (Erdmann et al., 2011). Entsprechend dieser Experimente wurde für die Experimente mit HEK-293 Zellen 100 µM OPHIO verwendet. Zudem sollte im Vergleich dazu der Effekt von TFP auf den TG-induzierten Ca²⁺-Efflux in HEK-293 Zellen untersucht werden. Hierzu wurde eine Konzentration von 10 µM TFP benutzt.

Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen, dass TFP in HEK-293 Zellen eine Erhöhung der TG-induzierten Ca²⁺-Mobilisation aus dem ER hervorruft und somit den Ca²⁺-Leck aus dem ER erhöht. Für OPHIO konnte dies in dieser Testreihe nicht bestätigt werden. Nach Applikation von OPHIO kam es zu einem vorzeitigen intrazellulären Ca²⁺-Anstieg vor TG-Gabe (siehe Abb. 3.12). Dieser Effekt könnte möglicherweise dazu geführt haben, dass die TG-induzierte Ca²⁺-Mobilisation aus dem ER verringert ausfiel und den Ca²⁺-Leck aus dem ER senkte.

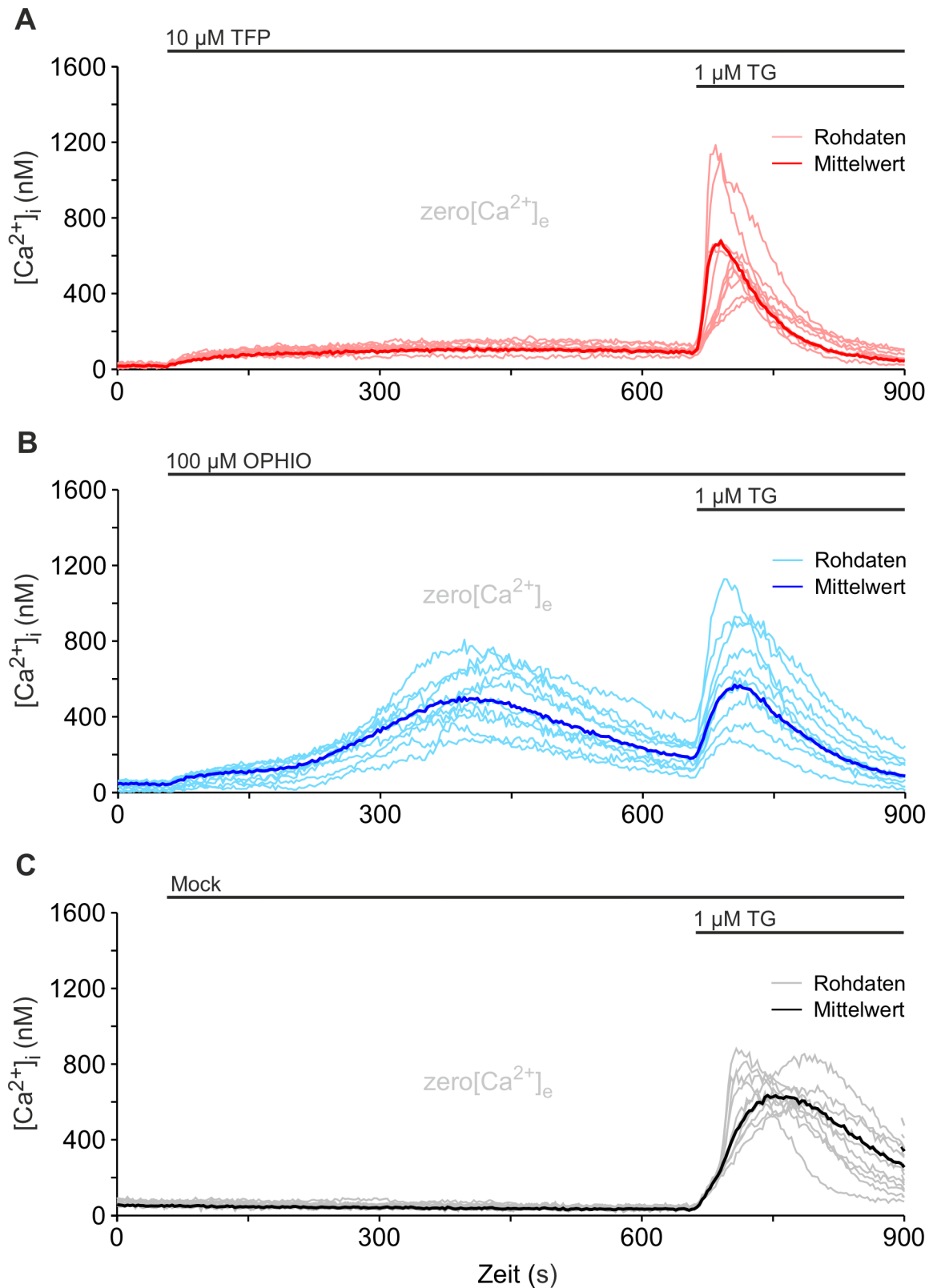


Abbildung 3.10: Effekt der Calmodulin-Inhibitoren Trifluoperazine und Ophiobolin A auf die Ca²⁺-Homöostase in HEK-293 Zellen.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA (ZCa = zero[Ca²⁺]_e) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung gestartet und nach 3 min 10 μM TFP, 100 μM OPHIO oder ZCa (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 8 min Messzeit wurde 1 μM TG zur Mobilisierung des Ca²⁺-Gehaltes der Zellen hinzugegeben und für 4 min

weitergemessen. (A - C) Natürliche HEK-293 Zellen wurden mit den aufgeführten CaM-Antagonisten oder mit 0,1% DMSO behandelt. Ein Ca^{2+} -Efflux wurde bei Fehlen von extrazellulärem Calcium (ZCa) mittels TG induziert. Der Mittelwert der Zellen wird in herausstechendem Farbton (rot, blau, schwarz) und die Rohdaten zehn exemplarisch gewählter Zellen in abgestuftem Farbton (rosa, türkis, grau) dargestellt. Die Zellanzahl der Kontrolle = MOCK (schwarz) betrug $n=70$, die der OPHIO 100 μM (blau) $n=55$ und die der TFP 10 μM (rot) $n=32$.

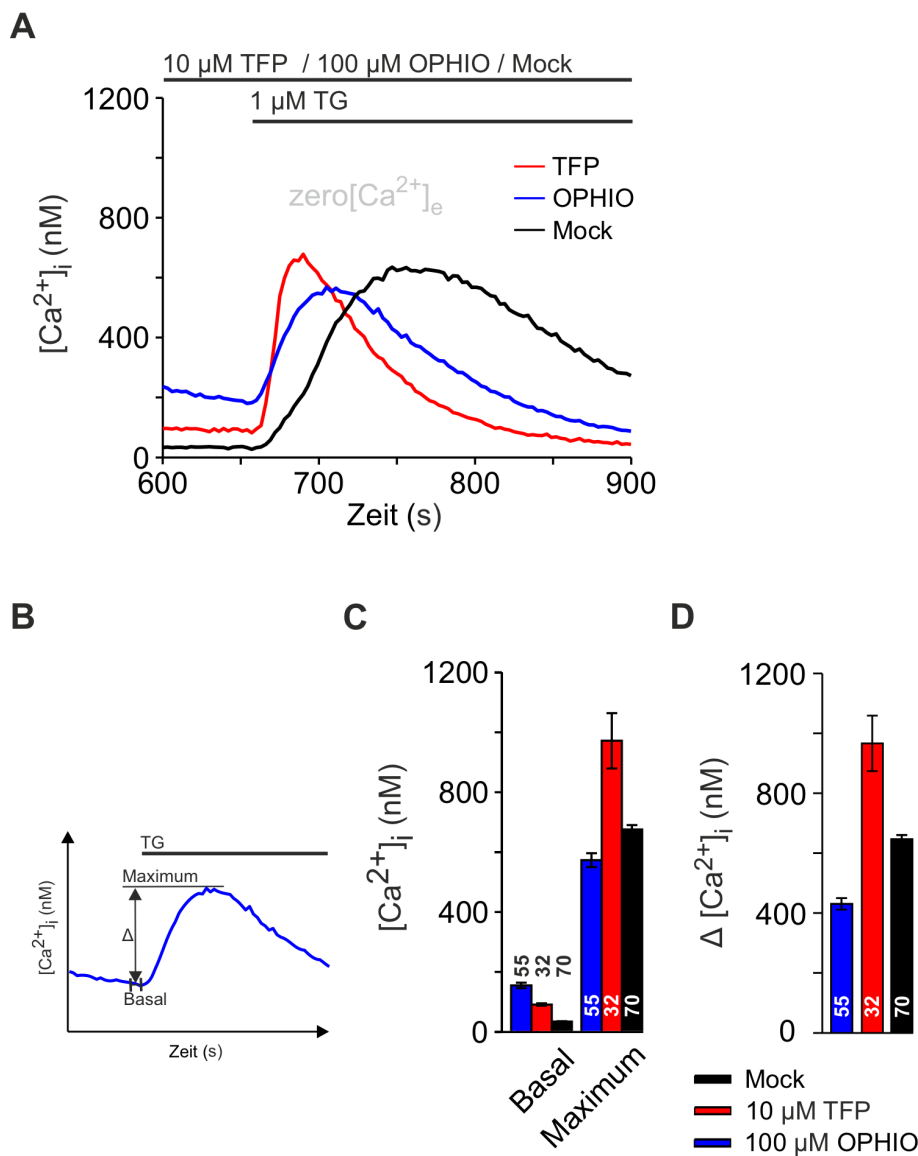


Abbildung 3.11: Minimale, Maximale und ΔCa^{2+} -Werte von HEK-293 Zellen nach vorheriger Inkubation mit den Calmodulin Antagonisten Trifluoperazin und Ophiobolin A.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($\text{ZCa} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des Visitron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung gestartet und nach 3 min 10 μM TFP, 100 μM OPHIO oder ZCa (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 8 min Messzeit wurde 1 μM TG zur Mobilisierung des Ca^{2+} -Gehaltes der Zellen hinzugegeben und für 4 min weitergemessen. (A) Zusammenführende Darstellung der aus A-C ermittelten Mittelwerte der Calcium-Konzentrations-Spitzen, nach TG Applikation. (B) Definition von Δ , Basal und Maximum. Folglich wird Basal als $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unmittelbar vor TG-Gabe und Maximum als größte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung nach TG-Gabe definiert. Δ entspricht der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung ab TG-Gabe bis zum Erreichen der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (C) Statische Auswertung

der unmittelbar vor der TG Gabe bestehenden Ca^{2+} -Konzentration (Basal) sowie der Maximal erreichten Ca^{2+} -Konzentration (Maximum). **(D)** Statische Auswertung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsänderung nach der Gabe von TG. Die Anzahl der analysierten Zellen sind in und über den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

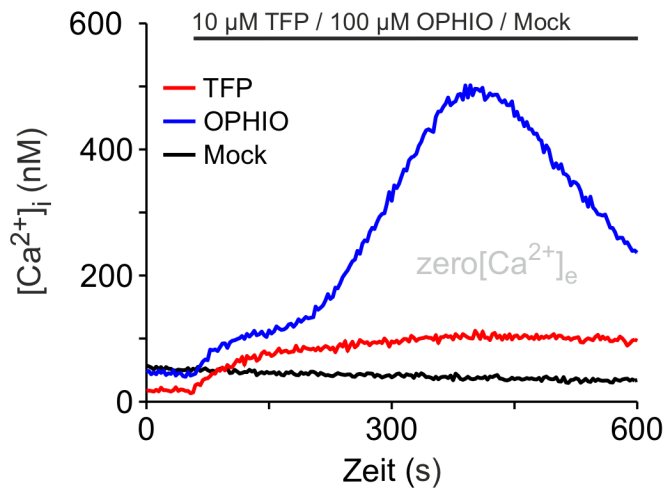


Abbildung 3.12: Ausschnitt der frühen zytosolischen Ca^{2+} -Werte von HEK-293 Zellen nach Gabe der Calmodulin Antagonisten Trifluoperazine und Ophiobolin A.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($\text{ZCa} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des Visitron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung gestartet und nach 1 min 10 μM TFP, 100 μM OPHIO oder ZCa (Mock) hinzugefügt und für weitere 9 min fortgeführt. Es wurde der Effekt von TFP, OPHIO und Mock auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei extrazellulärem ZCa ermittelt und dessen Mittelwerte graphisch dargestellt. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

3.9.6. Messung des ER Ca²⁺-Lecks und des Ca²⁺-Gehalts von murinen-Hautfibroblasten

Wie Kapitel 3.5.2 zu entnehmen liegt bei den murinen-Hautfibroblasten eine Punktmutation im SEC61A1-Gen von Tieren der Y344H^(+/+)-Mutante vor, weshalb von einer veränderten Sec61-Translokonfunktion auszugehen ist. Die Y344H-Mutation führt vermutlich zu einem gesteigerten Ca²⁺-Leck (Schäuble et al. 2012) (Kapitel 3.5.2). In den folgenden Kapiteln 3.9.6 – 3.9.7 wurde die Antwort der murinen-Hautfibroblasten auf TG und IONO hinsichtlich eines geänderten Ca²⁺-Lecks untersucht.

Bei beiden Versuchsreihen zeigten die murinen-Hautfibroblasten (Y344H) im Vergleich mit WT murinen-Hautfibroblasten keinen signifikant unterschiedlichen Ca²⁺-Efflux aus dem ER nach TG Applikation (Abb. 3.13). In ähnlicher Weise zeigte die IONO Applikation, dass der Ca²⁺-Gehalt der WT und Y344H murinen-Hautfibroblasten ähnlich sind.

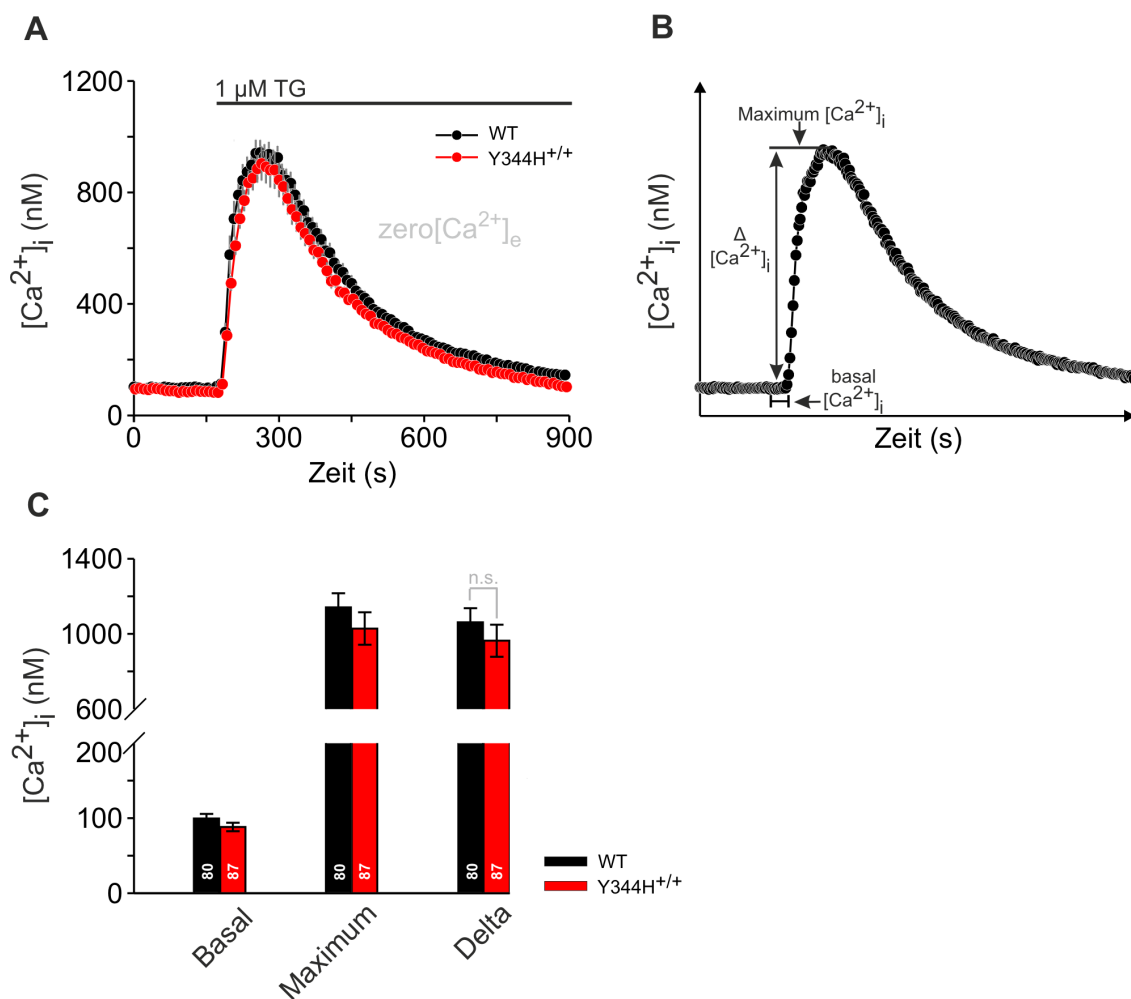


Abbildung 3.13: Analyse der Ca²⁺-Homöostase in Hautfibroblasten vom Wildtyp und einer Y344H^(+/+)-Mutante nach Behandlung mit Thapsigargin.

Für die Versuchsreihe wurden zwei Tage alte, auf mit Poly-L-Lysine beschichteten Deckgläsern kultivierte, Hautfibroblasten vom Wildtyp (WT) sowie einer Y344H^(+/+)-Mutante (Y344H^(+/+)) verwendet. Diese wurden mit einer 1 mM Ca²⁺-Lösung (1Ca) und einer Konzentration von 4 µM Fura-2-AM für 20 min bei Dunkelheit und RT beladen. Für die Messung wurden die Zellen auf dem Deckglas zunächst mit einer 0,5 mM EGTA-Ringerlösung (ZCa) zweimal gewaschen. Daraufhin wurden 300 µl ZCa in die Messkammer pipettiert und die ratiometrische Messung gestartet. Diese lief über 15 min, wobei alle 3 s bei einer Belichtungszeit von 25 ms (binning: 4x) jeweils eine Messung stattfand. Verglichen wurden die Änderungen des intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Ca²⁺_i, (nM)) in ZCa nach TG in Abhängigkeit der Zeit. Die gemessenen Ratios 340 nm/387 nm wurden im Anschluss in deren korrespondierenden Ca²⁺-Konzentration umgerechnet und graphisch dargestellt. **(A)** Zur Darstellung gebracht wurde 2 repräsentative Experimente unterschiedlicher Versuchstage. Für die Induktion eines Ca²⁺-Efflux wurde bei 180 s, 2 µM TG, welches in 0,2% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde, in 300 µl ZCa Lösung, zu den in der Messkammer befindlichen 300 µM ZCa Lösung, appliziert. Durch die Verdünnung im Verhältnis 1:2 resultiert eine Endkonzentration (END) von 1 µM TG und eine END von DMSO von 0,1%. Der übersichtlicher wurden in den Graphen [WT, Y344H^(+/+)] nur jeder 3te Messpunkt dargestellt. **(B)** Definiert wurden hier die basale Ca²⁺-Konzentration (Basal), sowie die Differenz zwischen dieser und der maximalen Ca²⁺-Konzentration (Maximum) die als Δ[Ca²⁺]_i (Delta), in (C) graphisch dargestellt wurden. **(C)** Statistische Analyse der aus (A) ermittelten Ca²⁺-Konzentration. Die Anzahl der analysierten Zellen sind in den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert±SEM.

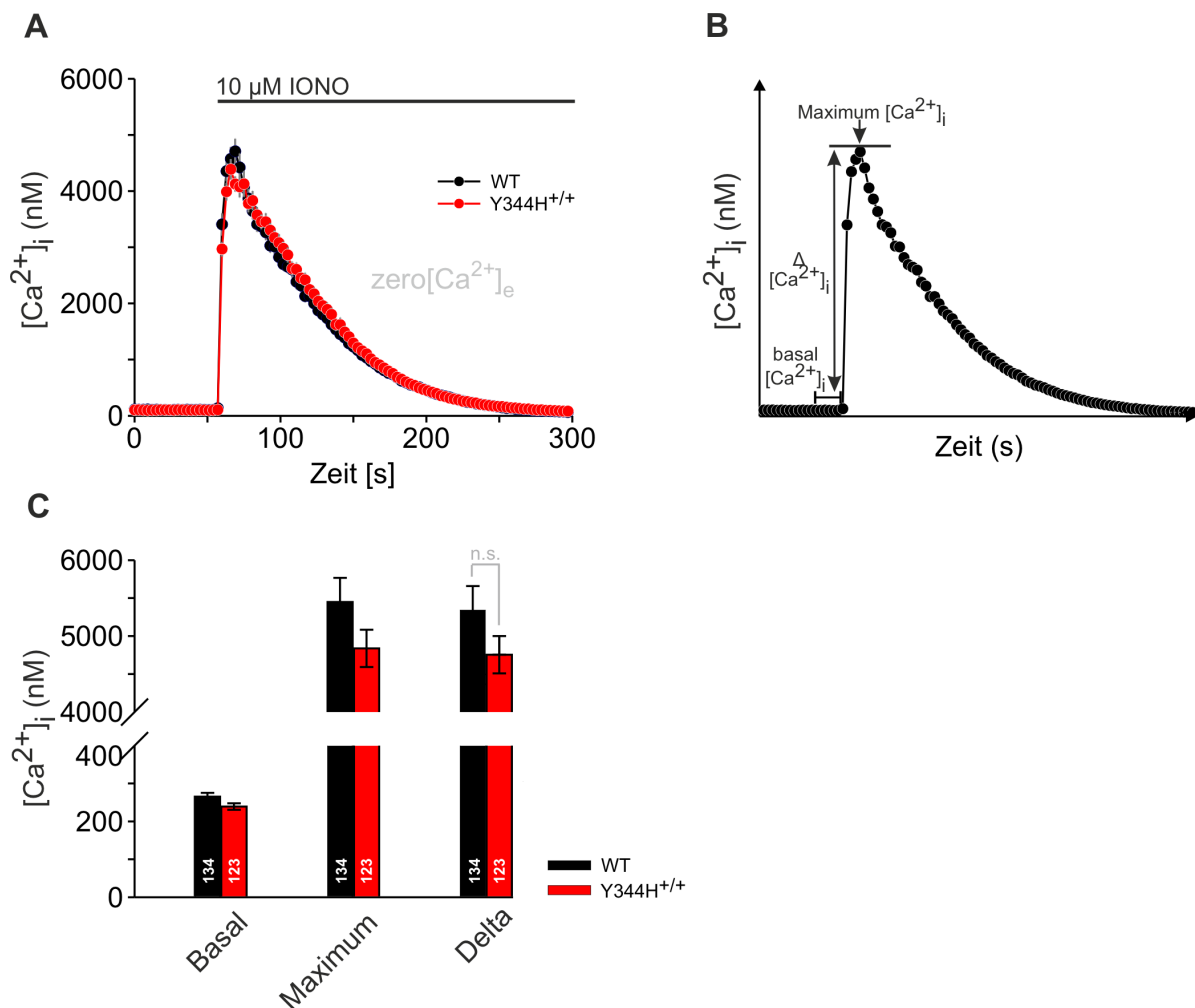


Abbildung 3.14: Analyse der Ca²⁺-Homöostase in Hautfibroblasten vom Wildtyp und einer Y344H^(+/+)-Mutante nach Behandlung mit Ionomycin.

Material und Methoden

Für die Versuchsreihe wurden zwei Tage alte, auf mit Poly-L-Lysine beschichteten Deckgläsern kultivierte, Hautfibroblasten vom Wildtyp (WT) sowie einer Y344H^(+/+)-Mutante (Y344H^(+/+)) verwendet. Diese wurden mit einer 1 mM Ca²⁺-Lösung (1Ca) und einer Konzentration von 4 µM Fura-2-AM für 20 min bei Dunkelheit und RT beladen. Für die Messung wurden die Zellen auf dem Deckglas zunächst mit einer 0,5 mM EGTA-Ringerlösung (ZCa) zweimal gewaschen. Daraufhin wurden 300 µl ZCa in die Messkammer pipettiert und die ratiometrische Messung gestartet. Diese lief über 15 min, wobei alle 3 s bei einer Belichtungszeit von 25 ms (binning: 4x) jeweils eine Messung stattfand. Verglichen wurden die Änderungen des intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Ca²⁺_i, (nM)) in ZCa nach TG in Abhängigkeit der Zeit. Die gemessenen Ratios 340 nm/387 nm wurden im Anschluss in deren korrespondierenden Ca²⁺-Konzentration umgerechnet und graphisch dargestellt. **(A)** Zur Darstellung gebracht wurde 2 repräsentative Experimente unterschiedlicher Versuchstage. Für die Induktion eines Ca²⁺-Efflux wurde bei 180 s, 20 µM IONO, welches in 0.2% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde, in 300 µl ZCa Lösung, zu den in der Messkammer befindlichen 300 µM ZCa Lösung, appliziert. Durch die Verdünnung im Verhältnis 1:2 resultiert eine Endkonzentration (END) von 1 µM TG und eine END von DMSO von 0,1%. Der übersichtlicher wurden in den Graphen [WT, Y344H^(+/+)] nur jeder 3te Messpunkt dargestellt. **(B)** Definiert wurden hier die basale Ca²⁺-Konzentration (Basal), sowie die Differenz zwischen dieser und der maximalen Ca²⁺-Konzentration (Maximum) die als Δ[Ca²⁺]_i (Delta), in **(C)** graphisch dargestellt wurden. **(C)** Statistische Analyse der aus **(A)** ermittelten Ca²⁺-Konzentration. Die Anzahl der analysierten Zellen sind in den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert±SEM.

4. Ergebnisse

4.1. Änderung der Ca^{2+} -Homöostase nach 4-Phenylbutyrat (4-PBA)-Inkubation

4.1.1. Messung des Thapsigargin induzierten Ca^{2+} -Efflux nach 4-PBA Inkubation

Das ER, welches den Hauptkalziumspeicher der Zelle darstellt, unterliegt genauen Regulierungen zur Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem sogenannten Ca^{2+} -Leck über der ER-Membran. Es ist bereits bekannt, dass der Sec61-Kanal, welcher Proteine in das ER-Lumen transloziert, eben solch einen Ca^{2+} -Leckkanal darstellt (Lang et al., 2011). Dabei wird dieser Ca^{2+} -Ausstrom endogen auf zytosolischer Seite durch CaM und auf luminaler Seite durch das Chaperon BiP limitiert (Schäuble et al., 2012; Erdmann et al., 2011). Die meisten dieser Arbeiten wurden mit HeLa Zellen durchgeführt. In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Leck aus dem ER in den HEK-293 Zellen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, auch mit Beteiligung von CaM und BiP reguliert wird (Abb. 3.9, 3.10, 3.11, 3.12). In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob das chemische Chaperon 4-Phenylbutyrat (4-PBA) das Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leck ebenso limitiert. Hierzu wurden HEK-293 Zellen mit dem zytosolischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 beladen (Kapitel 3.5.3) und das Ca^{2+} -Leck wurde mittels TG demaskiert. Dieses Verfahren wurde in Vorversuchen optimiert und für jedes Ca^{2+} -Imaging-Experiment durchgeführt (Kapitel 3.9, Abb. 3.6.). Um festzustellen, ob es durch Vorbehandlung mit 4-PBA zu einer Veränderung des Ca^{2+} -Efflux kommt, wurden mit 4-PBA behandelte Zellen mit einer Kontrolllösung (0,5 mM EGTA = ZCa) ohne 4-PBA (Mock) verglichen. In Abbildung 4.1 A sieht man den zeitlichen Verlauf exemplarischer Experimente mit und ohne 12-minütiger 4-PBA Inkubation. Die TG-Antwort wurde analysiert, in dem der basale Wert vor TG-Zugabe von dem Maximum der TG-Antwort subtrahiert wurde, was dem netto Ca^{2+} -Efflux entspricht ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$). Diese Berechnung gilt für alle nachfolgenden Analysen. Nach 4-PBA-Applikation konnte im Vergleich zur Kontrolle (ZCa) ein signifikanter Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ detektiert werden (Abb. 4.1 A und B). Nach 15 min wurde TG appliziert, was eine langsamere Kinetik und auch eine Reduzierung der TG-Antwort der 4-PBA-behandelten Zellen hervorrief. Wie in Abbildung 4.1 B zu erkennen stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kontroll-Zellen von basal $96,23 \pm 1,84$ nM auf das Maximum $1062,01 \pm 21,78$ an, was einer Differenz von $965,78 \pm 22,39$ nM entspricht. Für die 4-PBA behandelten Zellen konnte ein Ca^{2+} -Ausstrom von basal $118,62 \pm 2,3$ nM auf Maximum $827,34 \pm 9,51$ nM also durchschnittlich um $708,76 \pm 10,87$ nM detektiert werden. Im Vergleich fiel auf, dass die Gabe von 4-PBA zu einem signifikanten Anstieg des basalen

Ca²⁺-Wertes um 4,2% führte gegenüber der Kontrolle (Abb. 4.1 B). Abbildung 4.1 B zeigt die hohe signifikante Differenz der Maximalwerte nach TG Applikation von 22,1% und wird in Abbildung 4.1 C dargestellt. Die Differenz $\Delta[Ca^{2+}]_i$ zeigt eine signifikante Verringerung von 26,61% nach Vorbehandlung mit 4-PBA im Vergleich zu den Kontroll-Versuchen. Die detektierten Ratio-Werten (Abb. 4.1 D-E), sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.1 D-E.

