

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Regulation der ER-Translokation sekretorischer
Proteine durch Sekundärstrukturelemente der
Polypeptidkette**



Daniela Dirndorfer

aus

München, Deutschland

2013

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Jörg Tatzelt betreut und von Frau Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 11.06.2013

Dissertation eingereicht am	13.06.2013
1. Gutachterin:	Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer
2. Gutachter:	Prof. Dr. Jörg Tatzelt
Mündliche Prüfung am	08.08.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Import in das Endoplasmatische Retikulum	7
1.1.1	Überblick über ko- und posttranslationale Translokation	7
1.1.2	Regulation der kotranslationalen Translokation	13
1.1.3	Konservierung des kotranslationalen Transportweges zwischen Pro- und Eukaryoten	17
1.2	Qualitätskontrolle im ER	19
1.2.1	ER-Assoziierte Degradierung (ERAD)	19
1.2.2	Stressantwort auf ungefaltete Proteine (UPR)	21
1.3	Neuropeptide	22
1.3.1	Funktion der analysierten Peptidhormone	22
1.3.2	Biogenese	23
1.3.3	Funktion der Prodomäne	25
1.4	Intrinsisch unstrukturierte Proteine	26
1.4.1	Definition	26
1.4.2	Funktion	27
1.4.3	<i>In silico</i> Vorhersage von intrinsisch unstrukturierten Regionen	30
1.5	Mitochondriale Zielsteuerung und duales Targeting	30
1.6	Zielsetzung	35
2	Ergebnisse	37
2.1	Intrinsisch unstrukturierte Proteine sind im humanen Sekretom unterrepräsentiert	37
2.2	Die Neuropeptidhormone TRH, Somatostatin und GnRH werden als intrinsisch unstrukturiert, ihre Prodomäne als α -helikal vorhergesagt	38
2.3	Die isolierte Prodomäne von Somatostatin besitzt die Fähigkeit zur Ausbildung einer α -helikalen Struktur	40
2.4	Eine α -helikale Struktur der Prodomäne begünstigt die ER-Translokation	45
2.4.1	Die Deletion der Prodomäne führt zu einer verringerten oder gehemmten Sekretion der Hormondomäne	45

2.4.2	Ein Austausch der Prodomäne durch heterologe alpha-helikale Domänen kann die sekretionsfördernde Funktion der Prodomäne ersetzen	49
2.4.3	Die Prodomäne ist für eine erfolgreiche ER-Translokation erforderlich	51
2.4.4	Die kotranslationale Zielsteuerung und Bindung an die ER-Membran wird nicht durch eine intrinsisch unstrukturierte Ribosomen-assoziierte Polypeptidkette beeinträchtigt	56
2.5	ER-Signalsequenzen nicht-translozierter Proteine können eine mitochondriale Zielsteuerung vermitteln	62
2.5.1	Die Deletion der Prodomäne von Somatostatin führt zu einer mitochondrialen Lokalisation	62
2.5.2	Mitochondriale Zielsteuerung als Folge eines gescheiterten ER-Imports ..	64
2.5.3	Suche nach einem Motif in ER-Signalsequenzen mitochondrial-lokalisierter Mutanten	66
2.6	Ineffiziente periplasmatische Lokalisation von intrinsisch unstrukturierten Domänen in Prokaryoten	71
3	Diskussion	75
3.1	Unterrepräsentation von intrinsisch unstrukturierten Proteinen im ER – ein evolutionär konservierter Mechanismus?	75
3.2	Alpha-helikale Prodomänen fördern die ER-Translokation von intrinsisch unstrukturierten Neuropeptidhormonen	78
3.3	Möglicher Einfluss von <i>cis</i> -Faktoren der Polypeptidkette auf den Translokationsprozess	80
3.4	Möglicher Einfluss von <i>trans</i> - Faktoren auf die ER-Translokation intrinsisch unstrukturierter versus strukturierter Proteine	83
3.5	ER-Signalsequenzen können eine mitochondriale Zielsteuerung vermitteln	86
3.6	Nutzen und pathophysiologische Konsequenzen von dualem Targeting	90
4	Zusammenfassung	95
5	Material	97
5.1	Biologisches Material	97
5.1.1	Bakterienstämme	97
5.1.2	Zelllinien	97
5.2	Plasmide und Oligonukleotide	98

5.2.1	Plasmide	98
5.2.2	Synthetische Oligonukleotide.....	98
5.3	Small interfering RNA (siRNA)	102
5.4	Antikörper.....	102
5.5	Standardgrößenmarker für Proteine und Nucleinsäuren.....	102
5.6	Biologische Reagenzien.....	103
5.7	Chemische Reagenzien	103
5.8	Lösungen und Puffer.....	106
5.8.1	Allgemein	106
5.8.2	Puffer für die radioaktive Markierung in Bakterien	110
5.8.3	Puffer zur Aufreinigung der Somatostatin-Produktionsdomäne	110
5.9	Medien	111
5.9.1	Allgemein	111
6.9.2	Medien und Stammlösungen für die radioaktive Markierung in Bakterien.....	111
5.10	Kits	113
5.11	Geräte	114
5.12	Sonstige Materialien	116
6	Methoden	119
6.1	Molekularbiologische Methoden.....	119
6.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	119
6.1.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	121
6.1.3	Restriktion und Ligation.....	122
6.1.4	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	123
6.1.5	Transformation	124
6.1.6	DNA-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	124
6.1.6.1	Präparation von neu klonierter Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)	124
6.1.6.2	Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab (Midi- Präparation)	125
6.1.7	Neu generierte Konstrukte	126
6.2	Zellkultur	127
6.2.1	Zellkultivierung	127
6.2.2	Zellpassagierung.....	127
6.2.3	Ausplattieren von Zellen.....	127

6.2.4	Transfektion von Zellen.....	128
6.2.5	Zellernte	129
6.3	Proteinbiochemische Methoden	129
6.3.1	<i>In vitro</i> Transkription.....	129
6.3.2	<i>In vitro</i> Translation, Translokation und PK-Protektion	130
6.3.3	<i>In vitro</i> Targeting-Assay	131
6.3.4	Rekombinante Expression und Aufreinigung der Prodomäne von Somatostatin	132
6.3.5	CD-Analyse	133
6.3.6	Coomassie-Färbung.....	134
6.3.7	Western Blot Analyse.....	134
6.3.7.1	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten.....	134
6.3.7.2	Gewinnung des postnukleären Überstandes	135
6.3.7.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	135
6.3.6.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... (SDS-PAGE) nach Lämmli.....	135
6.3.6.5	Schägger-Gele	136
6.3.6.6	Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot)	136
6.3.6.7	Ponceau-Färbung.....	136
6.3.6.8	Immundetektion.....	137
6.3.6.9	Visualisierung und Quantifizierung.....	137
6.3.8	Spezielle Proteinanalytik	138
6.3.8.1	Nachweis der Sekretion	138
6.3.8.2	Nachweis des proteasomalen Abbaus von Proteinen.....	138
6.3.8.3	Deglykosylierung von Proteinen.....	138
6.3.8.4	Digitonin-Solubilisierungs-Assay.....	139
6.3.8.5	Radioaktive Markierung von Proteinen mit L-[³⁵ S]Methionin	139
6.3.8.5.1	Säuger-Zellen.....	139
6.3.8.5.2	Bakterien	140
6.3.8.6	Immunfluoreszenz-Analyse	142
6.3.8.7	SEC61A1-Knockdown mittels RNA-Interferenz	143
6.3.8.8	Bioinformatische Analysen	143
6.3.8.9	Statistische Auswertung	144
7	Bibliographie	145
8	Abkürzungsverzeichnis.....	163

9 Veröffentlichungen	167
Danksagung	169

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Prodomäne in der Biogenese von Neuropeptid-Hormonen untersucht. Genauer wurde der Import der hormonellen Protein-Vorläufer in das Endoplasmatische Retikulum (ER) in Abhängigkeit von alpha (α)-helikalen Domänen oder intrinsisch unstrukturierten Segmenten analysiert. In der Einleitung soll hier deshalb ein Überblick über Themen wie ER-Import, Proteinstruktur und Peptidhormon-Biogenese gegeben werden. Zudem werden die in dieser Arbeit verwendeten Peptidhormone kurz charakterisiert. Da in dieser Arbeit zusätzlich ein neuartiger dualer Zielsteuerungsmechanismus von sekretorischen Proteinen charakterisiert wird, soll hier zudem auf den Mechanismus der mitochondrialen Zielsteuerung und dem Phänomen der multiplen Zielsteuerung eingegangen werden.

1.1 Import in das Endoplasmatische Retikulum

1.1.1 Überblick über ko- und posttranslationale Translokation

Die meisten Membran- und sekretorischen Proteine in Eukaryoten werden kotranslational in das Endoplasmatische Retikulum ER importiert (Shao and Hegde, 2011b; Zimmermann et al., 2011). Dabei wird die N-terminale, hydrophobe Signalsequenz dieser Proteine durch den Signal-Erkennungs-Partikel (*Signal Recognition Particle*, SRP) gebunden, sobald diese aus dem ribosomalen Tunnel herausragt (Halic and Beckmann, 2005; Rapoport, 2007; Wild et al., 2004). Cytosolisch-lokalisierte Proteine ohne Signalsequenz werden möglicherweise von dem naszierenden Polypeptid-assoziierten Faktor (NAC) gebunden, welcher das unfertige Polypeptid vor unspezifischen Bindungen im Cytosol abschirmt (Wang et al., 1995; Wiedmann et al., 1994). Die Signalsequenz kann eine abspaltbare Signalsequenz (SS) im Fall von sekretorischen Proteinen oder eine sogenannte Signal-Anker-Sequenz sein, welche zusätzlich neben der Zielsteuerung von Membranproteinen als Transmembrandomäne fungiert (Sakaguchi et al., 1992).

ER-Signalsequenzen (ER-SS) besitzen folgende charakteristische Eigenschaften: eine Länge von ca. 20-30 Aminosäuren (aa) und eine typische Struktur aus drei Domänen, einer basischen N-terminalen Domäne, eine 7-13 aa lange hydrophobe Domäne und eine teilweise polare C-terminale Domäne. Der hydrophobe Kern hat sich dabei, unabhängig

von der Primärsequenz, als essentielles Charakteristikum für die Erkennung durch SRP herausgestellt (von Heijne, 1985).

Der Signal-Erkennungs-Partikel SRP ist ein Ribonukleoprotein-Komplex bestehend aus RNA und Protein, wobei die Proteinkomponente, genauer die M-Domäne des Partikels maßgeblich an der Erkennung und Bindung der Signalsequenz beteiligt ist (Halic and Beckmann, 2005). Die Bindung von SRP an die SS der naszierenden Polypeptidkette vermittelt in Eukaryoten einen temporären Translations-Arrest (Chang et al., 1997; Halic and Beckmann, 2005). Die Zielsteuerung des tertiären Komplexes aus Ribosomen-assoziiierter Polypeptidkette (*Ribosome Nascent Chain Complex*, RNC) und SRP wird durch eine Interaktion von SRP mit dessen membrangebundenem Rezeptor (SRP-Rezeptor, SR) an die Membran zielgesteuert (Abb. 1). Der SR besteht aus zwei Untereinheiten (SR α und SR β), wobei die mit SRP interagierende Untereinheit SR α wie SRP selbst eine GTPase-Domäne besitzt. Die GTPase-Aktivität von SRP und SR α ist essentiell für die Interaktion der beiden Komponenten und die Regulation des zeitlichen Ablaufs der Ereignisse an der Membran (Halic et al., 2006; Shan et al., 2004). Nach der Rekrutierung des RNC durch Interaktion des SR α mit SRP und dem Ribosom an die ER-Membran (Mandon et al., 2003), erfolgt der Transfer des Ribosoms auf den Translokationskomplex Sec61. Die Interaktion der SS mit dem hydrophilen, trimeren Translokationskanal Sec61 $\alpha\beta\gamma$ vermittelt eine Öffnung des Kanals (*Translocon Gating*), eine Positionierung und Insertion der naszierenden Polypeptidkette (Gorlich and Rapoport, 1993; Jungnickel and Rapoport, 1995; Kalies et al., 1994). Durch die Freisetzung von SRP kann die Translation des Proteins durch den Translokationskanal fortgesetzt werden. Hierbei wurde vorgeschlagen, dass die translatierende Polypeptidkette die Haupt-Antriebskraft für den vektoriellen Transport durch die Membran darstellt (Rapoport, 2007).

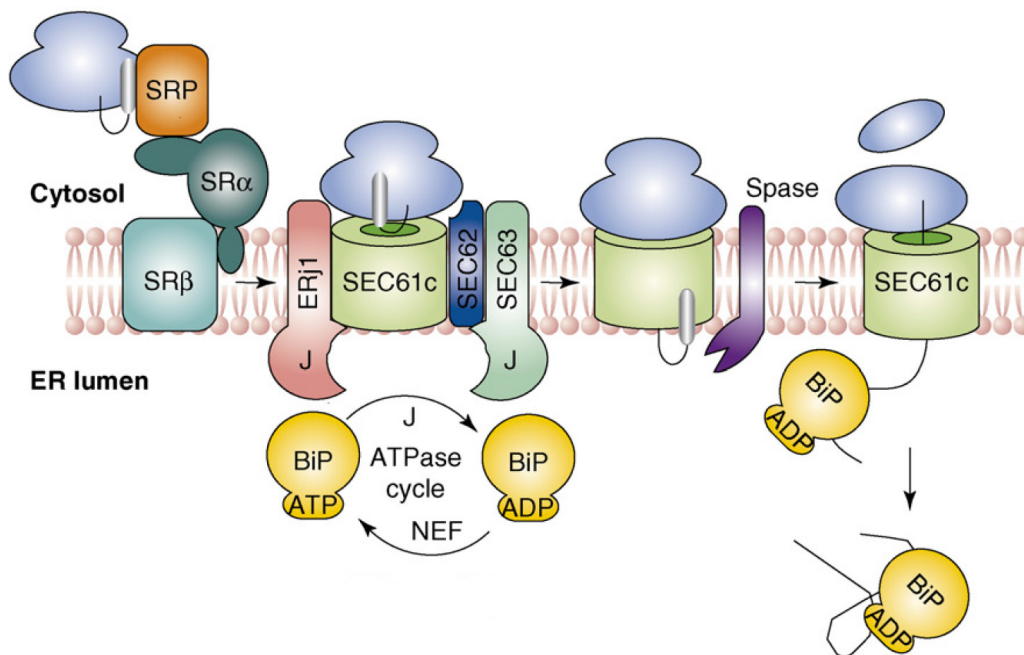


Abb. 1: Schematische Darstellung des kotranslationalen Transports von Vorläufer-Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Der kotranslationale Transport umfasst drei essentielle Schritte (von links nach rechts): Die Membranassoziation, die Insertion in die Membran und die vollständige Translokation des Zielproteins. Der erste Schritt besteht aus der spezifischen Erkennung der Signalsequenz durch SRP und die Interaktion von SRP mit dessen membrangebundenem Rezeptor SR. Der zweite und dritte Schritt beinhalten die Interaktion der Polypeptidkette mit dem zentralen Translokationskanal Sec61 (SEC61c) und den assoziierten Proteinen Sec63 (SEC63) und ERJ1, welche mit Hilfe ihrer J-Domäne (J) eine Verbindung zu dem ATPase-Zyklus des ER-luminalen Chaperons BiP darstellen. Nukleotid-Austausch-Faktoren (NEF) unterstützen BiP in der Beendigung seines funktionalen Zyklus. Typischerweise wird die Signalsequenz des zu translozierenden Proteins während der Translokation durch die Signalpeptidase (Spase) abgeschnitten. Modifiziert nach (Zimmermann et al., 2006)

Während des kotranslationalen Transports werden ER-luminale bzw. sekretierte Proteine vollständig durch die Translokationspore in das ER-Lumen transportiert, während Membranproteine mit mehreren Transmembrandomänen (polytopische Membranproteine) sequentiell in die ER-Membran inseriert werden (Rapoport, 2007).

Die seitliche Insertion von Transmembrandomänen (TMDs) in die Phospholipid-Membran geschieht durch eine partielle laterale Öffnung des Translokationskanals Sec61, welcher vermutlich kontinuierlich zwischen einer Öffnung und Schließung des sogenannten „lateralen Tors“ wechselt (Devaraneni et al., 2011; Skach, 2009) (Abb. 2). Die Permeabilitätsbarriere der Membran wird dabei auch bei einer Öffnung des Kanals, z.B.

bei der Translation von cytosolen Schleifen (*Loops*) zwischen zwei TMDs, beibehalten. Dies geschieht während der Translation vermutlich durch Verschließung des Kanals durch die naszierende Polypeptid-Kette (Rapoport, 2007). Während der Translokation wird die Polypeptidkette dabei durch den sogenannten „Porenring“ umgeben (Abb. 2). Dieser wird aus den Seitenketten der umgebenden Transmembran-Helices der Translokationspore gebildet und verhindert dadurch die Passage von kleinen Molekülen während der Translokation (Van den Berg et al., 2004). Es wurde vorgeschlagen, dass beim Verlassen der Polypeptidkette aus dem Kanal, z.B. nach Beendigung der Translation oder bei der Insertion von TMDs, eine Transmembrandomäne des Kanals selbst, die sogenannte „Plug“-Domäne, die Verschließung übernimmt (Van den Berg et al., 2004) (Abb. 2).

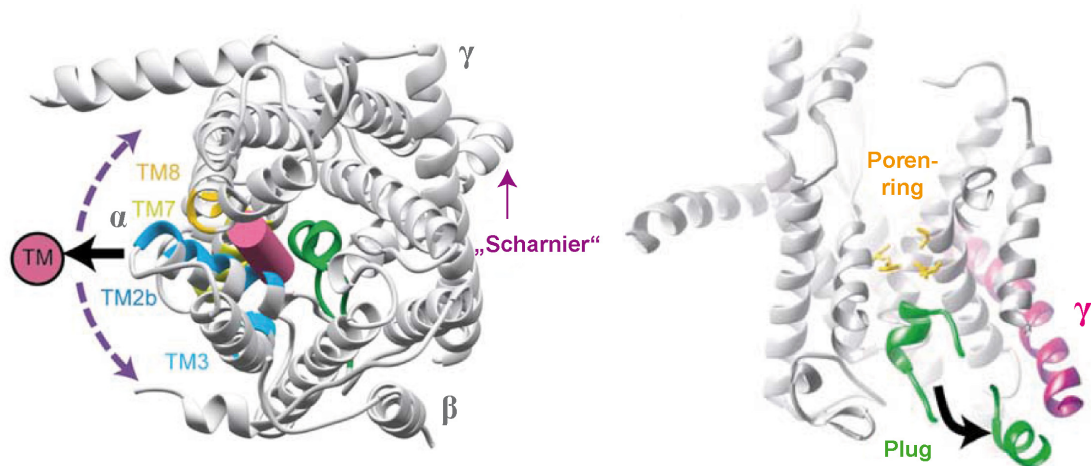


Abb. 2: Kristallstruktur des Translokationskanals aus *Methanococcus jannaschii*. Links: Aufsichtsansicht des Archae-bakteriellen Translokationskanals SecYEG, welcher das Homolog des eukaryotischen Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Translokons darstellt. Gezeigt sind die mit der Signalsequenz interagierenden und an der lateralen Öffnung des Kanals beteiligten Transmembran-Helices (TM, gelb und blau). Für eine laterale Membran-Insertion einer TM der zu translozierende Polypeptidkette (rosa Zylinder) in die Membran wird die laterale Seite der Translokationspore mit Hilfe einer gegenüberliegenden beweglichen Transmembran-Helix, welche als „Scharnier“ wirkt, geöffnet. Die Öffnung ist durch gestrichelte Pfeile angedeutet. Die „Plug“-Domäne, welche durch eine Transmembranhelix der α -Untereinheit gebildet wird, ist in grün dargestellt. Rechts: Seitenansicht: Die Bewegung der „Plug“-Domäne in Richtung der γ -Untereinheit (γ , in rosa) bei der lateralen Öffnung des Kanals ist angedeutet. Der hydrophobe „Porenring“, welcher die Polypeptidkette während der Translokation umgibt, wird durch die Seitenketten (gelb) der umliegenden Transmembran-Helices des Kanals gebildet. Modifiziert nach (Van den Berg et al., 2004)

Einige Publikationen deuten daraufhin, dass BiP auf der luminalen Seite der Membran durch eine Interaktion mit dem Translokationskanal zu einer Verschließung des Kanals beiträgt (Hamman et al., 1998; Schauble et al., 2012). Die Translokation-assoziierten Hsp40-Proteine Sec63 und ERj1 besitzen beide eine luminaire J-Domäne, durch welche sie die Bindung des luminalen Hsp70-Proteins BiP an die naszierende Polypeptidkette regulieren (Benedix et al., 2010) (Abb. 1). BiP ist an der Faltung der meisten Proteine im ER beteiligt (Gething, 1999). Zudem sind Sec62 und ERj1 womöglich beide in der Lage durch eine direkte Interaktion mit dem translatierenden Ribosom die Translation zu inhibieren, wenn BiP abwesend ist. Dies gestattet eine Kommunikation zwischen ER-luminalen BiP und translatierenden Ribosomen und verbindet die Proteinsynthese mit der Translokation (posttranslationaler Import) bzw. Faltung (kotrationaler Import) der Polypeptidkette (Benedix et al., 2010; Dudek et al., 2005; Zimmermann et al., 2006).

Neben der SRP-abhängigen, kotranslationalen Zielsteuerungsrouten existiert auch eine SRP-unabhängige Zielsteuerung von sekretorischen und Membranproteinen mit N-terminalen Signalsequenzen. Es wird vermutet, dass lediglich ca. 20 % aller sekretorischen und Membranproteine in Säugern durch diesen Weg an die ER-Membran zielgesteuert werden (del Alamo et al., 2011). In Hefe schließt dieser Transportweg eine deutlich größere Anzahl von Proteinen mit ein. Diese Proteine sind meist durch eine schwächer hydrophobe Signalsequenz gekennzeichnet und werden daher nicht effizient von SRP gebunden (Ng et al., 1996). Die SS-tragenden Proteine werden vollständig im Cytosol translatiert und anschließend posttranslational durch cytosolische Chaperone der Hsp70 und Hsp40-Familie (Deshaies et al., 1988; Ngosuwana et al., 2003) in einem ungefalteten, Translokations-kompetenten Zustand gehalten und Signalsequenz-abhängig an die ER-Membran zielgesteuert. Dort werden sie ebenfalls wie die SRP-abhängigen Substrate durch die Translokationspore Sec61 transportiert.

Für die Translokation werden jedoch zusätzliche Komponenten des Sec-Translokase-Komplexes benötigt, Sec62 und Sec63 (Abb. 3). Diese Komponenten wurden erstmals in Hefe entdeckt (Deshaies et al., 1991), sind aber bereits auch in Säugerzellen charakterisiert worden (Lang et al., 2012; Meyer et al., 2000).

Die Translokation durch den Sec61-Kanal erfolgt dabei mit Hilfe der Membrankomponenten Sec62 und Sec63 sowie des ubiquitären ER-luminalen Hsp70-Chaperons BiP. Dabei interagiert BiP in seinem ATP-gebundenen Zustand mit der J-Domäne von Sec63. Nach ATP-Hydrolyse interagiert BiP in seinem ADP-gebundenen Zustand mit der translozierenden Polypeptidkette. Im Anschluss wird das zu translozierende Protein durch sequenzielles Binden von BiP-Molekülen in das ER

„hineingezogen“. BiP wird deshalb in Hinblick auf seine Funktion in der posttranslationalen Translokation auch als „molekulare Ratsche“ bezeichnet (Park and Rapoport, 2012; Zimmermann et al., 2011) (Abb. 3).

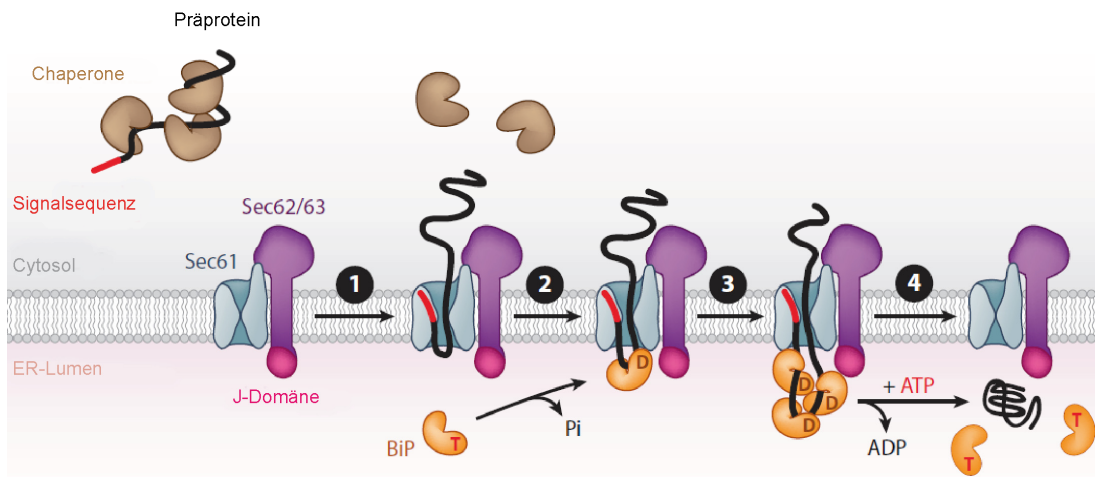


Abb. 3: Model der posttranslationalen Translokation in Eukaryoten. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Schritte in der posttranslationalen Translokation eines sekretorischen Proteins. Schritt 1: Nach der vollständigen Synthese des Proteins im Cytosol bindet das Protein, begleitet von cytosolischen Chaperonen, an den eukaryotischen Sec-Komplex, bestehend aus dem Translokationskanal Sec61 und dem Sec62/Sec63-Komplex. Die Chaperone, welche die Polypeptidkette in einem entfalteten, translokationskompetenten Zustand halten, werden vor der Translokation von der Polypeptidkette freigesetzt. Schritt 2: BiP interagiert in einem ATP-gebundenen Zustand (T) mit der J-Domäne von Sec63. Nach der ATP-Hydrolyse interagiert BiP in einem ADP-gebundenen Zustand (D) mit der teilweise translozierten Polypeptidkette, wobei es ein Zurückrutschen letzterer verhindert. Schritt 3: Sobald die Polypeptidkette weiter in das ER-Lumen hineinragt, bindet das nächste BiP-Molekül. Dieser Prozess wiederholt sich solange bis das Protein vollständig ins ER-Lumen transloziert wurde. Schritt 4: Durch einen Nukleotidaustausch wird BiP von der Polypeptidkette gelöst. (Park and Rapoport, 2012)

Wie bereits erwähnt, wird vermutlich nur ein kleiner Teil des ER-Transports in Säugern posttranslational mediert. Es wurde gezeigt, dass Proteine mit einer Länge von <75-100 Aminosäuren durch diesen Weg transportiert werden, vermutlich da ihre Länge nicht ausreicht, um eine kotranslationale Zielsteuerung der naszierenden Polypeptidkette durch eine effiziente Bindung von SRP zu ermöglichen (Lakkaraju et al., 2012; Zimmermann et al., 1990b). Die andere Fraktion posttranslational zielgesteuerter Proteine umfasst die Gruppe der C-terminal Membran-verankerten Proteine (*Tail-anchored proteins*) (Hegde and Keenan, 2011). Diese umfassen ca. 3-5 % der in die Membran integrierten

Membranproteine (Beilharz et al., 2003; Kalbfleisch et al., 2007) und werden durch spezifische Faktoren an die Membran geleitet. Hierbei konnte die cytosolische ATPase TRC-40 (Get3 in Hefe) als Zielsteuerungsfaktor und eine weitere Komponente als Membran-Rezeptor (Get1/2 in Hefe) identifiziert werden (Mariappan et al., 2010; Mariappan et al., 2011; Mateja et al., 2009; Stefanovic and Hegde, 2007). Es ist jedoch noch unklar, ob die C-terminal Membran-verankerten Proteine anschließend spontan in die Membran inserieren oder zusätzliche Translokations-Faktoren bzw. den universalen Translokations-Komplex Sec61 benötigen (Brambillasca et al., 2006; Johnson et al., 2012; Shao and Hegde, 2011b; Stefanovic and Hegde, 2007). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die TA-Insertion Sec61-unabhängig erfolgt (Lang et al., 2012). Zusätzlich konnte in Hefe gezeigt werden, dass GPI-verankerte Proteine häufig SRP-unabhängig bzw. posttranslational transloziert werden (Ast et al., 2013).

1.1.2 Regulation der kotranslationalen Translokation

Die korrekte Lokalisierung von sekretorischen Proteinen in der Zelle ist essentiell. Dies wird durch Studien deutlich, welche belegen, dass mislokalisierte, sekretorische Proteine im Cytosol eine cytotoxische Aktivität aufweisen können. Ein Beispiel sind cytosolisch-lokalisierte Varianten des Prion-Proteins (PrP) (Ma et al., 2002b; Rambold et al., 2006a; Rane et al., 2004). Die Toxizität von cytosolisch-lokalisiertem PrP (cytoPrP) könnte hierbei durch eine Rekrutierung von zellulären Schlüsselfaktoren hervorgerufen werden (Chakrabarti and Hegde, 2009; Rambold et al., 2006b). Zudem ist beschrieben, dass cytosolisch-fehllokalisierte Proteine aggregieren können und dadurch möglicherweise die Aktivität des Proteasoms beeinträchtigen (Chakrabarti et al., 2011; Deriziotis et al., 2011). Zusätzlich zu diesen „gain-of-function“- Mechanismen, kann das mislokalisierte Protein meist seine Funktion nicht mehr ausführen („loss-of-function“).

Die Regulation der kotranslationalen Zielsteuerung von sekretorischen Proteinen beginnt bei der Bindung von SRP an die Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette und endet bei der durch intrinsisch- und extrinsische Faktoren regulierten Translokation an der ER-Membran. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Bindung von SRP an translatierende Ribosomen (RNCs) nicht so selektiv erfolgt, wie bisher angenommen (Zhang et al., 2010) und die Affinität von SRP zu Ribosomen mit „inkorrekten“ Substraten oder leeren Ribosomen noch beachtlich hoch ist. In dieser Studie konnte gezeigt werden,

dass mehr als 75 % der inkorrekten Substrate in einem ersten Schritt von SRP gebunden werden (Abb. 4, Pfeil a). Eine Prä-Rekrutierung von SRP an translatierende Ribosomen unabhängig von einem korrekten Substrat erhöht möglicherweise die Effizienz der SRP-abhängigen Translokation (Hegde and Kang, 2008). Die nachfolgenden Schritte der Zielsteuerung stellen zusätzliche Kontrollpunkte dar, um inkorrekte Substrate aus diesem Signalweg auszuschließen. Dabei stellte sich die Bindung von SRP an den membrangebundenen Rezeptor SR als zweiter Kontrollpunkt heraus. Inkorrekte Substrate scheinen hierbei zu einem instabileren SRP-SR Komplex zu führen (Abb. 4, Pfeil b). Zudem erwies sich die Konformationsänderung des Komplexes von der „offenen“ zur „geschlossenen“ Konformation als bis zu 40 % langsamer als bei korrekten Substraten (Abb. 4, Pfeil c). Der letzte Kontrollschritt findet durch die Diskriminierung inkorrektter Substrate durch eine vorzeitige Dissoziation von SRP und SR durch GTP-Hydrolyse statt. Für korrekte Substrate konnte eine verzögerte GTP-Hydrolyse beobachtet werden (Abb. 4, Pfeil d). In Abb. 4 B sind die einzelnen Kontrollschritte nochmals zusammengefasst. Obwohl diese Analyse in Bakterien durchgeführt wurde, geht man von einer sehr ähnlichen Situation im eukaryotischen System aus, da der kotranslationale Transportweg hochkonserviert ist (siehe Punkt 1.1.3).

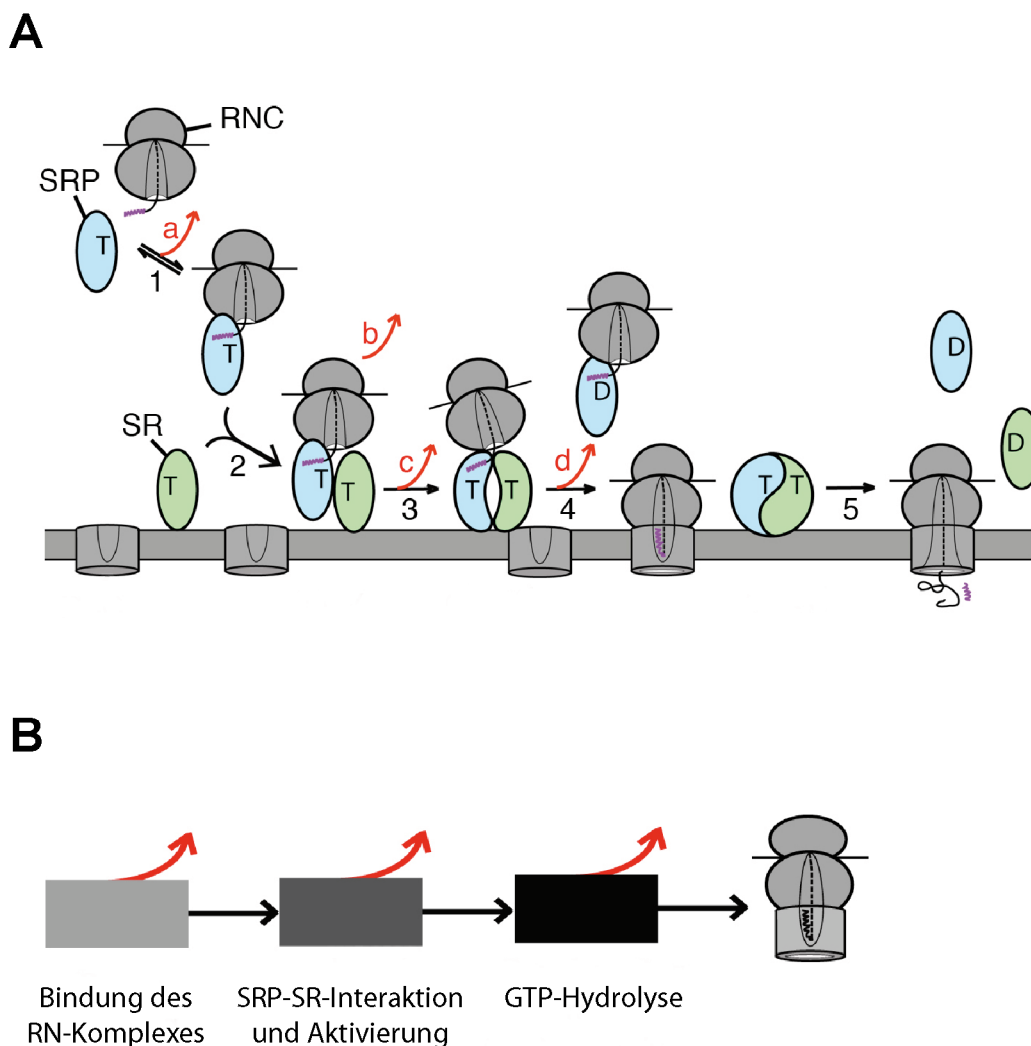


Abb. 4: Darstellung potenzieller Kontrollpunkte während der kotranslationalen Zielsteuerung. (A) Der Komplex aus Ribosom und naszierender Polypeptidkette (RNC) wird durch Bindung des Signalerkennungspartikels (SRP) an die Signalsequenz (magenta) an den SRP-Rezeptor (SR) gesteuert. Der RNC wird in jedem Schritt (1-4) entweder weiter in dem Signalweg gehalten (schwarze Pfeile) oder zurückgewiesen (rote Pfeile). Die einzelnen Kontrollschritte sind im Text näher beschrieben und in (B) nochmals zusammengefasst. T: GTP, D: GDP. (Zhang et al., 2010)

Die Translokationsmaschinerie stellt einen anderen wichtigen Kontrollpunkt dar. In vielen Studien wurde eine Funktion der Signalsequenz nach der Zielsteuerung belegt (Hegde and Bernstein, 2006; Hegde and Kang, 2008). Dabei ist die Signalsequenz nicht nur an der Bindung des Ribosoms an das Translokon, sondern auch an dessen Öffnung, des sogenannten „Translocon-Gating“ beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Signalsequenzen unterschiedliche Effizienzen bei der Öffnung des Translokationskanals aufweisen (Belin et al., 1996; Kim et al., 2002).

Die unterschiedliche Gating-Effizienz scheint dabei auf die mature Domäne des zu translozierenden Proteins abgestimmt zu sein, wobei einige Proteine, wie z.B. das Prion-Protein, nur in Verbindung mit einer Signalsequenz mit hoher *Gating*-Aktivität effizient ins ER transloziert werden können (Kim et al., 2002).

Viele Proteine benötigen für eine effiziente Translokation zusätzliche Hilfsfaktoren, wie z.B. das Translokon-assoziierte Membranprotein TRAM (Jungnickel and Rapoport, 1995; Voigt et al., 1996b). Die Interaktion von TRAM mit der zu translozierenden Polypeptidkette ist ebenfalls Signalsequenz-abhängig. Es gibt Hinweise darauf, dass TRAM neben der Signalsequenz noch andere spezifische Sequenzen der naszierenden Polypeptidkette erkennen kann und während des Translokationsprozesses ins Cytosol ragende Teile der Polypeptidkette abzuschirmen vermag (Hegde et al., 1998b). Beispiele für eine TRAM-regulierte Translokation sind das Apolipoprotein B (Apo B) und das Prion-Protein (PrP). Ein weiterer Faktor für die erfolgreiche Initiation der Translokation von vielen Substraten ist das Translokon-assoziierte-Protein TRAP. TRAP wirkt ebenso wie TRAM Signalsequenz- bzw. Substrat-spezifisch, wobei die Gating-Effizienz der Signalsequenz invers mit der TRAP-Abhängigkeit eines Substrates korreliert (Fons et al., 2003a).

Desweiteren wurde eine Regulation der Translokation durch die Signalsequenz unter ER-Stressbedingungen beschrieben (Kang et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen gewisse Signalsequenzen nicht mehr in der Lage sind eine erfolgreiche Translokation der matura Domäne zu vermitteln (regulierte SS), während andere weiterhin eine Translokation gewährleisten (konstitutive SS). Diese Reaktion wird möglicherweise durch eine limitierte Verfügbarkeit von BiP, welches unter ER-Stressbedingungen an mißgefaltete Proteine im ER rekrutiert wird, signalisiert (Oyadomari et al., 2006). Die Daten dieser Studie deuten daraufhin, dass nicht- oder ineffektiv translozierte Proteine während der kotranslationalen Translokation von dem Hsp40-Cochaperon P58^{IPK} gebunden werden können. Dieses Protein wird während der Antwort auf ungefaltete Proteine im ER aktiviert und vermittelt möglicherweise einen kotranslationalen, proteasomalen Abbau der nicht-effizient translozierten Proteine (Miesbauer et al., 2009; Oyadomari et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass Zellen eine Möglichkeit besitzen während transienten Störungen der ER-Homöostase, die Translokation bestimmter Substrate bereits während der Translokation zu regulieren und somit einen Protein-Überfluss im ER zu verhindern.

Zudem konnte gezeigt werden, dass neben der Signalsequenz auch die Sekundärstruktur der matura Domäne der naszierenden Polypeptidkette einen Einfluss auf die ER-

Translokation ausübt. Modellsubstrate des Prion-Proteins (PrP) bestehend aus intrinsisch-unstrukturierten Domänen konnten nicht ins ER transloziert werden und wurden anschließend im Cytosol proteasomal degradiert. Im Gegensatz dazu wurden PrP-Mutanten, welche hauptsächlich aus α -helikalen Domänen bestanden, mit der gleichen Signalsequenz effizient ins ER transportiert und die Fusion α -helikaler Domänen an intrinsisch unstrukturierte Mutanten, konnte den ER-Import wiederherstellen. Ein Austausch der PrP-SS durch eine hydrophobere Signalsequenz konnte den ER-Import von intrinsisch unstrukturierten Proteinen jedoch nicht verbessern. Dies deutet daraufhin, dass die Regulation durch die Sekundärstruktur möglicherweise einen dominanten Effekt gegenüber der Regulation durch die Signalsequenz darstellt (Heske et al., 2004; Miesbauer et al., 2009).

1.1.3 Konservierung des kotranslationalen Transportweges zwischen Pro- und Eukaryoten

Die Hauptroute für den Protein-Transport von sekretorischen Präproteinen und Membranproteinen über bzw. in die Cytoplasma-Membran in Bakterien bildet der Sec-Translokase-Komplex (Driessen and Nouwen, 2008). Dieser Komplex besteht aus einem hydrophilen Kanal, dem SecYEG-Komplex und einer peripher assoziierten Komponente, welche die Energiequelle für den Transport darstellt. Diese Komponente bildet im Falle des kotranslationalen Transports das translatierende Ribosom selbst, im Falle des posttranslationalen Transports das ATP-getriebene Motorprotein SecA (Driessen and Nouwen, 2008) (Abb. 5).

Die meisten Membranproteine sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten werden kotranslational in die Membran integriert (Luirink and Sinning, 2004). Der Signalerkennungspartikel SRP vermittelt dabei die Zielsteuerung durch Bindung an die N-terminale, hydrophobe Signalsequenz der naszierenden Proteine. Dadurch wird das Protein in Eukaryoten an die ER-Membran oder in Bakterien an die Cytoplasmamembran zielgesteuert. Die Zielsteuerungs-Komponenten des kotranslationalen Transportweges sowie die Translokationspore sind evolutionär hochkonserviert (Luirink and Sinning, 2004). Der bakterielle Signal-Erkennungs-Partikel SRP besteht wie sein eukaryotisches Gegenstück aus einer RNA- und einer Proteinkomponente, wobei es ein deutlich kürzeres RNA-Molekül und nur ein assoziiertes Protein (*SRP Fifty-four homolog*, Ffh), statt 6

assoziierte Proteine in Eukaryoten, besitzt. Das eukaryotische SR-Pendant in Prokaryoten bildet das FtsY-Molekül, welches jedoch nicht Membran-verankert, sondern lediglich peripher mit Lipiden der Membran assoziiert ist (Bahari et al., 2007; de Leeuw et al., 2000). Das Pendant des Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Translokons ist in Bakterien der trimere Translokationskanal SecYEG (Luirink and Sinning, 2004).

In *E. coli* werden im Unterschied zum eukaryotischen System die meisten sekretorischen Proteine, wie periplasmatische Proteine und Proteine der äußeren Membran, über einen SRP-unabhängigen Transportweg durch das molekulare Chaperon SecB an das Translokon zielgesteuert und dort mit Hilfe der ATPase SecA posttranslational transloziert (Driessen et al., 2001; Driessen and Nouwen, 2008).

Die Unterscheidung zwischen SRP- und SecB-abhängigem Transport erfolgt durch die Bindungsspezifität von SRP an hydrophobe Signalankersequenzen der Membranproteine sowie durch Bindung des Ribosomen-assoziierten molekularen Chaperons Trigger-Faktor an naszierende Polypeptidketten sekretorischer Proteine (Maier et al., 2005; Muller et al., 2001). Die Signalankersequenzen der Membranproteine bzw. der SRP-Substrate sind im Vergleich zu den Signalsequenzen sekretorischer Proteine deutlich länger und hydrophober (Lee and Bernstein, 2001; Valent et al., 1997).

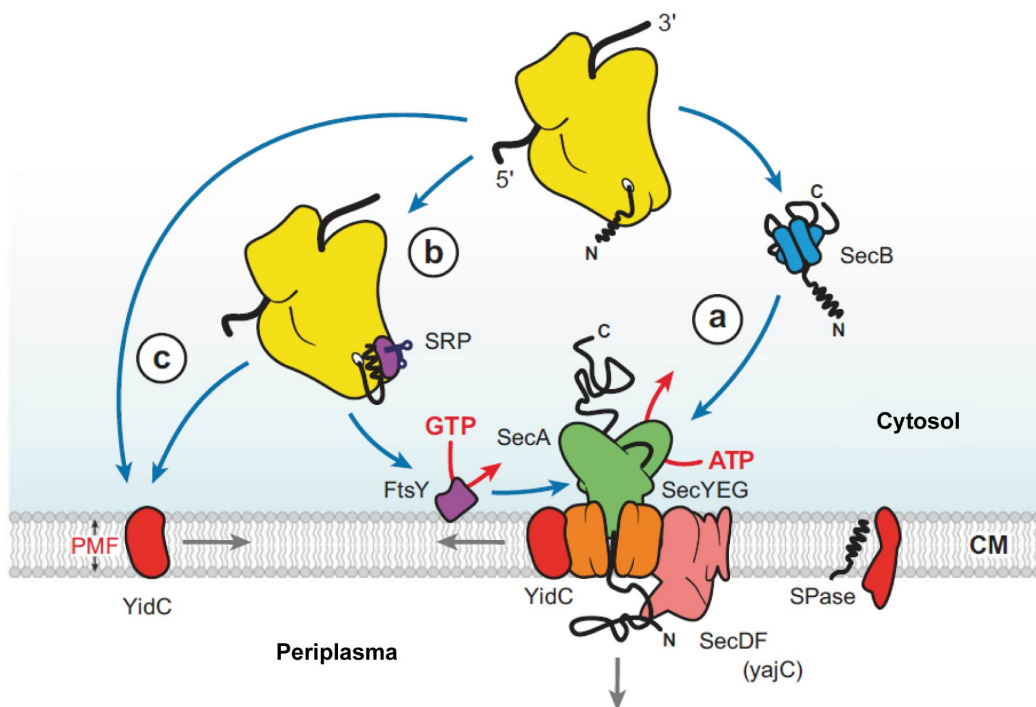


Abb. 5: Schematische Darstellung der Zielsteuerung von sekretorischen und Membranproteinen an die Cytoplasma-Membran von Bakterien. Der bakterielle Sec-Translokase-Komplex besteht aus dem Translokationskanal SecYEG (orange), dem peripheren Motor-Protein SecA (grün) und den Hilfsfaktoren SecDF (yajC, rosa) und YidC (rot). Die Signalpeptidase (SPase) ist für das Abschneiden der Signalsequenz von Präproteinen auf der periplasmatischen Seite der Membran verantwortlich. (a) Sekretorische Proteine werden posttranslational an die Sec-Translokase zielgesteuert. Die Zielsteuerung basiert entweder auf einer direkten Interaktion der Signalsequenz der Polypeptidkette mit SecA oder wird durch eine Interaktion von SecB (blau) und SecA vermittelt. (b) Membranproteine und einige sekretorische Proteine werden kotranslational durch die Interaktion von SRP und dem bakteriellen SRP-Rezeptor FtsY (beide lila) an den Sec-Translokase-Komplex geleitet. (c) Einige Membranproteine werden durch die bakterielle Insertase YidC in die Membran inseriert. PMF (*Proton Motive Force*), protonengetriebene Kraft. Modifiziert nach (Driessen and Nouwen, 2008)

1.2 Qualitätskontrolle im ER

In den vorangegangenen Abschnitten wurden mehrere Kontroll-Mechanismen beschrieben, welche eine erfolgreiche Zielsteuerung und ER-Translokation von sekretorischen- und Membranproteinen gewährleisten. Auch nach der Translokation unterliegen die Proteine weiteren Kontrollen-Mechanismen, welche sich hauptsächlich auf die korrekte Faltung des Proteins im ER konzentrieren. Die zwei Haupt-Mechanismen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.2.1 ER-Assoziierte Degradierung (ERAD)

Der erste Mechanismus der Zelle, nicht-korrekt gefaltete Proteine zu eliminieren, besteht in der ER-assoziierten Degradierung (ERAD). Dieser Prozess beinhaltet 1) die selektive Erkennung von fehlerhaften Proteinen, 2) die Retrotranslokation der Proteine aus dem ER und 3) deren proteasomalen Abbau im Cytosol (Hegde and Ploegh, 2010).

