

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik B

(Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Klinische Infektiologie)

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hartmut Schmidt -

Etablierung eines Zellkulturmodells, um molekulare und zelluläre Effekte der Sec61 α 1R236C Mutation, die mit polyzystischer Lebererkrankung assoziiert ist, zu untersuchen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Krader, Jana Kristina

aus Prien am Chiemsee

- 2021 -

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Frank Ulrich Müller

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Hartmut Schmidt

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Michael Krahn

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2021

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik B
(Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Klinische Infektiologie)
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hartmut Schmidt -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hartmut Schmidt
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Michael Krahn

Zusammenfassung

Etablierung eines Zellkulturmodells, um molekulare und zelluläre Effekte der Sec61 α 1R236C Mutation, die mit polyzystischer Lebererkrankung assoziiert ist, zu untersuchen

Krader, Jana Kristina

Eine polyzystische Lebererkrankung steht in Verbindung mit drei verschiedenen Krankheitsentitäten. Diese umfassen wiederum eine Gruppe heterogener Mutationen, die mit der Ätiologie einer polyzystischen Leber assoziiert sind. Diese Arbeit erweitert die Gruppe der polyzystischen Leber assoziierten Genmutationen, um eine neu entdeckte Variante (R236) des endoplasmatischen Membranproteins Sec61 α 1, die bei der Indexpatientin vorgefunden wurde. Die Variante R236C stellte sich mit einem ausgeprägten hepatischen Zystenbefund in der Indexpatientin vor und repräsentiert eine heterozygote *missense*-Mutation im Exon 8 des Sec61A1-Gens. Sec61A1 kodiert für die gleichnamige α -Untereinheit des Sec61-Translokonskomplexes. Sec61 α 1 ist ein essenzielles Protein des Komplexes, das u.a. den zentralen Proteintranslokationskanal zur Überwindung der Membran des endoplasmatischen Retikulums für Proteine des sekretorischen Weges bildet. In dieser Arbeit werden die Grundlagen zur molekularen Analyse der Mutation Sec61 α 1R236C im Hinblick auf die hepatische Zystogenese geschaffen. Dazu werden Methoden zur Detektion des Proteins etabliert. Außerdem werden verschiedene Expressionsvektoren getestet, die zur stabilen Expression von Sec61 α 1R236C führen sollen. Die Ergebnisse lassen erste Rückschlüsse auf eine Pathologie der Mutante ziehen und bieten ein Ausgangsmodell zur genaueren Analyse der zellulären und molekularen Auswirkungen von Sec61 α 1R236C.

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2021

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

**Etablierung eines Zellkulturmodells, um molekulare und zelluläre Effekte der
Sec61 α 1R236C Mutation, die mit polyzystischer Lebererkrankung assoziiert ist, zu
untersuchen**

in der Arbeitsgruppe Zibert/Schmidt, Medizinische Klinik B, Universitätsklinikum Münster

unter Anleitung von

Univ.-Prof. Dr. Hartmut Schmidt und Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael Krahn

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Jana Kristina Krader

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Polyzystische Lebererkrankung.....	1
1.1.1 Entitäten	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.3 Epidemiologie	4
1.1.4 Diagnose	5
1.1.5 Klinik.....	5
1.1.6 Therapie	5
1.2 Sec61 α 1	6
1.2.1 Aufbau	6
1.2.2 Funktionen.....	7
1.2.3 Sec61 α 1-Kanalopathien.....	10
1.2.4 Die Mutation Sec61 α 1R236C.....	11
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	13
2 Materialien	14
2.1 Geräte	14
2.2 Laborbedarf	15
2.3 Chemikalien.....	17
2.4 Puffer und Lösungen	18
2.5 Enzyme	20
2.6 Oligonukleotide.....	20
2.6.1 Oligonukleotide der guide RNAs	20
2.6.2 Oligonukleotide der <i>tag</i> -Sequenzen	20
2.6.3 Sequenzierungsprimer.....	21
2.6.4 Primer für PCR	21
2.7 Vektoren.....	22
2.7.1 <i>Entry</i> -Vektoren.....	22
2.7.2 <i>Destination</i> -Vektoren	22
2.7.3 Expressionsvektoren.....	22
2.7.4 Vektoren zur lentiviralen Transduktion	23
2.7.5 Vektoren zur Geneditierung mittels CRISPR/Cas9-System.....	24

2.8	Primäre Antikörper.....	24
2.9	Sekundäre Antikörper.....	25
2.10	Bakterien.....	25
2.11	Eukaryotische Zelllinien.....	26
2.12	Kommerzielle Zellkulturmedien.....	26
2.13	Kommerzielle Kits.....	26
2.14	Software.....	27
3	Methoden.....	28
3.1	Methoden der Mikrobiologie.....	28
3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
3.1.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	29
3.1.3	Kryokonservierung von Bakterien.....	29
3.2	Methoden der Molekularbiologie.....	29
3.2.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
3.2.2	DNA-Restriktionsverdau.....	30
3.2.3	Agarosegelelektrophorese.....	31
3.2.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	31
3.2.5	Ligation von DNA.....	31
3.2.6	Gateway Klonierung.....	32
3.2.7	Polymerasekettenreaktion.....	33
3.2.8	DNA-Sequenzierung.....	34
3.2.9	Geneditierung mittels CRISPR/Cas 9 System.....	34
3.2.10	Generierung von Konstrukten für ein Protein- <i>Knockout</i> mit CRISPR/Cas9.....	35
3.2.11	Markieren von Proteinen mit <i>tag</i> -Sequenzen.....	37
3.2.12	EdU-Assay.....	38
3.3	Methoden der Proteinbiochemie.....	39
3.3.1	Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese (SDS-Page).....	39
3.3.2	Western Blot Analyse.....	40
3.3.3	In-vitro Immunfluoreszenzmikroskopie.....	40
3.4	Methoden der Zellkultur.....	41
3.4.1	Kultivieren und Passagieren verwendeter Zelllinien.....	41
3.4.2	Zellzahlbestimmung.....	42
3.4.3	Kryokonservierung von Zellen.....	42
3.4.4	Transiente Transfektion.....	43
3.4.5	Stabile Transfektion.....	44
3.4.6	CRISPR/Cas9 induziertes <i>Sec61α1 Knockout</i> mit konventionellem <i>Rescue</i>	45
3.4.7	CRISPR/Cas9 induziertes <i>Sec61α1 Knockout</i> mit integrationsbasiertem <i>Rescue</i> nach „ <i>CRISPaint</i> “.....	46
3.4.8	Einsatz des lentiviralen, induzierbaren pINDUCER21-GFP-Puro-Systems.....	49

3.4.9	Lentivirale Transduktion.....	50
3.5	Statistische Auswertung	52
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Testung kommerzieller primärer Antikörper gegen Sec61α1	53
4.1.1	Funktionskontrolle verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61α1 in der Western Blot-Analyse	53
4.1.2	Funktionskontrolle verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61α1 in der Immunfluoreszenzmikroskopie.....	55
4.2	Expressions- und Lokalisationsstudien von unterschiedlich <i>getaggt</i> en Varianten des wildtypischen Sec61α1 und Sec61α1R236C.....	57
4.2.1	Funktionalität der verschiedenen Protein- <i>tags</i> zur Detektion von Sec61α1Wt/-R236C in der IF	57
4.2.2	Intrazelluläre Lokalisation der getaggten Sec61α1Wt/-R236C Fusionsproteine	59
4.3	Ergebnisse der Versuche Zelllinien mit stabiler Überexpression von wildtypischen und mutierten Sec61α1 zu etablieren	60
4.3.1	Etablierung der Zelllinie MDCKII_pEGG2Hamp1-Sec61α1Wt/-R236C- GFP durch stabile Transfektion.....	61
4.3.2	Etablierung der Zelllinie MDCKII_pcDNA-DEST47-Sec61α1Wt/-R236C- GFP durch stabile Transfektion.....	62
4.4	Ergebnisse des Versuchs Sec61α1- <i>Knockout</i> -Zelllinien mit unterschiedlichen <i>Rescue</i> -Strategien zu erstellen.....	63
4.5	Analyse des Expressionsunterschieds von Sec61α1Wt-GFP und Sec61α1R236C-GFP mit drei Vektoren.....	64
4.5.1	Vergleich der Anzahl Sec61α1Wt-GFP- und Sec61α1-R236C-GFP- positiver Zellen in der IF.....	64
4.5.2	Vergleich der Expression von Sec61α1Wt-GFP- und Sec61α1-R236C- GFP in der WB-Analyse.....	65
4.6	Untersuchung transient transfizierter HeLa-Zellen mittels EdU-Assay	66
4.7	Ergebnisse der lentiviralen Transduktion des Vektors pINDUCER- Sec61α1Wt/-R236C-GFP	68
4.7.1	Ergebnisse der lentiviralen Transduktion von HeLa- und MDCKII-Zellen	68
4.7.2	Ergebnisse der Induktion von MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1Wt/- R236C-GFP in der Immunfluoreszenzmikroskopie.....	69
5	Diskussion.....	76
5.1	Validierung verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61α1	76
5.2	Detektion von Sec61α1Wt und Sec61α1R236C anhand von <i>tag</i> -Proteinen.....	77
5.2.1	Generelle Vor- und Nachteile der verschiedenen <i>tag</i> -Proteine.....	78
5.2.2	Funktionalität der verschiedenen Protein- <i>tags</i> bei Sec61α1Wt/-R236C in der IF	78
5.3	Vergleichende Lokalisationsstudien von Sec61α1Wt und Sec61α1R236C.....	79
5.4	Bewertung der verschiedenen Möglichkeiten zur Etablierung eines Zellkulturmodells mit stabiler Expression von Sec61α1Wt/-R236C	79

5.4.1	Zelllinien mit stabiler Überexpression von wildtypischen und mutierten Sec61 α 1	80
5.4.2	<i>Knockout</i> Zelllinien mit verschiedenen <i>Rescue</i> -Ansätzen	81
5.4.3	Lentivirale Transduktion des induzierbaren Vektors pINDUCER21-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP	82
5.5	Expressionsunterschiede zwischen Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C	83
5.6	EdU-Assay von Sec61 α 1Wt/-R236C transfizierten HeLa-Zellen	85
5.7	Ausblick	86
	Literaturverzeichnis	87
	Lebenslauf	97
	Danksagung	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PLD-Entitäten und assoziierte Genmutationen	3
Abbildung 2: Schematische Struktur von Sec61	6
Abbildung 3: Schematische Übersicht der zellulären Funktionen von Sec61	9
Abbildung 4: Stammbaum der untersuchten Verwandten der Sec61 α 1R236C-Indexpatientin	12
Abbildung 5: Übersicht der Gateway Klonierung	32
Abbildung 6: Schematische Darstellung der DNA Knock-in Methode nach CRISPaint	47
Abbildung 7: Das pINDUCER21-GFP-Puro-System	50
Abbildung 8: Validierung verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61 α 1 in der WB-Analyse	54
Abbildung 9: Validierung verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61 α 1 in der Immunfluoreszenzmikroskopie	57
Abbildung 10: Funktionalität der verschiedenen Protein- <i>tags</i> bei Sec61 α 1Wt/-R236C in der IF	59
Abbildung 11: Kolokalisationen des wildtypischen und mutierten <i>getaggen</i> Sec61 α 1 mit Markern des ER und GA	60
Abbildung 12: Stabile Transfektion von pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP in MDCKII	62
Abbildung 13: Stabile Transfektion von pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP in MDCKII	63
Abbildung 14: Vergleich der Anzahl Sec61 α 1Wt-GFP- und Sec61 α 1-R236C-GFP-positiver Zellen	65
Abbildung 15: Vergleich der Expression von Sec61 α 1Wt-GFP und Sec61 α 1-R236C-GFP in der WB-Analyse	66
Abbildung 16: EdU-Assay transient transfizierter HeLa-Zellen	67
Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopie von 1.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP und 1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP nach Doxycyclin Induktion	72
Abbildung 18: Immunfluoreszenzmikroskopie von 2.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP und 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP nach Doxycyclin Induktion	74
Abbildung 19: Abweichende Darstellung der Struktur von Sec61 α 1R236C-GFP bei 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP nach 24 h Induktion	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sec61 α 1-Kanalopathien.....	11
Tabelle 2: Geräte.....	15
Tabelle 3: Laborbedarf	16
Tabelle 4: Chemikalien	18
Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....	19
Tabelle 6: Enzyme.....	20
Tabelle 7: Oligonukleotide der guide RNAs	20
Tabelle 8: Oligonukleotide der <i>tag</i> -Sequenzen	21
Tabelle 9: Sequenzierungsprimer	21
Tabelle 10: Primer für PCR	21
Tabelle 11: <i>Entry</i> -Vektoren.....	22
Tabelle 12: <i>Destination</i> -Vektoren	22
Tabelle 13: Expressionsvektoren.....	23
Tabelle 14: Vektoren zur lentiviralen Transduktion	23
Tabelle 15: CRISPR/Cas9- & Knock-in-Vektoren	24
Tabelle 16: Primäre Antikörper	24
Tabelle 17: Sekundäre Antikörper	25
Tabelle 18: Bakterien	25
Tabelle 19: Eukaryotische Zelllinien	26
Tabelle 20: Kommerzielle Zellkulturmedien	26
Tabelle 21: Kommerzielle Kits	26
Tabelle 22: Software	27
Tabelle 23: Übersicht PCR-Ansätze	33
Tabelle 24: PCR-Reaktionszyklen	34
Tabelle 25: Restriktionsverdau und Ligation des CRISPR/Cas9 Vektors	36
Tabelle 26: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	39
Tabelle 27: Transfektionsansätze für transiente Transfektionen und anschließende IF	43
Tabelle 28: Transfektionsansätze für stabile Zelllinien.....	44
Tabelle 29: Selektionsmedien für stabile Zelllinien	44
Tabelle 30: <i>CRISPaint</i> Vektorkombinationen.....	49

Abkürzungsverzeichnis

ADPKD	<i>autosomal dominant polycystic kidney disease</i>
ADPLD	<i>autosomal dominant polycystic liver disease</i>
AK	Antikörper
ALG8	Alpha-1,3-Glucosyltransferase
ALG9	Alpha-1,2-mannosyltransferase
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumperoxiddisulfat
ARPKD	<i>autosomal recessive polycystic kidney disease</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CRISPaint	CRISPR assisted insertion tagging
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	<i>CRISPR</i> -RNA
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
DEMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
DG	Deckglässchen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNJAB11	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B11</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
Dox	Doxycyclin
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
DZIP1	<i>DAZ-interacting protein 1 like</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2`-desoxyuridin
EF1a	<i>elongation factor1-a</i>
EMEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
ER	raues Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation
FCS	Fetales Kälberserum
GA	Golgi Apparat
GANAB	Glucosidase II Alpha Untereinheit
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HA	Hemagglutinin
HDR	<i>homology directed repair</i>
HRP	<i>Horseraddish Peroxidase</i>
Hygro	Hygromycin
IF	Immunfluoreszenzmikroskopie
IRES	interne Ribosomenbindestelle
Kana	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LRP5	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
MDCK II	<i>Madin-Darby Canine Kidney-Zellen (II)</i>
NHEJ	<i>nonhomologous end joining</i>
NHS	<i>Normal horse serum</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin

PAM	<i>protospacer-adjacent motif</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC1	Polycystin 1
PC2	Polycystin 2
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKD1	<i>polycystic kidney disease 1</i>
<i>PKD2</i>	<i>polycystic kidney disease 2</i>
<i>PKHD1</i>	<i>polycystic kidney and hepatic disease 1</i>
PLD	<i>polycystic liver disease</i>
PNK	Polynucleotid Kinase
PRKCSH	Protein Kinase C Substrate 80K-H
Puro	Puromycin
RNA	Ribonukleinsäure
rtTA3	<i>tetracycline-transactivator 3</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sgRNA	<i>single guide</i> RNA
S-Phase	Synthese-Phase
T/E	Trypsin/EDTA
TBST	Tris Buffered Saline + Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
trcrRNA	<i>trans-activating CRISPR-RNA</i>
TRE2	<i>tetracycline responsive element 2</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
WB	Western Blot

1 Einleitung

1.1 Polyzystische Lebererkrankung

1.1.1 Entitäten

Die klinische Diagnose einer polyzystischen Lebererkrankung (*polycystic liver disease*, PLD) steht im Zusammenhang mit drei verschiedenen hereditären Krankheitsentitäten (s. Abbildung 1). Zystenlebern können im Rahmen einer autosomal dominanten polyzystischen Lebererkrankung (*autosomal dominant polycystic liver disease*, ADPLD) auftreten, aber auch als extrarenale Manifestation einer autosomal dominanten (*autosomal dominant polycystic kidney disease*, ADPKD) oder autosomal rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (*autosomal recessive polycystic kidney disease*, ARPKD) (Boerrigter et al. 2021; Chauveau et al. 2000; Besse et al. 2020). Obwohl alle drei genannten Krankheiten derzeit als eigene Entität betrachtet werden, gibt es erhebliche genetische und phänotypische Überschneidungen (Besse et al. 2017; Boerrigter et al. 2021).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

ADPLD, ADPKD und ARPKD sind monogene Erkrankungen mit pathologischen Mutationen in verschiedenen Genen (Boerrigter et al. 2021) (s. Abbildung 1). Der Ursprung der Zystenentstehung liegt dabei bei allen drei Entitäten in Malformationen des Duktalplattenbaus während der fetalen Leberentwicklung. Die Duktalplatte ist der Ausgangspunkt der Entstehung von gallengangsbildenden Cholangiozyten. (Lazaridis et al. 2004; Lee-Law et al. 2019; Cnossen und Drenth 2014). Zur definitiven Zystogenese tragen letztendlich eine Fülle von veränderten Zellsignalwegen in den Zysten-auskleidenden Cholangiozyten bei (Masyuk et al. 2017). Im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses stehen dabei unter anderem eine veränderte intrazelluläre Calciumhomöostase sowie erhöhte Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegel (Wallace 2011). Aktueller Konsens besagt, dass es zur Ausprägung des zystischen Phänotyps, neben der vererbten Mutation (bezeichnet als *first hit*), eine weitere somatische Mutation desselben Gens im anderen Allel bedarf (sogenannter *second hit*) (Lee-Law et al. 2019; Janssen et al. 2012; Badenas et al. 2000; Watnick et al. 1998).

1.1.2.1 Genetik der ADPKD

Die zwei hauptsächlich verantwortlichen Gene der ADPKD sind Mutationen in *polycystic kidney disease 1* (PKD1) (78 % der Fälle) und *polycystic kidney disease 2* (PKD2) (15 % der Fälle), kodierend jeweils für Polycystin 1 (PC1) und Polycystin 2 (PC2) (Lee-Law et al. 2019). Es wird außerdem von anderen, selteneren Fällen mit Mutationen in der α -Untereinheit von Glucosidase II (GANAB) (Porath et al. 2016), *low-density lipoprotein receptor-related protein 5* (LRP5) (Cnossen et al. 2016), Alpha-1,2-mannosyltransferase (ALG9) (Besse et al. 2019) und *DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B11* (DNJAB11) (Cornec-Le Gall et al. 2018) berichtet. Die codierten Proteine tragen dieselben Namen wie die entsprechenden Gene.

1.1.2.2 Genetik der ADPLD

Die ursächlichen Mutationen der ADPLD zeigen sich als heterogenste Gruppe der PLD-assoziierten Gene. Die bisher bekannten Mutationen in sieben verschiedenen Genen können nur in 30-45 % der Fälle nachgewiesen werden (Boerrigter et al. 2021). Die zwei Hauptgene sind Protein Kinase C Substrat 80K-H (PRKCSH) (Li et al. 2003) und SEC63 (Davila et al. 2004). Des Weiteren sind Mutationen in LRP5 (Cnossen et al. 2014), GANAB (van de Laarschot et al. 2020; Besse et al. 2018), Alpha-1,3-Glucosyltransferase (ALG8), SEC61B (Besse et al. 2017) und *polycystic kidney and hepatic disease 1* (PKHD1) (Besse et al. 2020) mit ADPLD vergesellschaftet.

1.1.2.3 Genetik der ARPKD

In den aller meisten Fällen wird die ARPKD durch eine Mutation in dem Gen PKHD1, kodierend für das Protein Fibrozystin, verursacht. Neuere Studien berichten von seltenen Fällen, in denen Erkrankte eine pathologische Mutation in *DAZ-interacting protein 1-like* (DZIP1L) aufweisen (Boerrigter et al. 2021; Lu et al. 2017).

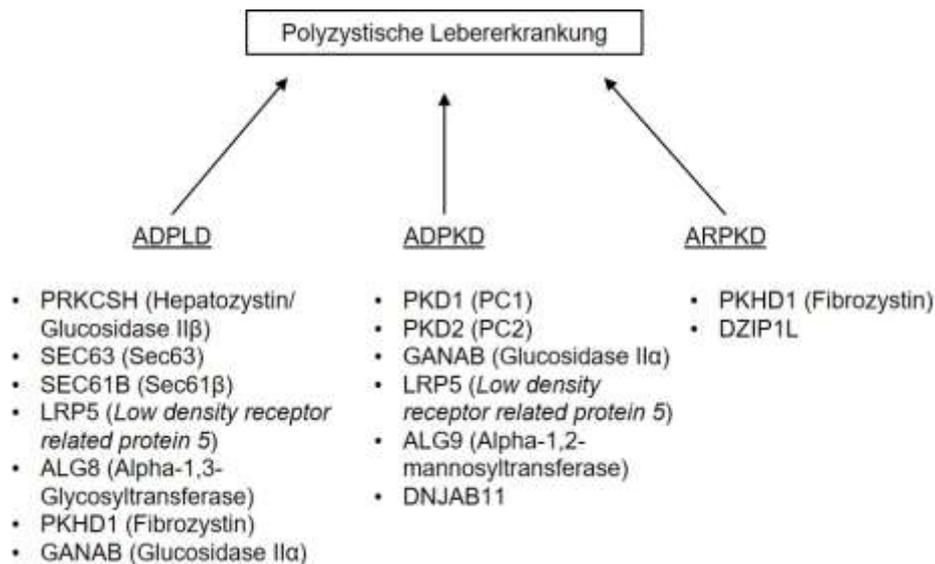


Abbildung 1: PLD-Entitäten und assoziierte Genmutationen

Dargestellt ist eine Übersicht der Krankheitsentitäten mit den jeweils assoziierten Genmutationen, die zu einer polyzystischen Lebererkrankung führen können. In Klammern steht der Name des codierten Proteins, falls dieser von dem Namen des Gens abweicht (Quelle: eigene Darstellung).

1.1.2.4 Funktionen der PLD-assozierten Proteine

Die PLD-assozierten Mutationen betreffen Proteine, die vornehmlich in zwei verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert sind: im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) (v.a. Proteine der ADPLD) und in der primären Zilie (v.a. Proteine der ADPKD, ARPKD) (Boerrigter et al. 2021). Die rER-lokalisierten Proteine Glucosidase II (codiert durch GANAB (α -Untereinheit) und PRKCSH (β -Untereinheit)), ALG8, ALG9, DNJAB11, Sec63 und Sec61 β fungieren als wichtige Akteure in der ko- und posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, die den sekretorischen Weg durchlaufen (Lee-Law et al. 2019; Breitling und Aebi 2013; Cornec-Le Gall et al. 2018). Darunter fallen alle sekretorischen Proteine sowie integrale Membranproteine (Farhan und Rabouille 2011). Letzteres inkludiert somit auch die Gruppe der PLD-assozierten Proteine PC1, PC2, Fibrozystin und DZIP1L, die unter anderem in der Zellmembran der primären Zilie lokalisiert sind (Boerrigter et al. 2021). Primäre Zilien sind apikale Ausstülpungen der Zellmembran mit spezifischer Protein- und Lipidzusammensetzung zur Erfüllung ihrer Aufgabe als sensorisches Zellorganell zur Signaltransduktion (Chirstensen et al. 2007). Zwei bekannte Akteure sind dort PC1 und PC2. Beide Proteine agieren sowohl zusammen als Komplex als auch als eigenständige Proteine an unterschiedlichen intrazellulären Positionen und beeinflussen ein breites Spektrum von intrazellulären Signalwegen, Zelldifferenzierung und Zellproliferation, die Gegenstand aktueller Forschung sind (Yu et al. 2009; Hardy und Tsiokas 2020; Casascelli et al. 2009; Streets et al. 2003;

Bhunja et al. 2002; González-Perrett et al. 2001; Pennekamp et al. 2002; Koulen et al. 2002; Kim et al. 2016; Shillingford et al. 2006; Boca et al. 2006). In der hepatischen und renalen Zystogenese stand lange die Hypothese der Funktion des ziliären PC1-PC2-Komplexes als Ionenkanal für Calcium Influx, induziert durch extrazellulären Flüssigkeitsstrom, im Fokus (Casuscelli et al. 2009; Nauli et al. 2003; Praetorius und Spring 2001). Es wurde postuliert, dass eine veränderte intrazelluläre Calciumhomöostase zu einem erhöhten cAMP-Spiegel führt, der wiederum Zellproliferation und transepitheliale Flüssigkeitssekretion (zwei Hauptmerkmale der Zysten-bildenden Cholangiozyten) induziert (Wallace 2011; Yamaguchi et al. 2004; Yamaguchi et al. 2000). Diese Theorie wurde in jüngerer Vergangenheit jedoch in Frage gestellt (Delling et al. 2016; Ma et al. 2017). Das hauptsächlich ARPKD-assoziierte Protein Fibrozystin ist ebenfalls im primären Cilium lokalisiert und interagiert dort mit dem PC1-PC2-Komplex (Wang et al. 2007; Garcia-Gonzalez et al. 2007). Die genaue Funktion ist bisher jedoch ungeklärt. In der Nähe von Fibrozystin und dem PC1-PC2-Komplex, in der ziliären Transitionszone, befindet sich auch das andere ARPKD-assoziierte Protein DZIP1L mit bisher nicht genau bekannter Funktion (Lu et al. 2017). LPR5 ist das einzige Protein, das sich nicht in eine der beiden Gruppen mit Lokalisation im rER oder primären Cilium einordnen lässt. Es ist ein Transmembranprotein der äußeren Zellmembran und fungiert als Kofaktor im Wnt-/ β -Catenin-Signalweg, der unter anderem Zellproliferation und -differenzierung kontrolliert (MacDonald und He 2012). Es existieren mehrere experimentelle Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass PC1 eine Schlüsselrolle in der Zystogenese einnimmt, da die Dysfunktionen aller genannten Proteine, bis auf LRP5, zu einer veränderten Funktion bzw. veränderten Menge an funktionsfähigem PC1 führen (Besse et al. 2017; Bergmann und Weiskirchen 2012; Cornec-Le Gall et al. 2018; Lu et al. 2017; Fedeles et al. 2011).

1.1.3 Epidemiologie

ADPKD ist die häufigste vererbte Nephropathie mit klinischer Manifestation vorwiegend im Erwachsenenalter. Die Prävalenz liegt zwischen 1:400 und 1:1.000. Mit einem bedeutend schwereren Krankheitsbild ist ARPKD eine deutlich seltenere Erkrankung des Kindesalters. (Bergmann et al. 2018; Cnossen und Drenth 2014). Die Häufigkeit und Verteilung von ADPLD kann aufgrund der vielen asymptomatischen Krankheitsträger nicht präzise angegeben werden (van Aerts et al. 2018). So schwankt die Prävalenz zwischen 1:100.000 und 1:1.000.000 (Cnossen und Drenth 2014). Das Risiko einer massiven hepatischen Zystogenese liegt bei weiblichen Erkrankten bei allen drei Krankheitsentitäten höher als bei Männern (Qian et al. 2003; van Keimpema et al. 2011; Masyuk et al. 2017). Ein Zystenprogress mit steigendem Patientenalter ist bei beiden Geschlechtern zu beobachten (Masyuk et al. 2017; Cnossen und Drenth 2014).

1.1.4 Diagnose

Die Diagnose einer Zystenleber entsteht häufig inzidentell durch vermehrtes Anwenden bildgebender Diagnostik wie z. B. Sonographie, Computertomografie oder Magnetresonanztomografie (Suwabe et al. 2020). Aktuell existiert kein feststehendes Minimum der Zystenanzahl zur Diagnose einer PLD. Ab mindestens zehn flüssigkeitsgefüllten Leberzysten sollte jedoch eine PLD in Erwägung gezogen werden (van Aerts et al. 2018).

1.1.5 Klinik

Die klinische Präsentation einer PLD unterliegt einer großen Variabilität und ist hauptsächlich von der Anzahl und dem Volumen der Leberzysten bestimmt. Die meisten Patienten*innen bleiben asymptomatisch, bis die, durch den Zystenprogress verursachte, Hepatomegalie zu Beschwerden aufgrund der Kompression anderer Abdominalorgane führt. Zu den durch gesteigertes Lebervolumen ausgelösten Symptomen gehören z. B. Bauchschmerzen, frühzeitiges Sättigungsgefühl, Atemnot und Rückenschmerzen. Die Leberfunktion bleibt dabei in der Regel, unabhängig vom Ausmaß der Zystenprogression und Hepatomegalie, erhalten. Zu den möglichen Komplikationen gehören unter anderem Zystenruptur, -hämorrhagie und -infektion (van Aerts et al. 2018; Cnossen und Drenth 2014).

1.1.6 Therapie

Die Therapie der PLD richtet sich nach der klinischen Ausprägung der Krankheit. Eine präventive Behandlung von asymptomatischen Patienten*innen ist derzeit nicht indiziert. Die einzige derzeit zugelassene medikamentöse Therapie besteht in Somatostatin-Analoga. Die Behandlung mit eben genannten Pharmazeutika wirkt kausal gegen den Prozess der hepatischen Zystogenese und vermindert somit das Lebervolumen bei gleichzeitiger Verbesserung der Lebensqualität (van Aerts et al. 2018; Masyuk et al. 2017). Chirurgische Interventionen umfassen Aspirations-Sklerosierungstherapie, Zystenfenestration, Leberteileresektionen sowie als *ultima ratio* die Lebertransplantation (van Aerts et al. 2018).

1.2 Sec61 α 1

1.2.1 Aufbau

Sec61 α 1 ist eine Untereinheit des heterotrimeren ER-Membranproteins Sec61. Es bildet einen über alle Domänen des Lebens evolutionär hoch konservierten Protein-Translokationskanal zwischen Zytosol und ER-Lumen. Die Untereinheit Sec61 α 1 fungiert dabei als wässrige Pore zur Proteintranslokation oder -insertion. Sie besteht aus zehn Transmembrandomänen (TM), die in zwei pseudo-symmetrischen Hälften (TM 1-5 N-terminal und TM 6-10 C-terminal), verbunden über eine „Scharnierregion“, um eine zentrale Verengung angeordnet sind (s. Abbildung 2). Der sanduhrförmige Kanal, den Sec61 α 1 bildet, ist an seiner engsten Stelle von hydrophoben Seitenketten ausgekleidet, die ein Ausströmen von kleinen Molekülen während der Proteintranslokation verhindern. Im ruhenden Zustand ist der Kanal zusätzlich durch eine *plug*-Helix verschlossen, die im aktiven, offenen Zustand disloziert und die Proteintranslokation ermöglicht. Neben der Translokation eines löslichen, sekretorischen Proteins vom Zytosol in das ER-Lumen können hydrophobe Membranproteine den Kanal an einem Seitenausgang verlassen und somit direkt in die Lipidphase der ER-Membran integriert werden (van den Berg et al. 2004; Lang et al. 2017; Ito et al. 2019). Die β - und γ -Untereinheit von Sec61 haben je eine TM. Sie befinden sich in der Peripherie des Komplexes. Die γ -Untereinheit verbindet die beiden Hälften von Sec61 α 1. Sec61 β ist die einzige nicht essenzielle Untereinheit des Proteins und nur hat nur geringen Kontakt zu Sec61 α 1 (van den Berg et al. 2004; Lang et al. 2017).

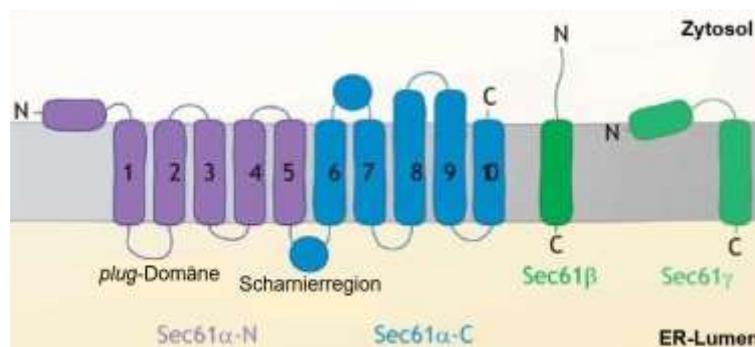


Abbildung 2: Schematische Struktur von Sec61

Dargestellt ist der schematische Aufbau des ER-Membranproteins Sec61. Das ER-Translokonprotein Sec61 besteht aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Die zehn Transmembrandomänen (1-10) von Sec61 α ordnen sich in zwei pseudo-symmetrischen Hälften zu je fünf Transmembrandomänen, verbunden über eine Scharnierregion zwischen TM fünf und sechs, an. Sowohl das C- (blau gefärbt) als auch das N-terminale Ende (lila gefärbt) der α -Untereinheit befinden sich im Zytosol. Die zentrale Konstriktion der Translokationspore (hier nicht abgebildet) wird durch eine *plug*-Domäne (ER-lumenale Schleife

zwischen TM 1 und 2) verschlossen. Sec61 β und Sec61 γ bestehen aus je einer TM (Quelle: modifiziert von Gemmer und Förster 2020).