	Mock	4-PBA
Basal (F340/F387)	0,69 ± 0,003	0,72 ± 0,003
Maximum (F340/F387)	1,75 ± 0,02	1,56 ± 0,001
Delta (Δ F340/F387)	1,07 ± 0,02	0,85 ± 0,01

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Inkubation mit 5 mM 4-PBA eine Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ und eine verringerte TG-Antwort zur Folge hat, was auf einen verringerten Ca²⁺ Leck aus dem ER möglicherweise zurückzuführen ist.

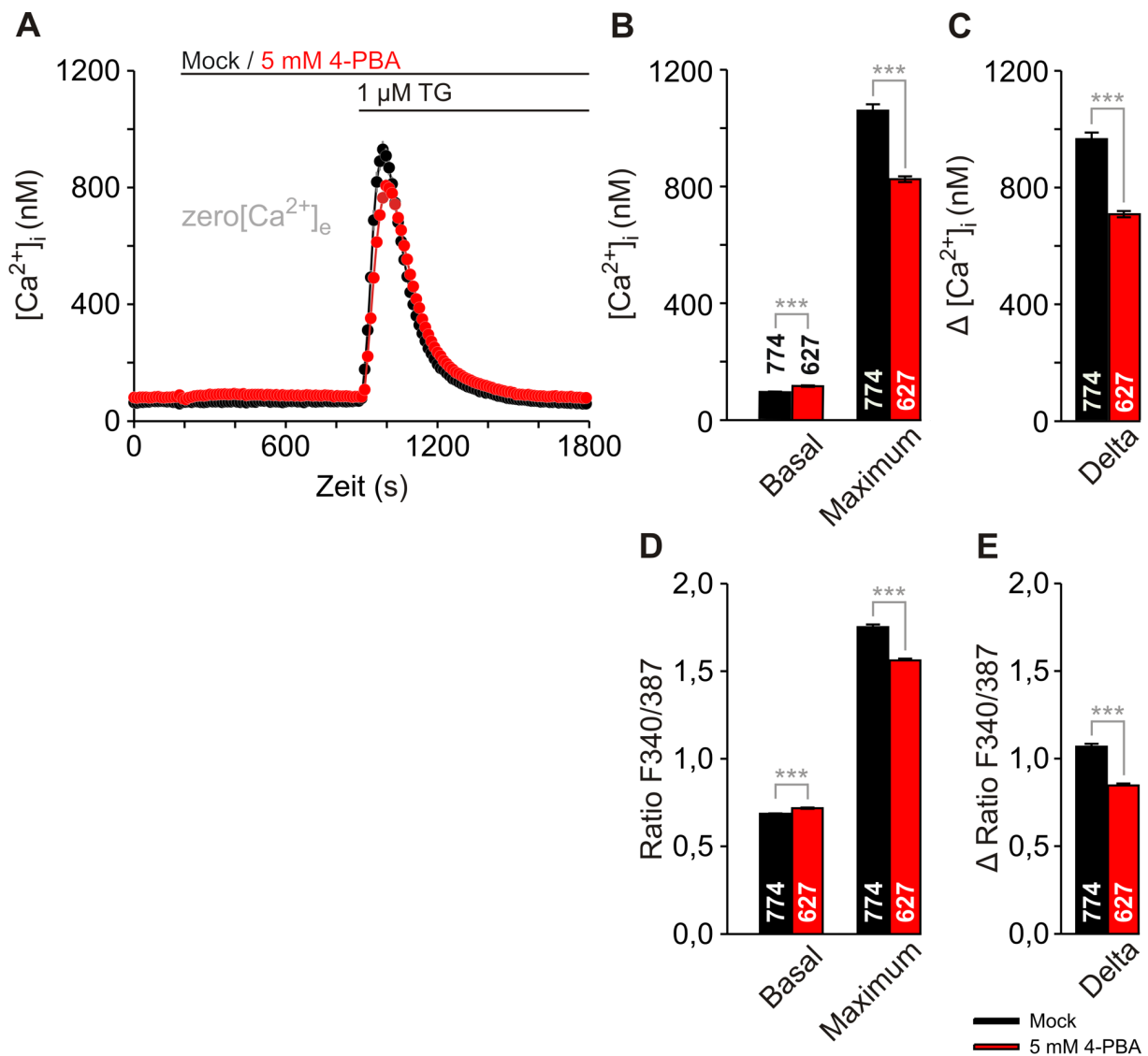


Abbildung 4.1: Effekt einer 12-minütigen Inkubation von 4-PBA auf den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit $4 \mu\text{M}$ Fura-2-AM in $0,5 \text{ mM}$ EGTA ($Z\text{Ca} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit $Z\text{Ca}$ gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung gestartet und nach 3 min 5 mM 4-PBA oder $Z\text{Ca}$ (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 12 min Messzeit wurde $1 \mu\text{M}$ TG zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 27 min weitergemessen. (A) Gezeigt sind die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kontrollzellen (Mock, schwarz) und der 5 mM 4-PBA-behandelten Zellen (5mM 4-PBA, rot). Auf der y-Achse ist die ermittelte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgetragen, die in Abhängigkeit der jeweiligen Messzeitpunkte auf der x-Achse abgebildet wurde. Graphische kommen zwei repräsentative Experimente zwei unterschiedlicher Tage zur Darstellung. (B) Statistische Analyse der basalen und maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (C) Gezeigt ist die Differenz aus der maximalen und basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was als $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ dargestellt ist. (D) Statistische Analyse der basalen und maximalen Ratio-Werte F340/387. (E) Gezeigt ist die Differenz aus den maximalen und basalen Ratio-Werte F340/387, was als $\Delta \text{Ratio F340/387}$ dargestellt ist. Die Versuche wurden an 7 Tagen mit 13 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: 5 mM PBA = 15; Mock = 13). Die Anzahl der analysierten Zellen sind in den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ (***)).

4.1.2. Effekt von 4-PBA auf den zellulären Ca^{2+} -Gehalt

Zur Untersuchung des 4-PBA-Effektes auf den Ca^{2+} -Gehalt der Zellen wurde die Ca^{2+} -Mobilisierung mit Hilfe des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin (IONO) detektiert. In Vorversuchen wurde das Verfahren zur Bestimmung des Ca^{2+} -Gehalts mittels einer Ca^{2+} -Mobilisierung mit IONO optimiert (siehe Kapitel 3.9, Abb. 3.6). Wie Abbildung 4.2 zeigt, wurden die Zellen für 12 min entweder in ZCa mit 5 mM 4-PBA oder der entsprechenden Kontrolle (Mock) inkubiert und anschließend der Ca^{2+} -Gehalt mit 10 μM IONO gemessen. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kontrollzellen stieg von $29,70 \pm 0,76$ nM auf das Maximum $3079,87 \pm 75,84$ nM an, dies entspricht einer Differenz von $3050,17 \pm 75,89$ nM. Für die 4-PBA behandelten Zellen konnte ein Ca^{2+} -Ausstrom von $39,39 \pm 1,36$ nM auf ein Maximum von $1772,90 \pm 21,83$ nM, also durchschnittlich um $1733,52 \pm 21,51$ nM detektiert werde. Auch in dieser Versuchsreihe konnte zwischen Kontrollzellen ($29,70 \pm 0,76$ nM) und 4-PBA-behandelten Zellen ($39,39 \pm 1,36$ nM) ein signifikanter Anstieg des basalen Ca^{2+} -Wertes detektiert werden (Abb. 4.2 A). Die Differenz $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigte eine Reduktion um fast die Hälfte (42,8%) nach Behandlung mit 4-PBA im Vergleich zu den Kontroll-Versuchen (Abb. 4.2 B). Die dazugehörige Ratio-Werte sind in (Abb. 4.2 C-D), sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.2 D-E.

	Mock	4-PBA
Basal (F340/F387)	$0,6 \pm 0,002$	$0,62 \pm 0,004$
Maximum (F340/F387)	$4,85 \pm 0,05$	$3,7 \pm 0,03$
Delta ($\Delta\text{F340/F387}$)	$4,26 \pm 0,05$	$3,08 \pm 0,03$

Für die Experimente aus 4.1 (siehe 4.1, A, B, D) und 4.2 (siehe 4.2, A, C) zeigte sich bei 4-PBA-behandelten Zellen ein geringer, aber signifikanter Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor Gabe von TG oder IONO. Bei den TG-Versuchen konnte ein Anstieg von 23,27% und bei den IONO-Versuchen von 32,63% kalkuliert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Inkubation mit 5 mM 4-PBA den zellulären Ca^{2+} -Gehalt verringert. Zusammenfassend lässt sich aus den ersten zwei Versuchsreihen 4.1.1 und 4.1.2 folgendes werten: 4-PBA zeigt einen

positiven Effekt sowohl bei der Reduktion des durch TG demaskierten Ca^{2+} -Lecks, als auch zu einem signifikanten Rückgang der durch IONO herbeigeführten Freisetzung von Ca^{2+} .

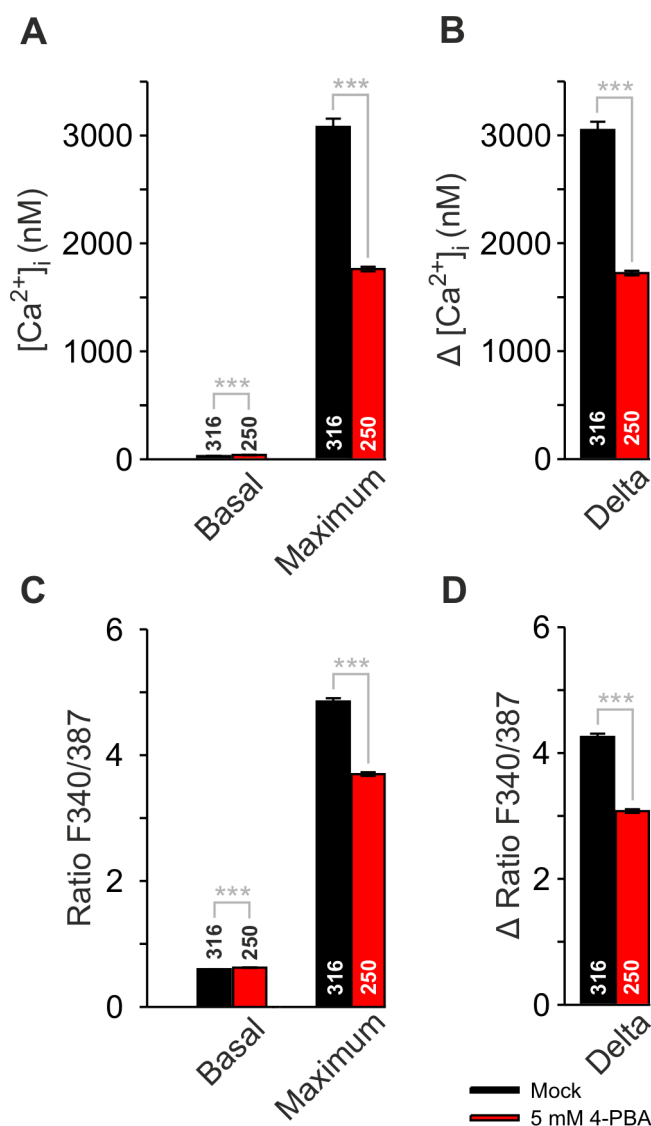


Abbildung 4.2: Effekt einer 12-minütigen Inkubation von 4-PBA auf den zellulären Ca^{2+} -Gehalt nach Behandlung mit 4-PBA und Zugabe von Ionomycin.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit $4 \mu\text{M}$ Fura-2-AM in $0,5 \text{ mM}$ EGTA ($\text{ZCa} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_i$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des Visitron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung gestartet und nach 3 min 5 mM 4-PBA oder ZCa (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 12 min Messzeit wurde $10 \mu\text{M}$ IONO zur Mobilisierung des Ca^{2+} -Gehaltes der Zellen hinzugegeben und für 5 min weitergemessen. (A) Statistische Analyse der basalen (vor TG-Gabe) und maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nach TG-Gabe). (B) Gezeigt ist die Differenz aus der maximalen und basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was als $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ dargestellt ist. (C) Statistische Analyse der basalen (vor TG-Gabe) und maximalen Ratio-Werte F340/387 (nach TG-Gabe). (D) Gezeigt ist die Differenz aus den maximalen und basalen Ratio-Werte F340/387, was als Δ Ratios F340/387 dargestellt ist. Die Versuche wurden an 5 Tagen mit 5 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: 5 mM PBA = 5; Mock = 6). Die Anzahl der analysierten Zellen sind in den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ ***).

4.1.3. Zeitabhängigkeit des Effektes von 4-PBA auf die Ca^{2+} -Homöostase

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass 4-PBA sowohl den Ca^{2+} -Leck aus dem ER (Abb. 4.1), als auch den zellulären Ca^{2+} -Gehalt beeinflusst (Abb. 4.2). Als nächstes sollte untersucht werden, ob dieser Effekt einer zeitlichen Abhängigkeit unterliegt. Hierzu wurden die Vorbereitung und Beladung der Zellen analog zu den obigen Experimenten durchgeführt. Allerdings wurden die Zellen nach der Beladung mit Fura-2 für 27 min mit 5 mM 4-PBA in ZCa bei Dunkelheit und RT inkubiert. 3 Minuten nach Beginn der Messung, was einer Gesamtinkubationszeit von ca. 30 min entspricht, wurde 1 μM TG appliziert (Abb. 4.3, A).

In diesen Versuchen bewirkte die alleinige Inkubation mit 5 mM 4-PBA im Gegensatz zur 12-minütigen Inkubation eine signifikante Erniedrigung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 4.3 A und B), wohingegen die TG-Antwort im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant erniedrigt ist (Abb. 4.3 A und C). Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kontrollzellen stieg von basal $194,4 \pm 2,9$ nM auf das Maximum $757,8 \pm 15,6$ nM an, dies entspricht einer Differenz von $563,5 \pm 17,4$ nM. Bei den mit 4-PBA-behandelten Zellen stieg der Ca^{2+} -Ausstrom von Basal $177,4 \pm 3,9$ nM auf ein Maximum von $672,1 \pm 15$ nM, also im Mittel um $494,7 \pm 17,6$ nM. Im Vergleich fiel in diesem Experiment im Gegensatz zu den beiden vorausgegangenen Experimenten (Abb. 4.1 und 4.2) auf, dass die Gabe von 4-PBA in einen signifikanten Abfall des basalen Ca^{2+} -Wertes im Zytosol der Kontrollzellen und den 4-PBA-behandelten Zellen von 8,74% resultierte. (Abb. 4.3 B). Wie sich bereits in Abbildung 4.3 B die signifikante Differenz der Maximalwerte ablesen lässt, so zeigt auch die Differenz $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abbildung 4.3 C eine signifikante Verringerung der 4-PBA-behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen von 12,2% auf. Die dazugehörigen Ratio-Werten (Abb. 4.3 D-E), sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3: Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.3 D-E.

	Mock	4-PBA
Basal (F340/F387)	$0,82 \pm 0,004$	$0,8 \pm 0,005$
Maximum (F340/F387)	$1,48 \pm 0,02$	$1,4 \pm 0,02$
Delta (Δ F340/F387)	$0,66 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,02$

Zusammenfassend ergab dieses Experiment, dass eine 30-minütige Inkubation mit 5 mM 4-PBA im Vergleich mit einer 12-minütigen Inkubation den durch TG verursachten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER in das Zytosol nicht so stark vermindert.

Aufgrund des Unterschiedes des TG induzierten Ca^{2+} -Efflux dieser Experimentreihe – 12,2% gegenüber 22% (bei 12-minütiger Inkubation) – wurden im Folgenden die 12-minütige Inkubationen beibehalten.

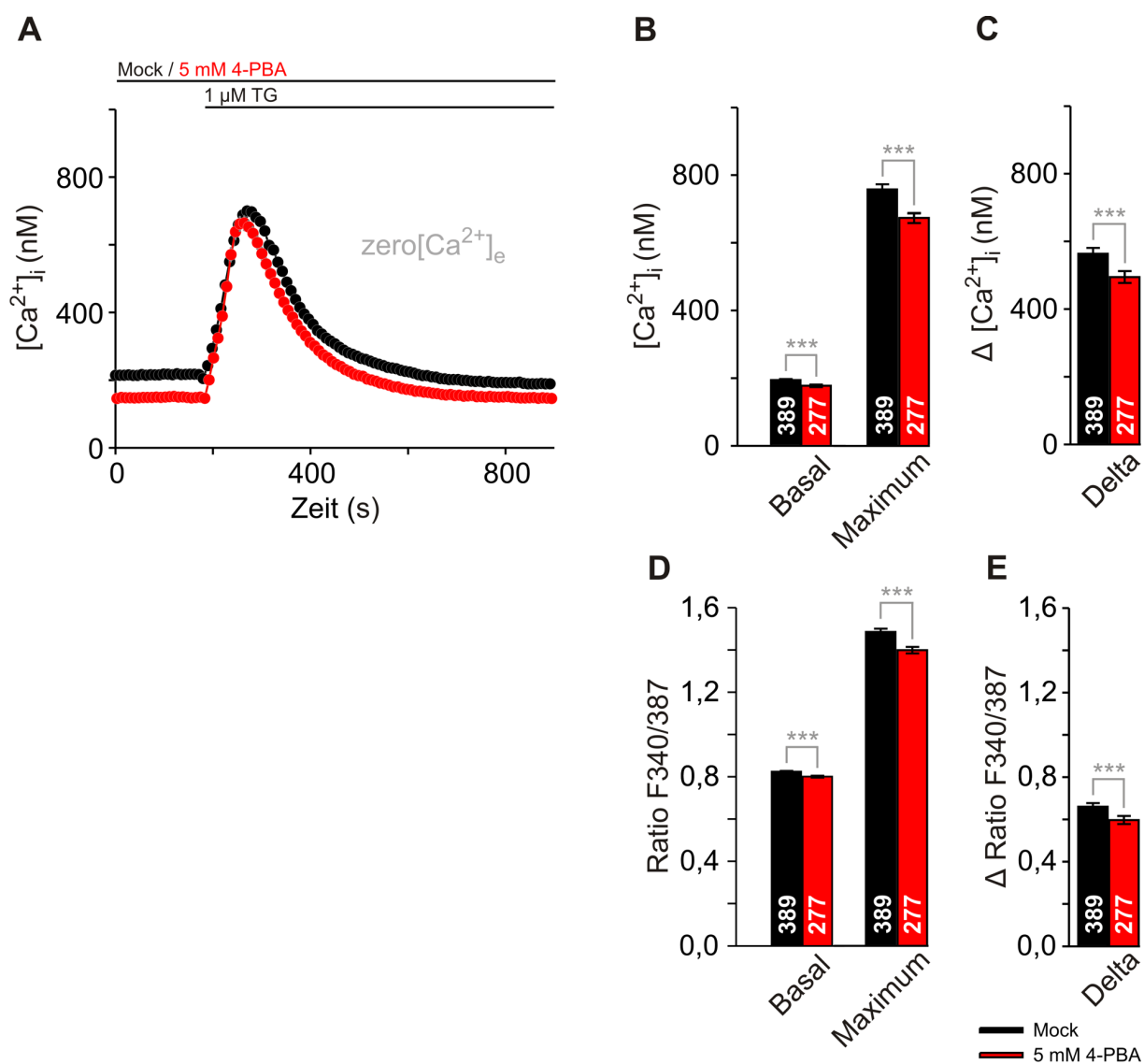


Abbildung 4.3: Effekt einer 30-minütigen Inkubation von 4-PBA auf die ER Ca^{2+} -Homöostase.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($Z\text{Ca} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit $Z\text{Ca}$ gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde 5 mM 4-PBA oder $Z\text{Ca}$ (Mock) hinzugefügt und für 27 min inkubiert. Dann wurde die Messung gestartet und nach 3 min Messzeit 1 μM TG zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 15 min weitergemessen. (A) Gezeigt sind die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kontrollzellen (Mock, schwarz) und der 5 mM 4-PBA-behandelten Zellen (5mM

4-PBA, rot). Auf der y-Achse ist die ermittelten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgetragen, die in Abhängigkeit der jeweiligen Messzeitpunkte auf der x-Achse abgebildet wurde. Graphische kommen zwei repräsentative Experimente zwei unterschiedlicher Tage zur Darstellung. **(B)** Statistische Analyse der basalen (vor TG-Gabe) und maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nach TG-Gabe) **(C)** Gezeigt ist die Differenz aus der maximalen und basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was als $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ dargestellt ist. **(D)** Statistische Analyse der basalen und maximalen Ratio-Werte F340/387. **(E)** Gezeigt ist die Differenz aus den maximalen und basalen Ratio-Werte F340/387, was als Δ Ratios F340/387 dargestellt ist. Die Versuche wurden an 5 Tagen mit 5 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: 5 mM PBA = 5; Mock = 7). Die Anzahl der analysierten Zellen sind in den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ ***).

4.1.4. Dosisabhängigkeit des Effektes von 4-PBA auf die Ca^{2+} -Homöostase

Um weiter zu untersuchen, inwieweit der Einfluss auf die ER Ca^{2+} -Homöostase auf den Effekt von 4-PBA zurückzuführen ist, wurde im Folgenden Experiment unterschiedliche Konzentrationen von 4-PBA verwendet. Wie in den vorherigen Experimenten wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mittels Fura-2 bestimmt. Die Zellen wurden für 12 min mit 1 mM, 5 mM und 10 mM 4PBA behandelt und anschließend den Ca^{2+} -Leck über die ER-Membran durch TG demaskiert.

Nach DMSO-Gabe (Mock) blieb das basale Ca^{2+} -Level konstant und es kam nach TG-Gabe zu einer deutlichen Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 4.4 A), das im Vergleich zu den Versuchen mit vorheriger 4-PBA Inkubation (Abb. 4.4 B - D) deutlich größer ausfällt.

Mit 1 mM 4-PBA-behandelten Zellen (Abb. 4.4 B), zeigten nach TG-Gabe eine im Verhältnis zur Kontrolle (Abb. 4.4 A) kleinere, jedoch zu den 5 und 10 mM 4-PBA-behandelten Zellen (Abb. 4.4 C und D) größer ausfallende TG-Antwort. Die Inkubation mit 5 mM 4-PBA (Abb. 4.4 C) und 10 mM 4-PBA (Abb. 4.4 D) zeigen, dass eine zunehmende Erhöhung der 4-PBA Konzentration zu einer zunehmenden Senkung der TG-Antwort führen. Bei einer Inkubation mit 10 mM 4-PBA konnte zusätzlich ein Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ noch vor der TG-Applikation beobachtet werden (Abb. 4.4 D). Mit zunehmender 4-PBA Konzentration zeigte sich mengenmäßig eine geringere TG-Antwort (Abb. 4.4 E).

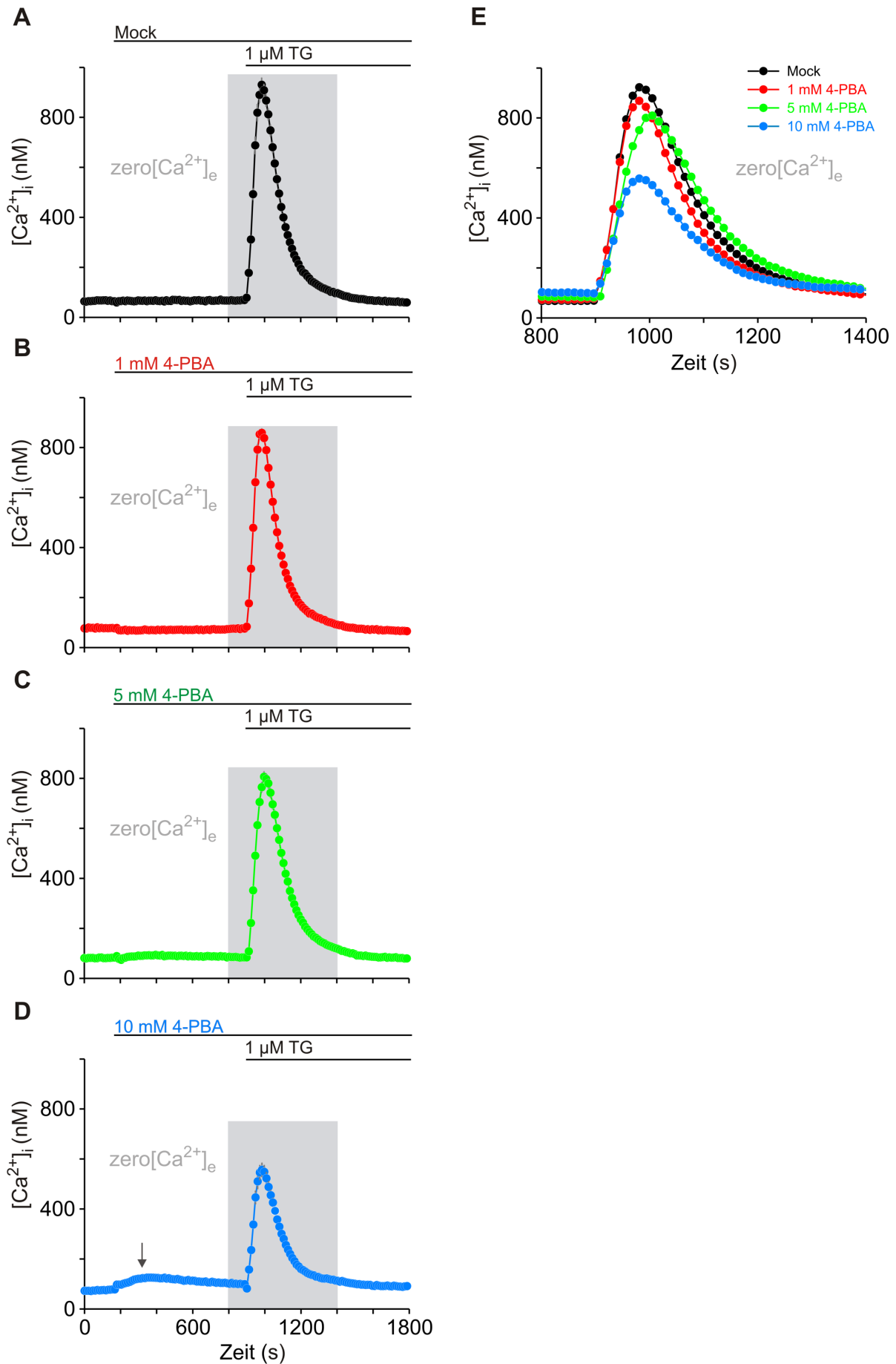


Abbildung 4.4: Konzentrationsabhängiger Effekt von 4-PBA auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($Z\text{Ca} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit $Z\text{Ca}$ gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung begonnen und nach 3 min entweder 1 mM (rot), 5 mM (grün), 10 mM (blau) 4-PBA oder $Z\text{Ca}$ (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 12 min Messzeit wurde 1 μM TG zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 27 min weitergemessen. **(A - D)** Repräsentative Experimente unterschiedlicher Versuchstage von HEK-293 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 4-PBA (B: 1 mM 4-PBA, rot; C: 5 mM 4-PBA, grün; C: 10 mM 4-PBA, blau) oder Mock (Mock, schwarz). Auf der y-Achse ist die ermittelten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgetragen, die in Abhängigkeit der jeweiligen Messzeitpunkte auf der x-Achse abgebildet wurde. Die grauen Bereiche zeigen den Teil der verwendet wurde für Abbildung E. **(E)** Vergleich der zytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung durch TG-Gabe nach 4-PBA Behandlung oder Mock; dargestellt als überlappende Messkurven. Die Versuche wurden an 4 Tagen mit 5 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: 1 mM = 5; 5 mM = 15; 10 mM = 5; Mock = 13). Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Mock: $96,23 \pm 1,84$ nM; 1 mM 4-PBA: $87,95 \pm 2,86$ nM; 5 mM 4-PBA: $118,62 \pm 2,3$ nM; 10 mM 4-PBA: $147,66 \pm 4,46$ nM) nahm nach einer Inkubation mit 1 mM 4-PBA signifikant um 8,6% im Vergleich zur Kontrolle ab, wohingegen mit zunehmender 4-PBA-Konzentration die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant um 18,9% (5 mM) und 34,8% (10mM) weiter zunahm (Abb. 4.5 A). Bei den maximalen Ca^{2+} -Werten nach TG-Applikation sind die Werte wie folgt: die Kontrolle liegt bei $1062,01 \pm 21,78$ nM, der von 1 mM 4-PBA bei $919,76 \pm 14,58$ nM, der von 5 mM 4-PBA bei $827,34 \pm 9,51$ nM und der von 10 mM 4-PBA bei $618,41 \pm 12,71$ nM (Abb. 4.5 B). In Prozent angegeben zeigte sich unter Inkubation mit 1 mM 4-PBA eine Senkung des TG-Maximum um 13,1%, bei Applikation von 5 mM 4-PBA 22,1%; und bei 10 mM 4-PBA-Lösung um 41,8%. Für $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM) gelten folgende Werte: die Kontrolle liegt bei $965,78 \pm 22,39$ nM, der von 1 mM 4-PBA bei $831,81 \pm 16,27$ nM, der von 5 mM 4-PBA bei $708,76 \pm 10,87$ nM und der von 10 mM 4-PBA bei $470,75 \pm 15,19$ nM (Abb. 4.5 C).