Die Proteinstruktur von ER-translozierten Proteinen kann vorerst durch Modifikationen wie N-Glykosylierung und Disulfidbrückenbildung stabilisiert werden. Die sequentielle Bindung der Proteine Calnexin und Calreticulin an Mannosidase I und II- prozessierte Glykoproteine unterstützt hierbei den Faltungsprozess (Meusser et al., 2005). Durch Abtrennung des terminalen Glukoserestes durch das Enzym Glukosidase II können nativ-gefaltete Proteine das ER verlassen (Ellgaard and Helenius, 2003). Nicht-nativen Glykoproteinen wird durch die UDP-Glukose:Glykoprotein-Glykosyltransferase (UGGT),

welche als Faltungs-Sensor wirkt, wieder ein Glukoserest angefügt, was einen erneuten Calnexin/Calretikulin-Zyklus zur Folge hat (Ellgaard and Helenius, 2003; Hagiwara and Nagata, 2012; Meusser et al., 2005). Bei der Beendigung dieses Zyklus im Falle von ERAD-Substraten ist die ER- α 1, 2-Mannosidase I und möglicherweise Mannosidase-ähnliche Lektine (EDEMs) beteiligt, welche dass Mannose-prozessierte Protein erkennen (Ellgaard and Helenius, 2003). Andere nicht-korrekt gefaltete Proteine, welche keine Glykoproteine darstellen, werden vermutlich durch die Exposition normalerweise versteckter Sequenz-Bereiche wie hydrophobe Domänen in löslichen Proteinen, hydrophile Reste in Transmembran-Segmenten, ungepaarte Cysteine und unprozessierter Sequenzen (wie der Signal- oder GPI-Anker-Sequenz) erkannt (Buchberger et al., 2010; Hegde and Ploegh, 2010). Wie fehlgefaltete Proteine von neu-synthetisierten, im Faltungsprozess inbegriffenen Proteinen unterschieden werden können, ist jedoch bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt.

BiP agiert vermutlich in Verbindung mit verschiedenen Hsp40-Proteinen im ER als generelles Chaperon, um ungefaltete Abschnitte von der Umgebung abzuschirmen und eine Aggregation der Proteine zu vermeiden (Gething, 1999; Vembar and Brodsky, 2008). Zudem spielt es möglicherweise eine Rolle bei der Rekrutierung der Proteine zum „Dislokons“, welches nicht korrekt gefaltete Proteine vom ER zum proteasomalen Abbau ins Cytosol überführt (Hagiwara and Nagata, 2012). Die Natur des „Dislokons“ bzw. „Retrotranslokons“ wird in der Literatur noch kontrovers diskutiert. Als Kandidaten wurde der allgemeine Protein-Importkanal Sec61, sogenannte Derlins oder membrangebundene Ubiquitin-Ligasen beschrieben (Hebert et al., 2010; Meusser et al., 2005; Romisch, 1999). Unabhängig von der Identität des Retrotranslokons, muss der Kanal in Verbindung mit einer N-Glykanase stehen, welche Glykoproteine vor dem proteasomalen Abbau noch im ER oder auf der cytosolischen Seite des ERs deglykosyliert (Hirsch et al., 2003; Katiyar et al., 2005; Suzuki et al., 1998). Zudem muss der Kanal direkt oder indirekt mit Ubiquitin-Ligasen assoziiert vorliegen. Die Poly-Ubiquitinierung der retrotranslozierten Substrate verhindert einerseits ein mögliches Zurückrutschen der Proteine ins ER-Lumen. Zudem dienen sie als ubiquitäres Signal für einen proteasomalen Abbau der Proteine (Vembar and Brodsky, 2008).

Die poly-ubiquitinierte Polypeptidkette wird anschließend von dem AAA-ATPase Komplex bestehend aus p97 und Cdc48p erkannt, wobei die Energie für die vollständige Extraktion der Polypeptidkette wahrscheinlich durch die ATPase-Aktivität von p97 aufgebracht wird (Claessen et al., 2012; Rabinovich et al., 2002; Ye, 2006). Durch die Aktion von p97 und

einigen weiteren cytosolischen Faktoren wird die extrahierte Polypeptidkette an ein ER-Membran-nahes bzw. assoziiertes Proteasom weitergereicht und dort abgebaut (Nakatsukasa and Brodsky, 2008). Erst kürzlich wurde ein weiterer Ubiquitin-Ligase-assoziiierter Multi-Protein-Komplex bestehend aus Bag6, Ubl4A und Trc35 beschrieben, welcher retrotranslozierte Membranproteine mit exponierten hydrophoben Domänen auf ihrem Weg zum Proteasom unterstützt und dabei eine Aggregation dieser Proteine verhindert (Wang et al., 2011).

1.2.2 Stressantwort auf ungefaltete Proteine (UPR)

Können fehlgefaltete Proteine nicht ausreichend durch den beschriebenen ERAD-Prozess aus dem ER entfernt werden, führt dies zu ER-Stress und einer Aktivierung der sogenannten „Antwort auf ungefaltete Proteine“ (*Unfolded Protein Response*, UPR). Die drei Hauptziele der UPR sind: 1) Die Reduktion des Protein-Influx ins ER, 2) die erhöhte Expression von Faktoren, welche eine erfolgreiche Faltung von Proteinen im ER oder die Degradierung von fehlgefalteten Proteinen unterstützen und 3) die Einleitung der Apoptose bei länger-anhaltenden Stressbedingungen (Groenendyk and Michalak, 2005; Patil and Walter, 2001; Szegezdi et al., 2006). Die UPR zielt somit allgemein auf eine Limitierung der Last an fehlgefalteteten Proteinen im ER ab und ist essentiell für eine erfolgreiche Wiederherstellung der ER-Homöostase.

Die drei Haupt-Vermittler der UPR sind: IRE1, ATF6 und PERK (Ron and Walter, 2007). Diese Proteine stellen ER-Membran-integrierte Sensoren dar, welche den Proteinfaltungs-Status im ER „erspüren“ und diese Information über die ER-Membran ins Cytosol weiterleiten. IRE1 mediiert dabei die transkriptionelle Hochregulation von UPR-abhängigen Genen durch die Prozessierung des Transkriptionsfaktors XBP1. PERK verringert die Protein-Synthese durch Phosphorylierung des Translations-Initiations-Faktors eIF2. ATF6 wird bei ER-Stress zum Golgi-Kompartiment geleitet, wo durch Proteasen dessen Leucin-Zipper-Transaktivierungsdomäne freigesetzt wird. Diese führt im Nukleus ebenfalls zur Aktivierung der Transkription verschiedener UPR-abhängiger Gene (Gardner et al., 2013).

Die Aktivierung von IRE1, ATF6 und PERK wird möglicherweise durch das universelle, luminale ER-Chaperon BiP vermittelt, welches unter ER-Stress-Bedingungen an

fehlgefaltete Proteine bindet und nicht mehr für die Bindung bzw. Blockierung der genannten Faktoren zur Verfügung steht (Bertolotti et al., 2000).

1.3 Neuropeptide

1.3.1 Funktion der analysierten Peptidhormone

Alle drei in dieser Arbeit charakterisierten Peptidhormone werden im Hypothalamus synthetisiert. TRH und GnRH sind sogenannte „Freisetzungshormone“, was bedeutet das sie, an der Spitze regulatorischer Freisetzungsvorgänge, andere Hirnregionen bzw. Organe veranlassen ihrerseits Hormone auszuschütten.

TRH stimuliert die Produktion und Freisetzung von Thyrotropin (TSH) in der Hirnanhangsdrüse, welches wiederum die Produktion und Ausschüttung von Thyroxin (T3/T4) in der Schilddrüse bewirkt. Die freigesetzten Hormone in der Peripherie können die Ausschüttung der Hormone im Gehirn hemmen (Negative Rückkopplung). Dieser regulatorische Wirkmechanismus wird auch als HPT (*Hypothalamus-Pituitary-Thyroid*) - Achse bezeichnet (Harris et al., 1978; Nillni, 2010).

GnRH stimuliert in der Hirnanhangsdrüse die Ausschüttung von Gonadotropinen, unter anderem die des Follikel-stimulierenden-Hormons (FSH) sowie des luteinisierenden Hormons (LH) (Leung et al., 2003).

Somatostatin ist ein sogenanntes „*Inhibiting*-Hormon“ und inhibiert die Ausschüttung des humanen Wachstumshormons (GH, Somatotropin) in der Hypophyse (Siler et al., 1973). Somatostatin wird neben dem Hypothalamus auch in den D-Zellen des Pankreas gebildet und wirkt auch dort in den α - und β -Zellen und im Magen-Darm-Trakt auf die Ausschüttung vieler Hormone (u.a. Gastrin, Insulin, Glucagon) hemmend (Barnett, 2003). Von Somatostatin sind zwei aktive Formen (Somatostatin-14 und Somatostatin-28) bekannt, die aus einem gemeinsamen Vorläufer prozessiert werden.

In Abb. 6 sind die drei Hormone und ihre Aminosäureabfolge sowie ihre posttranslationalen Modifikationen dargestellt.

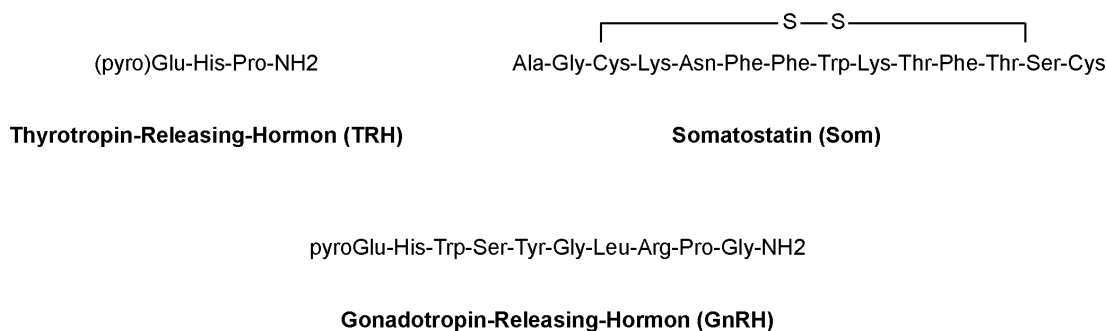


Abb. 6: Aminosäuresequenzen der Neuropeptidhormone TRH, Somatostatin (Som) und GnRH. Das Somatostatin-14 bzw. Somatostatin-28- Peptid kann durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke als zyklische Verbindung vorliegen.

1.3.2 Biogenese

Die meisten Neuropeptide werden als Preprohormone mit einer N-terminalen Signalsequenz (Pre) und einer Prodomäne (Pro) synthetisiert und durchlaufen vor ihrer Sekretion mehrere posttranslationale Prozessierungs-Schritte.

Die Signalsequenz mediiert die Zielsteuerung und den Import ins ER und wird während der kotranslationalen Translokation ins ER-Lumen durch die Signalpeptidase abgespalten. Die weitere proteolytische Prozessierung und die Abspaltung der Prodomäne findet bei den meisten Prohormonen im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) oder innerhalb der sekretorischen Vesikel statt (Bundgaard and Rehfeld, 2008; Mulcahy et al., 2005). Dort werden die sogenannten Prohormone durch verschiedene, substratspezifische Prohormon-Konvertasen (PCs) in ein oder mehrere Fragmente zerlegt. An der Prozessierung von Prohormonen sind meist die spezifischen PCs PC1-3 oder die generelle Furin-Protease beteiligt (Steiner, 1998; Thomas, 2002). Furin und ihre verwandten PCs sind spezialisierte Serin-Endoproteasen, die das dibasische Motif R-X-(R/K/X)-R₂ schneiden und dadurch Proproteine in ihre biologisch-aktive Form umwandeln (Steiner, 1998).

Bei der TRH-Prozessierung spielen dabei die Prohormon-Konvertasen PC1/3 und PC2 eine Rolle (Nillni, 2010; Perello et al., 2008). Diese zerlegen das Pro-TRH-Vorläufermolekül letztendlich in fünf Kopien des TRH-Tripeptids (Abb. 7). Für die Prozessierung von Pro-Somatostatin sind vier Prohormon-Konvertasen bekannt, nämlich PACE4, Furin, PC 1 und PC2 (Brakch et al., 1995). Dadurch wird das Pro-Somatostatin in

sechs, teils überlappende, Produkte zerlegt, darunter auch entweder Somatostatin-28 (28 aa) oder Somatostatin-14 (14 aa). GnRH wird vermutlich durch PC2 (Wetsel et al., 1995) und durch das GAP (Gonadotropin-assoziiertes Peptid)- Releasing- Enzym (Rangaraju and Harris, 1993) prozessiert. Die Intermediate vieler Hormone, wie z.B. Gastrin und TRH, werden anschließend in den sekretorischen Vesikeln C-terminal durch die Peptidylglycin- α -amidierende Monooxygenase modifiziert (Bundgaard and Rehfeld, 2008; Eipper et al., 1992; Nillni, 2010).

Die intrazelluläre Sortierung der Vorläufer bzw. Intermediate sowie die anschließende Segregation in die jeweiligen Vesikel wird vermutlich über die posttranslationalen Modifikationen und andere „Sortierungsmotive“ gesteuert (Bundgaard and Rehfeld, 2008; Kizer and Tropsha, 1991; Mulcahy et al., 2005). Im Fall von TRH können diese Motive durch das Schneiden der PCs freigelegt werden und steuern möglicherweise die unterschiedliche Sortierung der aus pro-TRH gewonnenen Peptide (Mulcahy et al., 2005). Die Ausschüttung der sekretorischen Vesikel kann entweder reguliert oder konstitutiv erfolgen (Bundgaard and Rehfeld, 2008). Interessanterweise wurde gezeigt, dass viele Peptidhormone in den sekretorischen Vesikeln als amyloid-ähnliche Aggregate vorliegen (Maji et al., 2009; van Grondelle et al., 2007).

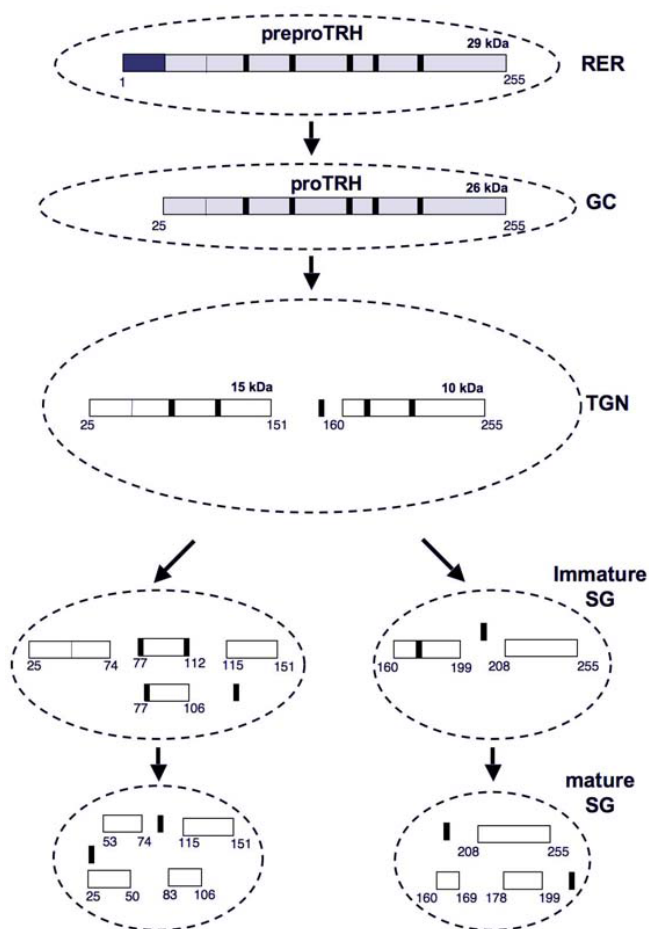


Abb. 7: Schematische Darstellung der Prozessierung und Sortierung von Pro-TRH innerhalb des sekretorischen Transportweges. Nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz im rauen Endoplasmatischen Retikulum (RER), wird das Pro-Protein im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) initial durch die Protein-Konvertasen PC1/PC3 prozessiert. Die N- und C-terminalen TRH-Intermediate werden in unterschiedliche immature sekretorische Vesikel (SG) sortiert. Hier werden die Intermediate weiter durch PCs und PAM prozessiert und durch weitere posttranslationale Veränderungen modifiziert. Die TRH- und nicht-TRH-Peptide werden in maturaen sekretorischen Vesikeln (SG) gespeichert und unter geeigneten Bedingungen sekretiert. Die Nummern unter den Peptiden entsprechen der ersten und letzten Aminosäure des Peptids. hellgraues Rechteck: TRH-Vorläufer-Molekül; dunkelgraues Rechteck: ER-Signalsequenz; schwarze Striche: TRH-Vorläufer-Peptide; GC: Golgi-Kompartment. (Perello and Nillni, 2007)

1.3.3 Funktion der Prodomäne

Prodomänen von Proproteinen wurden in der Vergangenheit bereits mehrere, unterschiedliche Funktionen zugeordnet. Zum einen kann sie eine wichtige Rolle bei der Suppression der Aktivität von verschiedenen Enzymen, den sogenannten Zymogenen

(Khan and James, 1998) spielen. Beispiele hierfür sind die apoptose-regulierenden Caspasen (Salvesen and Dixit, 1999) oder die Vorstufen der Verdauungs-regulierenden Enzyme Pepsin und Chymotrypsin. Hierbei wird das Enzym erst durch fremd- oder autokatalytische Abspaltung der Prodomäne in seinen aktiven Zustand überführt.

Zudem ist eine Rolle der Prodomäne bei der Biogenese von sekretorischen Proteinen beschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sie bei Prozessen wie Protein-Faltung, Stabilität, Prozessierung und der intrazellulären Sortierung im sekretorischen Biosyntheseweg eine essentielle Funktion erfüllt (Conticello et al., 2003; Kjeldsen et al., 1998; Suter et al., 1991). Für die Rolle der Prodomäne von Somatostatin wurde, neben der Funktion der Stabilisierung des Proteins während des ER-Golgi-Transports (Chen et al., 1995; Stoller and Shields, 1989), auch eine Funktion bei der intrazellulären Sortierung in sekretorische Vesikel diskutiert (Kizer and Tropsha, 1991; Sevarino et al., 1989). Der Prodomäne von TRH wurde eine Rolle bei der Faltung und Stabilisierung des TRH-Vorläufers zugeschrieben (Romero et al., 2008).

In einigen Fällen wurde auch eine von dem maturen Protein unabhängige und verschiedene zelluläre Funktion der Prodomäne entdeckt. In der Prodomäne des Vorläufermoleküls von Somatostatin zum Beispiel wurde ein weiteres Peptidhormon namens „Neuronostatin“ mit diversen neuronalen, neuroendokrinen und kardiovaskulären Funktionen gefunden (Samson et al., 2008). Auch die Prodomäne des GnRH-Propeptids enthält ein zusätzliches Neuropeptid, welches inhibierend auf die Prolaktin-Sekretion wirkt (Chavali et al., 1997).

1.4 Intrinsisch unstrukturierte Proteine

1.4.1 Definition

In der Vergangenheit wurde davon ausgegangen, dass die Primärstruktur eines Proteins seine dreidimensionale Struktur festlegt, welche wiederum seine Funktion bestimmt (Anfinsen, 1973). Zahlreiche Studien, vor allem der letzten zehn Jahre, konnten jedoch zeigen, dass eine Vielzahl von Proteinen unter physiologischen Bedingungen *in vitro* keine stabile Tertiär- und/oder Sekundärstruktur aufweisen (Dunker et al., 2002; Tompa, 2002; Uversky et al., 2000). Diese Proteine werden in der Literatur neben „intrinsisch

unstrukturiert“ auch als „ungeordnet“ oder „in nativer Form ungefaltet“ bezeichnet (Uversky et al., 2009). Es wird angenommen, dass der „intrinsisch unstrukturierte“ Zustand dabei keiner rigiden Form entspricht, sondern als ein Ensemble von sich ständig ändernden, alternativen Strukturen zu sehen ist (Tompa, 2005). Intrinsisch unstrukturierte Proteine (IUPs) besitzen eine oder mehrere intrinsisch unstrukturierte Domänen (IUDs, >30-40 Aminosäuren) innerhalb eines sonst strukturierten Proteins, während einige auch als vollständig unstrukturiert beschrieben wurden (Dunker et al., 2000; Fink, 2005). Vollständig Intrinsisch unstrukturierte Proteine können weiter in 2 Untergruppen unterteilt werden: Solche, die keine Sekundärstruktur besitzen und solche mit teilweiser Sekundärstruktur, welche jedoch keine Tertiärstruktur besitzen, wie z.B. die *Molten Globule*- Konformation (Fink, 2005).

Es wird teilweise kontrovers diskutiert, ob die durch *in vitro*- Analysen als intrinsisch unstrukturiert bezeichneten Proteine auch *in vivo* keine Struktur aufweisen. Da die Zelle meist mit Proteinen angefüllt ist, kann dieser „Crowding“- Effekt möglicherweise bei einigen Proteinen zu einer Verschiebung des konformationellen Gleichgewichtes und damit zu einer teilweisen oder kompletten Faltung des Proteins führen (Ellis, 2001; Flaugh and Lumb, 2001; Tompa, 2005). *In vivo* könnten zudem weitere Faktoren wie zum Beispiel Protein-Protein-Interaktionen, Temperatur- oder pH-Wert-Änderungen oder die Mithilfe der zellulären Faltungs-Maschinerie eine Faltung des Proteins unterstützen (Braakman and Bulleid, 2011; Hartl et al., 2011).

1.4.2 Funktion

Obwohl intrinsisch unstrukturierte Proteine (IUPs) keine stabile Tertiärstruktur und teilweise auch keine stabile Sekundärstruktur besitzen, sind sie in der Lage wichtige zelluläre Funktionen auszuführen. In den letzten Jahren wurde IUPs eine bedeutende Rolle bei der Regulation von zellulären Schlüssel-Prozessen zugewiesen, wie z.B. der Transkription, Translation, Signaltransduktion und der Regulation des Zellzyklus (Dunker et al., 2008; Iakoucheva et al., 2002; Tompa, 2005; Wright and Dyson, 1999).

Auf der Sekundärstruktur-Ebene bestehen hierbei zwei Kategorien von struktureller Unordnung, konstant oder intermediär, welche unterschiedliche Funktionen ausführen können (Dunker et al., 2001). Die erste Kategorie beschreibt Proteine bzw. Protein-

Regionen von IUPs, welche als proteinogene Detergenzien oder flexible Linker wirken können (Dunker et al., 2001; Tompa, 2005). Diese bleiben unstrukturiert, während sie ihre Funktion ausführen (Abb. 8, entropische Polypeptidketten). Die zweite Kategorie beschreibt IUPs mit molekularen Erkennungsdomänen, die ihre Funktion durch Bindung eines Interaktionspartners ausüben (Dunker et al., 2001; Tompa, 2005) (Abb. 8, rechts).

Einige Beispiele zeigen, dass intrinsisch unstrukturierte Proteine ihre ausgestreckte, offene Konformation beibehalten, wenn sie an ihr Ziel-Protein binden. Dies ermöglicht z.B. zahlreiche Kontaktpunkte über eine überproportional große Oberfläche des IUP mit dessen Ziel-Proteins/Proteinkomplexes, wie im Falle der Bindung des intrinsisch unstrukturierten Inhibitors p27 an den Komplex aus Cdk2 und CycA (Tompa, 2002).

Der Großteil der bekannten IUPs nimmt durch Interaktion mit einem meist strukturierten Bindungspartner ebenfalls Struktur an (*coupled binding and folding*, (Dyson and Wright, 2002). Hierbei zeichnen sich IUPs häufig durch eine hohe Bindungsspezifität ihrer Partner bei niedriger Bindungsaffinität aus (Wright and Dyson, 2009). Dies führt zu einer schnellen, aber sehr spezifischen Reaktion. Die strukturelle Flexibilität und die große Bindefläche der IUPs ermöglicht es ihnen außerdem mit vielen verschiedenen Bindungspartnern zu interagieren (Oldfield et al., 2008). Je nach Bindung ihres Interaktionspartners können IUPs dabei unterschiedliche Konformationen annehmen. Dies wird als sogenannte Bindungsplastizität bezeichnet (Tompa, 2005; Uversky et al., 2009).

Ausgehend von einer permanenten Interaktion mit spezifischen Bindungspartnern, können diese Proteine in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden: Effektoren, Assembler und Abfänger (Abb. 8, permanente Interaktion). Als Assembler üben IUPs hierbei eine zentrale Funktion in der Assemblierung von makromolekularen Komplexen, wie z.B. dem Ribosom aus (Timsit et al., 2009). Außerdem ist bekannt, dass IUPs durch ihre „offene“ Konformation meist sehr sensitiv gegenüber Proteasen und in ihrem Zustand optimal zugänglich für posttranslationale Modifikationen sind. Beides erlaubt eine strenge Regulation dieser Proteine (Wright and Dyson, 1999). Dies erklärt, warum IUPs eine Rolle bei hochgeregelten Abläufen wie z.B. dem Zellzyklus (Wright and Dyson, 1999; Yoon et al., 2012) spielen. Zusätzlich dienen IUPs auch als Chaperone in Tieren und Pflanzen (Tompa and Kovacs, 2010) (Abb. 8, transiente Bindung).

Interessanterweise können viele IUPs mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Es ist bekannt, dass IUPs in unterschiedlichen Erkrankungen wie Krebs-, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle zukommt (Uversky et al., 2009). Dies ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass sie Schlüsselfaktoren in wichtigen zellulären

Signaltransduktions-, Regulations und Kontrollprozessen darstellen. Wie bereits erwähnt erkennen und binden sie meist mehrere verschiedene Proteine und stellen dadurch zentrale Regulatoren dar, wie z.B. das Tumor-Suppressor-Protein p53, welches mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert ist (Dawson et al., 2003; Hollstein et al., 1991). Ein Beispiel für eine Rolle der IUPs in neurodegenerativen Erkrankungen ist das Parkinson-assoziierte Protein α -Synuklein, welches auch eine Rolle in der Alzheimererkrankung spielt. α -Synuklein liegt *in vitro* unter physiologischen Bedingungen unstrukturiert vor, durch die Bindung an Membranen kann jedoch eine α -helikale Struktur des N-Terminus induziert werden (Bartels et al., 2010). Seine Struktur ist sehr sensitiv gegenüber der Umgebung, wobei es unterschiedliche Strukturen annehmen kann und deshalb manchmal auch als „Chamäleon“ bezeichnet wird (Uversky et al., 2009). Zudem ist es hoch aggregationsgefährdet und ist Hauptbestandteil der charakteristischen Lewy-Körperchen bei der Parkinson-Erkrankung (Lee and Trojanowski, 2006).

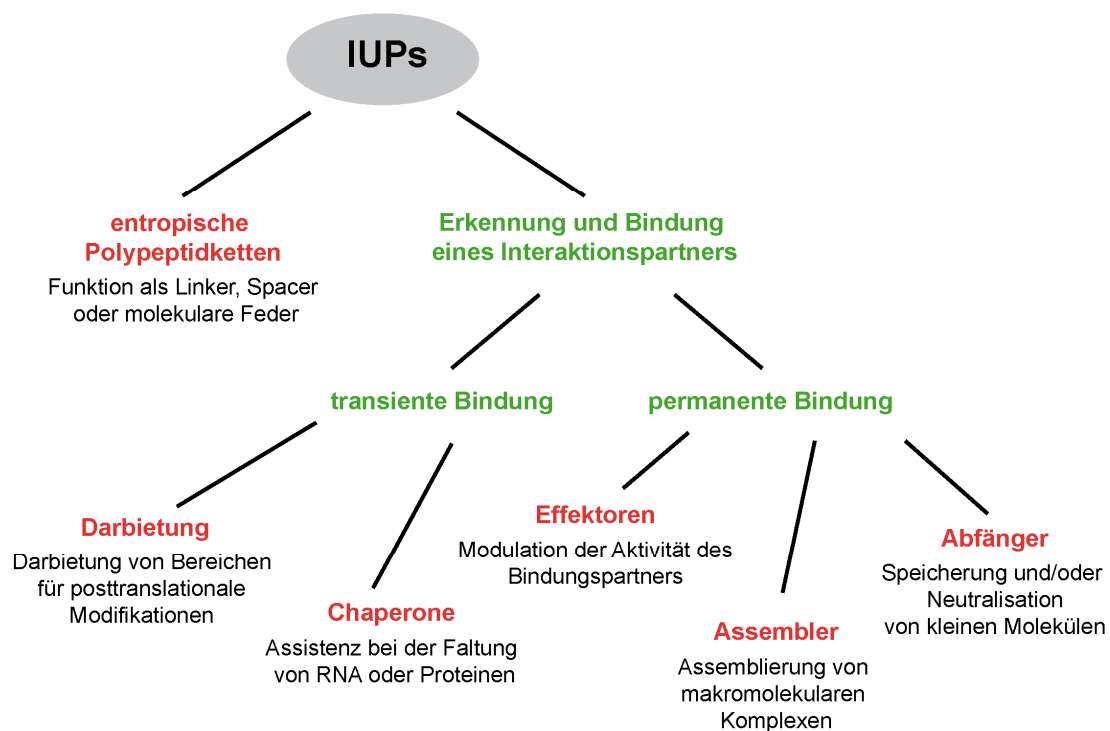


Abb. 8: Funktionale Klassifizierung von intrinsisch unstrukturierten Proteinen (IUPs). Die Funktion stammt entweder direkt von der intrinsisch-unstrukturierten Konfiguration (entropische Polypeptidkette) oder von der Fähigkeit der IUPs transient oder permanent an ein oder mehrere Partner-Moleküle zu binden. Die einzelnen funktionellen Gruppen sind jeweils kurz charakterisiert. Modifiziert nach (Tompa, 2005)

1.4.3 *In silico* Vorhersage von intrinsisch unstrukturierten Regionen

Die experimentelle Struktur-Analyse von intrinsisch unstrukturierten Proteinen (IUPs) ist schwierig, da flexible, ungefaltete Regionen durch gängige Strukturanalyse-Verfahren schlecht visualisiert werden können (Dunker et al., 2001). Aufgrund der limitierten Anzahl von Strukturdaten intrinsisch unstrukturierter Proteine, wurden in den letzten Jahren viele Algorithmen entwickelt, intrinsisch unstrukturierte Proteine vorherzusagen (Dosztanyi et al., 2010).

Diese basieren auf der Kenntnis, dass sich IUPs bzw. intrinsisch unstrukturierte Regionen (IURs) u.a. in ihrer Aminosäure-Komposition, Hydrophobizität, Komplexität, Flexibilität und Netto-Ladung von strukturierten, globulären Proteinen unterscheiden (Dunker et al., 2008; Uversky, 2009). Generell sind sogenannte „Struktur-fördernde“ Aminosäuren wie Cys, Trp, Tyr, Ile, Phe, Val, Leu und Asn in der Proteinsequenz von IDPs unterrepräsentiert. Im Gegensatz dazu sind die Proteinsequenzen jedoch reich an „Unordnungs-fördernden“ Aminosäuren wie Ala, Gly, Lys, Arg, Ser, Gln, Pro und Glu (Dunker et al., 2008; Tompa, 2005). Es ist ebenfalls möglich Segmente zu identifizieren, welche potentiell zu einer Unordnung-zu-Ordnungs-Transition führen (Dosztanyi et al., 2010; Oldfield et al., 2005).

Bis heute gibt es bereits ca. 50 verschiedene Vorhersageprogramme für intrinsisch unstrukturierte Proteine (He et al., 2009). Allerdings ist die begrenzte Anzahl von experimentell determinierten Strukturen von intrinsisch unstrukturierten Proteinen eine deutliche Limitierung für ihre *in silico* Vorhersage, da die Trainings-Datensets der *in silico* Programme dadurch ein deutliches Ungleichgewicht zwischen unstrukturierten und strukturierten Proteinen aufweisen (Dosztanyi et al., 2010; Shimizu et al., 2007).

1.5 Mitochondriale Zielsteuerung und duales Targeting

Die meisten der mitochondrialen Proteine (> 95 %) werden durch Gene im Nukleus kodiert und im Cytosol als Vorläufer-Proteine synthetisiert (Neupert, 1997; Wiedemann et al., 2004). Die Proteine werden nach vollständiger Synthese posttranslational an das Mitochondrium zielgesteuert und in die unterschiedlichen Membran-Kompartimente wie äußere Membran, Intermembranraum, innere Membran oder Matrix, importiert.

Die Zielsteuerung sowie der Import ins Mitochondrium werden durch eine meist N-terminale mitochondriale Signalsequenz (Präsequenz) mediiert. Bei dem Hauptteil der mitochondrialen Proteine mit N-terminalen Präsequenzen wird die Signalsequenz nach dem Import in das Mitochondrium abgeschnitten. Da diese Signalsequenzen viele Proteine in die Matrix des Mitochondriums dirigieren, werden sie häufig als *Matrix-Targeting* Sequenzen (MTS) bezeichnet. Viele andere Proteine tragen jedoch auch mitochondriale Signalsequenzen (SS), die weiter innerhalb des Proteins liegen (interne SS). Diese Gruppe umfasst hauptsächlich Membranproteine der inneren und äußeren Membran (Pfanner and Geissler, 2001). Diese beiden Haupt-Importwege sind in Abb. 9 zusammengefasst.

Es ist gezeigt, dass N-terminale Präsequenzen, verschiedene „Passagier“-Proteine ans Mitochondrium leiten können (Neupert, 1997). Sie besitzen einige charakteristische Eigenschaften: eine Länge von ca. 20-60 Aminosäuren, einen hohen Gehalt an basischen bzw. positiv geladenen Resten, einen niedrigen oder gar keinen Anteil an sauren bzw. negativ geladenen Resten sowie die Ausbildung einer amphipathischen α -helix in der Membrenumgebung (von Heijne, 1986). Es wird vermutet, dass die basischen Reste in Verbindung mit der amphipathischen Helix sowohl für die Erkennung durch den TOM-Komplex, den weiteren Import, als auch für das spätere Schneiden der SS benötigt werden, indem sie die Orientierung des Proteins für einen erfolgreichen Membran-Transport festlegen (Omura, 1998). Aufgrund dieser charakteristischen Eigenschaften, konnten Programme für eine *in silico* Vorhersage für mitochondrial-lokalisierte Proteine entwickelt werden (Emanuelsson et al., 2007).

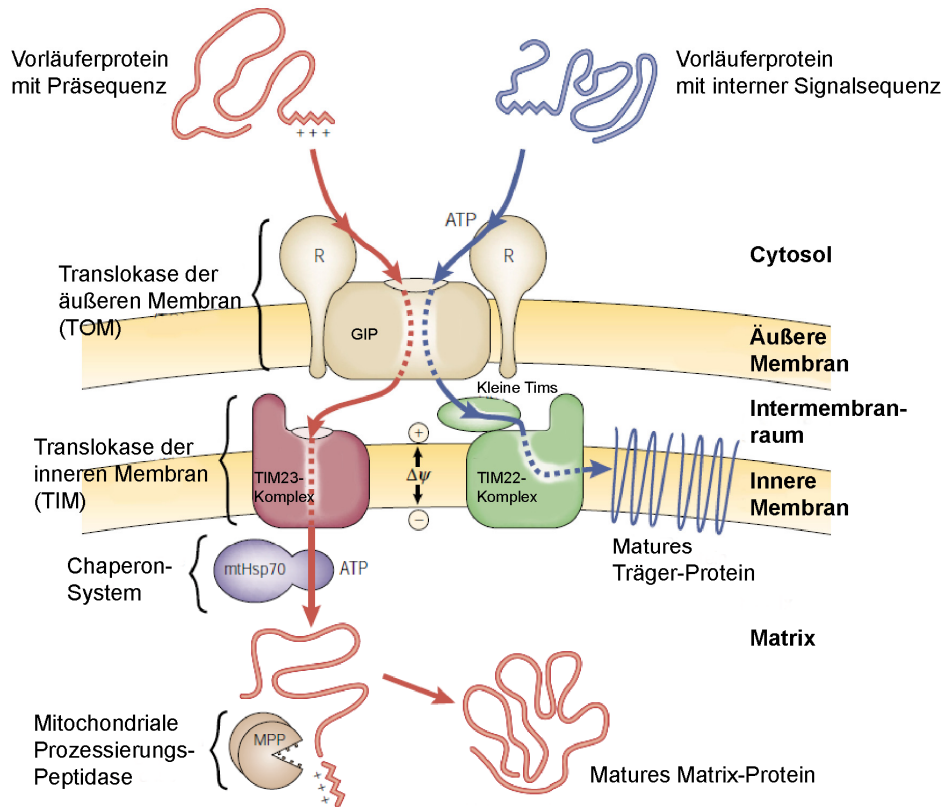


Abb. 9: Schematische Darstellung der zwei Hauptrouten des mitochondrialen Protein-Imports. Sowohl Vorläuferproteine mit einer N-terminalen Präsequenz (rot) als auch Proteine mit einer internen Signalsequenz (blau) werden von membrangebundenen Rezeptoren (R) erkannt und durch die generelle Importpore (GIP) der Translokase der äußeren Membran (TOM) transloziert. Vorläuferproteine mit einer N-terminalen Präsequenz werden weiter durch die Translokase der inneren Membran (Tim23-Komplex) über die innere Membran transportiert. Hierfür wird das Membranpotenzial ($\Delta\psi$) und die ATP-abhängige Aktion des mitochondrialen Hitze-Schock-Proteins 70 (mtHsp70) benötigt. Mitochondriale Präsequenzen werden in der Matrix durch die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase (MPP) abgespalten. Vorläuferproteine mit einer internen Signalsequenz werden über die ‚kleinen‘ Tims über den Intermembranraum zum TIM22-Komplex der inneren Membran geleitet. Dort werden sie ebenfalls Membranpotenzial-abhängig in die innere Membran inseriert. (Pfanner and Geissler, 2001)

Interessanterweise können Proteine mit mitochondrialen Signalsequenzen auch zu anderen Kompartimenten der Zelle gesteuert werden und umgekehrt ist es auch möglich, dass normalerweise sekretorisch- oder Kern-lokalisierte Proteine zum Mitochondrium geleitet werden. Dieses Phänomen wird als „duale“ Zielsteuerung bezeichnet. Dies kann einerseits durch zwei oder mehrere Signalsequenzen innerhalb eines Proteins oder durch ein und dieselbe Signalsequenz vermittelt werden (Karniely and Pines, 2005). Signalsequenzen, die in der Lage sind, mehr als eine Lokalisation des Proteins zu

ermöglichen, werden als „bivalente“ oder „multiple“ Signalsequenzen bezeichnet. Weitere bekannte Mechanismen einer dualen Zielsteuerung sind in Abb. 10 dargestellt.

In den letzten Jahren wurden immer mehr Proteine mit solchen Signalsequenzen beschrieben. In einer Studie wurde vorgeschlagen, dass in Hefe bis zu einem Drittel des mitochondrialen Proteoms dual lokalisiert ist (Ben-Menachem et al., 2011).

Ein Beispiel für eine duale Zielsteuerung für ein einziges Translationsprodukt ist Cytochrom P4502B1, welches durch eine „chimere“ N-terminale Signalsequenz gekennzeichnet ist, wobei die ER-Signalsequenz und die mitochondriale Präsequenz direkt hintereinanderliegen. Durch die Regulierung des Phosphorylierungsstatus von Ser128 der Proteinsequenz wird hierbei die SRP-Bindungsaffinität oder die Bindungsaffinität zur mitochondrialen Translokationsmaschinerie gesteuert und somit moduliert, ob das Protein entweder ins ER oder ins Mitochondrium transloziert wird (Anandatheerthavarada et al., 1999). Auch das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) zeigt teilweise eine duale Lokalisation zwischen ER und Mitochondrien (Anandatheerthavarada et al., 2003; Devi et al., 2006).

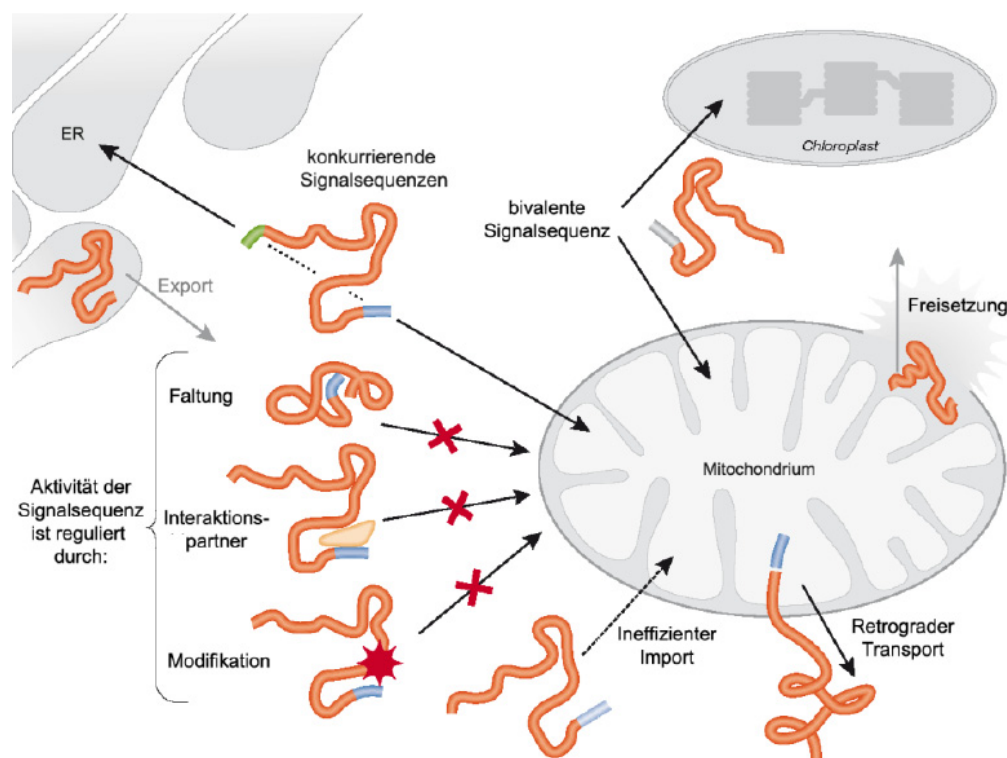


Abb. 10: Duale Zielsteuerungsmechanismen eines einzigen Translationsprodukts. Ein und dasselbe Protein kann entweder durch zwei konkurrierende Signalsequenzen innerhalb der

Proteinsequenz oder durch eine Signalsequenz, welche an zwei unterschiedliche Zielorte steuert (bivalente Signalsequenz) dual lokalisiert werden. Weitere Mechanismen sind Änderungen der Zugänglichkeit der Zielsteuerungssequenz z.B. durch posttranslationale Modifikationen, Bindung an einen Interaktionspartner oder Faltung des Proteins, ein unvollständiger Import in ein Organell oder ein aktiver retrograder Transport bzw. eine passive Freisetzung zurück ins Cytosol. Modifiziert nach (Karniely and Pines, 2005)

1.6 Zielsetzung

Der Import von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird durch verschiedene Faktoren streng reguliert, um eine Mislokalisierung von nicht-sekretorischen Proteinen zu vermeiden. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass die ER-Signalsequenz sekretorischer Proteine nicht nur eine Rolle in der Zielsteuerung der Proteine ans ER, sondern auch bei der Translokations-Initiation, eine Rolle spielt. Vorangegangene Studien wiesen zudem darauf hin, dass die ER-Translokation teilweise auch durch die mature Domäne des zu translozierenden Proteins reguliert wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur des Proteins für die Translokationseffizienz von Bedeutung sein kann. Untersuchungen zum ER-Import des Prion-Proteins zeigten, dass intrinsisch unstrukturierte Modellproteine trotz einer ER-Signalsequenz nicht ins ER transportiert wurden. Der ER-Import dieser Proteine konnte durch Fusion mit alpha-helikalen Domänen wiederhergestellt werden (Heske et al., 2004; Miesbauer et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Frage nachgegangen werden, ob intrinsisch unstrukturierte Proteine, welche nachweislich eine Rolle in essentiellen zellulären Prozessen spielen, auch innerhalb des sekretorischen Biosyntheseweges zu finden sind. Wenn ja, wie werden diese Proteine in das ER transportiert? Basierend auf den vorangegangenen Daten sollte hierbei die Untersuchung einer eventuellen Regulation der Translokation durch die Sekundärstruktur der Proteine im Vordergrund stehen.

Weiterhin war bekannt, dass die ER-Translokation von verschiedenen Proteinen durch ER-Stressbedingungen reguliert werden kann (Kang et al., 2006; Oyadomari et al., 2006). Dabei wurde beobachtet, dass in diesem Zuge nicht-translozierte, cytosolisch-lokalisierte Proteine meist dem Ubiquitin-Proteasom-System für einen schnellen Abbau der Proteine zugeführt werden können (Hessa et al., 2011).

In dieser Arbeit sollte deshalb zudem untersucht werden, was mit den nicht-translozierten, intrinsisch unstrukturierten Proteinen im Cytosol passiert.

Zusammenfassend zielten die Fragestellungen auf einen tieferen Einblick in die Regulations-Mechanismen der ER-Translokation und das weitere Schicksal von cytosolisch fehllokalisierten Proteinen ab.

2 Ergebnisse

2.1 Intrinsisch unstrukturierte Proteine sind im humanen Sekretom unterrepräsentiert

Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass krankheitsassoziierte PrP-Mutanten, welche eine C-terminale Verkürzung bzw. Deletion der C-terminalen Domäne aufweisen, schlechter bzw. gar nicht ins ER transportiert werden (Heske et al., 2004; Rambold et al., 2006a; Singh et al., 1997). Diese und nachfolgende Analysen mit Modellproteinen wiesen daraufhin, dass die Beeinträchtigung des ER-Imports auf eine Abnahme des alpha (α)-helikalen Anteils des Proteins zurückzuführen ist (Miesbauer et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, ob es sich hierbei um ein spezifisches Phänomen des Prion-Proteins und der analysierten Modellproteine oder um einen generalisierbaren Mechanismus handelt. Mit anderen Worten: Können Proteine, welche keine α -helikale Sekundärstruktur besitzen, generell schlechter in das ER transportiert werden? Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Häufigkeit von intrinsisch unstrukturierten Proteinen, welche normalerweise einen geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen aufweisen, im sekretorischen Biosyntheseweg untersucht. Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit Guy Nimrod und Prof. Nir Ben-Tal (Tel-Aviv Universität, Israel) eine bioinformatische Analyse des gesamten humanen Proteoms (20 331 Proteinsequenzen; Stand 2009) durchgeführt.

Zunächst wurde der Anteil an intrinsisch unstrukturierten Proteinen innerhalb des gesamten Proteoms bestimmt. Hierfür wurde das Vorhersage-Programm POODLE-W verwendet (Shimizu et al., 2007). Die Analyse ergab, dass 31 % der Proteine des humanen Proteoms größtenteils (d.h. über 70 % des Proteins) intrinsisch unstrukturiert sind. Dieses Ergebnis stimmt mit bisherigen Daten, welche mit diesem und anderen gängigen Vorhersageprogrammen durchgeführt wurden, überein (Dunker et al., 2000; Oldfield et al., 2005; Ward et al., 2004). Zusätzlich wurde die Proteinfraction bestimmt, welche eine N-terminale ER-Signalsequenz besitzt. Dies wurde mit Hilfe des Vorhersage-Programms SignalP 3.0 durchgeführt (Bendtsen et al., 2004). Die Analyse ergab, dass 4040 (20 %) der Proteine eine N-terminale Signalsequenz aufweisen. Dieser Prozentsatz deckt sich ebenfalls mit bisherigen Ergebnissen in der Literatur (Shao and Hegde, 2011b).

Zuletzt wurden die beiden Methoden SignalP 3.0 und POODLE-W kombiniert, um herauszufinden, wieviele der Proteine, die intrinsisch unstrukturiert sind, eine ER-Signalsequenz (ER-SS) besitzen. Die Analyse ergab eine Überlappung der beiden Merkmale von lediglich 10 %. Dieses Ergebnis deutet an, dass intrinsisch unstrukturierte Proteine (IUPs) unter ER-SS tragenden Proteinen (Sekretom) mit 10 % deutlich weniger häufig vertreten sind als im gesamten Proteom mit 31 %. Diese Tendenz konnte unter Verwendung von zwei weiteren, ebenfalls häufig zur Vorhersage von IUPs verwendeten *in silico* Programmen, IUPred und RONN, bestätigt werden (Dosztanyi et al., 2005; Yang et al., 2005).