1.2.2 Funktionen

Sec61 α 1, als Untereinheit des ER-Translokationskomplexes Sec61, ist in den folgenden elementaren Zellstoffwechsel und Zellsignalwegen beteiligt und erfüllt damit für das Zellüberleben essenzielle Funktionen (Lang et al. 2017; Lang et al. 2012).

1.2.2.1 Proteintranslokation

Ein wichtiges Zellkompartiment des sekretorischen Weges bildet das rER (Palade 1975). Hier werden sekretorische Proteine, ER-residente und integrale Membranproteine translatiert, modifiziert und kontrolliert, sodass nur korrekt gefaltete Proteine zu ihrem Bestimmungsort gelangen (Farhan und Rabouille 2011; Sun und Brodsky 2019). Dazu müssen die entsprechenden Proteine die Lipid-Doppelmembran des ER passieren oder in diese integriert werden. Dies wird durch den ER-Translokations-Komplex ermöglicht. Dabei handelt es sich um eine dynamische Funktionseinheit verschiedener Proteine mit dem invarianten, heterotrimeren Zentrum Sec61 (s. Abbildung 3) (Gemmer und Förster 2020; Lang et al. 2017). Wie bereits erwähnt (1.2.1) bildet Sec61 α 1 dabei die zentrale, wässrige Proteintranslokations-Pore. Die Proteintranslokation kann anhand ihrer zeitlichen Abfolge im Verhältnis zur Translation in zwei Mechanismen unterteilt werden: ko- und posttranslationale Proteintranslokation. In beiden Fällen existieren eine Vielzahl spezifischer Transportproteine, die hydrophobe Signalsequenzen des Vorläufer Peptids erkennen und das entstehende (entspricht der kotranslationalen Translokation) beziehungsweise neu entstandene, ungefaltete Peptid (entspricht der posttranslationalen Translokation) an die Membran des rER zum Translokations-Komplex dirigieren (Zimmermann et al. 2011). Neben Sec61 besteht dieser aus einer Maschinerie von auxiliären Proteinen, die transient oder konstitutiv an die Untereinheiten von Sec61 gebunden sind und sich je nach Translokationsmechanismus und Cargoprotein verändert. Diese auxiliären Proteine können als allosterische Effektoren des Translokationskanals Sec61 betrachtet werden. Sie assistieren bei der Translokation und fördern die Proteinbiogenese durch Proteinmodifikationen und Assistenz in korrekter Proteinfaltung. Die verschiedenen Komponenten und dynamischen Konstellationen des ER-Translokons sind Thema aktueller Forschung und müssen hier nicht genauer beleuchtet werden (Gemmer und Förster 2020; Pfeffer et al. 2016; Wu et al. 2018; Russo 2020; Pfeffer et al. 2017; Pfeffer et al. 2014; Meyer et al. 2000; Klein et al. 2020; Alder et al. 2005).

1.2.2.2 Calciumkanal

Das eukaryotische ER ist ein multifunktionelles Zellorganell, das neben seiner Funktionen in der Proteinbiosynthese und -sortierung sowie der Qualitätskontrolle als dynamischer intrazellulärer Calciumspeicher dient (Schwarz und Blower 2016). Calcium, als intrazelluläres Signalmolekül, beeinflusst eine Myriade von zellulären Prozessen darunter Proliferation, Differenzierung, Sekretion, Metabolismus, Motilität, Genexpression und Apoptose (Clapham 2007; La Rovere et al. 2016). Die intrazelluläre Calciumhomöostase ist daher von fundamentaler Bedeutung für das Zellüberleben und wird unter anderem durch das ER über die drei Mechanismen der Calciumaufnahme, -freisetzung und -bindung erhalten (Arruda und Hotamisligil 2015; Mekahli et al. 2011; Park et al. 2021). Im ruhenden Zustand ist die Calciumkonzentration im ER-Lumen um den Faktor 10^3 höher als im Zytosol (Schwarz und Blower 2016). Dieses Konzentrationsgefälle ist das Resultat aus aktiver Calciumaufnahme durch spezifische Transporter und sogenannten Calciumleckströmen durch Tunnelproteine (s. Abbildung 3). Letzteres bezeichnet passiven Calcium-Efflux entlang des Gradienten vom ER-Lumen ins Zytosol (Camello et al. 2002). Zu den Calciumleckkanälen gehört auch Sec61 (Lang et al. 2011; van Coppenolle et al. 2004). Neben Vorläuferpeptiden können die wässrige Pore des Sec61-Translokons auch kleine Moleküle wie Calciumionen passieren. Dieser Prozess unterliegt, aufgrund der fundamentalen Bedeutung von Calcium als intrazelluläres Signalmolekül, mehreren, bisher noch nicht vollständig entschlüsselten Kontrollmechanismen (Schäuble et al. 2012; Erdmann et al. 2011; Lang et al. 2017).

1.2.2.3 ER-assoziierte Degradation und *unfolded protein response*

Zur ER-assoziierten Proteinbiosynthese im sekretorischen Weg gehört neben der Proteinsynthese und -modifikation auch die Qualitätskontrolle der neu synthetisierten Peptide. Nur korrekt gefaltete und damit funktionstüchtige Proteine verlassen das ER in Richtung ihres Zielkompartments. Ein Ungleichgewicht aus Proteinfaltungskapazität und -faltungsbedarf führt zur Akkumulation von fehlgefalteten oder ungefalteten Proteinen im ER-Lumen, die ER-Stress auslösen. Um die Proteinhomöostase aufrecht zu erhalten, haben Zellen eine Maschinerie zur Proteinqualitätskontrolle entwickelt, die unter anderem die ineinandergreifenden, ER-lokalisierten Prozesse der ER-assoziierten Degradation (ERAD) und *unfolded protein response* (UPR) umfasst (Hwang und Qi 2018). Im Zuge der ERAD werden die fehlgefalteten Proteine des ER-Lumens ins Zytosol retransloziert und dort degradiert (Sun und Brodsky 2019). Es gibt Hinweise darauf, dass Sec61 als Retranslokationskanal fungieren könnte (Kalies et al. 2005; Schäfer und Wolf 2009; Wiertz et al. 1996). Jedoch werden zum jetzigen Zeitpunkt andere Proteinkanäle für diese Funktion favorisiert (Baldrige und Rapoport 2016; Carvalho et al. 2010; Schoebel et al. 2017; Gemmer

und Förster 2020). Wenn die Mechanismen der ERAD nicht zur Wiederherstellung der Proteinhomöostase im ER führen, wird die *UPR* induziert (Sun und Brodsky 2019). Diese verfolgt das Ziel, durch Induktion entsprechender Zielgene eine Minderung an translatierten Proteinen und eine Erhöhung der Proteinfaltungskapazitäten zu bewirken und dadurch die Proteinhomöostase im ER wiederherzustellen. Wenn dies nicht gelingt, treten die Zellen in den programmierten Zelltod ein. Nach derzeitigem Stand existieren drei Signalkaskaden der *UPR*, die durch ER-Membranproteine induziert werden (Hetz et al. 2020). Sec61 kontrolliert dabei die Aktivierung und Inaktivierung von IRE1 α , eines der *UPR*-auslösenden ER-Stresssensoren (Plumb et al. 2015; Sundaram et al. 2017).

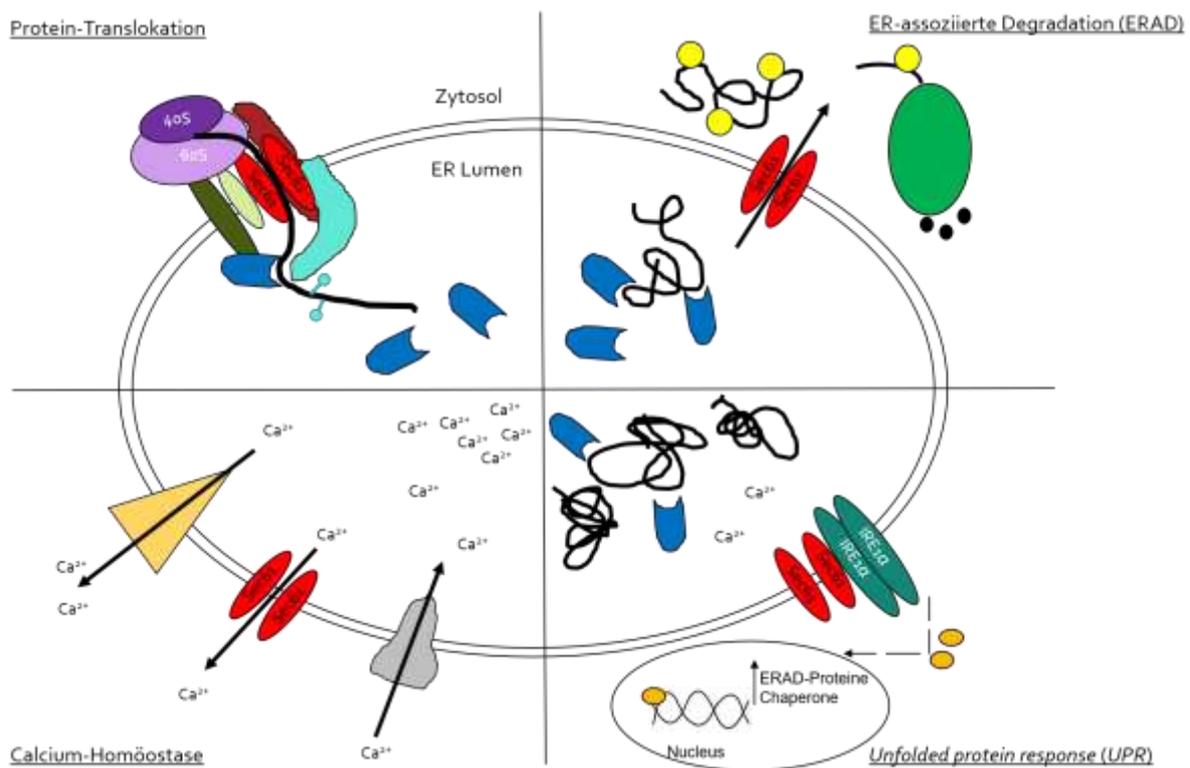


Abbildung 3: Schematische Übersicht der zellulären Funktionen von Sec61

Dargestellt sind in vereinfachter Form die Funktionen des Sec61-Translokons in der ER-Membran. Oben links: Sec61 bildet das invariante Zentrum des dynamischen Translokationskomplexes (unbeschriftete Elemente), der die Proteine des sekretorischen Wegs vom Zytosol in das ER-Lumen transloziert. Abgebildet ist eine kotranslationale Translokation einer Peptidkette, die am Sec61-gebundenen Ribosom (bestehend aus einer 40S- und 60S-Untereinheit) synthetisiert wird. Oben rechts: Eine Akkumulation von fehlgefalteten Peptiden führt zu ER-Stress und löst u.a. die ER-assoziierte Degradation aus. Diskutiert wird die Rolle von Sec61 als Retranslokationskanal der fehlgefalteten Proteine vom ER-Lumen zurück ins Zytosol, wo die Proteine nach Markierung abgebaut werden. Unten links: Durch den ins Zytosol gerichteten, chemischen Gradienten von Calcium entsteht passiver Efflux aus dem ER. Dieser wird über Calciumleckkanäle, wie Sec61, ermöglicht. Andere Ionenkanäle pumpen

Calcium aktiv ins ER (graues Element) oder ermöglichen bei bestimmten Signalen massive Calciumausströme (gelbes Element). Unten rechts: Chronischer ER-Stress löst die *unfolded protein response* (UPR) aus. Sec61 interagiert mit dem UPR-auslösenden ER-Stresssensor *Inositol Requiring 1 alpha* (IRE1 α), der nach Aktivierung u.a. zur Induktion der Genexpression von ERAD-Proteinen und Chaperonen (Proteine, die die korrekte Faltung anderer Proteine unterstützen, dargestellt durch die blauen Elemente im ER-Lumen) führt. Die schwarze Linie steht jeweils für ein Vorläuferpeptid des sekretorischen Weges (Quelle: in Anlehnung an Lang et al. 2017).

1.2.3 Sec61 α 1-Kanalopathien

Als Sec61 α 1-Kanalopathien können Krankheiten bezeichnet werden, die mit Mutationen von Sec61 α 1 in Verbindung stehen. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es fünf Publikationen, die von verschiedenen, kausal pathologischen Sec61 α 1-Mutationen berichten. Alle Mutationen finden sich dabei in verschiedenen Domänen des Proteins (s. Tabelle 1). Im Einklang mit der ubiquitären Expression von Sec61 α 1 und der elementaren Rolle des Proteins im Zellstoffwechsel (1.2.2) umfassen die assoziierten Krankheiten eine große Bandbreite von Entitäten.

Assoziierte Krankheit	Basenaustausch	Aminosäureaustausch, Lokalisation innerhalb des Proteins	Quelle
Autosomal dominante tubulointerstitielle und glomerulozystische Nierenerkrankung mit Anämie	c.T200G	p.Val67Gly, <i>plug</i> -Domäne	Bolar et al. 2016
	c.A553G	p.Thr185Ala, luminaler Konstriktions-Ring	
Diabetes mellitus		p.Tyr344His, ER-lumenale Domäne	Lloyd et al. 2010
Plasmazellmangel	c.T254A	p.Val85Asp, luminaler Konstriktions-Ring	Schubert et al. 2018
	c.G1325T	p.Glu381*, zytoplasmatische Domäne	
Schwere kongenitale Neutropenie	c.A257G	p.Gln92Arg, TM 2	Van Nieuwenhove et al. 2020
Proteinimportdefekte, ERAD Defekte		Deletion der ER-luminalen Domäne 7	Tretter et al. 2013

Tabelle 1: Sec61 α 1-Kanalopathien

Die Tabelle zeigt eine Übersicht der bisher publizierten Sec61 α 1-assoziierten Erkrankungen mit Angabe des jeweiligen Basen- und Aminosäureaustauschs.

1.2.4 Die Mutation Sec61 α 1R236C

Das Thema dieser Arbeit basiert auf der Entdeckung einer bislang nicht beschriebenen Mutation von Sec61 α 1, die mit polyzystischer Lebererkrankung assoziiert ist. Es handelt sich um eine *missense*-Mutation mit dem Basenaustausch von Cytosin zu Tyrosin an der Stelle 706 (c.C706T) im Exon 8 des Sec61A1-Gens. Dies hat den Austausch der Aminosäure 236 Arginin zu Cystein zur Folge (Arg236Cys bzw. R236C). Die untersuchte Mutante wird demnach im Folgenden als Sec61 α 1R236C bezeichnet. Die klinische Signifikanz dieser Mutation ist unklar. Festgestellt wurde die Mutation in heterozygoter Form zuerst bei einer Patientin, die aufgrund von einer polyzystischen Lebererkrankung von der Medizinischen Klinik B des Universitätsklinikums Münster durch Dr. med. Bernhard Schlevogt und Univ.-Prof. Dr. med. Hartmut Schmidt betreut wird. Die Indexpatientin, geboren 1967, erhielt die Erstdiagnose der PLD im Jahr 2009. Ein genetisches Screening auf Mutationen in PLD-assoziierten Genen ergab keine positiven Ergebnisse. Aufgrund der sehr ausgeprägten Leberzysten zeigt sich bei der Indexpatientin ein schweres Krankheitsbild mit starken Beschwerden durch die Kompression anderer Abdominalorgane. 2013 erhielt sie eine laparoskopische Leberzystenfensterung und 2015 erfolgte die Listung zur Lebertransplantation. Zusätzlich wurden ihre nächsten Verwandten einer genetischen Analyse des Sec61A1-Gens unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass die Mutter der Indexpatientin dieselbe Mutation aufweist und bei ihr Leber- sowie Nierenzysten nachweisbar sind. Alle anderen untersuchten Familienmitglieder waren negativ für Mutationen im Sec61A1-Gen (s. Abbildung 4) und zeigten auch in der sonographischen Darstellung von Leber und Nieren keine Zystenbildung.

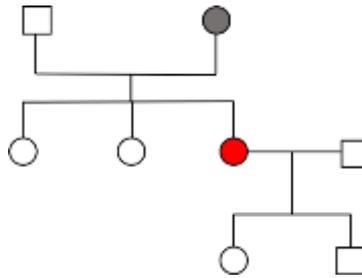


Abbildung 4: Stammbaum der untersuchten Verwandten der Sec61 α 1R236C-Indexpatientin

Abgebildet ist der Stammbaum der untersuchten Verwandten der Indexpatientin (mit Rot markiert), die die Mutation R236C im SEC61A1-Gen aufweist. Ihre Mutter ist ebenfalls positiv für dieselbe Mutation. Beide Frauen zeigen klinische Auffälligkeiten in Form von Leber- und/oder Nierenzysten. Die weiteren dargestellten Familienmitglieder zeigen weder genomische noch klinische Pathologien. Kreise stehen für weibliche Individuen, Vierecke stehen für männliche Individuen, Sec61 α 1R236C-positive Befunde sind durch ausgefüllte Formen gekennzeichnet (Quelle: eigene Darstellung).

Die *missense*-Mutation R236C betrifft eine ER-lumenale Domäne von Sec61 α 1. Diese liegt zwischen TM fünf und sechs und befindet sich somit in der Scharnierregion zwischen den beiden Hälften des Proteins (1.2.1, Abbildung 2). Die beschriebene Mutation hat eine unklare klinische Signifikanz, jedoch können unterschiedliche Hypothesen aufgestellt werden, die eine veränderte Funktion von Sec61 α 1R236C in Verbindung mit dem Pathomechanismus der PLD setzen. Erstens gehören zwei Interaktionspartner von Sec61 α 1, Sec61 β und Sec63, zu den ADPLD-assoziierten Proteinen (1.1.2.2). Dies liefert erste Hinweise auf die Wichtigkeit eines funktionellen Translokonskomplexes zum Erhalt der physiologischen Cholangiozytenfunktionen. Zweitens eröffnen die verschiedenen, elementaren Funktionen von Sec61 α 1 (1.2.2) eine Vielzahl von Möglichkeiten der Beeinflussung der Zystogenese. Abgeleitet von bereits untersuchten Pathomechanismen anderer Sec61 α 1-Mutationen (s. Tabelle 1), könnte die Zystogenese durch aberrante Calciumleckströme des Sec61 α 1-Kanals über konsekutiv erhöhte cAMP-Spiegel induziert werden (Schäuble et al. 2012; Schubert et al. 2018; Wallace 2011). Ein anderer Ansatz könnte die Rolle von Sec61 α 1 in der Synthese und Reifung von PC1, der zentralen Determinante der Zystenpathogenese, fokussieren. Dysfunktionen von Sec61 α 1 mit Auswirkungen auf die Synthese von funktionsfähigem PC1 ständen im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen, die die ER-lokalisierten ADPLD-assoziierten Proteine mit fehlerhafter Reifung und intrazellulärem Transport von PC1 verknüpfen (Besse et al. 2017; Fedeles et al. 2011). Des Weiteren sollte die Möglichkeit der Beeinflussung der ER-Stressregulationsmechanismen, ERAD und UPR, durch Sec61 α 1-Mutationen bedacht werden. Zelluläre Insuffizienz in Bezug auf Rekonstitution der Proteinhomeostase und dadurch ausgelöster chronischer ER-Stress ist bereits als Charakteristikum der Zystogenese beschrieben worden (Santos-Laso et al. 2020).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Zellkulturmodells mit Expression von Sec61 α 1R236C, um in folgenden Arbeiten die Signifikanz dieser Mutation im Zusammenhang mit einer PLD genauer analysieren zu können. Dazu sollen zunächst Methoden zur Detektion von endogenem sowie ektope Sec61 α 1 geprüft und entwickelt werden. Dies umfasst die Testung von Primärantikörpern gegen Sec61 α 1 sowie die Markierung des Proteins mit kurzen Aminosäuresequenzen, sogenannten *tag*-Proteinen, die entweder für ein Epitop kodieren, das von einem Primärantikörper erkannt wird, oder für ein autofluoreszierendes Protein. Anschließend sollen verschiedene Ansätze zur stabilen Expression von Sec61 α 1R236C in der Zellkultur verfolgt werden. Dabei zu berücksichtigen sind eine stabile Überexpression durch eine antibiotikaselektierte Transfektion, *Knockout-Rescue* Zelllinien und die lentivirale Transduktion. Aufgrund der essenziellen Funktion von Sec61 α 1 muss bei Sec61 α 1-*Knockout* Zellen ein zeitnahe *Rescue*, d.h. ein Ersetzen des endogenen Proteins durch die Expression einer ektope Variante, erfolgen. Dazu wurden zwei verschiedene Strategien ausgearbeitet: ein konventioneller *Rescue* durch Kotransfektion eines *Rescue*-Plasmids zeitgleich mit den *Knockout* Vektoren und ein integrationsbasiertes *Rescue*, das durch Integration einer spezifischen Sec61 α 1-Zielsequenz in das endogene Genom erfolgen soll.

2 Materialien

2.1 Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Analysegerät Chemielumineszenzsignale	Azure biosystems, c600	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Autoklav	System VX-95 System VX-75	System GmbH, Linden
Brutschrank Bakterien	Heratherm Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eismaschine	Ziegra ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Elektrophoresekammern (Agarosegele)		Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammern (SDS-Page)	Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenzbinokular	Leica MZ10 F	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch
Heizblock	Digitaler Heizblock	VWR International, Radnor, PA, USA
Lupe	Stereomikroskop Leica MZ 8	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch
Mikroskop	Observer Z1, Apotome, HXP120, Axiocam MRm TCS SP8	Zeiss AG, Jena Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch
Mikroskop (Zellkultur)	AE31E Axiovert 100	Motic, Wetzlar Carl Zeiss AG
Mikrowelle		Severin, Sundern
PCR-Cycler	T-gradient	Biometra GmbH- Analytik Jena AG, Jena
pH-Meter	inoLab	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	INTEGRA pipetboy	INTEGRA Biosciences Ltd., Thatcham, UK
Reinstwassersystem	Ultra Clear	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Schüttelinkubator	Multitron Pro	INFORS GmbH, Einsbach
Schüttler	Rocker 25	Labnet International, Edison, NJ, USA
Spannungsquellen	Standard Power Pack 25	Biometra GmbH- Analytik Jena AG, Jena
Spektrophotometer	Pico 100	Picodrop Limited, Hinxton, UK

Sterilwerkbank für Zellkultur	MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	Biologische Sicherheitswerkbank SC-BHC-IIA2	Clean Air Technik B.V., Woerden, Niederlande
	HERAsafe	Heraeus Instruments, Hanau
Thermomixer	Thermomixer F1.5	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex TK 30	BANDELIN, Belm
UV Transilluminator	Azure biosystems, c150	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, NY, USA
Waage	Kern 572	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wasserbad	Wasserbad WNE 45	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Western Blot Apparatur	Trans-Blot® SD, Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkulturinkubatoren	Heracell 150i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	MCO-20AIC	Sanyo Electric Co., Ltd., Japan
Zell-Zähler	Luna™ automatischer Zellzähler	Logos Biosystems, Südkorea
Zentrifugen	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
	Galaxy Mini Centrifuge	VWR International, Radnor, PA, USA
	Biofuge Primo	Heraeus Instruments, Hanau

Tabelle 2: Geräte

2.2 Laborbedarf

Material	Hersteller
1kb DNA Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
4',6-Diamin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Avalanche® Transfektionsreagenz	EZ Biosystems, USA
Blotting Papier	Whatman Schleicher & Schüll GmbH, Dassen
Clarity	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Deckgläschen 13mm Durchmesser	Karl Hecht, Sondheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Handschuhe (Latex/ Nitril)	Abenda, Zörbig
Impfschlingen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
K2® Transfektions System	Biontex, München
Kanülen, 0,4 mm Microlance™ 3	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg
Kryogefrierbehälter	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Kulturröhrchen, Bakterien	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Metafectene	Biontex, München
Nitrocellulosemembran	GF Healthcare Life Sciences, Amersham, UK
Normal horse serum (NHS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (H0146)
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
OPTI-MEM	Life Technologies Corporation, NY, USA
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Röhrchen	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Petrischalen für Bakterien	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), 1x, steril	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> , ohne Ca ²⁺ und MG ²⁺ , Sigma-Aldrich GmbH, München
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen für Photometrie	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße (Safe lock) 1.5-2ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Slide für Zell-Zähler	Logos Biosystems, Südkorea
Spritzen	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm, 0,22 µm (steril)	Millipore GmbH, Schwalbach
Stripetten	Corning BV Life Science, Amsterdam, NL
Transferpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
XtremeGENE™ HP Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Corning BV Life Science, Amsterdam, NL
Trypsin EDTA (10x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tryptanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 3: Laborbedarf

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
5-Ethynyl-2'-desoxyuridin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Alanin/Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Amoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin (Amp)	PanReac AppliChem, Darmstadt
Azide-PEG3-Biotin	Jena Biosciences GmbH, Jena
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CuSO ₂	Merck KGaG, Darmstadt
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PanReac AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck KGaG, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure	Merck KGaG, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaG, Darmstadt
Ethidiumbromid 10mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerol	PanReac AppliChem, Darmstadt
Glycin	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hygromycin (Hygro)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Roche, Mannheim
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck KGaG, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kanamycinsulfat (Kana)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
LB-Broth Powder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, EMD Biosciences, Californien
N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumascorbat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Polybrene	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Primocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Puromycin (Puro)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Rinderalbumin (BSA)	Pan Biotech, Aidenbach
Rotiporese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TritonX-100	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasser steril	B. Braun, Melsungen
Staurosporine	Merck KGaA, Darmstadt (569397-250UG)
Azide-PEG3-Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
5-Ethynyl-2'-desoxyuridin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 4: Chemikalien

2.4 Puffer und Lösungen

Beschreibung	Zusammensetzung/Hersteller
Cut Smart Puffer (10x)	BioLabs Inc., New England
PNK Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS-Elektrophorese Puffer (10x)	Tris 30,3 g/l Glycin 187,7 g/l 100 ml 10% SDS
T4 DNA Ligase Reaktionspuffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
AccuPuffer (10x)	Bioline, London, UK
Blaumarker (10x)	0,05% Bromphenolblau 40% Glycerol in H ₂ O lösen
Elution Buffer NE	5mM Tris/HCL, pH8,5, Macherey-Nagel, Düren
IF-Antikörper-Lösung/IF-Blocking- und Permeabilisierungslösung	97,5% PBST 2,5% NHS
Lämmli-Probenpuffer (2x)	4% SDS 20% Glycerol 120mM Tris-HCl (pH 6,8) ad H ₂ O 0,02% (w/v) Bromphenolblau

LB-Agarplatten mit Amp, mit Kana	LB-Medium 20 g/l Agar LB-Medium mit Amp 1/ 1000, LB-Medium mit Kana 1/ 1000
LB-Medium mit Amp, mit Kana	20 g/l LB-Pulver ad H ₂ O 1 mL/L Amp 350 µl/L Kana
PBS (10x)	80g NaCl 2g KCl 2g KH ₂ PO ₄ 7,62g Na ₂ HPO ₄ 1l H ₂ O
PBST	10x PBS 1/10 in H ₂ O 0,1% Tx100
Puffer P1 (DNA Mini-Präparation)	50 mM Tris-HCl 10mM EDTA 100 µg Rnase pH 8.0
Puffer P2 (DNA Mini- Präparation)	200mM NaOH 1% SDS
Puffer P3 (DNA Mini-Präparation)	3.0 M Kaliumacetat, pH 5,5
Restriktionsenzym- Puffer R5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Restriktionsenzym- Puffer Tango (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TAE-Puffer (1x)	40mM Tris-HCl 1mM EDTA-Na ₂ -Salz 40mM Essigsäure auffüllen auf 1l mit H ₂ O pH= 8,2
Tris Buffered Saline + Tween, (TBST) 10x	12,1g Tris 87,7g NaCl 5ml 0,5% Tween auffüllen mit 1l H ₂ O pH= 8,0
Transferpuffer (10x)	144,2g Glycin 30,4g Tris auffüllen mit 1l H ₂ O
Transferpuffer (1x)	10% 10x Transferpuffer 10% Ethanol 70% ad H ₂ O
WB-blocking Puffer/- Antikörper-Lösung	2,5 g BSA 50 ml TBST (1x)

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Accuzyme™ DNA Polymerase	Bioline, London, UK
Gateway® LR Clonase™ Enzym-Mix	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Polynukleotid Kinase (PNK)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym Ascl	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym BbsI	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym BsrGI	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym EcoRI	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym KpnI-HF	BioLabs Inc., New England
Restriktionsenzym SspI-HF	BioLabs Inc., New England
Restriktionsenzym XhoI	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
T4 DNA Ligase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
RNase	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 6: Enzyme

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Oligonukleotide der guide RNAs

guideRNA	Sequenz (5'-3')
C069_Locus guide-fw	CACCGTTCGAGAGGCCTTCTACCGC
C069_Locus guide-rv	AAACGCGGTAGAAGGCCTCTCGAAC
C069_Donor guide_3-fw	CACCGTATTGACTAGTCACTGCGGG
C069_Donor guide_3-rv	AAACCCCGCAGTGACTAGTCAATAC

Tabelle 7: Oligonukleotide der guide RNAs

2.6.2 Oligonukleotide der tag-Sequenzen

Tag-Sequenz	Sequenz (5'-3')
C072_1xHA_fw	AATTCAGGGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTGAGG
C072_1xHA_rv	CGCGCCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGATGGGTACCCTGG
C072_3xFLAG_fw	AATTCACCCGGGGATTATAAGGATCATGATGGTGATTATAAGG ATCATGATATCGACTACAAAGACGATGACGACAAGTGAGG
C072_3xFLAG_rv	CGCGCCTCACTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCGATATCATGAT CCTTATAATCACCATCATGATCCTTATAATCCCCGGGTGG
C072_3xHA_fw	AATTCAGGGTACCCGATGATGTTCCGGATTACGCTGGCTAC CCATACGACGTCCCAGACTACGCTGGCTACCCATACGACGTCC CAGACTACGCTTGAGG
C072_3xHA_rv	CGCGCCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGATGGGTAGCCAGC GTAGTCTGGGACGTCGATGGGTAGCCAGCGTAATCCGGAACA TCATACGGGTACCCTGG
C072_SPOT_fw	AATTCAGGGCCAGACCGCGTGCGCGCTGAGCCATTGGAG GCAGCTGAGG

C072_SPOT_rv	CGCGCCTCAGCTGCTCCAATGGCTCACGGCGCGCACGCGGTC TGGCCCTGG
--------------	---

Tabelle 8: Oligonukleotide der tag-Sequenzen

2.6.3 Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz (5`-3`)
BGH-rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
C047-Agel-fw	ATCACCGGTCCCATGGCGCGCATGAAAAAGCC
C047-multi-rv	ATTCCTTGCGGTCCGAATGGGCC
C068-noStop- EcoRI-rv	CAGAATTCTGAAGAGCAGGGCCCCC
C069_GFP-KPNI- rv	AATGGTACCTTTGTAGAGCTCATCCATGC
C069-PCR-Wt- Spel-fw	TATACTAGTCACTGCGGGAGGCATTTTACCGCCAGAATCTTCCC
C47-EGFP-rv	GAAGACTGTTGCTTTGTAGAGCTCATCCATGCC
CMV-for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
EGFP-N-rev	GCTTGCCGTAGGTGGCATC
hU6-Seq-F	GGGCCTATTTCCCATGATTC
IRES-for	TAGGCGTGACGGTGGG
M13	TGTAAAACGACGGCCAG
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC
PEN1-737R	TCCAGCTCGACCAGGAT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
TET-CMV-for	CCTCCATAGAAGACACC

Tabelle 9: Sequenzierungsprimer

2.6.4 Primer für PCR

Name	Sequenz (5`-3`)
C56-XhoI-fw	ACTACTCGAGATGGCAATCAAATTTCTGG
C068-noStop- EcoRI-rv	CAGAATTCTGAAGAGCAGGGCCCCC
C069_GFP-KPNI- rv	AATGGTACCTTTGTAGAGCTCATCCATGC
C069-PCR-Wt- Spel-fw	TATACTAGTCACTGCGGGAGGCATTTTACCGCCAGAATCTTCCC
C069_PCR-RC- Spel-fw	TATACTAGTCACTGCGGGAGGCATTTTACTGCCAGAATCTTCCC