In diesem Experiment wird deutlich, dass die Abnahme der Konzentration auf 1 mM 4-PBA auch mit einer geringeren Abnahme der TG-Antwort um 13,8% im Vergleich zu Mock einherging. Bei 5 mM 4-PBA kam es zu einer prozentualen Abnahme um 26,6% und entsprechend dazu kam es bei einer Zunahme der Konzentration auf 10 mM 4-PBA zu einer noch stärkeren Abnahme um 51,3%.

In den Abbildung 4.5 D - F sind die Ergebnisse analog zu Abbildung 4.5 A-C in den Ratio-Werten F340/F387 dargestellt, die den gleichen Effekt von 4-PBA widerspiegeln. In Tabelle 4.4 sind die Ratio-Werte der basalen, Maximal und Differenzwerte aufgelistet.

Tabelle 4.4: Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.5 D-F.

	Mock	1 mM 4-PBA	5 mM 4-PBA	10 mM 4-PBA
Basal (F340/F387)	0,69 ± 0,003	0,67 ± 0,004	0,72 ± 0,003	0,76 ± 0,006
Maximum (F340/F387)	1,75 ± 0,02	1,66 ± 0,01	1,56 ± 0,001	1,34 ± 0,01
Delta (Δ F340/F387)	1,07 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,85 ± 0,01	0,59 ± 0,02

Zusammenfassend zeigte sich, dass sich die Frage nach einer dosisabhängigen Wirkung einer 4-PBA Online-Inkubation auf das Ca^{2+} -Leck bestätigte, wobei folgende drei Beobachtungen hervorzuheben sind:

- (1) Für das basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigte sich eine geringe dosisabhängige Veränderung, welche ab 5 mM 4-PBA auftrat und sich mit der Applikation von 10 mM 4-PBA in einem deutlichen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstieg mit erneutem Abfall vor Gabe von TG präsentierte (siehe Abb. 4.5 A und Abb. 4.4 D).
- (2) Es zeigte sich, dass die nach TG induzierten Maximalwerte, als Maß für den Ca^{2+} -Efflux, signifikant dosisabhängig sanken (Abb. 4.5 B).
- (3) Infolgedessen zeigte sich diese signifikante, dosisabhängige Senkung auch in $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, als Maß für den TG-Peak und das Ca^{2+} -Leck (Abb. 4.5 C).

Die gewonnen Erkenntnisse wurden in einer Dosiswirkungskurve von 4-PBA auf HEK-293 Zellen zusammengeführt (Abb. 4.5).

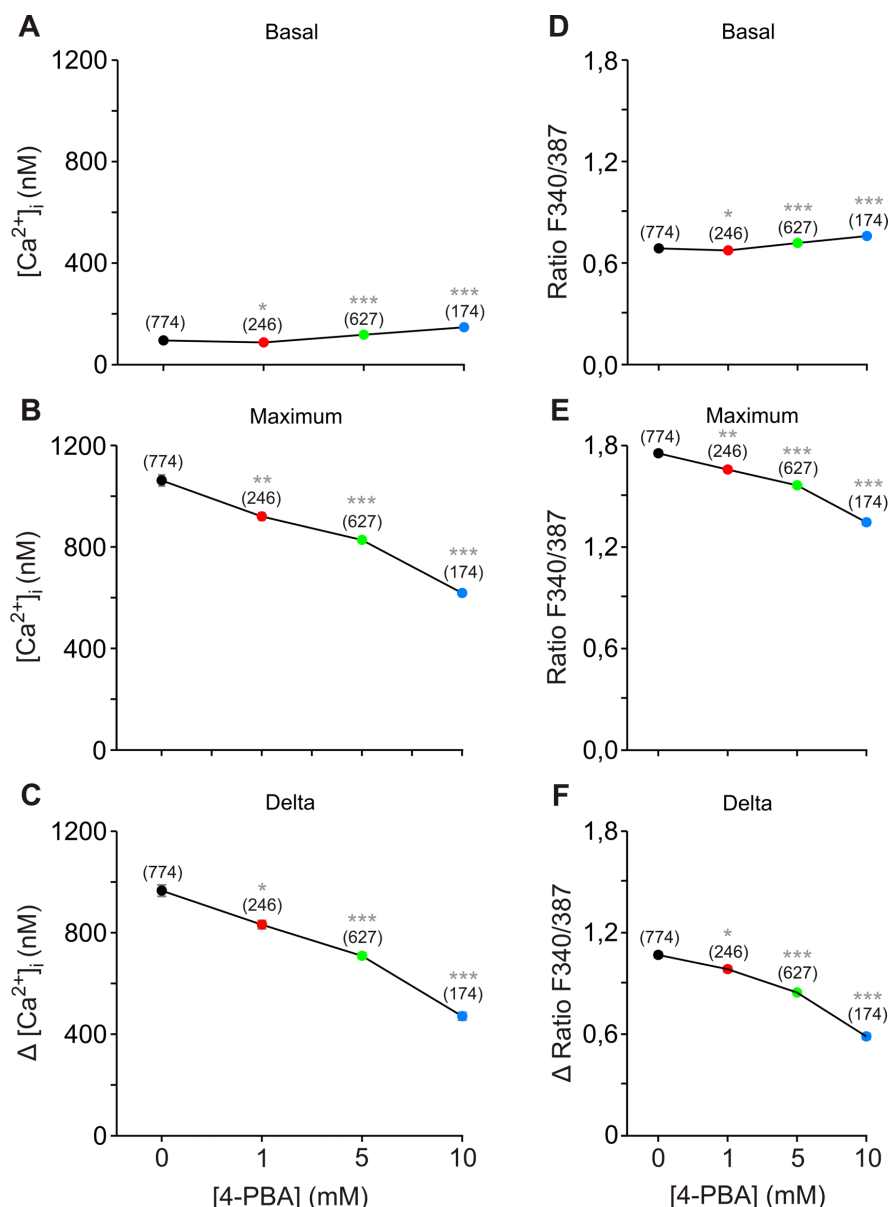


Abbildung 4.5: Dosiswirkungskurve von 1 mM, 5 mM und 10 mM 4-PBA Inkubation.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($Z\text{Ca} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_i$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit $Z\text{Ca}$ gewaschen. Im Anschluss wurde entweder 1 mM (rot), 5 mM (grün), 10 mM (blau) 4-PBA oder $Z\text{Ca}$ (Mock) hinzugefügt, in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt und für 12 min inkubiert. Dann wurde die Messung gestartet und nach 3 min Messzeit 1 μM TG zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 27 min weitergemessen. **(A)** Statistische Analyse der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der verschiedenen 4-PBA Konzentrationen und Mock vor TG-Gabe. **(B)** Statistische Analyse der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der verschiedenen 4-PBA Konzentrationen und Mock nach TG-Gabe. **(C)** Gezeigt ist die Differenz aus der maximalen und basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was als ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) dargestellt ist. **(D)** Statistische Analyse der basalen Ratio-Werte F340/387 der verschiedenen 4-PBA Konzentrationen und Mock vor TG-Gabe. **(E)** Statistische Analyse der maximalen Ratio-Werte F340/387 der verschiedenen 4-PBA Konzentrationen und Mock nach TG-Gabe. **(F)** Gezeigt ist die Differenz aus den maximalen und basalen Ratio-Werte F340/387, was als Δ Ratios F340/387 dargestellt ist. Die Versuche wurden an 4 Tagen mit 5 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: 1 mM = 5; 5 mM = 15; 10 mM = 5; Mock = 13). Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Die Anzahl der analysierten Zellen oberhalb der Dosiswirkungskurve angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

4.2. Beeinflussung des ER-Stresses durch 4-PBA

4.2.1. Effekte von 4-PBA auf den Tunicamycin-induzierten ER-Stress

Die vorangegangenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass 4-PBA die basale $[Ca^{2+}]_i$ erhöht und das Ca^{2+} -Leck über die ER-Membran verringert (Kapitel 4.1.1, 4.1.3 und 4.1.4, Abb. 4.1, 4.3, 4.4 und 4.5). Auf dieser Grundlage stellte sich die Frage, inwieweit 4-PBA einen ähnlichen oder anderen Einfluss aufweist, wenn die Zelle und das in ihr befindliche ER, unter ER-Stress gerät. Somit sollte im Folgenden untersucht werden, ob durch 4-PBA das Ca^{2+} -Leck während pharmakologisch-induziertem ER-Stress beeinflusst wird.

Hierfür wurden zu den Zellen zunächst nach Beladung mit Fura-2 für 12 min 5 mM 4-PBA hinzugegeben. Anschließend wurde der N-Glykosilierungsinhibitor TUNI bzw. die 0,1%-DMSO-Kontrolle (Mock) für weitere 3 min dazu gegeben. TUNI verursacht in HeLa-Zellen eine signifikante Erhöhung des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Lecks und löst durch die Akkumulierung von fehlgefalteten Proteinen ER-Stress aus (Wu et al., 2018; Nami et al., 2016; Schäuble et al., 2012). In Vorversuchen wurde hierfür das TUNI-Verfahren zur Erhöhung des Ca^{2+} -Lecks in HEK-293 Zellen optimiert (Abb. 3.9). Mit Hilfe von TG wurde das Ca^{2+} -Leck über die ER-Membran demaskiert.

Zur Untersuchung, ob TUNI-induzierter ER-Stress zu einem erhöhten Ca^{2+} -Leck führt, wurden die Zellen zunächst mit TUNI alleine inkubiert, was im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung der TG-Antwort geführt hat (Abb. 4.6 A und B). Wurden die Zellen jedoch mit 5 mM 4-PBA vorbehandelt, scheint der verstärkende Effekt von TUNI auf das Ca^{2+} -Leck inhibiert zu sein (Abb. 4.6 C).

Hierbei fällt zudem auf, dass eine Inkubation mit TUNI alleine und in Kombination mit 4-PBA eine langsamere Kinetik der TG-Antwort zur Folge hat (Abb. 4.6 D).

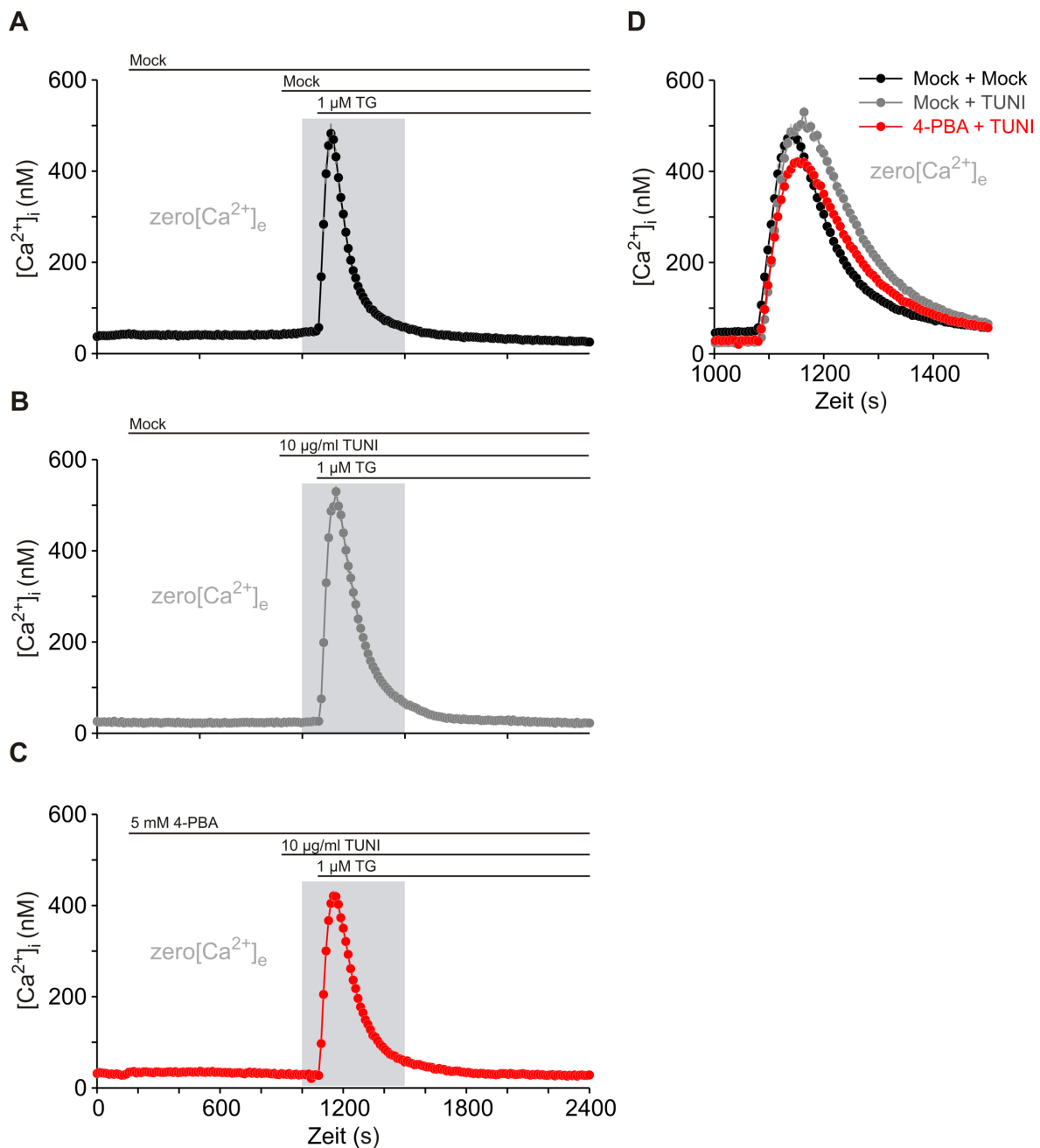


Abbildung 4.6: Effekt auf das Ca^{2+} -Leck bei Tunicamycin-induziertem ER-Stress.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μ M Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($ZCa = zero[Ca^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung gestartet und nach 3 min 5 mM 4-PBA oder ZCa (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 12 min Messzeit wurde 10 μ g/ml TUNI oder 0,1% DMSO in ZCa (Mock) zur Induktion von ER-Stress appliziert. Nach Weiteren 3 min wurde TG oder ZCa zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 15 min weitergemessen. (A - C) Repräsentative Experimente unterschiedlicher Versuchstage von HEK-293 Zellen mit Vorbehandlung mit 4-PBA oder ZCa bzw. mit TUNI oder ZCa (B: $ZCa + TUNI$, grau; C: 4-PBA + TUNI, rot) oder Mock (schwarz). Auf der y-Achse ist die ermittelte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ aufgetragen, die in Abhängigkeit der jeweiligen Messzeitpunkte auf der x-Achse abgebildet wurde. Die grauen Bereiche zeigen den Teil der verwendet wurde für Abbildung E. (E) Vergleich der zytosolischen $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung durch TG-Gabe nach 4-PBA/TUNI Behandlung oder Mock; dargestellt als überlappende Messkurven. Die Versuche wurden an 4 Tagen mit 6 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: $ZCa + TUNI = 8$; 4-PBA + TUNI = 7; Mock = 7). Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

In Abbildung 4.7 ist die statistische Analyse der Versuche aus Abbildung 4.6 dargestellt. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ nahm bei alleiniger TUNI-Behandlung um 7,70% zu, wohingegen in Kombination mit 4-PBA eine 23,72%-ige Reduktion zu beobachten war (Abb. 4.7 A, $[Ca^{2+}]_i$: Kontrolle: $42,20 \pm 0,90$ nM, TUNI: $45,45 \pm 1,39$ nM, 4-PBA+TUNI: $34,67 \pm 0,73$ nM). Die maximale $[Ca^{2+}]_i$ nach TG-Zugabe war im Vergleich zur Kontrolle bei alleiniger TUNI-Behandlung um 17,81% erhöht, wobei in Kombination dieser Wert um 23,84% erniedrigt war (Abb. 4.7 B, $[Ca^{2+}]_i$: Kontrolle: $451,01 \pm 15,31$ nM, TUNI: $531,32 \pm 13,87$ nM, 4-PBA + TUNI: $407,08 \pm 8,75$ nM). Gleiche prozentuale Werte ergaben sich somit für die Differenz aus basalem und maximalem Wert (Abb. 4.7 C, $[Ca^{2+}]_i$: Kontrolle: $408,81 \pm 15,14$ nM, TUNI: $485,87 \pm 13,91$ nM, 4-PBA+TUNI: $372,41 \pm 8,66$ nM). Die gleichen statistischen Ergebnisse konnten mit den Ratio-Werten detektiert werden (Abb. 4.7 D-F); in Tabelle 4.5 sind die Ratio-Werte der basalen, Maximal und Differenzwerte aufgelistet.

Tabelle 4.5: Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.7 D-F.

	Mock	ZCa + TUNI	4-PBA + TUNI
Basal (F340/F387)	$0,63 \pm 0,002$	$0,64 \pm 0,004$	$0,61 \pm 0,002$
Maximum (F340/F387)	$1,57 \pm 0,03$	$1,74 \pm 0,02$	$1,49 \pm 0,02$
Delta (Δ F340/F387)	$0,94 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,02$

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass 4-PBA den Effekt des verstärkten Ca^{2+} -Lecks während pharmakologisch-induziertem ER-Stress inhibieren kann.

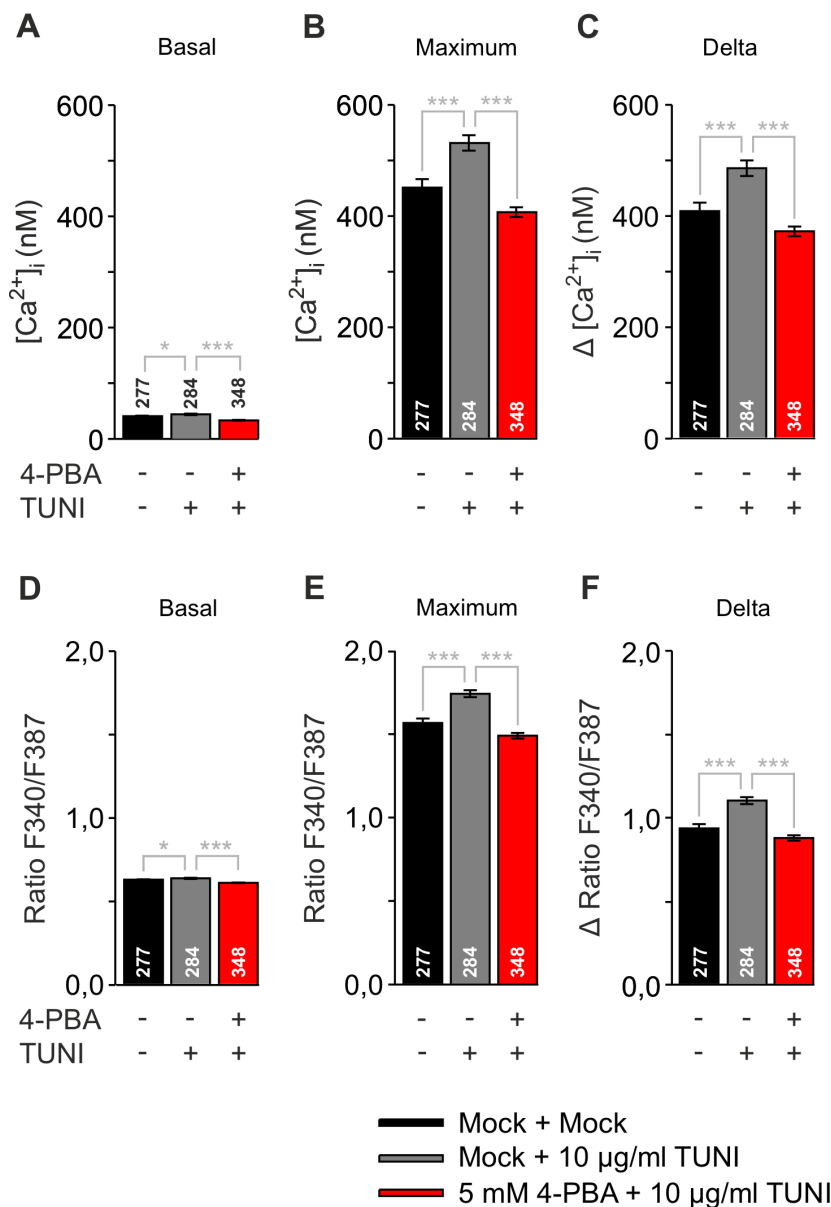


Abbildung 4.7: Statistische Analyse der Versuche aus Abbildung 4.6.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 µM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($ZCa = zero[Ca^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung gestartet und nach 3 min 5 mM 4-PBA oder ZCa (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 12 min Messzeit wurde 10 µg/ml TUNI oder 0,1% DMSO in ZCa (Mock) zur Induktion von ER-Stress appliziert. Nach Weiteren 3 min wurde TG oder ZCa zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 15 min weitergemessen. **(A)** Statistische Analyse der basalen $[Ca^{2+}]_i$ bei Vorbehandlung mit 4-PBA oder ZCa bzw. mit TUNI oder ZCa vor TG-Gabe. **(B)** Statistische Analyse der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ bei Vorbehandlung mit 4-PBA oder ZCa bzw. mit TUNI oder ZCa nach TG-Gabe. **(C)** Gezeigt ist die Differenz aus der maximalen und basalen $[Ca^{2+}]_i$, was als $(\Delta[Ca^{2+}]_i)$ dargestellt ist. **(D)** Statistische Analyse der basalen Ratio-Werte F340/387 bei Vorbehandlung mit 4-PBA oder ZCa bzw. mit TUNI oder ZCa vor TG-Gabe. **(E)** Statistische Analyse der maximalen Ratio-Werte F340/387 bei Vorbehandlung mit 4-PBA oder ZCa bzw. mit TUNI oder ZCa nach TG-Gabe. **(F)** Gezeigt ist die Differenz aus den maximalen und basalen Ratio-Werte F340/387, was als Δ Ratios F340/387 dargestellt ist. Die Versuche wurden an 4 Tagen mit 6 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: $ZCa + TUNI = 8$; 4-PBA + TUNI = 7; Mock = 7). Die Anzahl der analysierten Zellen sind in den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ ***, $p < 0,05$ *).

4.2.2. Effekte von 4-PBA auf den Dithiothreitol-induzierten ER-Stress

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass in HEK-293 Zellen TUNI das Ca^{2+} -Leck erhöht, aber dieser Effekt durch 4-PBA wieder reduziert werden kann (Abb. 4.6). Um den limitierenden Effekt von 4-PBA während ER-Stress weiter zu untersuchen, wurde das Detergens Dithiothreitol (DTT) ausgewählt, da bereits in HeLa-Zellen gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation mit DTT das Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leck erhöht (Schäuble et al., 2012). Wie auch TUNI bewirkt eine Inkubation mit DTT im ER-Lumen eine Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen, wodurch BiP von Sec61 α weg sequestriert wird und dadurch der erhöhte Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER zu erklären ist. Auch in diesen Versuchen wurden die Zellen zunächst für 12 min entweder in ZCa mit 5 mM 4-PBA oder der entsprechenden Kontrolle (Mock) inkubiert. Nach weiteren 6 min wurde 1 mM DTT bzw. die 0,1%-DMSO-Kontrolle (Mock) hinzugegeben und den Ca^{2+} -Leck mittels 1 μM TG demaskiert.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigt die alleinige Inkubation mit DTT keinen Unterschied in der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, jedoch ist die TG-Antwort deutlich größer und die Kinetik des Kurvenverlaufs ist merklich schneller (Abb. 4.8 A und B). Die Vorinkubation mit 4-PBA konnte den Effekt von DTT inhibieren (Abb. 4.8 C). Abbildung 4.8 D verdeutlicht die Ergebnisse.

So betrug der TG-induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Kontrollzellen $372,88 \pm 30,96$ nM, für DTT-behandelte Zellen $410,77 \pm 22,63$ nM und in Kombination mit 4-PBA $379,71 \pm 11,72$ nM (Abb. 4.8 E). Der Effekt von DTT auf TG-Antworten sind sehr variable, wie in Abbildung 4.8 E zu sehen ist, so dass eine schlüssige Aussage zu den möglichen Effekten von 4-PBA auf DTT-induziertem Stress auf der Basis der in Abbildung 4.8 gezeigten Versuchen nur bedingt möglich ist. Das DTT-Anwendungsverfahren sollte in HEK-293 Zellen optimiert werden.

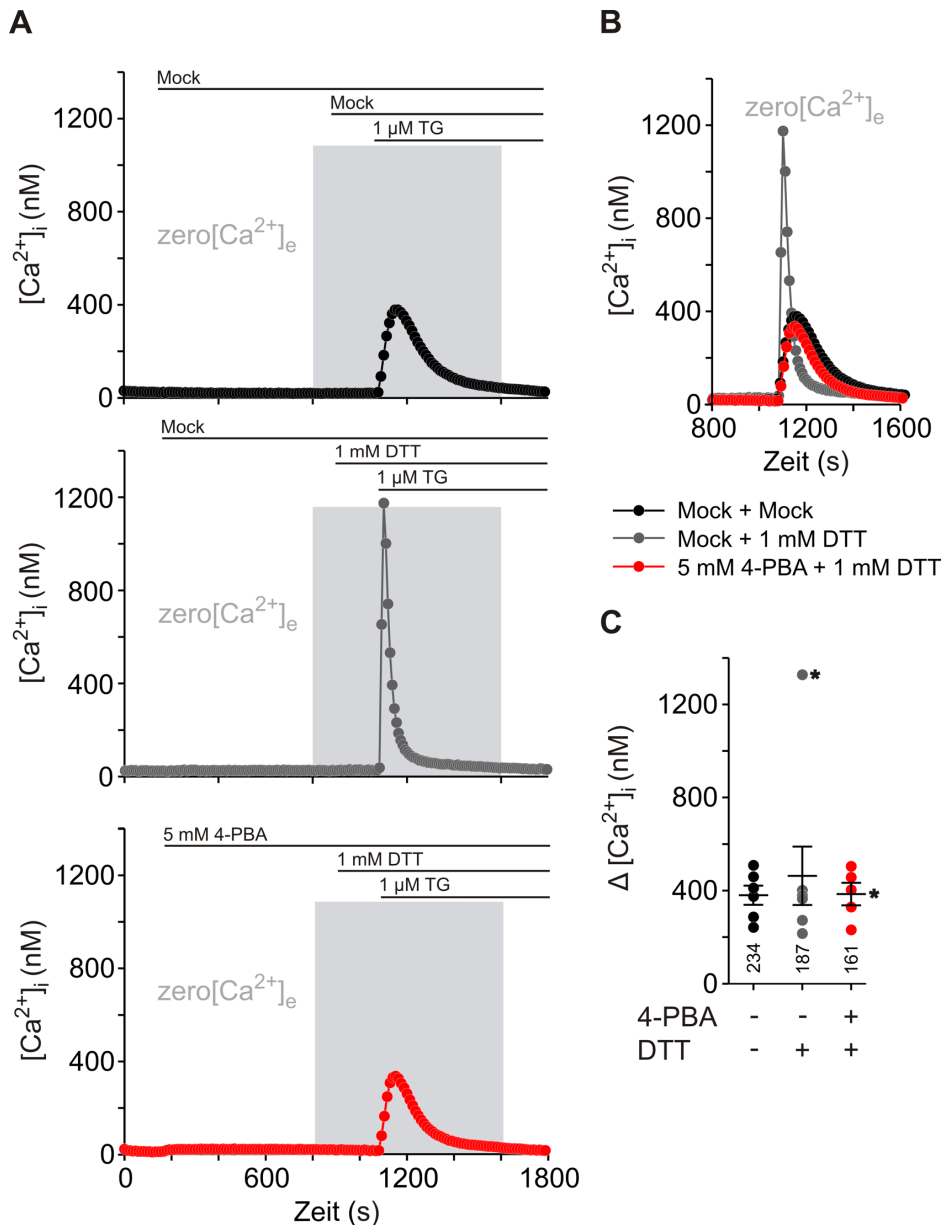


Abbildung 4.8: Effekt auf den Ca²⁺-Leck bei Dithiotreititol-induziertem ER-Stress.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA (ZCa = zero[Ca²⁺]_e) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung gestartet und nach 3 min 5 mM 4-PBA oder ZCa (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 12 min Messzeit wurde 10mM DTT oder 0,1% DMSO in ZCa (Mock) zur Induktion von ER-Stress appliziert. Nach Weiteren 3 min wurde TG oder ZCa zur Demaskierung des Ca²⁺-Lecks hinzugegeben und für 15 min weitergemessen. (A - C) Repräsentative Experimente unterschiedlicher Versuchstage von HEK-293 Zellen mit Vorbehandlung mit 4-PBA oder ZCa bzw. mit DTT oder ZCa (B: ZCa + DTT, grau; C: 4-PBA + DTT, rot) oder Mock (schwarz). Auf der y-Achse ist die ermittelten zytosolischen Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i aufgetragen, die in Abhängigkeit der jeweiligen Messzeitpunkte auf der x-Achse abgebildet wurde. Die grauen Bereiche zeigen den Teil der verwendet wurde für Abbildung E. (D) Vergleich der zytosolischen [Ca²⁺]_i-Änderung durch TG-Gabe nach 4-PBA/TUNI Behandlung oder Mock; dargestellt als überlappende Messkurven. (E) Gezeigt ist die Differenz aus der maximalen und basalen [Ca²⁺]_i, was als (Δ[Ca²⁺]_i) dargestellt ist. Die Versuche wurden an 5 Tagen mit 5 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: ZCa + DTT = 8; 4-PBA + DTT = 5; Mock = 7). Die Anzahl der analysierten Zellen ist unterhalb des Kastengrafik angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert±SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als p < 0,05 *).