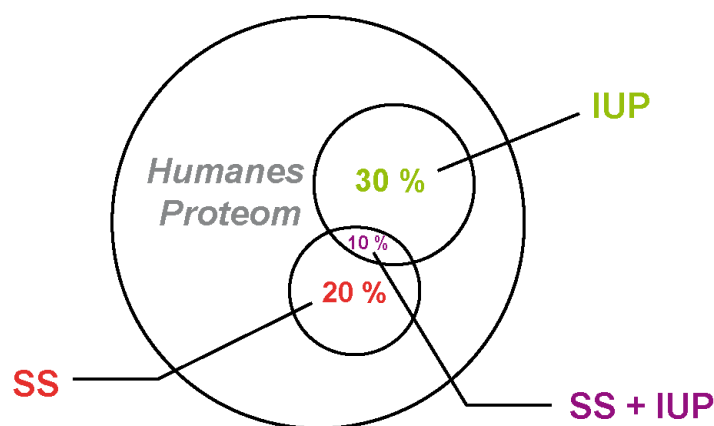


Abb. 11: Intrinsisch unstrukturierte Proteine (IUPs) weisen eine Unterrepräsentation im Sekretom auf. Obwohl 30 % der Proteine des gesamten humanen Proteoms als intrinsisch unstrukturiert vorhergesagt wurden, tragen lediglich 10 % der IUPs eine N-terminale ER-Signalsequenz (ER-SS). ER-SS tragende-Proteine (SP) wurden mit Hilfe des Vorhersage-Programmes SignalP 3.0 identifiziert und repräsentieren ca. 20 % des humanen Proteoms. IUPs mit einem unstrukturierten Anteil von > 70 % der Proteinsequenz wurden mit Hilfe des Vorhersage-Programmes POODLE-W bestimmt.

2.2 Die Neuropeptidhormone TRH, Somatostatin und GnRH werden als intrinsisch unstrukturiert, ihre Prodomäne als α -helikal vorhergesagt

Aus der Liste der Proteine, welche sowohl als intrinsisch unstrukturiert als auch sekretorisch vorhergesagt wurden, wurde das Thyrotropin-Releasing Hormon (TRH) für weitere Analysen ausgewählt. Neben TRH wurden zwei weitere Peptidhormone in die

anschließenden Analysen miteingeschlossen: Somatostatin (Som) und das Gonadotropin-Releasing Hormon 1 (GnRH).

TRH, Som und GnRH werden als sogenannte „Preproproteine“ synthetisiert, deren N-terminale Signalsequenz (ER-SS) während der Translokation der Proteine ins Endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten wird. Die Prodomäne wird meist im Trans-Golgi Kompartiment oder spätestens in den sekretorischen Vesikeln prozessiert und ist nicht Teil des muren Hormons (siehe Punkt 1.3.2). Die mature, aktive Hormondomäne der analysierten Proteine ist sehr kurz. Im Fall von TRH besteht sie lediglich aus fünf aktiven Tripeptiden (Abb. 12). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Hormondomänen selbst keine stabile Sekundärstruktur aufweisen.

Eine genauere Analyse der Proteine mit dem Sekundärstruktur-Vorhersageprogramm JPred zeigte, dass TRH eine lange α -helikale Domäne nach der ER-SS (Aminosäure (aa) 1-24), jedoch vor der ersten Peptidsequenz (aa 84, siehe UniprotKB) aufwies (Abb. 12). Im Folgenden wird diese Domäne (aa 26-62) als Prodomäne bezeichnet, da sie nicht Teil eines aktiven Peptids ist und bis zu den immaturren sekretorischen Vesikeln als Einheit prozessiert wird (Perello and Nillni, 2007).

Somatostatin und GnRH besitzen eine annotierte Prodomäne (UniprotKB, Zugangsnr.: P61278 P01148). Die Sekundärstruktur-Vorhersage der zwei Proteine mittels JPred zeigte ebenfalls einen hohen α -helikalen Anteil der Prodomäne. Auch die ER-Signalsequenz der Proteine wurde als α -helikal vorhergesagt (Abb. 12).

Zusätzlich zur Sekundärstruktur-Analyse, wurden die Programme IUPred und RONN angewendet, um spezifisch intrinsisch unstrukturierte Domänen vorherzusagen. Die Hormon-enthaltende Domäne von TRH, sowie die annotierten Hormondomänen von Som und GnRH erwiesen sich hierbei als größtenteils unstrukturiert (Abb. 12).

Zusammenfassend deutete die bioinformatische Strukturanalyse der drei Vorläufer-Proteine von TRH, Som und GnRH auf eine unstrukturierte Hormondomäne hin, wohingegen die im späteren Verlauf des sekretorischen Signalweges abgespaltene Prodomäne in den Analysen eine α -helikale Struktur aufwies.

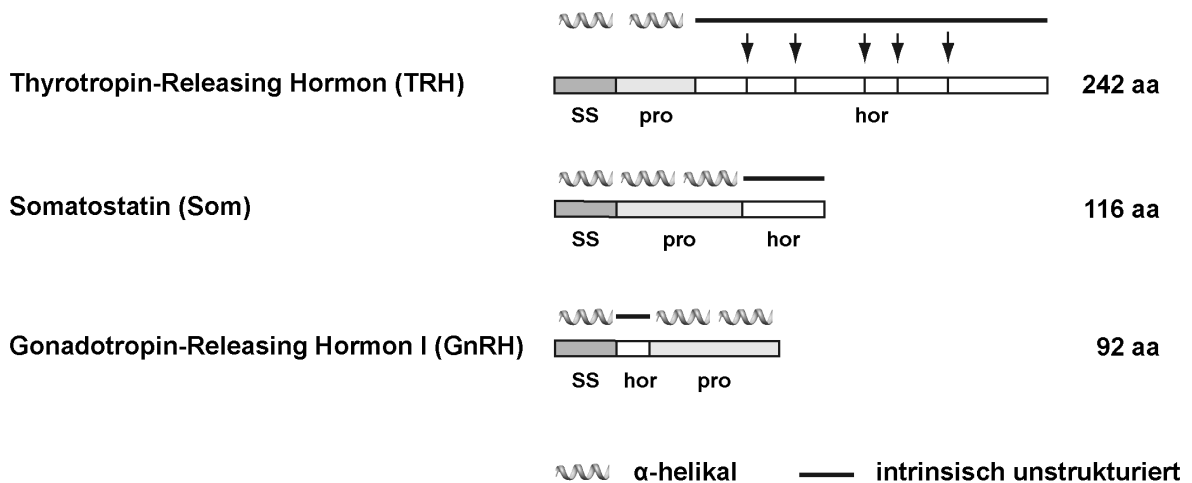


Abb. 12: *In silico* Vorhersage der Struktur der Peptidhormon-Vorläufer-Proteine von TRH, Som und GnRH. Alle Vorläufer wiesen eine α -helikale Struktur der ER-Signalsequenz (SS) sowie der Prodomäne (pro) auf. Die Hormondomäne (hor) aller drei Vorläufer-Moleküle wurde als unstrukturiert vorhergesagt. Für die allgemeine Sekundärstrukturvorhersage wurde das Programm JPred verwendet. Intrinsisch-unstrukturierte Segmente der Proteine wurden mit Hilfe der Vorhersage-Programme IUPred und RONN bestimmt. Die ER-SS- Abschnitte der Proteine wurden mit dem Vorhersage-Programm SignalP 3.0 identifiziert. Die Pfeile bei TRH deuten die Prozessierung des Vorläufers in 5 aktive TRH-Tripeptide an.

2.3 Die isolierte Prodomäne von Somatostatin besitzt die Fähigkeit zur Ausbildung einer α -helikalen Struktur

Die *in silico* Sekundärstrukturanalysen der Vorläuferproteine von TRH, Som und GnRH deuteten an, dass die Prodomäne der Proteine eine α -helikale Struktur aufweist. Um diese Vorhersage experimentell zu überprüfen, sollte im Folgenden die Sekundärstruktur der Prodomäne von Somatostatin durch eine CD-Analyse bestimmt werden. Hierfür sollte die isolierte Prodomäne von Somatostatin rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt werden.

Für eine rekombinante Expression der Prodomäne des humanen Somatostatins in *E. coli*, wurde die cDNA-Sequenz der Prodomäne vor einen C-terminalen Intein-Tag, gefolgt von einem His₆-Tag und einer Chitin-Bindungs-Domäne (CBD) in einen bakteriellen Expressionsvektor inseriert (Abb. 13).

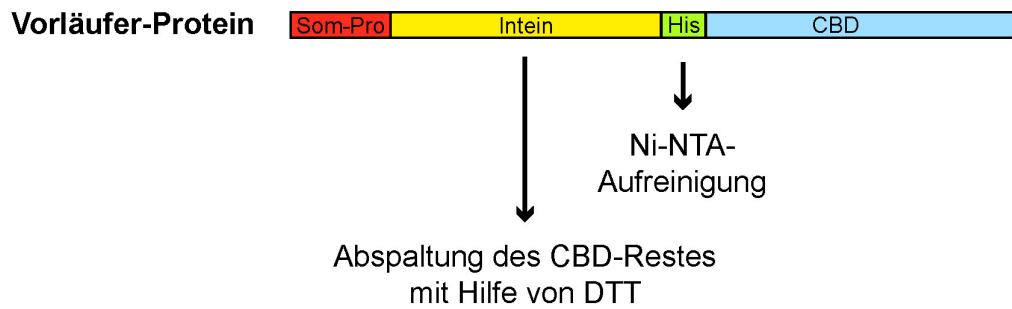


Abb. 13: Schematische Darstellung des rekombinant-exprimierten Vorläufer-Proteins. Som-Pro: Aminosäuresequenz der Prodomäne von Somatostatin (63 aa), Intein: durch Autokatalyse-abspaltbarer Intein-Tag (Mxe-GyrA-Intein, ca. 200 aa), His: His₆-Tag (6x His), CBD: Chitin-Binde-Domäne (ca. 50 aa).

Ein Überblick über den Ablauf der anschließenden Aufreinigung der Som-Prodomäne ist in Abb. 14 dargestellt. Die Aufreinigung setzte sich zusammen aus 1) Expression des Vorläufers und Aufschluss der Zellen unter nativen Bedingungen, 2) einer Ni-NTA-Aufreinigung des Vorläufers anhand des His₆-Tags, 3) einer Abspaltung der CBD-Domäne inklusive His₆-Tag durch DTT-induzierte Selbstspaltung des Inteins, 4) einer erneuten Ni-NTA-Chromatographie, bei der die abgespaltene CBD-Domäne aufgrund des His₆-Tags an der Säule gebunden bleibt, während die isolierte Prodomäne im Durchfluss isoliert wird, 5) einer Identifizierung des gereinigten Peptids durch Massenspektrometrie und 6) der CD-Analyse.

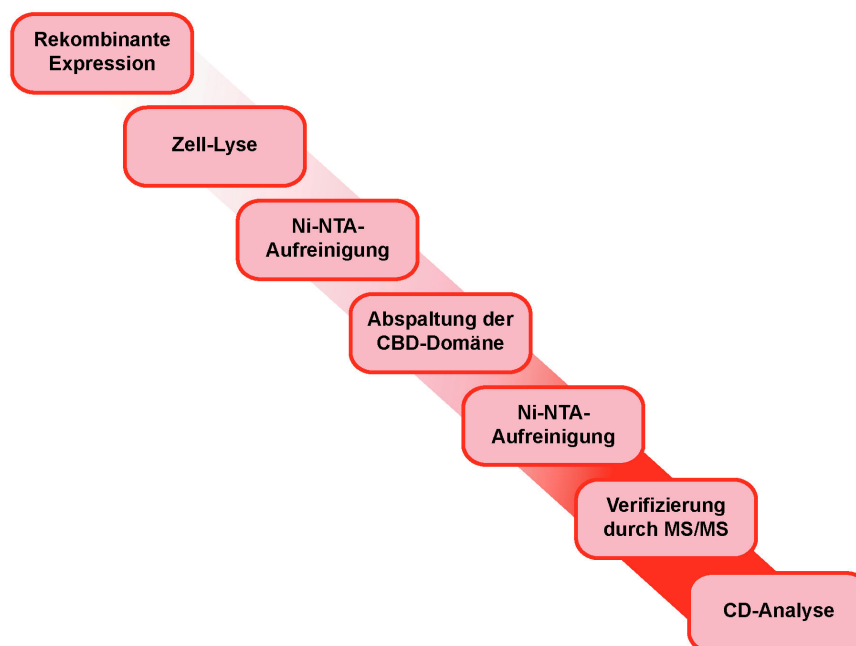


Abb. 14: Schematische Darstellung des Ablaufs der Aufreinigung der Prodomäne von Somatostatin. Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der Proteinreinigung von der rekombinanten Expression des Vorläufer-Proteins bis hin zur Verifizierung des Peptids durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) und anschließender Sekundärstruktur-Analyse mittels zirkulärem Dichroismus (CD).

Die Expression und die Reinigung des Vorläufermoleküls bzw. der Som-Prodomäne wurde anhand eines Comassie-Blau-Gels überprüft (Abb. 15). Das Vorläufer-Protein konnte in *E. coli* erfolgreich exprimiert werden (Abb. 15 A). Die folgenden Reinigungsschritte wurden unter nativen Bedingungen durchgeführt, nachdem die Solubilität des Proteins überprüft und bestätigt wurde. Bei der ersten Ni-NTA-Aufreinigung ging ein Teil des Proteins während der Waschschriffe verloren (Abb. 15 A, Eluat). Dies lag vermutlich an der Anwesenheit von Imidazol im Lysepuffer und einer zu hohen Konzentration von Imidazol während der Waschschriffe. Da für eine CD-Analyse jedoch nicht sehr viel Material benötigt wird, wurde mit dieser Menge weitergearbeitet. Die Intein-Spaltung war lediglich über Nacht bei Raumtemperatur effektiv. Nach der Spaltungsreaktion konnte die abgespaltene Prodomäne von Somatostatin als Bande bei ca. 7 kDa detektiert werden. Diese abgespaltene Fraktion der Som-Prodomäne wurde im Anschluss durch eine zweite NiNTA-Aufreinigung erfolgreich von dem restlichen Vorläufer-Protein getrennt (Abb. 15 A).

Die Konzentration des Proteins wurde anschließend im SDS-PA-Gel anhand einer Verdünnungsreihe und im Vergleich mit einer BSA-Standardreihe auf ca. 1 mg/ml bestimmt (Abb. 15 B).

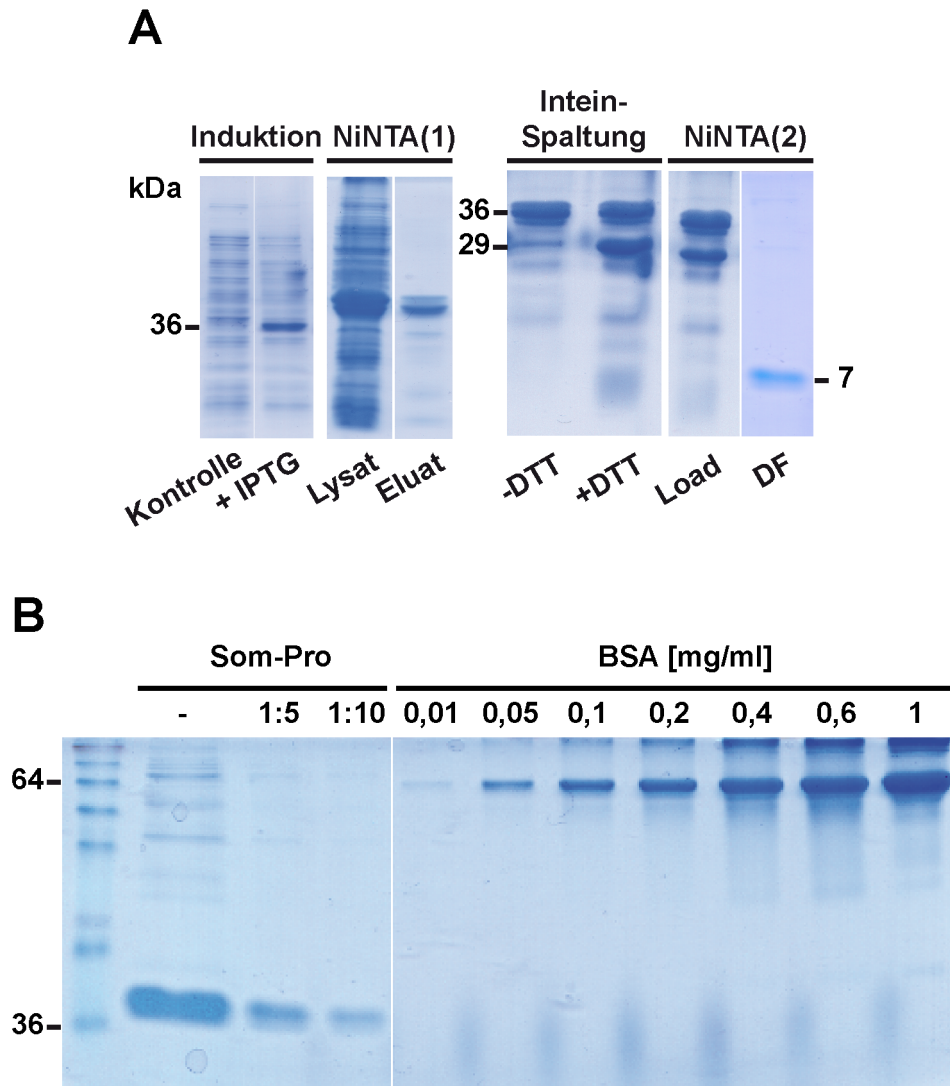


Abb. 15: Rekombinante Expression und Reinigung der Som-Prodomäne. (A) Die Expression des Som-Prodomänen-Vorläuferproteins (ca. 36 kDa) wurde durch IPTG (+IPTG) induziert. Die erste Ni-NTA-Aufreinigung (NiNTA(1)) des Proteins aus dem Lysat zeigt eine erfolgreiche Reinigung des Proteins. Die Abspaltung des Intein-Tags wurde durch Zugabe von DTT (+DTT) bei Raumtemperatur über Nacht erreicht. Die abgespaltene Som-Prodomäne (ca. 7 kDa) wurde in der zweiten Ni-NTA-Aufreinigung (NiNTA(2)) von dem restlichen Vorläuferprotein getrennt und konnte im Durchfluss (DF) detektiert werden. Kontrolle: uninduzierte *E. coli*-Kultur; Lysat: Zellysat der induzierten *E. coli*-Kultur; Load: auf die Ni-NTA-Säule aufgetragene Protein-Fraktion nach der Intein-Spaltungs-Reaktion. **(B)** Konzentrationsbestimmung der Som-Prodomäne (Som-Pro) mittels einer BSA-Standard-Reihe. Die aufgereinigte Som-Prodomäne wurde unverdünnt (-), 1:5 verdünnt (1:5) und 1:10 verdünnt (1:10) auf einem SDS-PA-Gel analysiert. Zum Vergleich der Konzentrationen wurden im selben Gel verschiedene, aufsteigende Konzentrationen (0,01-1 mg/ml) an BSA aufgetragen.

Die Prodomäne wurde aus dem Gel ausgeschnitten und einer Identifikation durch Flüssig-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Analyse (LC-MS/MS) im Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) der LMU München unterzogen. Die erhaltenen Peptid-Sequenzen der Probe (*Finger Print*) konnten eindeutig der Sequenz der Prodomäne von Somatostatin zugeordnet werden.

Anschließend wurde die Sekundärstruktur der aufgereinigten Prodomäne von Somatostatin durch CD-Analyse untersucht. Um eine hydrophobe Umgebung und somit eine interne Faltung des isolierten Peptids zu gewährleisten, wurde das Spektrum in Anwesenheit von 50 % Trifluoroethanol (TFE) gemessen (Tsai and Sherman, 1993). TFE ist ein hydrophiles, Wasserstoff-bindendes Lösungsmittel, welches dafür bekannt ist, α -helikale Strukturen zu stabilisieren, jedoch lediglich, wenn das Protein bzw. Peptid von sich aus eine Neigung zur Ausbildung einer α -Helix besitzt (Luidens et al., 1996). Die CD-Analyse wurde in Kollaboration mit Dr. Ralf Seidel und Prof. Martin Engelhardt (Universität Dortmund) durchgeführt.

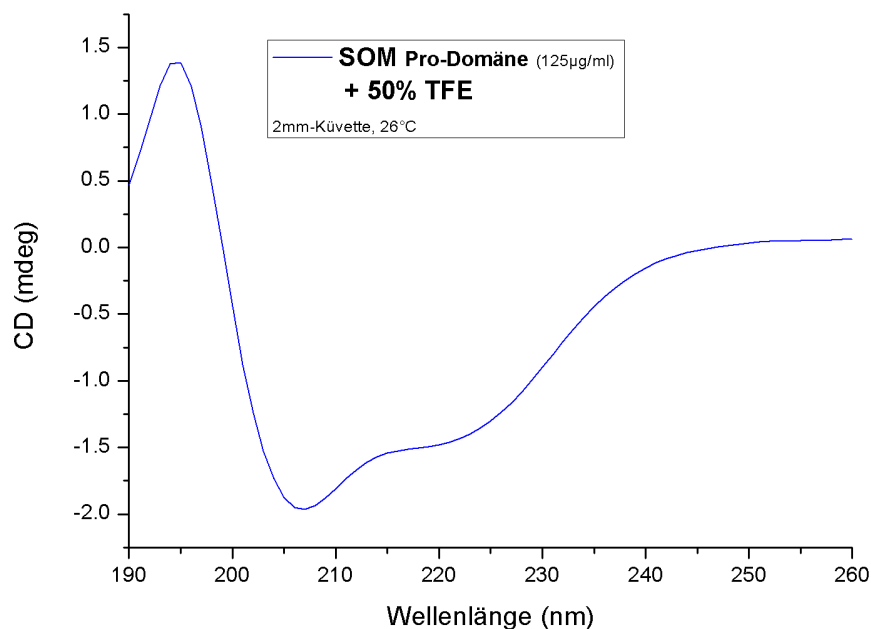


Abb. 16: CD-Analyse der isolierten Prodomäne von Somatostatin. Das Fern-UV-CD-Spektrum der rekombinanten Prodomäne (125 µg/ml) wurde bei 26 °C in Anwesenheit von 50 % TFE in einer 2mm-Küvette aufgenommen. Das Spektrum ist konsistent mit einer α -helikalen Konformation. X-Achse: Wellenlänge in Nanometer (nm), Y-Achse: molare Elliptizität in Milligrad (mdeg).

Das Ergebnis der CD-Analyse zeigt, dass die isolierte Prodomäne von Somatostatin die Fähigkeit besitzt eine α -helikale Struktur auszubilden. Typisch für eine α -helikale Struktur ist hierbei eine „Schulter“ der Kurve zwischen 210 und 220 nm und eine deutlich größere Ausdehnung der Elliptizität (positiv und negativ) im Vergleich zu einem Referenzspektrum einer β -Faltblatt-Struktur. Referenzspektren von Random-Coil-Strukturen sind meist durch ein inverses Bild der β -Faltblatt-Struktur gekennzeichnet und können somit relativ leicht von einer α -helikalen Konformation unterschieden werden (Greenfield and Fasman, 1969).

2.4 Eine α -helikale Struktur der Prodomäne begünstigt die ER-Translokation

Wie in Punkt 1.4.2 bereits erwähnt, kann die Prodomäne verschiedene Funktionen, z.B im Faltungsprozess des maturaen Proteins, übernehmen. Im folgenden Abschnitt sollte die Rolle der Prodomäne in der Biogenese der dargestellten Peptidhormone untersucht werden. Zudem sollte überprüft werden, ob die Funktion der Prodomäne von der α -helikalen Struktur der Prodomäne abhängt.

2.4.1 Die Deletion der Prodomäne führt zu einer verringerten oder gehemmten Sekretion der Hormondomäne

Um die Funktion der Prodomäne bei der Sekretion der drei Wildtyp (WT)-Peptidhormone TRH, Som und GnRH zu untersuchen, wurden zuerst Mutanten generiert, deren Prodomäne fehlt (Δ pro). Als Kontrolle wurden jeweils Mutanten hergestellt, deren Hormondomäne fehlt (Δ hor) (Abb. 17 A, links). Dabei wurde jeweils die ER-Signalsequenz (SS) des entsprechenden WT-Proteins beibehalten. Anschließend wurden die WT-Proteine sowie die generierten Mutanten in N2a-Zellen exprimiert und deren Expression und Sekretion in das Zellmedium nach drei Stunden analysiert (Abb. 17 A, rechts).

Alle WT-Proteine wurden als unprozessierte Propeptide sekretiert, da N2a-Zellen die für die Prozessierung der Propeptide notwendigen Protein-Konvertasen (hauptsächlich PC1/PC3 und PC2) nicht oder nur zu einem geringen Maße exprimieren (Day et al., 1993). Die Δ hor-Mutante von TRH (TRH Δ hor) wurde zu einem ähnlichen Anteil wie das WT-

Protein sekretiert (Abb. 17 A rechts). Im Gegensatz dazu, konnte für die Δ pro-Mutante von TRH eine deutlich reduzierte Sekretion beobachtet werden. Bei dieser Mutante konnten zusätzlich zwei Banden im Gel beobachtet werden, wobei die untere Bande vermutlich die SP-prozessierte Protein-Fraktion darstellt. Dies konnte durch weitere, in den nächsten Abschnitten folgende Experimente bestätigt werden. Eine Quantifizierung der sekretierten Fraktion in Relation zum Gesamtgehalt des exprimierten Proteins, zeigte eine signifikant reduzierte Sekretion der Δ pro-Mutante im Vergleich zu WT-TRH und TRH Δ hor (Abb. 17 B).

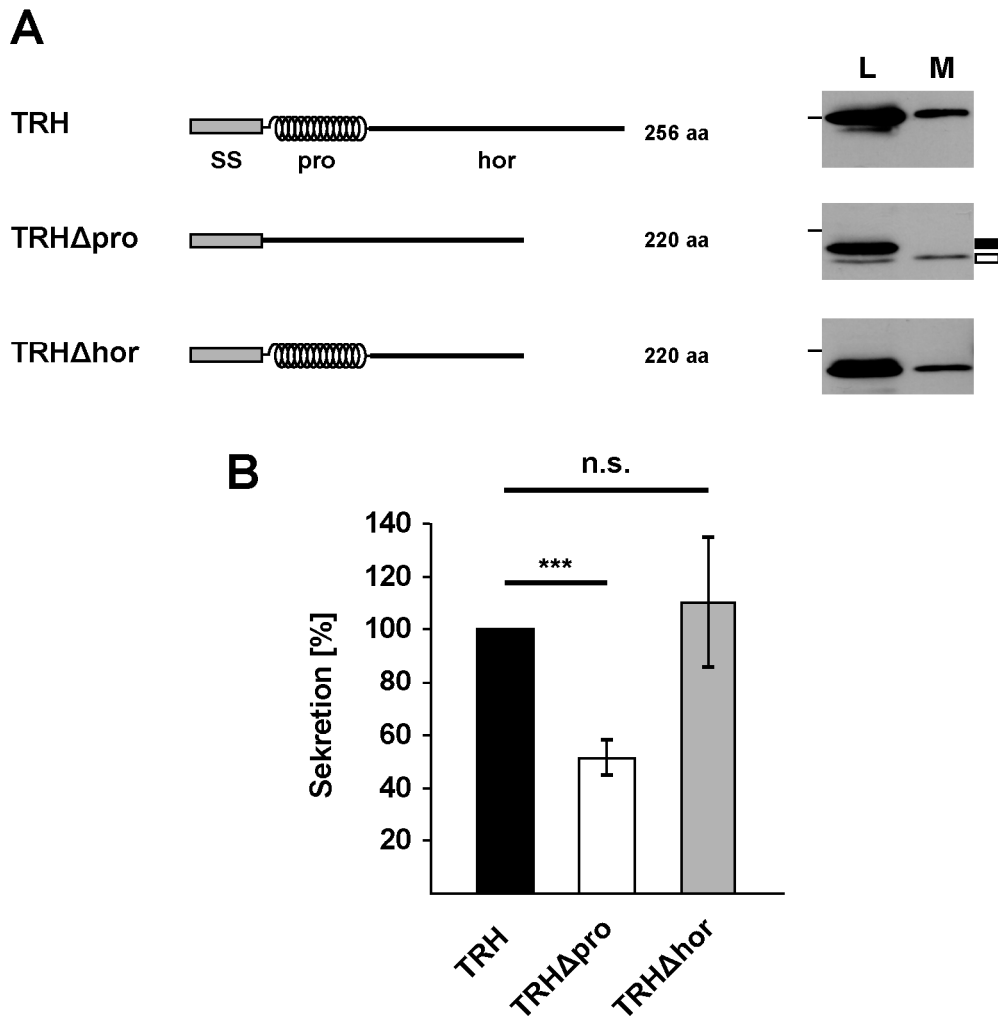


Abb. 17: Die Deletion der Prodomäne verringert die Sekretion der Hormon-Domäne von TRH. (A) Links: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Eine α -helikale Struktur ist durch eine Spirale, intrinsisch unstrukturierte Bereiche sind durch eine Linie gekennzeichnet. SS: ER-Signalsequenz, pro: Prodomäne, hor: Hormon-Domäne. Rechts: N2a-Zellen wurden transient mit den dargestellten Konstrukten transfiziert und die Sekretion der Proteine in den Zellkultur-Überstand nach 3 Stunden analysiert. Anschließend wurden die TRH-Konstrukte im Zell-Lysat (L) und im Zellkultur-Medium (M) durch Western-Blot-Analyse detektiert. Der Marker auf der linken Seite des Blots repräsentiert ein Molekulargewicht (MW) von 36 kDa. Ausgefülltes Rechteck:

unprozessierte Signalsequenz, unausgefülltes Rechteck: prozessierte Signalsequenz. **(B)** Bestimmung der Sekretions-Effizienz durch Quantifizierung der Banden-Intensitäten der jeweiligen Konstrukte im Medium relativ zur Menge der Konstrukte im Lysat. Die Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Die Sekretion des Wildtyp (WT)-TRH wurde dabei als 100 % definiert. Signifikanz (Studentischer t-Test): *** $p < 0,0005$; n.s.: nicht signifikant.

Analog wurden die Som- und GnRH-Mutanten auf ihre Sekretion untersucht (Abb. 18). Die Som Δ hor-Mutante wurde ebenfalls ähnlich stark sekretiert wie WT-Som, wobei die Lysat-Fraktion dieser Mutante im Vergleich zum WT sehr stark ist. Die Mutante kann eventuell nicht so schnell und effizient sekretiert werden wie das Wildtyp-Protein. Die unterschiedliche Höhe der Bande im Lysat und der sekretierten Bande von Som Δ hor deuten an, dass die Proteinfraction des Lysats möglicherweise SS-unprozessiert vorliegt (Abb. 18 A).

Eine *Pulse-Chase*-Analyse konnte zeigen, dass sowohl der WT als auch die Δ hor-Mutante von Som nach einer Stunde ab der radioaktiven Markierung (*Chase*) fast vollständig sekretiert wurden (Abb. 18 B, links). Eine Test-Analyse mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 wies ebenfalls daraufhin, dass die eventuell mit der Zeit akkumulierte nicht-translozierte Lysat-Fraktion der Δ hor-Mutante in der frühen Phase (eine Stunde nach radioaktiver Markierung) noch vollständig abgebaut wurde. Die Western-Blot- sowie die *Pulse-Chase*-Analyse zeigten trotz einer Expression im Lysat keine Sekretion der Mutante ohne Prodomäne (Som Δ pro). Die Test-Analyse mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 zeigte jedoch keine deutliche Stabilisierung der Bande (Abb. 18 B, rechts).

Die GnRH Δ hor-Mutante, bestehend nur aus dem GnRH-SP und der Prodomäne von GnRH, wird ähnlich stark sekretiert wie der WT und weist ebenso wie dieser im Lysat eine zweite Bande auf, wobei die untere Bande möglicherweise die SP-prozessierte Fraktion darstellt (Abb. 18 C). Die GnRH-Mutante ohne Prodomäne, GnRH Δ pro, konnte mittels Western-Blot-Analyse weder im Lysat noch im Medium detektiert werden.

Zusammenfassend zeigten die Analysen der drei verschiedenen Peptidhormone, dass die Prodomäne für eine effiziente Sekretion der Hormondomäne entscheidend ist. Im Falle von GnRH erwies sie sich sogar als essentiell für die Expression der Hormondomäne. Die Prodomäne hingegen konnte unabhängig von der Hormondomäne sekretiert werden. Diese Ergebnisse deuteten eine wichtige Rolle der Prodomäne in der Biogenese der dargestellten Peptidhormone an.

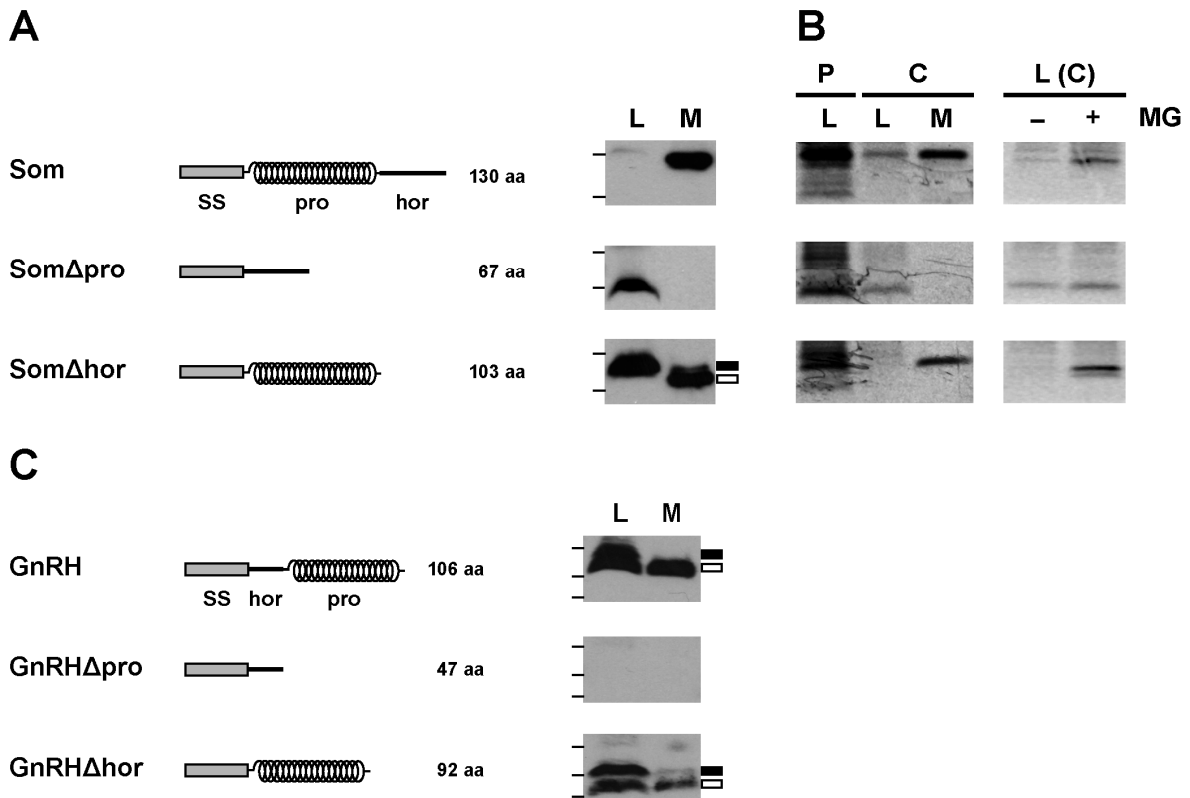


Abb. 18: Die Hormon-Domäne von Som und GnRH wird bei Abwesenheit der Prodomäne nicht sekretiert. (A) Die links dargestellten WT-Proteine und Mutanten wurden im Lysat (L) und Medium (M) wie in Abb. 17 dargestellt mittels des Western-Blot-Verfahrens analysiert (mitte). Eine α -helikale Struktur ist durch eine Spirale, intrinsisch unstrukturierte Bereiche sind durch eine Linie gekennzeichnet. SS: ER-Signalsequenz, pro: Prodomäne, hor: Hormon-Domäne. Die Marker auf der linken Seite des Blots repräsentieren ein Molekulargewicht von 16 kDa (oben) und 7 kDa (unten). Ausgefülltes Rechteck: unprozessierte Signalsequenz, unausgefülltes Rechteck: prozessierte Signalsequenz. **(B)** Die Expression und Sekretion von WT-Som und der entsprechenden Mutanten wurde zudem mittels *Pulse-Chase*-Analyse untersucht (links). Dafür wurden Zellen transient mit den Som-Konstrukten transfiziert und anschließend für 15 min mit L-[³⁵S]Methionin radioaktiv markiert (*Pulse*). Im nächsten Schritt wurden die Zellen entweder sofort (*Pulse*, P) oder nach einer weiteren Inkubation für eine Stunde in Vollmedium (*Chase*, C), geerntet. Für die Analyse des proteasomalen Abbaus der Konstrukte wurden die Zellen über das gesamte Experiment hinweg entweder in Medium ohne (-) oder mit (+) dem proteasomalen Inhibitor MG-132 (MG) kultiviert und anschließend die Lysate der Chase-Proben (L(C)) immunpräzipitiert (rechts). Die Immuno-Pellets wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. **(C)** Das GnRH-Konstrukt ohne Prodomäne (GnRHΔpro) konnte weder im Lysat noch in der sekretierten Fraktion der transfizierten Zellen durch Western-Blot Analyse detektiert werden. Die Marker links vom Blots repräsentieren Größen von 16, 7 und 4 kDa (von oben nach unten). Ausgefülltes Rechteck: unprozessierte Signalsequenz, unausgefülltes Rechteck: prozessierte Signalsequenz.

2.4.2 Ein Austausch der Prodomäne durch heterologe alpha-helikale Domänen kann die sekretionsfördernde Funktion der Prodomäne ersetzen

Im Abschnitt 2.4.1 wurde gezeigt, dass die Prodomänen für die Sekretion und damit für die Biogenese der Neuropeptidhormone benötigt werden. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die Primärsequenz der Prodomäne für diese Funktion eine Rolle spielt, oder ob die Funktion möglicherweise durch die Sekundärstruktur, d.h. die Eigenschaft der Prodomäne eine α -Helix auszubilden, vermittelt wird.

Um diese Idee experimentell zu untersuchen, wurden die Prodomänen von TRH, Som und GnRH entweder durch heterologe α -helikale oder intrinsisch unstrukturierte Domänen ersetzt. Hierbei wurden Proteindomänen verwendet, deren Struktur bereits experimentell ermittelt wurde (Abb. 19, A, B und C, links). Als α -helikale Domänen dienten hierbei

- (1) die α -helikale Prodomäne von Somatostatin (aa 25-88, diese Arbeit)
- (2) die C-terminale Domäne des Prion-Proteins (PrP, aa 173-219 oder aa 130-230) (Donne et al., 1997; Riek et al., 1996)
- (3) eine synthetische α -Helix (Bhushan et al., 2010).

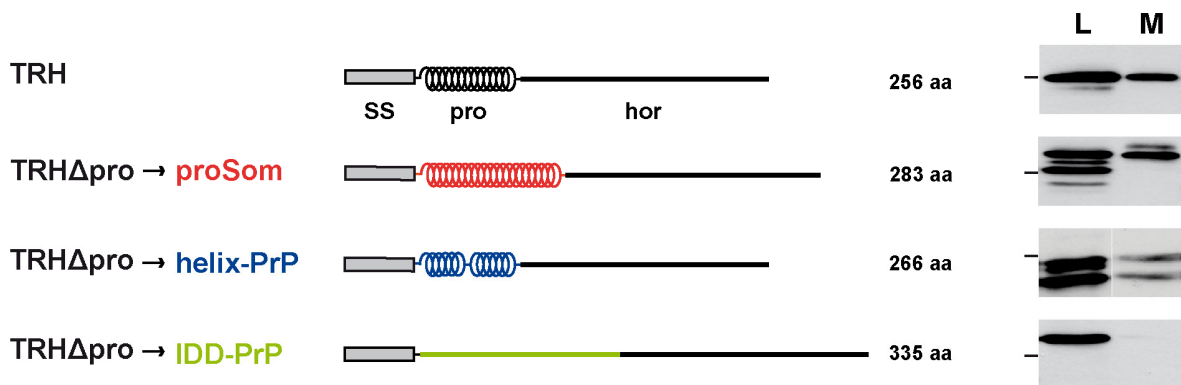
Letztere besitzt ein Muster aus 10x EAAAK Wiederholungen, wobei Alanine (A) eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit besitzen eine α -helikale Struktur zu bilden (Pace and Scholtz, 1998). Diese Struktur wird hierbei durch die flankierenden Aminosäuren (Glu und Lys) durch die Ausbildung von Salzbrücken stabilisiert (Bhushan et al., 2010). Als intrinsisch unstrukturierte Domänen wurden folgende Proteinabschnitte verwendet:

- (1) die N-terminale Domäne von PrP (aa 23-115) (Donne et al., 1997)
- (2) die N-terminale Domäne von Shadoo (Sho, aa 25-125) (Daude et al., 2010; Watts et al., 2007).

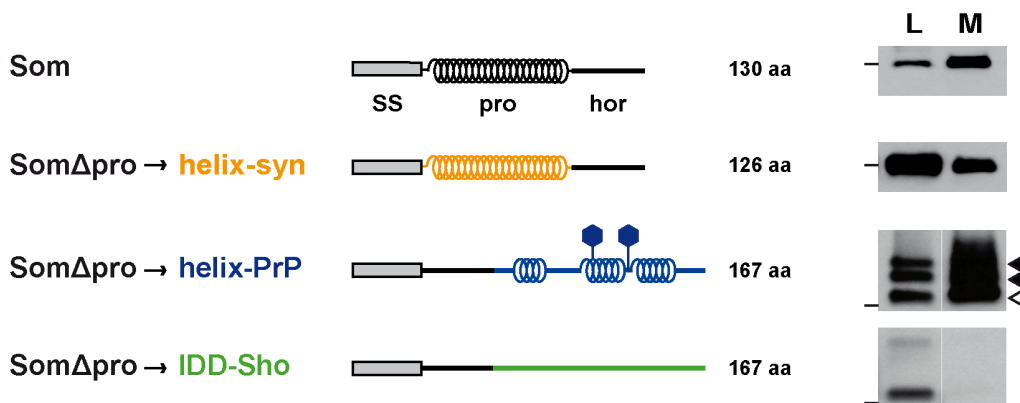
N2a-Zellen wurden mit den verschiedenen Konstrukten transient transfiziert und anschließend wurde das Zell-Lysat (L) und das Medium (M) der Zellen mittels Western-Blot-Verfahren analysiert.

Die Analyse zeigte deutlich, dass heterologe α -helikale Domänen ohne vergleichbare Primärsequenz (Abb. 19, dargestellt durch unterschiedliche Farben) die Sekretion der intrinsisch unstrukturiert vorhergesagten Hormondomänen ermöglichten (Vorhersage siehe Abschnitt 2.2). Im Gegensatz dazu waren intrinsisch unstrukturierte Domänen verschiedener Herkunft nicht in der Lage, eine Sekretion der unstrukturierten Hormondomäne zu vermitteln (Abb. 19, rechts).

A



B



C

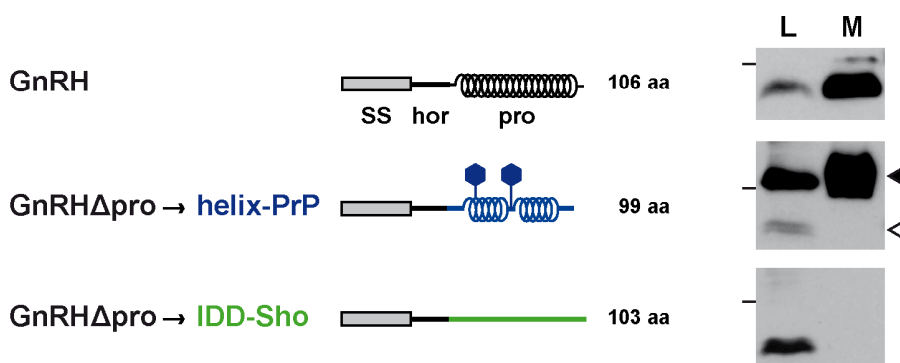


Abb. 19: Heterologe α -helikale Domänen können die Sekretion der Hormondomäne vermitteln. Die Prodomänen von TRH (**A**), Som (**B**) und GnRH (**C**) wurden durch andere Domänen mit definierter Struktur ersetzt. Links: Schematische Darstellung der generierten Konstrukte. Unterschiedliche Aminosäure (aa)-Sequenzen sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet. proSom: α -helikale Prodomäne von Somatostatin; helix-PrP: α -helikales Segment der strukturierten, C-terminalen Domäne des Prion-Proteins (PrP); IDD-PrP: Teil der intrinsisch-unstrukturierten, N-terminalen Domäne des Prion-Proteins; helix-syn: synthetische α -helix; IDD-Sho: Teil der intrinsisch-unstrukturierten Domäne des Shadoo (Sho)-Proteins. Eine α -helikale Struktur ist durch eine Spirale, intrinsisch unstrukturierte Bereiche sind durch eine Linie gekennzeichnet. SS: ER-Signalsequenz, pro: Prodomäne, hor: Hormon-Domäne. Ausgefülltes Sechseck: Glykosylierungsstelle. Rechts: N2a-Zellen wurden transient mit den dargestellten Konstrukten transfiziert und Lysat (L)- und Medium(M)-Fraktionen wurden wie in Abb. 17 beschrieben mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. Die Balken an den Seiten der Blots repräsentieren Größen von 36 kDa (**A**) und 16 kDa (**B, C**). Ausgefüllte Pfeilspitze: glykosylierte Fraktion, unausgefüllte Pfeilspitze: unglykosylierte Fraktion.

2.4.3 Die Prodomäne ist für eine erfolgreiche ER-Translokation erforderlich

In Abschnitt 2.4.1 konnte gezeigt werden, dass die Deletion der Prodomäne eine verringerte oder gehemmte Sekretion zur Folge hat. Die Prodomäne kann hierbei in mehreren Prozessen der Biogenese eine Rolle spielen. Denkbare Mechanismen sind z.B. ein Einfluss auf die Zielsteuerung der Proteine an die ER-Membran, die Translokation ins ER oder die Sortierung und Stabilität im sekretorischen Biogenese-Weg (Chen et al., 1995; Romero et al., 2008; Sevarino et al., 1989; Stoller and Shields, 1989). Dieser Arbeit vorangegangene Studien an Mutanten des Prion-Proteins konnten bereits zeigen, dass α -helikalen Domänen für einen effizienten ER-Import von intrinsisch-unstrukturierten Protein-Segmenten benötigt werden (Heske et al., 2004; Miesbauer et al., 2009). Deshalb wurde im Folgenden eine Funktion der α -helikalen Prodomänen bei der ER-Zielsteuerung und der ER-Translokation untersucht.

Durch den Digitonin-Solubilisierungs-Assay sollte eine mögliche cytosolische Lokalisation der nicht-sekretierten TRH Δ pro-Mutante untersucht werden. Der Assay beruht auf der selektiven Permeabilisierung der cholesterinreichen Plasmamembran, wobei andere Organellmembranen intakt bleiben (Plutner et al., 1992). Dadurch werden lösliche, cytosolische Proteine freigesetzt und können durch Zentrifugation von Proteinen aus Membrankompartimenten- wie dem ER- abgetrennt werden (Abb. 20 A). Im Vergleich mit den Gesamtlisaten der jeweiligen Konstrukte konnte anschließend mittels SDS-PAGE

und Western-Blot-Analyse der relative Anteil der Proteine im Cytosol oder in der Pellet-Fraktion bestimmt werden.

In diesem Assay konnte die TRH Δ pro-Mutante teilweise in der cytosolischen Fraktion (CF) nachgewiesen werden (Abb. 20 B). Wie erwartet, wurde die effizient sekretierte Mutante TRH Δ hor durch die Digitonin-Behandlung nicht aus den Zellen freigesetzt und konnte lediglich in der Pellet-Fraktion nachgewiesen werden. Dies bestätigt ebenfalls, dass die Anwesenheit von TRH Δ pro in der cytosolischen Fraktion nicht auf eine Permeabilisierung der ER-Membran zurückzuführen ist.