Tabelle 10: Primer für PCR

2.7 Vektoren

2.7.1 Entry-Vektoren

Name	Referenz
pENTR-MCS	AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTRMCS-Se61 α 1Wt-SPOT	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTRMCS-Sec61 α 1R236C-1xHA	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTRMCS-Sec61 α 1R236C-3xFLAG	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTRMCS-Sec61 α 1R236C-3xHA	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTRMCS-Sec61 α 1R236CNostopp	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTRMCS-Sec61 α 1Wt-3xHA	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTRMCS-Sec61 α 1WtNostopp	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTR-Sec61 α 1	Franziska Rodner, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pENTR-Sec61 α 1-R236C	Franziska Rodner, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster

Tabelle 11: *Entry*-Vektoren

2.7.2 Destination-Vektoren

Name	Referenz
pcDNA-DEST47	Invitrogen Katalognr. 12281-010, Carlsbad, CA, USA
pEGG2Hamp1	Pavel Nedvetsky (Versuch UKM131-1.1), AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pEpi-CuoGate-GFP	System Biosciences, CA, USA, EEV610A-1, Gateway-Kassette eingefügt von AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pINDUCER21-GFP	Addgene Plasmid Nr. 46948, eGFP-Marker durch Puro.-Resistenzgen ausgetauscht durch AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster

Tabelle 12: *Destination*-Vektoren

2.7.3 Expressionsvektoren

Name	Referenz
mCherry-GalNAc	AG Wedlich-Söldner, Universitätsklinikum Münster
mCherry-Sec61 β	Addgene Plasmid Nr. 49155
pcDNA-DEST47-Sec61 α 1R236C-1xHA	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pcDNA-DEST47-Sec61 α 1R236C-3xFLAG	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster

pcDNA-DEST47-Sec61α1R236C-3xHA	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pcDNA-DEST47-Sec61α1R236C-GFP	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pcDNA-DEST47-Sec61α1Wt-3xHA	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pcDNA-DEST47-Sec61α1Wt-GFP	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pcDNA-DEST47-Sec61α1Wt-SPOT	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pEGG2Hamp1-Sec61α1R236C-GFP	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pEGG2Hamp1-Sec61α1Wt-GFP	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pEpi-CuoGate-Sec61α1R236C-GFP	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pEpi-CuoGate-Sec61α1Wt-GFP	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pEpi-EGFP	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss Plasmid Nr. 050-08121 EGFP eingefügt von Lars Schmitz, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster

Tabelle 13: Expressionsvektoren

2.7.4 Vektoren zur lentiviralen Transduktion

Name	Referenz
pINDUCER21-Sec61α1-GFP	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
psPAX2	Addgene Plasmid Nr. 12260, AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster
pMD2.G VSVG	Addgene Plasmid 12259, AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster

Tabelle 14: Vektoren zur lentiviralen Transduktion

2.7.5 Vektoren zur Geneditierung mittels CRISPR/Cas9-System

Name	Beschreibung	Referenz
px459	Vektor mit Cas9-Sequenz und Schnittstellen zur Insertion von sgRNA	Addgene Plasmid Nr. 62988
pEGG2Hamp1-KnockinSec61α1Wt-GFP	Vektor für integrationsbasiertes Rescue mit Teilsequenz von Sec61α1Wt, GFP- <i>getaggt</i>	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
pEGG2Hamp1-KnockinSec61α1R236C-GFP	Vektor für integrationsbasiertes Rescue mit Teilsequenz von Sec61α1RC, GFP- <i>getaggt</i>	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
px459-Locusguide	Vektor mit Cas9-Sequenz und sgRNA für Sec61α1-Locus	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster
px459-Donorguide	Vektor mit Cas9-Sequenz und sgRNA für Sec61α1-Knock-in-Locus	Jana Krader, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster

Tabelle 15: CRISPR/Cas9- & Knock-in-Vektoren

2.8 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Hersteller (Referenznummer)
Flag-Tag	Kaninchen		1:250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (F2555)
GFP	Maus	1:500		Santa Cruz (B-2, sc-9996), Heidelberg
GFP	Kaninchen	1:1000	1:250	Chromotek (Pabg1), Martinsried
GFP	Ziege		1:500	Rockland Immunochemicals Inc. (600-101-215), Gilbertsville, PA, USA
HA-Tag	Maus		1:500	Abcam (16B12, Lot 130275), UK
Sec61α1	Ziege	1:1000	1:100	Novus biologicals (NB100-768), USA
Sec61α1	Kaninchen	1:1000	1:100	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MS, USA (14867S)
Sec61α1	Kaninchen	1:1000	1:100	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt (PA5-21773)
Spot-Label ATTO-488	Alpaca		1:1000 1:10.000	Chromotekt (ema488-10, 80213028AT1), Martinsried
ZO-1	Ratte		1:200	Santa Cruz (sc-33725), Heidelberg

Tabelle 16: Primäre Antikörper

2.9 Sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Konjugat	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Hersteller
Kaninchen IgG		HRP	1:2000		Aligent, Californien, USA
Maus IgG	Ziege	HRP	1:2000		Aligent, Californien, USA (P0447)
Maus IgG (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 488		1:500	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Maus IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 568		1:500	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ratte IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 568		1:500	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ratte IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 647		1:500	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ziege IgG	Kaninchen	HRP	1:2000		Aligent, Californien, USA (P0449)
Ziege IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 488		1:500	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ziege IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 647		1:500	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Kaninchen IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 568		1:500	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Streptavidin		Alexa Fluor 568			Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt (S11226)

Tabelle 17: Sekundäre Antikörper

2.10 Bakterien

Spezies	Genotyp	Hersteller
DH5α		New England Biolabs Inc.; kompetente Bakterien wurden im Labor generiert

Tabelle 18: Bakterien

2.11 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturbedingungen	Medium	Referenz
MDCK II	Distale Tubuluszellen aus <i>Canis familiaris</i> (<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>)	5% CO ₂ , 37°C	EMEM 1% P/S 5% FCS 1% Ala/ Gln	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
HeLa	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	5% CO ₂ , 37°C	DEMEM <i>low glucose</i> 10% FCS 1% P/S	American Tissue and Cell Collection
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzellen	5% CO ₂ , 37°C	DEMEM <i>low glucose</i> 10% FCS 1% P/S	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster

Tabelle 19: Eukaryotische Zelllinien

2.12 Kommerzielle Zellkulturmedien

Medium	Hersteller
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DEMEM)- Low glucose (1g/L)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Minimum Essential Medium Eagle (EMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 20: Kommerzielle Zellkulturmedien

2.13 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
innuPREP DOUBLEpure Kit (für DNA Reinigung aus Agarosegel oder PCR-/Restriktionsverdau-Reaktionen)	Analytik Jena Innuscreen GmbH, Berlin
Monarch Plasmid Miniprep Kit T1010G	BioLabs Inc., New England
NucleoBond PC100, Midi Kit für transfektionsgeeignete Plasmid DNA Isolation	Macherey-Nagel, Düren

Tabelle 21: Kommerzielle Kits

2.14 Software

Programmname	Hersteller
PubMed (U.S. National Library of Medicine/ National Institutes of Health) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
Picodrop Application v.3.1.5.0	© Picodrop Limited, Hinxton, UK
Microsoft Office Professional Plus 2019	© 2019 by Microsoft Cooperation
Snap Gene ® Viewer 5.0.8	© 2020 GSL Biotech LLC
Citavi 6.4	© Swiss Academic Software GmbH, Schweiz
ImageJ 1.53c	© 2016 by Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
GraphPad Prism 9, Version 9.0.1, Januar 21, 2021	© 1992-2021 by GraphPad Soft-ware, Inc., USA

Tabelle 22: Software

3 Methoden

3.1 Methoden der Mikrobiologie

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

3.1.1.1 Minipräparation

Zur schnellen Gewinnung kleiner Mengen von Plasmid-Desoxyribonucleinsäure (Plasmid-DNA) nach erfolgter Klonierung und Transformation wurden einzelne Klone der Bakterien in Flüssigkultur (LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika) überführt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 1,8 ml der Übernachtskultur für eine Minute bei 14.800 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden mit 100 µl P1 Puffer (s. Tabelle 4) resuspendiert. Dies diente der Destabilisierung der Bakterienzellmembran mittels EDTA und degradierte störende Ribonukleinsäure (RNA) mittels enthaltener RNase. Zelllyse und Denaturierung von Proteinen und DNA erfolgte durch eine alkalische Verseifung verursacht durch Zugabe von 200 µl Puffer P2. Nachfolgendes Hinzufügen von 150 µl Puffer P3 erzeugte durch Neutralisation des pH-Wertes mittels Kaliumacetats eine Renaturierung der Plasmid-DNA bei gleichzeitiger Ausfällung der zellulären Proteine, Membranen und chromosomaler DNA. Die Reaktionsgefäße wurden nach jedem Schritt mehrfach umgedreht, um eine gute Durchmischung zu erreichen. Nun wurden die Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA 6 min bei 14.800 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 900 µl Ethanol und erneuter Zentrifugation bei 14.800 rpm für 12 min bei 4 °C ausgefällt. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 3 min bei 14.800 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl Elutionspuffer (Macherey-Nagel, Düren) oder in H₂O resuspendiert.

Wenn eine DNA-Präparation höherer Reinheit gewünscht war, wurden wahlweise Plasmid-DNA Midi-Präparationen angefertigt oder die Mini-Präparation mit dem Kit *Monarch Plasmid Miniprep Kit T1010G* (BioLabs Inc., New England) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.1.2 Midipräparation

Zur DNA-Plasmidpräparation in größeren Mengen und höherem Reinheitsgrad wurde das *NucleoBond PC100 Midi-Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde am Vortag eine Flüssigkultur von 100-200 ml der transformierten Bakterienkolonien angesetzt.

3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurden pro zu transformierender DNA 50 µl *E.coli* DH5α Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA versetzt (2 µl einer LR-Klonierung oder 4 µl eines Ligationsansatzes) und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock. Dafür wurden die Bakterien für 45 sec einer Temperatur von 42°C ausgesetzt. Zur Regeneration und erstmaligen Ausbildung der Antibiotikaresistenz schloss sich eine Erholungsphase von 30 min bei 37 °C nach Zugabe von 250 µl LB-Medium an. Abschließend wurde die Bakteriensuspension zur positiven Selektion der transformierten Klone auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.3 Kryokonservierung von Bakterien

Um die in dieser Arbeit generierten Vektoren jederzeit reproduzieren zu können, wurden Glycerolstocks der nach Transformation positiv selektierten Bakterien angelegt. Dazu wurden die Bakterien 1:1 mit Glycerol versetzt und mit der Pipette gut vermischt. Die Glycerol-Bakteriensuspension wurde bei -80 °C kryokonserviert.

3.2 Methoden der Molekularbiologie

3.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm mittels Spectrophotometer (Pico 100). Dazu wurde das Spectrophotometer zunächst mit dem gleichen Lösungsmittel geeicht, dass auch zur Resuspension der nach 3.1.1. gewonnen DNA genutzt wurde. Einer optischen Dichte₂₆₀ (OD) von 1 entsprechen ca. 50 µg/ml doppelsträngige DNA. Zusätzlich wurde das Verhältnis von einer Absorption bei den Wellenlängen von 260 nm (Detektion von Nukleinsäuren) und 280 nm (Detektion von Proteinen) bestimmt, um Aussagen über den Reinheitsgrad der gewonnen DNA zu treffen. Bei guter Reinheit liegt das Verhältnis zwischen 1,7 und 2,0.

3.2.2 DNA-Restriktionsverdau

Bei einem enzymatischen Restriktionsverdau von DNA werden Restriktionsendonukleasen genutzt, um doppelsträngige DNA (dsDNA) an spezifischen Palindromsequenzen aufzuschneiden. Dies kann genutzt werden, um den Klonierungserfolg zu überprüfen, oder um Vektoren und Inserts für eine Klonierung vorzubereiten. Im ersten Fall wurden die durch den Verdau entstandenen DNA-Fragmente über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit den *in silico* errechneten Längen verglichen. Im zweiten Fall wurden Vektor und Insert mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Enzyme erzeugen für diesen Zweck *sticky ends* (3'- und 5'-Basenüberhänge an den Enden der DNA-Fragmente). Durch die Verwendung des gleichen Restriktionsenzym bei Vektor und Insert sind die *sticky ends* dabei zueinander komplementär, sodass das Insert sich an die Basenüberhänge des Vektors anlagern und im Laufe der Ligation kovalent mit diesem verbunden werden kann. Durch Nutzung zwei verschiedener Restriktionsendonukleasen kann zusätzlich die Orientierung des Inserts im Zielvektor bestimmt werden.

Analytische Restriktionsansätze zur Kontrolle von Klonierungen:

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden standardmäßig 5 µl einer DNA Minipräparation mit je 0,5 µl der ausgewählten Restriktionsenzyme verwendet. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug jeweils 20 µl. Zunächst wurden 2 µl des vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffers mit Aqua dest. verdünnt und anschließend mit der DNA und den gewählten Restriktionsenzymen versetzt. Bei Verwendung mehrerer Restriktionsenzyme wurde das vom Hersteller empfohlene Konzentrationsverhältnis der Enzyme zueinander beachtet. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 37 °C für mindestens eine Stunde.

Restriktionsansätze zur Vorbereitung von Klonierungen:

Zum präparativen Restriktionsverdau von PCR-Reaktionsansätzen wurden diese zunächst aufgereinigt und anschließend 26-32 µl von diesen mit je 0,5 µl der gewählten Restriktionsenzyme und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer versetzt. Bei Verwendung von reinen Vektoren wurden 2 µg DNA mit Restriktionsenzymen und entsprechendem Puffer benutzt. Alle Ansätze wurden für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von restriktionsenzymverdauten DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe wurde das Verfahren einer Agarosegelelektrophorese genutzt. Die Methode basiert darauf, dass die, bei neutralem pH-Wert, polyanionischen DNA-Fragmente je nach Größe unterschiedlich schnell durch die Poren der Gelmatrix zur Anode wandern. Dabei können kleinere DNA-Fragmente das Gel schneller durchwandern als größere. Die Agarosekonzentration des Gels ist daher nach der Größe der zu erwartenden DNA-Moleküle auszuwählen. Zusätzlich wurden die Gele zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht mit Ethidiumbromid versetzt.

In der vorliegenden Arbeit sind Gele mit 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet worden. Vor dem Auftragen auf das Gel, wurden die Proben mit Blaumarker versetzt. Parallel zu den Proben der Restriktionsansätze lief ein 1 kb DNA-Größenstandard. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100-130 mV in 20-60 min. Zur Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht wurde ein Transilluminator genutzt.

3.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR- oder Restriktionsverdau-Reaktionsansätzen erfolgte mithilfe des *innuPREP DOUBLEpure* Kit (Analytik Jena Innuscreen GmbH, Berlin) nach Herstellerangaben.

3.2.5 Ligation von DNA

Mithilfe der Ligation können zwei DNA-Moleküle (z.B. Vektor und Insert) kovalent miteinander verbunden werden. Dabei wurden Vektor und Insert zuvor mit dem/ den gleichen Restriktionsenzym/en geschnitten, sodass sich die komplementären Basenüberhänge an den Enden der DNA-Fragmente zusammenlagern und deren Zucker-Phosphat-Rückrad über Katalyse von Phosphodiesterbindungen durch die Ligase verbunden wurde. Vor Ansatz der Ligation wurde der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. In manchen Fällen konnte, aufgrund von Unzugänglichkeiten der Apparaturen durch Sars-CoV2 bedingte Arbeitseinschränkungen, keine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt werden. Dann wurde der Restriktionsansatz lediglich gereinigt. Die DNA-Fragmente sind in einem Verhältnis von 1:3–1:5 (Vektor: Insert) mit 1 µl T4-Ligase (5 U/µl) und 2 µl Ligasepuffer (10x) in einem Endvolumen von 20 µl für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert worden.

3.2.6 Gateway Klonierung

Neben der Restriktions-Ligations-Klonierung (s. 3.2.2, 3.2.5) gibt es die Möglichkeit spezifische DNA-Sequenzen mittels einer Gateway Klonierung in einen Vektor zu integrieren (s. Abbildung 5). Dabei ergeben sich folgende Unterschiede zur Restriktions-Ligations-Klonierung. Das System der Gateway Klonierung basiert auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Hierzu werden Zielsequenz tragende *Entry*-Vektoren mit *Destination*-Vektoren in einer LR-Reaktion rekombiniert. Der Entry Vektor enthält die Zielsequenz flankiert von attL-Rekombinationsstellen, während die attR-Rekombinationsstellen des Zielvektors das ccdB-Gen umschließen. Bei diesem Gen handelt es um eine Selbstmordgen, da es für ein toxisches Protein codiert und das Wachstum der meisten Bakterienstämme inhibiert. Dieses dient im weiteren Verlauf der doppelten Selektion. Das von attR-Rekombinationsstellen umschlossene ccdB-Gen wird Gateway-Kassette genannt. Der Enzym-Mix LR Clonase® II katalysiert spezifisch die Rekombination der attL- und attR-Sequenzen (bezeichnet als LR-Reaktion), mit dem Ergebnis einer attB flankierten Zielsequenz in einem Expressionsvektor und eines attP flankierten ccdB-Gen tragenden Plasmids als Nebenprodukt. (Abb. 1) Die doppelte Selektion der positiven Klone erfolgt durch die Antibiotikaresistenz auf dem *Destination*-Vektor und das Absterben der ccdB-Gen tragenden Bakterien. Die Reaktion ist mittels der BP-Klonase umkehrbar. Genutzt wird die BP-Klonase zur Herstellung der Entry-Vektoren. Diese mussten in dieser Arbeit nicht selbst generiert werden.

Zur Durchführung der LR-Klonierung wurden jeweils 2 μ l des *Entry*-Vektors (Konzentration 75 ng/ μ l) und 2 μ l des *Destination*-Vektors (Konzentration 75 ng/ μ l) mit 1 μ l LR Clonase® II mindestens zwei Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Alle verwendeten *Entry*- und *Destination*-Vektoren sowie die daraus generierten Expressionsvektoren sind unter 2.7 aufgelistet.

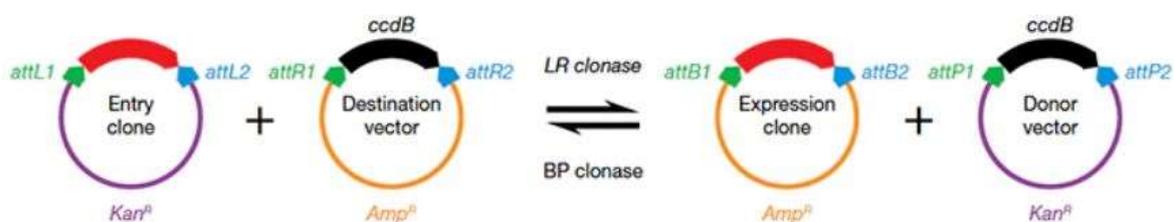


Abbildung 5: Übersicht der Gateway Klonierung

Die rot markierte Zielsequenz befindet sich zunächst flankiert von attL-Rekombinationsstellen in einem *Entry*-Vektor. Der Zielvektor (*Destination*-Vektor) trägt das Sterbegen ccdB flankiert von attR-Sequenzen. Die att-Stellen werden durch den Enzym-Mix LR Clonase® II nun spezifisch miteinander rekombiniert. Es entsteht ein Expressionsvektor mit der Zielsequenz umschlossen von attB-

Rekombinationsstellen und ein Plasmid, das die Sterbekassette *ccdB* trägt, als Nebenprodukt. Zur Selektion tragen die Expressionsvektoren hier eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp). Durch das Selbstmordgen im Nebenprodukt wachsen auf Ampicillin positiven Agarplatten somit letztendlich nur die Bakterien, die erfolgreich rekombinierte Plasmide aufgenommen haben. Kan = Kanamycin-Resistenzkassette (Quelle: Abbildung übernommen von Katzen 2007)

3.2.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde in dieser Arbeit für zwei unterschiedliche Modifikationen der Sec61 α 1-Sequenz angewandt. Einerseits diente sie zu Entfernung des Stopcodons der Sec61 α 1-Sequenz auf den Vektoren pENTRSec61 α 1/ pENTRSec61 α 1-R236C. Dazu wurde der Rückwärts-Primer so ausgewählt, dass das Stopcodon bei der Amplifizierung der Sec61 α 1-Sequenz entfällt (PCR-Reaktion 1 Tabelle 23). Anschließend konnte Sec61 α 1 mit Protein-Tags markiert werden. Andererseits wurden Sec61 α 1-Konstrukte generiert, die zum integrationsbasierten Rescue von Sec61 α 1-Knockout Zellen dienen können (PCR-Reaktion 2 Tabelle 23). Allgemein wird bei einer PCR zunächst dsDNA durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert, sodass anschließend temperaturabhängig spezifische, komplementäre Oligonucleotid-Primer jeweils an den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts binden können. Die Primer, die für die Amplifizierung von Klonierungsfragmenten benötigt werden, sind an ihren terminalen Enden mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen. Nach der ersten Phase der Anlagerung der Primer an die DNA (*Annealing*), folgt die Verlängerung/ Elongation des Primers mit einzelnen Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) komplementär zur vorliegenden DNA-Matrize bei 72 °C durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Durch mehrfaches Durchlaufen der drei Phasen der Denaturierung, Annealing und Elongation, wächst die Menge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz exponentiell. Die Amplifizierung der DNA wurde im Weiteren mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die verschiedenen PCR-Ansätze sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Name	Template	Primer (Tabelle 9)
PCR 1.1	pENTRSec61 α 1	C056-XhoI-fw C068-EcoRI-rv
PCR 1.2	pENTRSec61 α 1-R236C	C056-XhoI-fw C068-EcoRI-rv
PCR 2.1	pcDNAdest47-Sec61 α 1Wt-GFP	C069-GFP-KpnI-rv C069-PCR-Wt-SpeI-fw
PCR 2.2	pcDNAdest47-Sec61 α 1Wt-GFP	C069-GFP-KpnI-rv C069-PCR-RC-SpeI-fw

Tabelle 23: Übersicht PCR-Ansätze

Das Pipettierschema gestaltete sich immer nach dem gleichen Muster:

DNA-Template	50 ng
Vorwärts-Primer (10 µM)	1 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
Accu Puffer (10x)	5 µl
Accuzyme™ DNA Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Die Reaktionszyklen erfolgten wie nach Tabelle 24:

Prozess	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	3 min	1 x
Denaturierung	95 °C	15 sec	42 x
Primer-Anlagerung	55 °C / 65 °C	15 sec	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

Tabelle 24: PCR-Reaktionszyklen

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Überprüfung der Korrektheit neu generierter DNA-Konstrukte dieser Arbeit wurde durch Sequenzierung in Auftragsarbeit bei der Firma Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen) gewährleistet.

3.2.9 Geneditierung mittels CRISPR/Cas 9 System

Das CRISPR/Cas9-System ist eine molekularbiologische Methode zur zielgerichteten Veränderung von DNA, die erstmals 2012 von Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna veröffentlicht wurde (Jinek et al. 2012). Es basiert auf einem adaptiven Abwehrmechanismus von Bakterien und Archea zur RNA-vermittelten DNA-Degradation von viraler oder Plasmid-DNA in der Wirtszelle. CRISPR ist dabei die Abkürzung für *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, ein Teil des CRISPR-Genlocus, der CRISPR Array, in den Fragmente der eingedrungenen Fremd-DNA als *Spacer*-Motiv integriert werden. Diese dienen nach Transkription und Prozessierung durch eine *trans-activating* CRISPR-RNA (tracrRNA) als

guide RNA (genannt crRNA) für die Cas9, ein als Endonuklease funktionierendes Ribonukleoprotein. Der Komplex aus trcrRNA, crRNA und Cas9 lagert sich an die zur crRNA komplementäre DNA-Zielsequenz an. Hier kommt es drei Basenpaare aufwärts des *protospacer-adjacent motif* (PAM) -Motivs (*protospacer-adjacent motif*) durch die Endonukleaseaktivität der Cas9 zu einem Doppelstrangbruch der DNA. Dies führt zur Zerstörung der eingedrungenen DNA. Bei Nutzung des CRISPR/Cas9-Systems zur Gen-Editierung in eukaryotischen Zellen, setzen in diesem Fall zelluläre Reparaturmechanismen ein. Die Zelle kann mit zwei möglichen Mechanismen reagieren: nicht-homologe Rekombination (*nonhomologous end joining*, NHEJ) und homologe Rekombination (*homology directed repair*, HDR). Während eine Reparatur der DNA über HDR relativ fehlerfrei geschieht, dafür aber nur in Mitose und mit Vorlage eines Reparaturtemplates möglich ist, kommt es bei dem fehleranfälligeren NHEJ häufig zu Indel-Mutation (Insertionen und Deletionen), die zur Leserasterverschiebung und damit zum frühzeitigen Ablesestopp führen (Aleksandrov et al. 2020). Dies führt zu einem *Knockout* des Zielproteins. Erfahrungen aus unserem und anderen Laboren zeigen, dass HDR wesentlich ineffektiver ist und wesentlich seltener vorkommt als NHEJ, sodass eingeführte Doppelstrangbrüche über das CRISPR/Cas9-System eine effektive Methode zum *Knockout* der Genexpression eines ausgewählten Proteins darstellen (Jiang und Doudna 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vektor verwendet, der eine *single guide* RNA (sgRNA) mit DNA-Zielsequenz des Sec61 α 1-Gens sowie Cas9 zum *Knockout* des entsprechenden Proteins enthält. Die sgRNA ist eine künstlich hergestellte RNA-Sequenz aus Sequenzen der crRNA und trcrRNA.

3.2.10 Generierung von Konstrukten für ein Protein-*Knockout* mit CRISPR/Cas9

3.2.10.1 Hybridisierung „*Annealing*“ und Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Im ersten Schritt zur Herstellung des Vektors für ein *Knockout* des Sec61 α 1-Gens in MDCKII-Zellen wurden die als sgRNA fungierenden Oligonukleotidsequenz-Einzelstränge (C069_Locusguide_fw, C069_Locusguide_rv, s. Tabelle 6) phosphoryliert und komplementär aneinander angelagert. Die Phosphorylierung der Enden der RNA-Fragmente unterstützte die folgende Ligation der Fragmente mit dem Vektor. Vorgegangen wurde nach folgendem Protokoll:

8 μ l *forward*-Oligo (100 μ M)

8 μ l *reverse*-Oligo (100 μ M)

2 μ l 10x Polynukleotidkinase Puffer

1 µl 5mM ATP

1 µl Polynukleotidkinase

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dies ist die Phase der enzymatischen Phosphorylierung. Anschließend wurde der Ansatz zur Auflösung bestehender Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Oligonukleotiden für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Hybridisierung (komplementäre Anlagerung beider Einzelstränge) fand während des folgenden langsamen Abkühlens des Reaktionsansatzes statt. Gelagert wurde das erstellte DNA-Fragment bei -20 °C.

Dieses Protokoll wurde auch zur Generierung der DNA-Fragmente verwendet, die kurze Protein-Tags kodieren (s. 3.2.11).

3.2.10.2 Vektorverdau und Ligation

Um die in 3.2.10.1 erstellte DNA-Teilsequenz des späteren sgRNA-Moleküls in den Cas9 kodierenden Vektor (px459, s. Tabelle 14) zu klonieren, wurde ein Ansatz gewählt, indem Verdau und Ligation gleichzeitig stattfinden. Dies ist möglich, da das Produkt der Ligation von der Restriktase nicht mehr erkannt wird. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µl (entspricht 50 ng) px459 Vektor

0,5 µl hybridisierte Oligonukleotide

1 µl 10x T4 Ligase Puffer

0,5 µl BbsI

0,5 µl T4 Ligase

6,5 µl H₂O

Dem Temperaturoptimum der Ligase von Raumtemperatur und dem Temperaturoptimum des Restriktionsenzym BbsI von 37 °C entsprechend, wurde der Ansatz wie nach Tabelle 25 inkubiert.

Zeit		Temperatur
5 min	31 Zyklen	37 °C
5 min		23 °C
∞		-20 °C

Tabelle 25: Restriktionsverdau und Ligation des CRISPR/Cas9 Vektors

Anschließend wurde der Vektor in E.coli DH5α Stammes transformiert und die Plasmide (px459-Locusguide) wie nach 3.1.1 isoliert.

3.2.11 Markieren von Proteinen mit *tag*-Sequenzen

Um das ektope Sec61 α 1-Protein und die untersuchte Mutante antikörperunabhängig detektieren zu können, wurden an das C-terminale Ende der DNA-Sequenz des Sec61 α 1-Proteins kurze DNA-Sequenzen angefügt. Diese kodieren für Epitope, die von kommerziell erwerbbaaren Antikörpern erkannt werden können. Voraussetzung für die Expression eines Fusionsproteins aus Sec61 α 1 und Protein-*tag* ist die einheitliche Transkription beider Sequenzen in eine gemeinsame mRNA. Um dies zu ermöglichen wurde, wie in 3.2.7 beschrieben, das Stoppcodon am Ende der Sec61 α 1-Sequenz (in der wildtypischen und mutierten Variante) mittels einer PCR entfernt. In einem zweiten Schritt wurden die zwei Einzelstrangoligonukleotide eines Protein-*tags* (s. Tabelle 8) wie nach 3.2.10.1 aneinander angelagert und phosphoryliert. Die dabei entstandenen doppelsträngigen DNA-Fragmente, die jeweils für ein Protein-*tag* kodieren, bildeten an jeder Seite *sticky ends*. Diese wurden so designt, dass sie komplementär zu den am Ende der Sec61 α 1-Sequenz befindlichen Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Ascl* und *EcoRI* auf den Vektoren pENTRMCS-Sec61 α 1Wt-/R236CNoStopp waren. Nach Integration der *tag*-Sequenzen dienten diese Vektoren als *Entry*-Vektor für Gateway Klonierungen mit dem *Destination*-Vektor pcDNA-DEST47. Zur Integration wurden Restriktions-Ligations-Klonierungen nach folgendem Muster durchgeführt: 5 μ l der Vektoren wurden in je einem Ansatz mit je 0,5 μ l der genannten Restriktionsenzyme und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Endvolumen von 20 μ l für 2 Stunden bei 37 °C verdaut. Anschließend erfolgte die Ligation der verdauten Vektoren mit den Protein-*tag* kodierenden DNA-Fragmenten wie nach 3.2.5. Die generierten Vektoren wurden wie nach 3.1.1 isoliert und deren Korrektheit mittels Sequenzierung (s. 3.2.8) verifiziert.

Über eine Gateway-Klonierung (s. 3.2.6) wurden die so generierten *Entry*-Vektoren (s. Tabelle 11) mit dem *Destination*-Vektor pcDNA-DEST47 (s. Tabelle 12) rekombiniert. Die aus diesen Klonierungen hervorgegangen Expressionsvektoren der *getaggten* Sec61 α 1-Konstrukte sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die Markierung mit *green fluorescent protein* (GFP) erfolgte über den *Destination*-Vektor pcDNA-DEST47, der die kodierende Sequenz für GFP bereits enthält. Durch Entfernung des Stoppcodons der Sec61 α 1-Sequenz kann die im Vektor integrierte GFP-Sequenz zusammen mit der vorgeschalteten Sec61 α 1-Sequenz in eine mRNA transkribiert werden. GFP befindet sich in diesem Fall am C-Terminus von Sec61 α 1.