4.2.3. Effekte von 4-PBA auf den Trifluoperazine-induzierten ER-Stress

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die Vorbehandlung mit 4-PBA den durch TUNI-induzierten ER-Stress und damit verbundenen höheren Ca^{2+} -Leckstrom über die ER-Membran verringern kann. Mit TUNI wird das Ca^{2+} -Leck von luminaler Seite des ER moduliert, da durch diese Behandlung BiP von Sec61 α sequestriert wird und sich somit das Ca^{2+} -Leck erhöht (Schäuble et al., 2012). Aus diesem Grund sollte in den nächsten Versuchen untersucht werden, ob eine Modulierung von zytosolischer Seite aus den gleichen Effekt bewirkt. Hierfür wurde der CaM-Inhibitor Trifluoperazine (TFP) verwendet, da gezeigt werden konnte, dass in HeLa- Zellen eine Inkubation mit TFP das Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leck erhöht (Erdmann et al., 2011). In Vorversuchen wurde das TFP-Anwendungsverfahren in HEK-293 Zellen optimiert (Abb. 3.9, 3.10). Dieses TFP-Anwendungsverfahren wurde so erweitert, dass die Zellen entweder in ZCa mit 5 mM 4-PBA oder der entsprechenden Kontrolle (Mock) inkubiert wurden und anschließend wurde 10 μM TFP bzw. die 0,1%-DMSO-Kontrolle (Mock) hinzugegeben. Nach weiteren 3 min wurde der Ca^{2+} -Leck mittels 1 μM TG demaskiert. Wurden die Zellen allein mit TFP inkubiert, kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einem basalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta 1$) und zu einer signifikant erhöhten TG-Antwort ($\Delta 2$, Abb. 4.9 B und C), wie bereits von Erdmann et al. (2011) beschrieben. Abbildung 4.9 C zeigt die graphische Analyse des TFP-Effektes (auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$) nach Vorbehandlung mit 4-PBA. Die Gabe von 4-PBA erfolgte 12 min vor der anschließenden dreiminütigen TFP-Inkubation. Auch hier steigt nach TFP-Applikation das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kontinuierlich an, bis TG hinzugefügt wird (siehe Abb. 4.9, C). Nach TG-Gabe zeigt sich ebenfalls eine deutliche Zunahme des TG-induzierten Maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Vergleich zur Kontrolle, allerdings fällt dieser kleiner aus ohne vorherige 4-PBA Inkubation wie in Abbildung 4.9, B. Wurden die Zellen jedoch mit 4-PBA vorinkubiert, kam es weiterhin zu einem TFP-induzierten Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, jedoch war das Ca^{2+} -Leck vermindert (Abb. 4.9 C).

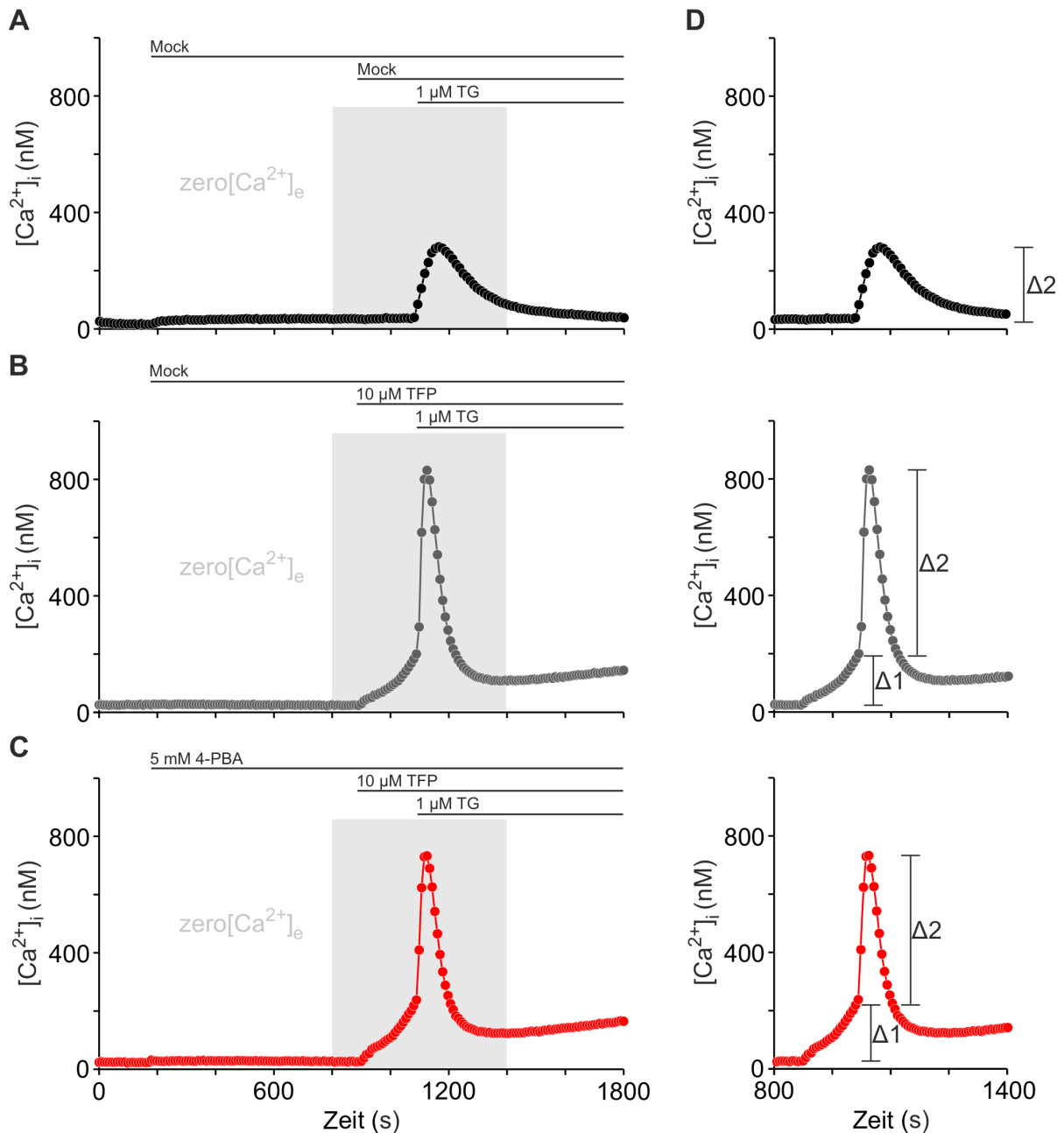


Abbildung 4.9: Effekt auf das Ca^{2+} -Leck bei Trifluoperazine-induziertem ER-Stress.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit $4 \mu\text{M}$ Fura-2-AM in $0,5 \text{ mM}$ EGTA ($\text{ZCa} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, 2x mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung begonnen und nach 3 min 5 mM 4-PBA oder ZCa (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 12 min Messzeit wurde $10 \mu\text{M}$ TFP oder $0,1\%$ DMSO in ZCa (Mock) zur Induktion von ER-Stress appliziert. Nach Weiteren 3 min wurde TG oder ZCa zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 15 min weitergemessen. (A - C) Repräsentative Experimente unterschiedlicher Versuchstage von HEK-293 Zellen mit Vorbehandlung mit 4-PBA oder ZCa bzw. mit TFP oder ZCa (B: $\text{ZCa} + \text{TFP}$, grau; C: 4-PBA + TFP, rot) oder Mock (schwarz). Auf der y-Achse ist die ermittelten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgetragen, die in Abhängigkeit der jeweiligen Messzeitpunkte auf der x-Achse abgebildet wurde. (D) Definition von $\Delta 1$ und $\Delta 2$. Folglich wird $\Delta 1$ im Folgenden als Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Gabe von TFP bis zur TG-Gabe gewertet. $\Delta 2$ entspricht der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung ab TG-Gabe bis zum Erreichen der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Versuche wurden an 4 Tagen mit 4 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: $\text{ZCa} + \text{TFP} = 5$; 4-PBA + TFP = 5; Mock = 4). Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

In den Kontrollexperimenten kam es zu keinem vorzeitigen Anstieg der basalen $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 4.9 A). Wurden jedoch die Zellen mit TFP behandelt, nahm die $[Ca^{2+}]_i$ um $168,16 \pm 3,66$ nM zu, wohingegen eine Vorinkubation mit 4-PBA diesen Anstieg auf $126,71 \pm 5,94$ nM reduzierte, was einer Reduktion von 24,65% entspricht (Abb. 4.9 A). Betrachtet man die TG-induzierte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$, so wurde in den Kontrollzellen eine Zunahme von $302,93 \pm 6,90$ nM detektiert, welche in TFP-behandelten Zellen bei $598,68 \pm 75,31$ nM lag (Abb. 4.9 B). Die 4-PBA-Vorinkubation reduzierte die TG-Antwort signifikant auf $496,68 \pm 11,86$ nM, was einer Reduktion von 17,04% entspricht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 4-PBA die durch CaM-Hemmung induzierte Erhöhung des Ca^{2+} -Lecks aus dem ER inhibiert.

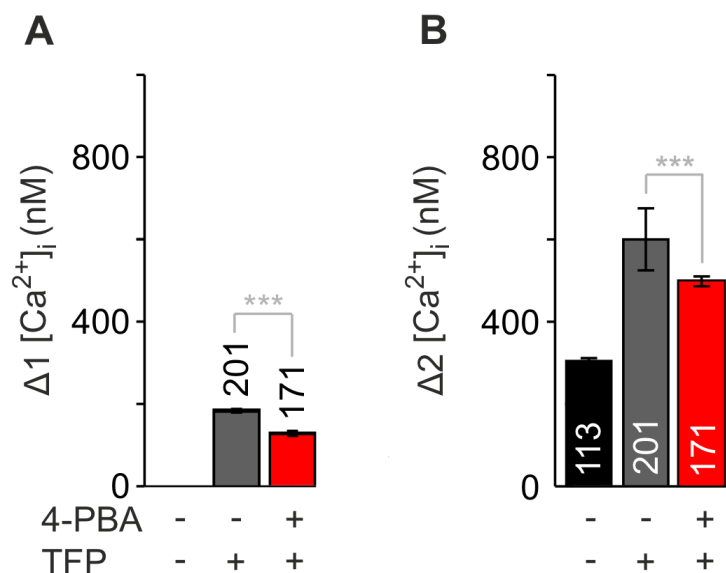


Abbildung 4.10: Statistische Analyse der Versuche aus Abbildung 4.8.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit $4 \mu\text{M}$ Fura-2-AM in $0,5 \text{ mM}$ EGTA ($ZCa = \text{zero}[Ca^{2+}]_i$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, 2x mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des Visitron-Mikroskops eingefügt. Im Anschluss wurde die Messung begonnen und nach 3 min 5 mM 4-PBA oder ZCa (Mock) hinzugefügt. Nach weiteren 12 min Messzeit wurde $10 \mu\text{M}$ TFP oder $0,1\%$ DMSO in ZCa (Mock) zur Induktion von ER-Stress appliziert. Nach Weiteren 3 min wurde TG oder ZCa zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 15 min weitergemessen. **(A)** Gezeigt ist $\Delta 1$ nach Gabe von TFP bis zur TG-Gabe. **(B)** Gezeigt ist $\Delta 2$ als Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ ab TG-Gabe bis zum Erreichen der maximalen $[Ca^{2+}]_i$. Die Versuche wurden an 4 Tagen mit 4 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: ZCa + TFP = 5; 4-PBA + TFP = 5; Mock = 4). Die Anzahl der analysierten Zellen sind in den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ (***)

4.3. Effekt des aktiven 4-PBA-Metaboliten Phenylacetic Acid (PAA) auf die Ca^{2+} -Homöostase

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass 4-PBA den Ca^{2+} -Leck limitiert und den durch pharmakologisch ER-Stress-induzierten erhöhten Ca^{2+} -Leck ebenfalls reduziert (Abb. 4.4, 4.6, 4.8). Da 4-PBA in der Leber zum aktiven Metaboliten Phenylelessigsäure (engl. phenylacetic acid, PAA) metabolisiert wird (Kapitel 2.7.1), sollte als nächstes der Effekt von PAA auf die ER- Ca^{2+} -Homöostase untersucht werden. Diese Versuche sollten klären, ob der PAA Metabolit prinzipiell wirksam ist, obwohl es unwahrscheinlich ist, dass dieser in Zellkultur entstehen könnte. Hierfür wurden die Zellen mit dem zytosolischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 beladen (Kapitel 3.6.2) und für 3 min entweder in ZCa mit 5 mM PAA oder der entsprechenden Kontrolle (Mock) inkubiert. Nach weiteren 3 min wurde 1 μM TG hinzugegeben, um den Ca^{2+} -Leck zu demaskieren (Abb. 4.11 A). Nach dieser Zugabe fiel die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf einen Wert von 150 nM ab und stieg dann durch den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER wieder auf 185 nM an. Am Ende der Messung war die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wie in den Versuchen zuvor auf 35 nM abgefallen. Die anfängliche hohe basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ könnte auf eine Autofluoreszenz von PAA zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurde im nächsten Experiment nach 3 min 5 mM PAA hinzugegeben, was einen sofortigen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 35 nM auf 410 nM zur Folge hatte (Abb. 4.11 B). Nach 7,5 min wurden 300 μl aus der Messkammer entfernt und durch 300 μl Messlösung ersetzt, was zur Folge hatte, dass die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder auf 35 nM abfiel. Dies bestätigt die Vermutung, dass PAA eine Eigenfluoreszenz aufweist, die die Fura-2-Signale stört.

Deshalb wurde die Messmethodik wie folgt angepasst. Nach 12-minütiger Inkubation mit 5 mM PAA wurde PAA entfernt, indem die Lösung durch 300 μl Messlösung ausgetauscht wurde. Hierunter fiel die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über 6 min lang ab bis zum Erreichen eines stabilen basalen Plateaus (Abb. 4.11 C). Unter diesen Bedingungen führte TG vom üblichen basalen Wert zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf $181,27 \pm 38,96$ nM (Abb. 4.11 C). Im Vergleich dazu liegt dieser Wert der Kontrollzellen bei $498,85 \pm 12,44$ nM (Abb. 4.11 D). Demnach zeigte sich auch bei einer Vorbehandlung mit PAA und Applikation von TG ein deutlich erniedrigtes Ca^{2+} -Leck im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 4.11 D).

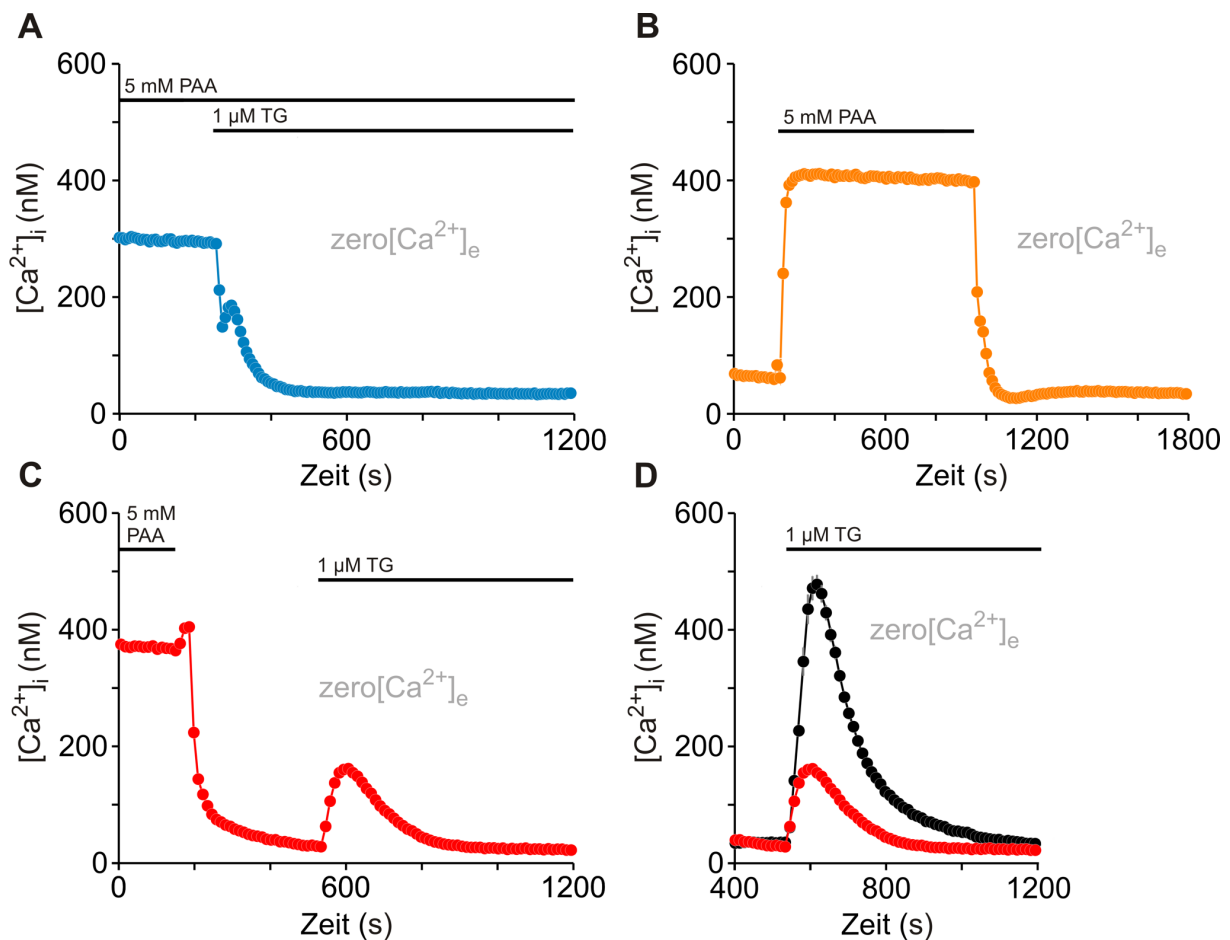


Abbildung 4.11: Analyse der Ca^{2+} -Homöostase in HEK293 Zellen nach 5 mM Phenylacetic Acid Inkubation.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($\text{ZCa} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des Visitron-Mikroskops eingefügt. Für die Experimente in Abbildung A wurden die Zellen 3 min mit 5 mM PAA inkubiert und anschließend wurde TG zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 17 min weitergemessen.

Für die Experimente in Abbildung B wurden die Zellen nach 3 min in ZCa für 9 min mit 5mM PAA inkubiert; anschließend wurde das PAA entfernt und die Zellen für 13 min mit ZCa weiterbehandelt. Für die Experimente in Abbildung C wurden die Zellen 3 min mit 5 mM PAA inkubiert und anschließend wurde das PAA entfernt und die Zellen für 7,5 min mit ZCa behandelt. Dann wurde TG zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 10 min weitergemessen. (A - C) Repräsentative Experimente unterschiedlicher Versuchstage von HEK-293 Zellen mit Vorbehandlung/Behandlung mit PAA, ZCa und TG (A: PAA + TG, blau; B: ZCa + PAA + ZCa, gelb; C: PAA + ZCa + TG, rot). Auf der y-Achse ist die ermittelte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgetragen, die in Abhängigkeit der jeweiligen Messzeitpunkte auf der x-Achse abgebildet wurde. (D) Vergleich der zytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung durch TG-Gabe nach PAA und ZCa Behandlung (rot) oder Mock (schwarz); dargestellt als überlappende Messkurven. Die Versuche wurden an 2 Tagen mit 3 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: PAA + ZCa + TG = 3; Mock = 3). Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lag bei Kontrollzellen bei $45,14 \pm 1,67$ nM, wobei dieser Wert in PAA-behandelten etwas niedriger mit $22,29 \pm 1,55$ nM ausfiel (Abb. 4.12 A). Die maximale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kontrollzellen wurde bei $498,85 \pm 12,44$ nM detektiert, wohingegen in

PAA-behandelte Zellen das Maximum bei $181,27 \pm 38,96$ nM signifikant erniedrigt war. Diese Werte spiegeln die Differenz wider (Abb. 4.12 B), bei der zu sehen ist, dass die TG-Antwort um 63,66% reduziert ist. In Abbildung 4.12 C und D sind die Ratio-Werte der Versuche dargestellt und die entsprechenden Werte sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tabelle 4.6: Ratio-Werte der Versuche aus Abbildung 4.7 C-D.

	Mock	PAA
Basal (F340/F387)	$0,64 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,004$
Maximum (F340/F387)	$1,68 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,04$
Delta (Δ F340/F387)	$1,05 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,04$

Zusammenfassend lässt sich aus den Versuchsreihen 4.3 folgendes ableiten: PAA zeigt einen deutlichen Effekt bei der Reduktion des durch TG demaskierten Ca^{2+} -Lecks. Im Vergleich zu der Reduktion des Ca^{2+} -Lecks durch 4-PBA mit ca. 25%, fiel die Reduktion des Ca^{2+} -Lecks durch PAA mit ca. 60% deutlich stärker aus (siehe Abb. 4.1, 4.11 und 4.12), wenn auch die Inkubationszeit versuchsbedingt länger stattfand als bei diesen Versuchsreihen und sich die Ergebnisse somit nur begrenzt vergleichen lassen.

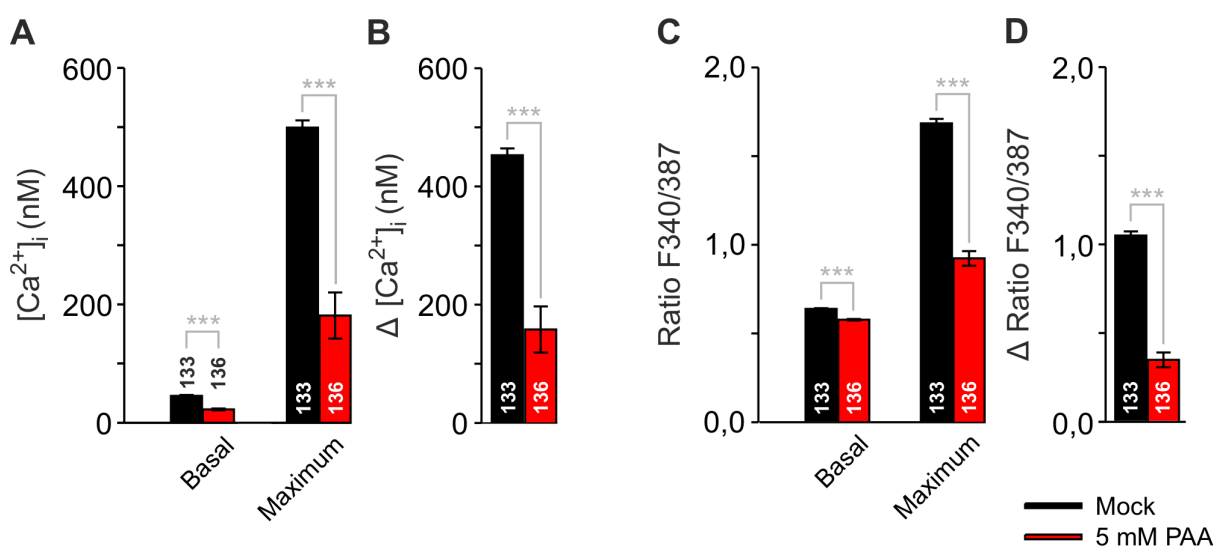


Abbildung 4.12: Effekt von PAA auf die ER- Ca^{2+} -Homöostase.

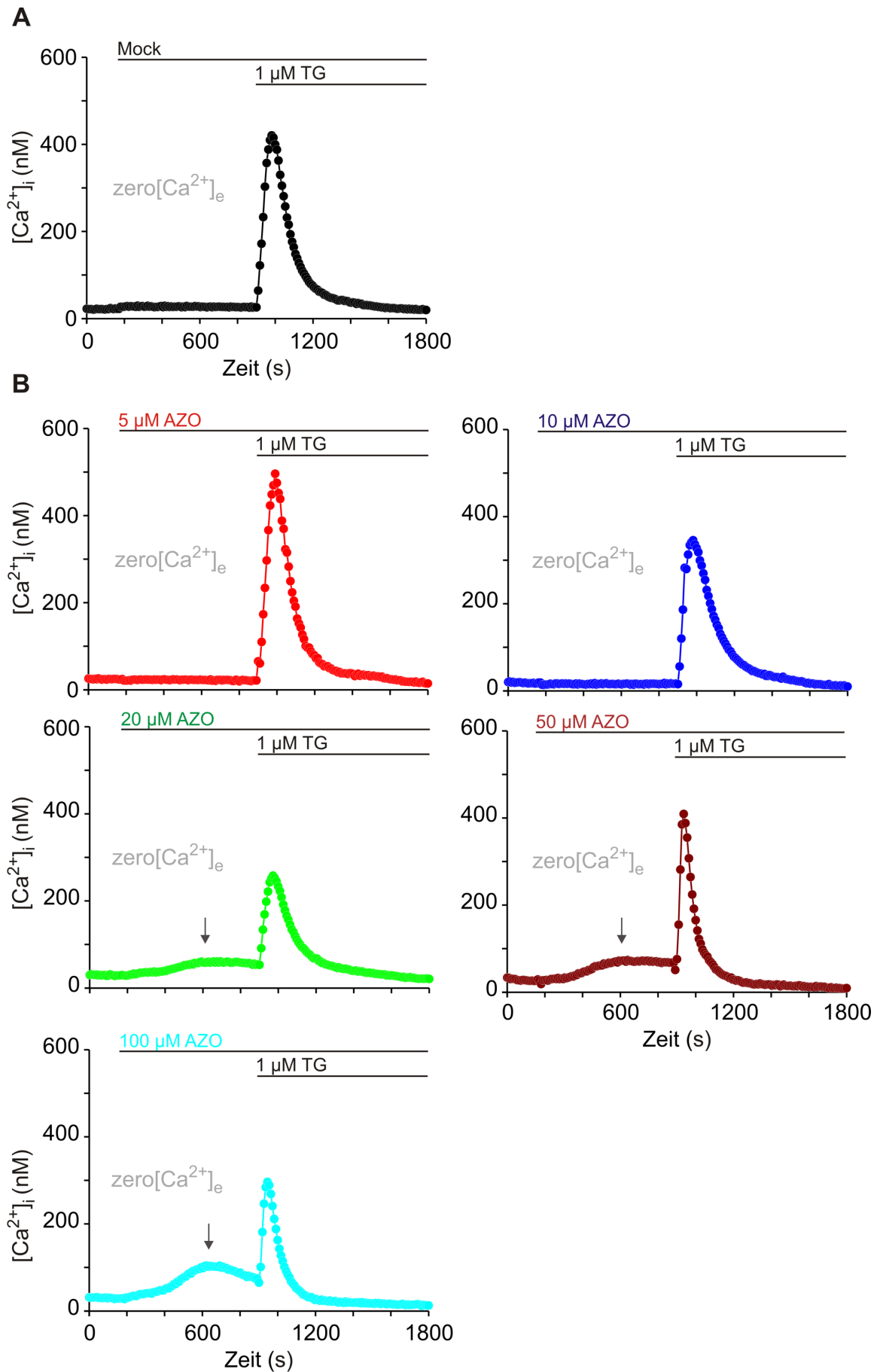
24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($Z\text{Ca} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit $Z\text{Ca}$ gewaschen und in den Strahlengang des VisiTron-Mikroskops eingefügt. Für die Experimente mit PAA wurden die Zellen 3 min mit 5 mM PAA inkubiert und anschließend wurde das PAA entfernt und die Zellen für 7 min mit $Z\text{Ca}$ behandelt. Dann wurde TG zur Demaskierung des Ca^{2+} -Lecks hinzugegeben und für 10 min weitergemessen. Für die Kontrolleexperimente (Mock) wurden die Zellen nach 3 min mit TG behandelt. **(A)** Statistische Analyse der basalen (vor TG-Gabe) und maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nach TG-Gabe) **(B)** Gezeigt ist die Differenz aus der maximalen und basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was als $(\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i)$ dargestellt ist. **(C)** Statistische Analyse der basalen und maximalen Ratio-Werte F340/387. **(D)** Gezeigt ist die Differenz aus den maximalen und basalen Ratio-Werte F340/387, was als $\Delta \text{Ratios F340/387}$ dargestellt ist. Die Versuche wurden an 2 Tagen mit 3 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: PAA + $Z\text{Ca}$ + TG = 3; Mock = 3). Die Anzahl der analysierten Zellen sind in den Balkendiagrammen angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ ***).

4.4. Änderung der Ca²⁺-Homöostase nach Azoramide (AZO)-Inkubation

4.4.1. Dosisabhängigkeit des Effektes von AZO auf die Ca²⁺-Homöostase

Um die bisherigen Ergebnisse der Inkubation mit 4-PBA zu unterstützen, wurde in den folgenden Experimenten das chemische Chaperon Azoramide (AZO) verwendet. Es ist bekannt, dass AZO die Synthese endogener Chaperone hochreguliert, wodurch beide Chaperon-Typen die Proteinfaltungskapazität verbessern und den ER-Stress, verursacht durch eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine, vermindert wird (Kapitel 2.7.3). Um den Effekt von AZO auf die Ca²⁺-Homöostase zu untersuchen, wurden die HEK-293 Zellen zunächst mit dem zytosolischen Ca²⁺-Indikator Fura-2 beladen (Kapitel 3.6.3) und während der Messung für 12 min mit unterschiedlichen Konzentrationen AZO (5, 10, 20, 50, 100 µM) inkubiert. Anschließend wurde 1 µM TG hinzugegeben, um den Ca²⁺-Leck zu demaskieren.