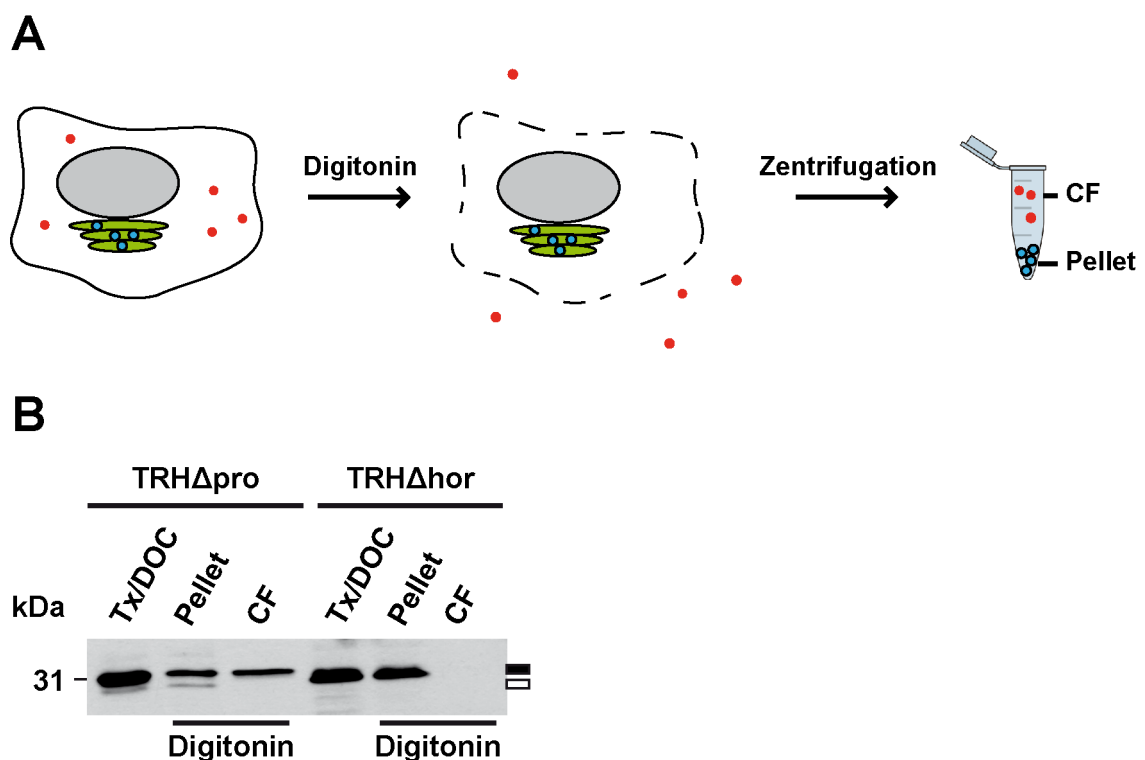


Abb. 20: Die nicht-sekretierte Fraktion von TRH Δ pro wird nicht ins ER transloziert. (A) Schematische Darstellung des Digitonin-Solubilisierungs-Assays. Hierbei werden die Zellen mit geringen Konzentrationen an Digitonin behandelt, um eine selektive Zerstörung der Plasmamembran (gestrichelte Linie), aber nicht der Organellmembranen wie z.B. des ERs (grün) oder des Nukleus (grau) zu erreichen. Durch Zentrifugation können die Proteine in eine lösliche Fraktion (CF) und eine Membran-Fraktion (Pellet) getrennt werden. Sekretorische Proteine (blaue Punkte) finden sich hierbei in der Pellet-Fraktion, während cytosolische Proteine (rote Punkte) im Überstand (CF) verbleiben. **(B)** Transient transfizierte N2a-Zellen wurden in Transport-Puffer mit 0,004 % Digitonin für 5 Minuten auf Eis solubilisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand (CF) und die Pellet-Fraktion (Pellet) wurden mittels Western-Blotting analysiert. Parallel dazu wurden mit 0,5 % Tx/DOC vollständig lysierte Zellen analysiert (Tx/DOC). Ausgefülltes Rechteck: unprozessierte Signalsequenz, unausgefülltes Rechteck: prozessierte Signalsequenz.

Um eine Prozessierung der ER-Signalsequenz (SS) in den Mutanten zu untersuchen, wurden entsprechende Mutanten von TRH Δ hor und TRH Δ pro ohne Signalsequenz generiert (Δ SS•TRH Δ hor und Δ SS•TRH Δ pro). Nach transienter Expression in N2a-Zellen wurden die Konstrukte anhand einer SDS-PAGE und Western-Blotting analysiert (Abb. 21). Es zeigte sich, dass die Höhe der Bande des Lysats der TRH Δ hor-Mutante identisch ist mit der Höhe der Bande des Lysats der generierten Mutante ohne Signalsequenz (Δ SS•TRH Δ hor). Dies wies darauf hin, dass diese Mutante *in vivo* in das ER transportiert und infolgedessen die Signalsequenz vollständig prozessiert wird. Im Gegensatz dazu wies die TRH Δ pro-Mutante eine langsamere Migration im SDS-Gel auf als das entsprechende Konstrukt ohne Signalsequenz (Δ SS•TRH Δ hor). Dies wies daraufhin, dass bei einem Großteil von TRH Δ pro die Signalsequenz in Zellen nicht geschnitten bzw. prozessiert wird. Zudem war auffallend, dass lediglich der unprozessierte Anteil in der cytosolischen Fraktion des Digitonin-Assays detektiert werden konnte (vgl. Abb. 20 unten). Dies sprach dafür, dass die unprozessierte Fraktion identisch mit der nicht-translozierten Fraktion ist und ließ vermuten, dass die TRH Δ pro-Mutante nicht effizient ins ER importiert werden kann.

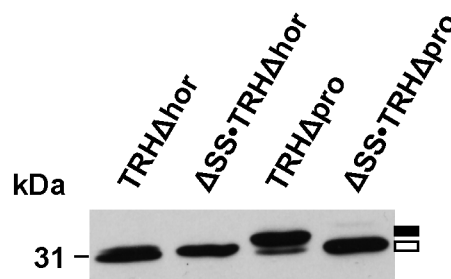


Abb. 21: Die Mutante TRH Δ pro weist ein größtenteils unprozessiertes ER-Signalsequenz auf. N2a-Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mittels Wester-Blot-Analyse detektiert. Ausgefülltes Rechteck: unprozessierte Signalsequenz, unausgefülltes Rechteck: prozessierte Signalsequenz.

In einem zweiten Assay wurde die ER-Translokation der Somatostatin-Konstrukte untersucht. Hierfür wurden die beiden Som-Mutanten (Som Δ pro und Som Δ hor) und das Wildtyp-Somatostatin (Som) in einem Retikulozyten-Lysat *in vitro* in An- oder Abwesenheit von mikrosomalen Membranen (RM) synthetisiert. Die Translokation in die Mikrosomen wurde durch die Behandlung der Proben mit Proteinase K (PK) überprüft, welche alle Proteine degradiert, die sich außerhalb der mikrosomalen Membranen befinden. Die

Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Es zeigten sich klare Unterschiede zwischen Som Δ hor und Som Δ pro. Im Falle von Som Δ hor konnte -wie für Som- in Anwesenheit von Mikrosomen eine zweite, im SDS-Gel schneller laufende Bande detektiert werden (Abb. 22 A). Die Anwesenheit dieser Bande ist ein Hinweis auf die Prozessierung der ER-Signalsequenz (SS). Zusätzlich wurde die SS-prozessierte Bande bei Behandlung der Mikrosomen mit PK vor dem Abbau geschützt. Im Gegensatz dazu wies Som Δ pro in Anwesenheit von Mikrosomen keine zweite Bande auf und konnte durch die Behandlung mit PK degradiert werden. Der Anteil der protektierten Protein-Fraktion wurde in Relation zum Gesamtprotein in Anwesenheit von Mikrosomen bestimmt (Abb. 22 B).

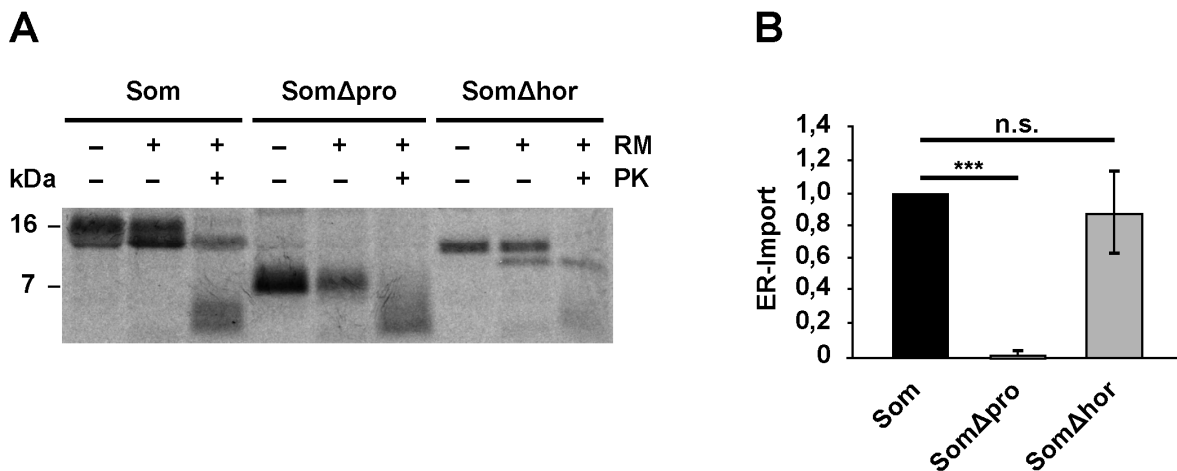


Abb. 22: Die intrinsisch-unstrukturierte Mutante Som Δ pro wird *in vitro* nicht in mikrosomale Membranen importiert. (A) Die angegebenen Konstrukte wurden *in vitro* in einem Retikulozyten-Lysat supplementiert mit L-[³⁵S]Methionin in An(+)- oder Abwesenheit (-) von rauen mikrosomalen Membranen (RM) für eine Stunde bei 30 °C translatiert. Nach der Translation wurden die Proben mit Proteinase K (PK) behandelt (+) oder unbehandelt (-) mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Der nieder-molekulare Schmier (< 7 kDa) in Anwesenheit von Mikrosomen (+RM) repräsentiert unspezifische Abbau-Produkte nach PK-Behandlung (+PK), welche auch bei PK-Behandlung der Proben ohne Mikrosomen auftraten (nicht gezeigt). (B) Der Import in die Mikrosomen (ER-Import) wurde durch Analyse des Verhältnisses der PK-resistenten Fraktion (+RM, +PK) zur Gesamt-Protein-Fraktion in Anwesenheit von Mikrosomen (+RM, -PK) bestimmt. Der relative, PK-resistente Anteil des WT-Proteins (Som) wurde dabei als 1 definiert. Die Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentischer t-Test): *** p < 0,0005; n.s.: nicht signifikant.

Um den Einfluss des strukturellen Aspektes der zu translozierenden Polypeptidkette näher zu untersuchen, wurden zwei weitere Mutanten mit Hilfe des *in vitro* Translations-Assays untersucht: PrP-115 α 2 α 3 und PrP-115/31^{CHO}+115. Beide Mutanten besitzen die ER-Signalsequenz (SS) von PrP, welches eine kotranslationale Translokation ins ER vermittelt (Fons et al., 2003b; Kim and Hegde, 2002). Die Struktur von 115 α 2 α 3 entspricht der N-terminal unstrukturierten Domäne von PrP (115, aa 23-115) (Donne et al., 1997) mit einer artifiziellen Glykosylierungsstelle. Auf diese Domäne folgen die Helices α 1 und α 2 der C-terminalen, α -helikalen Domäne von PrP (α 2 α 3) (James et al., 1997; Riek et al., 1996) mit zwei natürlichen Glykosylierungsstellen. Die Struktur von 115/31^{CHO}+115 entspricht zwei aufeinanderfolgenden unstrukturierten Domänen von PrP (Abb. 23 A). Die ER-Translokation beider Mutanten wurde bereits *in vivo* und *in vitro* charakterisiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PrP-115 α 2 α 3, nicht aber PrP-115/31^{CHO}+115 ins ER bzw. in die mikrosomalen Membranen importiert wird (Miesbauer et al., 2009).

In dem folgenden Assay sollte die *in vitro* Translokation der Mutanten in Retikulozyten-Lysat und Weizenkeim-Extrakt in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen verglichen werden (Abb. 23 B). Dieser Ansatz zeigte, dass in Tieren wie in Pflanzen lediglich die Mutante mit der C-terminalen, α -helikalen Domäne (115 α 2 α 3) eine glykosylierte Bande in Anwesenheit der Mikrosomen aufwies. Die Glykosylierung von Proteinen ist eine im ER stattfindende posttranslationale Modifikation und somit ein Hinweis auf eine erfolgreiche Translokation der Proteine ins ER.

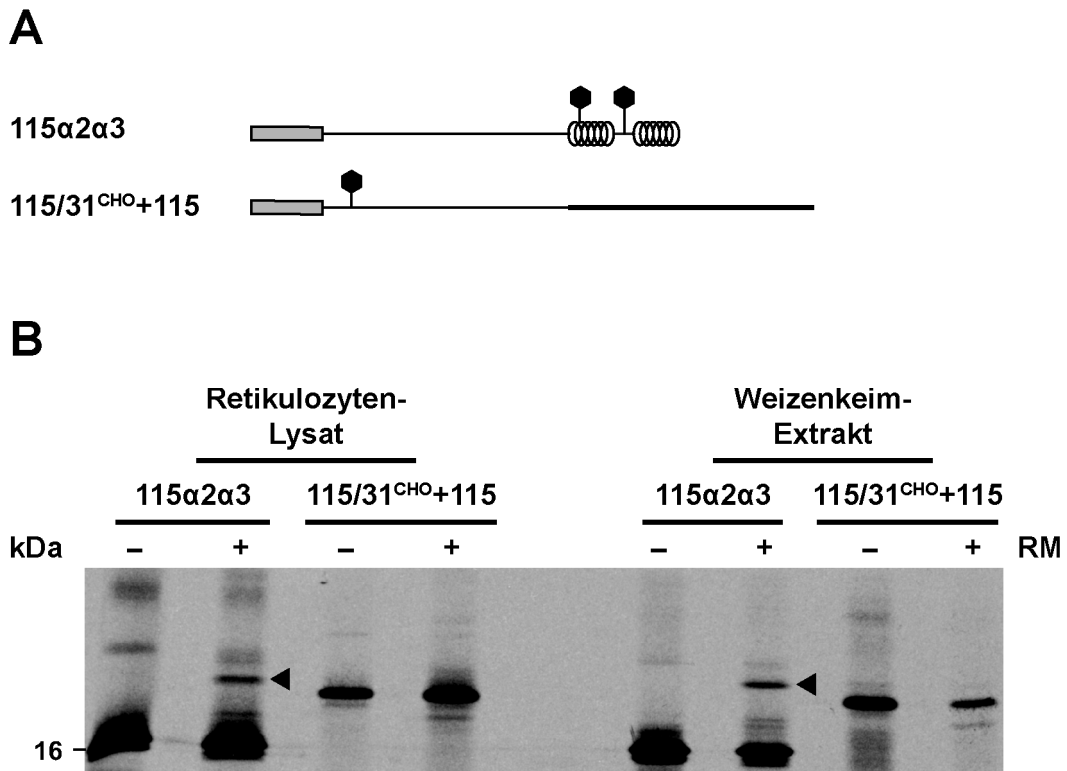


Abb. 23: Vergleich der *in vitro* ER-Translokation von α -helikalen oder intrinsisch-unstrukturierten Proteinen in Retikulozyten-Lysat und Weizenkeim-Extrakt. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Graues Rechteck: ER-Signalsequenz von PrP; Spirale: α -helikale Struktur; Linie: intrinsisch unstrukturiertes Segment; Ausgefülltes Sechseck: Glykosylierungsstelle. **(B)** Die Konstrukte wurden *in vitro* in Retikulozyten-Lysat oder Weizenkeim-Extrakt supplementiert mit L-[³⁵S]Methionin in An(+)- oder Abwesenheit (-) von mikrosomalen Membranen (RM) für eine Stunde bei 30 °C bzw. für eine Stunde bei 25 °C translatiert. Nach der Translation wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.4.4 Die kotranslationale Zielsteuerung und Bindung an die ER-Membran wird nicht durch eine intrinsisch unstrukturierte Ribosomen- assoziierte Polypeptidkette beeinträchtigt

Die bisherigen Ergebnisse deuteten auf eine Regulation des ER-Imports durch eine α -helikale Struktur der Prodomäne hin. Wie in der Einleitung (Punkt 1.1.2) beschrieben, gibt es mehrere Kontrollpunkte, an welcher eine Regulation des ER-Imports stattfinden könnte. Der erste Schritt ist die SRP-abhängige Zielsteuerung der naszierenden Polypeptidkette an die ER-Membran. Im folgenden Abschnitt sollte ein Einfluss der α -helikalen Prodomäne auf diesen Prozess untersucht werden.

Hierfür wurde ein Zielsteuerungs (*Targeting*)-Assay *in vitro* durchgeführt. In diesem Assay wurde sowohl die Zielsteuerung der Konstrukte, als auch deren Bindung an die Membran unter physiologischen Salzbedingungen untersucht (Abb. 24 A). Für den Assay wurden „gestutzte“ mRNAs der zu analysierenden Konstrukte generiert, welche kein Stop-Kodon enthielten (Abb. 24 B und Abb. 25 A). Diese wurden anschließend in einem Retikulozyten-Lysat in Anwesenheit von radioaktivem L-[³⁵S]Methionin translatiert. Die Verwendung von mRNAs ohne Stop-Kodon verhindert die Bindung von Freisetzung-Faktoren am Ribosom. Dies führt dazu, dass die am Ribosom synthetisierte Polypeptidkette nicht von der tRNA gelöst werden kann und am Ribosom „festsitzt“ (*Ribosome Stalling*) (Beckmann et al., 2001). Diese stabilen Komplexe aus Ribosom und naszierender Polypeptidkette werden als RNCs (*Ribosome-nascent chain complexes*) bezeichnet. Nach Translation der mRNAs der Konstrukte definierter Länge in Anwesenheit von mikrosomalen Membranen, wurden die membrangebundenen RNCs anschließend von den nicht-membrangebundenen RNCs und losgelösten, „freien“ Polypeptidketten durch Sedimentation getrennt (Rutkowski et al., 2001; Rutkowski et al., 2003). „Freie“ Polypeptidketten entstehen, da das *Stalling*-durch mRNAs ohne Stop-Codon normalerweise nicht an allen Ribosomen effizient erfolgt.

Die Pelletfraktion, welche die sedimentierten, membrangebundenen RNCs enthielt, wurde auf einem SDS-PA-Gel (im Falle von TRH) bzw. auf einem Schäggergel (im Falle von Som) nach Autoradiographie analysiert (Abb. 24 C und Abb. 25 B). Als Negativkontrolle diente jeweils ein entsprechendes Konstrukt ohne ER-Signalsequenz (Δ SS) mit ähnlicher Länge wie die analysierten Konstrukte. Als Kontrolle der Expression der Konstrukte und als Quantifizierungskontrolle wurden Polysomen der jeweiligen Konstrukte ohne Membranen sedimentiert (total). Als zusätzliche Kontrolle für eine unspezifische Sedimentation der Translationsprodukte (z.B. durch Aggregatbildung), wurde ebenso eine Probe der Konstrukte ohne Membranen sedimentiert (-RM).

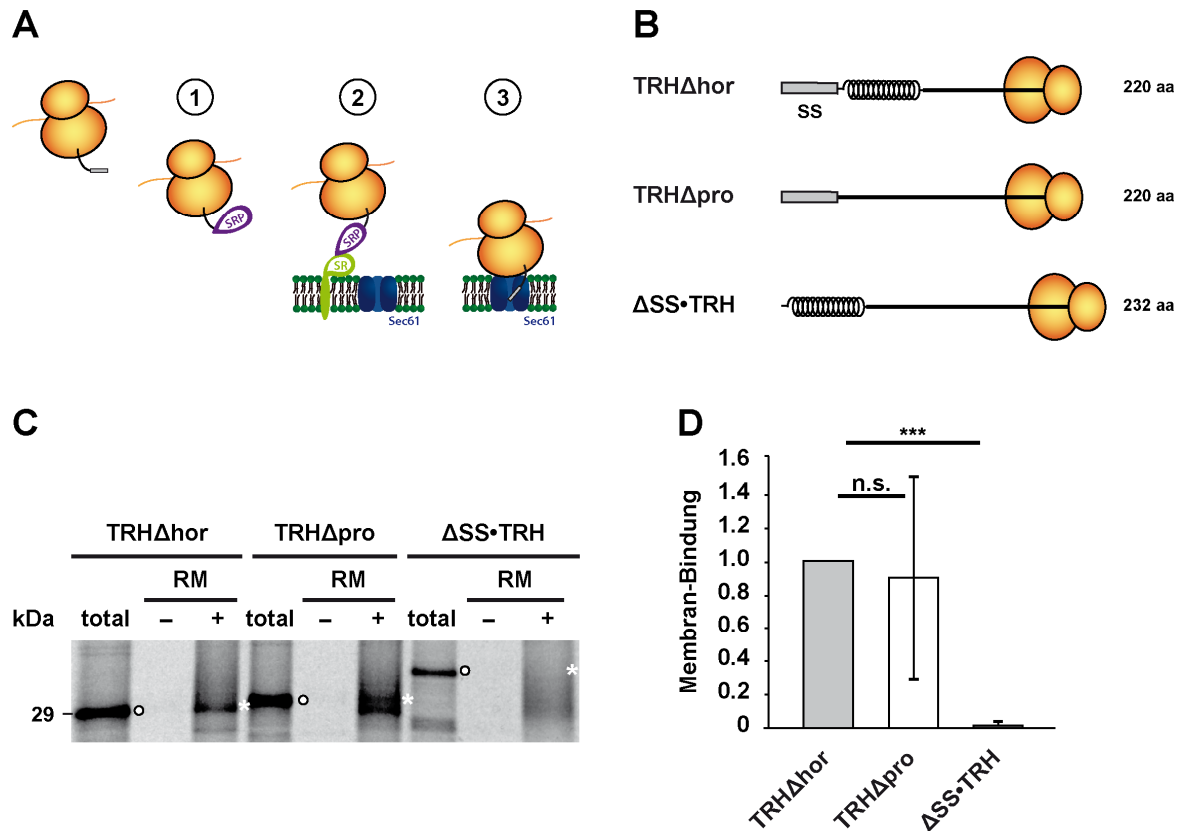


Abb. 24: Die Ribosomen-assoziierten TRH-Mutanten werden unabhängig von ihrer Sekundärstruktur an die ER-Membran zielgesteuert. **(A)** Schematische Darstellung der Signalsequenz (SS)-abhängigen Zielsteuerung an die ER-Membran. Mikrosomen-gebundene RNCs schließen die folgenden Interaktionen mit ein: 1) SRP-Bindung der Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette, 2) SRP-SR-Interaktion an der Membran und 3) Bindung des Ribosoms mit assoziierter Polypeptidkette an den Sec61-Translokon-Komplex. **(B)** Schematische Darstellung der verwendeten *Stalling*-Konstrukte. Eine α -helikale Struktur ist durch eine Spirale, intrinsisch unstrukturierte Bereiche sind durch eine Linie gekennzeichnet. SS: ER-Signalsequenz **(C)** mRNA-Matrizen ohne Stop-Kodon wurden *in vitro* in Retikulozytenlysat supplementiert mit L-[35 S]Methionin in An (+)- oder Abwesenheit (-) von mikrosomalen Membranen (RM) translatiert. Membran-gebundene naszierende Polypeptidketten wurden für drei Minuten bei 50.000 g durch ein Sukrose-Kissen pelletiert. Parallel wurden Polysomen von Translations-Ansätzen ohne Mikrosomen für 30 min bei 50.000 g sedimentiert (total). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. **(D)** Die Membran-Bindung wurde durch Analyse des Verhältnisses der Menge der mikrosomal-gebundenen Fraktion (+ RM, weiße Sternchen) zur Menge der zugehörigen Gesamt-Protein-Fraktion (total, weiße Punkte) unter Berücksichtigung der unspezifischen Pelletierung (- RM) bestimmt. Die Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Der Membran-gebundene Anteil der Δ hor-Mutante wurde dabei jeweils als 1 definiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentischer t-Test): *** $p < 0,0005$; n.s.: nicht signifikant.

In Abb. 24 und Abb. 25 ist eine deutliche Sedimentierung der Konstrukte mit Signalsequenz (SS) in Anwesenheit, jedoch nicht in Abwesenheit von Mikrosomen zu

erkennen. In Abb. 24 im Ansatz mit Mikrosomen ist möglicherweise eine Fraktion mit geschnittener SS als eine zweite, schneller-laufende Bande zu sehen. Für die Som-Konstrukte konnte keine für die Ansätze mit Mikrosomen spezifische Bande detektiert werden. Der Grund dafür ist vermutlich die unterschiedliche Länge der TRH- und Som-Konstrukte. Dabei ermöglichen die an die Membran gesteuerten und gebundenen TRH-Konstrukte durch ihre Länge möglicherweise eine teilweise Insertion der Peptidkette und damit ein Schneiden des SP. Die Som-Mutanten besitzen eine optimale Länge für die SRP-Bindung, sind jedoch zu kurz, um eine für die Signalpeptidase erreichbare Membran-Insertion der Polypeptidkette zu vermitteln.

In Abb. 24 D und Abb. 25 C wurde die Effizienz der Zielsteuerung bzw. der Bindung an die Membran durch Berechnung des Verhältnisses von membrangebundenen RNCs zu den gesamten pelletierten Polysomen unter Einbezug der unspezifischen Sedimentation bestimmt. Die Werte der Δ pro- und der Δ SS-Mutante wurden dabei auf die Werte der Δ hor-Mutanten normalisiert. Die großen Schwankungen der Ergebnisse in beiden Fällen resultieren vermutlich aus einer variierenden Zielsteuerung bzw. Bindung der ‚gestutzten‘ Konstrukte an die ER-Membranen aufgrund einer variierenden Konzentration von SRP bzw. des Translokationskanals in gleichen Probenvolumina des Translationsextrakts bzw. der mikrosomalen Membranen. Im Vergleich zu den Δ SS-Mutanten wird jedoch deutlich, dass die RNCs der Δ pro-Mutanten im Mittel ähnlich effizient an die Membranen zielgesteuert werden wie die Δ hor-Mutanten.

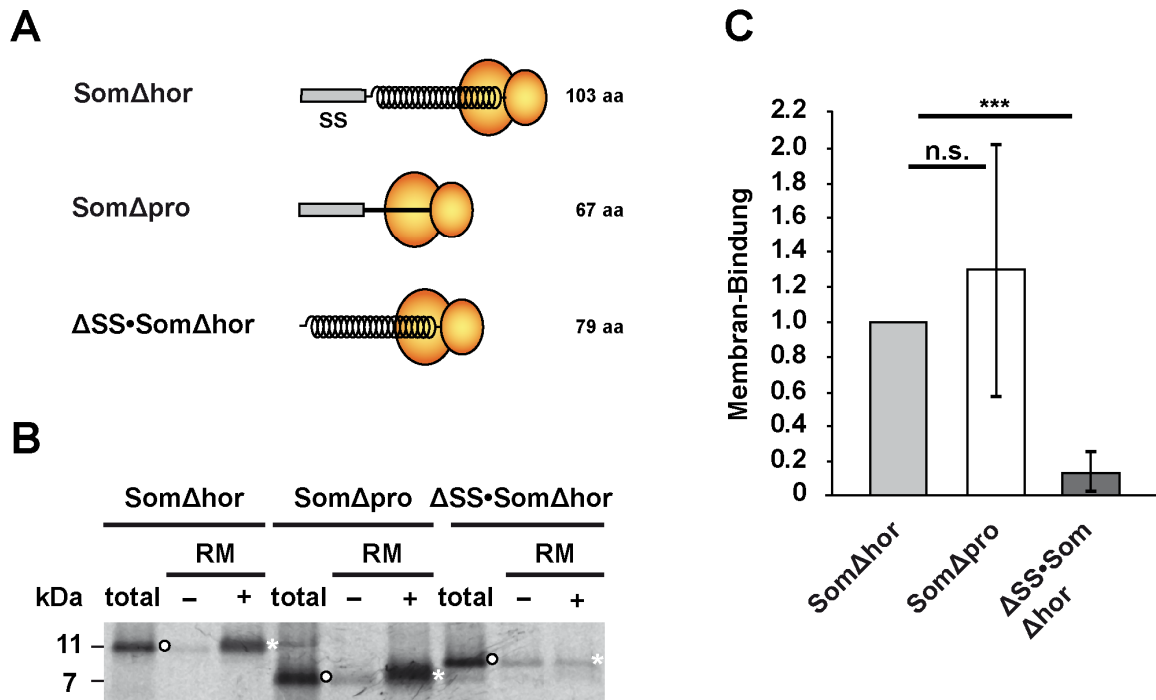


Abb. 25: Die Ribosomen-assoziierten Som-Mutanten werden unabhängig von ihrer Sekundärstruktur an die ER-Membran zielgesteuert. (A) Schematische Darstellung der verwendeten *Stalling*-Konstrukte. Eine α -helikale Struktur ist durch eine Spirale, intrinsisch unstrukturierte Bereiche sind durch eine Linie gekennzeichnet. SS: ER-Signalsequenz (B) mRNA-Matrizen ohne Stop-Kodon wurden *in vitro* in Retikulozytenlysat supplementiert mit L-[35 S]Methionin in An (+)- oder Abwesenheit (-) von mikrosomalen Membranen (RM) translatiert. Membran-gebundene naszierende Polypeptidketten wurden für drei Minuten bei 50.000 g durch ein Sukrose-Kissen pelletiert. Parallel wurden Polysomen von Translations-Ansätzen ohne Mikrosomen für 30 min bei 50.000 g sedimentiert (total). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. (C) Die Membran-Bindung wurde durch Analyse des Verhältnisses der Menge der mikrosomal-gebundenen Fraktion (+ RM, weiße Sternchen) zur Menge der zugehörigen Gesamt-Protein-Fraktion (total, weiße Punkte) unter Berücksichtigung der unspezifischen Pelletierung (- RM) bestimmt. Die Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Der Membran-gebundene Anteil der Δ hor-Mutante wurde dabei jeweils als 1 definiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentischer t-Test): *** $p < 0,0005$; n.s.: nicht signifikant.

Um weiterhin den möglichen Einfluss von α -helikalen bzw. intrinsisch unstrukturierten Domänen auf die ER-Zielsteuerung zu untersuchen, wurde zusätzlich die Zielsteuerung zweier Modellproteine analysiert, deren Struktur bereits experimentell bestimmt wurde. Zum einen wurden die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ der C-terminalen, α -helikalen Domäne von PrP mit zwei natürlichen Glykosylierungsstellen an die ER-SS von PrP fusioniert. (James et al., 1997; Riek et al., 1996). Als intrinsisch unstrukturierte Domäne wurde die N-terminale unstrukturierte Domäne von PrP (Donne et al., 1997) mit einer artifiziellen

Glykosylierungsstelle nach dem SP (aa 31) verwendet. Für die analysierten Konstrukte wurde eine gängige Konstruktlänge für die Generierung von RNCs gewählt (ca. 100 aa, (Berndt et al., 2009; Kim and Hegde, 2002; Whitley et al., 1996a; Woolhead et al., 2004), welche lang genug ist, um eine effiziente Bindung von SRP und eine teilweise Insertion in den Translokationskanal zu ermöglichen (Whitley et al., 1996b). Zudem wurde eine identische Konstruktlänge des strukturierten und des unstrukturierten Peptids gewählt, um einen unterschiedlichen Einfluss der Länge auf die Zielsteuerung auszuschließen (Abb. 26 A). Die Ergebnisse des *in vitro Targeting*-Assays zeigten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zielsteuerung der RNCs der α -helikalen und der intrinsisch unstrukturierten Domäne an die ER-Membran (Abb. 26 B, C).

Zusammenfassend deuten diese *in vitro* Ergebnisse an, dass die Sekundärstruktur der Polypeptidkette die kotranslationale, SRP-abhängige Zielsteuerung an die ER-Membran nicht zu regulieren scheint.

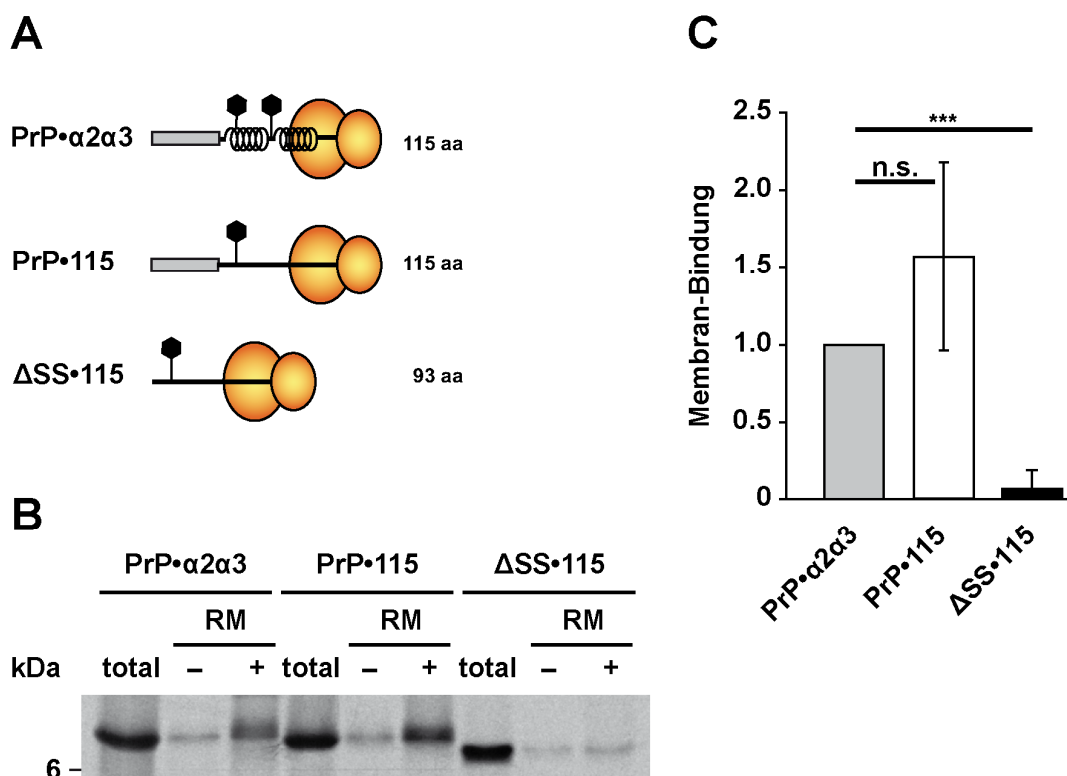


Abb. 26: Intrinsisch unstrukturierte naszierende Polypeptidketten werden *in vitro* kotranslational an die Membran zielgesteuert. (A) Schematische Darstellung der verwendeten *Stalling*-Konstrukte. α -Helices sind durch Spiralen, intrinsisch unstrukturierte Bereiche durch eine Linie gekennzeichnet. SS: ER-Signalsequenz; Ausgefülltes Sechseck: Glykosylierungsstelle (B) mRNA-Matrizen ohne Stop-Kodon wurden *in vitro* in Retikulozytenlysat supplementiert mit L-[35 S]Methionin in An (+)- oder Abwesenheit (-) von mikrosomalen Membranen (RM) translatiert.

Membran-gebundene naszierende Polypeptidketten wurden für drei Minuten bei 50.000 g durch ein Sukrose-Kissen pelletiert. Parallel wurden Polysomen von Translations-Ansätzen ohne Mikrosomen für 30 min bei 50.000 g sedimentiert (total). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. **(C)** Die Membran-Bindung wurde durch Analyse des Verhältnisses der Menge der mikrosomal-gebundenen Fraktion (+ RM, weiße Sternchen) zur Menge der zugehörigen Gesamt-Protein-Fraktion (total, weiße Punkte) unter Berücksichtigung der unspezifischen Pelletierung (- RM) bestimmt. Die Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Der Membran-gebundene Anteil der Δ hor-Mutante wurde dabei als 1 definiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentischer t-Test): *** $p < 0,0005$; n.s.: nicht signifikant.

2.5 ER-Signalsequenzen nicht-translozierter Proteine können eine mitochondriale Zielsteuerung vermitteln

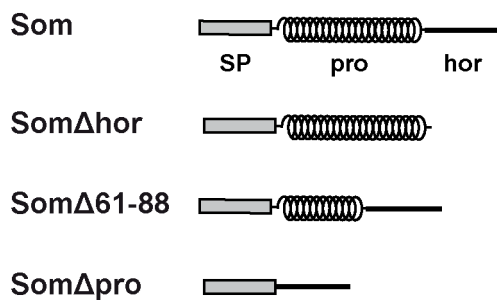
In Abschnitt 2.4.4 konnte gezeigt werden, dass intrinsisch unstrukturierte, sekretorische Proteine zumindest *in vitro* kotranslational an die ER-Membran zielgesteuert werden können. Es wurde jedoch auch dargelegt, dass diese Proteine nicht effizient ins ER transloziert werden. Es ist beschrieben dass nicht- oder retrotranslozierte, sekretorische und Membranproteine am Sec61-Translokon erkannt und anschließend im Cytosol proteasomal abgebaut werden können (Hessa et al., 2011; Kang et al., 2006; Oyadomari et al., 2006; Wang et al., 2011). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Studie für die hier analysierte, nicht-translozierte Mutante Som Δ pro sowie für einige andere nicht-translozierte Mutanten ein sekundärer Zielsteuerungs-Mechanismus beobachtet werden (Pfeiffer et al., 2013).

2.5.1 Die Deletion der Prodomäne von Somatostatin führt zu einer mitochondrialen Lokalisation

Die Lokalisation aller analysierten Konstrukte wurde durch Immunfluoreszenz-Analyse näher untersucht. Alle Konstrukte, welche erfolgreich sekretiert wurden, wiesen dabei eine Golgi-Lokalisierung auf. Für die nicht-translozierte Proteinfraction der TRH Δ pro-Mutante konnte bereits eine cytosolische Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 20). Im Folgenden sollte die Frage nach der Lokalisierung der nicht-translozierten Som Δ pro-Mutante geklärt werden.

Die Immunfluoreszenz-Analyse der Som-Konstrukte wiesen das WT-Som und die Som Δ hor-Mutante eine Kolokalisation mit dem Golgi-Marker Giantin auf (Abb. 27 B). Überraschenderweise zeigte die Färbung von Som Δ pro eine fadenförmige Struktur. Mit Hilfe einer Ko-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker RED CMXRos konnte eine mitochondriale Lokalisation von Som Δ pro festgestellt werden (Abb. 27 B, rechts). Es wurde hier außerdem eine Som-Mutante analysiert, welche eine um 27aa verkürzte Prodomäne besitzt (Som Δ 61-88), um zu untersuchen, ob die Länge der α -helikalen Domäne für die Lokalisation ausschlaggebend ist. Diese Mutante wies ebenso wie WT-Som eine prominente Golgi-Färbung auf. Dies deutet daraufhin, dass bereits eine 36aa lange α -helikale Domäne ausreicht, um eine ER-Translokation zu vermitteln.

A



B

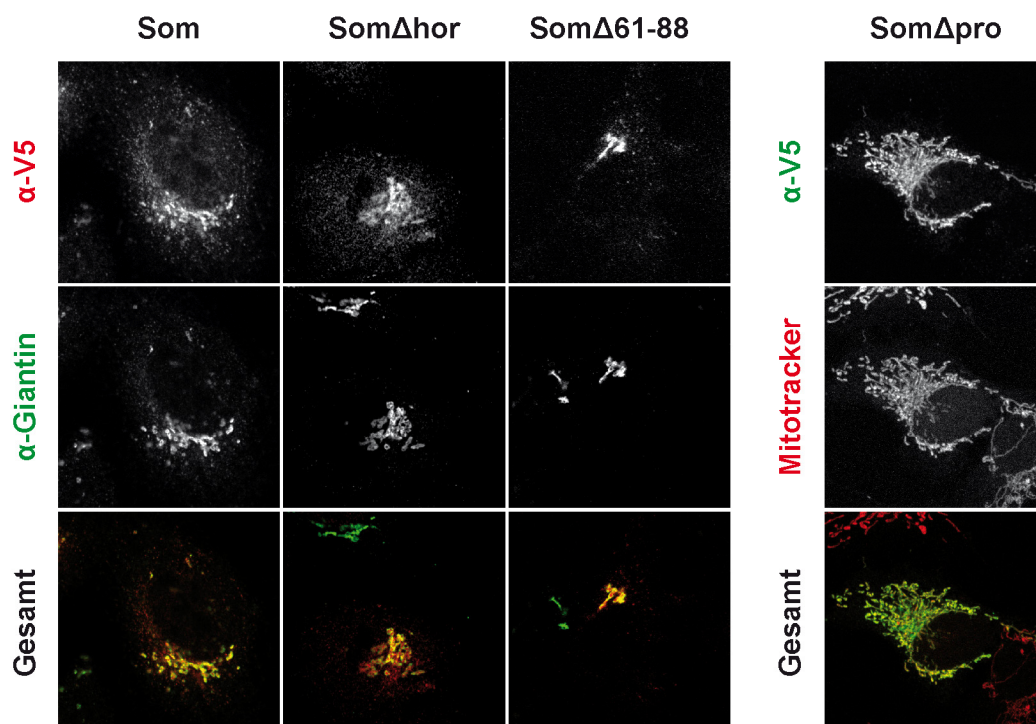


Abb. 27: Die nicht-translozierte Mutante Som Δ pro wird zu den Mitochondrien weitergeleitet. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. (B) Mit dem jeweiligen Konstrukt transient-transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Eine Kolokalisation mit Mitochondrien wurde durch deren Färbung mit dem Farbstoff MitoTracker Red CMXRos nachgewiesen. Der Nachweis einer Kolokalisation mit dem Golgi-Kompartiment erfolgte durch Detektion des endogenen Golgi-Proteins Giantin. Die Konstrukte wurden entweder mit einem polyklonalen (rot) oder einem monoklonalen (grün) α -V5-Antikörper detektiert.

2.5.2 Mitochondriale Zielsteuerung als Folge eines gescheiterten ER-Imports

Es konnte gezeigt werden, dass neben der hier analysierten Som Δ pro-Mutante auch andere -hauptsächlich intrinsisch unstrukturierte- Modellproteine mit der ER-Signalsequenz (ER-SS) des PrP-ähnlichen Shadoo-Proteins (Sho) und des ER-SS des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) zum Mitochondrium zielgesteuert werden können (Pfeiffer et al., 2013). Aufgrund der hier bestehenden Hypothese, dass diese Proteine in einem ersten Schritt zum ER und erst nach einer gescheiterten Translokation zum Mitochondrium weitergeleitet werden, sollte untersucht werden, ob es möglich ist auch die teilweise strukturierten, normalerweise effizient ins ER-importierten Wildtyp-Proteine unter Bedingungen einer defizienten ER-Importmaschinerie zum Mitochondrium fehlzuleiten.

Um dies *in vivo* zu testen, wurde in der Zelle durch eine gezielte Herunterregulierung (*Knockdown*) der α -Untereinheit des Translokationskanals Sec61 durch Einsatz einer spezifischen siRNA eine Situation eines nicht-effizienten ER-Imports simuliert. Unter diesen Bedingungen wurde untersucht, ob das Wildtyp-Somatostatin (Som) zu den Mitochondrien geleitet werden kann. Hierfür wurden HeLa-Zellen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit der Anti-Sec61 α 1 siRNA transfiziert und 2,5 Tage nach Ausplattieren der Zellen mit dem Som-Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden 4 Tage nach dem Beginn des *Knockdowns* durch indirekte Immunfluoreszenz-Analyse analysiert (Pfeiffer et al., 2013). Um toxische Effekte der siRNA-Behandlung auszuschließen, wurde eine randomisierte siRNA-Sequenz als Kontrolle eingesetzt.

Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigte, dass Som unter Bedingungen einer defekten Importmaschinerie eine Kolokalisation mit dem mitochondrialen Marker-Protein der äußeren Mitochondrien-Membran Tom20 aufwies (Abb. 28 A, links). Unter Behandlung mit unspezifischer siRNA konnte dabei keine Kolokalisation mit dem mitochondrialen

Marker, sondern eine reguläre Golgi-Lokalisation von WT-Som festgestellt werden (Abb. 28 A, rechts).

Für die Wildtyp-Proteine Sho und APP konnte ebenfalls unter *Sec61α1-Knockdown*-Bedingungen eine mitochondriale Lokalisation beobachtet werden. Das als Kontrolle verwendete Prion-Protein (PrP) wies unter Bedingungen eines gehemmten ER-Imports keine mitochondriale Lokalisation auf (Pfeiffer et al., 2013).

Eine Immunfluoreszenz-Analyse der SS-defizienten Mutante von Som zeigte eine cytosolische und keine mitochondriale Lokalisation (Abb. 28 B). Dies deutet daraufhin, dass eine cytosolische Lokalisierung der murenen Somatostatin-Domäne alleine nicht ausreicht, um eine mitochondriale Zielsteuerung zu vermitteln.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die ER-SS von Som, Sho und APP primär eine ER-Zielsteuerung vermitteln. Schlägt die ER-Translokation aufgrund einer defekten ER-Importmaschinerie oder von Sekundärstruktur-Einflüssen der murenen Domäne des Proteins jedoch fehl, wird die murene Domäne sekundär zum Mitochondrium weitergeleitet. Die Ergebnisse zeigen, dass die ER-SS dabei essentiell für die Weiterleitung des Proteins zu den Mitochondrien ist.

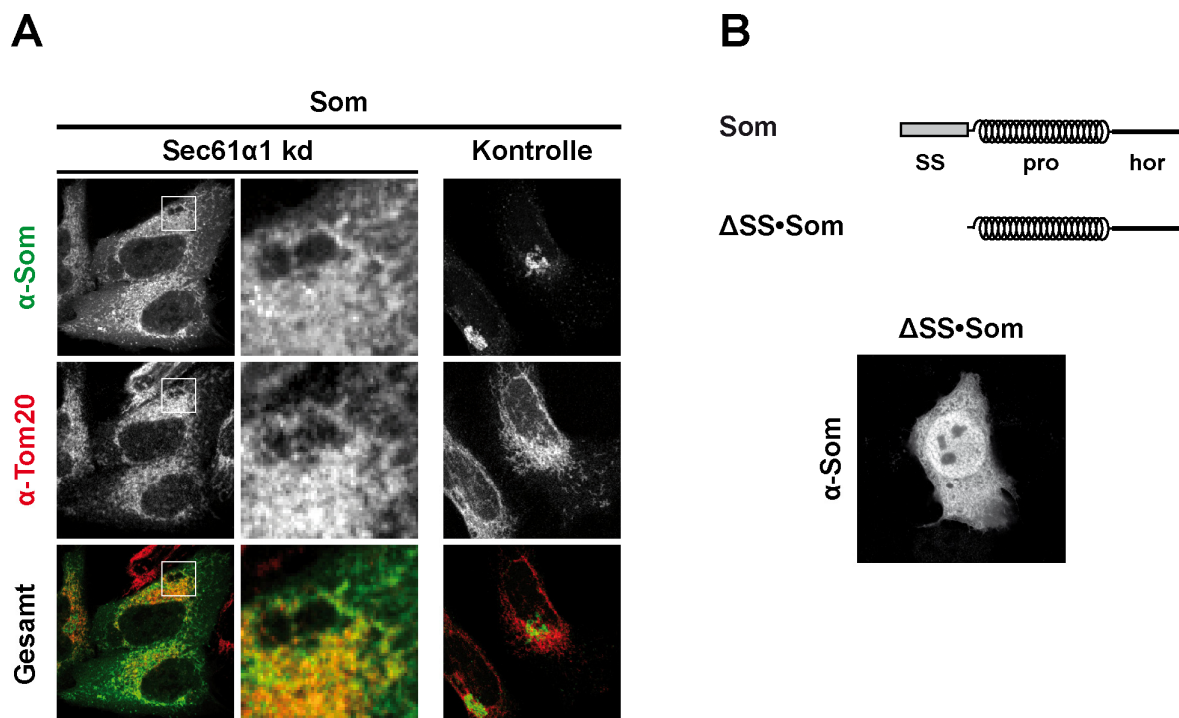


Abb. 28: Die Reduktion des ER-Imports durch einen *Sec61α1*-Knockdown führt zu einer mitochondrialen Lokalisation von Som. (A) HeLa Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit anti-*Sec61α1*-siRNA oder Kontroll-siRNA (Kontrolle) transfiziert. 60 Stunden nach

Ausplattieren der Zellen erfolgte die Transfektion mit dem Som-WT-Konstrukt. Die Analyse der permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde 96 Stunden nach Beginn des *Knockdowns* durchgeführt. Der Nachweis der Kollokalisierung mit Mitochondrien erfolgte durch Detektion des mitochondrialen Marker-Proteins der äußeren Membran Tom20. **(B)** Die SS-defiziente Mutante von Som wird nicht ans Mitochondrium zielgesteuert, sondern ist im Cytosol lokalisiert. Transient-transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. **(A,B)** Die Som-Konstrukte wurden mit Hilfe des monoklonalen α -V5-Antikörpers detektiert.