3.2.12 EdU-Assay

Zur Detektion von proliferierenden Zellen in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus wurde ein 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)-Assay durchgeführt. Das Thymidinanalogon EdU wird während der Replikation in die zelluläre DNA eingebaut (Salic und Mitchison 2008). Durch nachfolgende Markierung des Nukleosids mit einem Fluoreszenzfarbstoff konnte in einer anschließenden Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) der Anteil proliferierender Zellen bestimmt werden, die zugleich Konstrukte des Sec61 α 1-Proteins transient exprimierten. Dazu wurden die zu untersuchenden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, 24 h nach Aussaat mit den Vektoren pEpi-CuoGate-Sec61 α 1Wt/R236C-GFP (s. Tabelle 13) transfiziert und 24h nach Transfektion mit 10 μ M EdU für 2 h bei 37 °C inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen fixiert und geblockt wie nach 3.3.3. Im nächsten Schritt wurde Azid-modifiziertes Biotin über die Kupfer(II)-katalysierte Click-Reaktion kovalent an EdU gebunden. Die Click-Reaktion ist eine Azid-Alkin-Cycloaddition in der es zur Bildung eines stabilen Triazol-Rings zwischen dem Biotin-gekoppelten Azid und dem Alkin EdU kommt. Katalysiert wird die Reaktion durch Oxidation von Cu(II)-Ionen mit Natriumascorbat als Reduktionsmittel (Salic und Mitchison 2008). Der Reaktionsmix für die Cycloaddition wurde folgendermaßen angesetzt und direkt nach Herstellung für 30 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben:

2 mM CuSO₂

5 μ M Azide-PEG3-Biotin

100 mM Natriumascorbat

PBS bis zum Zielvolumen

Es folgte im Anschluss 3 x 2 min Waschen der Zellen mit PBS und ein erneutes Blocken mit blocking Puffer IF für 15 min. Um das GFP-Signal der Sec61 α 1-Konstrukte zu verstärken, wurden die Zellen über Nacht mit einem GFP-Antikörper (Rockland 600-101-215, s. Tabelle 16) inkubiert. Dieser wurde 3 x 5 min mit PBST abgewaschen, bevor die sekundären Antikörper zu den Zellen gegeben wurden. Verwendet wurden dazu Streptavidin-Alexa Fluor-568, DAPI und Ziege-anti-GFP-488 verdünnt in *blocking* Puffer IF (s. Tabelle 17). Streptavidin ist ursprünglich ein bakterielles Protein. Es bindet Biotin mit sehr hoher Affinität und wird in diesem Essay als Träger des Fluoreszenzfarbstoffes, anhand dessen nachher das EdU detektiert werden kann, verwendet. Die sekundären Antikörper wurden 30 min-1 h abgedeckt auf dem Schüttler mit den EdU-behandelten Zellen inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen und Einbetten der Zellen wie nach dem IF-Protokoll unter 3.3.3.

3.3 Methoden der Proteinbiochemie

3.3.1 Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zum Nachweis von spezifischen Proteinen und deren Konzentrationsunterschieden in Zelllysaten wurden diese anhand ihrer molekularen Größe in diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt. Bei der Herstellung von Zelllysaten (s. 3.4.4) denaturieren die Proteine und liegen anschließend in ihrer Primärstruktur als Aminosäurekette vor. Das im Laemmli-Probenpuffer enthaltene SDS dient als anionische Detergenz, welches sich an die Aminosäureketten anlagert und ihnen eine zur Größe proportionale negative Ladung verleiht. Somit erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine im Gel anhand ihrer Größe. Trenn- und Sammelgele wurden nach in Tabelle 26 angegebener Rezeptur gegossen. Die Gele besitzen unterschiedliche pH-Werte und Polyacrylamidkonzentrationen. Dabei ist das pH neutrale, grobporigere Sammelgel für alle Proteine gleich schnell zu durchwandern. Die Größenauftrennung der Proteine beginnt im basischen, feinporigen Trenngel. Kleine Proteine können hierbei die Poren des Trenngels schneller passieren als größere. In der Herstellung wurden zunächst die Trenngele in Gelkassetten gegossen und nach vollständiger Polymerisation mit den Sammelgelen aufgefüllt. In diesen diente ein Plastikkamm zur Aussparung der Probenaschen. Neben den Proben wurde ein Proteingrößenstandard (*Page Ruler Plus*) aufgetragen. Blieben ungenutzte Probenaschen übrig, wurden diese mit Probenpuffer aufgefüllt. Pipettiert wurden 15 µl Zelllysate/Lämmli-Probenpuffer pro Probenasche. Vom Marker wurden standardmäßig 4 µl verwendet. Die Gelkammern wurden mit SDS Laufpuffer (1x) befüllt. Anschließend erfolgte die Elektrophorese im Sammelgel bei 100 mV und im Trenngel bei 180 mV. Der Prozess wurde gestoppt bevor die Lauffront des Markers das Gel an der Unterseite verlassen konnte.

Reagenz	Sammelgel 5% 2 ml = 1 Gel Volumina [ml]	Trenngel 8% 5 ml = 1 Gel Volumina [ml]	Trenngel 10% 5 ml = 1 Gel Volumina [ml]
dH ₂ O	1,4	2,3125	2
30% Acrylamidmix	0,33	1,3125	1,6875
1.5 M Tris pH 8,8	-	1,25	1,25
1 M Tris pH 6,8	0,25	-	-
10 % SDS	0,02	0,05	0,05
10 % APS	0,02	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,003125	0,001875

Tabelle 26: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

3.3.2 Western Blot Analyse

Die Western Blot (WB) Analyse dient zur immunologischen Detektion von Proteinen, die zuvor in einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden. In dieser Arbeit wurde das *semi-dry* Verfahren als Blotting-Methode angewendet. Dazu wurden zunächst pro Gel vier Filterpapiere und eine Nitrocellulose-Membran in Transferpuffer getränkt. Ausgehend von der Anode wurden zwei Filterpapiere, die Nitrocellulose-Membran, das Polyacrylamidgel und zwei weitere Filterpapiere übereinander geschichtet. Bei Auftreten von Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden diese vor dem Blotting Vorgang vorsichtig ausgestrichen. Durch Anlegen einer zum Gel senkrechten, elektrischen Spannung (1,0-1,2 mA/cm², entspricht ca. 72 mA pro Gel für 60-90 min) wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode und damit auf die Nitrocellulose-Membran zu. Auf der Membran werden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Nach Beendigung des Blotting-Vorgangs wurde die Membran für 30 min- 1 Stunde in WB-*blocking* Puffer auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen der primären Antikörper (AK) zu vermeiden. Diese wurden anschließend nach in Tabelle 16 angegebener Verdünnung über Nacht auf die auf dem Schüttler befindliche Membran gegeben. Vor Zugabe der sekundären Antikörper folgte ein Waschen der Membran mit TBST, i.d.R. 3 x 5 min. Die sekundären Antikörper sind gegen die Spezies der primären Antikörper gerichtet und mit *Horseradish Peroxidase*/Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Die Inkubation der Membran mit den verdünnten sekundären Antikörpern (s. Tabelle 17) erfolgte für 30 min-1 h auf dem Schüttler.

Anschließend wurde die Membran nochmals 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Zur abschließenden Immundetektion wurde die Membran mit dem Lumineszenzreagenz (*Clarity*) nach Herstellerangaben versetzt. Durch die enzymatische Reaktion der Meerrettichperoxidase mit dem Substrat entsteht Chemilumineszenz, die mithilfe eines Lumineszenzimagers detektiert wurde. Dies führte zur Visualisierung der mit dem Antikörper-Konjugat markierten Proteine.

3.3.3 In-vitro Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation ausgewählter Proteine fixierter Zellen wurden diese nach folgendem Protokoll angefärbt oder anhand ihrer Fluoreszenz, entstehend durch Expression eines Fusionsproteins aus Zielprotein und fluoreszierendem Protein-*tag* (z. B. im Falle von GFP oder mCherry), mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektiert. Analog zum WB, markiert zunächst ein spezifischer Primärantikörper das Zielprotein, an diesen anschließend Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper binden. Die Zellen wurden dazu auf Deckgläschen (DG) ausgesät. Zur Detektion der Zellkerne wurde standardmäßig der

Fluoreszenzfarbstoff DAPI (1mg/μl), der sich an DNA bindet, verwendet. Die Konzentrationen der verschiedenen primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 16 und 17 beschrieben.

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. Waschen | mit 1x PBS (RT) |
| 2. Fixieren | 10 min 4% PFA (RT) |
| 3. Permeabilisieren und Blocken | 30 min-1 h <i>blocking</i> Puffer IF (RT auf Schüttler) |
| 4. 1. AK | 2-18 h verdünnt in blocking Puffer IF (8 °C) |
| 5. Waschen | 3 x 5-10 min mit PBST |
| 6. 2. AK | 30 min-6 h verdünnt in blocking Puffer IF (RT, abgedunkelt auf Schüttler) |
| 7. Waschen | 3 x 5-10 min mit PBST |
| 8. Einbetten | pro DG 1 kleiner Tropfen Mowiol, DG vorher in Wasser tunken, abtropfen |
| 9. Aushärten | ca. 30 min bei 37 °C |

Entfiel das Markieren des Zielproteins/ der Zielproteine aufgrund von Eigenfluoreszenz des Zielproteins, wurden die Zellen nach der Fixierung 10 min mit DAPI abgedunkelt auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend setzte das Protokoll bei Schritt 7 ein.

3.4 Methoden der Zellkultur

3.4.1 Kultivieren und Passagieren verwendeter Zelllinien

Die verwendeten Zellenlinien wurden in 10 cm Zellkulturschalen bis zur Bildung eines konfluenten Zellrasens unter den für sie optimalen Bedingungen (Tabelle 19) kultiviert. Zur Passagierung der adhären wachsenden HeLa- und MDCKII-Zellen mussten diese mit 1x Trypsin/EDTA (T/E)-Lösung (verdünnt in PBS, Trypsin 0,5 g/l, EDTA 0,2 g/l) nach Absaugen des Kulturmediums und einmaligem Waschen mit PBS von der Zellkulturschale abgelöst werden. Es folgte eine Inkubationszeit bei 37 °C von 10-30 min abhängig vom Zelltyp. Der Ablöseprozess wurde durch eine Sichtkontrolle unter dem Lichtmikroskop überprüft. Gegebenenfalls wurde dieser mechanisch durch Umspülen mit der Pipette unterstützt. Die semi-adhären wachsenden HEK-Zellen mussten lediglich mit Medium von der Zellkulturschale abgespült werden, um sie zu übertragen. Abschließend wurde das gewünschte Volumen gelöster Zellen entnommen und auf eine neue Zellkulturschale mit vorgelegtem warmem Medium übertragen.

3.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur quantitativ genauen Aussaat der Zellen wurde die Zellzahl mithilfe von Luna™ automatischer Zellzähler bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension nach erfolgter Inkubation auf T/E-Lösung im gewünschten Volumen Zellmedium aufgenommen. Zur Auszählung wurden 10 µl der Zell-Medium-Lösung 1:1 mit Trypanblau (0,4 %) versetzt und auf ein Zellzähler Slide gegeben. Der Zellzähler berechnete die Gesamtanzahl an Zellen sowie der Anteil lebender und toter Zellen anhand der Aufnahme der Zellen von Trypanblau. Mit dem Ergebnis konnte die vorhandene Zellsuspension auf die gewünschte Zellzahl pro ml verdünnt werden. Bei der anschließenden Aussaat war darauf zu achten, dass die Zellen in dem Medium nach kurzer Zeit absinken, sodass das Gefäß der verdünnten Zellsuspension regelmäßig geschwenkt werden musste.

3.4.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung eukaryotischer Zellen wurden diese bei -80 °C eingefroren. Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert (s. 3.4.1), nach dem Ablösen zur Deaktivierung des Trypsins mit einer geringen Menge Medium versetzt und für 5 min bei 150 G abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in dem jeweiligen Gefriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das Gefriermedium der MDCKII-Zellen wurde aus 90% FCS und 10% DMSO hergestellt. Für HeLa-Zellen wurde das übliche Zellmedium (DMEM) mit 10% DMSO versetzt. Das DMSO im Gefriermedium dient als Kryoprotektivum, da es die Kristallbildung minimiert. Gleichzeitig kann DMSO Zellen bei höheren Temperaturen schädigen, sodass die Zellen nach Zugabe von DMSO möglichst schnell eingefroren werden sollten. Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einem Kryogefrierbehälter bei -80 °C eingefroren. Wenn die Zellen vor der Kryokonservierung negativ auf Mykoplasmen getestet wurden, sollten sie zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

3.4.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Untersuchung von zellulären Proteinen in der WB-Analyse ist eine vorherige Zelllyse notwendig. Dazu wurde Lämmli-Probenpuffer (2x) 1:1 mit Aqua dest. verdünnt und mit 30 µl/ml DTT (1M) versetzt. Das DTT beugt der Oxidation von SH-Gruppen vor und löst dadurch gleichzeitig Disulfidbrücken auf, wodurch die Proteine entfaltet werden. Das im Lämmli-Probenpuffer enthaltene SDS dient zur Denaturierung der Proteine und zur Vereinheitlichung der Ladung proportional zur Größe. Pro *well* einer 12-*well* Zellkulturschale wurden 250 µl von der angesetzten Lämmli-DTT Lösung auf die Zellen gegeben. Nachdem durch mechanisches Einwirken mit der Pipette viskose Zelllysate entstanden sind, wurden

diese in *safe lock tubes* überführt und für 5-10 min bei 95 °C abgekocht. Falls die Lysate nach dem Abkochen aufgrund zu hoher Viskosität nicht in die Probenaschen des Polyacrylamidgels überführt werden konnten, wurden sie über eine Kanüle durch eine Spritze gezogen und/oder ins Ultraschallbad gesetzt. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Lysate bei -20 °C gelagert.

3.4.4 Transiente Transfektion

In dieser Arbeit wurden HeLa- und MDCKII-Zellen transient transfiziert, um Lokalisationsstudien des Sec61 α 1-Proteins mittels IF durchzuführen oder die Expression des Proteins mittels Western-Blot zu quantifizieren.

Für anschließende Immunfluoreszenzstudien wurden je *well* 100.000 Zellen auf Deckgläschen in 24er-*well* Zellkulturschalen ausgesät. Die Transfektion folgte 2-24 h nach Aussaat. Der Transfektionsansatz für ein *well* wurde wie nach Tabelle 27 angesetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieser Tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. Danach folgte ein Ersatz des Transfektionsmediums mit dem jeweiligen Zellkulturmedium. Bei Erreichen der gewünschten Konfluenz (i.d.R. 48 h nach Transfektion) wurden die Zellen fixiert.

Transfektionsreagenz	DNA	OPTI-MEM	Zelllinie
Avalanche® 0,3 μ l	0,2 μ g	50 μ l	MDCKII
Metafectene 0,75 μ l	0,25 μ g	50- 100 μ l	HeLa
XtremeGene™ HP 0,75 μ l	0,25 μ g	100 μ l	HeLa

Tabelle 27: Transfektionsansätze für transiente Transfektionen und anschließende IF

Eine transiente Transfektion zur Generierung von Zelllysaten für eine SDS- Page mit anschließendem Western-Blot erfolgte nach folgendem Ansatz, der vor Zugabe ins Zellmedium 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde:

1,5 μ l XtremeGene™ HP

0,5 μ g DNA

100 μ l OPTI-MEM

HeLa-Zellen wurden zu 200.000 Zellen pro Well auf einer 12-*well*-Zellkulturschale ausgesät, 24 h später transfiziert, 24 h mit dem obigen Transfektionsansatz inkubiert und 48 h nach Transfektion lysiert.

3.4.5 Stabile Transfektion

Zur Herstellung von Zelllinien mit stabiler Überexpression von Sec61 α 1-Konstrukten wurden die Zielzellen auf einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und mit den ausgewählten Vektoren transfiziert. Die Transfektionsansätze und -bedingungen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (Angaben pro well):

Transfektionsreagenz	DNA	OPTI-MEM	Zelllinie, Zellzahl	Transfektionszeitpunkt
3,5 μ l Avalanche®	2,5 μ g	200 μ l	MDCKII, 500.000	24 h nach Aussaat
6,75 μ l Avalanche®	2 μ g	200 μ l	MDCKII, 750.00	3 h nach Aussaat
20 μ l K2 Multiplier 8 μ l K2 Transfektionsreagenz	2 μ g	200 μ l	MDCKII, 750.000	K2 Multiplier 1 h nach Aussaat, K2 Transfektionsreagenz 3 h nach Aussaat
6,75 μ l XtremeGENE™ HP	2,5 μ g	200 μ l	HeLa, 750.000	24 h nach Aussaat

Tabelle 28: Transfektionsansätze für stabile Zelllinien

Der Transfektionsansatz wurde standardmäßig 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und 24 h im Zellmedium belassen. Insgesamt 48 h nach Zellaussaat wurde die Antibiotika-basierte Selektion transfizierter Zellen gestartet. Dabei verleiht der eingesetzte Vektor mit Sec61 α 1-Konstrukt den transformierten Zellen Resistenz gegenüber dem Selektionsantibiotikum, sodass nur transformierte Zellen überleben konnten. Die Effizienz der Selektion ist mit einer Sterbekontrolle von untransfizierten oder transfizierten Zellen ohne Resistenzvektor überwacht worden. Zum Starten der Selektion wurden die Zellen auf 10 cm Schalen übertragen und mit dem jeweiligen Antibiotikamedium nach Tabelle 29 versetzt.

Vektor	Zelllinie	Antibiotikakonzentration
pDEST47-Sec61 α 1(Wt/R236C)-GFP	MDCKII	500 μ g/ml G418
	HeLa	800 μ g/ml G418
pEGG2Hamp1-UKM131-1.1.-Sec61 α 1(Wt/R236C)-GFP	MDCKII	250 μ g/ml Hygromycin
	HeLa	200 μ g/ml Hygromycin
pEpi-CuoGate-Sec61 α 1(Wt/R236C)-GFP	MDCKII	2,5 μ g/ml Puromycin

Tabelle 29: Selektionsmedien für stabile Zelllinien

Die antibiotikahaltigen Zellmedien wurden alle 3- 5 Tage gewechselt. Bei Erreichen von Konfluenz sind die Zellen wie nach 3.4.1 weiter passagiert worden, wobei sie dauerhaft in

antibiotikahaltigen Zellmedien kultiviert wurden. Mit diesem Vorgehen sollte gewährleistet werden, dass möglichst viele Zellen das Sec61 α 1-Konstrukt dauerhaft exprimieren.

3.4.6 CRISPR/Cas9 induziertes Sec61 α 1 *Knockout* mit konventionellem *Rescue*

Um eine Sec61 α 1-*Knockout* MDCKII-Zelllinie zu etablieren, wurde das CRISPR/Cas9-System angewandt. Funktionsweise und Herstellung dazu erforderlicher Konstrukte (s. Tabelle 15) sind unter 3.2.9 und 3.2.10 beschrieben. Da es sich bei Sec61 α 1 um ein essenzielles Protein handelt (Lang et al. 2012), muss der *Knockout* des endogenen Proteins nach kurzer Zeit durch ektopes Sec61 α 1 ersetzt werden. Dies wird als *Rescue* bezeichnet. Hierzu wurden die Zellen mit dem *Knockout* induzierenden Vektor (px459-Locusguide) und einem *Rescue*-Vektor kotransfiziert. Als *Rescue*-Vektoren wurden pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt-GFP und pEGG2Hamp1-Sec61 α 1R236C-GFP eingesetzt (Tabelle 13). Diese Vektoren gehören zu den episomalen Plasmiden, sodass sie von der Zelle repliziert und in der Mitose weitergegeben werden können. Somit ist eine dauerhafte *Rescue*-Expression des Sec61 α 1 sichergestellt. Als Transfektions- und Sterbekontrolle für die Antibiotikaselektion diente eine zeitgleich angesetzte Transfektion mit dem Vektor mCherry-GalNAc. 24 h vor Transfektion wurden MDCKII-Zellen zu 500.000 pro *well* auf 6-*well*-Zellkulturschalen ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde nach folgendem Protokoll angesetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert:

2,5 μ g DNA (jeweils 1,25 μ g pro Vektor)

3,5 μ l Avalanche

200 μ l OPTI-MEM

Folgende Vektoren/Vektorkombinationen wurden transfiziert:

1. px459-Locusguide & pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt-GFP
2. px459-Locusguide & pEGG2Hamp1-Sec61 α 1R236C-GFP
3. px459-Locusguide
4. mCherry-GalNAc (Transfektions- und Sterbekontrolle)

Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium durch frisches Zellmedium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde die Selektion gestartet. Zunächst wurden px459-Locusguide-positive Zellen selektiert. Dieser Vektor enthält eine Puromycin-Resistenzkassette, sodass das Zellmedium für 24 h mit 4 μ g/ml Puromycin versetzt wurde. Die Zellen wurden anschließend mit Antibiotika freiem Medium kultiviert, bis einzelne Zellklone auf eigene Zellkulturschalen übertragen werden konnten. Hier wurden sie einer erneuten Selektion mit 250 μ g/ml Hygromycin

unterzogen. Resistenz gegen Hygromycin konnten nur Zellen erlangen, die mit pEGG2Hamp1-Sec61α1Wt/R236C-GFP transfiziert worden waren.

3.4.7 CRISPR/Cas9 induziertes Sec61α1 Knockout mit integrationsbasiertem Rescue nach „CRISPaint“

Als Alternative zu einem konventionellen *Rescue* nach Sec61α1 *Knockout* mittels CRISPR/Cas9 Geneditierung (s. 3.4.8), wurde ein *Rescue* basierend auf Integration eines Sec61α1 Konstrukts in einen ausgewählten Genlocus des Genoms von MDCKII-Zellen angesetzt. Diese Methode gründet auf dem *CRISPR-assisted insertion tagging* (CRISPaint) nach Schmid-Burgk (Schmid-Burgk et al. 2016). Er beschreibt den zielgerichteten Insert eines Donorplasmids an die Stelle eines durch CRISPR/Cas9 induzierten DSB im endogenen Genom der Zielzelle. Dabei handelt es sich um eine HDR-unabhängige Integration, sodass die Präparation von einem Konstrukt mit passenden Homologie-Armen entfällt. Das ebenfalls durch CRISPR/Cas9 geschnittene und damit linearisierte Donorplasmid wird im Zuge des kanonischen NHEJ mit zufälliger Orientierung in den durch CRISPR/Cas9 gewählten Locus des DSBs des eukaryotischen Genoms integriert. Dazu werden drei Plasmide gleichzeitig in die Zielzellen transfiziert: das zu integrierende Donorplasmid, ein Vektor, der dieses Donorplasmid zielgerichtet mithilfe von CRISPR/Cas9 schneidet und dadurch linearisiert (Donorguide), und ein Vektor der mittels CRISPR/Cas9 das endogene Genom sequenzspezifisch schneidet (Locusguide).

Ausgehend von diesem Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit ein Ansatz erstellt, der zum Rescue von Sec61α1 *Knockout* Zellen über Integration einer, abwärts des durch CRISPR/Cas9 induzierten DSB liegenden, Sec61α1 Teilsequenz führen sollte (s. Abbildung 6).

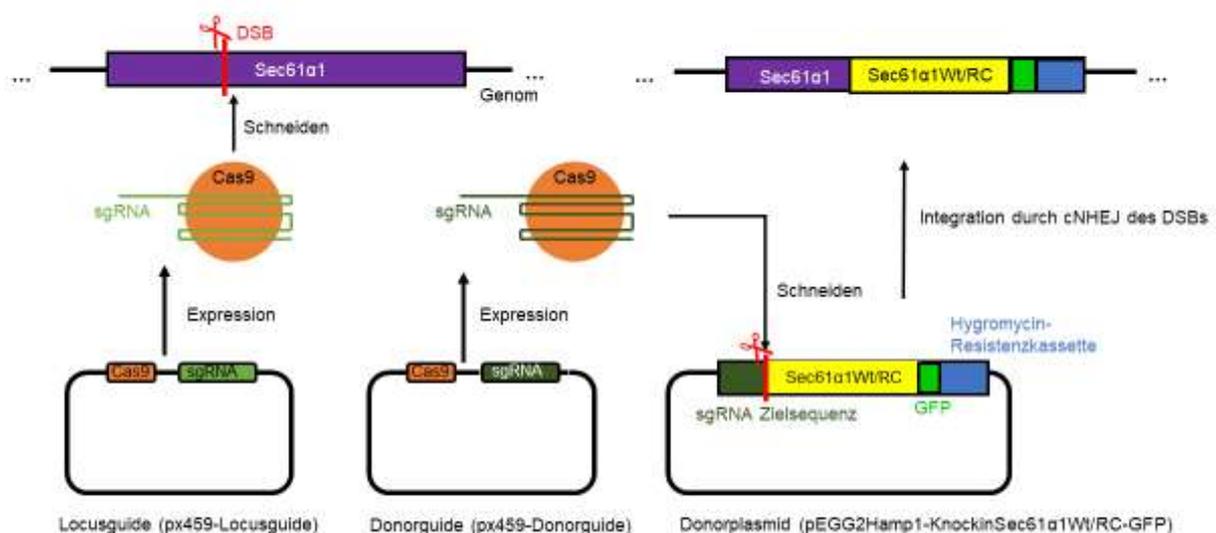


Abbildung 6: Schematische Darstellung der DNA Knock-in Methode nach CRISPaint

Die CRISPaint Methode nach Schmid-Burgk basiert auf der Integration eines Donorplasmids an die Stelle eines durch CRISPR/Cas9 induzierten DSBs im endogenen Genom der Zielzelle über NHEJ. Das Donorplasmid wird zuvor selbst von Cas9 geschnitten. Die Zelle muss dafür mit den folgenden drei Plasmiden gleichzeitig transfiziert werden: Locusguide (schneidet das Zielzellgenom mittels sgRNA dirigierter Cas9), Donorguide (schneidet das Donorplasmid mittels sgRNA dirigierter Cas9) und Donorplasmid (codiert die zu integrierende Sequenz). Eine Selektion der Zellen mit korrekt rekombinierten Sec61 α 1 Protein wird durch die Hygromycin-Resistenzkassette sowie den C-terminalen GFP-tag ermöglicht. Zwischen dem GFP-tag und der Hygromycin-Resistenzkassette liegt ein 2A-Peptid. Dieses bewirkt eine kotranslationale Trennung des GFP-getaggen Sec61 α 1-Proteins vom Produkt der Hygromycin-Resistenzkassette. GFP = *green fluorescent protein*, DSB = Doppelstrangbruch, cNHEJ = *canonical non homologous end joining* (Abbildung verändert nach Schmid-Burgk et al. 2016).

3.4.7.1 Herstellung des Donorplasmids

Im ersten Schritt mussten die Donorplasmide mit wildtypischer oder R236C-Mutante kodierender Sec61 α 1 Teilsequenz hergestellt werden. Dabei wurde die Teilsequenz so gewählt, dass sie exakt die Sequenz des Sec61 α 1 abwärts des Locusguide induzierten DSB im Genom codiert. C-terminal wurde der GFP-tag des Sec61 α 1 Templates übernommen. Mit Primern (s. Tabelle 10), die die ausgewählte Teilsequenz flankierten, wurde das DNA-Fragment in einer PCR amplifiziert (s. 3.2.7 PCR 2). Die untersuchte Mutation wurde über den Primer eingefügt, da als Template jeweils ein wildtypisches Konstrukt diente. Außerdem wurden mittels der Primer Restriktionsschnittstellen angehängen und stille Mutationen in die Sec61 α 1 Sequenz implementiert. Die Mutationen sind notwendig, damit der Locusguide eine bereits rekombinierte Sec61 α 1 Sequenz nicht erneut schneidet. Die PCR-Produkte und der Vektor pEGG2Hamp1 (s. Tabelle 12) wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen SpeI-HF und KpnI-HF wie nach 3.2.2 verdaut. Es folgten die Ligation (s. 3.2.5), Transformation der Konstrukte in DH5 α (s. 3.1.1) und DNA-Isolation (s. 3.1.2). Zur Verifizierung der erstellten Konstrukte (pEGG2Hamp1-KnockinSec61 α 1Wt-GFP, pEGG2Hamp1-KnockinSec61 α 1R236C-GFP, s. Tabelle 15) wurden diese sequenziert (s. 3.2.8).

3.4.7.2 Herstellung des Donorguides

Der Donorguide fügt mittels Cas9 und sgRNA ein DSB im Donorplasmid ein, sodass der Vektor linearisiert wird und ins Genom integriert werden kann. Die sgRNA (hergestellt nach 3.2.10 mit den Primern C069_Donorguide_3-fw, C069Donorguide_3rv, s. Tabelle 10: Primer für PCR) ist dabei so konfiguriert, dass Cas9 das Donorplasmid direkt vor der ersten Base der Sec61 α 1

Teilsequenz schneidet. Dadurch soll die Teilsequenz lückenlos, ohne Insertion oder Deletion von Basenpaaren, integriert werden, sodass sich das nun codierte rekombinante Sec61 α 1 Protein lediglich in der Punktmutation R236C und/oder im GFP-*tag* vom endogenen Sec61 α 1 Protein unterscheidet. Dabei wird die Expression des rekombinanten Proteins durch den endogenen Sec61 α 1 Promotor kontrolliert.

3.4.7.3 Herstellung des Locusguides

Zur Knock-out Induktion des endogenen Sec61 α 1 wurde derselbe Vektor wie in 3.4.6 verwendet (px459-Locusguide). Die darauf codierte sgRNA wurde so designt, dass sie einen genomischen DSB an dem Locus initiiert, wo strangabwärts das Donorplasmid integriert werden soll.

3.4.7.4 Einsatz von CRISPaint in der Zellkultur

Als Zielzellen des integrationsbasierten *Rescues* nach *CRISPaint* wurden MDCKII-Zellen gewählt. Dies ist eine Hundezelllinie, jedoch unterscheidet sich die Sec61 α 1-Sequenz des Hundes nicht von der zu integrierenden humanen Sec61 α 1 Sequenz (Quelle: Uniprot Nr. P61619 (human), Nr. P38377 (Canis familiaris), die angegebene Abweichung von einer Aminosäure unterliegt sehr wahrscheinlich einem Fehler, da alle anderen Wirbeltiere die gleiche Sequenz besitzen). Die Zellen wurden zu 750.000 Zellen pro *well* auf 6-*well*-Zellkulturschalen ausgesät und innerhalb von 1 h nach Aussaat mit dem Transfektionsreagenz Avalanche® transfiziert. Der folgende Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert:

0,75 μ g px459-Locusguide

0,75 μ g px459-Donorguide

0,75 μ g pEGG2Hamp1-KnockinSec61 α 1Wt/R236C-GFP

2,25 μ g DNA

6,75 μ l Avalanche

200 μ l OPTIMEM

Folgende Vektorkombinationen wurden transfiziert:

Vektor 1	Vektor 2	Vektor 3 (Donorplasmid)
px459-Locusguide	px459-Donorguide	pEGG2Hamp1-KnockinSec61α1Wt-GFP
px459-Locusguide	px459-Donorguide	pEGG2Hamp1-KnockinSec61α1RC-GFP
px459-Locusguide	px459-Donorguide	mCherry-GalNAc

Tabelle 30: CRISPaint Vektorkombinationen

Von allen drei Vektoren wurde dabei gleich viel DNA verwendet (je 0,75 µg). Die Transfektion mit mCherry-GalNAc diente als Transfektions- und Sterbekontrolle der Selektion. Durchgeführt wurde der Versuch zweimal mit je zweifach ausgeführter Transfektion der Vektorkombinationen nach Tabelle 30. In einem Versuch wurde der Transfektionsansatz 48 h auf den Zellen belassen, im zweiten Versuch wurde das Transfektionsmedium nach 24 h durch frisches Medium ersetzt. In beiden Fällen wurde 48 h nach Transfektion die Selektion auf Donorplasmid-positive Zellen gestartet. Der Vektor pEGG2Hamp1-KnockinSec61α1Wt/-R236C-GFP besitzt eine Hygromycin-Resistenzkassette, sodass damit transfizierte Zellen eine Hygromycin-Resistenz erlangen. Zum Selektionsstart wurden die Zellen auf 10 cm Schalen übertragen und das Zellmedium dauerhaft mit 250 µg/ml Hygromycin versetzt. Sobald einzelne Zellklone gesichtet werden konnten, wurden diese auf eigene Wells einer 24-Well-Zellkulturschale übertragen.

3.4.8 Einsatz des lentiviralen, induzierbaren pINDUCER21-GFP-Puro-Systems

Zur Erstellung von induzierbaren Zelllinien, die Konstrukte des Sec61α1 überexprimieren, wurde das pINDUCER21-GFP-Puro-System genutzt. Zunächst wurde die jeweilige Sec61α1-Sequenz ohne Stoppcodon (s. Tabelle 11 Vektoren: pENTRMCS-Sec61α1WtNostopp, pENTRMCS-Sec61α1R236CNostopp) mittels LR-Reaktion in den *Destination*-Vektor pINDUCER21-GFP-Puro kloniert. Die generierten Vektoren wurden anschließend mithilfe lentiviraler Transduktion (3.4.9.) stabil in das Genom der Zielzellen integriert. Basierend auf dem pINDUCER-System nach Meerbrey (Meerbrey et al. 2011) wurde der induzierbare Vektor so modifiziert, dass eine Selektion transduzierter Zellen durch Puromycin möglich ist (Schulze et al. 2014) (die Puromycin-Resistenz-Kassette wurde von der AG Pavenstädt Universitätsklinikum Münster in den Vektor in kloniert,) und eine GFP kodierende Sequenz am C-terminalen Ende des Inserts im *open reading frame* (ORF) integriert werden konnte (kloniert von Laura Schilling, AG Krahn, Universitätsklinikum Münster) (s. Abbildung 7). Bei dem pINDUCER21-GFP-Puro-System handelt es sich um ein *Tet-on* System, sodass das Insert nur nach Induktion durch das Tetracyclinderivat Doxycyclin exprimiert wird. Reguliert durch den *elongation factor1-a* (EF1a)-Promotor wird der reverse Transaktivator *reverse tetracycline-transactivator 3* (rtTA3) und die, über eine interne Ribosomenbindestelle (IRES)

angeschlossene, Puromycin-Resistenzkassette konstitutiv exprimiert. Die integrierte cDNA-Sequenz steht unter Kontrolle des *tetracycline responsive element 2* (TRE2) -Promotors, welcher nur Doxycyclin gebundenes rtTA3 aktiviert werden kann. In Gegenwart von Doxycyclin wird somit das Insert überexprimiert.