In Kontrollzellen konnte keine Veränderung der basalen [Ca²⁺]_i beobachtet werden (Abb. 4.13 A). Allerdings konnte ab einer Konzentration von 20 µM AZO eine konzentrationsabhängige Zunahme der basalen [Ca²⁺]_i detektiert werden (Abb. 4.13 B), was ebenso bei Verwendung von 4-PBA zu beobachten war (Abb. 4.4). Interessanterweise war bei einer Konzentration von 5 µM AZO die TG-Antwort höher als in Kontrollzellen, während bei höheren Konzentrationen von AZO der Anstieg der [Ca²⁺]_i verringert war.



24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($Z\text{Ca} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_i$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen sowie innerhalb des Strahlengangs des Visitron-Mikroskops positioniert. **(A)** 3 min nach Beginn der Messung wurde ZCa (Mock) hinzugegeben und für 12 min inkubiert. Anschließend wurde 1 μM Thapsigargin (TG) appliziert und für weitere 15 min gemessen. **(B)** Nach 3 min wurde entweder 5 μM (rot), 10 μM (blau), 20 μM (grün), 50 μM (braun) oder 100 μM (türkis) Azoramide (AZO) hinzugegeben und für 12 min inkubiert. Danach wurde 1 μM TG hinzugegeben und für weitere 15 min gemessen. Dargestellt sind exemplarische Graphen. Der graue Pfeil weist auf einen Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hin. Die Versuche wurden an 1 Tag mit 2 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: 5 μM = 2; 10 μM = 2; 20 μM = 5; 50 μM = 2; 100 μM = 3; Mock = 5). Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

Wie schon in Abbildung 4.9 wurde auch in diesen Versuchen $\Delta 1$ bestimmt, was den Netto-Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor Zugabe von TG repräsentiert (Abb. 4.14 A). Wie aus Tabelle 4.7 zu entnehmen ist, blieb $\Delta 1$ in Kontrollzellen und mit 5 und 10 μM AZO-behandelte Zellen unter 10 nM. Allerdings stieg ab einer Konzentration von 20 μM AZO die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stetig an bis zu einem Maximum von 76 nM nach Inkubation mit 100 μM AZO. Die genauen Werte sind in Tabelle 4.7 aufgelistet und in der Abbildung 4.14 B graphisch gezeigt.

Tabelle 4.7: $\Delta 1$ -Werte der Versuche aus Abbildung 4.14 B.

Versuch	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration in nM
Mock	$7,81 \pm 0,36$
5 μM AZO	$3,26 \pm 1,60$
10 μM AZO	$6,17 \pm 0,96$
20 μM AZO	$18,48 \pm 1,45$
50 μM AZO	$53,84 \pm 1,76$
100 μM AZO	$76,06 \pm 2,26$

Ebenso wurde $\Delta 2$ analysiert, was dem Netto-Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach TG-Zugabe entspricht (Abb. 4.14 A). Die TG-Antwort lag in Kontrollzellen bei ~ 410 nM, wohingegen nach Inkubation mit 5 μM AZO dieser Wert bei ~ 450 nM lag. Jedoch nahm der TG-induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit höheren Konzentrationen von AZO ab und lag bei 100 μM AZO nur noch bei 190 nM. Die genauen Werte können aus Tabelle 4.8 entnommen werden und sind in Abbildung 4.14 C graphisch dargestellt.

Tabelle 4.8: $\Delta 2$ -Werte der Versuche aus Abbildung 4.14 C.

Versuch	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration in nM
Mock	$411,60 \pm 14,23$
5 μM AZO	$452,06 \pm 10,25$
10 μM AZO	$333,61 \pm 7,97$
20 μM AZO	$294,68 \pm 9,95$
50 μM AZO	$326,28,68 \pm 16,76$
100 μM AZO	$190,68 \pm 10,14$

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, ähnlich zu denen mit 4-PBA, dass AZO dosisabhängig einen Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und eine Abnahme des Ca^{2+} -Lecks über die ER-Membran zur Folge hat.

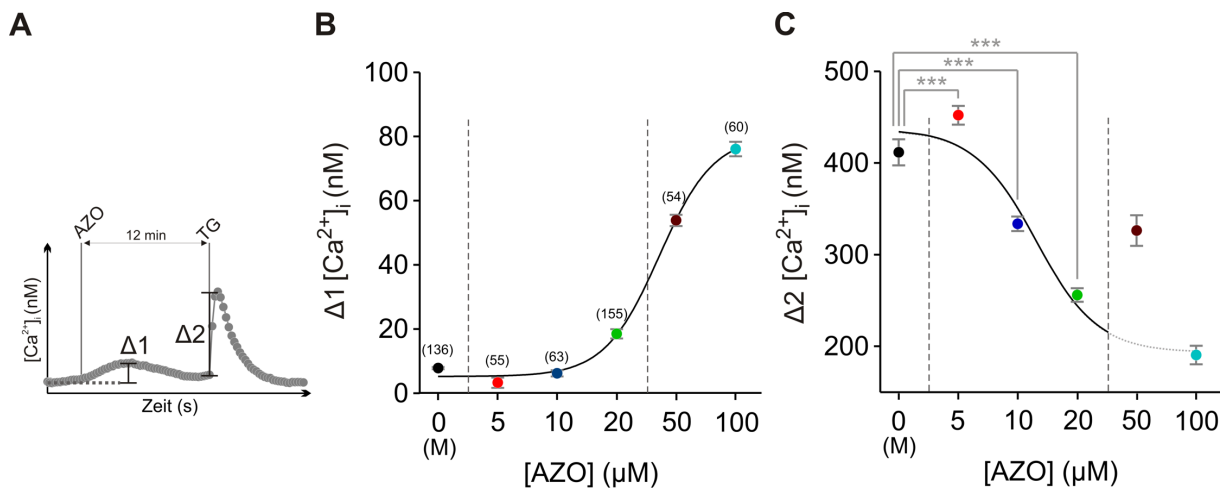


Abbildung 4.14: Statistik der in Abbildung 4.13 gezeigten Graphen.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($Z\text{Ca} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit $Z\text{Ca}$ gewaschen und in den Strahlengang des Visitron-Mikroskops eingefügt. **(A)** Definition von $\Delta 1$ und $\Delta 2$. Folglich wird $\Delta 1$ im Folgenden als erstmalige Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Gabe von AZO bis zur TG-Gabe gewertet. $\Delta 2$ entspricht der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung ab TG-Gabe bis zum Erreichen der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. **(B)** Gezeigt ist $\Delta 1$ nach Gabe von AZO bis zur TG-Gabe. Die Messpunkte wurde mittels einer sigmoidale Kurve verbunden, was einer Dosiswirkungskurve für AZO entspricht. **(C)** Gezeigt ist $\Delta 2$ als Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ab TG-Gabe bis zum Erreichen der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Messpunkte wurde mittels einer sigmoidale Kurve verbunden, was einer Dosiswirkungskurve für AZO entspricht. Die Versuche wurden an 1 Tag mit 2 gepaarten Versuchen durchgeführt (Versuchszahl: 5 μM = 2; 10 μM = 2; 20 μM = 5; 50 μM = 2; 100 μM = 3; Mock = 5). Die Anzahl der analysierten Zellen sind in Abbildung B oberhalb der Messpunkte von $\Delta 1$ in Klammern angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ (***)

4.4.2. Effekte von AZO auf den Tunicamycin-induzierten ER-Stress

Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass AZO, ähnlich zu 4-PBA, einen Anstieg der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge hat und den Ca^{2+} -Leck über die ER-Membran verringert (Abb. 4.4 und 4.13). 4-PBA konnte zudem noch den verstärkenden Effekt von TUNI auf den Ca^{2+} -Leck inhibieren (Abb. 4.6). Aus diesem Grund sollte ebenso mit AZO untersucht werden, ob das chemische Chaperon den durch TUNI verstärkten Ca^{2+} -leck reduzieren kann. In diesem Zuge wurden die Konzentrationen von AZO wie in Abbildung 4.13 verwendet, um eine mögliche Dosisabhängigkeit feststellen zu können. Hierfür wurden die Zellen wieder mit 4 μ M Fura-2 beladen (Kapitel 3.6.3) und entweder mit ZCa oder den entsprechenden Konzentrationen von AZO für 12 min inkubiert (Abb. 4.15). Danach wurde für 3 min DMSO oder 10 μ g/ml TUNI hinzugegeben und mit 1 μ M TG wurde der Ca^{2+} -Leck demaskiert.

In Abbildung 4.15 sind repräsentative Experimente unterschiedlicher Versuchstage dargestellt und verdeutlichen, die Änderung der $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Homöostase der Zellen bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von AZO.

Für den besseren Vergleich der einzelnen Kurvenverläufe, wurden die detektierten Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen untereinander wie folgt zu Darstellung gebracht. Abbildung 4.15 A: Mock + Mock (schwarz), Mock + TUNI (grau). Abbildung 4.15 B: 5 μ M AZO (rot), 10 μ M AZO (dunkel blau), 20 μ M AZO (grün), 50 μ M AZO (dunkel rot), 100 μ M AZO (hell blau). Im Folgenden beschreibe ich zunächst die einzelnen Verläufe mit ihren Besonderheiten und vergleiche im nächsten Kapitel detaillierter, einzelne Werte anhand der statistischen Auswertung.

Wurden die Zellen nur mit TUNI behandelt, kam es wie in der Literatur beschrieben (Schäuble *et al.*, 2012) zu einer erhöhten TG-Antwort (Abb. 4.15 A). Bei Inkubation mit höheren Konzentrationen von AZO, konnte wieder ein Anstieg der basalen $[Ca^{2+}]_i$ detektiert werden (Abb. 4.15 B). Zusätzlich ist zu erkennen, dass der TUNI-Effekt durch die AZO-Behandlung verloren geht.

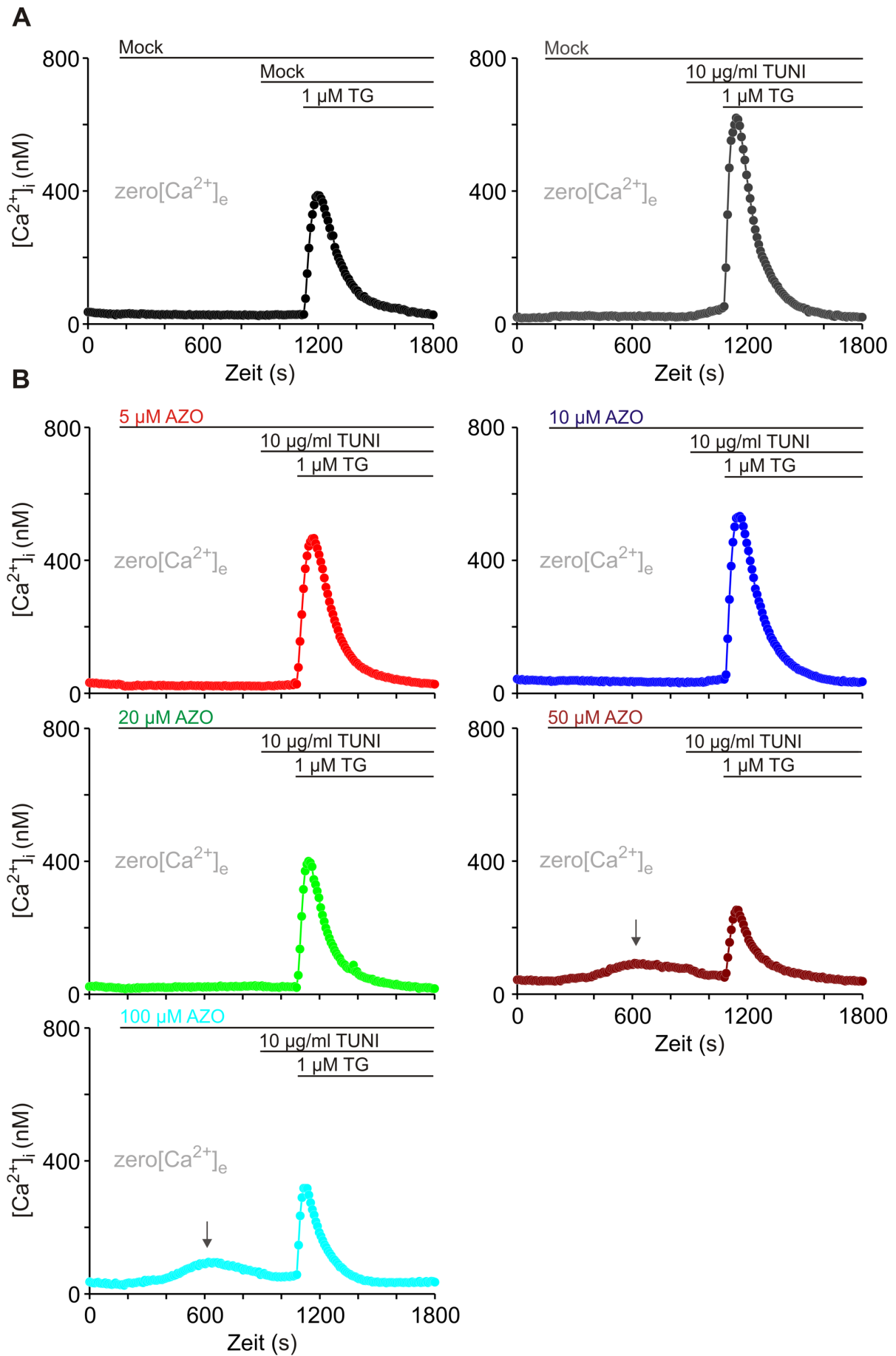


Abbildung 4.15: Effekt von AZO auf die Ca^{2+} -Homöostase während TUNI-induziertem ER-Stress.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 μM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA ($\text{ZCa} = \text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_i$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit ZCa gewaschen sowie innerhalb des Strahlengangs des Visitron-Mikroskops positioniert. **(A)** 3 min nach Beginn der Messung wurde ZCa (Mock) hinzugegeben und für 12 min inkubiert. Dann wurde Entweder 0,1% DMSO in ZCa (Mock + Mock, linker Graph) oder 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI (Mock + TUNI, rechter Graph) hinzugegeben und für 3 min inkubiert. Anschließend wurde 1 μM Thapsigargin (TG) appliziert und für weitere 15 min gemessen. **(B)** Nach 3 min wurde entweder 5 μM (rot), 10 μM (blau), 20 μM (grün), 50 μM (braun) oder 100 μM (türkis) Azoramide (AZO) hinzugegeben und für 6 min inkubiert. Dann wurde 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI hinzugegeben und für 3 min inkubiert. Anschließend wurde 1 μM TG hinzugeben und für weitere 15 min gemessen. Dargestellt sind exemplarische Graphen. Der graue Pfeil weist auf einen Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hin. Die Versuche wurden an 2 Tagen mit 1 gepaartem Versuch durchgeführt (Versuchszahl: 5 μM = 2; 10 μM = 2; 20 μM = 3; 50 μM = 1; 100 μM = 1; Mock + Mock = 2; Mock + Tuni = 3). Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM.

Auch hier blieb der ΔI Wert bei den Kontrollzellen und bis zu einer AZO-Konzentration von 10 μM mit einer basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter 10 nM. Bei Konzentrationen von 20-100 μM AZO lag dieser Wert bei 13-70 nM. Die genauen Werte können aus Tabelle 4.9 entnommen werden und sind in Abbildung 4.16 B graphisch dargestellt.

Tabelle 4.9: ΔI -Werte der Versuche aus Abbildung 4.15 A.

Versuch	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration in nM
Mock [ZCa] + Mock [ZCa]	8,89 \pm 0,59
Mock [ZCa] + 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI	7,38 \pm 0,83
5 μM AZO + 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI	3,55 \pm 0,77
10 μM AZO + 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI	4,74 \pm 0,52
20 μM AZO + 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI	13,47 \pm 1,35
50 μM AZO + 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI	59,96 \pm 2,86
100 μM AZO + 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI	70,82 \pm 5,71

Die TG-Antwort lag bei Kontrollzellen bei \sim 450 nM, wobei TUNI eine Vergrößerung des Ca^{2+} -Lecks auf 600 nM verursachte. Mit zunehmender AZO-Konzentration nahm dieser Wert ab und erreichte den niedrigsten Wert bei 210 nM mit einer AZO-Konzentration von 50 μM . Die genauen Werte können aus Tabelle 4.10 entnommen werden und sind in Abbildung 4.16 C graphisch dargestellt.

Tabelle 4.10: $\Delta 2$ -Werte der Versuche aus Abbildung 4.15 B.

Versuch	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration in nM
Mock [ZCa] + Mock [ZCa]	451,50 ± 07,00
Mock [ZCa] + 10µg/ml TUNI	601,91 ± 16,12
5 µM AZO + 10µg/ml TUNI	451,50 ± 7,001
10 µM AZO + 10µg/ml TUNI	463,29 ± 19,84
20 µM AZO + 10µg/ml TUNI	397,09 ± 12,73
50 µM AZO + 10µg/ml TUNI	210,00 ± 15,39
100 µM AZO + 10µg/ml TUNI	272,43 ± 21,80

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der AZO Effekt auf den verstärkten Ca^{2+} -Leck während pharmakologisch-induziertem ER-Stress konzentrationsabhängig ist. Bei AZO Konzentrationen gleich oder unter 20 µM wird den Ca^{2+} -Leck über die ER-Membran nach TUNI Gabe reduziert. Wie auch bei der ersten Experimentreihe zu AZO (TG, ohne TUNI Behandlung) kam es ab Konzentrationen von AZO ≥ 20 µM einer Erhöhung des basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Nach Gabe von TUNI kommt es zu einer größeren Senkung des Ca^{2+} -Lecks. Für uns sprechen diese Ergebnisse, genauso wie die Ergebnisse von 4-PBA, für einen starken Nachweis, dass AZO ebenfalls als neuartige Klasse von Chaperonen die Fähigkeit besitzt, durch eine sofortige Wirkung ER-Stress abzumildern.

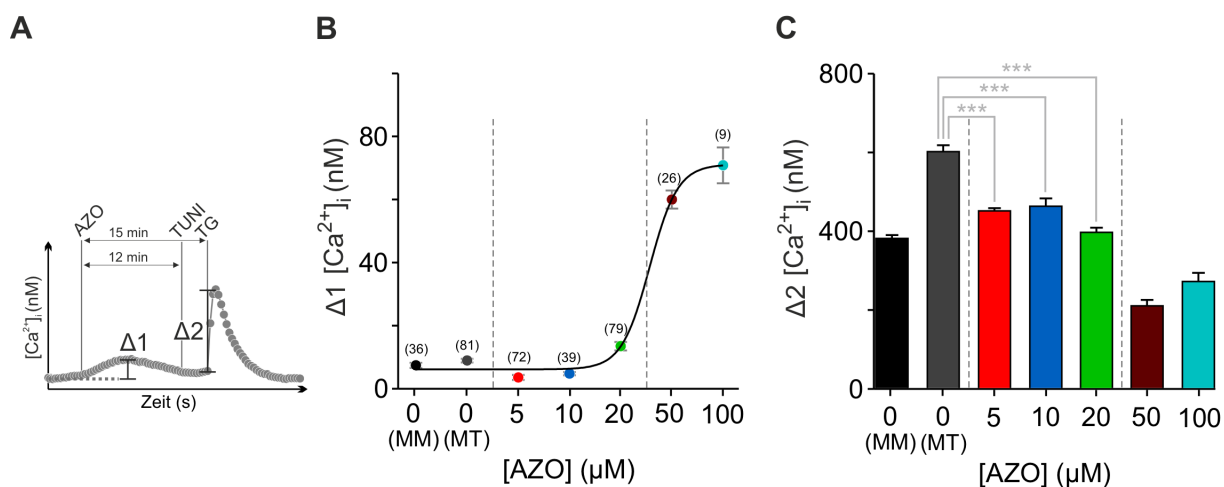


Abbildung 4.16: Statistik der in Abbildung 4.15 gezeigten Graphen.

24 h nach Ausplattieren (Kapitel 3.5.3) wurden HEK-293 Zellen mit 4 µM Fura-2-AM in 0,5 mM EGTA (ZCa = zero $[\text{Ca}^{2+}]_e$) für 20 min bei RT beladen. Anschließend wurde das Deckglas in die Messkammer eingespannt,

Ergebnisse

zweimal mit ZCa gewaschen und in den Strahlengang des Visitron-Mikroskops eingefügt. **(A)** Definition von $\Delta 1$ und $\Delta 2$. Folglich wird $\Delta 1$ im Folgenden als erstmalige Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Gabe von AZO bis zur TG-Gabe gewertet. $\Delta 2$ entspricht der $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung ab TG-Gabe bis zum Erreichen der maximalen $[Ca^{2+}]_i$. **(B)** Gezeigt ist $\Delta 1$ nach Gabe von AZO bis zur TG-Gabe. Die Messpunkte wurde mittels einer sigmoidale Kurve verbunden, was einer Dosiswirkungskurve für AZO entspricht. **(C)** Gezeigt ist $\Delta 2$ als Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ ab TG-Gabe bis zum Erreichen der maximalen $[Ca^{2+}]_i$. Die Versuche wurden an 1 Tag mit 2 gepaarten Versuchen durchgeführt Versuchsanzahl: 5 μM = 2; 10 μM = 2; 20 μM = 3; 50 μM = 1; 100 μM = 1; Mock + Mock = 2 [MM]; Mock + TUNI = 3 [MT]). Die Anzahl der analysierten Zellen sind in Abbildung B oberhalb der Messpunkte von $\Delta 1$ in Klammern angegeben. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert \pm SEM. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der KS-Test herangezogen und die Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ (***)

5. Diskussion

Das ER stellt in der eukaryotischen Zelle den Hauptcalciumspeicher dar. Ca^{2+} nimmt als sekundärer Botenstoff diverse Funktionen ein, von Zellwachstum bis hin zu Apoptose (siehe Kapitel 2.4). Die Hauptfunktion des ER-membranständigen Sec61-Komplexes ist der Transport von naszierenden Proteinen in das ER-Lumen, wo diese gefaltet und modifiziert werden (siehe Kapitel 2.2.1). Darüber hinaus fungiert der Sec61-Komplex auch als Ca^{2+} -Leckkanal, der gezielt durch das zytosolische CaM und das luminale Chaperon BiP reguliert wird (siehe Kapitel 2.4.2.1).

BiP besitzt mehrere Funktionen wie Unterstützung beim Transport naszierender Polypeptidkette in das ER-Lumen, Inaktivierung der UPR, aber auch Erhöhung der Faltungskapazität während einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine (siehe Kapitel 2.2.1, 2.6.3 und 2.3.1). Letzteres hat zur Folge, dass der Sec61 α -induzierte Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER erhöht ist (siehe Kapitel 4.2.1).

Neben BiP gibt es weitere endogene Chaperone, die an Proteintransport, -faltung und -modifikation beteiligt sind. Es sind mehrere chemische Chaperone bekannt, die ER-Stress senken und die Proteinfaltung erhöhen können (siehe Kapitel 2.7). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die chemischen Chaperone 4-PBA, dessen aktiver Metabolit PAA und AZO das Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Leck im ER modulieren. Darüber hinaus sollte überprüft werden, inwieweit sich die Effekte auch unter ER-Stress befindliche Zellen reproduzieren lassen.

5.1. Zeit- und Dosisabhängige Effekte von 4-PBA auf Ca^{2+} -Homöostase

Neben einer epigenetischen Wirkung von chemischen Chaperonen geht man davon aus, dass chemische Chaperone wie 4-PBA direkten Wirkungen auf den Zellmetabolismus ausüben (siehe Kapitel 2.1). Chemische Chaperone haben eine direkte stabilisierende Wirkung auf fehlerhafte oder fehlgefaltete Proteine und beeinflussen die Aktivität endogener Chaperone positiv (siehe Kapitel 2.7). Um den Effekt auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase zu untersuchen, wurde der zytosolische Ca^{2+} -Indikator Fura-2 verwendet (siehe Kapitel 3.6.2). Die HEK-293 wurden mit Fura-2 beladen und während der Messung für 12 min mit 4-PBA inkubiert. Durch die kurze Inkubationsdauer sind die beobachteten Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase in dieser

Untersuchung wahrscheinlich durch direkte Mechanismen und nicht durch die Änderung der Genexpression von z.B. UPR-Genen (siehe Kapitel 2.7.2.) zu erklären.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass eine 12-minütige Inkubation mit 5 mM 4-PBA zu einer signifikanten Reduktion des Ca^{2+} -Lecks und des zellulären Ca^{2+} -Gehalts führt (Abb. 4.1 und 4.2). Dieser Effekt zeigte in weiteren Versuchen eine Dosisabhängigkeit, wobei mit steigender 4-PBA Konzentration weniger Ca^{2+} -Leck beobachtet wurde (Abb. 4.4 A-B).

Nach höheren Gaben von 4-PBA (10 mM) kam es zu einer vorzeitigen, zytosolischen Ca^{2+} -Zunahme (Abb. 4.4 A). Dies erklärt sich am ehesten durch ein initial erhöhtes Ca^{2+} -Leck, ähnlich der Zunahme der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TFP-behandelten HeLa Zellen (Erdmann et al, 2009). Alternativ könnten hohe Mengen von 4-PBA jedoch auch über einen noch unbekanntem Mechanismus zu einem Anstieg von Ca^{2+} aus anderen Speichern (Zellorganellen, calciumbindender Proteine) oder Interaktion mit Ca^{2+} -Ionenkanälen führen (siehe Kapitel 2.4). Wurde die Inkubationszeit von 4-PBA von 12 auf 30 min erhöht, hatte dies im Vergleich einen reduzierten Effekt auf das Ca^{2+} -Leck und einen geringen basalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Folge (Abb. 4.3). Letzteres könnte auf eine verstärkte Aktivität der SERCA zurückzuführen sein (Fu et al., 2015).

Der Effekt von 4-PBA auf das Ca^{2+} -Leck könnten sich durch einen Ca^{2+} -Verlust aus dem ER erklären, wodurch sich folglich der TG-induzierte Ca^{2+} -Ausstrom ebenfalls verringert. Auf Grund dessen wurde der Versuch mit dem Ca^{2+} -Ionophor IONO angeschlossen, um die durch 4-PBA induzierten Änderung des gesamten Ca^{2+} -Gehaltes der Zelle zu untersuchen (Abb. 4.2). Da der Ca^{2+} -Gehalt nach Inkubation mit 4-PBA deutlich verringert war, ist dieser Erklärungsansatz durchaus eine wahrscheinliche Theorie, die weiter untersucht werden sollte. Andere Erklärungsansätze könnte sein, dass bei gleichbleibendem $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ das Ca^{2+} -Leck über die ER-Membran durch 4-PBA limitiert wird. Alternativ könnte die Inkubation mit 4-PBA natürlich auch zu nicht spezifischen Effekten auf den gesamten Zellmetabolismus führen.

Im Folgenden Kapitel wird nun als Erklärungsansatz näher auf die ersten beiden Möglichkeiten eingegangen.

5.2. Hypothesen zu den Wirkmechanismen von 4-PBA

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte von 4-PBA lassen zwei mögliche Wirkmechanismen von Chaperonen auf die Ca^{2+} -Homöostase im ER vermuten: Zum einen die exklusive Senkung des Ca^{2+} -Lecks, zum anderen die Depletion von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$.

Hypothese I: Exklusive Senkung des Ca^{2+} -Lecks

In diesem Erklärungsansatz baut auf der Beobachtung auf, dass es nach Zugabe von 1 mM 4-PBA bis zur Gabe von TG zu keiner nennenswerten Ca^{2+} -Konzentrationsänderung des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ kommt (Abb. 5.1 C). Nach Gabe von TG kommt es im Vergleich zur Kontrolle zu einem verringertem Ca^{2+} -Leck aus dem ER.

Erklären ließe sich diese Beobachtung damit, dass durch die Bindung von BiP an den Sec61-Komplex der Ca^{2+} -Leck über die ER-Membran limitiert wird (Schäuble et al., 2012). 4-PBA würde in der Folge Teilfunktionen von BiP übernehmen und BiP über diesen Mechanismus entlasten, wodurch der Efflux verringert ausfallen würde. Auf diese Weise würde 4-PBA als Faltungshilfsprotein an Stelle von BiP die vermehrt anfallenden fehlgefalteten Proteine in ihre korrekten Faltungsstrukturen überführen. Dadurch würde im ER-Lumen mehr BiP für den Verschluss der Sec61 α -Untereinheit zur Verfügung stehen, vermehrt an dieser gebunden bleiben und durch den Verschluss der Pore den passiven Ca^{2+} -Leck, insbesondere bei ER-Stress, entgegenwirken. Somit würde bei konstanter $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ (Abb. 5.1 A) ein langsamerer bzw. erniedrigter Ca^{2+} -Leck zustande kommen (Abb. 5.1 C) und ferner den verminderten Ca^{2+} -Leckstrom während des TG-induzierten ER-Stress erklären.

Für diesen Ansatz spricht auch die Arbeit von Mimori et al. (2013). Im Rahmen dieser wurde untersucht, ob der Schutz vor neuronalen Zelltod vermehrt auf den HDAC-inhibitorischen Effekt von 4-PBA oder vielmehr auf dessen Funktion als chemisches Chaperon zurückzuführen wäre. Die Untersuchung führte zu dem Ergebnis, dass der Schutz der humanen neuroblastom Zellen (SH-SY5Y) vor Apoptose, auf die Proteinfaltungskapazität von 4-PBA und die konsekutive Erniedrigung des ER-Stresses auf die Zellen zurückzuführen sei (Mimori et al., 2013).

Auf der anderen Seite könnte aber auch angenommen werden, dass 4-PBA als direkter Interaktionspartner mit dem Sec61-Komplex in Frage kommt. Über diese Möglichkeit jedoch liegen bislang keine Erkenntnisse vor.