2.5.3 Suche nach einem Motif in ER-Signalsequenzen mitochondrial-lokalisierter Mutanten

Die Beobachtung, dass einige der intrinsisch unstrukturierten Mutanten, welche eine ER-Signalsequenz (ER-SS) besitzen, zum Mitochondrium fehlgeleitet werden, führte zu der Frage nach einem spezifischen Sequenzmotif bzw. einer kryptischen mitochondrialen Signalsequenz in diesen Mutanten. Im Folgenden wurden die ER-SS dieser und einer assoziierten Studie (Pfeiffer et al., 2013), die zum Mitochondrium steuern, aufgegriffen und eine bioinformatische Analyse der physiko-chemischen Eigenschaften der Signalsequenzen (SS) durchgeführt, um ein eventuelles Motif für die mitochondriale Zielsteuerung zu erkennen.

Die Proteine wurden mit dem Programm TargetP auf eine mitochondriale Präsequenz (MTS) untersucht. Das Programm ordnete allen Proteinen eine eindeutige ER-SS, jedoch keine MTS zu (siehe Abb. 29 und (Pfeiffer et al., 2013)). In allen Analysen wurde die Signalsequenz von PrP als Positivkontrolle für eine ER-Signalsequenz (ER-SS) und die Signalsequenz von UCR als Positivkontrolle für eine mitochondriale Präsequenz (MTS) gewählt.

In silico Analyse			Experimentelle Analyse		
Protein	ER-SS	MTS	Protein	ER	Mito
PrP	0.943	0.021	PrP	+	-
Sho	0.971	0.045	Sho	+	+
Som	0.827	0.139	Som	+	+
APP	0.937	0.035	APP	+	+
UCR	0.022	0.944	UCR	-	+

Abb. 29: In silico Vorhersage der zelluläre Lokalisation der angegebenen WT-Proteine mit TargetP. Links: Die *in silico*- Analyse beschreibt die Signalsequenzen von Sho, Som und APP eindeutig als ER-Signalsequenzen (ER-SS). ER-SS: Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit einer ER-Signalsequenz; MTS: Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit einer mitochondrialen Präsequenz. Rechts: Experimentelle Analysen zeigen, dass die ER-SS von Sho, Som und APP eine mitochondriale Lokalisation vermitteln können (Pfeiffer et al., 2013). ER: ER- Lokalisation, Mito: mitochondriale Lokalisation.

Um ein mögliches sequenz-spezifisches Motif in den ER-SS von Sho, Som und APP ausfindig zu machen, welches ebenfalls in der UCR-MTS, aber nicht in der PrP-ER-SS vorkommt, wurden die unterschiedlichen SS mit dem Programm Clustal-X verglichen (Abb. 30).

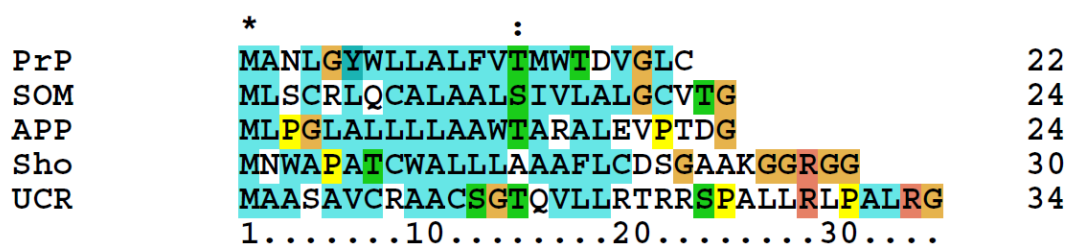


Abb. 30: Sequenz-Alignment der untersuchten ER-Signalsequenzen von Som, APP und Sho unter Verwendung von Clustal-X. Als Kontroll-ER-SS wurde die SS von PrP, als Kontroll-MTS wurde die mitochondriale Präsequenz von UCR (Ubiquinon-Cytochrom c-Reduktase) verwendet.

Das Sequenz-Alignment zeigt eine Häufung von hydrophoben Resten (wie L, V, I, M, F, W, A und C) in den analysierten SS, was typisch für ER-SS ist, welche einen kotranslationalen ER-Transport vermitteln. Bei der UCR-MTS befinden sich am Ende zusätzlich basische Reste, welche nicht in PrP, Som und APP vorhanden sind bzw. nur einmal in Sho. Da die Signalsequenzen unterschiedlich lang sind, wurden in dem verwendeten Programm in einem neuen Versuch mehrere ‚Lücken‘ (*gaps*) zugelassen, sowie vorerst nur die drei zu analysierenden SP aufgeführt (Abb. 31).

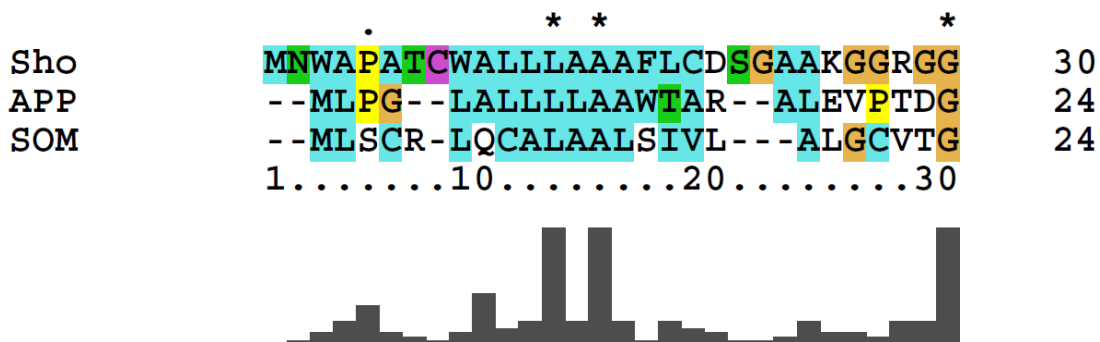
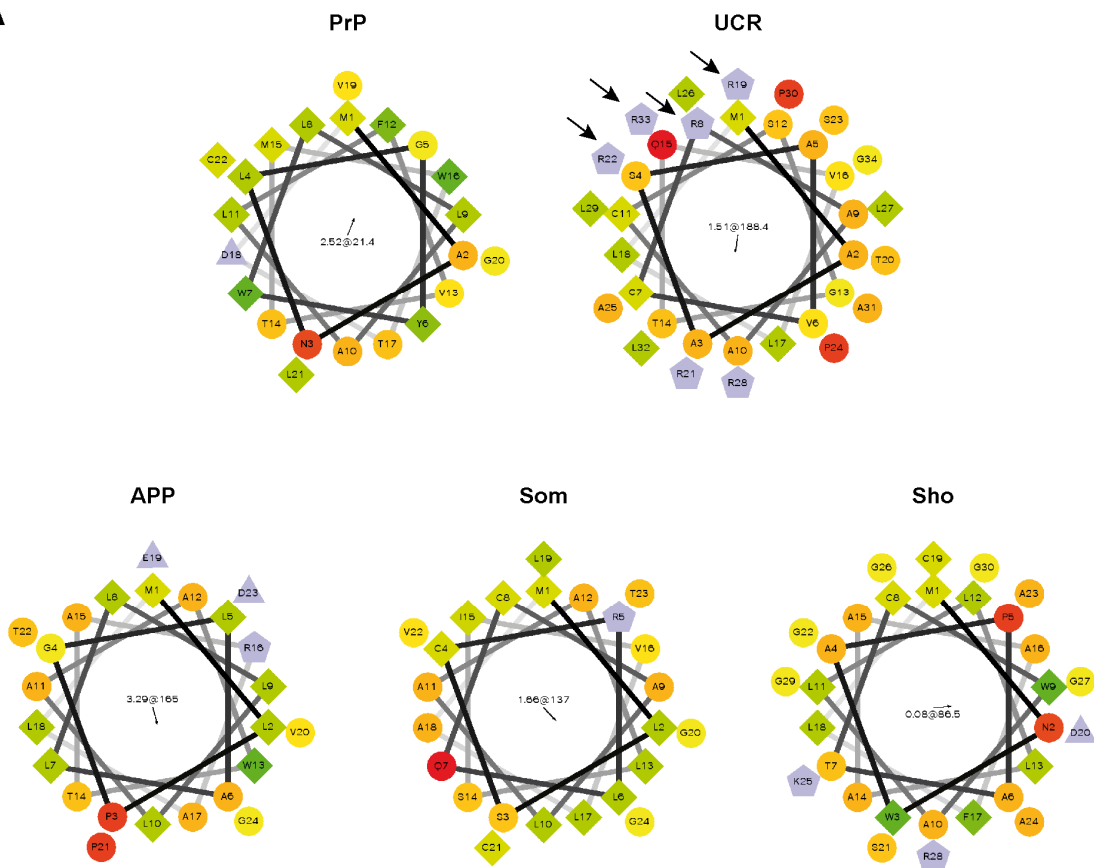


Abb. 31: Wiederholung des Sequenz-Alignment der untersuchten ER-Signalsequenzen von Sho, APP und Som mit Clustal-X unter Berücksichtigung der SP-Länge. Hier wurde der Parameter *Gap Opening Penalty* von 10 auf 2 herabgesetzt.

Aus dem Alignment lässt sich ein potentielles Motif erkennen: L-X(0,1)-A-A. Dieses Motif ist weder in der typischen ER-SS von PrP, noch in der kanonischen MTS von UCR zu erkennen. Eine Suche nach diesem Motif in der MeMotif Datenbank ergab ein bekanntes Motif in welchem das hier gefundene enthalten ist: A-X(0,2)-L-X(0,1)-A-A. Die Proteinfamilie, bei der dieses Motif am häufigsten auftritt, ist die der ABC-Transporter. Diese Proteinfamilie besteht aus mehrfach die Membran-durchspannenden Membranproteinen, welche im Transmembran-Transport von verschiedenen Substanzen eine zentrale Rolle spielen (Schmitt and Tampe, 2002).

Zusätzlich wurde eine *Helical Wheel*- Analyse durchgeführt, um die räumliche Verteilung der Aminosäurereste in der α -helix, wie sie die meisten der N-terminalen, mitochondrialen Präsequenzen annehmen (Ni et al., 1999; Roise et al., 1986), zu analysieren und eventuelle Unterschiede sichtbar zu machen (Abb. 32).

A



B

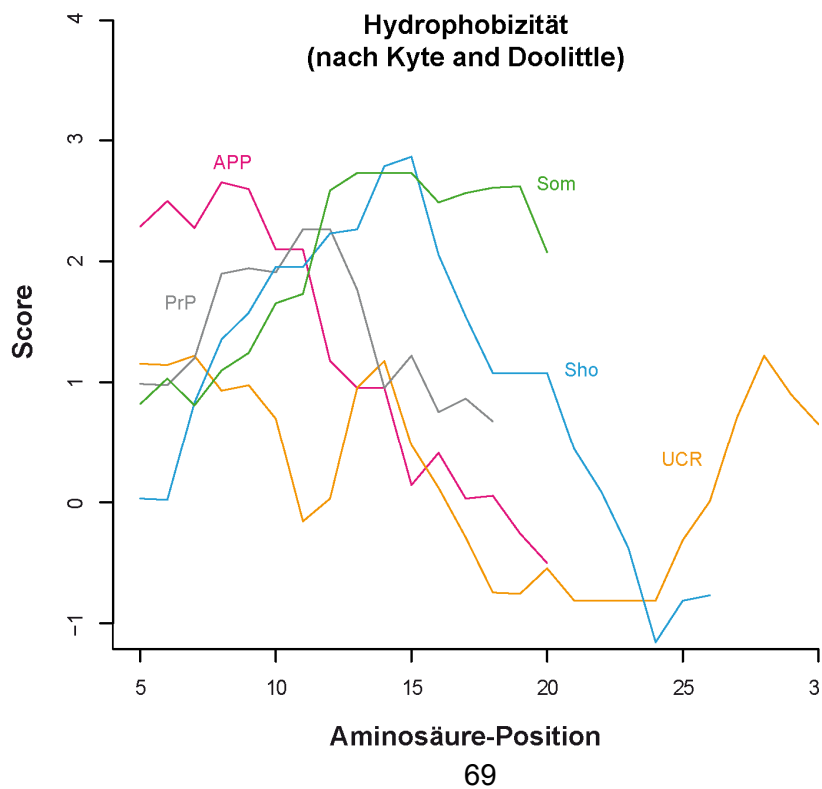


Abb. 32: Bioinformatische Analyse der ER-Signalsequenzen von APP, Som und Sho. (A, B) Als Kontroll-ER-SS wurde die SS von PrP, als Kontroll-MTS wurde die mitochondriale Präsequenz von UCR verwendet. **(A)** *Helical Wheel*- Analyse der Signalsequenzen (nach Don Armstrong und Raphael Zidovetzki; Version: Id: wheel.pl, v 1.4 2009-10-20 21:23:36 don Exp). Die Pfeile in dem Diagramm der UCR-MTS kennzeichnen eine charakteristische Häufung positiv-geladener Aminosäurereste in mitochondrialen Präsequenzen. **(B)** Analyse der Hydrophobizität der Aminosäuresequenzen der angegebenen Signalsequenzen (nach Kyte und Doolittle).

Die *Helical wheel*- Analyse zeigte für die UCR-MTS eine deutliche Häufung positiv-geladener Arginin-Reste (Abb. 32 A, Pfeile). Für die SS von PrP, Som, APP und Sho konnte dies nicht beobachtet werden. Die Signalsequenzen wurden außerdem auf physiko-chemische Eigenschaften, u.a. ihre Hydrophobizität untersucht. Dabei erwiesen sich die zu analysierenden SS ähnlich hydrophob wie PrP und deutlich hydrophober als die UCR-MTS (Abb. 32, B). Interessanterweise war die Hydrophobizität auf die gesamte Sequenzlänge gesehen, gemessen an dem sogenannten GRAVY (*Grand average of hydropathicity index*) für die Sho- und UCR-Signalsequenz sehr gering, was darauf hindeutet, dass die Sho-SS ähnlich schwach hydrophob ist wie die mitochondriale MTS von UCR.

Weitere Analysen unter Verwendung des ExpASy Protein-Servers lieferten jedoch sonst keine auffälligen Unterschiede. Eine Polaritäts-Analyse (nach Grantham) zeigte eine hohe allgemeine Polarität der UCR-MTS, während die SS von Som, Sho und APP wie PrP generell eine niedrigere Polarität aufwiesen. Auch in einer *in silico* Sekundärstrukturanalyse mit Hilfe des JPred Programmes war der helikale Anteil der UCR-SS deutlich niedriger als der der PrP-, Som-, Sho- und APP-ER-SS, welche einen ähnlich hohen α -helikalen Anteil aufwiesen.

Zusammenfassend war es durch die Analyse der dargestellten physiko-chemischen Eigenschaften nicht möglich, die potenzielle mitochondriale Zielsteuerung der ER-SS von APP, Som und Sho zu erklären. Zudem konnte aufgrund der limitierten Anzahl der untersuchten Signalsequenzen kein eindeutiges, sequenzspezifisches Motif innerhalb der Signalsequenzen ermittelt werden, welches diese eventuell als bivalente Signalsequenzen ausweisen könnte.

2.6 Ineffiziente periplasmatische Lokalisation von intrinsisch unstrukturierten Domänen in Prokaryoten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die SRP-medierte Zielsteuerung von Proteinen sowie die kotranslationale Translokation und deren Komponenten von Bakterien zu Eukaryoten hochkonserviert (Luirink and Sinning, 2004). Die hier dargestellten und frühere Ergebnisse (Miesbauer et al., 2009) in Säugerzellen konnten bereits zeigen, dass Proteine ohne α -helikale Domänen schlechter bzw. gar nicht ins ER importiert werden. Da die hier dargelegten, vorangegangenen Experimente darauf hinwiesen, dass der Regulationsschritt an der ER-Membran bzw. am ER-Translokon selbst erfolgt und aufgrund der Kenntnis der Konservierung der Translokon-Komponenten, sollte im Folgenden die Sekretion bzw. periplasmatische Lokalisation von α -helikalen versus unstrukturierten Modellsubstraten in Bakterien untersucht werden.

Die periplasmatische Lokalisierung der Proteine in Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* entspricht eines Transports über die Cytoplasma-Membran ähnlich wie der Transport über die ER-Membran in Eukaryoten (Abb. 33 A). In *Pulse-Chase*-Analysen wurde die Expression und Sekretion entweder α -helikaler oder intrinsisch unstrukturierter Konstrukte des Prion-Proteins (PrP) untersucht (Abb. 33 B). Dabei wurde die PrP-SS durch die *Leader*-Sequenz der Pektat-Lyase B (*pelB*) ersetzt, welche das angehängte „Passagier“-Protein in den periplasmatischen Raum von *E. coli* transferiert. Es zeigte sich, dass auch in Bakterien vollständig unstrukturierte Proteine nicht in den periplasmatischen Raum sekretiert werden. Im Gegensatz dazu, wurde ein Konstrukt bestehend aus hauptsächlich α -helikaler Struktur bei ähnlicher Expression sehr effizient sekretiert (Abb. 33 B).

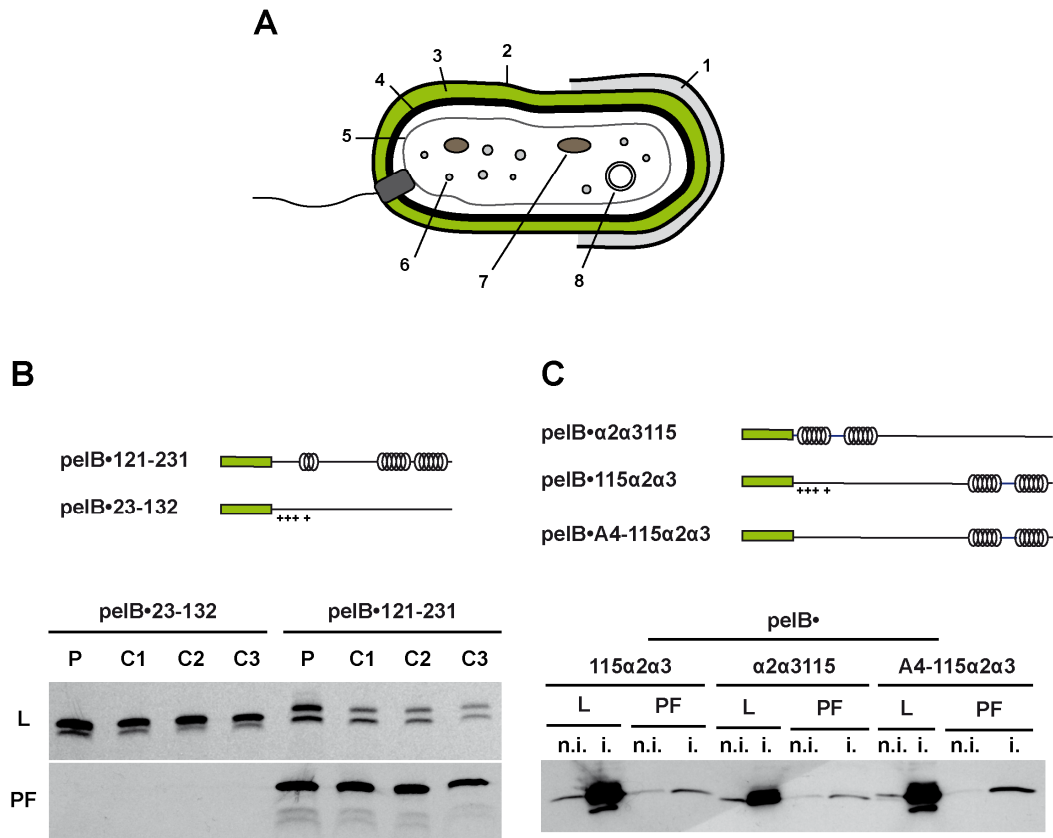


Abb. 33: Intrinsisch unstrukturierte Proteine werden nicht periplasmatisch lokalisiert. (A) Schematischer Aufbau eines Gram-negativen Bakteriums: 1: Exopolysaccharid-Kapsel, 2: Äußere Membran, 3: Periplasma, 4: Peptidoglykan-Schicht (Zellwand), 5: cytoplasmatische (innere) Membran, 6: Ribosom, 7: Speicher-Vesikel, 8: Chromosom. Modifiziert nach (<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1092137>). **(B, C)** Oben: Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte. pelB: periplasmatische Zielsteuerungssequenz der bakteriellen Pektat-Lyase B (grün); ++++: vier N-terminal, Signalsequenz-flankierende positiv-geladene Lysin-Reste. Spirale: α-helikale Struktur; Linie: intrinsisch unstrukturierte Domäne. **(B)** Unten: Pulse-Chase-Analyse der angegebenen Konstrukte. Die in *E.coli* transformierten Konstrukte wurden für 15 min radioaktiv markiert (P, Pulse) und für 5 (C1), 10 (C2) und 30 (C3) Minuten verfolgt (C, Chase); Gesamt-Zellysate (L) und periplasmatische Fraktionen (PF) wurden parallel mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. 121-231: α-helikaler C-Terminus des Prion-Proteins; 23-132: intrinsisch unstrukturierter N-Terminus des Prion-Proteins. **(C)** Unten: Sekretions-Analyse von teilweise unstrukturierten Mutanten des Prion-Proteins. Die Expression und periplasmatische Lokalisierung der in *E. coli* transformierten angegebenen Konstrukte wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Verfahren untersucht. i: induziert; n.i.: nicht induziert; L: Gesamt-Zellysate, PF: Periplasmatische Fraktion.

Da gezeigt werden konnte, dass in Säugerzellen ein Unterschied der ER-Import-Effizienz zweier teilweise unstrukturierter PrP-Konstrukte, PrP•115α2α3 und PrP•α2α3115, besteht (Miesbauer et al., 2009), sollte dies ebenfalls in Bakterien untersucht werden (Abb. 33 C). Dies wurde anhand einer Western-Blot-Analyse überprüft, da beide Konstrukte die 3F4-

Tag Sequenz enthielten (aa 109-112 des humanen PrP) und daher eine einfache Immun-Detektion ermöglichten. Beide Mutanten wiesen eine ähnliche Sekretion auf. Dies ist unterschiedlich zu Säugerzellen, in welchen das Konstrukt mit dem N-terminal lokalisierten α -helikalen Segment ($\alpha 2\alpha 3115$) effizienter ins ER importiert wurde als das Konstrukt mit der α -helikalen Domäne am C-terminalen Ende des Proteins ($115\alpha 2\alpha 3$), obwohl beide mit dem identischen N-terminalen ER-Signalsequenz von PrP ausgestattet waren (Miesbauer et al., 2009).

Da ein negativer Einfluss der positiven Ladungen nach der pelB-Leader-Sequenz auf die Translokation in Bakterien bei der pelB•23-132 und der $115\alpha 2\alpha 3$ -Mutante nicht auszuschließen war (Kaderbhai et al., 2010), wurde ebenfalls parallel eine Mutante ohne die positiven Ladungen des 115-Segmentes generiert, indem die 4 positiv-geladenen Lysine am N-Terminus nach der Signalsequenz durch ungeladene Alanine ausgetauscht wurden (pelB•A4- $115\alpha 2\alpha 3$). Dieses Konstrukt zeigte eine etwas bessere Sekretion als pelB• $115\alpha 2\alpha 3$, aber auch als pelB• $\alpha 2\alpha 3115$, welches ebenfalls keine positiven N-terminalen Ladungen besitzt (Abb. 33 C).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse an, dass in Bakterien ebenfalls eine Regulation der Sekretion von intrinsisch unstrukturierten Proteinen existiert.

3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Prodomänen von TRH, Somatostatin (Som) und GnRH in der Biogenese dieser intrinsisch unstrukturierten Neuropeptidhormone untersucht. Durch Deletions- sowie Domänen-Austausch-Analysen konnte eine essentielle Rolle der Prodomänen in der Förderung der ER-Translokation der Neuropeptide gezeigt werden. Es wurde dargelegt, dass diese Funktion auf einer α -helikalen Struktur der Prodomäne basiert.

Durch weitere Versuche wurde zudem ein neuartiger Zielsteuerungsmechanismus entdeckt, welcher die Zielsteuerung von sekretorischen Proteinen zum Mitochondrium durch ein- und dieselbe Signalsequenz vermitteln kann.

Im Folgenden wird daher generell eine Rolle von α -helikalen Domänen bei der ER-Translokation sowie Möglichkeiten der Regulation dualer Zielsteuerung diskutiert.

3.1 Unterrepräsentation von intrinsisch unstrukturierten Proteinen im ER – ein evolutionär konservierter Mechanismus?

Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen daraufhin, dass der ER-Import von intrinsisch unstrukturierten Proteinen generell ein ineffizienter Prozess ist, welcher jedoch durch α -helikale Domänen signifikant gefördert werden kann. Wie in der Einleitung erwähnt, sind intrinsisch unstrukturierte Proteine Teil von essentiellen und teilweise hochkomplexen, zellulären Prozessen und wie in unserer und anderen Studien gezeigt bilden sie ca. ein Drittel des menschlichen Proteoms (Dunker et al., 2000; Ward et al., 2004). Neben ihrer Rolle als Chaperone oder bei der Assemblierung von molekularen Maschinen im Cytosol, sind einige dieser Proteine auch im sekretorischen Signalweg vertreten. Offensichtlich hat die Evolution Wege gefunden, das Problem eines ineffizienten ER-Imports von unstrukturierten Proteinen zu umgehen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, können intrinsisch unstrukturierte Proteine als größere Vorgänger synthetisiert werden, welche strukturierte Domänen enthalten, die eine erfolgreiche Translokation ins ER gewährleisten. Diese strukturierten Domänen können, wie hier vorgestellt, α -helikale

Prodomänen sein. Wir konnten zudem zeigen, dass auch GPI-Ankersequenzen den ER-Import von IUPs fördern können (Pfeiffer et al., 2013). Gemeinsam ist diesen Domänen, dass sie im ER abgespalten werden und nicht Teil des muren Proteins sind.

Die bioinformatischen Analysen belegen eine Unterrepräsentation der intrinsisch unstrukturierten Proteine im sekretorischen Signalweg. Es wurden lediglich 10 % an sekretorischen, intrinsisch unstrukturierten Proteinen gefunden, wobei IUPs generell ca. 30 % des gesamten Proteoms repräsentieren. Aufgrund der komplexen und sehr sensitiven Faltung-Kontrollmechanismen im ER, wie ERAD und UPR, ist es vorstellbar, dass die Zelle den Anteil von hauptsächlich unstrukturierten Proteinen im ER zu limitieren versucht und sich deshalb sekretorische Proteine, welche bereits einen gewissen Anteil an Sekundärstrukturelementen enthalten, evolutionär durchgesetzt haben. Zudem ist denkbar, dass Proteine, welche wie IUPs keine grundsätzliche Faltungstendenz besitzen, durch ihre exponierten Bereiche von Chaperonen der Faltungsmaschinerie im ER spezifisch erkannt, am weiteren Transport gehindert und zurück ins Cytoplasma transportiert werden. Durch diesen Mechanismus würden IUPs im ER fälschlicherweise als fehlgefaltet erkannt und dem ER-assoziierten Degradierungsweg (ERAD) zugeführt werden. In der Tat, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die nicht-sekretierte Fraktion der analysierten IUPs im Cytosol lokalisiert ist. Jedoch enthielt diese cytosolische Fraktion eine ungeschnittene Signalsequenz. Dies widerspricht einer Retrotranslokation dieser Substrate im Sinne des ERAD-Signalweges. Eine ungeschnittene Signalsequenz weist vielmehr auf eine gestörten ER-Import und damit auf eine kotranslationale Qualitätskontrolle hin, welche bereits die ER-Translokation dieser Proteine verhindert (Kang et al., 2006; Oyadomari et al., 2006; Rutkowski et al., 2007).

Interessanterweise konnte ein ähnliches Phänomen in Bakterien beobachtet werden. In ersten Experimenten konnten wir zeigen, dass das unstrukturierte Protein pelB•23-132, im Gegensatz zu dem Protein pelB•121-231 bestehend aus α -helikalen Domänen, nicht in den periplasmatischen Raum der Bakterien sekretiert wird (siehe Punkt 2.6).

Die Translokationsmaschinerie, welche sekretorische Proteine über bzw. in die ER-Membran von Eukaryoten oder die Cytoplasmembran von Prokaryoten transportiert,

ist hochkonserviert (Luirink and Sinning, 2004) (siehe Punkt 1.1.3). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde vorgestellt, dass das Motif im Translokationskanal, welches für die Öffnung des Kanals -vermittelt durch die Signalsequenz des zu translozierenden Proteins- verantwortlich ist, zwischen Pro- und Eukaryoten ebenfalls konserviert ist (Trueman et al., 2012). Es kann deshalb spekuliert werden, dass die Regulation der Translokation durch α -helikale Domänen ebenfalls einem konservierten, Translokationskanal-spezifischen Mechanismus unterliegt.

Es gibt zahlreiche Studien, welche eine Korrelation zwischen der Komplexität eines Organismus und dem Gesamtanteil an intrinsisch unstrukturierten Proteinen in dessen Proteom zeigen konnten. Je komplexer der Organismus, desto größer war der Anteil an intrinsisch unstrukturierten Proteinen (Dunker et al., 2000)(Dunker et al., 2002; Ward et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass komplexere Organismen möglicherweise zusätzliche Mechanismen entwickeln mussten, um mit der Zunahme des Anteils an intrinsisch unstrukturierten Proteinen umzugehen. Mögliche involvierte Faktoren werden in Punkt 3.4 diskutiert.

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass positive Ladungen nach einer Signalsequenz die Translokation von Proteinen über die Cytoplasmembran inhibieren können (Kaderbhai et al., 2010; Li et al., 1988; Struyve et al., 1993). Die in Bakterien gewonnenen Daten der hier vorliegenden Arbeit veranschaulichen, dass die eingeschränkte Translokation des unstrukturierten Modellproteins nicht auf die Präsenz solcher positiv-geladenen Aminosäuren zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass ein Modellprotein mit auf die SS folgenden positiven Ladungen, aber mit einer C-terminalen α -helikalen Domäne, ähnlich stark sekretiert wird, wie zwei Modellproteine ohne N-terminale positive Ladungen. Dies verstärkt die Annahme, dass die Translokationseffizienz in Bakterien – wie auch in Eukaryoten- durch die Sekundärstruktur des „Passagier“-Proteins reguliert werden kann. Die verwendete Signalsequenz der Pektat-Lyase (peIB) vermittelt einen posttranslationalen Transport ihrer „Passagier“-Proteine (Thie et al., 2008). Daher kann auf Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass der beschriebene Regulationsmechanismus nur für Substrate des posttranslationalen Transportweges in Bakterien gilt. In weiterführenden Experimenten ist deshalb zu prüfen, ob die Verwendung einer

kotranslational-vermittelnden Signalsequenz, wie z.B. der DsbA-Signalsequenz, zu ähnlichen Ergebnissen führt (Schierle et al., 2003).

3.2 Alpha-helikale Prodomänen fördern die ER-Translokation von intrinsisch unstrukturierten Neuropeptidhormonen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten aus mehreren Gründen auf eine Störung der ER-Translokation der hier analysierten intrinsisch unstrukturierten Peptidhormone und einer Wiederherstellung der Translokation durch ihre α -helikal vorhergesagten Prodomänen hin: Es wurde eine eingeschränkte Sekretion der Hormone nach Deletion der Prodomäne beobachtet, welche durch die Fusion von heterologen α -helikalen Domänen wiederhergestellt werden konnte. Heterologe intrinsisch unstrukturierte Domänen waren hierbei nicht in der Lage eine Sekretion der Hormone zu vermitteln. Hierbei konnte eine α -helikale Konformation der Prodomäne von Somatostatin durch eine CD-Analyse experimentell bestätigt werden. In einer anderen Studie konnte durch CD-Analysen gezeigt werden, dass die Prodomäne von GnRH ebenfalls zur Ausbildung einer α -helikalen Konformation neigt (Chavali et al., 1997). Weiterhin gibt es mehrere Hinweise darauf, dass eine fehlende Prodomäne eine ineffiziente ER-Translokation der Peptidhormone zur Folge hat. Die TRH- sowie die Som- Mutante ohne Prodomäne (TRH Δ pro bzw. Som Δ pro) wies eine unprozessierte ER-Signalsequenz (SS) auf. Dies spricht gegen eine konventionelle Retrotranslokation der Konstrukte aus dem ER, vermittelt durch den klassischen ERAD-Signalweg, da das Schneiden des ER-Signalsequenz (ER-SS) durch die Signalpeptidase normalerweise während der kotranslationalen ER-Translokation und vor der vollständigen Translokation des Proteins in das ER-Lumen stattfindet (Evans et al., 1986; Rutkowski et al., 2003). Im ERAD-Weg werden Proteine bekanntermaßen vollständig in das ER-Lumen transloziert, bevor sie durch Qualitäts-Kontroll-Mechanismen im ER erkannt, retrograd ins Cytosol geleitet und dort proteasomal abgebaut werden (Meusser et al., 2005). Außerdem wurde Som Δ pro in einem *in vitro* Assay nicht in mikrosomale Membranen transportiert. Dies deutet daraufhin, dass die beobachtete

unprozessierte SS nicht auf eine ineffiziente Prozessierung während der Translokation, sondern auf eine ineffiziente Translokation ins ER zurückzuführen ist.

Zusammenfassend sprechen die hier vorgelegten Daten dafür, dass Prodomänen bereits den ER-Import der Proteine beeinflussen können und nicht erst –wie vielfach beschrieben- im ER bei der Faltung und Prozessierung der Neuropeptidhormone ihre Funktion erfüllen (Chen et al., 1995; Romero et al., 2008; Sevarino et al., 1989; Suter et al., 1991). Im Falle von GnRH konnte jedoch auch ein generell stabilisierender Effekt der Prodomäne auf die Expression des Vorläufer-Proteins nachgewiesen werden (siehe Punkt 2.4.1). Es ist möglich, dass die Mutante ohne Prodomäne (GnRH Δ pro) aufgrund ihrer Größe -sie ist lediglich 47 Aminosäuren lang- und der Unfähigkeit Struktur auszubilden, von cytosolischen Peptidasen relativ schnell abgebaut wird.

Es war denkbar, dass eine ineffiziente Translokation von intrinsisch unstrukturierten Proteinen auf einer ineffizienten kotranslationalen Zielsteuerung dieser Proteine beruht. Diese Möglichkeit wurde mit Hilfe eines *in vitro* Zielsteuerungs-Assays untersucht. Unter den getesteten *in vitro* Bedingungen konnte jedoch keine unterschiedliche kotranslationale Zielsteuerung der Δ hor- und der Δ pro-Mutanten festgestellt werden. Auch die Analyse eines intrinsisch unstrukturierten und eines α -helikalen Modellsubstrates zeigte keine signifikanten Unterschiede (siehe Punkt 2.4.4). Dies spricht dafür, dass die nicht-translozierten, intrinsisch unstrukturierten Konstrukte ebenfalls wie die translozierten, α -helikalen Proteine in einem ersten Schritt an die ER-Membran zielgesteuert werden und somit kann von einer Regulation der Translokation erst nach der Zielsteuerung am Translokationskanal ausgegangen werden.

Zukünftig wäre es interessant zu erforschen, ob und in welcher Form die hier dargestellte Regulation der Translokation durch Sekundärstrukturelemente in der Zelle verwendet wird. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass die Prodomäne von einigen Proteinen unter bestimmten Bedingungen -wie z.B. ER-Stress- durch alternative *Splicing*-Mechanismen deletiert wird, um deren Translokation ins ER zu regulieren. In diesem Zusammenhang könnte die Sekundärstruktur unterschiedlicher *Splicing*-Varianten eines Proteins analysiert werden. Es wäre zudem hochinteressant zu untersuchen, ob die durch den hier beschriebenen

Mechanismus fehllokalisierten Proteine zur Pathogenese von Krankheiten beitragen, welche nachweislich auf einer Fehllokalisation und möglicherweise einer cytosolischen Aggregation von Proteinen beruhen.

3.3 Möglicher Einfluss von *cis*- Faktoren der Polypeptidkette auf den Translokationsprozess

Neben der beschriebenen Regulation der ER-Zielsteuerung und der Translokation durch die ER-Signalsequenz (SS) (Hegde and Bernstein, 2006), konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass einige konventionelle topologische Sequenzen, wie z.B. Stop-Transfer-Sequenzen in integralen Membranproteinen, die zeitliche Abfolge während der kotranslationalen ER-Translokation an der Membran regulieren können (Blobel, 1980). Es konnten auch unkonventionelle topologische Sequenzen gefunden werden, welche z.B. unterschiedliche Membran-Topologien des Prion-Proteins (PrP) oder die unvollständige Translokation des Apolipoproteins B (ApoB) vermitteln (Chuck and Lingappa, 1993; Hegde and Lingappa, 1996; Hegde et al., 1998a; Lopez et al., 1990; Nakahara et al., 1994).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass -neben den bereits bekannten Regulatoren- eine α -helikale Konformation der Prodomänen die ER-Translokation der intrinsisch unstrukturierten Neuropeptidhormone TRH, Som und GnRH beeinflussen kann. Dies ist im Einklang mit einigen bereits veröffentlichten Studien: Für ApoB wurde zum Beispiel beschrieben, dass β -sheet-reiche Domänen eine weitere Translokation des Proteins behindern und einen proteasomalen Abbau des Proteins im Cytosol fördern (Yamaguchi et al., 2006). Zudem konnte anhand von PrP-Mutanten und PrP-Modellsubstraten gezeigt werden, dass α -helikale Domänen den ER-Import von intrinsisch unstrukturierten Domänen fördern können (Heske et al., 2004; Miesbauer et al., 2009).

Somit ist denkbar, dass die Sekundärstruktur der Polypeptidkette ein direktes bzw. indirektes Signal für den Translokationskanal Sec61 darstellt, wobei möglicherweise α -helikale Domänen -ähnlich wie die SS (Kim et al., 2002)- eine Öffnung des Translokationskanals bewirken. Dies könnte durch die Formation einer α -Helix bereits im ribosomalen Tunnel geschehen. Es konnte gezeigt werden, dass der

ribosomale Tunnel eine α -helikale Konformation der Polypeptidkette beherbergen kann (Bhushan et al., 2010; Netzer and Hartl, 1997; Woolhead et al., 2004). Dabei kann die Sekundärstrukturausbildung im ribosomalen Tunnel im Falle der Signalsequenz zu einer frühzeitigen Rekrutierung cytosolischer Faktoren führen (Berndt et al., 2009; Mariappan et al., 2010). Die Ausbildung von Transmembran-Helices im ribosomalen Tunnel kann im Falle der Translokation von Membranproteinen eine frühzeitige Öffnung oder Schließung des Translokationskanals koordinieren (Daniel et al., 2008; Lin et al., 2011a; Lin et al., 2011b). Generell wird vermutet, dass α -helikale Strukturen im ribosomalen Tunnel eine Konformationsänderung von ribosomalen Proteinen des Tunnelausgangs hervorrufen können, welche ihrerseits konformationelle Änderungen am Translokationskanal bewirken. Zudem wurde durch zahlreiche Studien auf diesem Gebiet klar, dass der Translokationskanal Sec61 keinesfalls ein starres, sondern ein dynamisches und reguliertes "Eintrittstor" für Proteine darstellt, wobei Protein-Translokation und -Faltung teilweise simultane und koordinierte Prozesse darstellen (Johnson and van Waes, 1999; Wickner and Schekman, 2005).

Neben einer indirekten Weiterleitung des "Struktursignals" ist es ebenfalls denkbar, dass α -helikale Domänen einen direkten Einfluss auf den Translokationskanal ausüben. So könnten α -helikale Domänen generell durch ihre kompakte Struktur einen besseren Angriffspunkt für die lineare Kraftweiterleitung des translatierenden Ribosoms darstellen. Zudem wäre es denkbar, dass eine auf die Signalsequenz folgende α -helikale Domäne die *Gating*-Effizienz der ebenfalls α -helikalen Signalsequenz unterstützt. In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass α -helikale Domänen eine erfolgreiche „Loop“-Insertion einer „schwachen“ SS fördern, was möglicherweise im Kontext von unstrukturierten Domänen nicht erreicht werden kann (Beckmann et al., 2001; Hegde and Kang, 2008; Kim et al., 2002) (Abb. 34).

Obwohl die Daten für einen Einfluss der Struktur der Polypeptidkette auf die ER-Translokation sprechen, kann jedoch letztlich ein Einfluss von spezifischen Ladungsverhältnissen in der Primärsequenz auf die Translokation letztendlich nicht ausgeschlossen werden. Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass positiv-geladene, dem ER-Signalsequenz folgende Aminosäuren sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten einen negativen Einfluss auf die Translokation ausüben. Dies kann einerseits die Orientierung der Signalsequenz im Translokationskanal Sec61

beeinflussen (Fujita et al., 2010; von Heijne and Gavel, 1988) oder in Bakterien die SecA-abhängige Translokation inhibieren (Li et al., 1988; Nouwen et al., 2009).

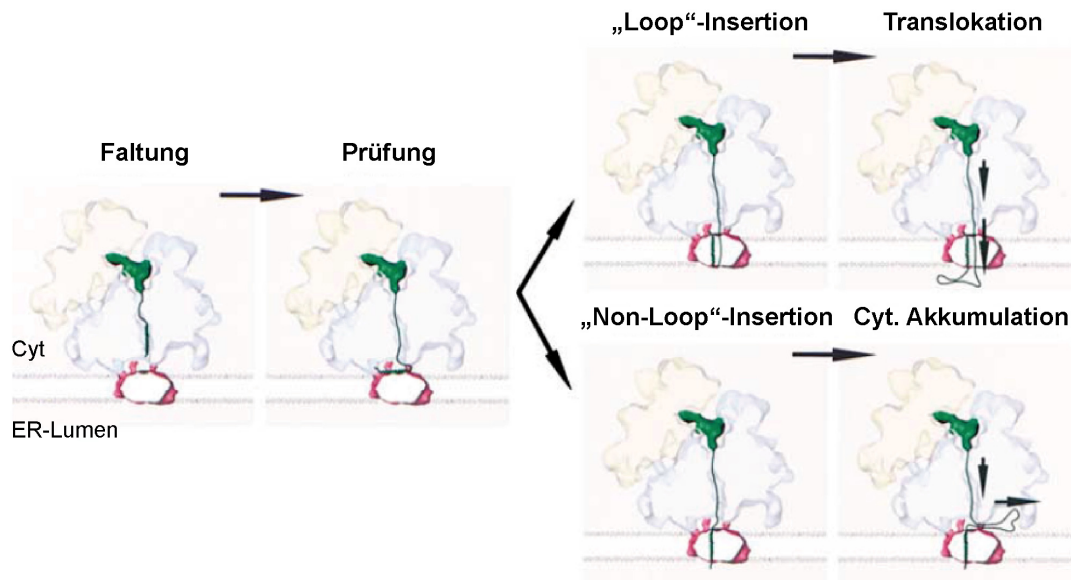


Abb. 34: Binäres Model der kotranslationalen Translokation. Nach einer möglichen Ausbildung von α -helikalen Segmenten im ribosomalen Tunnel (1), wird das austretende Segment durch den Translokationskanal auf Hydrophobizität, Helizität und Ladungsverteilungen geprüft (2). Diese Eigenschaften legen eine mögliche Membran-Insertion bzw. deren Topologie fest. (3) Eine sogenannte „Loop“-Insertion der Polypeptidkette ermöglicht eine vollständige Translokation der Polypeptidkette. Sekretorische Proteine werden vermutlich in dieser Weise transloziert. (4) Im Falle einer „Non-Loop“-Insertion kann die Polypeptidkette nicht durch den Translokationskanal translozieren und akkumuliert auf der cytosolischen Seite der Membran. Diese Art der Translokation wird vermutlich von polytopischen Membranproteinen mit mehreren hydrophoben Transmembran-Domänen genutzt. Das Model berücksichtigt keine anderen Regulations-Mechanismen bzw. Ausnahmen. Cyt: Cytosol bzw. cytosolisch. Modifiziert nach (Beckmann et al., 2001)

3.4 Möglicher Einfluss von *trans*- Faktoren auf die ER-Translokation intrinsisch unstrukturierter versus strukturierter Proteine

Zusätzlich oder an Stelle von intrinsischen (*cis*-) Faktoren können aber auch zelluläre (*trans*-) Faktoren an dem beschriebenen Regulationsmechanismus der ER-Translokation beteiligt sein. Hierbei sind mehrere Faktoren vorstellbar, welche eine ER-Translokation von intrinsisch unstrukturierten Domänen verhindern bzw. die Translokation von α -helikalen Segmenten fördern könnten.

Bereits während der Translokation kann die Polypeptidkette mit ER-Membran-assoziierten Proteinen wie der Oligosaccharyl-Transferase OST und der Signalpeptidase (SPase) und mit ER-luminalen Faktoren wie BiP und der Protein-Disulfid-Isomerase PDI interagieren. Diese Interaktionen sind transient und induzieren eine schnelle Faltung und Prozessierung des translozierten Proteins (Brodsky and Skach, 2011). Es ist vorstellbar, dass einige dieser Faktoren an der Translokations-Regulation von intrinsisch unstrukturierten Proteinen beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass ein N-terminales unstrukturiertes Segment des Prion-Proteins (aa 1-112) im ER-Lumen mit PDI interagiert (Kim and Hegde, 2002). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass dieses Segment des Prion-Proteins (aa 1-115) nicht ins ER transloziert wird (Miesbauer et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass diese unstrukturierte Domäne teilweise ins ER transloziert wird, an einem bestimmten Punkt jedoch wieder aus dem ER-Lumen extrahiert wird. Es ist möglich, dass BiP oder PDI α -helikale Domänen effizienter binden als intrinsisch unstrukturierte Bereiche, welche meist sehr flexibel und nicht sehr hydrophob sind.

Auch Sec62, Sec63 und das Protein ERj1 könnten die Translokation von intrinsisch unstrukturierten Domänen beeinträchtigen. Es ist bekannt, dass ERj1 an kotranslational-translatierende Ribosomen binden und deren weitere Synthese inhibieren kann, jedoch nur wenn BiP im ER unterrepräsentiert ist und nicht an die translozierende Polypeptidkette binden kann (Benedix et al., 2010; Dudek et al., 2005). Eine ineffiziente Bindung von BiP an intrinsisch unstrukturierte Domänen und der damit einhergehende Translationsarrest könnte eine Bindung von Faktoren auf der cytosolischen Seite des ERs begünstigen, welche wiederum möglicherweise

eine Extraktion des Proteins erleichtern. Sec63 könnte durch seine beschriebene Interaktion mit BiP eine ähnliche Funktion ausführen. Erst kürzlich konnte eine Substrat-spezifische Rolle von Sec63 bei der kotranslationalen Translokation belegt werden (Lang et al., 2012). Es ist möglich, dass Sec63, ähnlich wie TRAM oder TRAP, die *Gating*-Effizienz von Signalsequenzen bei der Translokations-Initiation verstärkt.