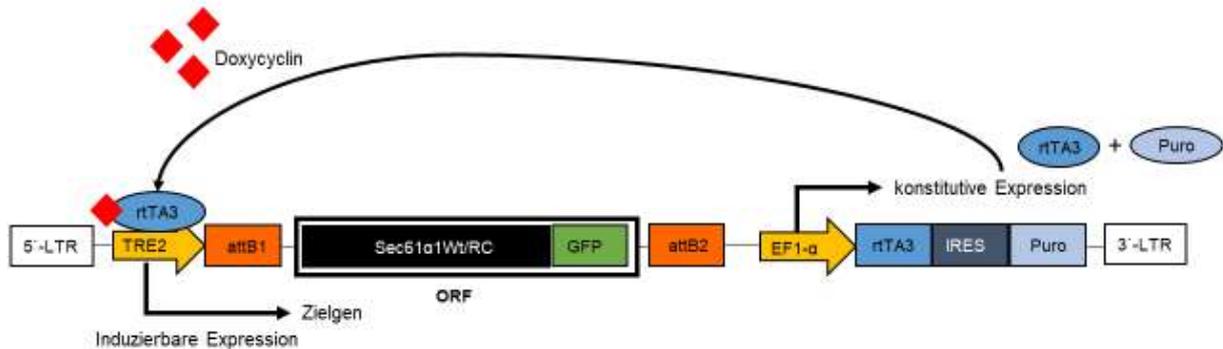


Abbildung 7: Das pINDUCER21-GFP-Puro-System

Schematische Darstellung des pINDUCER21-GFP-Puro Vektors mit Sec61 α 1Wt/R236C-Insert. Die EF1- α regulierte konstitutive Expression von rtTA3 und der Puromycin-Resistenzkassette ermöglicht die Selektion Vektor-tragender Zellen mittels Puromycin. Das Zielgen, unter der Kontrolle des rekombinanten TRE2 Promotors, wird nur exprimiert, wenn dieser durch eine Doxycyclin vermittelte Konformationsänderung und damit einhergehende Bindung von rtTA3 stimuliert wird. Im ORF, flankiert von den attachment sites attB1 und attB2, befindet sich das Zielgen (Sec61 α 1Wt/R236C) mit C-terminaler GFP-Sequenz. EF1- α = *elongation factor1-a*, rtTA3 = *reverse tetracycline-transactivator 3*, IRES = interne Ribosomenbindestelle, Puro = Puromycin, TRE2 = *tetracycline responsive element 2*, ORF = *open reading frame*, attB1/2 = *recombination sites* für Gateway Klonierungen, GFP = *green fluorescent protein* (Abbildung geändert nach Meerbrey et al. 2011).

3.4.9 Lentivirale Transduktion

Um die induzierbaren Konstrukte pINDUCER21-Sec61 α 1Wt/R236C-GFP-Puro stabil ins Genom von Zellen zu integrieren und gleichzeitig die Rate der DNA-Übertragung in die Zielzellen im Vergleich zur Transfektion zu steigern, wurde die Methode der lentiviralen Transduktion angewendet. Hierzu wurden zunächst Virus-Produktionszellen, in diesem Fall HEK239T-Zellen, mit 3 Plasmiden kotransfiziert (s. Tabelle 14). Zwei der Plasmide, psPAX2 und pMD2-VSVG, stellen die genetische Information zur Produktion des Virus bereit. Dabei codiert das Erste für die Virusverpackung der DNA und das Zweite für die Virushülle. Die Virusgene wurden aus Sicherheitsgründen auf die zwei genannten Helferplasmide aufgeteilt. Zudem codieren diese keinerlei Informationen zur Replikation des Virus in den Zielzellen. Das dritte Plasmid codiert die zu transduzierende Sequenz. In dieser Arbeit wurden dazu die

Doxycyclin-induzierbaren pINDUCER-Sec61 α 1Wt(/-R236C)-GFP Vektoren (s. 3.4.9) verwendet. Der Transfektionsansatz wurde nach folgendem Protokoll angesetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert:

3,5 ug pINDUCER21-Sec61 α 1Wt/R236C-GFP

2,2 ug PsPaX2

1,2 ug pMD2 VSVG

300 ul Optimem

20ul Metafectene

Die HEK239T-Zellen wurden 1, vor Transfektion auf T25- (= kleiner Ansatz verwendet für HeLa-Zellen) /T75- (großer Ansatz verwendet für MDCKII-Zellen) Kulturflaschen übertragen, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion adhärent waren und eine Konfluenz von ca. 50% aufwiesen. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes fallen alle nachfolgenden Arbeiten bis zur Runterstufung auf Sicherheitsstufe 1 unter die Sicherheitsstufe 2. Nach 6 h wurde das Transfektionsmedium durch 6 ml (kleiner Ansatz) /10 ml (großer Ansatz) Zielzellmedium ersetzt. Transfizierte HEK239T-Zellen produzieren den Lentivirus, der in seinem Genom das entsprechende Sec61 α 1-Konstrukt codiert, und sekretieren diesen in das Medium. Nach 72 h Virusproduktion wurde das virushaltige Medium abgenommen, über einen 0,45 μ m Filter filtriert und mit Polybrene (8 μ g/ml Endkonzentration) versetzt. Im nächsten Schritt wurde das virushaltige Medium auf 2 wells einer 6-well-Zellkulturschale (kleiner Ansatz)/auf zwei 10er Schalen (großer Ansatz) mit darin enthaltenen Zielzellen aufgeteilt, die zu dem Zeitpunkt der Transduktion eine Konfluenz von 30-50% aufwiesen. Parallel wurde je Zielzelllinie eine Kontrollschale nicht infizierter Zellen mit virusfreiem Medium unter denselben Bedingungen kultiviert. Nach 24 h wurde der Infektionszyklus beendet, die Zellen einmal nach Rückstufungsprotokoll mit PBS gewaschen und für eine 24 stündige Regenerationsphase mit frischem Medium überschichtet. Anschließend wurde die Selektion transduzierter Zellen gestartet, sodass nur mit der Puromycin-Resistenzkassette des pINDUCER21-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP ausgestattete Zellen weiter überleben konnten. Dazu wurde das Zellmedium nach der Regenerationsphase dauerhaft mit Puromycin versetzt. Im Falle von transduzierten MDCKII-Zellen wurden die zwei 10 cm-Zellkulturschalen (eine mit Konstrukt der Mutante und eine mit wildtypischen Konstrukt) zur Optimierung der Selektion trypsiniert und jeweils gleichmäßig auf 2 Schalen gesplittet. Das Zellmedium wurde zunächst für 48 h mit 2 μ g/ml Puromycin versetzt. Anschließend folgte eine Selektion mit 4 μ g/ml Puromycin für 7 Tage und danach eine dauerhafte Kultivierung mit 2 μ g/ml Puromycin. Transduzierte HeLa-Zellen wurden zum Selektionsstart trypsiniert und je well der 6-well-Schale auf eine 10 cm Schale übertragen. Hier wurde das Zellmedium 10 Tage mit 2 μ g/ml Puromycin versetzt und anschließend dauerhaft mit 1 μ g/ml Puromycin. Zusätzlich wurde für 10 Tage nach

Zurückstufung der Zellen auf die Sicherheitsstufe 1 Primocin (100 µg/ml) in das Zellmedium hinzugegeben, um einer Pilzkontamination der Zellen vorzubeugen. Auch die nicht-transduzierten Kontrollzellen wurden dem antibiotikahaltigem Selektionsmedium ausgesetzt, um das Absterben der Zellen zu kontrollieren. Nach insgesamt 4 Waschschritten in definierten Zeitabständen innerhalb von 9 Tagen nach Transduktion fällt die Arbeit mit den transduzierten Zellen wieder unter die Sicherheitsstufe S1.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der quantifizierbaren Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte mittels Student's-T-Test beim Vergleich von zwei Versuchsgruppen und mit der Varianzanalyse ANOVA beim Vergleich mehrerer Gruppen. Annahme der Analyse ist dabei eine approximative Normalverteilung der Daten innerhalb einer Gruppe bei unverbundenen Ereignissen. Zur Fundierung der Unterschiede in den Datensätzen wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet mit der die Unterschiede zufällig entstanden sind, bezeichnet als p-Wert. Bei einem p-Wert von $<0,05$ (5 %) kann davon ausgegangen werden, dass die Abweichungen zwischen den Versuchsgruppen nicht zufällig entstanden sind. In dieser Arbeit werden somit alle Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Die Beschriftung der Abbildungen erfolgt nach der üblichen Kennzeichnung von $p < 0,05$ als *. Wenn nicht anders beschrieben, stellen die angegebenen Fehlerbalken der Abbildungen die Standardabweichung der Proben um den Mittelwert da.

4 Ergebnisse

4.1 Testung kommerzieller primärer Antikörper gegen Sec61α1

4.1.1 Funktionskontrolle verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61α1 in der Western Blot-Analyse

Zur Funktionskontrolle der getesteten primären Antikörper gegen Sec61α1 im Western Blot wurden die Höhen der sichtbaren Banden mit den zu erwartenden Bandenhöhen, bestimmt durch die Molekülmasse, verglichen. Die endogene Sec61α1 Bande sollte sich demnach auf einer Höhe von ca. 52 Kilodalton (kDa) zeigen und die Bande des ektopen GFP-*getaggt*en Sec61α1 auf einer Höhe von ca. 79 kDa (52 kDa (Sec61α1) + 27 kDa (GFP)) (UniProt *Knowledgebase*). Dargestellte Abweichungen (s. Abbildung 8) werden im Folgenden (5.1) noch erläutert. Als Positivkontrolle wurde für die gleichen Zellysate ein primärer Antikörper gegen GFP genutzt, der in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert war (Maus- anti- GFP; Santa Cruz sc9996). Eine Negativkontrolle konnte, aufgrund der essentiellen Funktion von Sec61α1 (Lang et al. 2012), nicht durchgeführt werden.

Der primäre Antikörper gegen Sec61α1 von Cell Signaling (14867S; monoklonal aus dem Kaninchen; immunogene Sequenz: nicht veröffentlicht) erwies sich als tauglich für eine WB- Analyse. Die Funktionskontrolle der zwei anderen Antikörper gegen Sec61α1 (PA5-21773 von Invitrogen; polyklonal aus dem Kaninchen; immunogene Sequenz: Aminosäuren 413-476 und NB100-768 von Novus Biologicals; polyklonal aus der Ziege; immunogene Sequenz: C-KEQSEVGSMSGALLF) fiel negativ aus. Die in Abbildung 8 dargestellten WB- Analysen wurden mit Zellysaten von HeLa-Zellen nach transienter Transfektion der angegebenen Vektoren (3.4.4) mit 8%-Trenngelen durchgeführt.

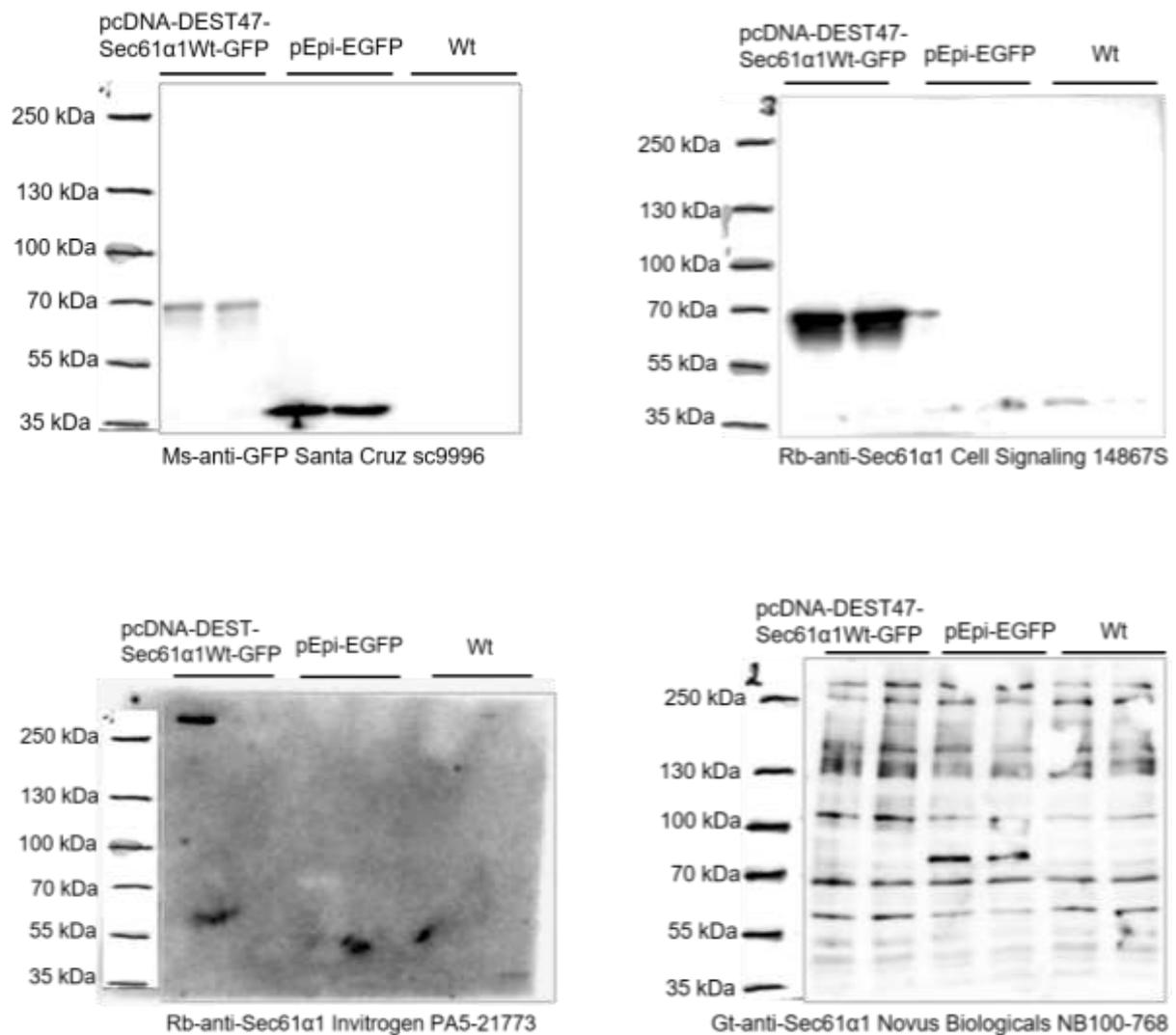
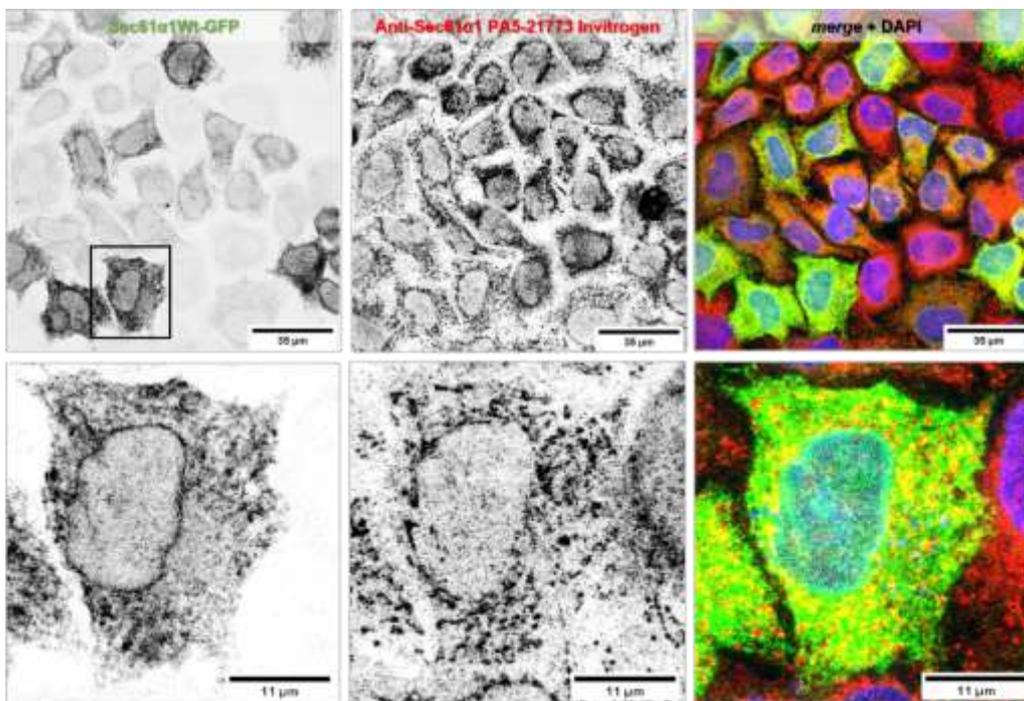
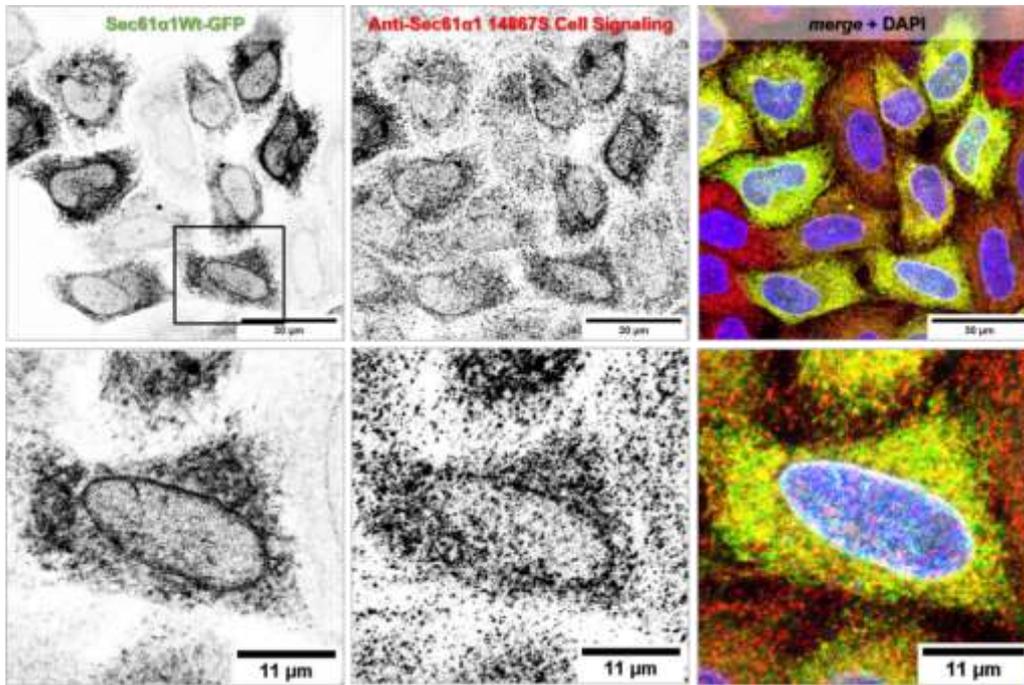


Abbildung 8: Validierung verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61 α 1 in der WB-Analyse
 Dargestellt sind die WB-Analysen drei verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61 α 1 und die Positivkontrolle mit einem primärem Antikörper gegen GFP. Der Antikörper 14867S von Cell Signaling zeigt die Bande des ektopen GFP-*getaggen* Sec61 α 1 auf derselben Höhe wie die Sec61 α 1-GFP-Bande, die mittels primärem Antikörper gegen GFP (Santa Cruz sc9996; dient als Positivkontrolle) detektiert wurde, und gilt damit als validiert. Außerdem zeigt sich bei S14867S in allen Zelllysaten eine schwache bis sehr schwache endogene Sec61 α 1-Bande auf Höhe von ca. 40 kDa, die damit leicht von der erwarteten Höhe von 52 kDa abweicht. Der Antikörper PA5-21773 von Invitrogen zeigt nur eine Bande auf der Höhe von ca. 270 kDa. Der Antikörper NB100-768 von Novus Biologicals zeigt viele unspezifische Banden in allen Lysaten. Die beiden letztgenannten Antikörper werden damit als untauglich bewertet.

4.1.2 Funktionskontrolle verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61 α 1 in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie ist es möglich intrazelluläre Lokalisationsstudien von Sec61 α 1 durchzuführen. Daher wurden drei primäre Antikörper gegen Sec61 α 1 in der IF überprüft. Da keine Spezifitätskontrolle mittels Knock-out-Kontrolle stattfinden konnte, diente eine Kolokalisation mit GFP-getaggen Sec61 α 1 als Funktionskontrolle. Transient transfizierte Konstrukte von Sec61 α 1 (in diesem Versuch benutzt: pcDNA-DEST47- Sec61 α 1Wt-GFP) werden von den Zellen überexprimiert, sodass ein funktionaler, spezifischer primärer Antikörper gegen Sec61 α 1 in diesen Zellen zu einem besonders starken Signal führen sollte. Daneben sollte ein primärer Antikörper mit hoher Affinität (Bindungsspezifität) und Avidität (Bindungsstärke) auch das endogene Sec61 α 1 detektieren. Dazu wurden MDCKII-Zellen (Testung des Antikörpers NB100-768 Novus Biologicals) und HeLa-Zellen (Testung der Antikörper PA5-21773 Invitrogen und 14867S Cell Signaling) wie nach 3.4.4 transfiziert und wie nach 3.3.3 für die IF kultiviert und gefärbt. Folgender primärer Antikörper zeigte überwiegend eine Kolokalisation mit Sec61 α 1Wt-GFP und bildete dieselbe Strukturbeschaffenheit wie das transfizierte Protein ab: 14867S von Cell Signaling (s. Abbildung 9). Er gilt damit als validiert für die IF von Sec61 α 1. PA5-21773 von Invitrogen wies im Vergleich dazu eine geringfügig verminderte Kolokalisation mit Sec61 α 1Wt-GFP auf, bildete die Strukturen jedoch deutlich grobkörniger, im Vergleich zum ektopen Sec61 α 1Wt-GFP, ab. Da die zellulären Strukturen, die von PA5-21773 am stärksten erkannt wurden, nicht mit den Zellen mit starkem GFP-Signal übereinstimmen, ist von einer nicht unerheblichen Unspezifität des Antikörpers auszugehen. Er wird damit als nicht validiert bewertet. Der Antikörper NB100-768 von Novus Biologicals erwies sich als völlig untauglich für eine Analyse von Sec61 α 1 in der Immunfluoreszenzmikroskopie.



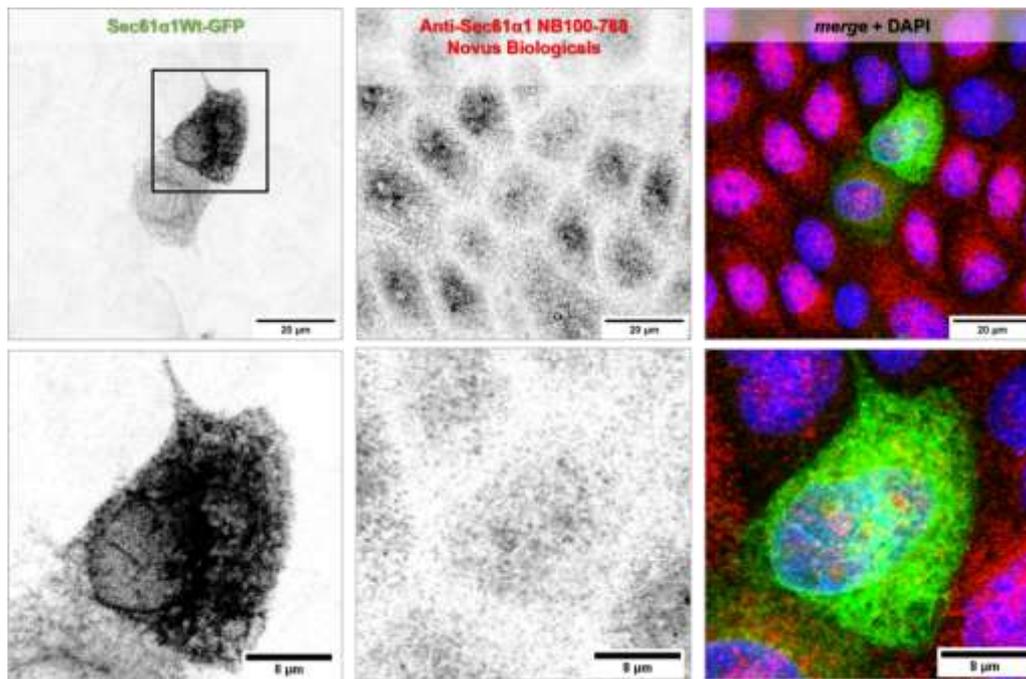


Abbildung 9: Validierung verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61 α 1 in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Dargestellt ist die immunologische Färbung von HeLa- (primäre Antikörper gegen Sec61 α 1: 14867S Cell Signaling (Reihe 1-2); PA5-21773 Invitrogen (Reihe 3-4)) und MDCKII-Zellen (Anti-Sec61 α 1 NB100-768 Novus Biologicals (Reihe 5-6)) nach transienter Transfektion mit pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt-GFP. 14867S kolokalisiert am stärksten mit den GFP-Signalen. Der Antikörper wird als validiert bewertet. PA5-21773 kolokalisiert nur teilweise mit Sec61 α 1-GFP. NB100-768 kolokalisiert gar nicht mit den GFP-Signalen und zeigt keine Sec61 α 1-typischen Strukturen. Dieser Primärantikörper wird als völlig untauglich für eine IF eingestuft.

4.2 Expressions- und Lokalisationsstudien von unterschiedlich *getaggt*en Varianten des wildtypischen Sec61 α 1 und Sec61 α 1R236C

Um eine Möglichkeit zu schaffen ausschließlich ektopes Sec61 α 1 zu detektieren, wurden rekombinante Fusionsproteine, bestehend aus Sec61 α 1 und einem Protein-*tag*, hergestellt.

4.2.1 Funktionalität der verschiedenen Protein-*tags* zur Detektion von Sec61 α 1Wt/-R236C in der IF

Für intrazelluläre Lokalisationsstudien von ektopen Sec61 α 1Wt/-R236C (4.2.2) wurden zunächst insgesamt fünf unterschiedliche Protein-*tags* am C-terminalen Ende der Sec61 α 1-cDNA in den *open reading frame* des Proteins kloniert (3.2.11). Dies führte zur Expression eines rekombinanten Fusionsproteins bestehend aus Sec61 α 1 und dem entsprechenden Protein-*tag*. Zu unterscheiden sind dabei die Epitop-*tags* (FLAG-*tag*, Hemagglutinin (HA)-*tag*,

Spot-*tag*) von dem verwendeten Fluoreszenz-*tag* GFP. Die Epitop-*tags* mussten zur Detektion mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zunächst mit Antikörpern markiert werden, während GFP-markierte Proteine ohne Färbung mit Antikörpern in der IF sichtbar sind. Zunächst sollte überprüft werden, ob alle rekombinanten Sec61 α 1-Proteine exprimiert werden können und ob, falls erforderlich, die Markierung des *getaggen* Proteins mittels Epitop-*tag* spezifischer Antikörper funktioniert, unabhängig von der Variante des Sec61 α 1 (Wt oder Mutante). Es stellte sich heraus, dass die Markierung von Sec61 α 1 mit GFP zu den eindeutigsten und differenziertesten Signalen in der IF führte, da der Schritt der Färbung mit *tag*-spezifischen Antikörpern entfiel und somit eine Unspezifität des Signals ausgeschlossen war. Daher wurde die Funktionalität der Epitop-*tags* anhand des Vergleichs mit Sec61 α 1Wt-GFP beurteilt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Färbung des 3xHA-*tag* zur Abbildung einer wesentlich differenzierteren Struktur des Sec61 α 1-Proteins führte, als die Färbung des Proteins mit 1xHA-*tag* (s. Abbildung 10). Die Darstellung von Sec61 α 1 mittels 3xFlag-*tag* führte zu gar keinem eindeutigen Signal. Auch die Färbung des Spot-*tags* erwies sich als weitestgehend unspezifisch. Zwar konnten teilweise Sec61 α 1-charakteristische Strukturen detektiert werden, jedoch stellte die Färbung mit Antikörpern gegen den Spot-*tag* auch Zell-Zell-Kontakte dar.

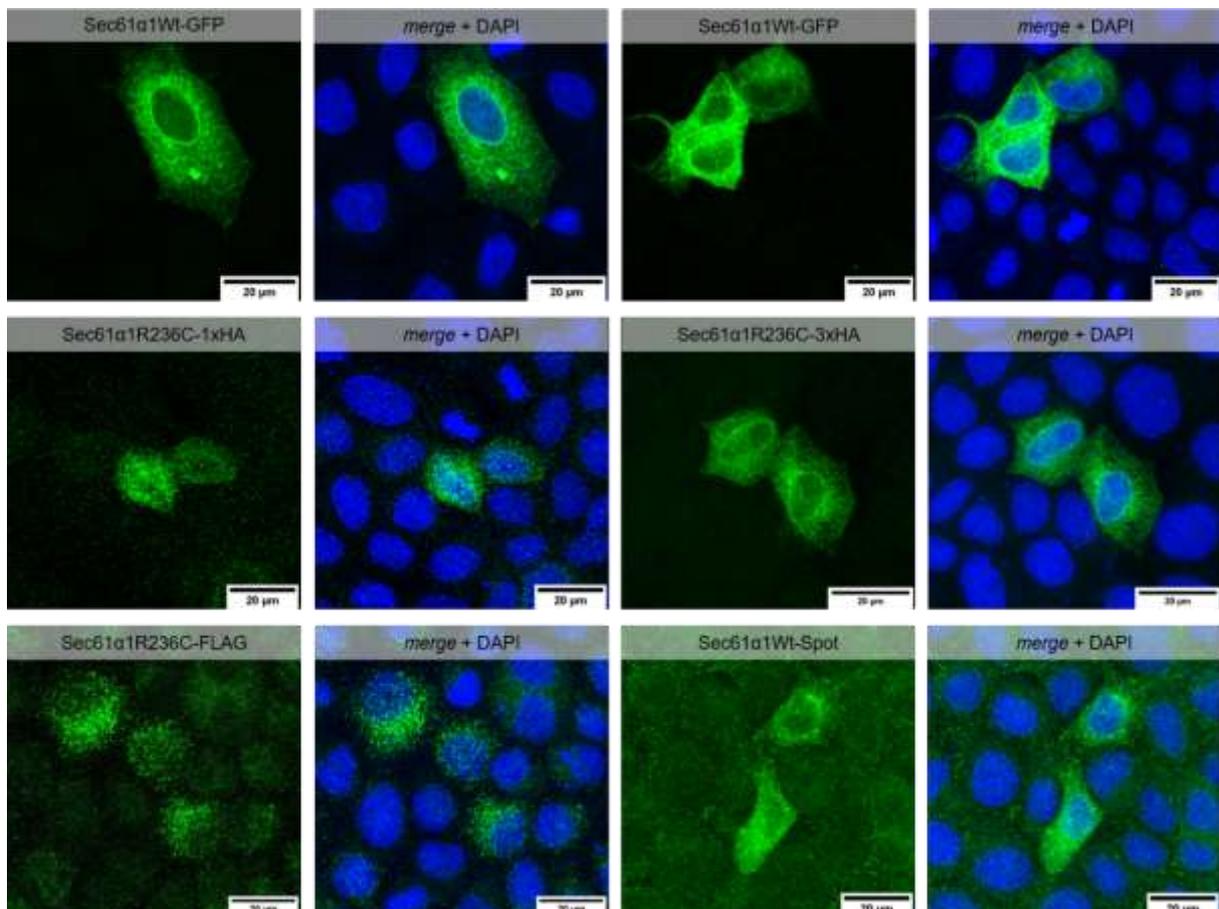


Abbildung 10: Funktionalität der verschiedenen Protein-tags bei Sec61 α 1Wt/-R236C in der IF

Dargestellt ist die immunologische Färbung von MDCKII-Zellen nach Transfektion mit rekombinanten Sec61 α 1-Produkten, die sich jeweils in ihrem Protein-*tag* unterscheiden. Das GFP-markierte Sec61 α 1 zeigte aufgrund der Autofluoreszenz von GFP die differenziertes Proteinstruktur sowie die wenigstens Artefakte. Die immunologische Färbung von Sec61 α 1R236C-3xHA präsentiert ein ähnliches Bild des Proteins. Dagegen sind die Färbungen der Konstrukte Sec61 α 1R236C-1xHA und Sec61 α 1R236C-3xFLAG unspezifisch und werden als nicht tauglich bewertet. Die Färbung des Spot-getaggten Sec61 α 1 zeigt zwar eine eindeutige Färbung des Proteins, jedoch auch viel unspezifische Hintergrundfärbung, v.a. der Zell-Zell-Kontakte.