Wahrscheinlich ist aber in beiden Fällen, dass 4-PBA, wie in der Literatur vielfach vermutet, als Chaperon einen sofortigen Effekt auf Proteine innerhalb der Zelle entfaltet. Diese Vermutung wird durch die Untersuchungen von Gault et al. (2018) gestützt, in denen mittels Massenspektrometer der direkte Effekt von TMAO (siehe Kapitel 2.7) auf Proteine untersucht wurde. Hier zeigte sich, nach Zugabe des chemischen Chaperon TMAO, eine direkte Interaktion von TMAO mit Proteinen und deren Schutz vor Denaturierung in harnstoffhaltigem Milieu (Gault et al., 2018). Auch die Arbeiten von Liao et al. (2017) und Cho et al. (2011), beschreiben eine direkte Interaktion und stabilisierenden Effekt von TMAO auf Proteine (siehe Cho et al., 2011; Liao et al., 2017).

Es ist in der Folge notwendig, der dargelegten Hypothese durch weiterführende Untersuchungen nachzugehen, um, im Falle einer Verifikation derselben, ein genaueres Verständnis der direkten Wirkung von 4-PBA zu erlangen.

Ein denkbarer Ansatz wäre es dabei, die der vorliegenden Untersuchung zugrundeliegende experimentelle Reihe nach Depletion durch siRNA der Proteine Sec61 α , BiP und Calreticulin erneut durchzuführen, sowie direkt die $[Ca^{2+}]_{ER}$ zu messen (Gamayun et al., 2019).

Eine Ergänzung bestünde darin, durch eine Depletion von Sec61 α und eine darauffolgende Transfektion mit einer Sec61 α -Mutante, bei der die Bindestelle für BiP mutiert ist (Y344H), für die weiterführenden Experimente zu verwenden (Schäuble et al., 2012). So könnte eruiert werden, ob diese Bindestelle auch von 4-PBA genutzt wird.

Hypothese II: Depletion von $[Ca^{2+}]_{ER}$

In der zweiten Hypothese wird davon ausgegangen, dass es sofort nach Zugabe von 4-PBA zu einer Abnahme der $[Ca^{2+}]_{ER}$ (Abb. 5.1 B) kommt, wodurch folglich die TG-Antwort niedriger ausfallen würde (Abb. 5.1 C). Dies ist bei 4-PBA Konzentrationen höher als 5 mM beobachtet worden.

Diese Hypothese wird durch die Experimente 4.1.2 untermauert, bei denen gezeigt werden konnte, dass in 4-PBA-behandelten Zellen der zelluläre Ca^{2+} -Gehalt um 50% reduziert war (Abb. 4.2). Mögliche Mechanismen könnten sein, dass 4-PBA durch eine (1) direkte Bindung mit freiem Ca^{2+} oder durch eine (2) anderweitige Induktion und Verwendung von Ca^{2+} dazu führen, dass die $[Ca^{2+}]_{ER}$ sinkt oder (3) ein nicht spezifischer Effekt auf den Zellmetabolismus zu einer Verringerung des Ca^{2+} -Gehalts führt. Neben BiP gibt es auch noch weitere Chaperone und Faltungsenzyme im ER, wie beispielsweise CRT und seine membrangebundenen

Äquivalenten CNX, GRP94, und PDI/Calcistorin, ERp72. Sie sind, genau wie BiP, in der Lage, Ca^{2+} zu puffern und so die ER-abhängige Ca^{2+} -Homöostase der Zelle zu beeinflussen. Während BiP bis zu 25% vom $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ bindet, übernimmt die Ca^{2+} bindende C-Domäne von CLR die Hälfte der Ca^{2+} -Bindungskapazität des ER (siehe Kapitel 2.4.3). Arnaudeau et al. zeigten 2002, dass sich diese Kapazität signifikant mit einer erhöhten Expression von CLR erhöhen ließ. Allerdings überleben CLR-depletierte Zellen nicht, was dessen Stellenwert in der Ca^{2+} -Homöostase verdeutlicht (Arnaudeau et al., 2002; Coe und Michalak, 2009; Michalak et al., 2009; Nakamura et al., 2001).

4-PBA gilt als chemisches Chaperon der Unterklasse der hydrophoben Chaperone, die universell an hydrophobe Segmente aller fehlerhaften oder missgefalteten Proteine binden, diese in die Zielstruktur überführen und ihre Aggregation verhindern (Kong et al., 2017). Das wiederum würde bedeuten, dass 4-PBA nicht nur BiP bei der Proteinfaltung entlasten würde, sondern auch die oben genannten Chaperone und Faltungsenzyme. Diese könnten in der Folge in freier Form verstärkt für die Ca^{2+} -Bindung zur Verfügung stehen und damit sowohl bei TG- als auch IONO-Applikation, zu einem verminderten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ führen. Zudem muss auch berücksichtigt werden, dass eine erfolgreiche Proteinfaltung von der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ abhängig ist (siehe Kapitel 2.4.3). Somit wird freies Ca^{2+} bei verstärkter Faltungsaktivität im ER auch zunehmend verwendet und würde im Zytosol dann von Fura-2 abnehmend detektiert werden (Milles et al., 2018; Reid et al., 1981).

Für die Abklärung der zwei Hypothesen wäre eine anknüpfende Untersuchung mittels FRET-Messung denkbar. Diese ermöglicht, neben Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Fura-2, auch die gleichzeitige Ermittlung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ durch einen spezifischen Ca^{2+} -Sensor wie z.B. D1ER (Gamayun et al, 2019). Die damit erzielten Ergebnisse könnten weitere Klarheit über die Herkunft des zytosolischen Ca^{2+} nach Applikation chemischer Chaperone, und eine weitere Einsicht über deren Wirkweise im ER und der Zelle eröffnen. Des Weiteren könnten, auf diese Weise, unter Umständen auch weitere Rückschlüsse in Bezug auf den vorzeitigen Ca^{2+} -Efflux bei höheren 4-PBA Dosierungen (≥ 10 mM) gezogen werden (Abb. 4.4 D [Pfeil]). Da die Fura-2 Messungen den zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel wiedergeben, wäre ein Anstieg desselben auch dann möglich, wenn das ER einzelner Zellen in einen defekten Zustand übergeht oder andere Membrankanäle beeinflusst wären: Dann würde Ca^{2+} entsprechend des Konzentrationsgefälles in das Zytosol diffundieren bis entweder der Defekt in der Membran behoben und/oder Kompensationsmechanismen das Ca^{2+} zurück in die Ca^{2+} -Speicher (ER und Mitochondrien) oder in den Extrazellularraum transportiert hätten. Ein solcher Effekt für 4-PBA ist jedoch noch nicht beschrieben.

Während der Untersuchungen von Kubota et al. aus dem Jahre 2006 zeigte sich, dass 4-PBA im Rahmen einer 24 h Inkubation zusammen mit dem ER-Stressor TUNI einen protektiven Effekt auf die ER-Stress-induzierte Apoptose der humanen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC ausübt (Kubota et al., 2006). Dort zeigte sich das Wirkmaximum bei 5 mM 4-PBA, wobei bei 10 mM 4-PBA über einen erhöhten toxischen Effekt berichtet wurde. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde in Experimenten ein spezifischer Effekt ab einer Konzentration von 10 mM 4-PBA (Abb. 4.4 D [Pfeil]) beobachtet, was ein möglicher Erklärungsansatz für die berichteten Ergebnisse mit toxischem Effekt auf die verwendeten Zellen von Kubota et al. sein könnte und weiter untersucht werden sollte. In deren Arbeit konnte außerdem ein dosisabhängiger Effekt detektiert werden. Eine dosisabhängige Verringerungen des ER-Stresses durch 4-PBA wurde *in vitro* in Chondrozyten festgestellt (Rellmann et al., 2019). So konnte mittels Immunoblot-Analysen gezeigt werden, dass 4-PBA dosisabhängig zu einer signifikanten Senkung der ER-Stress Indikatoren BiP, CHOP, IRE1 und XBP1s führte. Vor allem die Reduktion von BiP könnte ebenfalls ein Erklärungsansatz für den initialen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei höheren 4-PBA Konzentrationen sein (Abb. 4.4 D [Pfeil]).

Zu hinterfragen ist, wieso 4-PBA bei einer Inkubationszeit von 30 min (siehe Abb. 4.3) gegenüber 12 min (siehe Abb. 4.1.) einen geringeren Einfluss auf den Ca^{2+} -Efflux zeigte. Hier müssten weitere Experimente angeschlossen werden, um diesen Sachverhalt zu klären. Da bei 30-minütiger Inkubationszeit noch von keiner 4-PBA bedingten Änderung der Genexpression auszugehen ist, muss untersucht werden, ob 4-PBA in diesem Zeitraum direkt mit anderen Proteinen interagiert oder reagiert und somit möglicherweise vermindert zur Verfügung steht. Es ist nicht auszuschließen, dass 4-PBA ebenfalls Einfluss auf die in Kapitel 2.3 beschriebenen Ca^{2+} -bindenden Proteine ausüben könnte. Das würde auch bedeuten, dass 4-PBA somit möglicherweise nicht nur einen spezifischen Einfluss auf BiP, den Sec61-Komplex und den Ca^{2+} -Leck haben könnte, sondern darüber hinaus einen nicht spezifischen Einfluss auf den gesamten Zellmetabolismus.

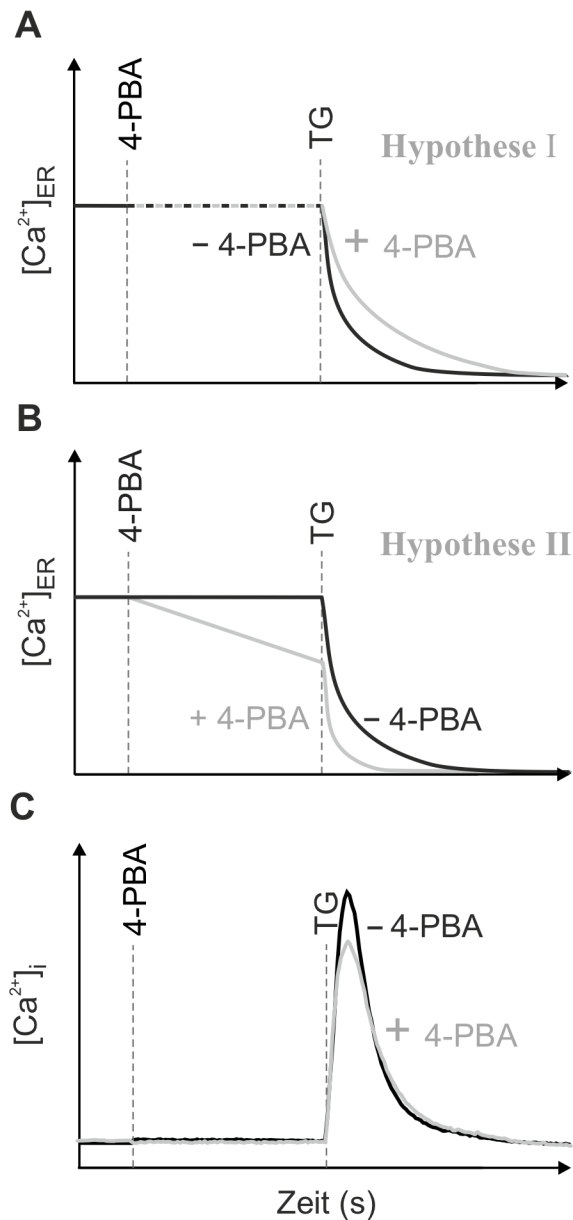


Abbildung 5.1: Hypothesen der 4-PBA Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_{ER}$.

Die gestrichelten Linien zeigen den Zeitpunkt der Gabe von 4-PBA und TG. **(A)** Hypothese I – Exklusive Senkung des $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Lecks: Zeitverlauf des $[Ca^{2+}]_{ER}$ unter der Annahme, dass das $[Ca^{2+}]_{ER}$ nicht von 4-PBA beeinflusst wird. **(B)** Hypothese II – Depletion von $[Ca^{2+}]_{ER}$: Zeitverlauf des $[Ca^{2+}]_{ER}$ bei einer stetigen Senkung des $[Ca^{2+}]_{ER}$ durch Vorbehandlung mit 4-PBA. **(C)** Zeitverlauf der $[Ca^{2+}]_i$: Die Behandlung mit 4-PBA führt zu einem verminderten Ca^{2+} -Leck. Die Kontrolle ist jeweils in schwarz (- 4-PBA) und die Vorbehandlung mit 4-PBA in grau (+ 4-PBA) dargestellt.

5.3. Wechselwirkung von 4-PBA mit Stress-Induktoren

Es konnte bereits in BiP-depletierten HeLa-Zellen gezeigt werden, dass unter ER-Stress das Sec61 α -vermittelte Ca²⁺-Leck über die ER-Membran signifikant erhöht ist (Schäuble et al., 2012). Des Weiteren wurde unter Verwendung der beiden ER-Stress-Induktoren TUNI und DTT beobachtet, dass BiP von Sec61 α sequestriert wird, um der Akkumulation fehlgefalteter Proteine entgegenzuwirken, wobei in BiP-depletierten Zellen jedoch weder TUNI noch DTT einen Effekt zeigten. Da 4-PBA als chemisches Chaperon ER-Stress verringern kann (Kolb et al., 2015), sollte untersucht werden, ob durch 4-PBA das Ca²⁺-Leck während pharmakologisch-induziertem ER-Stress beeinflusst wird. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit mit TUNI konnte gezeigt werden, dass eine 3-minütige Inkubation mit TUNI den durch TG demaskierten Ca²⁺-Efflux um 17% steigerte (Abb. 4.7 D). Wurden die Zellen zusätzlich für 12 min mit 4-PBA inkubiert, konnte derselbe Efflux um fast 25% verringert und damit sogar unter das Niveau der Kontrolle gesenkt werden (Abb. 4.7 D). Da die Ergebnisse bei der Verwendung von DTT nicht vergleichbar mit denen aus der Arbeit von Schäuble et al. (2012) sind, lässt sich vermuten, dass hier ein zelltypspezifischer Effekt vorliegt.

Da bis dahin ein protektiver Effekt von 4-PBA auf ER-Stress beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, ob 4-PBA auch bei einem anderen zu ER-Stress führenden Wirkmechanismus ähnliche Effekte erzielen kann. Daher wurde entsprechend der Versuche von Erdmann et al. (2011) eine Versuchsreihe mit dem CaM-Inhibitor TFP durchgeführt. Als solcher wird der Verschluss von Sec61 α durch CaM verhindert und dadurch der, durch TG demaskierte, Ca²⁺-Leck durch Sec61 α (Erdmann et al., 2011) erhöht. Die Versuche in der vorliegenden Untersuchung konnten zeigen, dass eine Behandlung mit TFP den Ca²⁺-Leck signifikant erhöht. Dieser war jedoch nach Vorinkubation mit 4-PBA erniedrigt (Abb. 4.9).

Die Ergebnisse der Versuche mit 4-PBA in Verbindung mit TUNI bzw. TFP zeigen klar eine Beteiligung von 4-PBA während ER-Stress und dem damit einhergehenden Ca²⁺-Leck. In beiden Experimentreihen zeigte sich eine signifikante Abnahme des Ca²⁺-Efflux nach TG-Gabe. Durch die Online-Inkubation und kurze Inkubationsdauer von 4-PBA besteht die Hypothese, dass dieses als chemisches Chaperon über eine direkte Wirkung den ER-Stress senkt. Jedoch besteht auch hier die Möglichkeit, dass 4-PBA eine direkte Wirkung auf die [Ca²⁺]_{ER} ausübt, was – wie oben erwähnt – durch Verwendung eines Ca²⁺-Indikators, welcher spezifisch die [Ca²⁺] im ER misst, untersucht werden könnte.

Da für die im Rahmen der Untersuchung durchgeführten Experimente das Prinzip der Online-Inkubation gewählt wurde, ist von keiner Modulierung der Genexpression durch PAA

auszugehen. Daher sollten hier, ähnlich wie bei der 30 min Inkubation mit 4-PBA (siehe Abb. 4.3), zur besseren Vergleichbarkeit der Effekte, weiterführende Experimente, mit einer 30 min Inkubationszeit von PAA, angeschlossen werden.

5.4. Wechselwirkung des aktiven 4-PBA-Metaboliten PAA auf die Ca^{2+} -Homöostase

Der Lebermetabolismus führt unter physiologischen Bedingungen dazu, dass 4-PBA in den aktiven Metaboliten PAA, die konjugierte Base von Phenylacetate, verstoffwechselt wird. Dieser aktive Metabolit weist ebenfalls Eigenschaften als Histon-Deacetylase-Inhibitor auf. Weil dieser Lebermetabolismus in der Zellkultur fehlt, sollten die direkten Eigenschaften von PAA auf die Ca^{2+} -Homöostase analog zu den ersten Versuchen mit 4-PBA untersucht werden. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass PAA bei 18-minütiger Inkubation zu einer starken, signifikanten Senkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt. Da bei 18 min Inkubation von keiner PAA induzierten, epigenetischen Änderung des Proteoms im ER auszugehen ist, kann der Effekt als ein direkter Einfluss von PAA auf die Ca^{2+} -Homöostase interpretiert werden. Da PAA ebenfalls eine Chaperon-ähnliche Wirkung zugesprochen wird, sprechen die Ergebnisse ebenfalls für diese Feststellung.

Die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse sollten in weiteren Studien reproduziert, der Versuchsablauf angepasst und hinsichtlich weiterer Effekte untersucht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob PAA und 4-PBA einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen

5.5. Modifikation der Ca²⁺-Homöostase durch Azoramide (AZO)

Analog zu 4-PBA unterstützt das chemische Chaperon AZO ebenfalls die Proteinfaltung und inhibiert eine Aktivierung der UPR (siehe Kapitel 2.7.3). Daher sollte dessen Effekt auf die Ca²⁺-Homöostase in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Die Experimente dieser Untersuchung zeigten, dass AZO, ähnlich wie 4-PBA, eine signifikante Reduzierung des Ca²⁺-Lecks verursacht. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt dosisabhängig ist (Abb. 5.13 - 5.14). Ferner ließ sich mit zunehmender Konzentration von AZO eine vorzeitige, zytosolische Ca²⁺-Zunahme beobachten, die wiederum selber dosisabhängig zunahm (Abb. 4.15). Hier zeigte sich durch die 12-minütige Inkubation mit AZO einer Verringerung des durch TG demaskierten Ca²⁺-Lecks um 18%. Bei den Konzentrationen von 5 µM und 50 µM zeigte sich während der Experimente ein unerwartet stark ausfallendes Ca²⁺-Leck. Bei 50 µM fiel dieses, wie auch zu erwarten gewesen war, unter den Kontrollwert. Im Verhältnis zu 10, 20 und 100 µM AZO fiel es allerdings ebenfalls deutlich höher aus. Es wäre an dieser Stelle vielmehr zu erwarten gewesen, dass sich das Ca²⁺-Leck entsprechend der illustrierten Dosiswirkungskurve in Abbildung 4.14 C (Kapitel 4.4.1) verhalten würde – und somit eher dem Ca²⁺-Leck-Verlauf der Experimente von AZO + TUNI in Abbildung 4.16 C (Kapitel 4.4.2) folgend. Grundsätzlich sollte die Versuchsreihe mit einer höheren Anzahl an Zellen noch einmal wiederholt werden, um einen eindeutigen Kurvenverlauf zu prüfen. Zusammenfassend lässt sich jedoch die Tendenz einer Dosiswirkungskurve beobachten.

Fu et al. (2015) haben erstmalig AZO als chemisches Chaperon untersucht. Sie konnten durch eine vorherige Behandlung mit 20 µM AZO und anschließender Induktion von ER-Stress mittels TG zeigen, dass dies zu einer verminderten Expression von Genen und Proteinen der UPR führte (Fu et al., 2015). Da ein hoher Verlust von Ca²⁺ im ER zu ER-Stress und Aktivierung der UPR führen kann (Mekahli et al., 2011), könnte der AZO-induzierte verminderte Ca²⁺-Leck in Verbindung mit den Ergebnissen von Fu et al. (2015) ein weiteres Indiz dafür sein, dass AZO den ER-Stress reduzieren kann.

5.6. Hypothese zu den Wirkmechanismen von AZO

Wie Abbildung 5.2 zu entnehmen sind zwei mögliche Wirkmechanismen von AZO bei low AZO (geringe Applikationsmenge von $\leq 10 \mu\text{M}$ AZO), sowie bei high AZO (hohe Applikationsmenge von $> 10 \mu\text{M}$ AZO), denkbar. Entweder entsprechend Hypothese III (Abb. 5.2 B), bei der es zu keiner Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ kommt, oder entsprechend Hypothese IV a + b (Abb. 5.2 C, E), bei der es zu unterschiedlichen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -Verlusten bei low und high AZO kommt. Wie auch bei 4-PBA kann sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor TG-Gabe erhöhen, was sich insbesondere bei hohen Konzentrationen von AZO zeigt, siehe high AZO (Abb. 5.2, E).

Bei low AZO kommt es nach Zugabe von AZO zu keinem Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wobei das TG-induzierte Ca^{2+} -Leck verringert ist (Abb. 5.2, A-B). Eine naheliegende Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass AZO, ähnlich wie 4-PBA, Teilfunktionen von BiP übernehmen könnte. Über diesen Mechanismus würde es die Proteinfaltung unterstützen, wodurch der Efflux verringert ausfallen würde (siehe Kapitel 5.2). In diesem Zusammenhang könnten Gemeinsamkeiten und/oder Unterschiede der chemischen Strukturen von AZO und BiP mögliche Hinweise auf deren Funktionsweise geben. Durch weitere Experimente sollten die direkten Interaktionen von 4-PBA und AZO mit anderen Proteinen näher untersucht werden, um ein genaueres Verständnis der direkten Wirkung der beiden Substanzen zu erlangen.

Hypothese IVa versucht die verminderte Ca^{2+} -Antwort aus dem ER anders zu interpretieren. Hier kommt es bereits mit Gabe von 4-PBA zu einer abnehmenden $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$. Dadurch würde die Gabe von TG folglich auch zu einem niedriger ausfallenden Ca^{2+} -Efflux führen. Beispielsweise könnte AZO durch eine direkte Bindung mit freiem Ca^{2+} oder durch eine anderweitige Induktion und Verwendung von Ca^{2+} dazu führen, dass die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ sinkt.

Hypothese IVb versucht den verminderten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER durch eine AZO-induzierte zytosolische Ca^{2+} -Erhöhung zu erklären. Hier könnte es, wie auch bei zu hohen Mengen von 4-PBA, bereits mit Gabe von AZO zu einer abnehmenden $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ kommen. Dies würde die nach AZO beginnende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung erklären (Abb. 5.2, D). Dadurch würde die Gabe von TG wie oben beschrieben ebenfalls zu einem niedriger ausfallenden Ca^{2+} -Efflux führen.

Da die Änderung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur bei hohen Konzentrationen von AZO ($\geq 10 \text{ mM}$) zu beobachten ist, liegt die Ursache hierfür wahrscheinlich in einer Beeinflussung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase und weniger an AZO selbst. Um den Ursprung dieses

Effekts und die generelle Beeinflussung der $[Ca^{2+}]_{ER}$ durch AZO zu klären, wären zukünftige Versuche mit einem Ca^{2+} -Indikator spezifisch für das ER sinnvoll. Im Folgenden werden mögliche Ursachen für den AZO-induzierten basalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ diskutiert.

Da die Funktion des ER auf eine stabile Ca^{2+} -Homöostase angewiesen ist, muss ein Gleichgewicht aufrechterhalten werden. Zur Einstellung dieses Gleichgewichts stehen zur Ca^{2+} -Aufnahme die SERCA und für den Ca^{2+} -Ausstrom mehrere Ca^{2+} -permeable Kanäle zur Verfügung (siehe Kapitel 2.4). Eine mögliche Ursache für den Anstieg der basalen $[Ca^{2+}]_i$ wäre eine Beeinflussung der ER-Membranintegrität durch AZO, sodass die Membran für Ca^{2+} durchlässig wird. Andererseits könnte AZO Ca^{2+} -permeable Kanäle positiv regulieren oder deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen.

Es wird in diesem Zusammenhang angenommen, dass CRT die IP_3 -Kanäle positiv regulieren kann (Arnaudeau et al., 2002). AZO könnte folglich als chemisches Chaperon CRT an dieser Stelle ablösen und somit zu einem Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER führen.

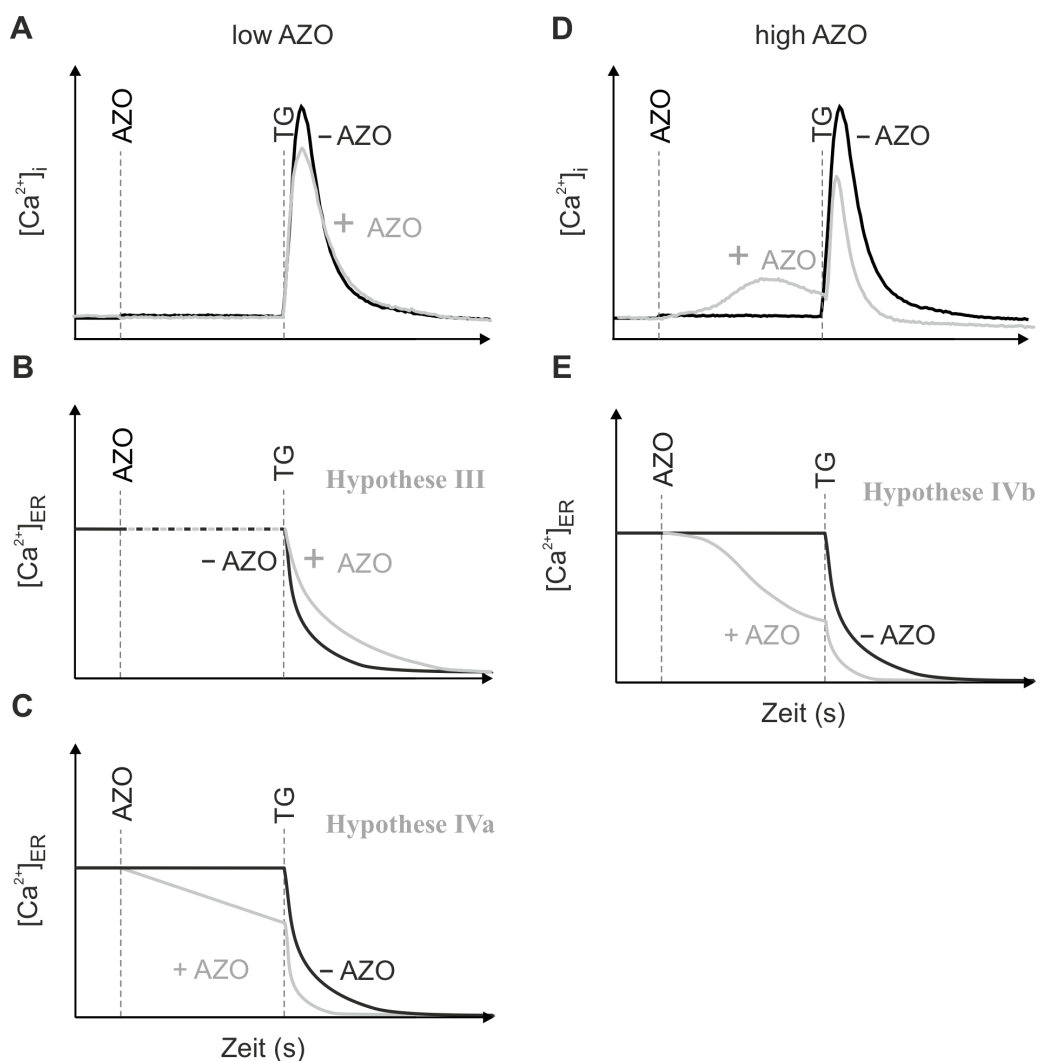


Abbildung 5.2: Hypothese der konzentrationsabhängigen AZO-Wirkung.

Die gestrichelten Linien zeigen den Zeitpunkt der Gabe von 4-PBA und TG. Die möglichen Hypothesen III und IVa zu einer geringen Konzentration von AZO (low AZO) sind in den Graphen A-C dargestellt und die mögliche Hypothese IVb zu einer hohen Konzentration von AZO (high AZO) ist in den Graphen D-F illustriert. **(A, D)** Zeitverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ bei low AZO und high AZO: Die Kontrolle (- AZO) in Schwarz dargestellt und nach Vorbehandlung mit low AZO (+ AZO) in grau illustriert. **(B)** Hypothese III – Exklusive Senkung des $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Lecks: Zeitverlauf des $[Ca^{2+}]_{ER}$ unter der Annahme, dass das $[Ca^{2+}]_{ER}$ nicht von AZO beeinflusst wird. **(C)** Hypothese IVa – Depletion von $[Ca^{2+}]_{ER}$: Zeitverlauf des $[Ca^{2+}]_{ER}$ bei einer stetigen Senkung des $[Ca^{2+}]_{ER}$ durch Vorbehandlung mit AZO. **(E)** Hypothese IVb – Depletion von $[Ca^{2+}]_{ER}$: Zeitverlauf des $[Ca^{2+}]_{ER}$ bei einer starken Senkung des $[Ca^{2+}]_{ER}$ durch Vorbehandlung mit high AZO.