Eine ineffiziente Bindung von BiP an intrinsisch unstrukturierte Bereiche des zu translozierenden Proteins im ER-Lumen kann möglicherweise zu einer kotranslationalen Extraktion von sekretorischen Proteinen zurück ins Cytosol führen. Dies könnte durch das Hsp40-Chaperon p58^{IPK} vermittelt werden (Oyadomari et al., 2006). p58^{IPK} wurde in einer Studie als peripher assoziiertes Membranprotein auf der cytosolischen Seite der ER-Membran beschrieben. Zudem wurde eine Interaktion mit dem Translokationskanal, sowie mit cytosolischen Hsp70-Chaperonen festgestellt. Die Studie von Oyadomari et al. schlägt -basierend auf ihren Daten- folgendes Modell vor: Unter Stressbedingungen wird BiP an ungefaltete Proteine im ER rekrutiert und kann nicht wie unter normalen Bedingungen die ER-Translokation durch eine Bindung der naszierenden Polypeptidkette unterstützen. Dies führt möglicherweise zu einer cytosolischen Akkumulation des Proteins während der Translokation. p58^{IPK} bindet diese cytosolischen Bereiche und rekrutiert Hsp70-Proteine an die cytosolische Seite der ER-Membran. Dies führt letztendlich möglicherweise zu einer Extraktion und Degradierung des nicht-effizient translozierten Proteins (Oyadomari et al., 2006). Ein ähnliches Szenario wäre auch für die Translokation von intrinsisch unstrukturierten Proteinen denkbar. Andere Studien weisen jedoch daraufhin, dass p58^{IPK} seine Funktion lediglich im ER-Lumen durch seine Interaktion mit BiP erfüllt (Petrova et al., 2008; Rutkowski et al., 2007). Um die Polypeptidkette als möglichen Angriffspunkt von cytosolischen Faktoren wie p58^{IPK} zu verstehen, ist zu erwähnen, dass die Verbindung zwischen Ribosom und Translokation in der Literatur nicht als komplett geschlossen beschrieben wird und Protease-Protektions-Versuche zeigen, dass während der Translokation Unterschiede in der räumlichen Zugänglichkeit der naszierenden Polypeptidkette von der cytosolischen Seite aus bestehen (Beckmann et al., 2001; Johnson and van Waes, 1999; Jungnickel and Rapoport, 1995; Liao et al., 1997). Auch weisen verschiedene Proteine eine unterschiedliche cytosolische Zugänglichkeit auf. Eine einseitige ‚Lücke‘ von ca. 15-25 Å erlaubt hierbei z.B. den Austritt von cytosolischen

Domänen von Membranproteinen, sowie die Interaktion mit faltungsfördernden Kofaktoren.

Wie in der Einleitung beschrieben, existieren in Eukaryoten viele Translokon-assoziierte Membranproteine, wie TRAM oder TRAP, welche eine Translokation verschiedener Substrate meist signalsequenz-spezifisch regulieren. Es wurde beschrieben, dass die Translokation von Proteinen mit einer ER-Signalsequenz, welche eine ineffiziente *Gating*-Aktivität besitzt, teilweise durch diese Faktoren gefördert wird (Fons et al., 2003b; Voigt et al., 1996a). Dabei sind diese Faktoren vermutlich an einer erfolgreichen Ausbildung eines stabilen Ribosom-Translokon-Komplexes beteiligt (Fons et al., 2003b; Hegde and Kang, 2008). Es ist deshalb denkbar, dass die Membran-Komponenten TRAM und TRAP neben ihrer Interaktion mit der Signalsequenz oder anderen spezifischen Sequenzen auch bestimmte α -helikale Strukturen der zu translozierenden Polypeptidkette erkennen und ihre Translokation aktiv fördern.

Neben einer Rolle als Chaperon bei der kotranslationalen Faltung von naszierenden Polypeptidketten (Hartl and Hayer-Hartl, 2002), könnte NAC eine Funktion beim Translokationsprozess selbst ausüben. Daten konnten zeigen, dass NAC parallel mit SRP an RNCs binden kann und dass diese Bindung auch noch während einer Interaktion des RNCs mit dem Translokon anhält (Zhang et al., 2012). Somit könnte NAC eine Funktion bei der Abschirmung von Transmembrandomänen oder cytosolischen „Loops“ während der Membranprotein-Insertion ausüben. Es ist vorstellbar, dass NAC dabei mit intrinsisch unstrukturierten oder α -helikalen Domänen unterschiedlich interagiert, wobei intrinsisch unstrukturierte Bereiche eventuell nicht so effektiv abgeschirmt werden können. Dies könnte eine gesteigerte Interaktion mit cytosolischen Faktoren zur Folge haben und damit den weiteren Translokationsprozess beeinträchtigen (Cheng and Gilmore, 2006).

Zusammenfassend können alle Translokon-assoziierten Faktoren, welchen bereits eine Rolle bei der Signalsequenz-spezifischen bzw. Substrat-spezifischen Regulation zugewiesen wurde, auch eine mögliche Funktion bei der Regulation der ER-Translokation von intrinsisch unstrukturierten Proteinen übernehmen. Geht man von einer teilweisen Translokation dieser Domänen ins ER und einem anschließenden „Zurückziehen“ der Polypeptidkette ins Cytosol aus, könnten zudem

Faktoren beteiligt sein, welche bei der Retrotranslokation von Proteinen eine Rolle spielen. Die zukünftige Erforschung von Faktoren, welche eine Translokation von intrinsisch unstrukturierten Proteinen verhindern bzw. die Translokation von Domänen mit einer α -helikalen Struktur fördern könnten, ist ein wichtiger Schritt, um den hier dargestellten Regulationsmechanismus zu erklären. Dies könnte durch *in vitro* Translokations-Analysen in Translationsextrakten durchgeführt werden, welche spezifisch rekonstituiert bzw. wobei potentielle Regulator-Proteine depletiert wurden. Zum anderen könnten potenziell an der Regulation beteiligte Proteine mittels spezifischer siRNAs aus Zellen depletiert werden und anschließend der ER-Import von intrinsisch unstrukturierten Substraten untersucht werden.

3.5 ER-Signalsequenzen können eine mitochondriale Zielsteuerung vermitteln

Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Arbeit war, dass die ER-Signalsequenz (ER-SS) von Somatostatin (Som) die Fähigkeit besitzt eine mitochondriale Zielsteuerung zu vermitteln. Dies konnte sowohl durch die mitochondriale Lokalisation der Som Δ pro-Mutante als auch der mitochondrialen Lokalisation von WT-Som nach einer Hemmung des ER-Imports gezeigt werden. Zwei Gründe sprechen dabei für eine entscheidende Rolle der ER-SS für die mitochondriale Zielsteuerung: Erstens konnte durch *in vitro* Studien gezeigt werden, dass Som Δ pro nicht in mikrosomale Membranen importiert wird und somit eine unprozessierte Signalsequenz besitzt. Zweitens konnte gezeigt werden, dass eine Mutante von WT-Somatostatin, welcher die ER-SS fehlt, cytosolisch lokalisiert ist und somit unfähig ist eine Weiterleitung zum Mitochondrium zu vermitteln.

Zudem konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei weitere ER-SS identifiziert werden, welche ebenfalls eine mitochondriale Zielsteuerung vermitteln können: die des Amyloid-Präkursor Proteins (APP) und die des PrP-ähnlichen Proteins Shadoo (Sho) (Pfeiffer et al., 2013). Hierbei konnte für die drei ER-SS von Som, Sho und APP jeweils eine inverse Korrelation zwischen ER-Translokation und mitochondrialer Zielsteuerung beobachtet werden (Pfeiffer et al., 2013).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Protein durch alternative mRNA-*Splicing*-Mechanismen oder alternative Translationsstarts einer mRNA zu verschiedenen Kompartimenten der Zelle zielgesteuert werden kann (Danpure, 1995; Small et al., 1998). Alternativ kann ein einziges Translationsprodukt zwei unterschiedliche Signalsequenzen besitzen. Liegen diese direkt hintereinander, wird dieser Teil auch als „chimere“ Signalsequenz bezeichnet. Häufig wird die Zielsteuerung dieser Proteine durch eine posttranslationale Modifizierung, wie Phosphorylierung oder proteolytische Spaltung, und damit einer Aktivierung einer der beiden Signalsequenzen reguliert (Karniely and Pines, 2005). Beispiele für Proteine mit chimären Signalsequenzen sind Proteine der Cytochrom P450 Familie, wobei die Enzyme entweder zum Mitochondrium oder zum ER zielgesteuert werden (Anandatheerthavarada et al., 1999). Auch für APP wurde ein ähnlicher Mechanismus beschrieben (Anandatheerthavarada et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine neuartige Modulation der Zielsteuerung gezeigt, wobei die ER-SS der analysierten Proteine Som, Sho und APP entweder eine Zielsteuerung ans ER oder eine mitochondriale Zielsteuerung vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass diese ER-SS nicht nur die jeweilige Zielsteuerung, sondern auch einen erfolgreichen Import der Proteine entweder in das ER-Lumen oder die mitochondriale Matrix vermitteln (Pfeiffer et al., 2013).

Um eine Erklärung für diese interessante Beobachtung zu finden, wurden die ER-SS von Som, Sho und APP auf ihre physico-chemischen Eigenschaften untersucht. Dadurch sollten mögliche Hinweise auf die Fähigkeit zur mitochondrialen Zielsteuerung gefunden werden. Es konnten jedoch in dieser Hinsicht keine Ähnlichkeiten zu einer konventionellen mitochondrialen Präsequenz gefunden werden. Ein Vergleich der Proteinsequenzen der drei ER-SS lieferte einen Hinweis auf ein mögliches gemeinsames Sequenzmotif. Das gefundene „A-X(0,2)-L-X(0,1)-A-A“-Motif ist allgemein am häufigsten in der Familie der ABC-Transporter vertreten. Diese Proteinfamilie besteht aus mehrfach die ER-Membran-durchspannenden Membranproteinen, welche im Transmembran-Transport von verschiedenen Substanzen eine zentrale Rolle spielen (Schmitt and Tampe, 2002). Interessanterweise werden einige Isoformen dieser Proteinfamilie zu den Mitochondrien oder Peroxisomen geführt (Miyazaki et al., 2005).

Drei Signalsequenzen sind jedoch zu wenig, um bioinformatisch ein eindeutiges Motif abzuleiten. Zudem deutet die Analyse hybrider Signalsequenzen auf eine

Lokalisation des mitochondrialen Zielsteuerungs-Motifs in der N-terminalen Hälfte von Som, aber in der C-terminalen Hälfte von APP hin (Pfeiffer et al., 2013). Das hier dargestellte Motif liegt jedoch in der N-terminalen Hälfte von APP und spricht somit gegen dieses Motif.

Wie ist jedoch erklärbar, dass ein und dieselbe Signalsequenz die Zielsteuerung entweder ins ER oder ans Mitochondrium reguliert?

Durch die hier vorgelegte Studie konnte gezeigt werden, dass die Zielsteuerungsrichtung durch strukturelle Eigenschaften der Polypeptidkette bestimmt wird. Dieses Konzept wird durch folgende Beobachtung unterstützt:

In Verbindung mit intrinsisch unstrukturierten „Passagier“-Proteinen vermittelten diese Signalsequenzen eine mitochondriale Zielsteuerung. Im Gegensatz dazu leiteten sie Proteine, welche α -helikale Domänen enthielten, zum ER. In Verbindung mit der Beobachtung, dass intrinsisch unstrukturierte Proteine nicht effizient ins ER transloziert wurden und die Anwesenheit von α -helikale Domänen die ER-Translokation förderte, scheint folgendes Model plausibel zu sein (Abb. 35):

Die ER-Signalsequenzen von Som, Sho und APP vermitteln, unabhängig von der Struktur ihrer naszierenden Polypeptidkette, in einem ersten Schritt eine Zielsteuerung an die ER-Membran (Schritt 1). Falls das Protein in einem nächsten Schritt aufgrund von intrinsisch unstrukturierten Domänen oder einer eingeschränkten Translokation-Aktivität nicht erfolgreich ins ER importiert werden kann (Schritt 2), wird es ins Cytosol freigesetzt (Schritt 3). Dort kann es proteasomal abgebaut werden, wie im Fall von unstrukturierten Modellproteinen des Prion-Proteins (Miesbauer et al., 2009) (Schritt 4) oder durch die unprozessierte ER-Signalsequenz zum Mitochondrium weitergeleitet werden (Schritt 5 und 6).

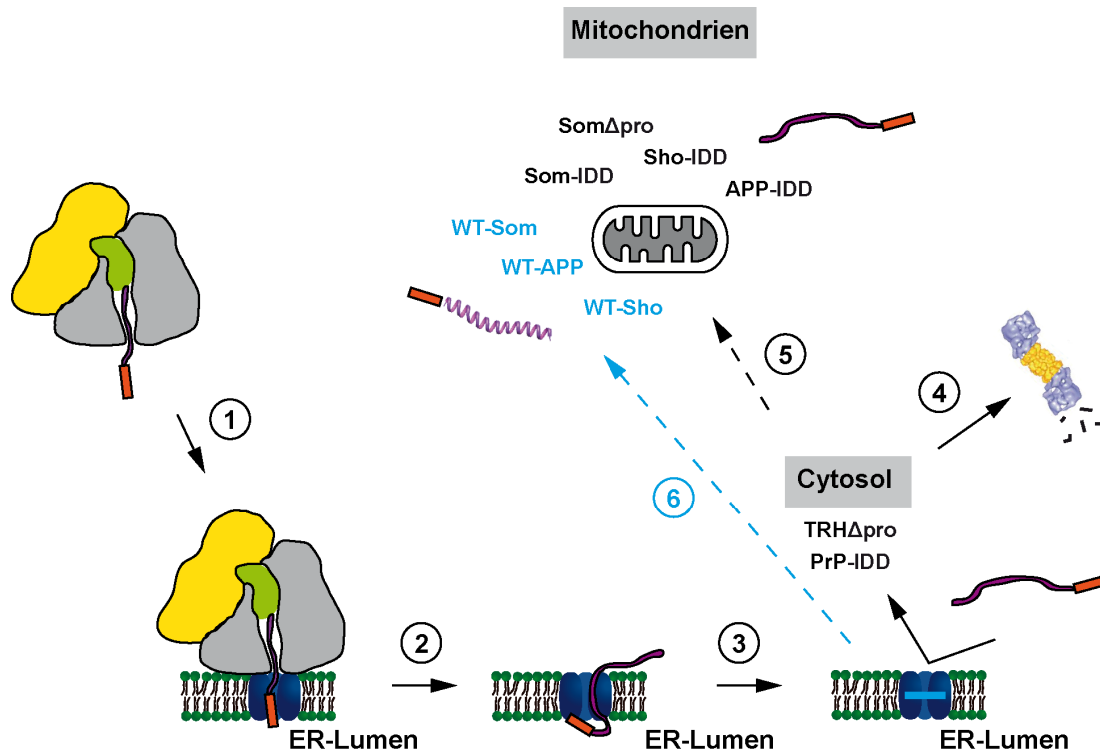


Abb. 35: Model einer Translokations-regulierten mitochondrialen Zielsteuerung durch bivalente ER-Signalsequenzen. Die einzelnen Schritte sind im Text erläutert. Gelb: kleine ribosomale Untereinheit; grau: große ribosomale Untereinheit; grün: tRNA; rot: ER-Signalsequenz; blau: Translokationskanal Sec61. Das Bild des Proteasoms wurde entlehnt von (Voges et al., 1999).

Die Zielsteuerung von sekretorischen Proteinen mit einer N-terminalen Signalsequenz erfolgt in Eukaryoten meist kotranslational. Es gibt jedoch Ausnahmen. Zum Beispiel ist bekannt, dass sehr kleine Proteine (ca. <100 aa) den posttranslationalen Importweg in das ER nutzen und dabei unterschiedliche Faktoren benötigen, u.a. Calmodulin (Shao and Hegde, 2011a), TRC-40 (Johnson et al., 2012) oder Sec62 (Lakkaraju et al., 2012; Lang et al., 2012). Dies liegt vermutlich an dem limitierten Zeitfenster, in welchem SRP an die naszierende Polypeptidkette binden kann (Goder et al., 2000; Shao and Hegde, 2011b; Zimmermann et al., 1990a).

Aufgrund dieser Kenntnis kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete ineffiziente ER-Translokation von SomΔpro auf dessen Länge und nicht auf das Fehlen der α-helikalen Prodomäne zurückzuführen ist. Es ist mit einer Länge von lediglich 67 aa das kürzeste hier analysierte Konstrukt.

Möglicherweise ist es damit zu kurz, um *in vivo* kotranslational an die ER-Membran zielgesteuert zu werden (Muller and Zimmermann, 1987). Jedoch konnte Som Δ pro auch durch eine Verlängerung bzw. Fusion mit einer relativ langen intrinsisch unstrukturierten Domäne nicht ins ER transloziert werden. Dies spricht gegen einen verhinderte ER-Import von Som Δ pro aufgrund der Länge des Proteins. Zudem konnte Som Δ pro in einem *in vitro* Experiment kotranslational an die ER-Membran zielgesteuert werden. Hierbei wird die Polypeptidkette jedoch künstlich am Ribosom "festgehalten", was möglicherweise zu einer artifiziellen Ausweitung des Zeitfensters für die SRP-Bindung führt.

Zudem ist möglich, dass -wie bereits in Punkt 3.3 erwähnt- eine eventuelle α -helikale Faltung der naszierenden Polypeptidkette im ribosomalen Tunnel nach Exposition der Signalsequenz die Bindung von SRP verstärkt. Intrinsisch unstrukturierte Segmente vermitteln möglicherweise keine effiziente Bindung von SRP. Dies könnte eine verstärkte Bindung des kotranslational mit der naszierenden Polypeptidkette assoziierenden Faktors NAC zur Folge haben. Ein Zwischenspiel zwischen SRP und NAC ist schon lange bekannt (Moller et al., 1998; Wiedmann et al., 1994). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die β' - Untereinheit (Btt1) des cytosolischen Chaperons NAC bevorzugt mit nukleär-kodierten mitochondrialen Proteinen interagiert (del Alamo et al., 2011; George et al., 1998). Die Bindung von NAC könnte demnach eine Zielsteuerung ans Mitochondrium unterstützen. Jedoch ist noch wenig über die Rolle von NAC in der Zielsteuerung von mitochondrialen Proteinen bekannt. Gegen das zuletzt dargestellte Szenario spricht jedoch, dass zumindest *in vitro* keine Unterschiede in der Effizienz der kotranslationalen Zielsteuerung von intrinsisch unstrukturierten und α -helikalen Proteinen an mikrosomale Membranen festgestellt werden konnte.

3.6 Nutzen und pathophysiologische Konsequenzen von dualem Targeting

Generell besitzen ER- und mitochondriale Signalsequenzen aufgrund ihrer Hydrophobizität meist eine Affinität zu Organell-Membranen. Das „Fine-Tuning“, welches die richtige Lokalisation der Proteine in der Zelle ermöglicht, ist jedoch nicht im Detail verstanden. Die spezifische Aminosäureabfolge der Signalsequenzen

scheint jedoch für die Zielsteuerung unerheblich zu sein. Dies geht aus Daten hervor, die zeigen, dass bis zu einem Fünftel von analysierten randomisierten Sequenzen, welche N-terminal an die mature Domäne der Invertase aus Hefe angefügt wurden, ein ER-Importsignal darstellen (Kaiser et al., 1987). Auch das Ersetzen der mitochondrialen Präsequenz der Cytochrom-Oxidase Untereinheit IV durch zufällige Sequenzen resultierte bei einem Viertel der Proteine in einer mitochondrialen Lokalisation (Allison and Schatz, 1986; Lemire et al., 1989).

Die Erforschung des Phänomens der dualen bzw. multiplen Zielsteuerung eines Translationsproduktes ergab eine Abhängigkeit der Lokalisation von Proteinen von zellulären Bedingungen, wie z.B. ER-Stress, von spezifischen Zielsteuerungsfaktoren sowie verschiedenen posttranslationalen Modifikationen (Yogev and Pines, 2011).

In vielen Fällen führt eine fehlgeschlagene Zielsteuerung zu pathogenen Mechanismen. Zum Beispiel ist beschrieben, dass eine cytosolische Lokalisation des normalerweise an der Plasmamembran-lokalisierten Prion-Proteins zu cytotoxischen Effekten und Neurodegeneration führen kann (Ma et al., 2002a; Rambold et al., 2006a). Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine ineffiziente ER-Translokation der Grund für die cytosolische Lokalisation von PrP sein kann (Heske et al., 2004; Rane et al., 2008; Rane et al., 2004). Es ist zudem beschrieben, dass die cytosolische Fraktion und damit die Toxizität von PrP unter ER-Stressbedingungen (Kang et al., 2006; Rane et al., 2008) oder unter Bedingungen einer ineffizienten proteasomalen Degradierung (Ma et al., 2002b; Rambold et al., 2006a; Rane et al., 2004) ansteigt. Dies deutet daraufhin, dass eine gestörte Qualitätskontrolle, wie sie bei natürlichen Alterungsprozessen vorkommt, zur Fehllokalisierung von Proteinen führen und damit möglicherweise zur Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen beitragen kann.

Auch die mitochondriale Fehllokalisierung des hier analysierten Plasmamembran-Proteins APP wird mit einer mitochondrialen Dysfunktion in Verbindung gebracht (Anandatheerthavarada et al., 2003; Devi et al., 2006). Da die Prozessierung dieses Proteins an der Plasmamembran eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung spielt, könnte auch dessen mitochondriale Lokalisierung zur Ausbildung dieser Erkrankung beitragen. Dabei wäre es plausibel, dass altersbedingte Veränderungen eine mitochondriale Zielsteuerung dieses Proteins begünstigen.

Es wurde vermutet, dass der duale Zielsteuerungsmechanismus von APP auf eine chimere Signalsequenz zurückzuführen ist, wobei eine der beiden Signalsequenzen durch verschiedene cytosolische Faktoren wie Abspaltung der ER-SS durch Proteasen oder Phosphorylierung aktiviert wird (Devi and Anandatheerthavarada, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, konnte jedoch gezeigt werden, dass die ER-Signalsequenz (ER-SS) von APP selbst eine mitochondriale Zielsteuerungsaktivität besitzt und die ER-SS somit eine bivalente Signalsequenz darstellt (Pfeiffer et al., 2013).

Neben einer Rolle in pathogenen Mechanismen konnte gezeigt werden, dass eine duale Zielsteuerung von Proteinen in vielen Fällen zu einer Expansion der Proteinfunktion führen kann. Dabei können Proteine ähnliche oder verschiedene Funktionen abhängig von ihrem Zielort erfüllen (Yogev and Pines, 2011). Ein Beispiel hierfür ist das ER-Chaperon Calretikulin, welches unter physiologischen Bedingungen durch Retrotranslokation des Proteins aus dem ER eine cytosolische Fraktion aufweist, welche zu weiteren funktionellen Eigenschaften des Proteins führt (Afshar et al., 2005; Shaffer et al., 2005). Auch die duale Zielsteuerung von Proteinen zwischen ER und Mitochondrium kann zu einem erweiterten Wirkungsbereich dieser Proteine führen. Zu nennen sind hier z.B. die Proteine CYP2B1 und CYP1A1 der Cytochrom P450 Familie (Anandatheerthavarada et al., 1999; Bhagwat et al., 1999) und das antiapoptotische Protein Bcl-2 (Kaufmann et al., 2003).

Wie in der vorgelegten Arbeit gezeigt, können nicht nur chimäre Signalsequenzen in Verbindung mit posttranslationalen Modifikationen des Proteins eine duale Zielsteuerung zwischen ER und Mitochondrien vermitteln, sondern auch bivalente Signalsequenzen in Verbindung mit der Sekundärstruktur des Proteins. Dies verdeutlicht, dass die duale Zielsteuerung von Proteinen einen sehr dynamischen und durch mehrere Faktoren regulierten Prozess darstellt. Dies erlaubt Zellen ein hohes Maß an Flexibilität und die Fähigkeit schnell auf sich ändernde Bedingungen zu reagieren (Yogev and Pines, 2011).

Es bleibt zukünftig zu klären, ob der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Mechanismus der dualen Zielsteuerung einen physiologischen Nutzen darstellt, durch welchen mitochondrial zielgesteuerten, sekretorischen Proteinen eine zusätzliche Proteinfunktion zugewiesen werden kann.

Es ist jedoch auch möglich, dass die hier beschriebene Translokations-regulierte mitochondriale Zielsteuerung lediglich als Folge von gestörten Qualitätskontrollmechanismen während ER-Stressbedingungen oder aufgrund des natürlichen Alterungsprozesses auftritt. In diesem Fall wäre es von Bedeutung durch weitere Forschungen auf diesem Gebiet aufzudecken, ob und inwieweit durch diesen Mechanismus fehllokalisierten Proteinen eine Rolle in pathogenen Mechanismen, wie z.B. neurodegenerativen Erkrankungen, zukommt.

4 Zusammenfassung

Verschiedene Neuropeptidhormone, welche einerseits sehr klein sind oder als intrinsisch unstrukturiert vorhergesagt werden, werden als größere Vorläufer-Proteine synthetisiert. Diese enthalten neben der N-terminalen Signalsequenz eine Prodomäne, welche später im sekretorischen Biosyntheseweg abgespalten wird und nicht Teil des aktiven Hormons ist. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle der Prodomänen in der Biogenese der intrinsisch unstrukturiert vorhergesagten Neuropeptidhormone Thyrotropin-Releasing Hormon (TRH), Somatostatin (Som) und Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) untersucht. Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Prodomänen dieser Proteine für eine effiziente Translokation der intrinsisch unstrukturierten Hormondomänen in das ER-Lumen verantwortlich sind. Bisher wurde eine Funktion der Prodomäne von Peptidhormonen erst nach der Translokation bei der Proteinfaltung, Prozessierung und Sortierung der Proteine im ER-Golgi-Kompartiment beschrieben. Zudem deuten die durchgeführten Domänen-Austausch-Experimente daraufhin, dass für die beschriebene translokationsfördernde Aktivität der Prodomäne ihre alpha-helikale Struktur entscheidend ist. Durch die *in vitro* durchgeführten Zielsteuerungsexperimente konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der Prodomäne bzw. von alpha-helikalen Domänen im Allgemeinen die Translokation in das ER-Lumen und nicht die kotranslationale Zielsteuerung der naszierenden Polypeptidkette an die ER-Membran negativ beeinflusst.

Durch die Analyse des weiteren Schicksals der nicht-translozierten, intrinsisch unstrukturierten Proteine konnte ein neuartiger, dualer Zielsteuerungsmechanismus charakterisiert werden, wobei die ER-Signalsequenzen von Somatostatin (Som), Shadoo (Sho) und APP (Amyloid-Vorläuferprotein) eine Weiterleitung der Proteine zum Mitochondrium vermitteln. Es zeigte sich, dass die Zielsteuerungsrichtung der genannten bivalenten Signalsequenzen von der Sekundärstruktur der Polypeptidkette abhängt, wobei intrinsisch unstrukturierte Domänen eine mitochondriale Lokalisation und α -helikale Domänen präferentiell eine ER-Translokation vermitteln.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bekräftigen eine Regulation der ER-Translokation durch die Sekundärstruktur der maturen Domäne des Proteins. Die hier gewonnenen Daten zeigen zudem, dass eine duale Zielsteuerung von Proteinen zwischen ER und Mitochondrium durch die Sekundärstruktur der maturen Domäne koordiniert werden kann. Diese Erkenntnisse können möglicherweise in Zukunft zu einem tieferen Verständnis von einigen Erkrankungen beitragen, welche auf einer Mislokalisierung von sekretorischen Proteinen beruhen.

5 Material

5.1 Biologisches Material

5.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	<i>E. coli</i> supE44, Δ lac169 (Φ lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1 Herkunft: (Hanahan, 1983)
BI21-DE3-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r] Herkunft: Stratagene

5.1.2 Zelllinien

N2a	murine Neuroblastomzellen ATCC-Nr. CCI 131 (Neuro-2a)
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen DSMZ-Nr. ACC 209
HeLa	humane, epitheliale Zervixkarzinomzellen ATCC-Nr. CCL-2

5.2 Plasmide und Oligonukleotide

5.2.1 Plasmide

Plamid	Herkunft	Eigenschaften
pcDNA 3.1/Zeo+	Life Technologies, Carlsbad, USA	Expression in Säugerzellen, Ampicillin-Resistenz
pTXB1	New England BioLabs	Expression in <i>E. coli</i> , Ampicillin-Resistenz; modifiziert durch Einführung einer 6x Histidin-Sequenz nach der Age1-Restriktionsstelle
pET-27b(+)	Novagen	Expression in <i>E. coli</i> , Kanamycin-Resistenz; kodiert pelB-Leader -Sequenz

5.2.2 Synthetische Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide (Primer) erfolgte von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm).

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')
Som-Hind-fw	CCC AAG CTT ATG CTG TCC TGC CGC CTC CAG
Som-V5_Xho-rev	GCG CTC GAG CTA CGT GCT ATC CAG ACC GAG CAG AGG GTT CGG TAT CGG TTT ACC ACA GGA TGT GAA AGT CTT
Som-d25-88-fw	CTG GGC TGT GTC ACC GGC TCT GCT AAC TCA AAC CCG
Som-d25-88-rev	CGG GTT TGA GTT AGC AGA GCC GGT GAC ACA GCC CAG
Som-d89-116-V5-Xho-rev	GCG CTC GAG CTA CGT GCT ATC CAG ACC GAG CAG AGG GTT CGG TAT CGG TTT ACC TCT CTG CAG CTC AAG CCT

pTXB1-Som25-88-Nde-fw	CTG TGT CCA TAT GGC TCC CTC GGA CCC CAG
pTXB1-Som25-88-Xho-rev	TTT TTT GCG CTC GAG TCT CTG CAG CTC AAG CCT
GnRH-Hind-fw	CCC AAG CTT ATG AAG CCA ATT CAA AAA CTC
GnRH-V5-Xho-rev	GCG CTC GAG CTA CGT GCT ATC CAG ACC GAG CAG AGG GTT CGG TAT CGG TTT ACC AAT CTT CTT CTG CCC AGT
TRH-Hind-fw	CCC AAG CTT ATG CCC GGC CCT TGG TTG CTG
TRH-V5-Xho-rev	GCG CTC GAG CTA CGT GCT ATC CAG ACC GAG CAG AGG GTT CGG TAT CGG TTT ACC CTC CTC CAG GGG CTC TCT
TRH-d26-62-fw	CCC GGC GGC CGT GCT CAG CAA GGG GAC CAG GGT GAG
TRH-d26-62-rev	CTC ACC CTG GTC CCC TTG CTG AGC ACG GCC GCC GGG
TRH-d63-99 -fw	GAA AAC ATC CAG CGG CTG GAG GAA GAG GAA GAA GGG
TRH-d63-99 -rev	CCC TTC TTC CTC TTC CTC CAG CCG CTG GAT GTT TTC
SS-TRH-Pro-Som-fw	GTC CCC GGC GGC CGT GCT GCT CCC TCG GAC CCC AGA
SS-TRH-Pro-Som-rev	TCT GGG GTC CGA GGG AGC AGC ACG GCC GCC GGG GAC
Pro-Som-Peptid-TRH-fw	AGG CTT GAG CTG CAG AGA CAG CAT CCA GGC AAA AGA
Pro-Som-Peptid-TRH-rev	TCT TTT GCC TGG ATG CTG TCT CTG CAG CTC AAG CCT
cytoTRHd63-99_fw	CCC AAG CTT ATG CAG CCA GAG GCG GCC CAG
cytoTRHd26-62_fw	CCC AAG CTT ATG CAG CAA GGG GAC CAG GGT
cytoSom_fw	CCC AAG CTT ATG GCT CCC TCG GAC CCC AGA
Som-d61-88 fw	GAG CTG CTG TCT GAA CCC TCT GCT AAC TCA AAC CCG
Som-d61-88 rev	CGG GTT TGA GTT AGC AGA GGG TTC AGA CAG CAG CTC
PrP 121-231_Msc1_fw	AAA AAA ATG GCC ATG GGG GGC CTT GGT GGC TAC
PrP 121-231_Hind3_rev	TTT TTT AAG CTT TCA TTA GCT GCT GGA TCT TCT CCC GT
PrP 23-132_Msc1_fw	AAA AAA ATG GCC ATG AAA AAG CGG CCA AAG CCT

Material

PrP 23-132_Hind3_rev	TTT TTT AAG CTT TCA TTA CAT GGC GCT CCC CAG CAT
dSS-A4-115α2α3-Msc-fw	AAA AAA ATG GCC ATG GCG GCC GCG CCA GCG CCT
dSS-115α2α3-Msc-fw	AAA AAA ATG GCC ATG AAA AAG CGG CCA AAG CCT
dSS-115α2α3-Hind-rev	TTT TTT AAG CTT TCA TTA GGA CTC CTT CTG GTA CTG
dSS-α2α3115-Msc-fw	AAA AAA ATG GCC ATG CAG AAC AAC TTC GTG CAC
dSS-α2α3115-Hind-rev	TTT TTT AAG CTT TCA TTA AGC CCC TGC CAT ATG CTT
Helix-Som-89-116-fw	GCA GCA AAG GCT GGC GGA TCT GCT AAC TCA AAC CCG
Helix-Som-89-116-rev	CGG GTT TGA GTT AGC AGA TCC GCC AGC CTT TGC TGC
Som-SS-Helix-fw	GGC TGT GTC ACC GGC GCT GGC GGT GCA GAA GCC GCC
Som-SS-Helix-rev	GGC GGC TTC TGC ACC GCC AGC GCC GGT GAC ACA GCC
Somd26-88-Sho fw	AAG ACT TTC ACA TCC TGT AAG GGC GGC CGC GGA GGT
Somd26-88-Sho rev	ACC TCC GCG GCC GCC CTT ACA GGA TGT GAA AGT CTT
Somd26-88-PrP130-230 fw	AAG ACT TTC ACA TCC TGT AGC GCC ATG AGC AGG CCC
Somd26-88-PrP130-230 rev	GGG CCT GCT CAT GGC GCT ACA GGA TGT GAA AGT CTT
PrP130-230-V5-Xho rev	GCG CTC GAG CTA CGT GCT ATC CAG ACC GAG CAG AGG GTT CGG TAT CGG TTT ACC GCT GCT GGA TCT TCT CCC
GnRH-24-33-V5-Xho rev	GCG CTC GAG CTA CGT GCT ATC CAG ACC GAG CAG AGG GTT CGG TAT CGG TTT ACC TCC AGG GCG CAG TCC ATA
GnRH-SS-37-92 fw	GTG GAA GGC TGC TCC AGC GAT GCC GAA AAT TTG ATT
GnRH-SS-37-92 rev	AAT CAA ATT TTC GGC ATC GCT GGA GCA GCC TTC CAC
TRH-SS-nonstop fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG ACC AAA CAA AAC AAA TAA AAC AAA GCC ACC ATG CCC GGC CCT TGG TTG CTG
TRH-ohneSS-nonstop fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG ACC AAA CAA AAC AAA TAA AAC AAA GCC ACC ATG CAG CCA GAG GCG GCC CAG CAG
TRH-nonstop-rev_neu	CTC CTC CAG GGG CTC TCT GAC CCA GGC TGC CCG CCG
Som-V5-nonstop_rev	CGT GCT ATC CAG ACC GAG CAG AGG

Som-dSS-nonstop_fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG ACC AAA CAA AAC AAA TAA AAC AAA GCC ACC ATG GCT CCC TCG GAC CCC AGA
GnRH-PrP_fw	TAT GGA CTG CGC CCT GGA CAG AAC AAC TTC GTG CAC
GnRH-PrP_rev	GTG CAC GAA GTT GTT CTG TCC AGG GCG CAG TCC ATA
α2α3-V5-Xho_rev	GCG CTC GAG CTA CGT GCT ATC CAG ACC GAG CAG AGG GTT CGG TAT CGG TTT ACC GGA CTC CTT CTG GTA CTG
GnRH-Sho_fw_neu	GGA CTG CGC CCT GGA GCC GGG GCG GCA GCC
GnRH-Sho_rev_neu	GGC TGC CGC CCC GGC TCC AGG GCG CAG TCC
PrP-1-126-nonstop_fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG ACC AAA CAA AAC AAA TAA AAC AAA GCC ACC ATG GCG AAC CTT GGC TAC TGG
PrP-dSS-nonstop_fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG ACC AAA CAA AAC AAA TAA AAC AAA GCC ACC ATG AAA AAG CGG CCA AAG CCT
PrP115-nonstop_rev	AGC CCC TGC CAT ATG CTT
PrPα2α3-42aa115-nonstop_rev	CCA GCC ACC ACC GTG GGG
TRH-SS-α2α3_fw	CCC GGC GGC CGT GCT CAG CAG AAC AAC TTC GTG CAC
TRH-SS-α2α3_rev	GTG CAC GAA GTT GTT CTG CTG AGC ACG GCC GCC GGG
α2α3-TRH-d26-62_fw	CAG TAC CAG AAG GAG TCC CAA GGG GAC CAG GGT GAG
α2α3-TRH-d26-62_rev	CTC ACC CTG GTC CCC TTG GGA CTC CTT CTG GTA CTG
TRH-SS-115_fw	CCC GGC GGC CGT GCT CAG AAA AAG CGG CCA AAG CCT
TRH-SS-115_rev	AGG CTT TGG CCG CTT TTT CTG AGC ACG GCC GCC GGG
115-TRH-d26-62_fw	AAG CAT ATG GCA GGG GCT CAA GGG GAC CAG GGT GAG
115-TRH-d26-62_rev	CTC ACC CTG GTC CCC TTG AGC CCC TGC CAT ATG CTT

5.3 Small interfering RNA (siRNA)

Sec61A1-Knockdown in HeLa-Zellen

Anti-Sec61 alpha Isoform 1 siRNA (CACUGAAAUGUCUACGUUUt)	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
--	---

Kontroll siRNA AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden
---	----------------

5.4 Antikörper

Anti-PrP 3F4, monoklonal	Signet Laboratories, Dedham, MA, USA (Kascsak et al., 1987)
Anti-PrP A7, polyklonal	Hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigten rekombinanten PrP(Winklhofer et al., 2003)
Anti-V5, monoklonal	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Anti-V5, polyklonal	Millipore, Schwalbach
Anti-Giantin, monoklonal	Alexis/Enzo Life Sciences, Lörrach
Anti-Tom20, polyklonal	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

5.5 Standardgrößenmarker für Proteine und Nucleinsäuren

See Blue Plus2 Pre-stained Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

5.6 Biologische Reagenzien

BSA	USB, Cleveland, OH, USA
Pfu-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
PNGase F	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin-EDTA (500mg/l) # 25300-062	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Mikrosomale Membranen aus Hundepankreas	Promega, Madison, WI, USA und Prof. R. Zimmermann

5.7 Chemische Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid Solution 37.5:1 (40 % w/v)	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Amplify	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	USB, Cleveland, OH, USA
Bacto Trypton	BD, Sparks, MD, USA
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

Material

Chloramphenikol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrophosphat	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	USB, Cleveland, OH, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	USB, Cleveland, OH, USA
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Hepes	Biomol, Hamburg
HiPerFect Reagent	Quiagen, Hilden
Instant-Magermilchpulver	Frema Reform, Heimertingen
Kaliumactetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe

Kupfersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipofectamin Reagent	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
L-[35S] Methionin >37 TBq/mmol	Hartmann Analytics, Braunschweig
MG-132	Merck, Darmstadt
MitoTracker Red CMXRos	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Mowiol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Ni-NTA Agarose	Quiagen, Hilden
Paraformaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (100x) P11-010	PAA Laboratories, Pasching
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Plus Reagens	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G/A-Sepharose	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	USB, Cleveland, OH, USA
SDS	Roth, Karlsruhe

Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	USB, Cleveland, OH, USA
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	USB, Cleveland, OH, USA
Trypan Blau	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tunicamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween-20	USB, Cleveland, OH, USA

5.8 Lösungen und Puffer

5.8.1 Allgemein

Anodenpuffer (5x), 1 L <i>SDS-PAGE im Bio-Rad-System</i>	1 M Tris-HCl pH 8,9
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat in PBS -/-
Blockierungsmilch <i>Western Blot</i>	5 % Magermilchpulver in 1x PBS-T
Blockierungspuffer <i>Immunofluoreszenz</i>	1 % BSA in PBS -/-
Coomassie-Färbelösung	0,25 % Coomassie Blue R 250 50 % Methanol 10 % Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Methanol 7 % Essigsäure
DNA-/RNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerol

Entwickler G153 A+B	AGFA HealthCare, Septestraat, Belgien
Fixierlösung G354	AGFA HealthCare, Septestraat, Belgien
Gelpuffer	3 M Tris-HCl pH 8,45
<i>SDS-PAGE-Gele (Bio-Rad)</i>	0,3 % SDS
Kathodenpuffer (1x), 1 L	0,1 M Tris-HCl
<i>SDS-PAGE im Bio-Rad-System</i>	0,1 M Tricin
	0,1 % SDS
Laemmli-Probenpuffer (4x)	240 mM Tris pH 6,8
	4 % SDS
	40 % Glycerol
	1 % Bromphenolblau
	4 % Mercaptoethanol
Laemmli-Probenpuffer (2x)	Laemmli-Probenpuffer (4x) zu H ₂ O im Verhältnis 1 : 1
Laufpuffer	250 mM Tris, pH 6,8
<i>SDS-PAGE im Hoefer-System</i>	1,9 M Glycin
	1 % SDS
Lysepuffer	0,5 % Triton X-100
	0,5 % DOC in PBS -/-
	Zusatz: Protease-Inhibitor Cocktail 1:500
MG-132	10 mM in DMSO
mikrosomaler Resuspensions- puffer (MRB)	0,1 M KOAc
	5 mM Mg(OAc) ₂
	0,25 M Sucrose
	50 mM Hepes, pH 7,4
MitoTracker Red CMXRos, gelöst	1 mM in DMSO
Mowiol	6 g Glycerol
	2,4 g Mowiol
	6 ml H ₂ O
	12 ml Tris-HCl pH 8,5

Material

Paraformaldehyd-Lösung (3,7 % zum Fixieren von Zellen)	Paraformaldehyd 37 % zu PBS +/- im Verhältnis 1 : 10
PBS, Dulbecco's <i>ohne Calcium und Magnesium</i> (Zellkultur, steril)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS +/-, Dulbecco's <i>mit Calcium und Magnesium</i> (Immunfluoreszenz)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS unsteril (10x), 1 L	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄
PBS-T (10x)	1 % Tween-20 in 1x PBS
Pfu-PCR-Mix	1200 µl autoklaviertes Reinstwasser 200 µl 10x Pfu-Polymerase-Puffer je 2 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Pfu-Polymerase-Puffer	Promega, Madison, WI, USA
PMSF 200 mM	200 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in DMSO
Ponceau S-Färbelösung, 0,1 L	0,2 g Ponceau S 5 ml Essigsäure
Restriktionsendonuklease- Puffer (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
Sammelgelpuffer <i>SDS-PAGE-Gele (Hoefel-System)</i>	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % SDS
Shrimp-Alkaline-Phosphatase- Puffer (10x)	Roche Diagnostics, Mannheim
Sucrose-Kissen	0,5 M Sucrose 0,1 mM KOAc 5 mM Mg(OAc) ₂

	50 mM Hepes, pH 7,4
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
TFB1-Puffer <i>Herstellung kompetenter E. coli- Bakterien</i>	30 mM KOAc 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15 % Glycerol, pH 5,8
TFB2-Puffer <i>Herstellung kompetenter E.colis</i>	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15 % Glycerol, pH 6,5
Transferpuffer <i>Bio-Rad-System</i>	2,9 g/l Tris 14,5 g/l Glycin 20 % Methanol
Transferpuffer <i>Hoefel-System</i>	20 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,01 % SDS 20 % Methanol
Transportpuffer	110 mM KOAc 2 mM Mg(OAc) ₂ 0,5 mM EGTA 20 mM Hepes pH 7,4
Trenngelbuffer <i>SDS-PAGE-Gele (Hoefel-System)</i>	1,5 M Tris, pH 8.8 0,4 % SDS
Tunicamycin	10 mg/ml in H ₂ O

5.8.2 Puffer für die radioaktive Markierung in Bakterien

Lyse-Puffer, pH 8,0

2 % SDS
1 mM EDTA
50 mM Tris/HCl

Solubilisierungs-Puffer, pH 8,0

2 % Triton X-100
150 mM NaCl
50 mM Tris/HCl

5.8.3 Puffer zur Aufreinigung der Somatostatin-Prodomäne

Die NPI-Puffer der Ni-NTA-Aufreinigung wurden nach Angaben des Herstellers (Quiagen, *Ni-NTA Superflow Cartridge Handbook*, März 2007) hergestellt.

Lyse-Puffer, pH 8,0

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
1mg/ml Lysozym
5 µg/ml DNase I

Abspaltungspuffer, pH 8,0

20 mM Tris/HCl
50 mM NaCl
0,1 mM EDTA

CD-Puffer, pH 7,2

20 mM NaPO₄
100 mM KCl

NPI-Puffer, pH 8,0

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl

NPI-10-Puffer, pH 8,0

NPI-Puffer
20 mM Imidazol

NPI-250-Puffer, pH 8,0

NPI-Puffer
250 mM Imidazol

5.9 Medien

5.9.1 Allgemein

Minimal Essential Medium (MEM)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Minimal Essential Medium (MEM) ohne L-Methionin	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Opti-MEM	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
LB-Medium	1 % NaCl 1 % Bacto Trypton 0,5 % Hefeextrakt 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agar	1,5 % Bacto Agar 100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium

6.9.2 Medien und Stammlösungen für die radioaktive Markierung in Bakterien

Aminosäure-Stammlösungen:

1) 10x Aminosäure-Mix (AS 1): je 1,2 % in bidestilliertem Wasser
Alanin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin,
Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Valin

Die Aminosäuren wurden durch Sonifikation im Wasserbad gelöst.

2) 20x Aminosäure-Mix (AS 2): je 1 % in 0,5 M NaOH
Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tyrosin

Material

3) 100x Aminosäure-Mix (AS 3): 1 % in 0,2 M HCl

Tryptophan

500x Vitaminlösung (100 ml):

500 mg Nicotinsäure-Amid

25 mg Thiamin/HCl

Weitere Stammlösungen:

Uracil	5 mg/ml in bidestilliertem Wasser
Cystein	25 mg/ml in bidestilliertem Wasser
Methionin	25 mg/ml in bidestilliertem Wasser
Puromycin	10 mg/ml in bidestilliertem Wasser
Kanamycin	50 mg/ml in bidestilliertem Wasser
Chloramphenikol	34 mg/ml in Ethanol

Minimalmedium M9 (1 Liter):

7,5 g Na₂HPO₄

3 g KH₂PO₄

0,5 g NaCl

0,25 g MgSO₄·7 H₂O

0,014 g CaCl₂·2 H₂O, pH 7,1

Vollmedium (200 ml):

10x Aminosäure-Mix 20 ml

20x Aminosäure-Mix 10 ml

100x Aminosäure-Mix 2 ml

Uracil (5 mg/ml) 0,8 ml

Cystein (25 mg/ml) 10 ml

500x Vitamin-Lösung 0,4 ml

Glycerin 2 ml

Minimalmedium M9 154,8 ml

Alle Medien wurden nach Herstellung autoklaviert und alle Stammlösungen sterilfiltriert.