4.2.2 Intrazelluläre Lokalisation der getaggtten Sec61 α 1Wt/-R236C Fusionsproteine

Um die intrazelluläre Lokalisation der rekombinanten Sec61 α 1Wt/-R236C-Proteine weiter zu untersuchen, wurden die Zellen mit den Vektoren *mCherry*-GalNAc und *mCherry*-Sec61 β kotransfiziert. Der erst genannte Vektor wurde als Marker für den Golgi-Apparat (GA) genutzt und codiert für das Golgi-Apparat-residente-Enzym N-acetylgalactosaminyltransferase (Rabouille et al. 1995), hier *getaggt* mit dem Fluoreszenzprotein *mCherry*. Das ebenfalls *mCherry*-*getaggte* Protein Sec61 β , diente als Marker für das Endoplasmatische Retikulum (ER). Es bildet mit Sec61 α 1 und Sec61 γ den heterotimeren ER-Translokon-Komplex in Säugetierzellen (Gorlich 1993; Hartmann et al. 1994). Untersucht werden sollte, ob ein grundsätzlicher Unterschied in der Detektion und Lokalisation von Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C besteht und ob die verschiedenen Protein-*tags* einen Einfluss auf die Lokalisation der beiden Proteine haben. Es zeigte sich bei Sec61 α 1 und Sec61 α 1R236C stets eine fein granuläre Struktur, die netzartig die gesamte Zelle, ausgehend vom Zellkern, durchspannt. Dabei kolokalisierte Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C stets mit Sec61 β , unabhängig vom Protein-*tag*. Eine Kolokalisierung mit dem GA-Marker trat bei keiner *getaggtten* Variante von Sec61 α 1Wt oder Sec61 α 1R236C auf (s. Abbildung 11). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die verschiedenen C-terminalen *tag*-Proteine sowie die Mutation R236C keine Veränderung der Struktur oder Lokalisation von Sec61 α 1 bewirkten.

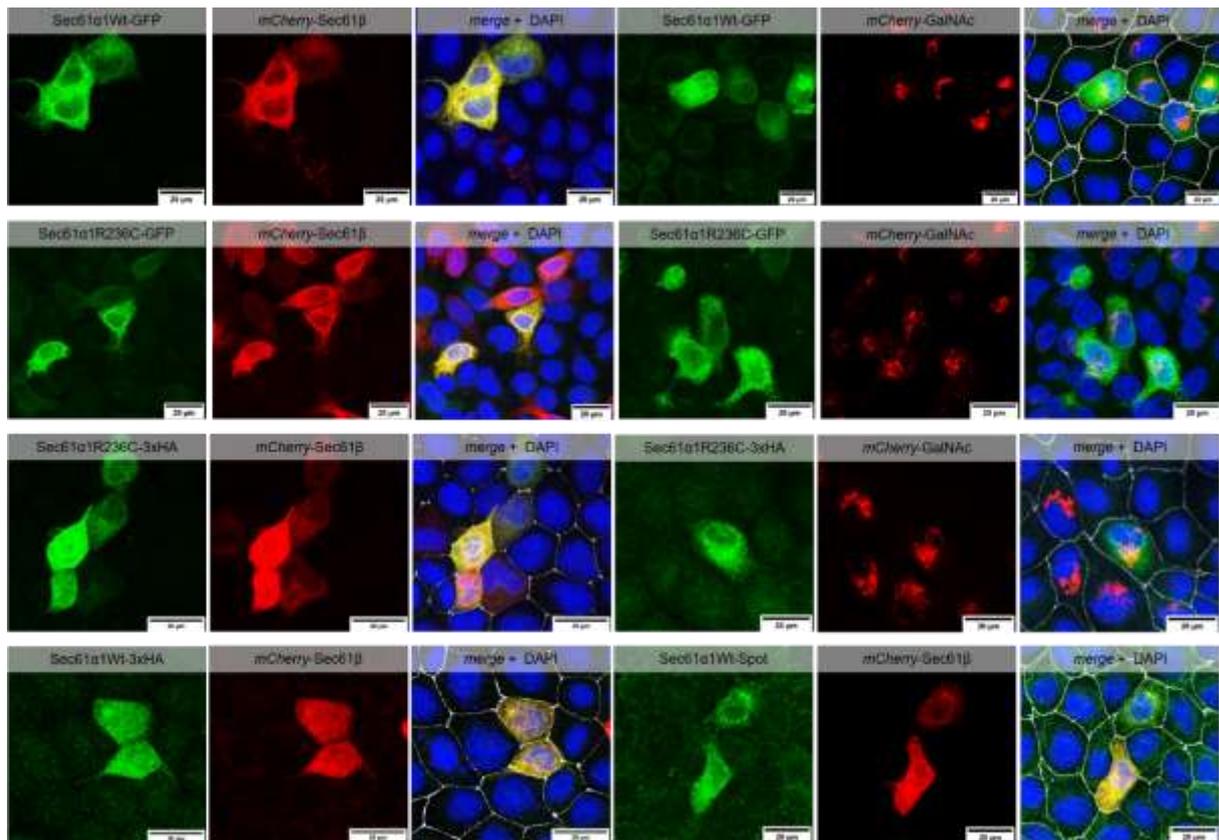


Abbildung 11: Kolokalisationen des wildtypischen und mutierten *getaggten* Sec61 α 1 mit Markern des ER und GA

Dargestellt ist die Immunfluoreszenzmikroskopie von MDCKII-Zellen (bzw. HeLa-Zellen in der zweiten Reihe) nach Kotransfektion von rekombinanten *getaggten* Sec61 α 1Wt/-R236C-Konstrukten und jeweils *mCherry-Sec61 β* (ER-Marker) oder *mCherry-GalNAc* (GA-Marker). Es zeigen sich keine Unterschiede in der Detektion und Lokalisation von Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C.

4.3 Ergebnisse der Versuche Zelllinien mit stabiler Überexpression von wildtypischen und mutierten Sec61 α 1 zu etablieren

Zur Etablierung von Zelllinien mit stabiler Überexpression von Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP wurden mehrere Ansätze mit HeLa- und MDCKII-Zellen und drei verschiedenen Vektorpaaren (pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP, pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP, pEpi-CuoGate-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP) getestet. Ein Vektorpaar bezeichnet hierbei den gleichen Vektor, der einmal wildtypisches Sec61 α 1 codiert und einmal Sec61 α 1R236C. Über eine Antibiotika-basierte Selektion nach Transfektion der Vektoren sollte erreicht werden, dass nur erfolgreich transfizierte Zellen überleben und sich somit ein Zellkulturmodell mit überwiegend Sec61 α 1Wt/-R236-GFP-positiven Zellen entwickelt (3.4.5). Die Etablierung einer Zelllinie mit stabiler Expression der Sec61 α 1-Konstrukte codiert auf dem Vektor pEpi-CuoGate war nicht möglich, da mit Start der Antibiotika-Selektion alle Zellen innerhalb von vier Tagen

abgestorben sind. Das Problem, dass dieser Vektor nicht mit dem entsprechenden Antibiotikum (Puromycin) selektiert werden kann, ist in unserer Arbeitsgruppe bekannt. Jedoch führte auch keiner der anderen Transfektionen, weder von HeLa- noch von MDCKII-Zellen, zu dem gewünschten Ergebnis. Entweder die Zellen starben innerhalb von 14 Tagen nach Start der Antibiotika-Selektion vollständig (betrifft alle angesetzten stabilen Überexpressionen mit HeLa-Zellen unabhängig vom Typ des transfizierten Proteins (Sec61 α 1Wt-GFP oder Sec61 α 1R236C-GFP)), oder sie erwarben die Antibiotika-Resistenz ohne Sec61 α 1R236C-GFP zu exprimieren. Zellen, die mit Vektoren kodierend für die wildtypische Variante von Sec61 α 1 transfiziert worden sind, wuchsen durchgehend besser bzw. tolerierten die Antibiotikaexposition länger, als Zellen, die mit Sec61 α 1R236C-GFP kodierenden Vektoren transfiziert waren. Somit gelang die erfolgreiche Etablierung einer Zelllinie mit stabiler Überexpression von Sec61 α 1Wt-GFP, aber nicht von Sec61 α 1R236C-GFP.

4.3.1 Etablierung der Zelllinie MDCKII_pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP durch stabile Transfektion

Mit pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt-GFP transfizierten MDCKII-Zellen gelang die stabile Überexpression des Proteins und Selektion der transfizierten Zellen. Das Pendant mit der Sec61 α 1-Mutante bildete ebenfalls wachsende Zellen, jedoch ohne die Expression des Proteins (s. Abbildung 12). Überprüft wurde die Expression anhand des GFP-Signals in der IF. Die selektionierten MDCKII-Zellen wurden dazu dreimal unabhängig voneinander auf Deckgläschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die vorliegenden Bilder der anschließenden konfokalen IF wurden für das GFP-Signal verblindet aufgenommen, sodass eine zufällige Stichprobe der Zellpopulation zur Auswertung herangezogen werden konnte. Es zeigte sich bei pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt-GFP transfizierten Zellen ein überwiegender Anteil GFP-positiver Zellen, während bei pEGG2Hamp1-Sec61 α 1R236C-GFP transfizierten Zellen in keinem Versuchsdurchlauf eine GFP-positive Zelle detektiert werden konnte.

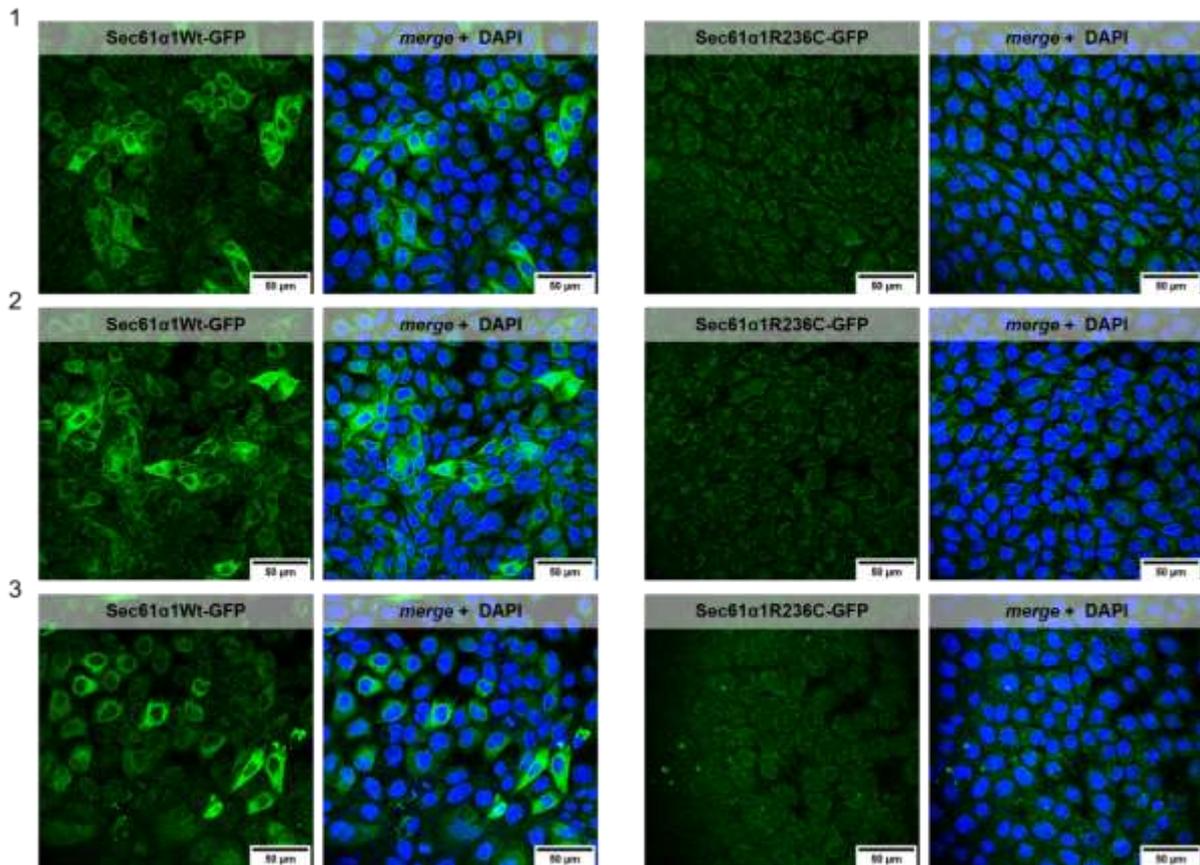


Abbildung 12: Stabile Transfektion von pEGG2Hamp1-Sec61α1Wt/-R236C-GFP in MDCKII

Dargestellt sind pEGG2Hamp1-Sec61α1Wt/-R236C-GFP-transfizierte MDCKII-Zellen nach Kultivierung mit antibiotikahaltigem Selektionsmedium. Die Zellen wurden in drei unabhängigen Versuchen (Reihe 1,2,3) auf Deckgläschen ausgesät und bei Erreichen von Konfluenz in der IF anhand von verblindeten Stichproben ausgewertet. Während viele GFP-positive Zellen des wildtypischen Sec61α1Wt zu sehen sind, konnten keine Signale der untersuchten Sec61α1R236C Mutante detektiert werden. Die abgebildeten Signale der Mutante sind als unspezifisch zu werten. N=3

4.3.2 Etablierung der Zelllinie MDCKII_pcDNA-DEST47-Sec61α1Wt/-R236C-GFP durch stabile Transfektion

Die Antibiotika-selektierte Transfektion von pcDNA-DEST47-Sec61α1Wt/-R236C-GFP in MDCKII-Zellen führte zwar zu stabilen Zelllinien, jedoch zeigte sich in einer einmaligen Überprüfung der Expression von Sec61α1Wt/-R236C-GFP anhand der GFP-Signale in der IF nur ein geringer Anteil an GFP-positiven Zellen bei MDCKII_pcDNA-DEST47-Sec61α1Wt-GFP (s. Abbildung 13). Bei MDCKII_pcDNA-DEST47-Sec61α1R236C-GFP konnten im Vergleich dazu noch weniger GFP-positive Zellen detektiert werden.

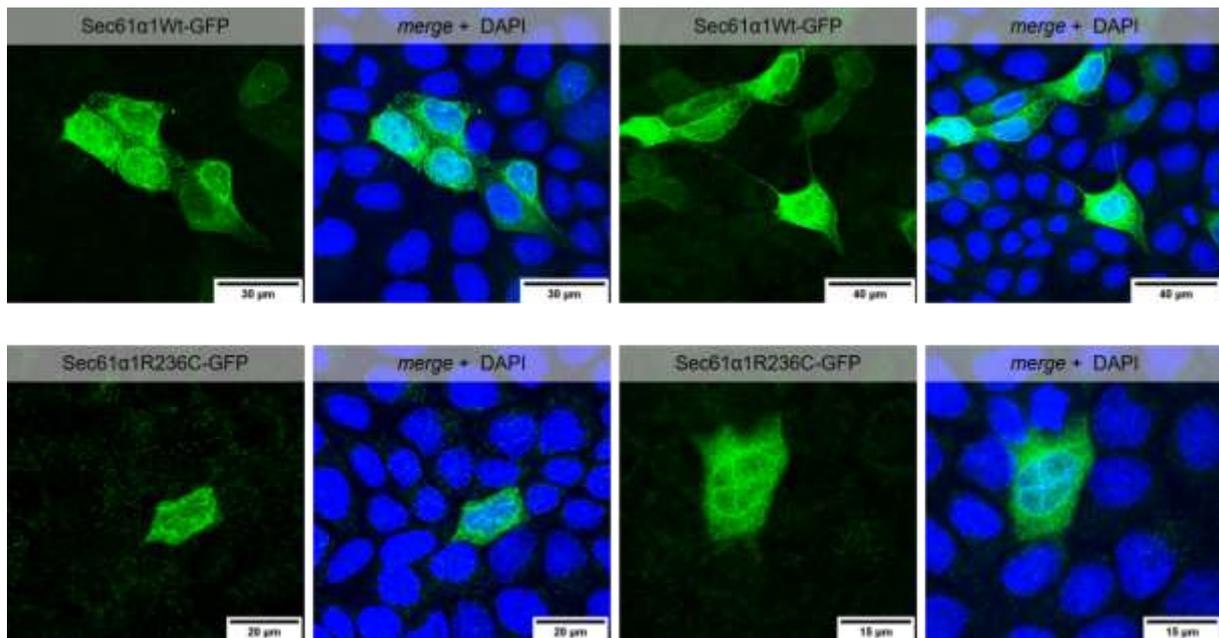


Abbildung 13: Stabile Transfektion von pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP in MDCKII

Dargestellt sind pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP-transfizierte MDCKII-Zellen nach Kultivierung mit antibiotikahaltigem Selektionsmedium. Festzustellen ist ein Unterschied in der Anzahl GFP-positiver Zellen zwischen Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C. Es gibt kleinere Gruppen von Sec61 α 1Wt-GFP exprimierenden Zellen, während nur vereinzelte Zellen Sec61 α 1R236C-GFP exprimieren. N=1

4.4 Ergebnisse des Versuchs Sec61 α 1-Knockout-Zelllinien mit unterschiedlichen Rescue-Strategien zu erstellen

Da Sec61 α 1 ein essentielles Protein ist (Lang et al. 2012), konnte kein konventioneller *Knockout* des Proteins durchgeführt werden. Deshalb wurden zwei verschiedene *Rescue*-Strategien ausgearbeitet (3.4.6, 3.4.7). Jedoch führte keine der *Knockout-Rescue*-Ansätze zur Etablierung einer Zelllinie mit *Knockout* des endogenen Sec61 α 1 und gleichzeitiger Expression von ektopten Sec61 α 1Wt/-R236C. Die Zielzellen wurden wie in 3.4.6 und 3.4.7 beschrieben transfiziert und selektioniert. Die weitere Kultivierung der Zielzellen gestaltete sich nach Beginn der Selektion für alle Ansätze gleich: Sobald sich nach dem Start der Selektion von positiv-transfizierten Zellen einzelne Zellklone bildeten (ca. nach zwei bis drei Wochen Antibiotika-Expositionsdauer), wurden diese auf eigene Zellkulturschalen übertragen. Durchschnittlich eine Woche nach Übertragung der einzelnen Zellklone konnte in keinem Ansatz noch eine lebende Kolonie gefunden werden. Alle *Knockout-Rescue*-Ansätze wurden zweimal unabhängig voneinander je in doppelter Ausführung angesetzt.

4.5 Analyse des Expressionsunterschieds von Sec61 α 1Wt-GFP und Sec61 α 1R236C-GFP mit drei Vektoren

Um die Ursachen der erfolglosen Versuche zur Etablierung von Zelllinien mit stabiler Überexpression von Sec61 α 1R236C und von *Knockout-Rescue* Zelllinien weiter zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit drei Vektorpaaren (pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt/R236C-GFP, pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt/R236C-GFP, pEpi-CuoGate-Sec61 α 1Wt/R236C-GFP) kodierend für wildtypisches und mutiertes Sec61 α 1 transient transfiziert. Dadurch sollte die Expression des Proteins abhängig vom Vektor sowie der Unterschied der Expression von Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C genauer analysiert werden.

4.5.1 Vergleich der Anzahl Sec61 α 1Wt-GFP- und Sec61 α 1-R236C-GFP-positiver Zellen in der IF

Um die Unterschiede der Expression von Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C zu quantifizieren, wurden HeLa-Zellen transient mit insgesamt drei verschiedenen Vektoren (4.5), kodierend jeweils für das wildtypische oder mutierte Sec61 α 1, transfiziert und jeweils 24 h und 48 h nach Transfektion fixiert. Für die anschließende Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die fixierten Zellen wie nach 3.3.3 gefärbt und eingebettet. Die zur Zählung der Sec61 α 1Wt/R236C-GFP-positiven Zellen verwendeten Bilder wurden „blind“ in folgender Weise aufgenommen: In der gleichen Vergrößerung mit gleichem Bildausschnitt wurden pro Versuch jeweils drei Bilder eines Präparats anhand der Färbung der Zellkerne mit DAPI aufgenommen. Anschließend wurde die Gesamtanzahl der Zellen anhand der gefärbten Zellkerne gezählt und der Anteil von Sec61 α 1Wt- oder Sec61 α 1R236C-GFP-positiven Zellen bestimmt. In der statistischen Auswertung mittels ANOVA ergab sich ein signifikanter Unterschied bei dem Vektor pcDNA-DEST47 in der Anzahl Sec61 α 1Wt-GFP-positiver Zellen zu Sec61 α 1R236C-GFP-positiven bei Fixierung 24 h nach Transfektion. Hier wurde die untersuchte Sec61 α 1-Mutante signifikant weniger detektiert als der Wildtyp. Auch wenn die Ergebnisse aller anderen Vergleiche keine statistische Signifikanz aufweisen, ist die Tendenz von einem geringeren Anteil Sec61 α 1R236C-GFP-positiver Zellen im Vergleich zu Sec61 α 1Wt-GFP, sowie eine Abnahme der Anzahl Sec61 α 1R236C-GFP-positiver Zellen über die Zeit im Vergleich zu eher konstanten Anteilen von Sec61 α 1Wt-GFP-positiven Zellen, deutlich zu erkennen (s. Abbildung 14). Auffällig sind zudem die erheblichen Unterschiede der Expression des Proteins zwischen den verschiedenen Vektoren. Während der maximale Mittelwert GFP-positiver-Zellen bei pEGG2Hamp1 bei ca. 2% liegt, konnten bei pEpi-CuoGate bis zu ca. 33% GFP-positive Zellen im Mittelwert detektiert werden.

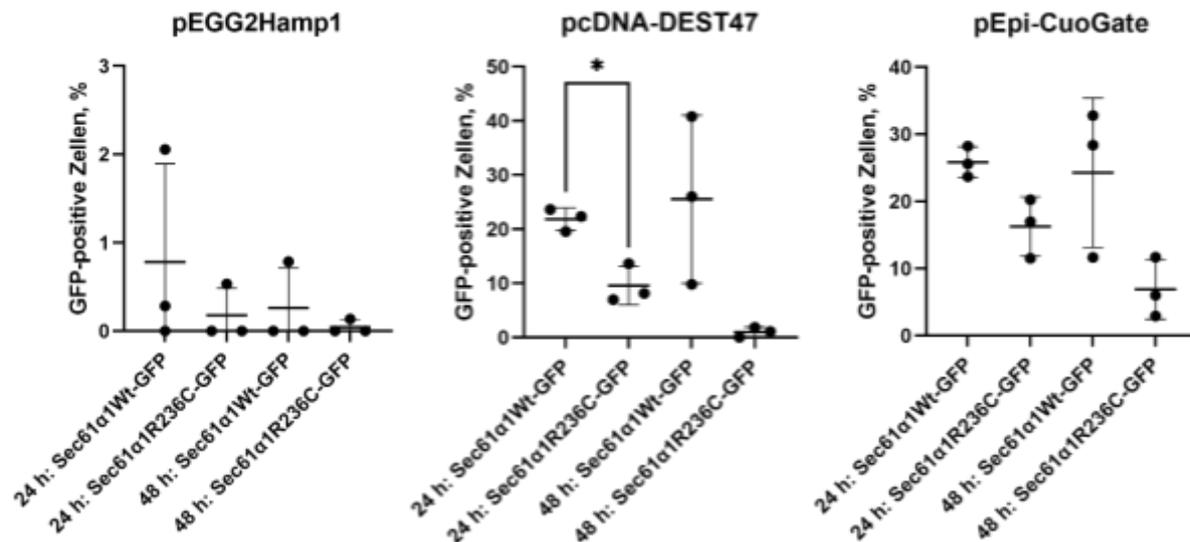


Abbildung 14: Vergleich der Anzahl Sec61α1Wt-GFP- und Sec61α1-R236C-GFP-positiver Zellen
 Dargestellt ist die statistische Auswertung des Vergleichs von Sec61α1Wt-GFP- und Sec61α1R236C-GFP-positiven HeLa-Zellen 24 h und 48 h nach Transfektion von drei verschiedenen Vektorpaaren. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ergibt sich bei dem Vektor pcDNA-DEST47 im Vergleich der Anzahl von Sec61α1Wt-GFP- und Sec61α1R236C-GFP-positiven Zellen 24 h nach Transfektion. Bei allen drei Vektoren ist die Tendenz sichtbar, dass unabhängig vom Zeitpunkt weniger positive Zellen der Mutante im Vergleich zum Wildtyp erfasst werden konnten und dass die Rate positiver Zellen des Wildtyps im Verlauf der Zeit konstant zu bleiben scheint, während die Rate positiver Zellen der Mutante tendenziell fällt. Erhoben wurden die Raten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Es wurden drei unabhängige Transfektionen durchgeführt und pro Versuch und Zeitpunkt von jedem Vektor und Sec61α1-Konstrukt drei Bilder ausgewertet (N=3, n=3). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

4.5.2 Vergleich der Expression von Sec61α1Wt-GFP- und Sec61α1-R236C-GFP in der WB-Analyse

Zur Untermauerung der in 4.5.1 beschriebenen Unterschiede zwischen Sec61α1Wt und Sec61α1-R236C wurden HeLa-Zellen transient mit pcDNA-DEST47-Sec61α1Wt-GFP oder pcDNA-DEST47-Sec61α1R236C-GFP transfiziert (3.4.4) und nach 3.3.1 und 3.3.2 einer WB-Analyse unterzogen. Als Transfektionskontrolle vor Herstellung der Zellysate diente die Fluoreszenzmikroskopie von pEpi-EGFP. Die immunologische Detektion von Sec61α1 mit dem primären Antikörper 14867S von Cell Signaling zeigte eine Bande des endogenen Proteins auf Höhe von ca. 40 kDa bei allen Zellysaten in allen drei Versuchsdurchläufen (s. Abbildung 15). Ektopes Sec61α1Wt-GFP wurde ebenfalls in allen drei Versuchsansätzen auf einer Höhe von ca. 70 kDa detektiert. Ektopes Sec61α1R236C-GFP kann nur bei der zweiten WB-Analyse als schwache Bande auf gleicher Höhe wie Sec61α1Wt-GFP vermutet werden.

Im ersten und dritten Versuchsdurchlauf sind keine Banden von Sec61 α 1R236C-GFP zu sehen. Der Verdacht einer geringeren Expression der Mutante im Vergleich zum Wildtyp, wie bereits in 4.5.1 beschrieben, wird durch die Ergebnisse der vorliegenden WB-Analyse als bekräftigt angesehen.

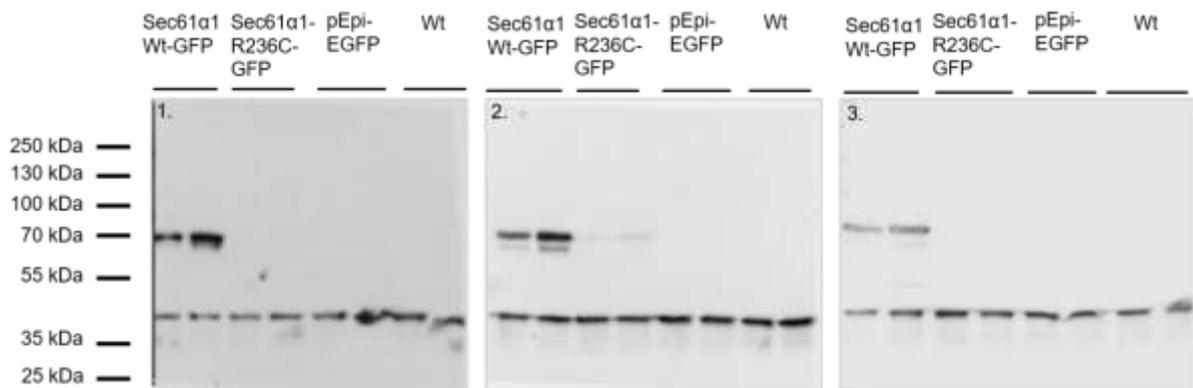


Abbildung 15: Vergleich der Expression von Sec61 α 1Wt-GFP und Sec61 α 1R236C-GFP in der WB-Analyse

Dargestellt sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse mit primärem Antikörper (14867S Cell Signaling) gegen Sec61 α 1 in wildtypischen HeLa-Zellen und nach transienter Transfektion von pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt-GFP (Probe in der Abbildung bezeichnet als Sec61 α 1Wt-GFP), pcDNA-DEST47-Sec61 α 1R236C-GFP (Probe in der Abbildung bezeichnet als Sec61 α 1R236C-GFP) und pEpi-EGFP. Während die Expression von Sec61 α 1Wt-GFP konstant zu einer deutlichen Bande auf einer Höhe von 70 kDa führt, kann Sec61 α 1R236C-GFP nur im zweiten Versuchsdurchlauf als sehr schwache Bande auf gleicher Höhe dargestellt werden. Als Transfektionskontrolle wurden Zellen mit pEpi-EGFP transfiziert. Dieses konnte vor Herstellung der Zelllysate mittels Immunfluoreszenz detektiert werden. Alle Proben zeigen eine konstante Bande des endogenen Sec61 α 1 auf Höhe von ca. 40 kDa. N=3

4.6 Untersuchung transient transfizierter HeLa-Zellen mittels EdU-Assay

Zur Ursachenfindung der geringeren Expression von Sec61 α 1R236C-GFP im Vergleich zu Sec61 α 1Wt-GFP (4.5) wurde überprüft, ob ein Unterschied in der Proliferation der unterschiedlich transfizierten HeLa-Zellen vorliegt. Dazu wurde ein EdU-Assay durchgeführt. Mit diesem ist es möglich, Zellen, die sich in der Synthese-Phase des Zellzyklus befinden, zu markieren (3.2.12). Zur Auswertung der Unterschiede zwischen Zellen, die mit pEpi-CuoGate-Sec61 α 1Wt-GFP oder pEpi-CuoGate-Sec61 α 1R236C-GFP transfiziert worden sind, wurden Aufnahmen der GFP-positiven Zellen bei gleichzeitiger Verblindung des EdU-Signals am konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop aufgenommen. Anschließend wurde der Anteil EdU-positiver Zellen von je 100 GFP-positiven Zellen bestimmt. In der statistischen Analyse mittels

Student's t-test zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil Edu-positiver Zellen zwischen Sec61 α 1Wt-GFP-positiver Zellen und Sec61 α 1-R236C-GFP-positiver Zellen. Dabei zeigen die Ergebnisse von Sec61 α 1-R236C transfizierten Zellen eine wesentlich größere Streuung als Zellen, die mit der wildtypischen Variante transfiziert waren (s. Abbildung 16).

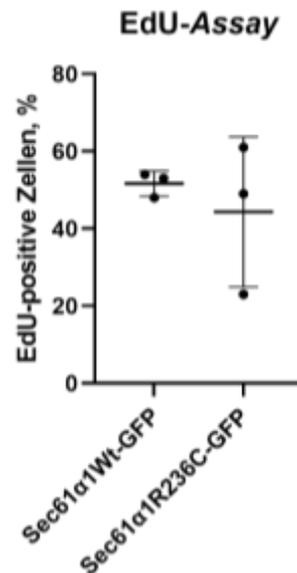


Abbildung 16: EdU-Assay transient transfizierter HeLa-Zellen

Dargestellt ist die statistische Auswertung des Edu-Assays von HeLa-Zellen, die zuvor mit pEpi-CuoGate-Sec61 α 1Wt-GFP oder pEpi-CuoGate-Sec61 α 1-R236C-GFP transfiziert worden waren. Es wurde der Anteil Edu-positiver Zellen von jeweils 100 GFP-positiven Zellen mithilfe der IF bestimmt. Insgesamt wurde der Versuch dreimal durchgeführt (N=3). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil Edu-positiver Zellen zwischen Sec61 α 1Wt-GFP und Sec61 α 1-R236C-GFP exprimierenden Zellen.