5.7. Wechselwirkung von AZO mit Stress-Induktoren

Während die Experimente mit 4-PBA und dem etablierten ER-Stress-Induktor TUNI einen direkten Einfluss auf ER-Stress herausstellten, sollte dies ebenfalls mit AZO getestet werden. Fu et al. (2015) untersuchten *in vitro* den Effekt von AZO auf den durch TUNI induzierten ER-Stress. Hierbei kamen zwei spezielle Sekretions-Reportersysteme zur Detektion der Chaperon-Aktivität und -Kapazität innerhalb des ER der *human hepatoma cell line-7* (Huh-7)-Zellen zum Einsatz, der sogenannten ATF6 *luminal domain* (ATF6LD) *Cypridina noctiluca* luciferase (-Cluc) und der *Asialoglycoprotein receptor 1* (ASGR) *Cypridina noctiluca* luciferase (-Gluc). Es zeigte sich mit zunehmender Inkubationszeit von AZO eine steigende Hemmung der TUNI-induzierten-ATF6LD-Gluc-Sekretion. Dies ist als Hemmung der UPR Reaktion und ER-Stress und demzufolge als positiver Effekt von AZO auf ER-Stress zu werten. Das gleiche Ergebnis wurde bei der Detektion der ASGR-Gluc-Sekretion beobachtet. Selbst in mittels siRNA BiP-depletierten Zellen konnte dieser Effekt detektiert werden. Da die Wirkung von AZO auch bei gleichzeitiger Gabe mit TUNI gemessen werden konnte, stellt dies den dominanten Effekt von AZO bei der ER-Stressreduktion in den Vordergrund (Fu et al., 2015).

Da AZO den verstärkten TUNI-Effekt auf das Ca^{2+} -Leck inhibiert (Abb. 4.11), lässt sich vermuten, dass AZO auch den pharmakologisch-induzierten ER-Stress vermindert. Es lässt sich somit annehmen, dass AZO ähnliche Wirkweisen wie 4-PBA aufweist (siehe Kapitel 5.3).

5.8. Fazit

Chemische Chaperone wie TUDCA, 4-PBA und AZO sind vielversprechende Pharmaka, die bei verschiedenen Pathogenesen und Krankheiten (siehe Kapitel 2.7.2 und 2.7.3) einen positiven Nutzen mit sich bringen können. Dieser besteht darin, dass diese Substanzen als molekulare Chaperone die Proteinfaltung im ER unterstützt und dadurch ER-Stress der Zellen senken können. Darüber hinaus modulieren sie über eine erhöhte Expression molekularer Chaperone, die UPR und Ca^{2+} -Homöostase der Zelle und senken den ER-Stress, was wiederum einen protektiven Effekt für das Zellüberleben und -funktion darstellt.

Wenn auch der genaue Wirkmechanismus noch nicht geklärt ist, was auch nicht Ziel dieser Untersuchung war, so fungiert die vorliegende Arbeit doch als Beitrag zur Klärung der Frage, ob 4-PBA und AZO eine direkte Wirkung auf die Ca^{2+} -Homöostase des ER aufweisen.

Die gewonnenen Ergebnisse sprechen in diesem Zusammenhang durchaus dafür, dass sowohl 4-PBA als auch AZO die Funktion von BiP übernehmen, indem sie als chemische Chaperone fungierend, die Faltung der bei ER-Stress vermehrt auftretenden fehlgefalteten Proteinen kompensieren. Durch diese Eigenschaft steht BiP wiederum vermehrt zur Bindung an den Sec61-Komplex und dadurch herbeigeführter Hemmung des Ca^{2+} -Lecks über die ER-Membran zur Verfügung (Abb. 5.3).

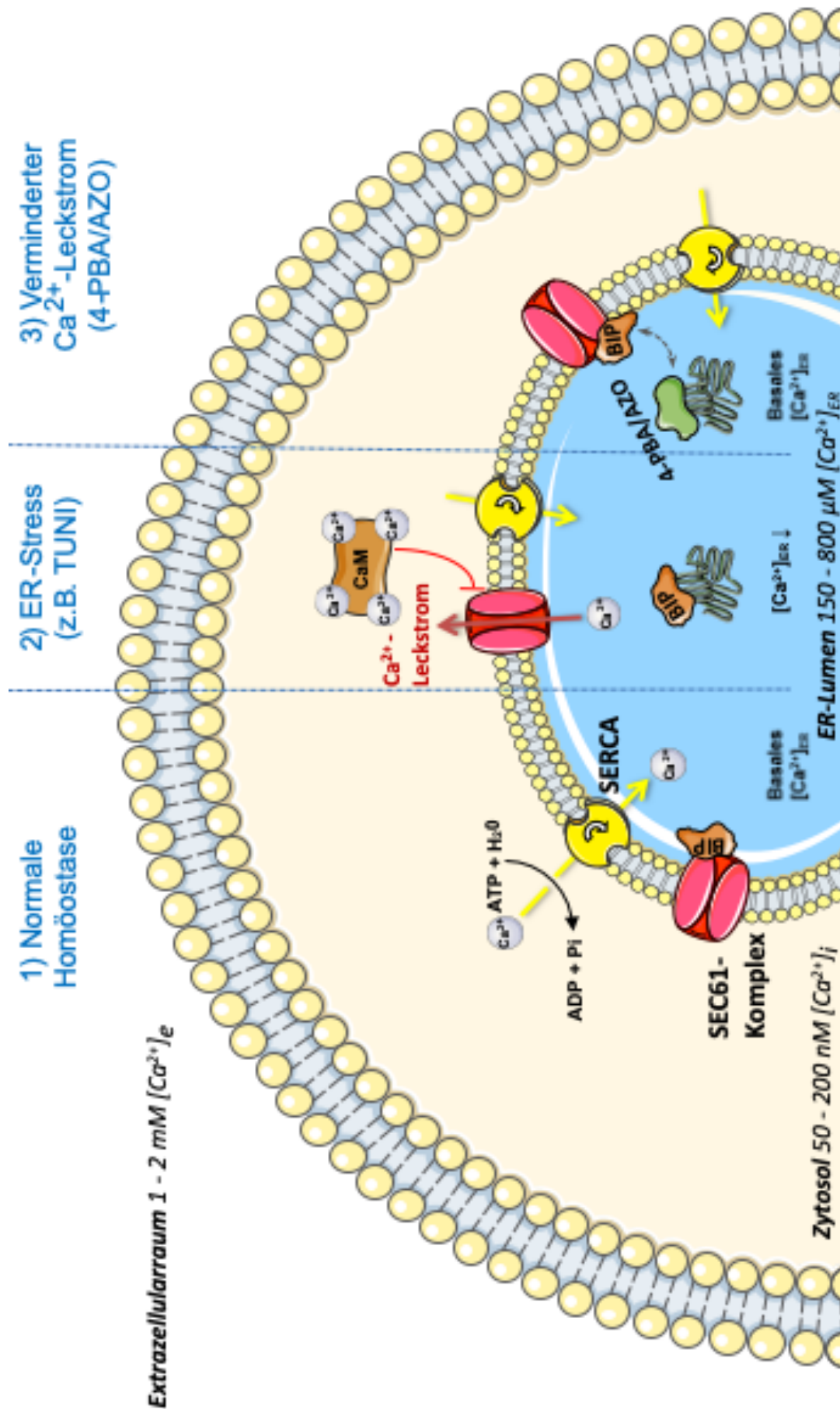


Abbildung 5.3: Hypothese der 4-PBA- und AZO-Wirkung auf BiP und das Ca²⁺-Leck über die ER-Membran.

1) Normale Ca^{2+} -Homöostase der Zelle. Der Sec61-Komplex (SEC61) ist durch die Bindung von BiP für Ca^{2+} nicht durchlässig. Die SERCA-ATPase (SERCA) hält entgegen des Konzentrationsgradienten unter Energieaufwand (ATP-Hydrolyse zu ADP + Pi) die Ca^{2+} -Homöostase aufrecht ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$). Calmodulin (CaM) liegt frei im Zytosol vor und hat kein Ca^{2+} gebunden. **2) Zelle mit ER-Stress (z.B. TUNI).** BiP hat sich von SEC61 entfernt und widmet sich der korrekten Faltung der durch Tunicamycin (TUNI) induzierten, fehlgefalteten Proteine. Durch Fehlen von BiP liegt SEC61 im offenen Zustand vor, wodurch Ca^{2+} ausströmen (Ca^{2+} -Leck) kann. Das Ca^{2+} -Leck wird durch ER-Stress begünstigt und führt zur Abnahme von der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$. Im Zytosol bindet Ca^{2+} an CaM, welches an SEC61 bindet und somit das Ca^{2+} -Leck limitiert. **3) Vermindertes Ca^{2+} -Leck (4-PBA/AZO).** Statt BiP fungiert 4-PBA/AZO als Chaperon bei der korrekten Faltung fehlgefalteter Proteine. Dadurch liegt BiP wieder vermehrt frei im Lumen des ER vor und kann somit SEC61 hinsichtlich des Ca^{2+} -Lecks verschließen. Hierdurch kommt es zu einem der normalen Ca^{2+} -Homöostase annähernden Zustand.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass 4-PBA und AZO eine direkte hemmende Wirkung auf das Ca^{2+} -Leck aus dem ER ausüben, den ER-Stress senken und somit eine protektive Wirkung besitzen. Insofern lässt sich annehmen, dass chemische Chaperone das Potential aufweisen, die Zellüberlebensfähigkeit zu steigern und somit bei vielen Krankheiten zu protektiven Effekten führen können. Als eine weltweit mit hoher Inzidenz vertretende Erkrankung, die mit ER-Stress induziertem Zelltod in Verbindung gebracht wird, ist hier die alkohol-induzierte bzw. fettinduzierte Lebererkrankung zu nennen (Basseri und Austin, 2012; Liu und Green, 2019).

Gerade in Bezug auf ER-Stress wäre es interessant, chemische Chaperone mit Medikamenten zu kombinieren, von denen man ausgeht, dass sie ER-Stress als unerwünschte Nebenwirkung induzieren. Diesbezüglich wären beispielsweise Anti-Humaner Immundefizienz-Virus (HIV) Medikamente (z.B. Efavirenz, Lopinavir), Anti-Depressiva (z.B. Sertralin, Clozapin), nichtsteroidale Antirheumatika (z.B. Ibuprofen, Diclofenac), Diabetes Medikamente (z.B. Metformin, Troglitazone) auch das Antiarrhythmikum Amiodaron vermutete Kandidaten (siehe Chen et al., 2014; Foufelle und Fromenty, 2016; Lombardi et al., 2015; Quentin et al., 2012; Tsutsumi et al., 2004).

Im Umkehrschluss sollte auch die Forschung vertieft werden, inwieweit chemische Chaperone als Notfallmedikamente in der Akutphase, den Zelltod auf Grund von Hypoxie bedingtem ER-Stress (z.B. bei Schlaganfall, Akutem Myokardinfarkt) modulieren und das Outcome für Patienten verbessern können. Schon 2004 zeigten die vielversprechenden Ergebnisse von Qi et al. an Mäusen mit hypoxisch-induzierten Hirnschäden, dass die Tiere mit 4-PBA Behandlung signifikant reduzierte neurologische Defizite gegenüber der Kontrollgruppe aufwiesen (Qi et al., 2004). Ferner ließ sich auch das erhebliche kardioprotektive Potential von 4-PBA gegenüber kardialer Ischämie und Reperfusionsschäden an Ratten-Kardiomyozyten, in unterschiedlichen

Versuchen nachweisen (siehe Takatori et al., 2017; Zhang et al., 2017). Daher sind auch neben 4-PBA für das noch wenig erforschte AZO aussichtsreiche Ergebnisse zu erwarten und sollten wie 4-PBA weiter untersucht werden.

Zwar konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die chemischen Chaperone 4-PBA, dessen Metabolit PAA und AZO kurzfristig auf die Zellen und ER- Ca^{2+} -Homöostase wirken, jedoch ohne einen eindeutigen molekularen Mechanismus eruieren zu können. Deshalb sollte auf Basis dieser gewonnenen Erkenntnisse weiter untersucht werden, inwieweit BiP vermutlich durch 4-PBA bzw. AZO von der Proteinfaltung entlastet, selbst wiederum an der Bindestelle von Sec61 α gebunden bleibt und dadurch das Ca^{2+} -Leck vermindert. Mögliche Ansätze wären einerseits direkte Messungen des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ und andererseits Gene Silencing Experimente, um die Wirkmechanismen weiter zu untersuchen: Als zentrale Vertreter wären BiP und dessen Co-Chaperone zu nennen, um zu untersuchen ob 4-PBA oder AZO deren Funktionen/Arbeit kompensieren können. In Hinblick auf den Sec61-Komplex oder dessen Untereinheiten, könnte man untersuchen, ob der vorzeitige basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstieg bei hohen Dosen von 4-PBA und AZO, Sec61 α vermittelt ist. Ferner könnten weiterführende Experimente mittels Western Blot dazu dienen zu ermitteln, inwieweit sich die Prozessierung von Proteinen, bzw. wie stark sich die UPR-Aktivierung bei kurzen Inkubationen mit den chemischen Chaperonen verändern.

Interessant für weitere Untersuchungen wäre ferner, die Beobachtungs-Zeitspanne auf mehrere Stunden zu erweitern, um sich genau der Situation anzunähern, die bei einer täglichen Medikamentengabe entstehen soll.

Neben dem in dieser Arbeit beleuchteten, kurzfristigen Effekt gegenüber ER-Stress, sollte auch für AZO als neu entdecktes chemisches Chaperon, das möglicherweise sogar einer neuen Subklasse von chemischen Chaperon zuzurechnen ist, der langfristige Effekt auf ER-Stress und Proteinfehlfaltung tiefergehend untersucht werden. Der für AZO beschriebene antidiabetische Effekt (siehe Kapitel 2.7.3), in Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, unterstreicht das vielversprechende Potential von AZO deutlich.

In Zukunft sollte AZO analog zu 4-PBA und TUDCA, als bis jetzt intensiv erforschte Medikamente aus dieser Klasse, in Versuchsreihen miteingeschlossen werden. Ferner erscheint es gewinnbringend, weitere systematische Untersuchung mit 4-PBA, AZO und TUDCA durchzuführen, um mehr über die pharmakologische Modulation dieser drei Chaperone auf das Ca^{2+} -Leck aus dem ER in Erfahrung zu bringen.

6. Literaturverzeichnis

1. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M (2010) N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* 35:74-82
2. Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE (2005) The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 168:389-399
3. Ali Khan H, Mutus B (2014) Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front Chem* 2:70
4. Alliegro MC (2000) Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. *Anal Biochem* 282:102-106
5. Arakawa T, Ejima D, Kita Y, Tsumoto K (2006) Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochim Biophys Acta* 1764:1677-1687
6. Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, Castelbou C, Michalak M, Demareux N (2002) Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* 277:46696-46705
7. Arruda AP, Hotamisligil GS (2015) Calcium Homeostasis and Organelle Function in the Pathogenesis of Obesity and Diabetes. *Cell Metab* 22:381-397
8. Assentoft M, Kaptan S, Schneider HP, Deitmer JW, de Groot BL, MacAulay N (2016) Aquaporin 4 as a NH₃ Channel. *J Biol Chem* 291:19184-19195
9. Ast T, Cohen G, Schuldiner M (2013) A network of cytosolic factors targets SRP-independent proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 152:1134-1145
10. Bagci R, Sahinturk V, Sahin E (2019) Azoramidate ameliorates fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Tissue Cell* 59:62-69
11. Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE (2009) Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *J Vis Exp*
12. Basseri S, Austin RC (2012) Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. *Biochem Res Int* 2012:841362
13. Beckmann R, Bubeck D, Grassucci R, Penczek P, Verschoor A, Blobel G, Frank J (1997) Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* 278:2123-2126
14. Beeler TJ, Jona I, Martonosi A (1979) The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J Biol Chem* 254:6229-6231
15. Behnke J, Feige MJ, Hendershot LM (2015) BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sill: mechanisms of action and biological functions. *J Mol Biol* 427:1589-1608
16. Ben Mosbah I, Alfany-Fernandez I, Martel C, Zaouali MA, Bintanel-Morcillo M, Rimola A, Rodes J, Brenner C, Rosello-Catafau J, Peralta C (2010) Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Cell Death Dis* 1:e52

17. Berner N, Reutter KR, Wolf DH (2018) Protein Quality Control of the Endoplasmic Reticulum and Ubiquitin-Proteasome-Triggered Degradation of Aberrant Proteins: Yeast Pioneers the Path. *Annu Rev Biochem* 87:751-782
18. Bernier V, Bichet DG, Bouvier M (2004a) Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 4:528-533
19. Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M (2004b) Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab* 15:222-228
20. Bernier V, Lagace M, Lonergan M, Arthus MF, Bichet DG, Bouvier M (2004c) Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol Endocrinol* 18:2074-2084
21. Bernier V, Morello JP, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Lonergan M, Arthus MF, Laperriere A, Brouard R, Bouvier M, Bichet DG (2006) Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 17:232-243
22. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21
23. Berridge MJ (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32:235-249
24. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529
25. Bezprozvanny IB (2010) Calcium signaling and neurodegeneration. *Acta Naturae* 2:72-82
26. Blair NF, Cremer PD, Tchan MC (2015) Urea cycle disorders: a life-threatening yet treatable cause of metabolic encephalopathy in adults. *Pract Neurol* 15:45-48
27. Bosoi CR, Rose CF (2009) Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis* 24:95-102
28. Bowler BE (2012) Residual structure in unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol* 22:4-13
29. Brini M, Carafoli E (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 89:1341-1378
30. Brini M, Carafoli E (2011) The plasma membrane Ca(2)+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
31. Camello C, Lomax R, Petersen OH, Tepikin AV (2002) Calcium leak from intracellular stores - the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* 32:355-361
32. Carducci MA, Nelson JB, Chan-Tack KM, Ayyagari SR, Sweatt WH, Campbell PA, Nelson WG, Simons JW (1996) Phenylbutyrate induces apoptosis in human prostate cancer and is more potent than phenylacetate. *Clin Cancer Res* 2:379-387
33. Carreras-Sureda A, Pihan P, Hetz C (2018) Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium* 70:24-31
34. Castillo V, Onate M, Woehlbier U, Rozas P, Andreu C, Medinas D, Valdes P, Osorio F, Mercado G, Vidal RL, Kerr B, Court FA, Hetz C (2015) Functional Role of the Disulfide Isomerase ERp57 in Axonal Regeneration. *PLoS One* 10:e0136620

35. Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947
36. Chambers JE, Petrova K, Tomba G, Vendruscolo M, Ron D (2012) ADP ribosylation adapts an ER chaperone response to short-term fluctuations in unfolded protein load. *J Cell Biol* 198:371-385
37. Chang TK, Lawrence DA, Lu M, Tan J, Harnoss JM, Marsters SA, Liu P, Sandoval W, Martin SE, Ashkenazi A (2018) Coordination between Two Branches of the Unfolded Protein Response Determines Apoptotic Cell Fate. *Mol Cell* 71:629-636 e625
38. Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86:627-637
39. Chen S, Melchior WB, Jr., Guo L (2014) Endoplasmic reticulum stress in drug- and environmental toxicant-induced liver toxicity. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 32:83-104
40. Chen T, Noto D, Hoshino Y, Mizuno M, Miyake S (2019) Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination. *J Neuroinflammation* 16:165
41. Chen X, Shen J, Prywes R (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 277:13045-13052
42. Cheung WY (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207:19-27
43. Chino H, Mizushima N (2020) ER-Phagy: Quality Control and Turnover of Endoplasmic Reticulum. *Trends Cell Biol* 30:384-398
44. Cho SS, Reddy G, Straub JE, Thirumalai D (2011) Entropic stabilization of proteins by TMAO. *J Phys Chem B* 115:13401-13407
45. Chou AC, Ju YT, Pan CY (2015) Calmodulin Interacts with the Sodium/Calcium Exchanger NCX1 to Regulate Activity. *PLoS One* 10:e0138856
46. Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047-1058
47. Clerico EM, Tilitsky JM, Meng W, Gierasch LM (2015) How hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *J Mol Biol* 427:1575-1588
48. Coe H, Michalak M (2009) Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus:F96-F103
49. Cortez L, Sim V (2014) The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion* 8
50. Cousens LS, Gallwitz D, Alberts BM (1979) Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *J Biol Chem* 254:1716-1723
51. Dahlmann B (2016) Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Arch Biochem Biophys* 591:132-140
52. Dasari R, Masi M, Lisy R, Ferderin M, English LR, Cimmino A, Mathieu V, Brenner AJ, Kuhn JG, Whitten ST, Evidente A, Kiss R, Kornienko A (2015) Fungal metabolite ophiobolin A as a

- promising anti-glioma agent: In vivo evaluation, structure-activity relationship and unique pyrrolylation of primary amines. *Bioorg Med Chem Lett* 25:4544-4548
53. Demuro A, Parker I, Stutzmann GE (2010) Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 285:12463-12468
 54. Dong G, Wearsch PA, Peaper DR, Cresswell P, Reinisch KM (2009) Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity* 30:21-32
 55. Dricu A, Carlberg M, Wang M, Larsson O (1997) Inhibition of N-linked glycosylation using tunicamycin causes cell death in malignant cells: role of down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor in induction of apoptosis. *Cancer Res* 57:543-548
 56. Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Muller L, Zimmermann R (2009a) Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci* 66:1556-1569
 57. Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L, Zimmermann R (2009b) Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:1556-1569
 58. Dudek J, Pfeffer S, Lee PH, Jung M, Cavalie A, Helms V, Forster F, Zimmermann R (2015) Protein transport into the human endoplasmic reticulum. *J Mol Biol* 427:1159-1175
 59. DuRose JB, Scheuner D, Kaufman RJ, Rothblum LI, Niwa M (2009) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 29:4295-4307
 60. Dyson HJ, Wright PE, Scheraga HA (2006) The role of hydrophobic interactions in initiation and propagation of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13057-13061
 61. Ellgaard L, Frickel EM (2003) Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* 39:223-247
 62. Ellgaard L, Ruddock LW (2005) The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 6:28-32
 63. Ellis J (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328:378-379
 64. Engin F, Hotamisligil GS (2010) Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2:108-115
 65. English AR, Voeltz GK (2013) Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a013227
 66. Erdmann F, Schauble N, Lang S, Jung M, Honigmann A, Ahmad M, Dudek J, Benedix J, Harsman A, Kopp A, Helms V, Cavalie A, Wagner R, Zimmermann R (2011) Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 30:17-31
 67. Fahrner M, Derler I, Jardin I, Romanin C (2013) The STIM1/Orai signaling machinery. *Channels (Austin)* 7:330-343
 68. Ferriero R, Brunetti-Pierri N (2013) Phenylbutyrate increases activity of pyruvate dehydrogenase complex. *Oncotarget* 4:804-805

69. Finka A, Mattoo RU, Goloubinoff P (2016) Experimental Milestones in the Discovery of Molecular Chaperones as Polypeptide Unfolding Enzymes. *Annu Rev Biochem* 85:715-742
70. Forouhan M, Mori K, Boot-Handford RP (2018) Paradoxical roles of ATF6alpha and ATF6beta in modulating disease severity caused by mutations in collagen X. *Matrix Biol* 70:50-71
71. Foufelle F, Fromenty B (2016) Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect* 4:e00211
72. Fribley A, Zhang K, Kaufman RJ (2009) Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol* 559:191-204
73. Frickel EM, Frei P, Bouvier M, Stafford WF, Helenius A, Glockshuber R, Ellgaard L (2004) ERp57 is a multifunctional thiol-disulfide oxidoreductase. *J Biol Chem* 279:18277-18287
74. Friedman JR, Voeltz GK (2011) The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol* 21:709-717
75. Fritz JM, Dong M, Apsley KS, Martin EP, Na CL, Sitaraman S, Weaver TE (2014) Deficiency of the BiP cochaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects. *Mol Biol Cell* 25:431-440
76. Fu S, Yalcin A, Lee GY, Li P, Fan J, Arruda AP, Pers BM, Yilmaz M, Eguchi K, Hotamisligil GS (2015) Phenotypic assays identify azoramidate as a small-molecule modulator of the unfolded protein response with antidiabetic activity. *Sci Transl Med* 7:292ra298
77. Gault J, Lianoudaki D, Kaldmae M, Kronqvist N, Rising A, Johansson J, Lohkamp B, Lain S, Allison TM, Lane DP, Marklund EG, Landreh M (2018) Mass Spectrometry Reveals the Direct Action of a Chemical Chaperone. *J Phys Chem Lett* 9:4082-4086
78. Gaut JR, Hendershot LM (1993) The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 5:589-595
79. Gavel Y, von Heijne G (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 3:433-442
80. Gelebart P, Opas M, Michalak M (2005) Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* 37:260-266
81. Gestwicki JE, Shao H (2019) Inhibitors and chemical probes for molecular chaperone networks. *J Biol Chem* 294:2151-2161
82. Goddard-Borger ED, Withers SG (2012) Natural product biosynthesis: Tackling tunicamycin. *Nat Chem* 4:520-521
83. Goldshmidt H, Sheiner L, Butikofer P, Roditi I, Uliel S, Gunzel M, Engstler M, Michaeli S (2008) Role of protein translocation pathways across the endoplasmic reticulum in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 283:32085-32098
84. Gomez-Navarro N, Miller E (2016a) Protein sorting at the ER-Golgi interface. *J Cell Biol* 215:769-778
85. Gomez-Navarro N, Miller EA (2016b) COP-coated vesicles. *Curr Biol* 26:R54-R57
86. Gorlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU, Rapoport TA (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71:489-503

87. Gorlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75:615-630
88. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74
89. Greber BJ (2016) Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *RNA* 22:1643-1662
90. Griesemer M, Young C, Robinson AS, Petzold L (2014) BiP clustering facilitates protein folding in the endoplasmic reticulum. *PLoS Comput Biol* 10:e1003675
91. Grotzke JE, Kozik P, Morel JD, Impens F, Pietrosevoli N, Cresswell P, Amigorena S, Demangel C (2017) Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E5910-E5919
92. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450
93. Guan BJ, Krokowski D, Majumder M, Schmotzer CL, Kimball SR, Merrick WC, Koromilas AE, Hatzoglou M (2014) Translational control during endoplasmic reticulum stress beyond phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *J Biol Chem* 289:12593-12611
94. Guillen C (2016) Azoramide: a new drug for the treatment of type 2 diabetes? *Ann Transl Med* 4:S45
95. Guo F, Snapp EL (2013) ERdj3 regulates BiP occupancy in living cells. *J Cell Sci* 126:1429-1439
96. Haas IG, Wabl M (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306:387-389
97. Hageman J, Kampinga HH (2009) Computational analysis of the human HSPH/HSPA/DNAJ family and cloning of a human HSPH/HSPA/DNAJ expression library. *Cell Stress Chaperones* 14:1-21
98. Ham H, Woolery AR, Tracy C, Stenesen D, Kramer H, Orth K (2014) Unfolded protein response-regulated *Drosophila* Fic (dFic) protein reversibly AMPylates BiP chaperone during endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem* 289:36059-36069
99. Hammond C, Braakman I, Helenius A (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:913-917
100. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475:324-332
101. Hassdenteufel S, Johnson N, Paton AW, Paton JC, High S, Zimmermann R (2018) Chaperone-Mediated Sec61 Channel Gating during ER Import of Small Precursor Proteins Overcomes Sec61 Inhibitor-Reinforced Energy Barrier. *Cell Rep* 23:1373-1386
102. Hetz C, Chevet E, Harding HP (2013) Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* 12:703-719
103. Hole M, Jorge-Finnigan A, Underhaug J, Teigen K, Martinez A (2016) Pharmacological Chaperones that Protect Tetrahydrobiopterin Dependent Aromatic Amino Acid Hydroxylases Through Different Mechanisms. *Curr Drug Targets* 17:1515-1526

104. Howell SH (2017) When is the unfolded protein response not the unfolded protein response? *Plant Sci* 260:139-143
105. Huang S, Wang Y (2017) Golgi structure formation, function, and post-translational modifications in mammalian cells. *F1000Res* 6:2050
106. Hwang J, Qi L (2018) Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci* 43:593-605
107. Iannitti T, Palmieri B (2011) Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate. *Drugs R D* 11:227-249
108. Jadhav B, McKenna M, Johnson N, High S, Sinning I, Pool MR (2015) Mammalian SRP receptor switches the Sec61 translocase from Sec62 to SRP-dependent translocation. *Nat Commun* 6:10133
109. Jha S, Komar AA (2011) Birth, life and death of nascent polypeptide chains. *Biotechnol J* 6:623-640
110. Jin Y, Zhuang M, Hendershot LM (2009) ERdj3, a luminal ER DnaJ homologue, binds directly to unfolded proteins in the mammalian ER: identification of critical residues. *Biochemistry* 48:41-49
111. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14:105-111
112. Kang S, Hong J, Lee JM, Moon HE, Jeon B, Choi J, Yoon NA, Paek SH, Roh EJ, Lee CJ, Kang SS (2017) Trifluoperazine, a Well-Known Antipsychotic, Inhibits Glioblastoma Invasion by Binding to Calmodulin and Disinhibiting Calcium Release Channel IP3R. *Mol Cancer Ther* 16:217-227
113. Kazantsev AG, Thompson LM (2008) Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7:854-868
114. Ke M, Chong CM, Zeng H, Huang M, Huang Z, Zhang K, Cen X, Lu JH, Yao X, Qin D, Su (2020) Azoramide protects iPSC-derived dopaminergic neurons with PLA2G6 D331Y mutation through restoring ER function and CREB signaling. *Cell Death Dis* 11:130
115. Kitakaze K, Taniuchi S, Kawano E, Hamada Y, Miyake M, Oyadomari M, Kojima H, Kosako H, Kuribara T, Yoshida S, Hosoya T, Oyadomari S (2019) Cell-based HTS identifies a chemical chaperone for preventing ER protein aggregation and proteotoxicity. *Elife* 8
116. Kityk R, Kopp J, Mayer MP (2018) Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones. *Mol Cell* 69:227-237 e224
117. Knorre A, Wagner M, Schaefer HE, Colledge WH, Pahl HL (2002) DeltaF508-CFTR causes constitutive NF-kappaB activation through an ER-overload response in cystic fibrosis lungs. *Biol Chem* 383:271-282
118. Kolb PS, Ayaub EA, Zhou W, Yum V, Dickhout JG, Ask K (2015) The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 61:45-52
119. Kong FJ, Wu JH, Sun SY, Zhou JQ (2017) The endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway is involved in cholesterol-induced pancreatic beta-cell injury. *Sci Rep* 7:44746