5.10 Kits

Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents RPN 2106	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit	Epicentre, Madison, USA
Bio-Rad Protein Assay <i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat	Merck Millipore, Darmstadt
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
Pure Link HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Quiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega, Mannheim
Wheat Germ Extract	Promega, Mannheim

5.11 Geräte

Agarosegel- Dokumentationssystem Gel iX Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Agarosegel- Elektrophorese-Kammern	Zentralwerkstatt, MPI, Martinsried
Analysenwaage Sartorius bp 3100s	Sartorius, Apeldoorn, Niederlande
Bio-Rad-Kammer Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Chemilumineszenzmesser Fujifilm LAS-4000	Fujifilm Life Science, Stamford, CT, USA
Filmentwickler Cawomat 2000 IR	Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen
Elektrophorese Netzgerät EPS 301 Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Geltrockner Model 583	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Inkubationsschränke	Binder, Tuttlingen
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Braun Biotech International, Melsungen
Kühlschrank Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axioscope 2 plus	Carl Zeiss, Göttingen
Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp, Osaka, Japan

Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten Gilson P2, P10, P20, P100, P200	Abimed, Langenfeld
Pipette Research 1000	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Polyacrylamid-Elektrophorese- Kammer Hoefer SE6000	Hoefer, Holliston, MA, USA
Polyacrylamid-Elektrophorese- Zubehör für Hoefer	Hoefer, Holliston, MA, USA
Präzisionswaage Sartorius BP 221 S	Sartorius, Apeldoorn, Niederlande
Rotor Ja-10	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Rotor Ja-25.50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Rotor TLA55-Rotor	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Rotor Ti50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Reinstwasseranlage Milli-Q Academic	Millipore, Eschborn
Schwenktisch GFL 3017	GFL, Burgwedel
Schwenktisch Reax 3	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Spektralphotometer Nanophotometer	Implen, München
Spektralphotometer PowerWave XS Microplate Reader	Biotec, Winooski, VT, USA
Thermocycler T1	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

Material

Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer Hoefer TE-62	Hoefer, Holliston, MA, USA
Transfernetzgerät Power Supply EPS 2A200	Hoefer, Holliston, MA, USA
Typhoon Imaging System	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Ultrazentrifuge Optima Max-E	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Vacuumpumpe BVC21	Vacuumbrand, Wertheim
Vortexer	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkulturschränke Hera cell	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Zentrifuge Multifuge 3SR	Heraeus, Hanau

5.12 Sonstige Materialien

Blottingpapier	Macherey-Nagel, Düren
Deckgläschen Menzel-Glas	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Einmalkanülen Sterican	Braun, Melsungen
Einmalpipetten, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen	Terumo, Leuven, Belgien
Filme (für Chemilumineszenz) Fuji Medical X-Ray	Fujifilm Life Science, Stamford, CA, USA
Filme (für 35-S-markierte Proben) BioMax MR	Kodak, Stuttgart
Filmkassetten	Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA

Objektträger Menzel-Glas	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen-Zentrifugenröhren	Sarstedt, Nümbrecht
Safe-Lock Micro Test Tubes	Eppendorf, Hamburg
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulose Membran Protran 0,45 µm	Whatman/GE Healthcare, Little Chalfont, UK
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Abgene, Hamburg
Skalpellklinge	Bayha, Tuttlingen
Sterilfilter 0,22 µm und 0,45 µm	VWR, Darmstadt
Vivaspin-Zentrifugenröhrchen	Sartorius, Göttingen
Zählkammer, Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellheber	Corning, Tewksbury, MA, USA
Zellkulturgefäße (Flaschen, Platten, Schalen)	Nunc, Roskilde, Dänemark

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit eingesetzte rekombinante DNA wurde durch Standardtechniken der Plasmid-Klonierung hergestellt. Hierzu wurden die untersuchten Genvariationen mittels Polymerase-Kettenreaktion generiert und durch Restriktion und Ligation in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) integriert. Die so gewonnene rekombinante DNA wurde in kompetenten *Escherichia coli* Bakterien amplifiziert und nach Plasmid-Präparation zur Transfektion der eukaryotischen Zielzellen eingesetzt. Die einzelnen Schritte einer Klonierung sind im Folgenden erläutert. Eine detaillierte Auflistung der Klonierungsstrategien neuer Konstrukte befindet sich am Ende dieses Abschnittes.

6.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ist eine molekularbiologische Methode zur *in vitro* Amplifizierung von DNA (Saiki et al., 1988). Hierbei werden einzelne Fragmente einer DNA mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase sowie mehrerer Oligonukleotide (*Primer*) selektiv amplifiziert. Darüber hinaus kann die PCR, durch eine gezielte Gestaltung der Primer, zur Erzeugung von Mutationen der DNA eingesetzt werden. Diese Methode der PCR-basierten Mutagenese wurde in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung neuartiger DNA-Konstrukte verwendet. Einfache Mutationen, wie beispielsweise die Deletion der Signalsequenz, wurden durch Mutations-kodierende Primer in einer einstufigen PCR generiert. Die Synthese von DNA-Konstrukten, bei denen mehrere DNA-Abschnitte miteinander fusioniert wurden, erfolgte durch eine teilweise mehrstufige Überlappungs-PCR (Abb. 36).

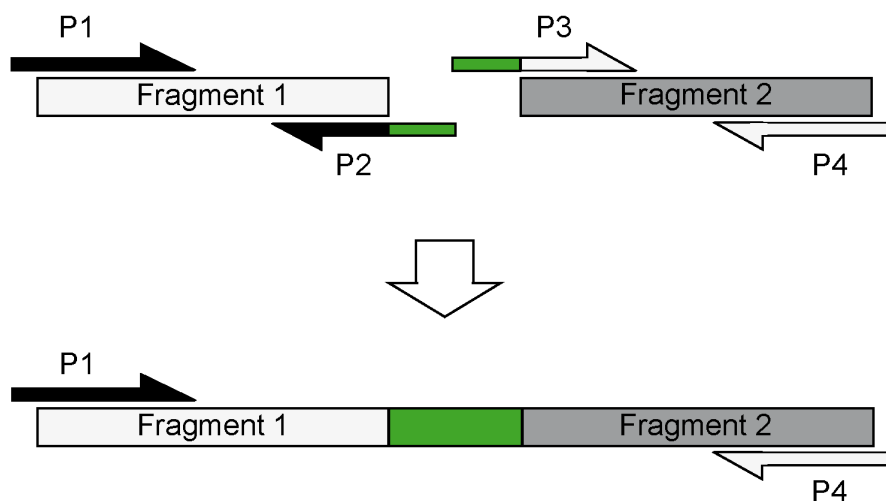


Abb. 36: Schematische Darstellung einer Überlappungs-PCR. In einem ersten Schritt werden die Fragmente 1 und 2 durch die Primer P1 und P2 bzw. P3 und P4 amplifiziert. Dabei weisen die Primer P2 und P3 einen überlappenden Bereich (grün) auf. In einer darauffolgenden PCR werden die Fragmente 1 und 2 als Matrizen eingesetzt, wobei sie sich an dem überlappenden Ende aneinanderlagern. Durch die Amplifikation mit den Primern P1 und P4 entsteht am Ende das Produkt aus Fragment 1 und 2.

Zur Durchführung einer PCR wurden 100 ng Plasmid-DNA (Matrizen-DNA), 4 pmol jedes Primers, je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, DMSO und Pfu-Reaktionspuffer nach dem unten angegebenen Schema auf Eis gemischt und kurz vor dem Start der PCR 1,5 Einheiten Pfu-Polymerase zugegeben.

Standard-PCR-Pipettierschema (0,2 ml PCR-Gefäß)	
18,5 µl	Pfu-PCR-Mix
1 µl	Matrizen-DNA (100 ng/µl)
2 µl	Vorwärts-Primer (2 pmol/µl)
2 µl	Rückwärts-Primer (2 pmol/µl)
1,5 µl	DMSO
0,5 µl	Pfu-Polymerase (3 Einheiten/µl)

Für die Fusions-PCR einer Überlappungs-Extensions-PCR wurde das Standard-PCR-Pipettierschema wie folgt abgewandelt:

Pipettierschema einer Fusions-PCR

18,5 µl	Pfu-PCR-Mix
1 µl*	DNA-Fragment aus PCR 1
1 µl*	DNA-Fragment aus PCR 2
2 µl	Vorwärts-Primer (2 pmol/µl)
2 µl	Rückwärts-Primer (2 pmol/µl)
1,5 µl	DMSO
0,5 µl	Pfu-Polymerase (3 Einheiten/µl)

* bezogen auf eine Agarose-Gelextraktion mit einem Elutionsvolumen von 30 µl.

Der fertige PCR-Ansatz wurde unter den nachfolgenden PCR-Bedingungen amplifiziert. Die Höhe der Temperatur für die Primer-Anlagerung (*Annealing* Temperatur, T_A) wurde dabei an die jeweiligen Schmelztemperatur (T_M) der verwendeten Primer angepasst, wobei folgende Annäherung verwendet wurde:

$$T_A = 0,3 \times T_M (\text{Primer}) + 0,7 \times T_M (\text{PCR-Produkt}) - 14,9$$

Die Elongationszeit wurde auf die Länge des entstehenden PCR-Produktes angepasst. Die verwendete Pfu-Polymerase benötigt für eine Produktlänge von 1 kB ca. 2 min.

PCR-Phase	Zeit	Temperatur	
Denaturierung	2 min	95 °C	
Denaturierung	30 sec	95 °C	28 x
Annealing	45 sec	52-58 °C	
Elongation	1-2 min	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	
Abschließende	∞	4 °C	
Kühlung			

6.1.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Hierzu wurde der PCR-Ansatz mit 5 µl DNA-Probenpuffer (6x) versetzt und über ein 1 %iges Ethidiumbromid-Agarosegel bei 75 Volt aufgetrennt. Eine eindeutige Identifizierung des gewünschten PCR-Fragments

erfolgte über einen Höhenvergleich mit einer 100bp-DNA-Leiter. Die mittels UV-Licht sichtbar gemachten PCR-Produkte wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des Nucleospin Extract II Gelextraktions-Kits isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers, wobei die aufgereinigte DNA in 30 µl Elution-Puffer eluiert wurde.

6.1.3 Restriktion und Ligation

Die Integration der aufgereinigten PCR-Fragmente in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) erfolgte durch enzymatische Restriktion und Ligation. Hierbei werden die endständigen Restriktionssequenzen eines PCR-Produkts (vergleiche 6.1.1 Abb. 49 und 50, blau) sowie die äquivalenten Schnittstellen des Expressionsvektors durch enzymatischen Verdau mit dem gleichen Enzym freigesetzt. Durch die so entstehenden zueinander passenden Enden kann das PCR-Fragment mittels einer Ligase in die Vektorsequenz integriert werden. Um eine korrekte Orientierung des PCR-Fragments im Zielvektor zu gewährleisten, wurden in dieser Arbeit Schnittsequenzen zweier unterschiedlicher Restriktionsenzyme an die DNA-Fragmente fusioniert. In der Regel *HindIII* an das 5'-Ende in Kombination mit *XhoI* oder *EcoRI* am 3'-Ende des PCR-Fragments.

Zur Durchführung wurde das PCR-Produkt sowie der Zielvektor bei 37 °C über Nacht (PCR-Produkt) bzw. für 3 Stunden (Vektor) enzymatisch verdaut. Die jeweiligen Ansätze sind tabellarisch dargestellt:

Restriktionsverdau des PCR-Produkts	
30 µl	aufgereinigtes PCR-Fragment (Eluat der Agarosegelextraktion)
4 µl	10x BSA
4 µl	10x Restriktionsendonuklease-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuklease 1
1 µl	Restriktionsendonuklease 2

Restriktionsverdau des Zielvektors (Ansatz für 8 Ligationen)	
5 µl	pcDNA3.1/Zeo(+) (1 µg/µl)
4 µl	10x BSA
4 µl	10x Restriktionsendonuklease-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuklease 1
1 µl	Restriktionsendonuklease 2
25 µl	autoklaviertes Wasser

Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze für 20 min auf 65 °C erhitzt. Der durch den enzymatischen Verdau linearisierte Zielvektor wurde darüber hinaus wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben durch eine Agarosegel-Elektrophorese mit anschließender Gelextraktion aufgereinigt.

Die anschließende Ligation von verdautem PCR-Produkt und linearisiertem Vektor erfolgte 16 h bei 16 °C.

Ligations-Ansatz	
12 µl	PCR-Produkt (nach Restriktionsverdau)
5 µl	linearisierter Vektor
2 µl	10x T4-Ligase-Puffer
1 µl	T4-Ligase

Zur Inaktivierung der T4-Ligase wurde der Ansatz für 20 min auf 65 °C erhitzt.

6.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Da die zur Amplifikation rekombinanter Plasmid-DNA eingesetzten *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien über keine ausreichende natürliche Kompetenz (Fähigkeit Fremd-DNA aufzunehmen) verfügen, wurden sie zunächst chemisch transformationskompetent gemacht. Hierzu wurden *E.coli* Bakterien des Stammes DH5α mit Rubidiumchlorid behandelt, wodurch die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellmembran erhöht wird.

Zur Durchführung wurden 2 ml *Luria Broth* (LB)-Medium unter sterilen Bedingungen mit dem *E.coli*-Stamm DH5 α angeimpft und 16 h bei 37 °C kultiviert. Die Vorkultur wurde dann in 250 ml LB-Medium überführt und die Bakterien bis zum Erreichen einer OD600 zwischen 0,4 und 0,6 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD, üblicherweise nach 2 bis 3 Stunden, wurden die Bakterien bei 3750 rpm und 4 °C 5 min abzentrifugiert. Die entstandenen Bakterienpellets wurden in 100 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren der Bakterien (3750 rpm, 4 °C, 5 min) wurden diese in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert, 60 min auf Eis inkubiert und für die Lagerung bei -80 °C aliquotiert.

6.1.5 Transformation

Zur Transformation kompetenter DH5 α Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA wurden 100 μ l Bakteriensuspension mit 10 μ l des Ligations-Ansatzes (0) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Fremd-DNA in die Bakterienzellen wurde durch einen kurzzeitigen Hitzeschock (90 sec, 42 °C) initiiert. Die nun transformierten Bakterien wurden nach 5-minütiger Abkühlung auf Eis in 400 μ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) resuspendiert, auf Ampicillin-LB-Agarplatten ausgestrichen und circa 16 h bei 37 °C kultiviert.

6.1.6 DNA-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

6.1.6.1 *Präparation von neu klonierter Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)*

Im Anschluss an die Übernachtinkubation der transformierten *E.colis* wurden einzelne Klone mittels einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte entnommen, in je 5 ml Ampicillin-LB-Medium überführt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abzentrifugation der transformierten Bakterien (3750 rpm, 4 °C, 15 min) wurden die einzelnen Plasmid-Klone mit dem Nucleospin Plasmid Mini-Präparations Kit gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

Zur Identifizierung der erfolgreich transformierten Bakterien-Klone wurden Proben der durch Mini-Präparationen einem Kontrollverdau unterzogen. Hierfür wurden 3 µl Mini-Präparations-Eluat mit den bei der Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen 3 h bei 37 °C verdaut und die Freisetzung des integrierten PCR-Fragments mittels Agarose-Gelelektrophorese (wie unter 6.1.2 beschrieben) überprüft.

Kontrollverdau-Ansatz (1x)	
3 µl	Mini-Präparations-Eluat (aufgereinigte Plasmid-DNA) *
1 µl	10x BSA
4 µl	10x Restriktionsendonuklease-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuklease 1
1 µl	Restriktionsendonuklease 2
4,8 µl	autoklaviertes Wasser

* 3 µl bei einem Mini-Präparations-Eluat von 30 µl

Die Überprüfung der neu hergestellten DNA erfolgte mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz).

6.1.6.2 *Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab (Midi-Präparation)*

Zur Herstellung von Plasmid-DNA im größeren Maßstab wurde eine Transformation von 100 µl Bakteriensuspension mit 1 µg Plasmid-DNA wie oben beschrieben durchgeführt und die DNA mit dem Nucleobond Xtra Midi Kit gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Herstellung endotoxin-freier Plasmid-DNA wurde genauso verfahren, jedoch wurde die DNA mit dem Pure Link HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit isoliert.

6.1.7 Neu generierte Konstrukte

cDNA-Klone des menschlichen Somatostatins (Som) (Zugangsnummer bei der Gendatenbank Genbank: BC032625), des Thyrotropin-Releasing Hormons (TRH) (Genbank: BC074889) und des Gonadotropin-Releasing Hormons (Genbank: BC126463) wurden bei der Firma Imagenes bestellt (www.imagenes-bio.de). Alle in dieser Arbeit verwendeten Mutanten wurden mit Hilfe der oben beschriebenen PCR-Methoden generiert. GnRH Δ pro und GnRH Δ hor wurden durch Deletion der Aminosäuren (aa) 37-92 bzw. 24-33 erhalten. Som Δ pro fehlen die aa 25-88 und Som Δ hor die aa 89-116. Im Fall von Som Δ pro \rightarrow helix-syn wurde die Prodomäne von Somatostatin (aa 25-88) durch ein synthetisch hergestelltes Peptid ersetzt, welches aus zehn Wiederholungen der Aminosäureabfolge Glu-(Ala)₃-Lsy besteht und in Lösung eine α -helikale Struktur annimmt (Bhushan et al., 2010). Som Δ pro \rightarrow helix-PrP und Som Δ pro \rightarrow IDD-Sho entstanden durch die Fusion der aa 130-230 des Maus-Prion-Proteins (Maus-PrP, NCBI Referenz-Sequenz NP_035300.1) bzw. der aa 25-125 des menschlichen Shadoo-Proteins (NCBI Referenz-Sequenz NP_001012526.2) an Som Δ pro. Die Generierung von TRH Δ pro und TRH Δ hor erfolgte durch eine Deletion der aa 26-62 bzw. 63-99. Im Fall von TRH Δ pro \rightarrow proSom und TRH Δ pro \rightarrow helix-PrP wurde die Prodomäne von TRH (aa 26-62) durch die Prodomäne von Somatostatin (proSom, aa 25-88) bzw. die α -helikale Domäne des Maus-PrP (aa 173-219) ersetzt. Hierbei wurde die Aminosäure Asp an der Position 196 der PrP-Domäne durch die Aminosäure Gln ersetzt, um die zweite Glykosylierungsstelle in dieser Domäne zu deletieren. In TRH Δ pro \rightarrow IDD-PrP wurde die Prodomäne von TRH (aa 26-62) durch die intrinsisch unstrukturierte Domäne von Maus-PrP (aa 23-115) ausgetauscht. Hierbei wurden die Aminosäuren Trp und Asp an Position 31/32 durch die Aminosäuren Asp und Phe ersetzt, um eine Glykosylierungsstelle (N-F-T) einzufügen. Alle Δ SS-Mutanten wurden durch die Deletion der Aminosäuresequenz, ausgenommen des ersten Methionins, der ER-Signalsequenz (SS) hergestellt. Für eine Detektion der Konstrukte durch Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analyse wurden alle generierten Konstrukte mit einem C-terminalen V5-Tag (5'-ggg aaa ccg ata ccg aac cct ctg ctc ggt ctg gat agc acg-3') ausgestattet. Alle Konstrukte wurden für eine Expression in Säuger-Zellen in den pcDNA 3.1/Zeo+ Vektor inseriert.

6.2 Zellkultur

6.2.1 Zellkultivierung

Murine Neuroblastomzellen (N2a Zellen) wurden in Minimal Essential Medium (MEM-Medium) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin) und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Als Basismedium für humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y Zellen) diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Medium), versetzt mit 8 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen (N2a Zellen) oder 75 cm²-Zellkulturflaschen (SH-SY5Y Zellen) bei 37 °C und 5 % CO₂.

6.2.2 Zellpassagierung

Die N2a Zellen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:4 und 1:6 passagiert. SH-SY5Y Zellen wurden parallel im Verhältnis 1:20 und 1:30 gesplittet. Zur Passagierung wurden die adhärennten Zellen, nach Entnahme des Kulturmediums, zweimal mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; phosphate buffered saline) gewaschen und anschließend mit 0,5 µl Trypsin-Lösung (500 mg/L) vom Flaschenboden gelöst. Nach Aufnahme der Zellen in Vollmedium wurden diese in den oben angegebenen Verhältnissen in neue Kulturflaschen überführt. Hierfür wurden je 25 cm²-Flasche 7 ml und je 75 cm²-Flasche 15 ml frisches Medium vorgelegt.

6.2.3 Ausplattieren von Zellen

Ausplattieren von Zellen für eine Western-Blot-Analyse

Zur Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden Zellen, wie unter Punkt 6.2.2 erläutert, gewaschen und trypsinisiert. Die Anzahl der Zellen in der erhaltenen Zellsuspension wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt 5,5 x 10⁵ (N2a) beziehungsweise 5,0 x 10⁵ (SH-SY5Y) Zellen je 3,5 cm-Schale

ausplattiert. Die Zellsuspension wurde hierfür so verdünnt, dass die Zellzahl je Schale einem Volumen von 2 ml entsprach.

Ausplattieren von Zellen für eine Immunfluoreszenz-Analyse

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden 6-Well-Platten mit je einem sterilen 22 mm-Deckgläschen je Well vorbereitet und $4,5 \times 10^5$ SH-SY5Y Zellen je Well ausplattiert. Das Zellsuspensionsvolumen je Well betrug 2 ml.

6.2.4 Transfektion von Zellen

Transfektion mit Plasmid-DNA

Für eine transiente liposomale Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA wurden diese, wie in Punkt 6.2.3 erläutert, ausplattiert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte 20 bis 24 h später eine Transfektion mit dem lipidbasierten Transfektionsreagenz Lipofectamin. Hierzu wurden pro 3,5 cm-Schale die folgenden beiden Transfektions-Ansätze gemischt:

Transfektions-Ansatz 1		Transfektions-Ansatz 2	
100 µl	Opti-MEM	100 µl	Opti-MEM
1 µg	Plasmid-DNA	8 µl	Lipofectamin
6 µl	Plus-Reagenz		

Beide Ansätze wurden nach 15-minütiger Inkubation gemischt, erneut 15 min inkubiert und anschließend mit 800 µl Opti-MEM verdünnt.

Zwischenzeitlich wurden die Zellen zweimal mit Medium ohne Zusätze gewaschen und im Anschluss daran 2 h mit dem Transfektions-Gemisch inkubiert. Zur Minderung toxischer Effekte durch die Transfektion wurde das Transfektions-Gemisch nach 2 h abgenommen und durch Vollmedium ersetzt.

Reverse Transfektion mit siRNA in HeLa Zellen

Zum transienten *Gen-Knockdown* mittels RNA-Interferenz in HeLa Zellen wurden die Zellen, wie unter Punkt 6.2.2 beschrieben, trypsinisiert und auf eine Zelldichte von 780.000 Zellen pro 3,9 ml DMEM-Medium eingestellt. Desweiteren wurde je

Probe ein Ansatz aus 82 µl Opti-MEM, 20 nM siRNA und 20 µl HiPerFect 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gemeinsam mit 3,9 ml der eingestellten Zellsuspension in eine 6 cm-Zellkulturschale ausplattiert (Reverse Transfektion). 24 h später wurde die Transfektion mit siRNA wiederholt.

6.2.5 Zellernte

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen 24 h nach der Plasmid-Transfektion geerntet. Dazu wurden die Zellen jeder 3,5 cm-Kulturschale zweimal mit unsterilem PBS gewaschen, mit einem Zellheber vorsichtig abgeschabt und in je ein 1,5 ml Safe-Lock-Gefäß (Eppi) überführt. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 13.000 rpm für 15 sec wurde das überstehende PBS abgenommen und die Zellpellets entweder unmittelbar auf Eis weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 *In vitro* Transkription

Die Transkription der Konstrukte für den Vergleich der Translokation in Weizenkeim-Extrakt und Retikulozyten-Extrakt sowie für die Konstrukte des Targeting-Assays erfolgte separat mit Hilfe des AmpliScribe T7 High Yield Transcriptions-Kits nach Anweisung des Herstellers. Vektor-inserierte Konstrukte wurden vorher durch Zugabe eines geeigneten Restriktionsenzym, welches nach der zu transkribierenden DNA-Sequenz endet und entweder stumpfe oder 5' hervorstehende Enden produziert, linearisiert. Im Falle des verwendeten pcDNA 3.1/Zeo+ Vektors wurde das Xho1 Enzym gewählt. Für den Targeting-Assay wurden DNA-Matrizen mit Hilfe einer konventionellen PCR generiert, welche kein Stop-Codon besitzen. Hierbei wurde der T7-Promotor, gefolgt von einer 5' untranslatierten Region, welche eine hohe Transkriptions-Initiations-Effizienz garantiert, sowie ein optimiertes AUG-Umfeld in den 5' Vowärts-Primer inkorporiert (Beckmann et al., 2001). Nach Beendigung der Transkriptionsreaktion wurde die gewonnene RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Die in nuklease-freiem Wasser eluierte RNA wurde anschließend 1:20 verdünnt, 10 Minuten bei 65 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu lösen und in einer

1:1 Verdünnung mit 6x RNA Ladepuffer auf einem 1 % Agarosegel analysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte ebenfalls in einer 1:20 Verdünnung an einem Nanodrop-Gerät. Die RNA-Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die *in vitro* Transkription der ER-Imports-Analyse der Somatostatin-Konstrukte erfolgte in einem gekoppelten Transkriptions-/Translations-System nach Anweisung des Herstellers, wobei die Vektor-inserierten Matrizen nicht linearisiert wurden.

6.3.2 *In vitro* Translation, Translokation und PK-Protektion

Die *in vitro* Translation wurde entweder in einer Reaktion mit der Transkription mit Hilfe des TNT Quick Coupled Transcription/Translation Hasen- Retikulozyten-Systems durchgeführt oder separat in einem Hasen-Retikulozyten-Lysat oder einem Weizenkeim-Extrakt. Für die von der Transkription getrennte Translation wurde die in Punkt 0 gewonnene RNA mit nuklease-freiem Wasser auf 0,5 µg/µl verdünnt und bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert. Anschließend wurde die mRNA-Matrize in Anwesenheit von L-[35S]-Methionin und wenn angegeben in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen bei 30 °C (Reticulozyten-Lysat) oder 25 °C (Weizenkeim-Extrakt) für eine Stunde translatiert. Anschließend wurden die Translationsansätze 10 Minuten bei 13.000 rpm in einer konventionellen Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Mikrosomen-Pellets bzw. Rückstände des Translationsextraktes in Ansätzen ohne Mikrosomen wurden in 2xLSB mit β-ME resuspendiert und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Um den Import von Proteinen in die mikrosomalen Membranen zu analysieren, wurden die Proben vor Zugabe von LSB mit Proteinase K (PK) behandelt. Dafür wurden die Mikrosomen-Pellets bzw. Rückstände des Translationsextraktes in 25 µl eines mikrosomalen Resuspensionspuffers (MRB) gelöst und mit 0,5 mg/ml PK versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 mM PMSF gestoppt. Anschließend wurden die Proben mit 4xLSB mit β-ME versetzt und wie zuvor beschrieben erhitzt. Ein typischer Translationsansatz enthielt folgende Komponenten:

Reticulozyten-Lysat	μl	Weizenkeim-Extrakt	μl
Reticulozyten-Lysat	17,5	Weizenkeim-Extrakt	12,5
Aminosäure-Mix (ohne Methionin)	0,5	Aminosäure-Mix (ohne Methionin)	2
mRNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2	mRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5
Mikrosomen	1,5	Mikrosomen	1,5
L-[³⁵ S]-Methionin	1,5	L-[³⁵ S]Methionin	1,5
Wasser (nuklease-frei)	2	KOAc (100 mM)	2,5
	25		25

6.3.3 *In vitro* Targeting-Assay

Um die Bindung von Ribosomen-assoziierten naszierenden Polypeptidketten an mikrosomale Membranen zu untersuchen, wurden die in Punkt 6.3.1 beschriebenen mRNAs, welche kein Stop-Codon besitzen *in vitro* unter Verwendung eines Hasen-Reticulozyten-Lysats, mikrosomalen Membranen und L-[³⁵S] Methionine wie in Punkt 6.3.2 beschrieben translatiert. Die 'gestutzte' mRNA verhindert das Freisetzen der Polypeptidkette von der tRNA und führt damit zu einem '*Stalling*' der Polypeptidkette am Ribosom. Die TRH-Konstrukte wurden für 30 min bei 32 °C, die Som- und PrP-Konstrukte für 20 min bei 26 °C translatiert. Anschließend wurden die Proben über ein 50 μl Sucrose-Kissen (0,5 M Sucrose, 0,1 mM KOAc, 50 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM MgOAc) geschichtet und für 3 min bei 46.000 rpm und 4 °C in einem TLA55-Rotor zentrifugiert (Rutkowski et al., 2001). Diese Konditionen ermöglichen die Sedimentierung von mikrosomalen Membranen (und ihrer gebundenen Ribosomen-Polypeptidketten-Komplexe), jedoch nicht die von freien Ribosomen oder Polysomen. Sedimentiertes Material wurde einmal durch Zugabe von 50 μl des Sukrose-Kissens und erneuter Zentrifugation (wie oben) gewaschen. Sedimentierte naszierende Polypeptidketten wurden in MRB resuspendiert, nach Zugabe von 4x LSB mit β -Me für 5 min bei 95 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. In jedem Experiment wurden Translations-Reaktionen ohne Mikrosomen als interne Sedimentationskontrolle mitgeführt. Als spätere Quantifizierungskontrolle wurde pro Konstrukt ein Ansatz für 30 min bei 46.000 rpm

und 4 °C durch ein 100 µl Sucrose-Kissen zentrifugiert, um auch die nicht-membrangebundenen Polysomen zu sedimentieren.

6.3.4 Rekombinante Expression und Aufreinigung der Prodomäne von Somatostatin

Für die Aufreinigung der Somatostatin-Prodomäne wurde die cDNA der Aminosäurereste 25-88 des humanen Somatostatin-Gens in den bakteriellen Expressionsvektor pTXB1 inseriert und anschließend in *E.coli*-Zellen des Stammes BI21-DE3 exprimiert.

Dafür wurden die Zellen mit dem Konstrukt transfiziert, auf einer Platte mit Ampicillin ausplattiert und am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit Ampicillin mit einer vereinzelt Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur 1:100 in 2 Liter LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Die Protein-Expression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 3 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Nach der Induktionszeit wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 8.000 g für 15 min in einem Ja10-Rotor geerntet. Zum Einfrieren, wurde das Zellpellet in restlichem Überstand (ca. Hälfte des Zellpellet-Volumens) resuspendiert, Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 20 % hinzugefügt und zügig in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Zellpellet wurde über Nacht bei -80 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut, erneut abzentrifugiert und in Lysepuffer (7 ml per 2g Nassgewicht) supplementiert mit Protease-Inhibitor (1:500) resuspendiert und auf Eis sonifiziert. Das Lysat wurde bei 19.000 rpm in einem Ja-25.50-Rotor für 20 min zentrifugiert, um Zellrückstände zu pelletieren. Die His-markierten Proteine des Überstandes wurden mit Hilfe von NiNTA-Beads (Quiagen) aufgereinigt. Dafür wurden die Beads mit NPI-10-Puffer äquilibriert und anschließend das Lysat mit den Beads über Nacht bei 4 °C rotiert. Die Wasch- und Elutionsschritte wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden die Beads am nächsten Tag mit dem Lysat auf eine leere Polyprop-Säule transferiert und der Durchfluss aufgefangen (DF). Die Säule (1 ml) wurde mit 10 Säulenvolumen NPI-20-Puffergewaschen und der Durchfluss gesammelt (W1). Der Waschschrift wurde wiederholt (W2). Anschließend wurde 7 Säulenvolumen NPI-250-Puffer auf die geschlossene Säule gegeben und für 10 Minuten inkubiert. Die

an die NiNTA-Beads gebundenen Proteine wurden bei einer Flussrate von 1ml/min in separaten 1ml-Proben gesammelt (E1-E7). Die Eluatfraktionen wurden auf die Anwesenheit des Proteins geprüft und anschließend die Proteinfraktionen vereinigt, welche das Ziel-Protein enthielten. Im nächsten Schritt wurde das Eluat in einem Zentricon mit einer Abtrennung aller Moleküle <5 kDa aufkonzentriert und mit Abspaltungs-Puffer äquilibriert. Die Intein-Tag-Abspaltung erfolgte durch Zugabe von 30 mM DTT zum Abspaltungspuffer bei Raumtemperatur über Nacht (Anleitung IMPACT™-CN System, NEB). Die Proteine wurden mit Hilfe von Ammoniumsulfat gefällt. Dafür wurde der Probe unter Rühren bei 4 °C in kleinen Portionen über einen Zeitraum von 30 min feingemörstertes Ammoniumsulfat (1 g/2 ml) zugegeben und für ca. 30 min weitergerührt. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 31.100 rpm für 30 min bei 4 °C in einem Ti50-Rotor gefällt. Das Pellet wurde in 4 ml NPI-Puffer gelöst und mit 5 % Glycerol optional bei -80 °C eingefroren. Im nächsten Schritt wurde die Protein-Probe nochmals einer NiNTA-Aufreinigung unterzogen, um die durch DTT abgespaltene Somatostatin-Prodomäne von der His₆-Tag enthaltenen Intein-Domäne zu trennen. Der Bindungsschritt der Proteine an die NiNTA-Beads wurde diesmal für nur 20 min bei 4 °C durchgeführt. Der Durchfluss (4 Säulenvolumen) und ein Waschschrift (4 Säulenvolumen) wurde gesammelt, mit Hilfe eines Zentricons mit einer Abtrennung aller Moleküle <3 kDa aufkonzentriert und in NPI-Puffer äquilibriert. Die Proteinprobe wurde erneut mit Ammoniumsulfat präzipitiert und das Protein-Pellet anschließend in CD-Puffer mit 5 % Glycerol resuspendiert. Die Proteinfraktionen wurden auf einem SDS-PA-Gel nach Coomassie-Färbung analysiert.

Zuletzt wurde die Coomassie-gefärbte Bande der aufgereinigten Prodomäne von Somatostatin aus einem SDS-PA-Gel ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie-Analyse (LC-MS/MS) und mit Hilfe der Identifikationssoftware Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest/>) im Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) der LMU München (<http://proteinanalytik.web.med.uni-muenchen.de/>) verifiziert.

6.3.5 CD-Analyse

Um die Sekundärstruktur der rekombinant aufgereinigten Somatostatin-Prodomäne zu bestimmen, wurde die Proteinlösung mittels Fern-UV zirkulärem Dichroismus analysiert. Hierbei wurde eine Konzentration von 125 µg/ml des Proteins in CD-

Puffer mit 5 % Glycerol gewählt. Vor der Analyse wurde ausgeschlossen, dass ein Anteil von 5 % Glycerol einen Einfluss auf die Absorptionskurve hat. Die Messung wurde in einem Jasco J-810-Spectropolarimeter bei 26 °C in einer 2mm Küvette durchgeführt. Das Spektrum wurde in 1 nm-Intervallen von 260 nm bis 190 nm in Anwesenheit von 50 % Trifluoroethanol (TFE) aufgenommen. Die Berechnung des alpha-helikalen Anteils wurde mit Hilfe des Programmes ContinLL der CDPro Software (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>) durchgeführt. Für die Analyse wurde das Referenzset IBasis 4 benutzt.

6.3.6 Coomassie-Färbung

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel mit Coomassie-Lösung bedeckt und darin ca. 1 Stunde geschüttelt. Anschließend wurde das Gel mit destilliertem Wasser gewaschen und zur weiteren Entfärbung in Entfärberlösung geschüttelt, bis die Protein-Banden vor dem Hintergrund deutlich sichtbar wurden.

6.3.7 Western Blot Analyse

6.3.7.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die geernteten Zellen wie folgt behandelt: Je nach Größe des Zellpellets wurden die Zellen in 150 - 180 µl Lysepuffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert, wobei sie zwischendurch mehrmals gevortext wurden. Anschließend wurden 5 µl Zelllysate zur Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe unten) entnommen, dem restlichen Lysat Laemmli-Probenpuffer (4x) zugesetzt und die Probe 5 min bei 95 °C denaturiert. Um die genomische DNA zu scheren und somit die Viskosität der Probe für eine erleichterte Weiterverarbeitung zu verringern, wurde das noch heiße Zelllysate mehrmals mit einer 1 ml-Einmalspritze durch eine 21G-Sterican-Kanüle gezogen. Die so erhaltenen Proben wurden bis zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot bei -20 °C gelagert.

6.3.7.2 Gewinnung des postnukleären Überstandes

Um die Löslichkeit von Proteinen in Detergentien zu untersuchen, wurden die Zellen nach Zugabe von 150 - 180 µl Lysepuffer für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend kurz gevortext. Anschließend wurden die Lysate für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (postnukleär) abgenommen und mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Pelletfraktion wurde ebenfalls mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und anschließend mehrmals mit einer 1 ml-Einmalspritze durch eine 21G-Sterican-Kanüle gezogen, um die genomische DNA bzw. restliche Zelltrümmer zu scheren. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und mittels Western Blot analysiert. Von Proteinen, welche sich größtenteils in der löslichen Fraktion (postnukleärer Überstand, PNS) befanden, wurde in Folgeexperimenten lediglich der PNS und nicht das Gesamtzell-Lysat hergestellt.

6.3.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Um zu gewährleisten, dass die mittels Western Blot analysierten Proben quantitativ vergleichbar sind, wurde die Proteinkonzentration der Lysate mit dem Bio-Rad Protein Assay gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Unterschiede in den Proteinkonzentrationen wurden durch Anpassung der auf die SDS-PAGE-Gele geladenen Lysatmengen ausgeglichen.

6.3.6.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli

Die Proteine im Zelllysat wurden mittels eindimensionaler diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli analysiert (Laemmli, 1970). Hierfür wurden SDS-Gele mit einem 4 %igen Polyacrylamid-Sammelgel und einem 12-18 %igen Polyacrylamid-Trenngel hergestellt. Die Polyacrylamid-Konzentration des Trenngels wurde je nach Größe des zu untersuchenden Proteins gewählt. Die

Gelelektrophorese wurde bei 150-220 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt.

Alle TRH-Konstrukte wurden mit dieser Methode in einem 12 %igen Gel aufgetrennt. Auch die Auftrennung der bakteriellen, periplasmatischen Konstrukte und der rekombinant exprimierten, isolierten Somatostatin-Prodomäne erfolgten anhand dieses Gelsystems (15 % bzw. 18 %iges Gel).

6.3.6.5 Schägger-Gele

Anhand der Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow können Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa analysiert werden (Schagger and von Jagow, 1987). Das SDS-Gel besteht aus einem 4 %igen Polyacrylamid-Sammelgel und einem Trenngel, das sich aus zwei Schichten zusammensetzt: die untere Schicht mit 16,5 % Polyacrylamid und die obere Schicht mit 10 % Polyacrylamid. Die Gelelektrophorese wurde bei 80-120 V in einer Bio-Rad-Kammer durchgeführt.

Alle GnRH und Somatostatin - Konstrukte (außer die rekombinant-exprimierte, isolierte Somatostatin-Prodomäne) wurden anhand dieses Gelsystems aufgetrennt.

6.3.6.6 Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot)

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE nach Laemmli oder Schägger wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran mit der Porengröße 0,45 µm transferiert. Hierbei wurden je nach SDS-PAGE-Methode folgende Parameter verwendet.

Nach Laemmli: 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 1000 mA

Nach Schägger: 45-60 min bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA

6.3.6.7 Ponceau-Färbung

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosemembran für 1-2 min mit dem roten Azofarbstoff Ponceau S gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Durch

diese reversible Anfärbung der Proteine ist es möglich Qualität und Effizienz des Proteintransfers zu kontrollieren.

6.3.6.8 Immundetektion

Der Nachweis einzelner Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgte durch Immundetektion. Hierzu wurde die Membran zunächst 1 h bei Raumtemperatur in PBS-T mit 5 % Magermilchpulver geschwenkt und so unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Anschließend wurde dreimal für je 10 min mit PBS-T gewaschen und die Membran für 16 h bei 4 °C, in einer Verdünnung eines Erstantikörpers gegen das zu analysierende Protein geschwenkt. Am folgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal für je 10 min mit PBS-T gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*; HRP)-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert.

6.3.6.9 Visualisierung und Quantifizierung

Zur Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz wurde die abgetrocknete Nitrocellulosemembran entweder 1 min mit dem ECL Reagenz von Amersham oder, bei schwachen Signalen, 5 min mit dem Chemilumineszenz-Reagenz Immobilon inkubiert. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch das Auflegen von Röntgenfilmen in unterschiedlich langen Expositionszeiten.

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinsignale wurde die Membran mit dem Chemilumineszenzmesser Fujifilm LAS-4000 vermessen und die Signale unter Verwendung der *Multi Gauge* Software von Fujifilm ausgewertet.

Radioaktive Signale wurden mit Hilfe des *Typhoon-Imaging* Systems in Kombination mit der *Image Quant TL* Software quantifiziert.

6.3.8 Spezielle Proteinanalytik

6.3.8.1 Nachweis der Sekretion

Die von Zellen sekretierten Proteine wurden mittels TCA-Fällung im Medium nachgewiesen. Hierfür wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und 3 h bei 37 °C in serumfreiem Medium inkubiert. Nach Inkubation wurde das Medium abgenommen, 15 sec bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der zellfreie Überstand in ein neues Probengefäß überführt. Die sekretierten Proteine im Medium wurden mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Hierfür wurde das Medium mit TCA (Endkonzentration 5 %) versetzt, 10-20 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit Aceton gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in Laemmli-Proben-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C gekocht. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und mit Laemmli-Proben-Puffer gekocht. Die Proteine im Zelllysate (L) oder im Medium (M) wurden mittels Western Blot analysiert.

6.3.8.2 Nachweis des proteasomalen Abbaus von Proteinen

Um nachzuweisen, dass ein untersuchtes Protein einem proteasomalen Abbau unterliegt, wurde das Proteasom durch Behandlung der Zellen mit MG132 reversibel inhibiert. Hierfür wurden Zellen zunächst wie oben beschrieben in 3,5 cm-Schalen ausplattiert und transfiziert. 20 - 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen 3 h vor dem Ernten mit 30 µM MG132 (gelöst in DMSO) oder dem gleichen Volumen DMSO (Kontrolle) inkubiert. Ein aufgrund des gehemmten Abbaus auftretendes verstärktes Proteinsignal wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot ermittelt.

6.3.8.3 Deglykosylierung von Proteinen

Zur enzymatischen Deglykosylierung der Proteine wurden Gesamtzell-Lysate nach Angaben des Herstellers mit 2 Einheiten N-Glykosidase F (PNGase F) für 2 h bei

37 °C inkubiert. Kontrollproben wurden ohne Zusatz von PNGase F inkubiert. Nach der Deglykosylierung wurde allen Proben 4x-Laemmli-Probenpuffer zugesetzt und diese mittels Western Blot analysiert.

6.3.8.4 *Digitonin-Solubilisierungs-Assay*

Transient-transfizierte N2a-Zellen wurden wie in Punkt 6.2.5 beschrieben geerntet und anschließend in Transport-Puffer mit Protease-Inhibitor (1:500) resuspendiert. Die Plasmamembran wurde durch Zugabe von 0,004 % Digitonin für 5 min auf Eis selektiv permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Proben für 30 min bei 100.000 g in einem TLA-55 Rotor zentrifugiert. Überstand- und Pelletfraktion wurden getrennt. Das Pellet wurde in Lyse-Puffer (0,5 % Tx/DOC) resuspendiert. Parallel wurden Zellen nach der Ernte wie gewohnt in Lysepuffer ohne Digitonin resuspendiert. Anschließend wurden äquivalente Volumina von Tx/DOC-lysierten Zellen und der Pellet- bzw. cytosolischen Fraktion Digitonin-permeabilisierter Zellen mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse unter Verwendung des monoklonalen anti-V5-Antikörpers analysiert.

6.3.8.5 *Radioaktive Markierung von Proteinen mit L-[35S]Methionin*

6.3.8.5.1 Säuger-Zellen

N2a Zellen wurden wie oben erläutert ausplattiert und transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Medium ohne Zusätze gewaschen und 30 min in Methionin-freiem MEM-Medium inkubiert. Um die Proteine anschließend radioaktiv zu markieren wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl Methionin-freies MEM-Medium mit 300 µCi/ml L-[35S]Methionin ersetzt. Nach 15 min wurden die Zellen entweder geerntet (*Pulse*-Proben) oder für 1 h mit 500 µl unmarkiertem Vollmedium bei 37 °C inkubiert (*Chase*-Proben). Die geernteten Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert und nach 5-minütiger Inkubation auf Eis für 20 min bei 15.000 g zentrifugiert. Aus der detergenzlöslichen Fraktion (Überstand) wurden die transfizierten Konstrukte mittels Immunpräzipitation (IP) unter Verwendung des

monoklonalen Antikörpers V5 und Protein G Sepharose-Beads über Nacht bei 4 °C nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) aufgereinigt. Zur Bestimmung der Sekretion wurden die transfizierten Konstrukte nach dem gleichen IP-Protokoll aus dem *Chase*-Medium immunpräzipitiert. Die weitere Analyse der radioaktiv markierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Nach der Elektrophorese wurden die SDS-PAGE-Gele 30 min in Fixierlösung geschwenkt und anschließend 30 min mit Amplify inkubiert. Zur Trocknung der Gele wurden diese auf zwei Whatman-Papiere gelegt, mit Klarsichtfolie bedeckt und bei 72 °C für 80 min unter Vakuum erhitzt. Die Visualisierung der radioaktiv markierten Proteine erfolgte durch Autoradiographie.

Wenn angezeigt, wurden die Zellen für die gesamte Dauer des Experiments in Medium versetzt mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (30 µM) kultiviert.

6.3.8.5.2 Bakterien

Für die Analyse der periplasmatischen Lokalisation wurden die zu untersuchenden PrP-Konstrukte in einen bakteriellen Expressionsvektor hinter eine periplasmatische Leader-Sequenz, in diesem Falle die der Pektat-Lyase B (*pelB*), inseriert.

Um die Expression, einen möglicherweise schnellen Abbau der Konstrukte und deren periplasmatische Lokalisation zu analysieren, wurde ein klassisches *Pulse-Chase*-Experiment durchgeführt. Hierfür wurde ein für die Protein-Expression optimierter *E. coli*-Stamm (BI21-DE3-RIL) mit den entsprechenden Konstrukten transformiert und auf einer LB-Platte ausplattiert. Diese wurde neben Kanamycin (Selektion des Expressionsvektors) mit Chloramphenikol supplementiert, um das *t*-Plamid, welches verschiedene Kopien von seltenen tRNA-Genen enthält, zu selektieren (siehe Anleitung „BL21-CodonPlus® Competent Cells“ von Stratagene).

Um die Bakterien heranzuziehen, wurden je 10 ml Minimalmedium M9 mit einzelnen Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Das Minimalmedium wurde dabei mit allen essentiellen Aminosäuren und Vitaminen (Vollmedium), Methionin (25 µg/ml), Chloramphenikol (1:1000) und Kanamycin (1:1000) versetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Übernacht-Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in 10 ml Medium ohne Antibiotika verdünnt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7 wurden die Zellen je einer 2 ml-Kultur zweimal mit Vollmedium ohne Methionin (Hungermedium) gewaschen und anschließend in 2 ml Hungermedium resuspendiert. Die Kulturen

wurden mit 1 mM IPTG induziert und 20 min bei 37 °C geschüttelt. Nach der Induktionszeit wurden je 70 µCi L-[³⁵S]Methionin pro Kultur zugegeben und für eine Minute geschüttelt (*Pulse*, nach (Wiegert et al., 1997)). Pro 2 ml-Kultur wurden 52 µl Chase-Lösung (20 mg/ml L-Methionin und 100 µg/ml Puromycin) zugegeben und nach 5, 10 und 30 min 500 µl-Proben der Kultur entnommen. Die Zell-Proben wurden über Nacht mit TCA präzipitiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 15.000 g und 4 °C für 20 min pelletiert und anschließend zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Die Zellpellets wurden für 5 min bei 95 °C getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 30 µl Lyse-Puffer bei 95 °C für 5 min lysiert. Jeder Probe wurden 970 µl Solubilisierungspuffer versetzt mit Protease-Inhibitor (1:500) hinzugefügt. Die Proben wurden erneut für 20 min bei 15.000 g zentrifugiert, um restliche Zellbestandteile zu pelletieren. Protein A Sepharose-Beads wurden zweimal mit Solubilisierungspuffer gewaschen, zu dem Überstand gegeben und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads bei 13.000 rpm kurz abzentrifugiert und der Überstand mit Sarkosyl versetzt (Endkonzentration 20 %). Die Proteine wurden durch Zugabe von 2 µl des monoklonalen Antikörpers 3F4, welcher eine Tag-Sequenz innerhalb der unstrukturierten PrP-Domäne erkennt bzw. des polyklonalen Antikörpers A7, welcher im Bereich des strukturierten C-Terminus von PrP bindet, über Nacht bei 4 °C in einem Überkopf-Schwenker präzipitiert. Am nächsten Tag wurden pro Ansatz 50 µl gewaschene Protein A Sepharose-Beads zugegeben und für weitere 1,5 Stunden bei 4 °C rotiert. Die Beads wurden zweimal mit Solubilisierungspuffer mit Sarkosyl und als letztes einmal mit Solubilisierungspuffer ohne Sarkosyl gewaschen. Zum Schluß wurden die Beads mit 60 µl 2xLSB mit β-Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die Proteine von den Beads zu lösen. Die Beads wurden kurz abzentrifugiert und der gesamte Überstand wurde auf ein 15 %iges SDS-PA-Gel geladen. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurden die Proteine mittels Audiographie detektiert. Für die Isolierung der periplasmatischen Protein-Fraktion wurden parallel von jedem Zeitpunkt zusätzliche Chase-Proben entnommen, die Zellen pelletiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellen in dem restlichen Überstand resuspendiert und nach Zugabe von 15 µl Chloroform 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit 75 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 versetzt und bei 12.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (nach dem pET System Manual von Novagen, 4. Edition, 1994). Der Überstand wurde mit Solubilisierungspuffer verdünnt, mit Protein A Sepharose-Beads vorinkubiert und

anschließend mit den Antikörpern 3F4 oder A7 über Nacht immunpräzipitiert. Die weitere Behandlung der Periplasma-Proben erfolgte wie im oberen Abschnitt für die Gesamtllysate der Zellen beschrieben.