4.7 Ergebnisse der lentiviralen Transduktion des Vektors pINDUCER-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP

4.7.1 Ergebnisse der lentiviralen Transduktion von HeLa- und MDCKII-Zellen

Nach den erfolglosen Versuchen mittels selektionierter Transfektion und *Knockout-Rescue*-Ansätzen Sec61 α 1Wt/-R236C stabil in Zellen zu exprimieren bzw. in das Genom der Zellen zu integrieren, wurde die lentivirale Transduktion von HeLa- und MDCKII-Zellen zum Vektortransfer von Sec61 α 1-Konstrukten genutzt. Dadurch sollte einerseits die Rate eines erfolgreichen Vektortransfers im Vergleich zur Transfektion gesteigert werden und andererseits bot es den Vorteil einer stabilen Integration des Sec61 α 1-Konstrukts in das Genom der Zielzellen. Im ersten Schritt wurde Sec61 α 1Wt/-R236C (codiert auf dem *Entry*-Vektor pENTRMCS-Sec61 α 1WtNostopp/pENTRMCS-Sec61 α 1R236CNostopp) in den induzierbaren Vektor pINDUCER21-GFP (3.4.8) mittels LR-Reaktion (3.2.6) kloniert. Es folgte die Transformation in kompetente *E. coli* (3.1.2), die Isolation der Plasmid-DNA (3.1.1) und die Überprüfung der generierten Vektoren mittels Sequenzierung (3.2.8). Anschließend erfolgte die Transfektion von HEK-Zellen mit dem jeweiligen pINDUCER21-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP, pMD2.G VSVG und psPAX2. Die darauffolgend von den HEK-Zellen sezernierten Lentiviren im Zellüberstand wurden zur Transduktion von HeLa- und MDCKII-Zellen eingesetzt (3.4.9). Pro Vektor und Zelllinie wurde eine Transduktion durchgeführt, das bedeutet es gab vier Transduktionsansätze (HeLa-Zellen mit je pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP und pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP und MDCKII-Zellen mit je pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP und pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP). Die zwei Schalen transduzierter MDCKII-Zellen wurden zur Optimierung der Selektion unmittelbar vor dem Selektionsstart auf je zwei Zellkulturschalen gleichmäßig aufgeteilt. So ergaben sich vier Schalen mit je zweimal gleich transduzierten MDCKII-Zellen, die im Folgenden als 1.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP und 1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP und 2.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP und 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP bezeichnet werden. Die transduzierten HeLa-Zellen wurden zum Selektionsstart lediglich von den 6-well-Schalen auf je eine 10 cm-Zellkulturschale übertragen. Zu Beginn der Selektion transduzierter Zellen mit Puromycin wurde das Zellmedium jeden bis jeden zweiten Tag getauscht, da der gelöste Zelldetritus entfernt werden sollte. Nach ca. vier Tagen verminderte sich die Menge der täglich abgelösten, toten Zellen und kleine Kolonien positiv-selektionierter, lebender Zellen wurden sichtbar. Im Falle der transduzierten MDCKII-Zellen bildete sich je Zellkulturschale eine Kolonie. Im Falle der transduzierten HeLa-Zellen bildeten sich mehrere kleine Kolonien je Zellkulturschale, die anschließend als Mischkultur weiter hochgezogen wurden. Alle Ansätze transduzierter Zellen wurden unter Selektionsbedingungen bis zur Konfluenz weiter kultiviert

(Dauer ca. 14 Tage). Sobald dies erreicht war, wurden Kryokonserven der ersten Passage der Zellen nach Transduktion angelegt (3.4.3). Zusammenfassend konnten die vier folgenden Zelllinien durch erfolgreiche Transduktion und Selektion etabliert werden: HeLa_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP, HeLa_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP, 1.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP, 1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP, 2.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP und 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP.

4.7.2 Ergebnisse der Induktion von MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP in der Immunfluoreszenzmikroskopie

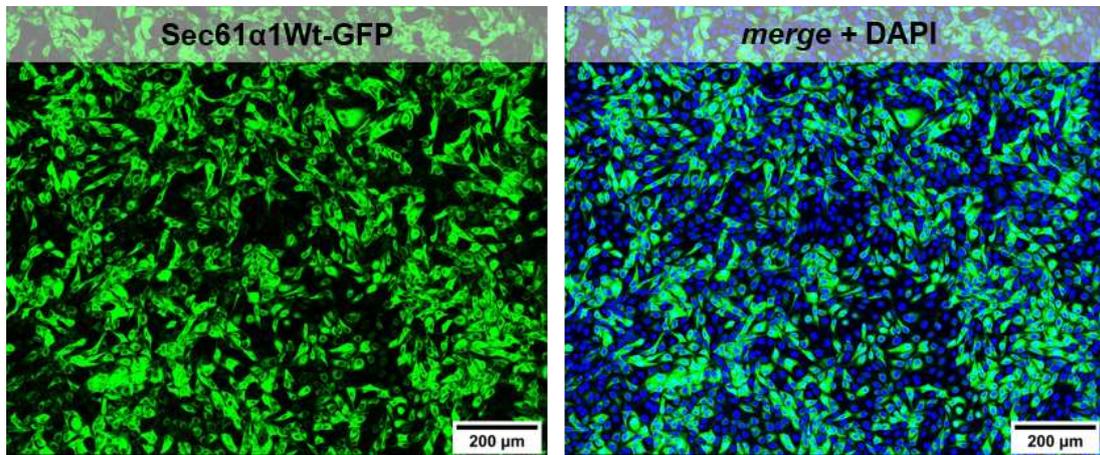
Die Expression von Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP in den etablierten transduzierten Zelllinien 1.1_/1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP und 2.1_/2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP wurde nach Inkubation der Zellen mit 250 ng/ml Doxycyclin (Dox) innerhalb einer Zeitspanne von 24-72 h mittels konfokaler IF anhand des GFP-Signals überprüft. Zur Verstärkung des GFP-Signals wurden die fixierten Zellen mit dem primären Antikörper Ziege-Anti-GFP von *Rockland Immunochemicals Inc.* (600-101-215) gefärbt.

4.7.2.1 Nachweis von induzierter Sec61 α 1Wt-GFP Expression in 1.1_/1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP

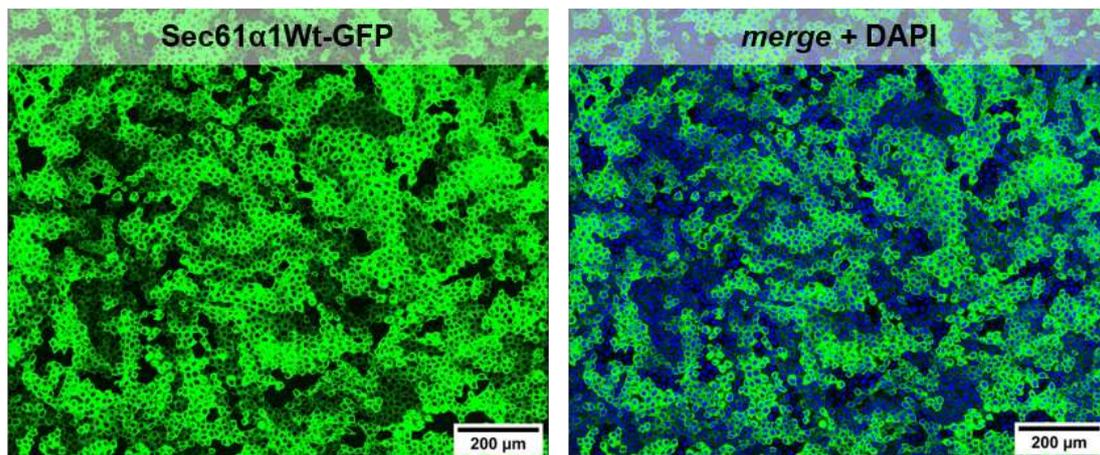
Bei beiden mit pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP transduzierten Zelllinien konnte eine Expression von Sec61 α 1Wt-GFP mit Doxycyclin induziert werden. Bei 1.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP waren sowohl nach 24 und 72 h Induktion fast alle Zellen GFP-positiv (s. Abbildung 17A). Von der Zelllinie 1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP konnten deutlich weniger Zellen induziert werden. Hier lag der Anteil GFP-positiver Zellen zu beiden Zeitpunkten bei maximal 10 % (s. Abbildung 17B). Die nicht-induzierten Zellen der Linien 1.1_/1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP zeigten sehr vereinzelt eine Expression des Proteins. Man spricht in diesem Fall von einer geringen, aber akzeptablen *Leakyness* des Vektors.

A

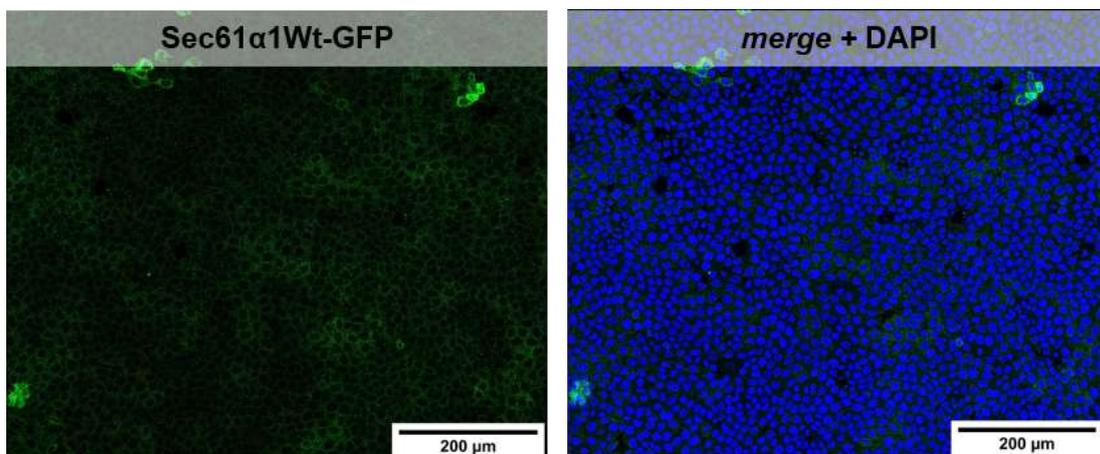
24 h + Dox



72 h + Dox

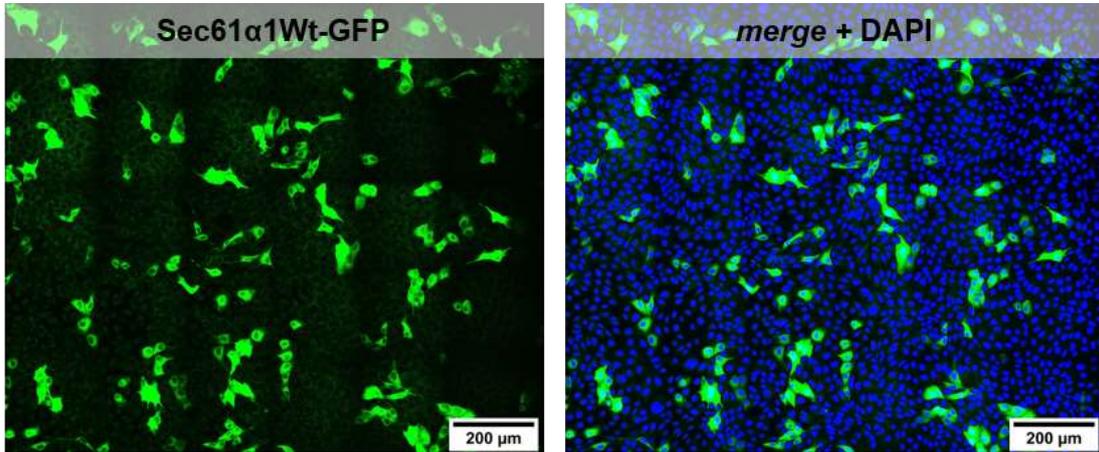


- Dox

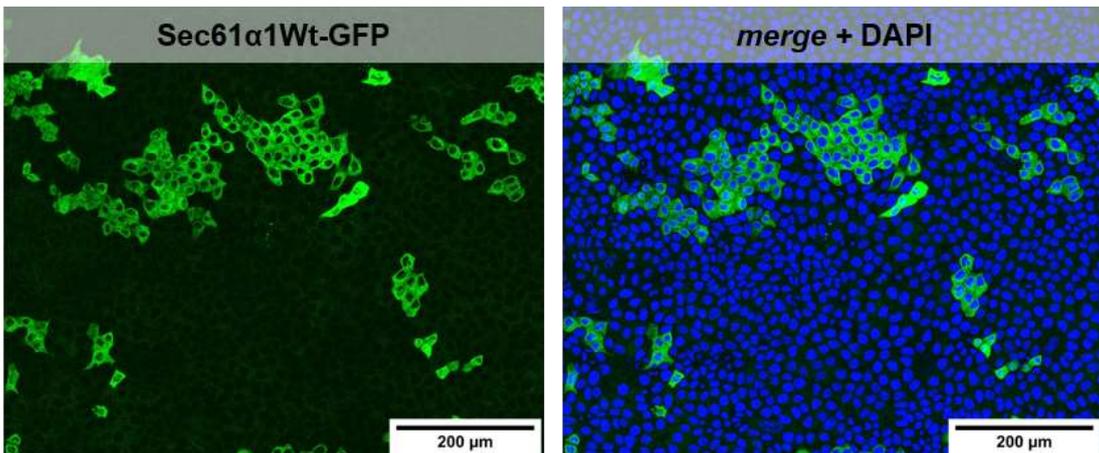


B

24 h + Dox



72 h Dox



- Dox

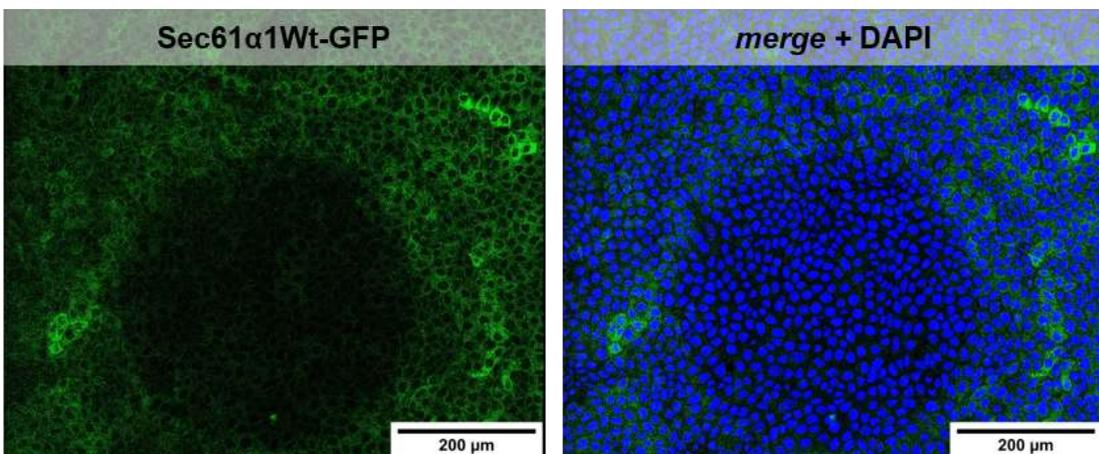


Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopie von 1.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP und 1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP nach Doxycyclin Induktion

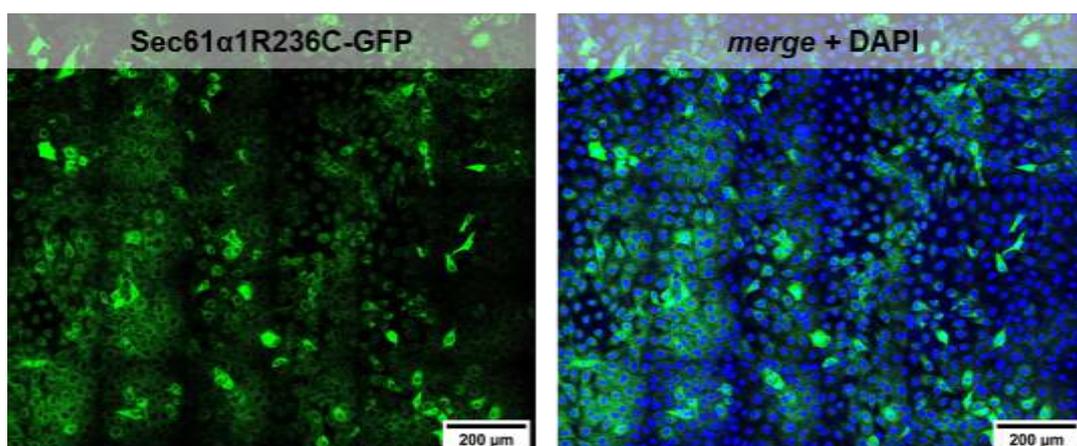
Dargestellt sind die Zelllinien 1.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP (A) und 1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP (B) nach 24 und 72 h Inkubation mit 250 ng/ml Doxycyclin bzw. bei Fixierung nach 72 h ohne Induktion (- Dox). Zur Verstärkung des GFP-Signals wurden die Zellen mit dem Primärantikörper Anti-GFP Maus (1:500) gefärbt. In beiden Zelllinien konnte eine induzierte Expression von Sec61α1Wt-GFP nachgewiesen werden. A zeigt zu beiden Zeitpunkten einen größeren Anteil GFP-positiver Zellen als B. Der Vektor pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP ist in beiden Zelllinien kaum *leaky*. N=1

4.7.2.2 Nachweis von induzierter Sec61α1R236C-GFP Expression in 2.1_/2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP

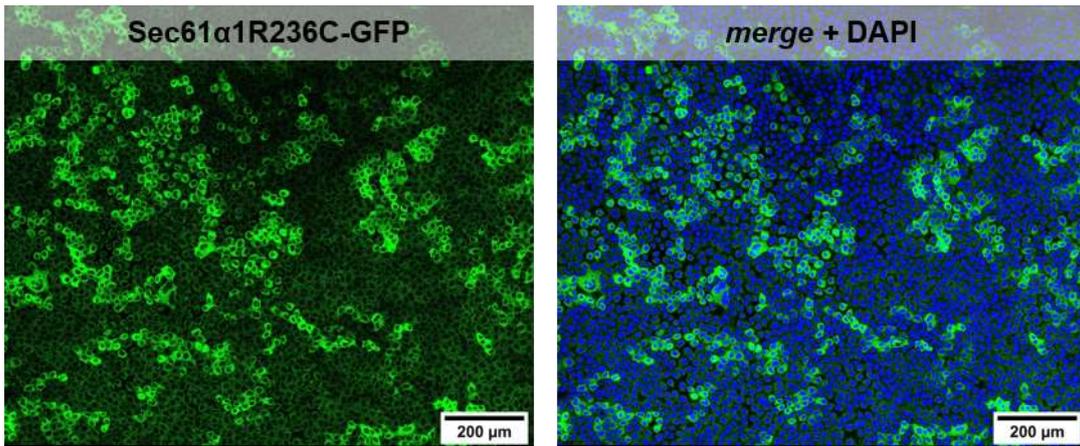
Auch die Induktion der beiden Zelllinien 2.1_/2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP viel positiv aus. Bei 2.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP stieg der Anteil GFP-positiver Zellen mit längerer Induktionsdauer auf ca. 20 % positiver Zellen nach 72 h Doxycyclinexposition (s. Abbildung 18A). Die Zelllinie 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP zeigte eine relativ konstante Anzahl induzierbarer Zellen (s. Abbildung 18B). Beide pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP Zelllinien zeigten keine *Leakiness*.

A

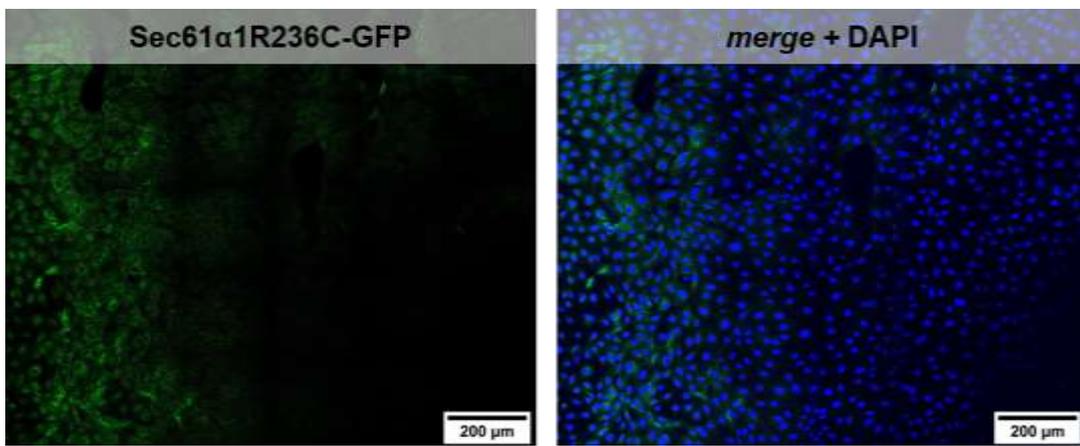
24 h + Dox



72 h + Dox

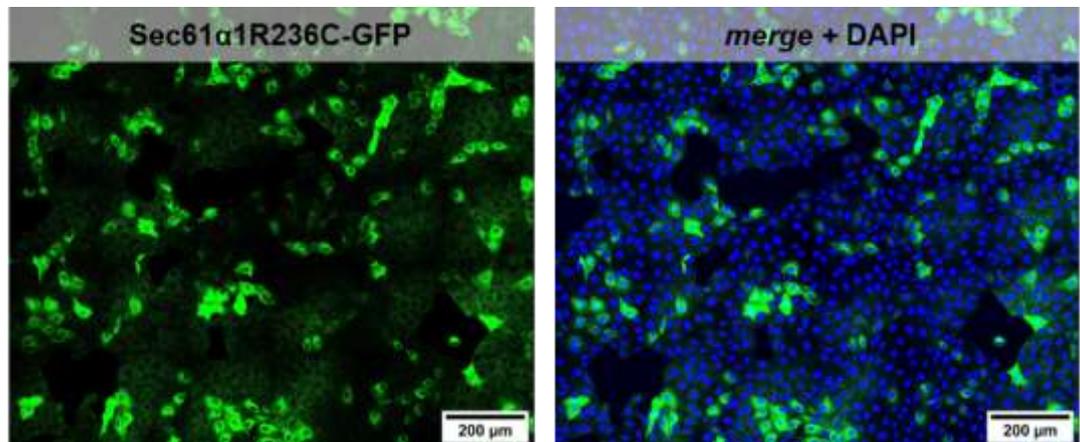


- Dox

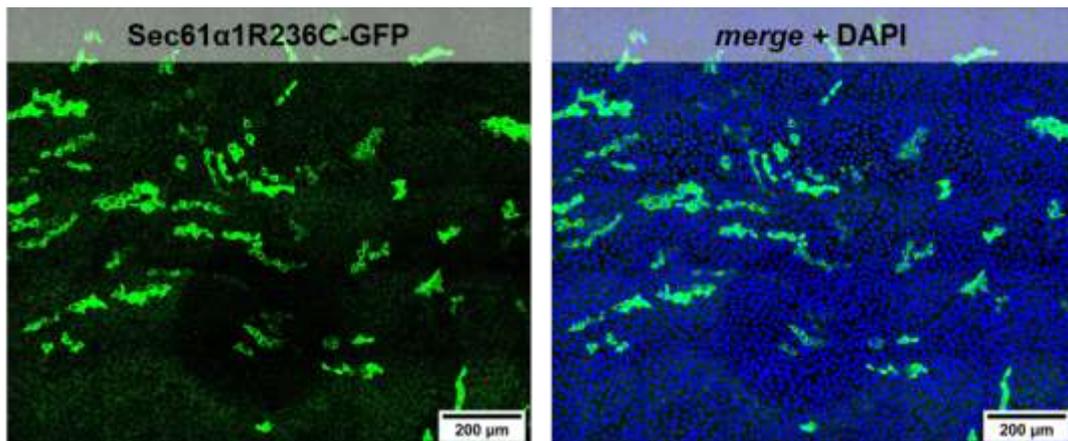


B

24 h + Dox



72 h + Dox



- Dox

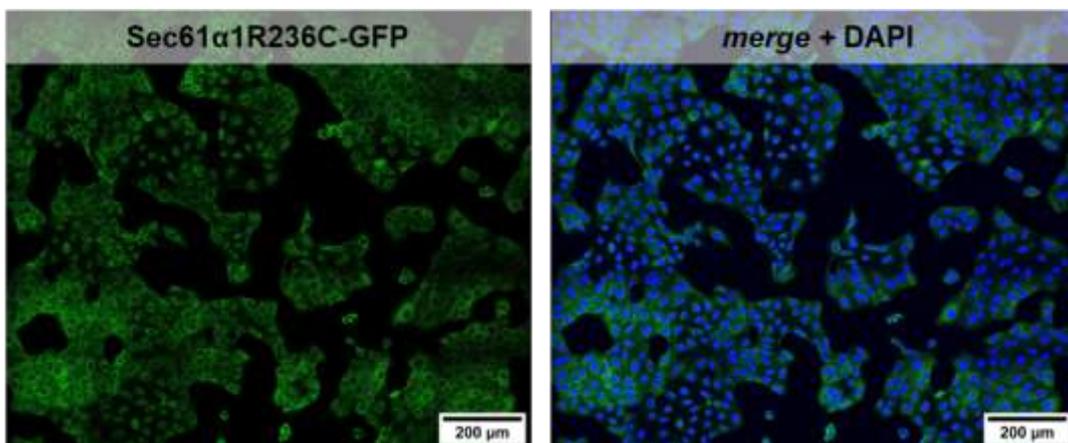


Abbildung 18: Immunfluoreszenzmikroskopie von 2.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP und 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP nach Doxycyclin Induktion

Dargestellt sind die Zelllinien 2.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP (A) und 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP (B) nach 24 und 72 h Inkubation mit 250 ng/ml Doxycyclin bzw. bei Fixierung nach 24 h ohne Induktion (- Dox). Zur Verstärkung des GFP-Signals wurden die Zellen mit dem Primärantikörper Anti-GFP Maus (1:500) gefärbt. In beiden Zelllinien konnte eine induzierte Expression von Sec61α1R236C-GFP nachgewiesen werden. In den vorliegenden Übersichtsaufnahmen nimmt der Anteil GFP-positiver und somit Sec61α1R236C exprimierender Zellen bei A mit längerer Doxycyclin-Inkubation zu, während der Anteil bei B geringer wird. Der Vektor pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP ist in beiden Zelllinien nicht *leaky*. N=1

4.7.2.3 Strukturelle Auffälligkeiten in der Darstellung von Sec61α1R236C-GFP bei 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP nach 24 h Induktion in der IF

Neben den Unterschieden in der Anzahl der Sec61α1(Wt/R236C)-GFP-exprimierender Zellen zwischen den vier etablierten transduzierten MDCKII-Zelllinien (4.7.2.1, 4.7.2.2), zeigten sich

strukturelle Auffälligkeiten in der Darstellung von Sec61 α 1R236C-GFP mittels IF nach 24 h Induktion bei der Zelllinie 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP. Die Struktur des Proteins zeigte sich hier gehäuft als grobporiges, die Zelle durchspannendes Netz (s. Abbildung 19). Nach 72 h Doxycyclin Inkubation konnte diese Struktur des Proteins nicht mehr gefunden werden. Ebenso zeigte keine der anderen transduzierten Zelllinien diese Auffälligkeit, weder die beiden mit der wildtypischen Variante von Sec61 α 1 transduzierten Zelllinien 1.1_/1.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1Wt-GFP, noch die andere Sec61 α 1R236C-GFP transduzierte Zelllinie 2.1_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP.

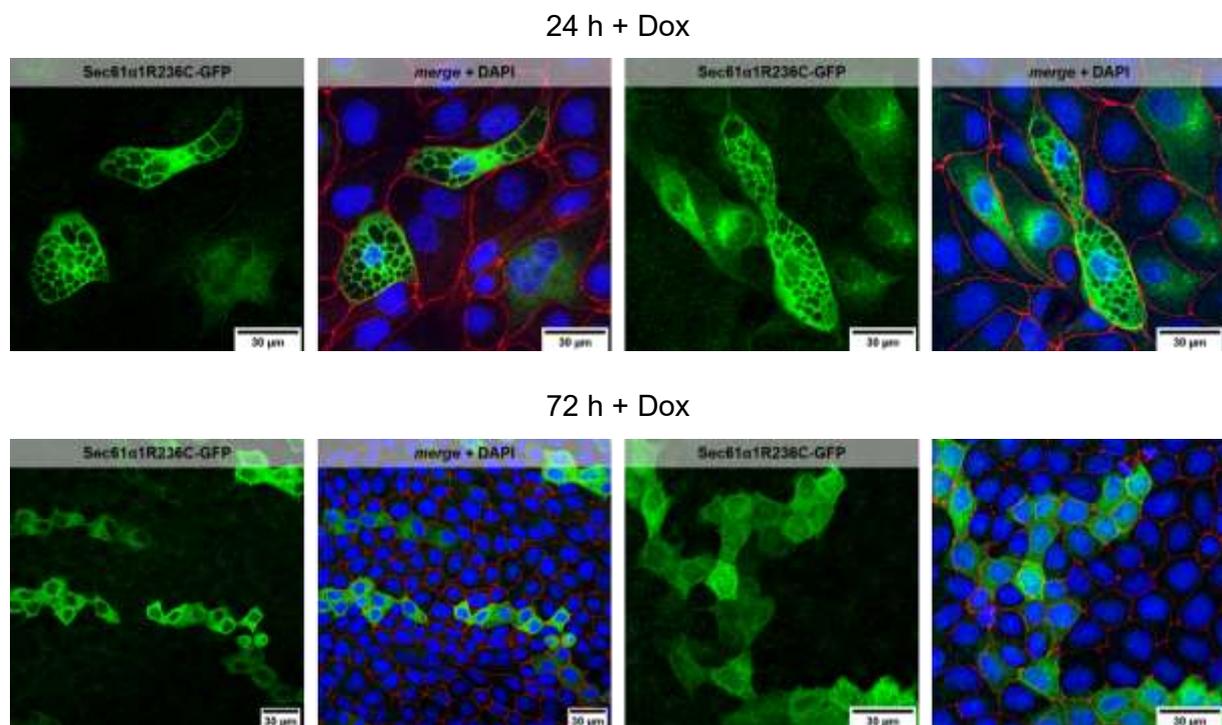


Abbildung 19: Abweichende Darstellung der Struktur von Sec61 α 1R236C-GFP bei 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP nach 24 h Induktion

Dargestellt ist die Zelllinie 2.2_MDCKII_pINDUCER21-Sec61 α 1R236C-GFP nach 24 (1. Reihe) und 72 h Induktion (2. Reihe) mit 250 ng/ml Doxycyclin. Nach Fixierung wurden die Zellen mit den primären Antikörpern Maus Anti-GFP (1:500), Ratte Anti-Zonula occludens-1 (1:200) und DAPI und entsprechenden Sekundärantikörpern (Anti-Maus-488, Anti-Ratte-568) gefärbt. Nach 24 h Induktion zeigte sich gehäuft eine grobporige Struktur von Sec61 α 1R236C-GFP, die nach 72 h Induktion nicht mehr detektiert werden konnte. N=1

5 Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind von hoher Relevanz für die weitere Untersuchung der Genmutation Sec61 α 1R236C, die mit polyzystischer Lebererkrankung assoziiert ist. Die gewonnenen Erkenntnisse über das Protein und die untersuchte Mutante in Bezug auf Methoden zur Detektion von Sec61 α 1, intrazelluläre Lokalisation und die etablierten Zellkulturmodelle bilden die Basis zur zellulären und funktionellen Analyse der Mutation. Durch die umfassenden Studien von Sec61 α 1 in der Immunfluoreszenzmikroskopie kann nun bei weiteren Studien auf eine Referenzabbildung und -lokalisierung des Proteins zurückgegriffen werden. Auch die Versuche zur Etablierung von *Knockout-Rescue* Zelllinien sowie zur Etablierung von Zelllinien mit stabiler Überexpression von Sec61 α 1R236C führten zu neuen Erkenntnissen und offenbarten unerwartete Schwierigkeiten bei der Arbeit mit der Sec61 α 1-R236C Mutante. So wurden erste Unterschiede zwischen der Expression des wildtypischen Proteins und Sec61 α 1R236C entdeckt. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Basis zur weiteren Etablierung eines Zellmodells zur Untersuchung von der Sec61 α 1R236C Mutante geschaffen.

5.1 Validierung verschiedener primärer Antikörper gegen Sec61 α 1

Zur Detektion von Sec61 α 1 wurden drei verschiedene, kommerziell erwerbbar primäre Antikörper gegen das Protein getestet (4.1). Es sollte eine Basis für zukünftige Arbeiten gelegt werden, die sich mit der Charakterisierung von Patientenzellen, die eine endogene Expression von Sec61 α 1R236C aufweisen, befassen. Getestet wurden die Primärantikörper in der IF und WB-Analyse durch Vergleich der Signale mit dem zuvor generierten rekombinanten Fusionsprotein Sec61 α 1Wt-GFP. Die auf das wildtypische Sec61 α 1-Konstrukt beschränkte Testung ist dabei als ausreichend zu bewerten, da nicht zu erwarten ist, dass der einzelne *missense*-Aminosäureaustausch R236C der Mutante zu einer Bindungsstörung des Antikörpers führt, insofern die immunogene Sequenz des Primärantikörpers überhaupt im Bereich der Mutation liegt.