120. Kovalevskaya NV, van de Waterbeemd M, Bokhovchuk FM, Bate N, Bindels RJ, Hoenderop JG, Vuister GW (2013) Structural analysis of calmodulin binding to ion channels demonstrates the role of its plasticity in regulation. *Pflugers Arch* 465:1507-1519
121. Kozlov G, Maattanen P, Schrag JD, Pollock S, Cygler M, Nagar B, Thomas DY, Gehring K (2006) Crystal structure of the bb' domains of the protein disulfide isomerase ERp57. *Structure* 14:1331-1339
122. Kozlov G, Maattanen P, Thomas DY, Gehring K (2010) A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J* 277:3924-3936
123. Kraskiewicz H, FitzGerald U (2012) InterfERing with endoplasmic reticulum stress. *Trends Pharmacol Sci* 33:53-63
124. Kubota K, Niinuma Y, Kaneko M, Okuma Y, Sugai M, Omura T, Uesugi M, Uehara T, Hosoi T, Nomura Y (2006) Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 97:1259-1268
125. Kusaczuk M (2019) Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells* 8
126. Ladiges WC, Knoblaugh SE, Morton JF, Korth MJ, Sopher BL, Baskin CR, MacAuley A, Goodman AG, LeBoeuf RC, Katze MG (2005) Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes* 54:1074-1081
127. Lai CW, Otero JH, Hendershot LM, Snapp E (2012) ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery. *J Biol Chem* 287:7969-7978
128. Lamb HK, Mee C, Xu W, Liu L, Blond S, Cooper A, Charles IG, Hawkins AR (2006) The affinity of a major Ca²⁺ binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP. *J Biol Chem* 281:8796-8805
129. Lang S, Erdmann F, Jung M, Wagner R, Cavalie A, Zimmermann R (2011) Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels (Austin)* 5:228-235
130. Lang S, Pfeffer S, Lee PH, Cavalie A, Helms V, Forster F, Zimmermann R (2017) An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Front Physiol* 8:887
131. Lawless MW, Greene CM, Mulgrew A, Taggart CC, O'Neill SJ, McElvaney NG (2004) Activation of endoplasmic reticulum-specific stress responses associated with the conformational disease Z alpha 1-antitrypsin deficiency. *J Immunol* 172:5722-5726
132. Leung PC, Taylor WA, Wang JH, Tipton CL (1984) Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *J Biol Chem* 259:2742-2747
133. Li Z, Stafford WF, Bouvier M (2001) The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability. *Biochemistry* 40:11193-11201
134. Liao S, Lin J, Do H, Johnson AE (1997) Both lumenal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* 90:31-41
135. Liao YT, Manson AC, DeLyser MR, Noid WG, Cremer PS (2017) Trimethylamine N-oxide stabilizes proteins via a distinct mechanism compared with betaine and glycine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:2479-2484

136. Liebermeister W, Rapoport TA, Heinrich R (2001) Ratcheting in post-translational protein translocation: a mathematical model. *J Mol Biol* 305:643-656
137. Linxweiler M, Schorr S, Schauble N, Jung M, Linxweiler J, Langer F, Schafers HJ, Cavalie A, Zimmermann R, Greiner M (2013) Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells. *BMC Cancer* 13:574
138. Linxweiler M, Schick B, Zimmermann R (2017) Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine. *Signal Transduct Target Ther* 2:17002
139. Liu C, Hermann TE (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 253:5892-5894
140. Liu X, Green RM (2019) Endoplasmic reticulum stress and liver diseases. *Liver Res* 3:55-64
141. Lloyd DJ, Wheeler MC, Gekakis N (2010) A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes* 59:460-470
142. Lombardi A, Inabnet WB, 3rd, Owen R, Farenholtz KE, Tomer Y (2015) Endoplasmic reticulum stress as a novel mechanism in amiodarone-induced destructive thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 100:E1-10
143. Lord C, Ferro-Novick S, Miller EA (2013) The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5
144. Lorenzon NM, Beam KG (2008) Disease causing mutations of calcium channels. *Channels (Austin)* 2:163-179
145. Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS (2006) GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 26:5688-5697
146. Luo T, Chen B, Wang X (2015) 4-PBA prevents pressure overload-induced myocardial hypertrophy and interstitial fibrosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Chem Biol Interact* 242:99-106
147. Lyman SK, Schekman R (1997) Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88:85-96
148. Ma J, Luo T, Zeng Z, Fu H, Asano Y, Liao Y, Minamino T, Kitakaze M (2016) Histone Deacetylase Inhibitor Phenylbutyrate Exaggerates Heart Failure in Pressure Overloaded Mice independently of HDAC inhibition. *Sci Rep* 6:34036
149. Mamipour M, Yousefi M, Hasanzadeh M (2017) An overview on molecular chaperones enhancing solubility of expressed recombinant proteins with correct folding. *Int J Biol Macromol* 102:367-375
150. Mandon EC, Trueman SF, Gilmore R (2013) Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5
151. Marcinowski M, Holler M, Feige MJ, Baerend D, Lamb DC, Buchner J (2011) Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions. *Nat Struct Mol Biol* 18:150-158

152. Martoglio B, Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8:410-415
153. Masi M, Dasari R, Evidente A, Mathieu V, Kornienko A (2019) Chemistry and biology of ophiobolin A and its congeners. *Bioorg Med Chem Lett* 29:859-869
154. Matlack KE, Misselwitz B, Plath K, Rapoport TA (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97:553-564
155. Mattoo RU, Goloubinoff P (2014) Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cell Mol Life Sci* 71:3311-3325
156. Mayer MP (2010) Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell* 39:321-331
157. Mayer MP (2013) Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* 38:507-514
158. Mayer MP, Kityk R (2015) Insights into the molecular mechanism of allostery in Hsp70s. *Front Mol Biosci* 2:58
159. McCafferty EH, Scott LJ (2019) Migalastat: A Review in Fabry Disease. *Drugs* 79:543-554
160. McMaster CR (2001) Lipid metabolism and vesicle trafficking: more than just greasing the transport machinery. *Biochem Cell Biol* 79:681-692
161. Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L (2011) Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
162. Melnyk A, Rieger H, Zimmermann R (2015) Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum. *Subcell Biochem* 78:179-200
163. Meyer HA, Grau H, Kraft R, Kostka S, Prehn S, Kalies KU, Hartmann E (2000) Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* 275:14550-14557
164. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344 Pt 2:281-292
165. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M (2009) Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 417:651-666
166. Milles LF, Unterauer EM, Nicolaus T, Gaub HE (2018) Calcium stabilizes the strongest protein fold. *Nat Commun* 9:4764
167. Mimori S, Okuma Y, Kaneko M, Kawada K, Hosoi T, Ozawa K, Nomura Y, Hamana H (2012) Protective effects of 4-phenylbutyrate derivatives on the neuronal cell death and endoplasmic reticulum stress. *Biol Pharm Bull* 35:84-90
168. Mimori S, Ohtaka H, Koshikawa Y, Kawada K, Kaneko M, Okuma Y, Nomura Y, Murakami Y, Hamana H (2013) 4-Phenylbutyric acid protects against neuronal cell death by primarily acting as a chemical chaperone rather than histone deacetylase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 23:6015-6018
169. Misselwitz B, Staack O, Matlack KE, Rapoport TA (1999) Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J Biol Chem* 274:20110-20115

170. Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kurosaki T, Iino M (2001) Ca(2+)-sensor region of IP(3) receptor controls intracellular Ca(2+) signaling. *EMBO J* 20:1674-1680
171. Miyake H, Hara I, Arakawa S, Kamidono S (2000) Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 77:396-408
172. Mohammed-Ali Z, Lu C, Marway MK, Carlisle RE, Ask K, Lukic D, Krepinsky JC, Dickhout JG (2017) Endoplasmic reticulum stress inhibition attenuates hypertensive chronic kidney disease through reduction in proteinuria. *Sci Rep* 7:41572
173. Molinari M, Helenius A (2000) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* 288:331-333
174. Moon HW, Han HG, Jeon YJ (2018) Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Int J Mol Sci* 19
175. Morito D, Nagata K (2015) Pathogenic Hijacking of ER-Associated Degradation: Is ERAD Flexible? *Mol Cell* 59:335-344
176. Morshauer RC, Wang H, Flynn GC, Zuiderweg ER (1995) The peptide-binding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry* 34:6261-6266
177. Muller G, Zimmermann R (1987) Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *EMBO J* 6:2099-2107
178. Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demaurex N, Opas M, Michalak M (2001) Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol* 154:961-972
179. Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR (2005) Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 20:303-318
180. Oh E, Becker AH, Sandikci A, Huber D, Chaba R, Gloge F, Nichols RJ, Typas A, Gross CA, Kramer G, Weissman JS, Bukau B (2011) Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo. *Cell* 147:1295-1308
181. Okatan EN, Olgar Y, Tuncay E, Turan B (2019) Azoramide improves mitochondrial dysfunction in palmitate-induced insulin resistant H9c2 cells. *Mol Cell Biochem* 461:65-72
182. Ooi CE, Weiss J (1992) Bidirectional movement of a nascent polypeptide across microsomal membranes reveals requirements for vectorial translocation of proteins. *Cell* 71:87-96
183. Osowski CM, Urano F (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol* 490:71-92
184. Ostrovsky O, Ahmed NT, Argon Y (2009) The chaperone activity of GRP94 toward insulin-like growth factor II is necessary for the stress response to serum deprivation. *Mol Biol Cell* 20:1855-1864
185. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG, Jr., Ozcan U (2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 9:35-51

186. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137-1140
187. Paknejad N, Hite RK (2018) Structural basis for the regulation of inositol trisphosphate receptors by Ca(2+) and IP3. *Nat Struct Mol Biol* 25:660-668
188. Papp E, Csermely P (2006) Chemical chaperones: mechanisms of action and potential use. *Handb Exp Pharmacol*:405-416
189. Papp S, Dziak E, Michalak M, Opas M (2003) Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca²⁺-handling proteins. *J Cell Biol* 160:475-479
190. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143-151
191. Parenti G, Andria G, Valenzano KJ (2015) Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Mol Ther* 23:1138-1148
192. Park E, Rapoport TA (2012) Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys* 41:21-40
193. Pena-Quintana L, Llarena M, Reyes-Suarez D, Aldamiz-Echevarria L (2017) Profile of sodium phenylbutyrate granules for the treatment of urea-cycle disorders: patient perspectives. *Patient Prefer Adherence* 11:1489-1496
194. Perlmutter DH (2002) Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr Res* 52:832-836
195. Pfeffer S, Dudek J, Gogala M, Schorr S, Linxweiler J, Lang S, Becker T, Beckmann R, Zimmermann R, Forster F (2014) Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nat Commun* 5:3072
196. Pfeffer S, Burbaum L, Unverdorben P, Pech M, Chen Y, Zimmermann R, Beckmann R, Forster F (2015) Structure of the native Sec61 protein-conducting channel. *Nat Commun* 6:8403
197. Phillips MJ, Voeltz GK (2016) Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:69-82
198. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R (2008) Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27:6407-6418
199. Plath K, Rapoport TA (2000) Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 151:167-178
200. Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM (2019) The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem* 294:2098-2108
201. Porter KR, Claude A, Fullam EF (1945) A Study of Tissue Culture Cells by Electron Microscopy : Methods and Preliminary Observations. *J Exp Med* 81:233-246
202. Powell K, Zeitlin PL (2002) Therapeutic approaches to repair defects in deltaF508 CFTR folding and cellular targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1395-1408

203. Prakriya M, Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 95:1383-1436
204. Preston GM, Brodsky JL (2017) The evolving role of ubiquitin modification in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochem J* 474:445-469
205. Price NP, Tsvetanova B (2007) Biosynthesis of the tunicamycins: a review. *J Antibiot (Tokyo)* 60:485-491
206. Prins D, Michalak M (2011) Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
207. PubchemID5258 (2021) Sodium phenylbutyrate. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-phenylbutyrate>
208. PubchemID7518316 (2021) Azoramide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7518316>
209. Puri BK, Morris G (2018) Potential therapeutic interventions based on the role of the endoplasmic reticulum stress response in progressive neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 13:1887-1889
210. Putney JW (2009) Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev* 231:10-22
211. Putney JW, Jr. (1990) The integration of receptor-regulated intracellular calcium release and calcium entry across the plasma membrane. *Curr Top Cell Regul* 31:111-127
212. Qi X, Hosoi T, Okuma Y, Kaneko M, Nomura Y (2004) Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Mol Pharmacol* 66:899-908
213. Quentin T, Steinmetz M, Poppe A, Thoms S (2012) Metformin differentially activates ER stress signaling pathways without inducing apoptosis. *Dis Model Mech* 5:259-269
214. Rajan RS, Tsumoto K, Tokunaga M, Tokunaga H, Kita Y, Arakawa T (2011) Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases. *Curr Med Chem* 18:1-15
215. Randow F, Seed B (2001) Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol* 3:891-896
216. Rapoport TA, Li L, Park E (2017) Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33:369-390
217. Reid RE, Garipey J, Saund AK, Hodges RS (1981) Calcium-induced protein folding. Structure-affinity relationships in synthetic analogs of the helix-loop-helix calcium binding unit. *J Biol Chem* 256:2742-2751
218. Rellmann Y, Gronau I, Hansen U, Dreier R (2019) 4-Phenylbutyric Acid Reduces Endoplasmic Reticulum Stress in Chondrocytes That Is Caused by Loss of the Protein Disulfide Isomerase ERp57. *Oxid Med Cell Longev* 2019:6404035
219. Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM (2004) Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochem* 89:1358-1367
220. Ridlon JM, Bajaj JS (2015) The human gut sterolbiome: bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics. *Acta Pharm Sin B* 5:99-105

-
221. Ringe D, Petsko GA (2009) What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *J Biol* 8:80
222. Romisch K (2004) A cure for traffic jams: small molecule chaperones in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 5:815-820
223. Roy D, Kumar V, James J, Shihabudeen MS, Kulshrestha S, Goel V, Thirumurugan K (2015) Evidence that Chemical Chaperone 4-Phenylbutyric Acid Binds to Human Serum Albumin at Fatty Acid Binding Sites. *PLoS One* 10:e0133012
224. Ruan B, Zhu Z, Yan Z, Yang W, Zhai D, Wang L, Ye Z, Lu H, Xiang A, Liang J, Jiang Y, Xu C, Wang Z, Wei M, Lei X, Cao X, Lu Z (2018) Azoramide, a novel regulator, favors adipogenesis against osteogenesis through inhibiting the GLP-1 receptor-PKA-beta-catenin pathway. *Stem Cell Res Ther* 9:57
225. Rudolph U, Knoflach F (2011) Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 10:685-697
226. Russo C, Osterburg C, Sirico A, Antonini D, Ambrosio R, Wurz JM, Rinnenthal J, Ferniani M, Kehroesser S, Schafer B, Guntert P, Sinha S, Dotsch V, Missero C (2018) Protein aggregation of the p63 transcription factor underlies severe skin fragility in AEC syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E906-E915
227. Sanford M, Keating GM (2009) Sapropterin: a review of its use in the treatment of primary hyperphenylalaninaemia. *Drugs* 69:461-476
228. Sano R, Reed JC (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1833:3460-3470
229. Sanyal A, Chen AJ, Nakayasu ES, Lazar CS, Zbornik EA, Worby CA, Koller A, Mattoo S (2015) A novel link between Fic (filamentation induced by cAMP)-mediated adenylylation/AMPylation and the unfolded protein response. *J Biol Chem* 290:8482-8499
230. Saraogi I, Shan SO (2011) Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic* 12:535-542
231. Schauble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan O, Linxweiler J, Dudek J, Blum R, Helms V, Paton AW, Paton JC, Cavalie A, Zimmermann R (2012) BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J* 31:3282-3296
232. Schild H, Rammensee HG (2000) gp96--the immune system's Swiss army knife. *Nat Immunol* 1:100-101
233. Schorr S, Klein MC, Gamayun I, Melnyk A, Jung M, Schauble N, Wang Q, Hemmis B, Bochen F, Greiner M, Lampel P, Urban SK, Hassdenteufel S, Dudek J, Chen XZ, Wagner R, Cavalie A, Zimmermann R (2015) Co-chaperone Specificity in Gating of the Polypeptide Conducting Channel in the Membrane of the Human Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 290:18621-18635
234. Schwarz DS, Blower MD (2016) The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 73:79-94
235. Schwarz EC, Qu B, Hoth M (2013) Calcium, cancer and killing: the role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochim Biophys Acta* 1833:1603-1611

236. Sehgal P, Szalai P, Olesen C, Praetorius HA, Nissen P, Christensen SB, Engedal N, Moller JV (2017) Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca(2+)-ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca(2+) depletion and the unfolded protein response. *J Biol Chem* 292:19656-19673
237. Seo MD, Enomoto M, Ishiyama N, Stathopoulos PB, Ikura M (2015) Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors. *Biochim Biophys Acta* 1853:1980-1991
238. Seto E, Yoshida M (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a018713
239. Shah VN, Chagot B, Chazin WJ (2006) Calcium-Dependent Regulation of Ion Channels. *Calcium Bind Proteins* 1:203-212
240. Shan SO, Schmid SL, Zhang X (2009) Signal recognition particle (SRP) and SRP receptor: a new paradigm for multistate regulatory GTPases. *Biochemistry* 48:6696-6704
241. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 3:99-111
242. Shen X, Zhang K, Kaufman RJ (2004) The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat* 28:79-92
243. Shen Y, Hendershot LM (2005) ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol Biol Cell* 16:40-50
244. Shi X, Zheng C, Li C, Hou K, Wang X, Yang Z, Liu C, Liu Y, Che X, Qu X (2018) 4-Phenylbutyric acid promotes gastric cancer cell migration via histone deacetylase inhibition-mediated HER3/HER4 up-regulation. *Cell Biol Int* 42:53-62
245. Shima KR, Ota T, Kato KI, Takeshita Y, Misu H, Kaneko S, Takamura T (2018) Ursodeoxycholic acid potentiates dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by enhancing glucagon-like peptide-1 secretion in patients with type 2 diabetes and chronic liver disease: a pilot randomized controlled and add-on study. *BMJ Open Diabetes Res Care* 6:e000469
246. Shiu RP, Pouyssegur J, Pastan I (1977) Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3840-3844
247. Shu S, Zhu J, Liu Z, Tang C, Cai J, Dong Z (2018) Endoplasmic reticulum stress is activated in post-ischemic kidneys to promote chronic kidney disease. *EBioMedicine* 37:269-280
248. Sicking M, Lang S, Bochen F, Roos A, Drenth JPH, Zakaria M, Zimmermann R, Linxweiler M (2021) Complexity and Specificity of Sec61-Channelopathies: Human Diseases Affecting Gating of the Sec61 Complex. *Cells* 10
249. Smith HL, Li W, Cheetham ME (2015) Molecular chaperones and neuronal proteostasis. *Semin Cell Dev Biol* 40:142-152
250. Stathopoulos PB, Ikura M (2013) Structure and function of endoplasmic reticulum STIM calcium sensors. *Curr Top Membr* 71:59-93

251. Sun M, Kotler JLM, Liu S, Street TO (2019) The endoplasmic reticulum (ER) chaperones BiP and Grp94 selectively associate when BiP is in the ADP conformation. *J Biol Chem* 294:6387-6396
252. Sun Z, Brodsky JL (2019) Protein quality control in the secretory pathway. *J Cell Biol* 218:3171-3187
253. Takatori O, Usui S, Okajima M, Kaneko S, Ootsuji H, Takashima SI, Kobayashi D, Murai H, Furusho H, Takamura M (2017) Sodium 4-Phenylbutyrate Attenuates Myocardial Reperfusion Injury by Reducing the Unfolded Protein Response. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 22:283-292
254. Tanaka K (2009) The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:12-36
255. Tao YX, Conn PM (2018) Pharmacoperones as Novel Therapeutics for Diverse Protein Conformational Diseases. *Physiol Rev* 98:697-725
256. Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2466-2470
257. Thiel A, Grimm MOW, Lauer AA, Winkler J, Lehmann J, Regner L, Nelke C, Janitschke D, Benoist C, Streidenberger O, Stotzel H, Endres K, Herr C, Beisswenger C, Grimm HS, Bals R, Lammert F, Hartmann T (2017) Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid-beta (A β) Formation and Increase A β -Degradation. *Int J Mol Sci* 18
258. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405-496
259. Trombetta ES (2003) The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* 13:77R-91R
260. Tsutsumi S, Gotoh T, Tomisato W, Mima S, Hoshino T, Hwang HJ, Takenaka H, Tsuchiya T, Mori M, Mizushima T (2004) Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11:1009-1016
261. Turano C, Gaucci E, Grillo C, Chichiarelli S (2011) ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell Mol Biol Lett* 16:539-563
262. Tyedmers J, Lerner M, Bies C, Dudek J, Skowronek MH, Haas IG, Heim N, Nastainczyk W, Volkmer J, Zimmermann R (2000) Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7214-7219
263. Uemura A, Oku M, Mori K, Yoshida H (2009) Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *J Cell Sci* 122:2877-2886
264. van Leeuwen W, van der Krift F, Rabouille C (2018) Modulation of the secretory pathway by amino-acid starvation. *J Cell Biol* 217:2261-2271
265. Vassilakos A, Michalak M, Lehrman MA, Williams DB (1998) Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 37:3480-3490
266. Vembar SS, Brodsky JL (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:944-957

267. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA (2002) Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 3:944-950
268. Voorhees RM, Hegde RS (2016) Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. *Science* 351:88-91
269. Walenna NF, Kurihara Y, Chou B, Ishii K, Soejima T, Hiromatsu K (2020) Chlamydia pneumoniae infection-induced endoplasmic reticulum stress causes fatty acid-binding protein 4 secretion in murine adipocytes. *J Biol Chem* 295:2713-2723
270. Walter P, Blobel G (1983) Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell* 34:525-533
271. Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334:1081-1086
272. Wang D, Fang C, Zong NC, Liem DA, Cadeiras M, Scruggs SB, Yu H, Kim AK, Yang P, Deng M, Lu H, Ping P (2013) Regulation of acetylation restores proteolytic function of diseased myocardium in mouse and human. *Mol Cell Proteomics* 12:3793-3802
273. Wang L, Wang X, Wang CC (2015) Protein disulfide-isomerase, a folding catalyst and a redox-regulated chaperone. *Free Radic Biol Med* 83:305-313
274. Wang M, Kaufman RJ (2016) Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529:326-335
275. Ware FE, Vassilakos A, Peterson PA, Jackson MR, Lehrman MA, Williams DB (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem* 270:4697-4704
276. Weiner ID, Mitch WE, Sands JM (2015) Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. *Clin J Am Soc Nephrol* 10:1444-1458
277. Weitzmann A, Baldes C, Dudek J, Zimmermann R (2007) The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *FEBS J* 274:5175-5187
278. Williams DB (2006) Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 119:615-623
279. Wright JM, Zeitlin PL, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB (2004) Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line demonstrates a major influence on heat-shock proteins. *Physiol Genomics* 16:204-211
280. Wu X, Cabanos C, Rapoport TA (2019) Structure of the post-translational protein translocation machinery of the ER membrane. *Nature* 566:136-139
281. Xiao C, Giacca A, Lewis GF (2011) Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and beta-cell dysfunction in humans. *Diabetes* 60:918-924
282. Xu L, Gong W, Cusack SA, Wu H, Loovers HM, Zhang H, Perrett S, Jones GW (2018) The beta6/beta7 region of the Hsp70 substrate-binding domain mediates heat-shock response and prion propagation. *Cell Mol Life Sci* 75:1445-1459
283. Yang J, Zhao Z, Gu M, Feng X, Xu H (2019) Release and uptake mechanisms of vesicular Ca(2+) stores. *Protein Cell* 10:8-19

284. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6:1355-1364
285. Yoda T, Sugita Y, Okamoto Y (2010) Hydrophobic core formation and dehydration in protein folding studied by generalized-ensemble simulations. *Biophys J* 99:1637-1644
286. Yoo J, Mashalidis EH, Kuk ACY, Yamamoto K, Kaeser B, Ichikawa S, Lee SY (2018) GlcNAc-1-P-transferase-tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation. *Nat Struct Mol Biol* 25:217-224
287. Yoo YS, Han HG, Jeon YJ (2017) Unfolded Protein Response of the Endoplasmic Reticulum in Tumor Progression and Immunogenicity. *Oxid Med Cell Longev* 2017:2969271
288. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881-891
289. Yoshimura T, Kameyama K, Takagi T, Ikai A, Tokunaga F, Koide T, Tanahashi N, Tamura T, Cejka Z, Baumeister W, et al. (1993) Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* 111:200-211
290. Zamponi GW, Lory P, Perez-Reyes E (2010) Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch* 460:395-403
291. Zhang C, Tang Y, Li Y, Xie L, Zhuang W, Liu J, Gong J (2017) Unfolded protein response plays a critical role in heart damage after myocardial ischemia/reperfusion in rats. *PLoS One* 12:e0179042
292. Zhang X, Wang Y (2016) Glycosylation Quality Control by the Golgi Structure. *J Mol Biol* 428:3183-3193
293. Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272:1606-1614
294. Zimmermann R, Blatch GL (2009) A novel twist to protein secretion in eukaryotes. *Trends Parasitol* 25:147-150
295. Zimmermann R, Eyrisch S, Ahmad M, Helms V (2011) Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808:912-924
296. Zimmermann R (2016) Components and Mechanisms of Import, Modification, Folding, and Assembly of Immunoglobulins in the Endoplasmic Reticulum. *J Clin Immunol* 36 Suppl 1:5-11
297. Zode GS, Bugge KE, Mohan K, Grozdanic SD, Peters JC, Koehn DR, Anderson MG, Kardon RH, Stone EM, Sheffield VC (2012) Topical ocular sodium 4-phenylbutyrate rescues glaucoma in a myocilin mouse model of primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:1557-1565

7. Danksagung

Zunächst gilt mein ausdrücklicher Dank meinem Universitäts-Professor Dr. rer. nat. Dr. med. Adolfo Cavalié, der mir mit diesem hochinteressanten Thema, sowie seiner stetigen und unermüdlichen Unterstützung die Möglichkeit eröffnete, diese wissenschaftliche Arbeit durchzuführen. Er war für mich über Jahre hinweg ein präsender Ansprechpartner, der sich stets die Zeit nahm, mit mir (und der nötigen Geduld) aufkommende Fragen zu besprechen und mich in jeder Phase der Arbeit zu unterstützen.

Ferner geht mein Dank besonders an Dr. rer. nat. Tillman Pick für das immer zeitnahe Korrekturlesen und die fortwährenden Verbesserungsvorschläge meiner Arbeit, die nützlichen Anregungen und die ganz allgemeine Hilfsbereitschaft bei allen meinen experimentellen Vorhaben. Natürlich gilt mein Dank auch René Tinschert und Dr. Igor Gamayun, die mir jederzeit mit fachlichem Rat zur Seite standen und auch auf einer sehr menschlichen Ebene die Zeiten im Labor bereicherten. Ein herzliches Dankeschön geht auch an Heidi Löhr und Martin Simon-Thomas, insbesondere für die Arbeiten in der Zellkultur und die technische Unterstützung.

Auch meinen Eltern Dagmar und Dr. rer. nat. Wolfgang Bender sei an dieser Stelle großer Dank ausgesprochen: Sie ermöglichten mir, auch über die reguläre Studienzeit hinaus, meinen Traum einer experimentellen Dissertation zu vollenden. Ich danke auch von ganzem Herzen meinen Brüdern Stephan und Christian, die mir stets mit schlaun Sprüchen, wunderbaren Weisheiten und erinnerungswürdigen Erlebnissen den langen Weg bis hier hin erleichterten.

An dieser Stelle geht großer Dank auch an Andrea Thiel für unermüdliches Korrekturlesen, gute Ratschläge und ausdauernden Beistand an meiner Seite über Jahre und über verschiedene Lebensabschnitte meines Lebens hinweg. Dies hat maßgeblich dazu beigetragen diese Arbeit und auch das Medizinstudium erfolgreich zum Abschluss zu bringen und nebenbei auch unvergessliche Erfahrungen in meinem Leben gesammelt haben zu dürfen.

Abschließend will ich mich auch bei all meinen Freunden, Bekannten und vielen anderen Mitgliedern meiner Familie bedanken, die mich über die lange Zeit begleitet haben: Sie bereicherten meinen Alltag während des Studiums und des Berufseinstieges in vielerlei Hinsicht und auf vielfältige Weise und wussten mir in den richtigen Momenten vor Augen zu

Danksagung

führen, dass auch steinige Wege, werden sie nur beharrlich genug beschritten, am Ende zum Ziel führen.

Lieben Dank an all jene, die ich an dieser Stelle nicht namentlich erwähnte und die trotzdem meinen größten Dank verdienen.

Vielen herzlichen Dank euch Allen

8. Curriculum vitae

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