6.3.8.6 Immunfluoreszenz-Analyse

Zur Proteinanalyse mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden Zellen auf Deckgläschen (Cover slips) ausplattiert und 24 h später mit Plasmid-DNA transfiziert (siehe Punkt 6.2.4). 20 h – 24 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen zweimal in PBS mit Calcium und Magnesium (PBS +/+) gewaschen und mit 3,7 %iger Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläschen mit PBS ohne Calcium und Magnesium (PBS -/-), wurden die Zellen 10 min mit 0,2 % Triton X-100 (in PBS-/-) permeabilisiert und erneut dreimal mit PBS-/- gewaschen. (Zur ausschließlichen Detektion von Proteinen an der Plasmamembran wurden nicht-permeabilisierte Zellen analysiert und in diesen Fällen die Behandlung mit Triton X-100 weggelassen). Nach dem Waschen wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer umgesetzt und unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit Blockierungspuffer (5 % Pferdeserum in PBS -/- mit 0,1 % Tween-20) bei Raumtemperatur gesättigt. Sofern nicht anderweitig erläutert, wurden die Deckgläschen im Anschluß 1 h bei 37 °C mit Erstantikörper inkubiert, dann dreimal mit PBS -/- gewaschen und anschließend 1 h mit einem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Zweitantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS (-/-) wurde jedes Deckgläschen kurz durch Wasser gezogen, überschüssiges Wasser mit einem Papiertuch abgezogen und die Zellen mit 40 µl Mowiol (+ 1 µg/ml DAPI) auf einem Objektträger eingebettet. Die Visualisierung der Proteine erfolgte nach 24-stündiger Aushärtung des Einbettungsmediums bei Raumtemperatur an dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) unter der Verwendung der LSM Image Browser Software (Zeiss). Zum Nachweis der Lokalisation der transfizierten Proteine im sekretorischen Biosyntheseweg, wurde parallel eine Fluoreszenz-Markierung des endogenen Golgi-Markers Giantin durchgeführt. Zum Nachweis der Lokalisation der transfizierten Proteine im Mitochondrium, wurden die Mitochondrien

zusätzlich vor der Fixierung 30 min bei 37 °C mit dem membranpotential-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red CMXRos (1: 10.000) angefärbt.

6.3.8.7 SEC61A1-Knockdown mittels RNA-Interferenz

Zur transienten Hemmung der Genexpression (*Gen-Knockdown*) von SEC61A1 mittels RNA-Interferenz wurden HeLa Zellen, wie unter Punkt 6.2.4 genau beschrieben, mit Sec61a1-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert (Lang et al., 2012).

Für den *Knockdown* wurden die Zellen 12 h nach der zweiten siRNA-Transfektion mit Plasmid-DNA transfiziert. Die DNA-Transfektion wurde mit dem Transfektions-Reagenz FuGene, gemäß dem Protokoll des Herstellers Promega durchgeführt. Die weitere Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz erfolgte 60 h nach Ausplattieren der Zellen.

6.3.8.8 Bioinformatische Analysen

Für die Vorhersage von sekretorischen Proteinen, wurde das Programm SignalP 3.0 verwendet, welches die Proteine anhand ihrer N-terminalen Signalsequenz erkennt (Bendtsen et al., 2004) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0>). SignalP 3.0 kann die Signalsequenzen durch zwei unterschiedliche Algorithmen vorhersagen: durch *Hidden Markov* Modelle oder sogenannte „neurale Netzwerke“. In der hier dargestellten Analyse wurde die Präsenz einer Signalsequenz nur als eindeutig definiert, wenn diese mittels beider Ansätze festgestellt werden konnte. Intrinsisch unstrukturierte Protein mit einem >70 % Anteil an unstrukturierten Elementen wurden mit Hilfe der *in silico* Programme für die Vorhersage von unstrukturierten Proteinen POODLE-W (Shimizu et al., 2007) (<http://mbs.cbrc.jp/poodle/help-w.html>), IUPred (Dosztanyi et al., 2005) (<http://iupred.enzim.hu>) und RONN 3.1 (Yang et al., 2005) (<http://www.strubi.ox.ac.uk/RONN>) identifiziert. Die Sekundärstruktur-Vorhersage der Proteine wurde mit Hilfe des Vorhersage-Programmes JPred durchgeführt (Cole et al., 2008) (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>). Insgesamt wurden alle 20.331 menschlichen Proteinsequenzen der Swiss-Prot Datenbank analysiert, welche im August 2009 freigegeben wurden.

Die ER-SS von Som, Sho und APP wurden mit dem Programm TargetP analysiert (Emanuelsson et al., 2007) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Das Sequenz-Alignment wurde mit dem Programm Clustal-X durchgeführt (Larkin et al., 2007) (<http://www.clustal.org/clustal2/>). Das potentielle Motif wurde mit bereits bekannten Motiven der MeMotif Datenbank verglichen (<http://projects.biotec.tu-dresden.de/memotif>). Die *Helical Wheel*-Analyse wurde nach Don Armstrong und Raphael Zidovetzki durchgeführt (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi?sequence=ABCDEFGHIJKLMNPO&submit=Submit>). Die Hydrophobizität der ER-SS wurde nach Kyte und Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982) und die Polarität nach Grantham (Grantham, 1974) bestimmt (<http://web.expasy.org/protscale/>). Der GRAVY (*Grand average of hydropathicity*)-Wert wurde mit Hilfe des Protparam-Tools des ExPASy-Servers errechnet (Kyte and Doolittle, 1982) (<http://web.expasy.org/protparam/>).

6.3.8.9 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit gezeigten Quantifizierungen basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Die Signifikanz der Analysen wurde mit dem Verfahren des Studentischen t-Tests ermittelt. Die hierbei verwendeten P-Werte waren: ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

7 Bibliographie

- Afshar, N., Black, B.E., and Paschal, B.M. (2005). Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol. *Mol Cell Biol* 25, 8844-8853.
- Allison, D.S., and Schatz, G. (1986). Artificial mitochondrial presequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9011-9015.
- Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Mullick, J., Sepuri, N.B., Otvos, L., Pain, D., and Avadhani, N.G. (1999). Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at ser128. *Embo J* 18, 5494-5504.
- Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Robin, M.A., and Avadhani, N.G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* 161, 41-54.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
- Ast, T., Cohen, G., and Schuldiner, M. (2013). A network of cytosolic factors targets SRP-independent proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 152, 1134-1145.
- Bahari, L., Parlitz, R., Eitan, A., Stjepanovic, G., Bochkareva, E.S., Sinning, I., and Bibi, E. (2007). Membrane targeting of ribosomes and their release require distinct and separable functions of FtsY. *J Biol Chem* 282, 32168-32175.
- Barnett, P. (2003). Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine* 20, 255-264.
- Bartels, T., Ahlstrom, L.S., Leftin, A., Kamp, F., Haass, C., Brown, M.F., and Beyer, K. (2010). The N-terminus of the intrinsically disordered protein alpha-synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophys J* 99, 2116-2124.
- Beckmann, R., Spahn, C.M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P.A., Sali, A., Frank, J., and Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* 107, 361-372.
- Beilharz, T., Egan, B., Silver, P.A., Hofmann, K., and Lithgow, T. (2003). Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 8219-8223.
- Belin, D., Bost, S., Vassalli, J.D., and Strub, K. (1996). A two-step recognition of signal sequences determines the translocation efficiency of proteins. *Embo J* 15, 468-478.
- Ben-Menachem, R., Tal, M., Shadur, T., and Pines, O. (2011). A third of the yeast mitochondrial proteome is dual localized: a question of evolution. *Proteomics* 11, 4468-4476.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology* 340, 783-795.

- Benedix, J., Lajoie, P., Jaiswal, H., Burgard, C., Greiner, M., Zimmermann, R., Rospert, S., Snapp, E.L., and Dudek, J. (2010). BiP modulates the affinity of its co-chaperone ERj1 for ribosomes. *J Biol Chem* **285**, 36427-36433.
- Berndt, U., Oellerer, S., Zhang, Y., Johnson, A.E., and Rospert, S. (2009). A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1398-1403.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332.
- Bhagwat, S.V., Biswas, G., Anandatheerthavarada, H.K., Addya, S., Pandak, W., and Avadhani, N.G. (1999). Dual targeting property of the N-terminal signal sequence of P4501A1. Targeting of heterologous proteins to endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* **274**, 24014-24022.
- Bhushan, S., Gartmann, M., Halic, M., Armache, J.P., Jarasch, A., Mielke, T., Berninghausen, O., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2010). alpha-Helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 313-317.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1496-1500.
- Braakman, I., and Bulleid, N.J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **80**, 71-99.
- Brakch, N., Galanopoulou, A.S., Patel, Y.C., Boileau, G., and Seidah, N.G. (1995). Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett* **362**, 143-146.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Makarow, M., and Borgese, N. (2006). Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J Cell Biol* **175**, 767-777.
- Brodsky, J.L., and Skach, W.R. (2011). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Current opinion in cell biology* **23**, 464-475.
- Buchberger, A., Bukau, B., and Sommer, T. (2010). Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell* **40**, 238-252.
- Bundgaard, J.R., and Rehfeld, J.F. (2008). Distinct linkage between post-translational processing and differential secretion of progastrin derivatives in endocrine cells. *J Biol Chem* **283**, 4014-4021.
- Chakrabarti, O., and Hegde, R.S. (2009). Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration. *Cell* **137**, 1136-1147.
- Chakrabarti, O., Rane, N.S., and Hegde, R.S. (2011). Cytosolic aggregates perturb the degradation of nontranslocated secretory and membrane proteins. *Mol Biol Cell* **22**, 1625-1637.
- Chang, D.Y., Newitt, J.A., Hsu, K., Bernstein, H.D., and Maraia, R.J. (1997). A highly conserved nucleotide in the Alu domain of SRP RNA mediates translation arrest through high affinity binding to SRP9/14. *Nucleic Acids Res* **25**, 1117-1122.

- Chavali, G.B., Nagpal, S., Majumdar, S.S., Singh, O., and Salunke, D.M. (1997). Helix-loop-helix motif in GnRH associated peptide is critical for negative regulation of prolactin secretion. *Journal of molecular biology* 272, 731-740.
- Chen, Y.G., Danoff, A., and Shields, D. (1995). The propeptide of anglerfish preprosomatostatin-I rescues prosomatostatin-II from intracellular degradation. *J Biol Chem* 270, 18598-18605.
- Cheng, Z., and Gilmore, R. (2006). Slow translocon gating causes cytosolic exposure of transmembrane and luminal domains during membrane protein integration. *Nat Struct Mol Biol* 13, 930-936.
- Chuck, S.L., and Lingappa, V.R. (1993). Analysis of a pause transfer sequence from apolipoprotein B. *J Biol Chem* 268, 22794-22801.
- Claessen, J.H., Kundrat, L., and Ploegh, H.L. (2012). Protein quality control in the ER: balancing the ubiquitin checkbook. *Trends Cell Biol* 22, 22-32.
- Cole, C., Barber, J.D., and Barton, G.J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 36, W197-201.
- Conticello, S.G., Kowalsman, N.D., Jacobsen, C., Yudkovsky, G., Sato, K., Elazar, Z., Petersen, C.M., Aronheim, A., and Fainzilber, M. (2003). The prodomain of a secreted hydrophobic mini-protein facilitates its export from the endoplasmic reticulum by hitchhiking on sorting receptors. *J Biol Chem* 278, 26311-26314.
- Daniel, C.J., Conti, B., Johnson, A.E., and Skach, W.R. (2008). Control of translocation through the Sec61 translocon by nascent polypeptide structure within the ribosome. *J Biol Chem* 283, 20864-20873.
- Danpure, C.J. (1995). How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? *Trends in cell biology* 5, 230-238.
- Daude, N., Ng, V., Watts, J.C., Genovesi, S., Glaves, J.P., Wohlgemuth, S., Schmitt-Ulms, G., Young, H., McLaurin, J., Fraser, P.E., *et al.* (2010). Wild-type Shadoo proteins convert to amyloid-like forms under native conditions. *J Neurochem* 113, 92-104.
- Dawson, R., Muller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H., and Buchner, J. (2003). The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *Journal of molecular biology* 332, 1131-1141.
- Day, N.C., Lin, H., Ueda, Y., Meador-Woodruff, J.H., and Akil, H. (1993). Characterization of pro-opiomelanocortin processing in heterologous neuronal cells that express PC2 mRNA. *Neuropeptides* 24, 253-262.
- de Leeuw, E., te Kaat, K., Moser, C., Menestrina, G., Demel, R., de Kruijff, B., Oudega, B., Luirink, J., and Sinning, I. (2000). Anionic phospholipids are involved in membrane association of FtsY and stimulate its GTPase activity. *Embo J* 19, 531-541.
- del Alamo, M., Hogan, D.J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P.O., and Frydman, J. (2011). Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol* 9, e1001100.
- Deriziotis, P., Andre, R., Smith, D.M., Goold, R., Kinghorn, K.J., Kristiansen, M., Nathan, J.A., Rosenzweig, R., Krutauz, D., Glickman, M.H., *et al.* (2011). Misfolded

PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry. *Embo J* 30, 3065-3077.

Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A., and Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805.

Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., and Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349, 806-808.

Devaraneni, P.K., Conti, B., Matsumura, Y., Yang, Z., Johnson, A.E., and Skach, W.R. (2011). Stepwise insertion and inversion of a type II signal anchor sequence in the ribosome-Sec61 translocon complex. *Cell* 146, 134-147.

Devi, L., and Anandatheerthavarada, H.K. (2010). Mitochondrial trafficking of APP and alpha synuclein: Relevance to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802, 11-19.

Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 26, 9057-9068.

Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13452-13457.

Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 3433-3434.

Dosztanyi, Z., Meszaros, B., and Simon, I. (2010). Bioinformatical approaches to characterize intrinsically disordered/unstructured proteins. *Brief Bioinform* 11, 225-243.

Driessen, A.J., Manting, E.H., and van der Does, C. (2001). The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol* 8, 492-498.

Driessen, A.J., and Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77, 643-667.

Dudek, J., Greiner, M., Muller, A., Hendershot, L.M., Kopsch, K., Nastainczyk, W., and Zimmermann, R. (2005). ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1008-1014.

Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., and Obradovic, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41, 6573-6582.

Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., *et al.* (2001). Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19, 26-59.

Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C., and Brown, C.J. (2000). Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome informatics Workshop on Genome Informatics* 11, 161-171.

- Dunker, A.K., Oldfield, C.J., Meng, J., Romero, P., Yang, J.Y., Chen, J.W., Vacic, V., Obradovic, Z., and Uversky, V.N. (2008). The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* 9 *Suppl 2*, S1.
- Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2002). Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol* 12, 54-60.
- Eipper, B.A., Stoffers, D.A., and Mains, R.E. (1992). The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu Rev Neurosci* 15, 57-85.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191.
- Ellis, R.J. (2001). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* 26, 597-604.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2, 953-971.
- Evans, E.A., Gilmore, R., and Blobel, G. (1986). Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 581-585.
- Fink, A.L. (2005). Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol* 15, 35-41.
- Flaugh, S.L., and Lumb, K.J. (2001). Effects of macromolecular crowding on the intrinsically disordered proteins c-Fos and p27(Kip1). *Biomacromolecules* 2, 538-540.
- Fons, R.D., Bogert, B.A., and Hegde, R.S. (2003a). Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* 160, 529-539.
- Fons, R.D., Bogert, B.A., and Hegde, R.S. (2003b). Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* 160, 529-539.
- Fujita, H., Kida, Y., Hagiwara, M., Morimoto, F., and Sakaguchi, M. (2010). Positive charges of translocating polypeptide chain retrieve an upstream marginal hydrophobic segment from the endoplasmic reticulum lumen to the translocon. *Mol Biol Cell* 21, 2045-2056.
- Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., and Walter, P. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a013169.
- George, R., Beddoe, T., Landl, K., and Lithgow, T. (1998). The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2296-2301.
- Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10, 465-472.
- Goder, V., Crottet, P., and Spiess, M. (2000). In vivo kinetics of protein targeting to the endoplasmic reticulum determined by site-specific phosphorylation. *Embo J* 19, 6704-6712.
- Gorlich, D., and Rapoport, T.A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, 615-630.

- Grantham, R. (1974). Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* *185*, 862-864.
- Greenfield, N., and Fasman, G.D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* *8*, 4108-4116.
- Groenendyk, J., and Michalak, M. (2005). Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* *52*, 381-395.
- Hagiwara, M., and Nagata, K. (2012). Redox-dependent protein quality control in the endoplasmic reticulum: folding to degradation. *Antioxid Redox Signal* *16*, 1119-1128.
- Halic, M., and Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* *15*, 116-125.
- Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M.R., Sinning, I., and Beckmann, R. (2006). Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science* *312*, 745-747.
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M., and Johnson, A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* *92*, 747-758.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* *166*, 557-580.
- Harris, A.R., Christianson, D., Smith, M.S., Fang, S.L., Braverman, L.E., and Vagenakis, A.G. (1978). The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. *The Journal of clinical investigation* *61*, 441-448.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* *475*, 324-332.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* *295*, 1852-1858.
- He, B., Wang, K., Liu, Y., Xue, B., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2009). Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview. *Cell Res* *19*, 929-949.
- Hebert, D.N., Bernasconi, R., and Molinari, M. (2010). ERAD substrates: which way out? *Semin Cell Dev Biol* *21*, 526-532.
- Hegde, R.S., and Bernstein, H.D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends in biochemical sciences* *31*, 563-571.
- Hegde, R.S., and Kang, S.W. (2008). The concept of translocational regulation. *J Cell Biol* *182*, 225-232.
- Hegde, R.S., and Keenan, R.J. (2011). Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 787-798.
- Hegde, R.S., and Lingappa, V.R. (1996). Sequence-specific alteration of the ribosome-membrane junction exposes nascent secretory proteins to the cytosol. *Cell* *85*, 217-228.
- Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Lingappa, V.R. (1998a). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* *279*, 827-834.

- Hegde, R.S., and Ploegh, H.L. (2010). Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology* 22, 437-446.
- Hegde, R.S., Voigt, S., Rapoport, T.A., and Lingappa, V.R. (1998b). TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* 92, 621-631.
- Heske, J., Heller, U., Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2004). The C-terminal domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 5435-5443.
- Hessa, T., Sharma, A., Mariappan, M., Eshleman, H.D., Gutierrez, E., and Hegde, R.S. (2011). Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature* 475, 394-397.
- Hirsch, C., Blom, D., and Ploegh, H.L. (2003). A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *Embo J* 22, 1036-1046.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Iakoucheva, L.M., Brown, C.J., Lawson, J.D., Obradovic, Z., and Dunker, A.K. (2002). Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *Journal of molecular biology* 323, 573-584.
- James, T.L., Liu, H., Ulyanov, N.B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D.G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S.B., *et al.* (1997). Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10086-10091.
- Johnson, A.E., and van Waes, M.A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annual review of cell and developmental biology* 15, 799-842.
- Johnson, N., Vilardi, F., Lang, S., Leznicki, P., Zimmermann, R., and High, S. (2012). TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *J Cell Sci* 125, 3612-3620.
- Jungnickel, B., and Rapoport, T.A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 82, 261-270.
- Kaderbhai, N.N., Ahmed, K., and Kaderbhai, M.A. (2010). Export of a hyperexpressed mammalian globular cytochrome b5 precursor in *Escherichia coli* is dramatically affected by the nature of the amino acid flanking the secretory signal sequence cleavage bond. *Protein Sci* 19, 1344-1353.
- Kaiser, C.A., Preuss, D., Grisafi, P., and Botstein, D. (1987). Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase. *Science* 235, 312-317.
- Kalbfleisch, T., Cambon, A., and Wattenberg, B.W. (2007). A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic* 8, 1687-1694.
- Kalies, K.U., Gorlich, D., and Rapoport, T.A. (1994). Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol* 126, 925-934.
- Kang, S.W., Rane, N.S., Kim, S.J., Garrison, J.L., Taunton, J., and Hegde, R.S. (2006). Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* 127, 999-1013.

- Karniely, S., and Pines, O. (2005). Single translation--dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO reports* 6, 420-425.
- Kasczak, R.J., Rubenstein, R., Merz, P.A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R.I., Wisniewski, H.M., and Diringer, H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol* 61, 3688-3693.
- Katiyar, S., Joshi, S., and Lennarz, W.J. (2005). The retrotranslocation protein Derlin-1 binds peptide:N-glycanase to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 16, 4584-4594.
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., and Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 160, 53-64.
- Khan, A.R., and James, M.N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* 7, 815-836.
- Kim, S.J., and Hegde, R.S. (2002). Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel. *Mol Biol Cell* 13, 3775-3786.
- Kim, S.J., Mitra, D., Salerno, J.R., and Hegde, R.S. (2002). Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner. *Dev Cell* 2, 207-217.
- Kizer, J.S., and Tropsha, A. (1991). A motif found in propeptides and prohormones that may target them to secretory vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 174, 586-592.
- Kjeldsen, T., Andersen, A.S., Hach, M., Diers, I., Nikolajsen, J., and Markussen, J. (1998). alpha-Factor pro-peptide N-linked oligosaccharides facilitate secretion of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and applied biochemistry* 27 (Pt 2), 109-115.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* 157, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakkaraju, A.K., Thankappan, R., Mary, C., Garrison, J.L., Taunton, J., and Strub, K. (2012). Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell* 23, 2712-2722.
- Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S.V., Schorr, S., Schirra, C., Schauble, N., Jalal, C., Greiner, M., Hassdenteufel, S., Tatzelt, J., *et al.* (2012). Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci* 125, 1958-1969.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23, 2947-2948.
- Lee, H.C., and Bernstein, H.D. (2001). The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3471-3476.
- Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2006). Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron* 52, 33-38.

- Lemire, B.D., Fankhauser, C., Baker, A., and Schatz, G. (1989). The mitochondrial targeting function of randomly generated peptide sequences correlates with predicted helical amphiphilicity. *J Biol Chem* 264, 20206-20215.
- Leung, P.C., Cheng, C.K., and Zhu, X.M. (2003). Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol* 202, 145-153.
- Li, P., Beckwith, J., and Inouye, H. (1988). Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7685-7689.
- Liao, S., Lin, J., Do, H., and Johnson, A.E. (1997). Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* 90, 31-41.
- Lin, P.J., Jongsma, C.G., Liao, S., and Johnson, A.E. (2011a). Transmembrane segments of nascent polytopic membrane proteins control cytosol/ER targeting during membrane integration. *J Cell Biol* 195, 41-54.
- Lin, P.J., Jongsma, C.G., Pool, M.R., and Johnson, A.E. (2011b). Polytopic membrane protein folding at L17 in the ribosome tunnel initiates cyclical changes at the translocon. *J Cell Biol* 195, 55-70.
- Lopez, C.D., Yost, C.S., Prusiner, S.B., Myers, R.M., and Lingappa, V.R. (1990). Unusual topogenic sequence directs prion protein biogenesis. *Science* 248, 226-229.
- Luidens, M.K., Figge, J., Breese, K., and Vajda, S. (1996). Predicted and trifluoroethanol-induced alpha-helicity of polypeptides. *Biopolymers* 39, 367-376.
- Luirink, J., and Sinning, I. (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* 1694, 17-35.
- Ma, J., Wollmann, R., and Lindquist, S. (2002a). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298, 1781-1785.
- Ma, J., Wollmann, R., and Lindquist, S. (2002b). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298, 1781-1785.
- Maier, T., Ferbitz, L., Deuerling, E., and Ban, N. (2005). A cradle for new proteins: trigger factor at the ribosome. *Curr Opin Struct Biol* 15, 204-212.
- Maji, S.K., Perrin, M.H., Sawaya, M.R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R.A., Singru, P.S., Nilsson, K.P., Simon, R., Schubert, D., *et al.* (2009). Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325, 328-332.
- Mandon, E.C., Jiang, Y., and Gilmore, R. (2003). Dual recognition of the ribosome and the signal recognition particle by the SRP receptor during protein targeting to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 162, 575-585.
- Mariappan, M., Li, X., Stefanovic, S., Sharma, A., Mateja, A., Keenan, R.J., and Hegde, R.S. (2010). A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* 466, 1120-1124.
- Mariappan, M., Mateja, A., Dobosz, M., Bove, E., Hegde, R.S., and Keenan, R.J. (2011). The mechanism of membrane-associated steps in tail-anchored protein insertion. *Nature* 477, 61-66.

- Mateja, A., Szlachcic, A., Downing, M.E., Dobosz, M., Mariappan, M., Hegde, R.S., and Keenan, R.J. (2009). The structural basis of tail-anchored membrane protein recognition by Get3. *Nature* **461**, 361-366.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**, 766-772.
- Meyer, H.A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.U., and Hartmann, E. (2000). Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* **275**, 14550-14557.
- Miesbauer, M., Pfeiffer, N.V., Rambold, A.S., Muller, V., Kiachopoulos, S., Winkhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2009). Alpha-helical domains promote translocation of intrinsically disordered polypeptides into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **284**, 24384-24393.
- Miyazaki, E., Kida, Y., Mihara, K., and Sakaguchi, M. (2005). Switching the sorting mode of membrane proteins from cotranslational endoplasmic reticulum targeting to posttranslational mitochondrial import. *Mol Biol Cell* **16**, 1788-1799.
- Moller, I., Jung, M., Beatrix, B., Levy, R., Kreibich, G., Zimmermann, R., Wiedmann, M., and Luring, B. (1998). A general mechanism for regulation of access to the translocon: competition for a membrane attachment site on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13425-13430.
- Mulcahy, L.R., Vaslet, C.A., and Nilni, E.A. (2005). Prohormone-convertase 1 processing enhances post-Golgi sorting of prothyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *J Biol Chem* **280**, 39818-39826.
- Muller, G., and 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.
- Muller, M., Koch, H.G., Beck, K., and Schafer, U. (2001). Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**, 107-157.
- Nakahara, D.H., Lingappa, V.R., and Chuck, S.L. (1994). Translocational pausing is a common step in the biogenesis of unconventional integral membrane and secretory proteins. *J Biol Chem* **269**, 7617-7622.
- Nakatsukasa, K., and Brodsky, J.L. (2008). The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* **9**, 861-870.
- Netzer, W.J., and Hartl, F.U. (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**, 343-349.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**, 863-917.
- Ng, D.T., Brown, J.D., and Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**, 269-278.
- Ngosuwana, J., Wang, N.M., Fung, K.L., and Chirico, W.J. (2003). Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **278**, 7034-7042.
- Ni, L., Heard, T.S., and Weiner, H. (1999). In vivo mitochondrial import. A comparison of leader sequence charge and structural relationships with the in vitro

- model resulting in evidence for co-translational import. *J Biol Chem* 274, 12685-12691.
- Nillni, E.A. (2010). Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front Neuroendocrinol* 31, 134-156.
- Nouwen, N., Berrelkamp, G., and Driessen, A.J. (2009). Charged amino acids in a preprotein inhibit SecA-dependent protein translocation. *Journal of molecular biology* 386, 1000-1010.
- Oldfield, C.J., Cheng, Y., Cortese, M.S., Brown, C.J., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2005). Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochemistry* 44, 1989-2000.
- Oldfield, C.J., Meng, J., Yang, J.Y., Yang, M.Q., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2008). Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics* 9 *Suppl 1*, S1.
- Omura, T. (1998). Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. *J Biochem* 123, 1010-1016.
- Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E.A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H.P., Goodman, A.G., Harant, H., Garrison, J.L., *et al.* (2006). Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* 126, 727-739.
- Pace, C.N., and Scholtz, J.M. (1998). A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys J* 75, 422-427.
- Park, E., and Rapoport, T.A. (2012). Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys* 41, 21-40.
- Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Current opinion in cell biology* 13, 349-355.
- Perello, M., and Nillni, E.A. (2007). The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (proTRH). *Front Biosci* 12, 3554-3565.
- Perello, M., Stuart, R., and Nillni, E.A. (2008). Prothyrotropin-releasing hormone targets its processing products to different vesicles of the secretory pathway. *J Biol Chem* 283, 19936-19947.
- Petrova, K., Oyadomari, S., Hendershot, L.M., and Ron, D. (2008). Regulated association of misfolded endoplasmic reticulum luminal proteins with P58/DNAJc3. *Embo J* 27, 2862-2872.
- Pfanner, N., and Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 339-349.
- Pfeiffer, N.V., Dirndorfer, D., Lang, S., Resenberger, U.K., Restelli, L.M., Hemion, C., Miesbauer, M., Frank, S., Neutzner, A., Zimmermann, R., *et al.* (2013). Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria. *EMBO J* 32, 1036-1051.
- Plutner, H., Davidson, H.W., Saraste, J., and Balch, W.E. (1992). Morphological analysis of protein transport from the ER to Golgi membranes in digitonin-

permeabilized cells: role of the P58 containing compartment. *The Journal of cell biology* 119, 1097-1116.

Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K.U., Diamant, N., and Bar-Nun, S. (2002). AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* 22, 626-634.

Rambold, A.S., Miesbauer, M., Rapaport, D., Bartke, T., Baier, M., Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2006a). Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* 17, 3356-3368.

Rambold, A.S., Miesbauer, M., Rapaport, D., Bartke, T., Baier, M., Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2006b). Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* 17, 3356-3368.

Rane, N.S., Kang, S.W., Chakrabarti, O., Feigenbaum, L., and Hegde, R.S. (2008). Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration. *Dev Cell* 15, 359-370.

Rane, N.S., Yonkovich, J.L., and Hegde, R.S. (2004). Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *EMBO J* 23, 4550-4559.

Rangaraju, N.S., and Harris, R.B. (1993). GAP-releasing enzyme is a member of the pro-hormone convertase family of precursor protein processing enzymes. *Life Sci* 52, 147-153.

Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663-669.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382, 180-182.

Roise, D., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H., and Schatz, G. (1986). A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers. *Embo J* 5, 1327-1334.

Romero, A., Cakir, I., Vaslet, C.A., Stuart, R.C., Lansari, O., Lucero, H.A., and Nillni, E.A. (2008). Role of a pro-sequence in the secretory pathway of prothyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 283, 31438-31448.

Romisch, K. (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci* 112 (Pt 23), 4185-4191.

Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.

Rutkowski, D.T., Kang, S.W., Goodman, A.G., Garrison, J.L., Taunton, J., Katze, M.G., Kaufman, R.J., and Hegde, R.S. (2007). The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 18, 3681-3691.

Rutkowski, D.T., Lingappa, V.R., and Hegde, R.S. (2001). Substrate-specific regulation of the ribosome- translocon junction by N-terminal signal sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7823-7828.

Rutkowski, D.T., Ott, C.M., Polansky, J.R., and Lingappa, V.R. (2003). Signal sequences initiate the pathway of maturation in the endoplasmic reticulum lumen. *J Biol Chem* 278, 30365-30372.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakaguchi, M., Tomiyoshi, R., Kuroiwa, T., Mihara, K., and Omura, T. (1992). Functions of signal and signal-anchor sequences are determined by the balance between the hydrophobic segment and the N-terminal charge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 16-19.
- Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.
- Samson, W.K., Zhang, J.V., Avsian-Kretchmer, O., Cui, K., Yosten, G.L., Klein, C., Lyu, R.M., Wang, Y.X., Chen, X.Q., Yang, J., *et al.* (2008). Neuronostatin encoded by the somatostatin gene regulates neuronal, cardiovascular, and metabolic functions. *J Biol Chem* 283, 31949-31959.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schauble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, O., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., *et al.* (2012). BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *Embo J* 31, 3282-3296.
- Schierle, C.F., Berkmen, M., Huber, D., Kumamoto, C., Boyd, D., and Beckwith, J. (2003). The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the Escherichia coli periplasm via the signal recognition particle pathway. *J Bacteriol* 185, 5706-5713.
- Schmitt, L., and Tampe, R. (2002). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 12, 754-760.
- Sevarino, K.A., Stork, P., Ventimiglia, R., Mandel, G., and Goodman, R.H. (1989). Amino-terminal sequences of prosomatostatin direct intracellular targeting but not processing specificity. *Cell* 57, 11-19.
- Shaffer, K.L., Sharma, A., Snapp, E.L., and Hegde, R.S. (2005). Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function. *Dev Cell* 9, 545-554.
- Shan, S.O., Stroud, R.M., and Walter, P. (2004). Mechanism of association and reciprocal activation of two GTPases. *PLoS Biol* 2, e320.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2011a). A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell* 147, 1576-1588.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2011b). Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 25-56.
- Shimizu, K., Muraoka, Y., Hirose, S., Tomii, K., and Noguchi, T. (2007). Predicting mostly disordered proteins by using structure-unknown protein data. *BMC bioinformatics* 8, 78.
- Siler, T.M., VandenBerg, G., Yen, S.S., Brazeau, P., Vale, W., and Guillemin, R. (1973). Inhibition of growth hormone release in humans by somatostatin. *J Clin Endocrinol Metab* 37, 632-634.
- Singh, N., Zanusso, G., Chen, S.G., Fujioka, H., Richardson, S., Gambetti, P., and Petersen, R.B. (1997). Prion protein aggregation reverted by low temperature in

- transfected cells carrying a prion protein gene mutation. *J Biol Chem* 272, 28461-28470.
- Skach, W.R. (2009). Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nat Struct Mol Biol* 16, 606-612.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., and Mireau, H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* 38, 265-277.
- Stefanovic, S., and Hegde, R.S. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128, 1147-1159.
- Steiner, D.F. (1998). The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 2, 31-39.
- Stoller, T.J., and Shields, D. (1989). The propeptide of preprosomatostatin mediates intracellular transport and secretion of alpha-globin from mammalian cells. *J Cell Biol* 108, 1647-1655.
- Struyve, M., Bosch, D., Visser, J., and Tommassen, J. (1993). Effect of different positively charged amino acids, C-terminally of the signal peptidase cleavage site, on the translocation kinetics of a precursor protein in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 109, 173-178.
- Suter, U., Heymach, J.V., Jr., and Shooter, E.M. (1991). Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *Embo J* 10, 2395-2400.
- Suzuki, T., Park, H., Kitajima, K., and Lennarz, W.J. (1998). Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide: N-glycanase activity. *J Biol Chem* 273, 21526-21530.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7, 880-885.
- Thie, H., Schirrmann, T., Paschke, M., Dubel, S., and Hust, M. (2008). SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in *E. coli*. *N Biotechnol* 25, 49-54.
- Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766.
- Timsit, Y., Acosta, Z., Allemand, F., Chiaruttini, C., and Springer, M. (2009). The role of disordered ribosomal protein extensions in the early steps of eubacterial 50 S ribosomal subunit assembly. *Int J Mol Sci* 10, 817-834.
- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* 27, 527-533.
- Tompa, P. (2005). The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* 579, 3346-3354.
- Tompa, P., and Kovacs, D. (2010). Intrinsically disordered chaperones in plants and animals. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 88, 167-174.
- Trueman, S.F., Mandon, E.C., and Gilmore, R. (2012). A gating motif in the translocation channel sets the hydrophobicity threshold for signal sequence function. *J Cell Biol* 199, 907-918.

- Tsai, F.C., and Sherman, J.C. (1993). Circular dichroism analysis of a synthetic peptide corresponding to the alpha, alpha-corner motif of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* *196*, 435-439.
- Uversky, V.N. (2009). Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Front Biosci* *14*, 5188-5238.
- Uversky, V.N., Gillespie, J.R., and Fink, A.L. (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* *41*, 415-427.
- Uversky, V.N., Oldfield, C.J., Midic, U., Xie, H., Xue, B., Vucetic, S., Iakoucheva, L.M., Obradovic, Z., and Dunker, A.K. (2009). Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases. *BMC Genomics* *10 Suppl 1*, S7.
- Valent, Q.A., de Gier, J.W., von Heijne, G., Kendall, D.A., ten Hagen-Jongman, C.M., Oudega, B., and Luirink, J. (1997). Nascent membrane and presecretory proteins synthesized in *Escherichia coli* associate with signal recognition particle and trigger factor. *Mol Microbiol* *25*, 53-64.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* *427*, 36-44.
- van Grondelle, W., Iglesias, C.L., Coll, E., Artzner, F., Paternostre, M., Lacombe, F., Cardus, M., Martinez, G., Montes, M., Cherif-Cheikh, R., *et al.* (2007). Spontaneous fibrillation of the native neuropeptide hormone Somatostatin-14. *Journal of structural biology* *160*, 211-223.
- Vembar, S.S., and Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 944-957.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* *68*, 1015-1068.
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E., and Rapoport, T.A. (1996a). Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* *134*, 25-35.
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E., and Rapoport, T.A. (1996b). Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* *134*, 25-35.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *Journal of molecular biology* *184*, 99-105.
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J* *5*, 1335-1342.
- von Heijne, G., and Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* *174*, 671-678.
- Wang, Q., Liu, Y., Soetandyo, N., Baek, K., Hegde, R., and Ye, Y. (2011). A ubiquitin ligase-associated chaperone holdase maintains polypeptides in soluble states for proteasome degradation. *Mol Cell* *42*, 758-770.
- Wang, S., Sakai, H., and Wiedmann, M. (1995). NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J Cell Biol* *130*, 519-528.

- Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., and Jones, D.T. (2004). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *Journal of molecular biology* 337, 635-645.
- Watts, J.C., Drisaldi, B., Ng, V., Yang, J., Strome, B., Horne, P., Sy, M.S., Yoong, L., Young, R., Mastrangelo, P., *et al.* (2007). The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J* 26, 4038-4050.
- Wetsel, W.C., Liposits, Z., Seidah, N.G., and Collins, S. (1995). Expression of candidate pro-GnRH processing enzymes in rat hypothalamus and an immortalized hypothalamic neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 62, 166-177.
- Whitley, P., Nilsson, I., and Vonheijne, G. (1996a). A Nascent Secretory Protein May Traverse the Ribosome Endoplasmic Reticulum Translocase Complex As an Extended Chain. *J Biol Chem* 271, 6241-6244.
- Whitley, P., Nilsson, I.M., and von Heijne, G. (1996b). A nascent secretory protein may traverse the ribosome/endoplasmic reticulum translocase complex as an extended chain. *J Biol Chem* 271, 6241-6244.
- Wickner, W., and Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* 310, 1452-1456.
- Wiedemann, N., Frazier, A.E., and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* 279, 14473-14476.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A., and Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370, 434-440.
- Wiegert, T., Sahm, H., and Sprenger, G.A. (1997). Expression of the *Zymomonas mobilis* gfo gene or NADP-containing glucose:fructose oxidoreductase (GFOR) in *Escherichia coli*. Formation of enzymatically active preGFOR but lack of processing into a stable periplasmic protein. *Eur J Biochem* 244, 107-112.
- Wild, K., Halic, M., Sinning, I., and Beckmann, R. (2004). SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1049-1053.
- Winklhofer, K.F., Heske, J., Heller, U., Reintjes, A., Muranji, W., Moarefi, I., and Tatzelt, J. (2003). Determinants of the in vivo-folding of the prion protein: a bipartite function of helix 1 in folding and aggregation. *J Biol Chem* 278, 14961-14970.
- Woolhead, C.A., McCormick, P.J., and Johnson, A.E. (2004). Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell* 116, 725-736.
- Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology* 293, 321-331.
- Wright, P.E., and Dyson, H.J. (2009). Linking folding and binding. *Curr Opin Struct Biol* 19, 31-38.
- Yamaguchi, J., Conlon, D.M., Liang, J.J., Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (2006). Translocation efficiency of apolipoprotein B is determined by the presence of beta-sheet domains, not pause transfer sequences. *J Biol Chem* 281, 27063-27071.
- Yang, Z.R., Thomson, R., McNeil, P., and Esnouf, R.M. (2005). RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 3369-3376.

- Ye, Y. (2006). Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *Journal of structural biology* 156, 29-40.
- Yogev, O., and Pines, O. (2011). Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochim Biophys Acta* 1808, 1012-1020.
- Yoon, M.K., Mitrea, D.M., Ou, L., and Kriwacki, R.W. (2012). Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. *Biochemical Society transactions* 40, 981-988.
- Zhang, X., Rashid, R., Wang, K., and Shan, S.O. (2010). Sequential checkpoints govern substrate selection during cotranslational protein targeting. *Science* 328, 757-760.
- Zhang, Y., Berndt, U., Golz, H., Tais, A., Oellerer, S., Wolfle, T., Fitzke, E., and Rospert, S. (2012). NAC functions as a modulator of SRP during the early steps of protein targeting to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 23, 3027-3040.
- Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M., and Helms, V. (2011). Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1808, 912-924.
- Zimmermann, R., Muller, L., and Wullich, B. (2006). Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Trends in molecular medicine* 12, 567-573.
- Zimmermann, R., Sagstetter, M., and Schlenstedt, G. (1990a). Ribonucleoparticle-independent import of proteins into mammalian microsomes involves a membrane protein which is sensitive to chemical alkylation. *Biochimie* 72, 95-101.
- Zimmermann, R., Zimmermann, M., Wiech, H., Schlenstedt, G., Muller, G., Morel, F., Klappa, P., Jung, C., and Cobet, W.W. (1990b). Ribonucleoparticle-independent transport of proteins into mammalian microsomes. *J Bioenerg Biomembr* 22, 711-723.

8 Abkürzungsverzeichnis

APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APS	Ammoniumperoxidsulfat
aa	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	<i>Heavy Chain- <u>B</u>inding <u>P</u>rotein</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i><u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumin</i>)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DMEM	<i><u>D</u>ulbecco´s <u>M</u>odified <u>E</u>agle <u>M</u>edium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i><u>E</u>nhances <u>C</u>hemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Protein-Degradierung
ERj1	ER-residentes J-Domänen-Protein (<i><u>ER</u>-resident <u>J</u>-domain protein <u>1</u></i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i><u>F</u>etal <u>C</u>alf <u>S</u>erum</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HD	Hydrophobe Domäne
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i><u>H</u>orse<u>R</u>adish <u>P</u>eroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschock-Protein
IUP	Intrinsisch unstrukturiertes Protein
IUR	Intrinsisch unstrukturierte Region

Abkürzungsverzeichnis

KOAc	Kaliumacetat
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ - Ionenkonzentration
PK	Proteinase K
PrP	Prion-Protein
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo]-2,7- naphthalendisulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNC	Komplex aus Ribosom und naszierender Polypeptidkette (<i>Ribosome Nascent chain Complex</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sho	Shadoo
Som	Prä-Pro-Somatostatin
SS	Signalsequenz
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne

TRAM	Mit der translozierenden Polypeptidkette assoziiertes Membranprotein (<i><u>T</u>ranslocating chain-<u>A</u>ssociated <u>M</u>embrane protein</i>)
TRAP	Translokon-assoziiertes-Protein (<i><u>T</u>Ranslocon-<u>A</u>ssociated <u>P</u>rotein</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tx	Triton X-100
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine (<i><u>U</u>nfolded <u>P</u>rotein <u>R</u>esponse</i>)
WT	Wildtyp

Gewichts- und andere Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System benannt. Aminosäuren wurden nach dem Dreibuchstaben-Code bezeichnet.

9 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Dirndorfer, D., Seidel, R.P., Nimrod, G., Miesbauer, M., Ben-Tal, N., Engelhard, M., Zimmermann, R., Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2013). The alpha-helical structure of prodomains promotes translocation of intrinsically disordered neuropeptide hormones into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*.

Pfeiffer, N.V., **Dirndorfer, D.**, Lang, S., Resenberger, U.K., Restelli, L.M., Hemion, C., Miesbauer, M., Frank, S., Neutzner, A., Zimmermann, R., *et al.* (2013). Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria. *EMBO J* 32, 1036-1051.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden internationalen Konferenzen vorgestellt:

Gordon Research Conference: *Protein Transport Across Cell Membranes*; Galveston, Texas, März 2012

Thema des Vortrages und Titel des Posters: "Alpha-helical structure of prodomains is a major determinant for translocation of peptide hormones into the endoplasmic reticulum"

Cell Symposia Mitochondria: *from Signalling to Disease*; Lissabon, Portugal, Mai 2013

Titel des Posters: "Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria"

Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Jörg Tatzelt für die Betreuung dieser Arbeit, das spannende Projekt und für die stetige wissenschaftliche Unterstützung danken. Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Konstanze Winklhofer für die bereitwillige Übernahme der Fachvertretung dieser Arbeit und die vielen hilfreichen Anregungen als Mitglied meines TAC-Komitees.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Ulrich Hartl für die anregenden Diskussionen während der TAC-Meetings bedanken. Ich danke Prof. Dr. Ulrich Hartl und Prof. Dr. Richard Zimmermann außerdem für die bereitwillige Zustimmung Teil meiner Prüfungskommission zu sein. Prof. Dr. Richard Zimmermann und seiner Arbeitsgruppe danke ich zudem für die gute und sehr angenehme Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Christian Haass für sein Interesse und die wissenschaftliche Unterstützung bedanken. Dank gilt ebenso dem gesamten Lehrstuhl der Stoffwechselbiologie für die Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Hierbei möchte ich mich besonders bei Brigitte Nuscher für ihre Unterstützung bei den ersten CD-Messungen bedanken.

Insbesondere möchte mich bei Dr. Ralf Seidel und Prof. Dr. Martin Engelhard für die fachliche und experimentelle Unterstützung bei der Proteinreinigung sowie den CD-Analysen bedanken. Zudem danke ich Prof. Dr. Nir Ben-Tal und Guy Nimrod für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der proteomweiten, bioinformatischen Analysen.

Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in der Zeit meiner Doktorarbeit im Labor begleitet haben. Allen voran danke ich Dr. Natalie Pfeiffer und Dr. Ulrike Resenberger für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihre immer offenen Ohren innerhalb und außerhalb des Labors. Dr. Natalie Pfeiffer danke ich zudem für die Zeit der Zusammenarbeit an ihrem interessanten Projekt und ihre Unterstützung in dieser Hinsicht. Ich danke auch Vignesh, Viktoria, Maria P., Caro, Kathrin, Anna, Maria F., Melania, Elisa und Sina für die fachliche und außerfachliche Unterstützung in dieser Zeit. Ich möchte hier auch gerne Veronika Müller für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und Dr. Margit Miesbauer für ihre Vorarbeiten hinsichtlich meines Projekts danken. Ich möchte hier auch ein weiteres Mal Gülcin danken und demjenigen, der es ermöglicht hat,

dass sich unsere Wege in der Schillerstr. 44 einmal mehr kreuzten. Mein großer Dank gilt Mara, Melania und Alessio, die durch ihren italienischen Charme einige Tage gerettet haben. Ich danke im Besonderen Dr. Alessio Colombo für die gemeinsamen, späten Mittagessen und die dabei entstandenen guten Gespräche. Ich möchte hier auch Dr. Peer-Hendrik Kuhn für seine permanente fachliche Unterstützung danken.

Nicht zuletzt möchte ich einigen Leuten danken ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Hiermit möchte ich meinen Freunden danken, die in der schönen, aber teilweise auch sehr stressigen Zeit für mich da waren. Ich möchte hier besonders meiner Freundin Kathrin danken, die mich mit ihrem Humor und Einfallsreichtum in einigen aufregenden Zeiten meiner Doktorarbeit sehr unterstützt hat. Ich möchte mich auch bei meinem Freund Alex für die stetige Unterstützung und die vielen guten Tipps im Bezug auf das „Doktorarbeitsleben“ danken. Ich danke Alex und meiner persönlichen „Word“-Fachkompetenz Christoph für die bereitwillige Korrektur dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich auf meinem Weg bis hierher begleitet, mich in all meinen Entscheidungen unterstützt und mir in jeder Lebensphase Rückhalt gegeben hat.