Da auf der Anbieterseite keine universellen Standards zur Antikörper Validierung bestehen, sollte der Anwender selbst eine Funktionskontrolle durchführen, um die Affinität (Bindungsspezifität) und Avidität (Bindungsstärke) zu überprüfen. Ein geeigneter primärer Antikörper sollte eine hohe Affinität und eine hohe Avidität aufweisen. Es tritt dabei häufig auf, dass die Funktionalität des Antikörpers in der IF und WB-Analyse unterschiedlich ausfällt. In der letztgenannten Methode liegen die Proteine denaturiert in ihrer Primärstruktur als lineares Peptid vor. In den für die IF fixierten Zellen bleibt die Tertiärstruktur des Proteins erhalten, jedoch nimmt hier die Behandlung der Zellen mit PFA im Rahmen des Fixierungsprozess

Einfluss auf die räumliche Konfiguration der antigenen Epitope. Folglich bewirken die zwei unterschiedlichen Methoden eine Veränderung der räumlichen Konfiguration des Epitops, was zu einer methodenabhängigen Antikörperspezifität führen kann. Daher wurde die Reaktivität der Primärantikörper für jede Methode einzeln geprüft.

In der WB-Analyse (4.1.1) konnte nur der Anti-Sec61 α 1 Antikörper von Cell Signaling (Kat.-Nr. 14867S) als spezifischer Primärantikörper validiert werden. Die durch diesen Antikörper detektierte Bande von Sec61 α 1Wt-GFP befindet sich auf gleicher Höhe wie die durch den in unserer Arbeitsgruppe bereits validierten Antikörper Maus Anti-GFP (Santa Cruz sc9996) visualisierte Bande von Sec61 α 1Wt-GFP (Abbildung 8). Die Höhe der detektierten Bande (ca. 70 kDa) weicht leicht von der erwarteten Höhe von ca. 79 kDa ab. Es wäre möglich, dass sich an den in Sec61 α 1 gehäuft vorkommenden hydrophoben Bereichen der zehn Transmembranhelices (van den Berg et al. 2004) überproportional viel SDS anlagert. Dies würde eine stärkere Triebkraft des Proteins im Gel Richtung Anode bewirken und eine leicht verlängerte Laufstrecke erklären. Dieser Erklärungsansatz wird durch die ebenfalls verlängerte Laufstrecke des endogenen Sec61 α 1, detektiert auf einer Höhe von ca. 45 kDa statt der erwarteten Höhe von 52 kDa, gestützt.

Auch in der IF erzielte die Färbung mit dem Anti-Sec61 α 1 Antikörper von Cell Signaling (Kat.-Nr. 14867S) die stärkste Übereinstimmung mit den Signalen, die vom GFP-*getaggten* Sec61 α 1 detektiert werden konnten (4.1.2). Die Detektion von Sec61 α 1 mit dem Anti-Sec61 α 1 Antikörper von Invitrogen (Kat.-Nr. PA5-21773) kann in der IF ebenfalls als relativ spezifisch bewertet werden, während der Antikörper für eine WB-Analyse völlig ungeeignet ist. NB100-768 Ziege Anti-Sec61 α 1 von Novus Biologicals erweist sich für jede Methode als untauglich.

Abschließend ist zu betonen, dass aufgrund des Fehlens von Negativkontrollen durch *Knockout* Zelllinien keine absoluten Aussagen zur Validität der getesteten Antikörper gemacht werden können. Jedoch unterstreichen die Ergebnisse die Notwendigkeit der Testung der Antikörperspezifität vor individuellem Einsatz im Labor.

5.2 Detektion von Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C anhand von tag-Proteinen

Um endogenes Sec61 α 1 von ektopen Sec61 α 1(Wt/R236C) unterscheiden zu können, wurden rekombinante Fusionsproteine bestehend aus Sec61 α 1 und einem Protein-*tag* generiert. Da ein Anti-Sec61 α 1 Antikörper immer endogenes und ektopes sowie Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C erkennen würde, war das *taggen* des Proteins ein essenzieller Schritt, um später ausschließlich die mutierte Variante analysieren zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden Fluoreszenz- und Epitop-*tags* an das C-terminale Ende von Sec61 α 1 angefügt.

Anschließend musste überprüft werden, ob diese angefügten Peptide zu Expressions-, Funktions- oder Lokalisationsstörungen von Sec61 α 1 führen.

5.2.1 Generelle Vor- und Nachteile der verschiedenen *tag*-Proteine

Die verwendeten *tag*-Proteine lassen sich in Epitop- und Fluoreszenz-*tags* unterscheiden. Epitop-*tags* sind kurze Aminosäuresequenzen, die von entsprechenden kommerziell erwerblichen Antikörpern erkannt werden. Durch Kopplung mit einem Sekundärantikörper kann so das *getaggte* Protein visualisiert werden. Bei Einsatz von Fluoreszenz-*tags* kann das Protein aufgrund der Autofluoreszenz des Protein-*tags* ohne weitere Immunhistochemie in der IF in vivo oder in der konfokalen IF dargestellt werden. Fluoreszenz-*tags* bieten somit den Vorteil, dass die Gefahr einer möglichen unspezifischen Färbung durch nicht funktionale Antikörper entfällt. Außerdem ist es sehr vorteilhaft, wenn die Expression des Proteins detektiert werden kann, ohne dass die Zellen dazu präpariert (im Falle der IF fixiert und gefärbt, im Falle der WB-Analyse lysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt) werden müssen. Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenz-*tag* GFP ist einer der bekanntesten *tags* in der heutigen Forschung. Da es sich bei diesem Protein-*tag* um ein relativ großes Protein von ca. 26 kDa handelt, steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit einer störenden Interaktion mit dem Zielprotein (Bräuer et al. 2019; Brieger et al. 2012). Die Epitop-*tags* bestehen aus deutlich kleineren Aminosäureketten, sodass die Möglichkeit einer Wechselwirkung mit der Struktur und Funktion des Zielproteins verringert wird. Auf der anderen Seite ist man bei dieser Art von Protein-*tag* auf die Verfügbarkeit validierter Primärantikörper angewiesen. Ein Anteil von unspezifischen Signalen kann mit Epitop-*tags* nie ausgeschlossen werden. Zudem wird auch beim Einsatz von kleinen Epitop-*tags* von störenden Interaktionen mit dem Zielprotein berichtet (Thielges et al. 2011).

5.2.2 Funktionalität der verschiedenen Protein-*tags* bei Sec61 α 1Wt/-R236C in der IF

Nach Testung von fünf verschiedenen C-terminalen Protein-*tags* zur Detektion von Sec61 α 1Wt/-R236C in der IF (4.2.1) erwies sich GFP als Markerprotein mit den stärksten Signalen, das zur spezifischsten Darstellung von Sec61 α 1 führte. Deshalb wurde die GFP-*getaggte* Variante von Sec61 α 1Wt/-R236C zum Ausgangsmodell für alle weiteren Versuche dieser Arbeit. Da auch andere Arbeitsgruppen auf das Fusionsprotein Sec61 α 1-GFP zurückgreifen (van Nieuwenhove et al. 2020) konnten wir in Zusammenschau mit unseren Ergebnissen keinen Anhaltspunkt für eine Interaktion zwischen GFP und Sec61 α 1Wt/-R236C, die eine veränderte Proteinstruktur, -funktion oder -lokalisation zur Folge haben könnte (4.2.2), finden. Da zu Beginn der Arbeit kein validierter Primärantikörper gegen Sec61 α 1 zur

Verfügung stand und unsere Arbeitsgruppe bisher keine Erfahrung mit dem untersuchten Protein hatte, konnte jedoch auf keinerlei Referenzdarstellung von Sec61 α 1 in der IF zurückgegriffen werden. Bis auf den 3xHA-*tag* erzielten alle anderen immunhistochemischen Färbungen der Epitop-*tags* keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Aufgrund der Funktionalität des längeren 3xHA-*tags* lassen sich als Ursache für die schwierige Detektion der anderen kleinen Epitop-*tags* Defizite in der Spezifität der Primärantikörper annehmen. Ergänzende, hier nicht durchgeführte Untersuchungen zur möglichen Störung von Sec61 α 1 durch das *tag*-Protein, könnte eine Variation der Stelle des *tags* innerhalb des Proteins, z. B. N-terminale Positionierung, umfassen.

5.3 Vergleichende Lokalisationsstudien von Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C

Neben dem möglichen Einfluss des *tag*-Proteins auf die intrazelluläre Lokalisation von Sec61 α 1, sollte grundsätzlich ein Vergleich der Struktur von Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C in der konfokalen IF durchgeführt werden. Da zuvor veröffentlichte Studien anderer Sec61 α 1-Mutationen von Kollokationen der jeweils untersuchten Mutante mit Markern des GA berichten (Bolar et al. 2016; van Nieuwenhove et al. 2020), wurde eine Analyse der intrazellulären Lokalisation von Sec61 α 1Wt im Vergleich zu Sec61 α 1R236C mithilfe von Markern des ER und GA durchgeführt (4.2.2). In den dargestellten Ergebnissen (s. Abbildung 11) sowie in vielen weiteren hier nicht abgebildeten Lokalisationsstudien ergaben sich keine Hinweise für eine Kollokation von Sec61 α 1R236C mit dem Marker des GA. Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C kollokalisieren stets mit Sec61 β , dem genutzten ER-Marker. Etwaige Veränderung der Proteinfunktion sind somit nicht in intrazellulärer Delokalisation zu vermuten.

5.4 Bewertung der verschiedenen Möglichkeiten zur Etablierung eines Zellkulturmodells mit stabiler Expression von Sec61 α 1Wt/-R236C

Nach den erfolgreich etablierten Methoden zur Detektion von Sec61 α 1Wt/-R236C sollte ein Zellkulturmodell entwickelt werden, das die untersuchte Mutante bzw. den Wildtyp von Sec61 α 1 stabil und somit dauerhaft exprimiert. Die Umsetzung dieses Ziels wurde mit vier verschiedenen Methoden ausgeführt, die sich im Grad ihrer möglichen Aussagekraft sowie Komplexität unterscheiden: stabile Transfektion, CRISPR-Cas9 *Knockout* mit vektorbasiertem Rescue, CRISPR-Cas9 *Knockout* mit integrationsbasiertem Rescue und lentivirale Transduktion.

5.4.1 Zelllinien mit stabiler Überexpression von wildtypischen und mutierten Sec61 α 1

Zunächst wurde mittels Transfektion und anschließender Antibiotikaselektion versucht, Zelllinien mit stabiler Überexpression von Sec61 α 1Wt/-R236C zu generieren (4.3). Diese Methode wurde mit drei verschiedenen Vektoren, die sich in grundlegenden Eigenschaften unterscheiden, getestet. Der Vektor pEGG2-Hamp1-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP ist ein episomaler Vektor, der synchron mit der DNA-Replikation repliziert und somit ohne Integration in das zelluläre Genom über viele Zellzyklen in den Zellen erhalten bleibt. Grundsätzlich bietet dieser Vektor somit die höchste Wahrscheinlichkeit einer stabilen Überexpression von Sec61 α 1Wt/-R236C. In dieser Arbeit konnten nach transienter Transfektion dieses Vektors unerklärlicher Weise jedoch nur sehr wenige GFP-positive Zellen detektiert werden (4.5.1 Abbildung 14). Nach stabiler Transfektion mit anschließender Antibiotikaselektion der transfizierten Zellen gelang trotzdem die Etablierung einer Zelllinie mit pEGG2-Hamp1-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP (4.3.1). Eine mehrfach durchgeführte IF der Zelllinien MDCKII_pEGG2Hamp1-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP zeigte allerdings, dass nur die wildtypische Variante (Sec61 α 1Wt-GFP) von den Zellen exprimiert wurde, während die Zelllinie MDCKII_pEGG2Hamp1-Sec61 α 1R236C-GFP zwar die auf dem Vektor codierte Antibiotikaresistenz erlangte, aber nicht das Protein (Sec61 α 1R236C-GFP) exprimierte. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Schubert et al. 2018, die ebenfalls eine Abnahme GFP-positiver Zellen nach stabiler Transduktion mit einer anderen GFP-getaggen Sec61 α 1-Mutante beschreiben. Solch eine *Exit*-Strategie der Zellen trat auch zuvor bereits anderen Projekten unserer Arbeitsgruppe. Durch nicht bekannte Mechanismen erlangen vereinzelte Zellen die Fähigkeit in dem antibiotikahaltigen Zellmedium zu überleben, ohne das auf dem Vektor kodierte Zielprotein zu exprimieren. Diese Zellen haben nun einen Vorteil, da sie keine Energie und Zeit für die Expression des Zielproteins aufwenden müssen und können sich somit schneller teilen. Nach einem längeren Selektionszeitraum besteht die Zellkultur dementsprechend nur noch aus diesen das Zielprotein nicht-exprimierenden Zellen. Auffällig war, dass Zellen, die mit Sec61 α 1R236C transfiziert worden waren, unabhängig vom Vektor, wesentlich häufiger die beschriebene *Exit*-Strategie entwickelten, als Zellen die mit Sec61 α 1Wt transfiziert wurden. Daraus konnten erste Vermutungen abgeleitet werden, dass die untersuchte Sec61 α 1-Mutante negative Einflüsse auf zelluläre Funktionen ausübt und führte zur weitergehenden Untersuchung des Expressionsunterschieds zwischen Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C mit drei verschiedenen Vektoren (4.5). Der andere Vektor, mit dem die Etablierung einer Zelllinie mit stabiler Transfektion gelang, war pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt/-R236-GFP (4.3.2). Dieser Vektor ist nicht episomal und wird dementsprechend bei der Zellteilung nicht an die Tochterzelle weitergegeben. Für eine dauerhafte zelluläre Expression dieses Vektors muss es zur Integration des Plasmids/ Teilen des Plasmids in das Genom der Zellen kommen. Eine Untersuchung der Zelllinien MDCKII_pcDNA-DEST47-Sec61 α 1Wt/-

R236-GFP in der IF ergab abermals eine geringere Anzahl GFP-positiver bei Sec61 α 1R236C im Vergleich zu Sec61 α 1Wt. Bei beiden Zelllinien war jedoch der Anteil GFP-positiver Zellen insgesamt gering, sodass diese verworfen wurden. Der Vektor pEpi-CuoGate eignete sich nicht zur stabilen Transfektion. Eine Selektion der Zellen nach Transfektion war nicht möglich, da das Antibiotikum innerhalb von 48 h alle Zellen abtötete.

5.4.2 Knockout Zelllinien mit verschiedenen Rescue-Ansätzen

Eine weitere Methode mit geringerer Erfolgswahrscheinlichkeit als eine reine stabile Überexpression von Sec61 α 1Wt/-R236C, aber möglicher größerer Aussagekraft, war der Versuch zur Etablierung von Sec61 α 1-Knockout Zelllinien. Da Sec61 α 1 ein essenzielles Protein ist (Lang et al. 2012), sollte der Funktionsausfall des endogenen Proteins über zwei unterschiedliche *Rescue*-Ansätze kompensiert werden. In einem Fall sollte ein konventionelles *Rescue* über Transfektion eines Sec61 α 1Wt/-R236C-kodierenden Plasmids erfolgen (3.4.6) und im anderen Fall sollte es zur gerichteten Integration von einer Sec61 α 1Wt/-R236C Teilsequenz an die Stelle des durch CRISPR-Cas9 initiierten DSB kommen (3.4.7). Das letztgenannte integrationsbasierte *Rescue* nach *CRISPaint* bietet dabei den Vorteil, dass das rekombinante Protein der Expression durch den endogenen Promotor unterliegt und somit das Modell mit der größten Ähnlichkeit zu Patientenzellen mit endogener Expression von Sec61 α 1R236C darstellt. Außerdem ist durch die Integration der *Rescue*-Sequenz in das zelluläre Genom eine dauerhafte Expression sichergestellt. Die dauerhafte Überexpression von Sec61 α 1Wt/-R236C, das auf einem Vektor mit rekombinantem Promotor kodiert ist, wie z. B. das hier benutzte *Rescue*-Plasmid, führt durch die vermehrte Expression des Proteins zu einer Veränderung des natürlichen Zellstoffwechsels. Nachteil von *CRISPaint* ist, dass gleichzeitig drei Plasmide in eine Zelle transfiziert werden müssen. Darauffolgend müssen die weiteren Schritte des Schneidens des endogenen Genoms und des Donorplasmids erfolgen und schlussendlich muss die Integration der gewählten Sequenz in korrekter Orientierung in das zelluläre Genom glücken. Bis zum integrationsbasierten *Rescue* müssen folglich viele aufeinanderfolgende und voneinander abhängige Schritte gelingen, sodass von Anfang an eine niedrigere Erfolgswahrscheinlichkeit im Vergleich zu anderen Methoden angenommen werden kann. Letztendlich ist in dieser Arbeit weder das konventionelle noch das integrationsbasierte *Rescue* nach *Knockout* von endogenem Sec61 α 1 gelungen, was nach den erfolglosen Versuchen zur Etablierung einer Zelllinie mit alleiniger stabiler Überexpression von Sec61 α 1Wt/-R236C nicht überraschend war. Dennoch leistet diese Arbeit einen Beitrag zur Vermehrung von Kenntnissen bei der Arbeit mit essenziellen Proteinen und deren *Knockouts*. Es wird deutlich, dass weder ein zum *Knockout* simultaner, konventioneller *Rescue*, noch ein integrationsbasierter *Rescue* mit den hier getesteten Methoden erfolgen

kann. Trotzdem sollte vor allem der Ansatz eines *Rescues* nach *CRISPaint* weiterverfolgt und verbessert werden, da er wegen der geschilderten Eigenschaften erhebliche Vorteile bietet.

5.4.3 Lentivirale Transduktion des induzierbaren Vektors pINDUCER21-Sec61α1Wt/R236C-GFP

Als letzte Möglichkeit zur Etablierung einer Zelllinie mit stabiler Expression von Sec61α1Wt/R236C wurde auf die lentivirale Transduktion des induzierbaren Vektors pINDUCER21-Sec61α1Wt/R236C-GFP zurückgegriffen. Im Vergleich zum Vektortransfer mittels Transfektion sollte die Effizienz des Vektorshuttels über die lentivirale Transduktion gesteigert werden. Außerdem bietet diese Methode den Vorteil, dass die gewünschte DNA-Sequenz fest in das Genom der Zielzellen integriert wird, folglich der endogenen Replikation unterliegt und somit dauerhaft in der gesamten Zellpopulation vorhanden ist. Nachteil dieses Zellkulturmodells ist die fortbestehende endogene Expression von Sec61α1. Mögliche Effekte der untersuchten Mutante könnten dadurch abgeschwächt werden. Um keine *Exit*-Strategien der Zellen zu fördern (5.4.1) und zunächst das Zellkulturmodell zu etablieren, ohne mögliche negative Einflüsse von Sec61α1R236C auf zelluläre Funktionen berücksichtigen zu müssen, wurde das Doxycyclin-induzierbare System pINDUCER21-GFP als zu transduzierenden Vektor verwendet. Der Anteil transduzierter Zellen stellte sich nach Beginn der Selektion als geringer heraus als angenommen, da lediglich eine Zellkolonie im antibiotikahaltigen Zellkulturmedium überleben konnte. Trotzdem konnte letztendlich aus jedem Ansatz eine Zelllinie etabliert werden (4.7.1).

5.4.3.1 Ergebnis der Induktion von MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1Wt/R236C-GFP

Die Beurteilung der transduzierten Zelllinien 1.1_/1.2_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP und 2.1_/2.2_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP in Bezug auf eine induzierbare Expression des jeweiligen Sec61α1-Konstruktes fällt für alle Zelllinien positiv aus. Die Unterschiede zwischen den Populationen des gleichen Sec61α1-Konstrukts sind wahrscheinlich zufälliger Natur und durch die Teilung der Zellkultur auf zwei getrennte Zellkulturschalen nach Transduktion, vor der Selektion entstanden. So wurden auf eine Zellkulturschale zufällig hauptsächlich Zellen übertragen, die zu einer induzierbaren Expression von Sec61α1Wt-GFP fähig sind (1.1_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP). Die andere transduzierte Zelllinie des Wildtyps (1.2_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP) beinhaltet dagegen mehr Zellen, die den Vektor pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP so in ihr Genom integriert haben, dass zwar ein Überleben und Proliferieren in antibiotikahaltigem Zellmedium möglich ist, jedoch keine Expression von Sec61α1Wt-GFP bei Induktion. Man

erkennt, dass die induzierbaren Zellen von 1.2_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP zunächst vereinzelt vorkommen und nach 72 h Induktion zu kleineren Inseln GFP-positiver Zellen führen (4.7.2.1). Im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen zu Sec61α1R236C erhielten wir bei beiden Zelllinien 2.1_- und 2.2_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP eine geringere Anzahl induzierbarer Zellen als bei den mit dem wildtypischen Sec61α1-Konstrukt transduzierten Zelllinien (4.7.2.2). Das Ergebnis von 2.1_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP nach 72 h Induktion stellt jedoch die höchste Expression von Sec61α1R236C dar, die wir in dieser Arbeit in einer stabilen Zelllinie erreichen konnten. Sowohl bei 1.1_/1.2_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1Wt-GFP als auch bei 2.1_/2.2_MDCKII-pINDUCER21-Sec61α1R236C-GFP handelt es sich um Mischpopulationen von induzierbaren und nicht induzierbaren Zellen. Insbesondere zur Erhöhung der Rate von Sec61α1R236C-GFP exprimierender Zellen wird eine Subklonierung empfohlen. Durch die Isolierung einzelner Zellklone könnten so Populationen mit fast 100 prozentiger induzierbarer Expression des Proteins etabliert werden. Die in 4.7.2.3 beschriebene auffällige Struktur von Sec61α1R236C kann in verschiedener Weise gedeutet werden. Zum einen könnte es sich um versuchstechnisch-bedingte Artefakte handeln. Alle Arbeitsschritte bis zum fertigen Objektträger mit Zellpräparat (u.a. Fixierung, Blockierung, Einbetten) können Auswirkungen auf die Darstellung des Proteins in der IF haben und in unbestimmter Weise variieren. Zum anderen könnte die alleinige Tatsache einer sehr starken Überexpression von Sec61α1R236C zur Veränderung der Darstellung in der IF führen. Dies könnte, unter der Annahme das eine starke Proteinüberexpression zu Störungen des physiologischen Zellstoffwechsels und -zykluses führen, in Einklang mit dem Verschwinden der auffälligen Struktur von Sec61α1R236C bei Fixierung nach 72 stündiger Induktion gebracht werden. Nicht zuletzt könnte die veränderte Struktur des Proteins durch die Mutation entstehen und somit Hinweise auf den zugrundeliegenden Pathomechanismus liefern. Um dies näher zu beleuchten, sollte der Versuch zunächst mehrfach wiederholt werden. Zellpopulationen mit einem hohen Anteil an Zellen mit der beschriebenen Sec61α1R236C-Struktur könnten anschließend *Readouts* z.B. in Hinblick auf ER-Stress unterzogen werden.

5.5 Expressionsunterschiede zwischen Sec61α1Wt und Sec61α1R236C

Die Ergebnisse der Versuchsansätze zur Etablierung von Zelllinien mit stabiler Überexpression von Sec61α1Wt/R236C sowie von *Knockout-Rescue* Zelllinien führten zur genaueren Analyse des Expressionsunterschieds zwischen Sec61α1Wt und Sec61α1R236C. Da wie in 4.5.1 beschrieben auch die Art des Plasmid-Vektors Einfluss auf die zelluläre Expression von Sec61α1Wt/-R236C nahm, wurde anhand aller drei Vektoren, die auch zur stabilen Transfektion eingesetzt wurden (pEGG2Hamp1, pcDNA-DEST47, pEpi-CuoGate),

bestimmt ob ein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Expression von Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C besteht (4.5). Die Fixierung der Zellen wurde 24 und 48 h nach Transfektion der Sec61 α 1Wt/-R236C Vektoren vorgenommen, um zu überprüfen, ob mögliche negative Einflüsse der Mutante mit zunehmender Wirkungsdauer zu Veränderungen in der Expression des Proteins bzw. der exprimierenden Zellen führen. Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen genutzt, weil sie nach Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe wesentlich leichter zu transfizieren sind, als MDCKII-Zellen. Zur Etablierung von Zellkulturmodellen mit Expression von Sec61 α 1R236C wurden hingegen nur MDCKII-Zellen verwendet, da diese spezifische Eigenschaften besitzen, wie beispielsweise die Fähigkeit zur Ausbildung einer primären Zilie (Kiesel et al. 2020), die in künftigen Projekten in Bezug auf Veränderungen durch Sec61 α 1R236C Expression untersucht werden sollten. Die statistische Auswertung der Anteile Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP exprimierender Zellen zeigte insgesamt nur einen signifikanten Unterschied bei dem Vektor pcDNA-DEST47 in dem Anteil GFP-positiver Zellen zwischen Sec61 α 1Wt-GFP und Sec61 α 1R236C exprimierenden Zellen bei Fixierung 24 h nach Transfektion (s. Abbildung 14). Sec61 α 1R236C-GFP konnte hier signifikant weniger detektiert werden als Sec61 α 1Wt-GFP. Trotzdem ist insgesamt bei allen Vektoren auffällig, dass beim Vergleich der jeweils gleichzeitig fixierten Zellen, der Mittelwert von Sec61 α 1R236C-GFP-positiven Zellen unter dem von Sec61 α 1Wt-GFP-positiven Zellen liegt. Eine geringere Expression von Sec61 α 1-Mutanten im Vergleich zum wildtypischen Protein wird bereits für mehrere Sec61 α 1-Mutationen beschrieben, die eine kausale Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheiten einnehmen (Bolar et al. 2016; Schubert et al. 2018; Tretter et al. 2013; van Nieuwenhove et al. 2020). Demnach wird der in diesem Versuch gemessene Expressionsunterschied zwischen Sec61 α 1R236C-GFP und Sec61 α 1Wt-GFP als wichtiger Hinweis auf eine ätiologische Rolle der untersuchten Mutation in der Zystenentwicklung der Indexpatientin gewertet. Um mehr statistisch signifikante Unterschiede zu belegen, könnte man die Anzahl der Versuchsdurchläufe steigern. Zudem könnte auch die Methode der Erfassung vom Anteil GFP-positiver Zellen verbessert werden, da diese in der vorliegenden Arbeit manuell abgezählt werden mussten und dabei viele Grenzfälle auftraten, in denen ohne feststehende Richtwerte entschieden werden musste, ob das GFP-Signal stark genug ist, um diese Zelle als GFP-positiv zu werten. Ein computerimplementierter Algorithmus zur Auswertung der Immunfluoreszenz-Bilder wäre hier die präferierte Methode. Bei dem Vektor pEGG2Hamp1 sind die Expressionsraten jedoch unabhängig vom transfizierten Sec61 α 1-Konstrukt so gering (max. Anteil GFP-positiver Zellen: 2 %), dass auch nach Verbesserung der Auswertungsmethode nicht mit signifikanten Ergebnissen zu rechnen ist. Zur Untersuchung von möglichen negativen Auswirkungen der zellulären Expression Sec61 α 1R236C auf Zellüberleben und -proliferation wurden zusätzlich die Anteile GFP-positiver Zellen des gleichen Konstrukts zwischen den zwei verschiedenen

Fixierungszeitpunkten einer statistischen Analyse unterzogen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 24 h: Sec61 α 1Wt-GFP und 48 h: Sec61 α 1Wt-GFP sowie zwischen 24 h: Sec61 α 1R236C-GFP und 48 h: Sec61 α 1R236C-GFP bei allen drei Vektoren. Während die grafische Auswertung das statistische Ergebnis eines relativ stabilen Anteils GFP-positiver Zellen bei Sec61 α 1Wt-GFP über die Zeit unterstützt, ist bei Sec61 α 1R236C-GFP wiederum eine Tendenz zur Abnahme der Expression der Mutante nach längerer intrazellulärer Lokalisation des Vektors erkennbar. Um die per IF ermittelten Expressionsunterschiede zu untermauern, wurde anschließend eine WB-Analyse durchgeführt (4.5.2). Dieses, im Vergleich zur Auswertungsmethode der IF-Bilder, objektivere Verfahren, bestätigt die Expressionsunterschiede zwischen Sec61 α 1Wt und Sec61 α 1R236C (s. Abbildung 15).

5.6 EdU-Assay von Sec61 α 1Wt/-R236C transfizierten HeLa-Zellen

Die nach 5.5 gewonnenen Erkenntnisse führten zur Hypothese, dass Sec61 α 1R236C einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation ausüben könnte, wodurch der abnehmende Anteil Sec61 α 1R236C-GFP-positiver Zellen über die Zeit zu erklären wäre. Demnach wurde ein EdU-Assay transient transfizierter HeLa-Zellen durchgeführt, der in der statistischen Auswertung keinen signifikanten Unterschied zwischen Sec61 α 1Wt- und Sec61 α 1R236C-transfizierten Zellen zeigt (4.6). Aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse, wird hier eine erhöhte Anzahl an Versuchsdurchläufen empfohlen, um eine eindeutigere Aussage treffen zu können. Die Veränderung EdU-positiver Zellen über einen längeren Zeitraum nach Transfektion wäre eine weitere Möglichkeit zur zusätzlichen Informationsgewinnung über die Zellproliferation bei Überexpression von Sec61 α 1R236C. Jedoch ist hier zu bedenken, dass die Zellen bei Start des Assays noch keine Konfluenz erreicht haben dürfen. Die Zahl der zu Beginn ausgesäten Zellen müsste somit variiert werden. Ergänzend könnte auch der zur Zellproliferation gegenteilige Prozess des programmierten Zelltods untersucht werden. Denn auch ein erhöhter Anteil apoptotischer Sec61 α 1R236C-GFP-exprimierender Zellen, könnte eine Abnahme GFP-positiver Zellen über die Zeit erklären.

5.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit generiert grundlegende Kenntnisse zu Sec61 α 1R236C und bietet eine Basis für weitere Studien. So wurden im Verlauf der Versuche viele Fragen aufgeworfen, die Anlass zur weiteren Forschung bieten. Diese sind unter anderem, weshalb Sec61 α 1R236C für die hier genutzten Zellen toxisch zu sein scheint, sodass eine dauerhafte Expression des Proteins in der Zellkultur aktuell nicht möglich ist, während die Indexpatientin, bis auf kompressionsbedingte Beschwerden anderer Organe durch die raumfordernden Zysten, unbeeinträchtigt ist. Außerdem ist auffällig, dass pathologische Auswirkungen der Mutation nur in Leber und Niere zur Erscheinung kommen, obwohl Sec61 α 1 ein ubiquitäres Protein darstellt (Lloyd et al. 2010). Zur weiteren *in vitro* Charakterisierung von Sec61 α 1R236C sollten *Readouts* des etablierten Zellkulturmodells MDCKII-pINDCUER21-Sec61 α 1Wt/-R236C-GFP im Hinblick auf die ER-Funktionalität durchgeführt werden. In Bezug auf die physiologischen Funktionen von Sec61 α 1 (1.2.2) und bereits erfolgter bekannter Analysen anderer Mutationen des Proteins (1.2.4) könnte der Einfluss von Sec61 α 1R236C auf die Proteintranslokation über die ER-Membran, Calcium-Homöostase und *UPR* untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit zur Etablierung eines Zellkulturmodells durch Immortalisierung von Patientenzellen bedacht werden. Dieses könnte den gleichen *Readouts* unterzogen werden und hätte aufgrund seiner Nähe zur *in-vivo* Situation eine hohe Aussagekraft.

Literaturverzeichnis

1. Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 2005;168(3):389–399. doi:10.1083/jcb.200409174.
2. Aleksandrov R, Hristova R, Stoyanov S, Gospodinov A. The chromatin response to double-strand DNA breaks and their repair. *Cells* 2020;9(8):1853. doi:10.3390/cells9081853.
3. Arruda AP, Hotamisligil GS. Calcium Homeostasis and Organelle Function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell Metab.* 2015;22(3):381–397. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.010.
4. Badenas C, Torra R, Pérez-Oller L, Mallolas J, Talbot-Wright R, Torregrosa V, Darnell A. Loss of heterozygosity in renal and hepatic epithelial cystic cells from ADPKD1 patients. *Eur J Hum Genet.* 2000;8(7):487–492. doi:10.1038/sj.ejhg.5200484.
5. Baldrige RD, Rapoport TA. Autoubiquitination of the Hrd1 ligase triggers protein retrotranslocation in ERAD. *Cell.* 2016;166(2):394–407. doi:10.1016/j.cell.2016.05.048.
6. Bergmann C, Weiskirchen R. It's not all in the cilium, but on the road to it: genetic interaction network in polycystic kidney and liver diseases and how trafficking and quality control matter. *J Hepatol.* 2012;56(5):1201–1203. doi:10.1016/j.jhep.2011.10.014.
7. Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, Horie S, Peters DJM, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):50. doi:10.1038/s41572-018-0047-y.
8. Besse W, Dong K, Choi J, Punia S, Fedeles SV, Choi M, Gallagher AR, Huang EB, Gulati A, Knight J, Mane S, Tahvanainen E, Tahvanainen P, Sanna-Cherchi S, Lifton RP, Watnick T, Pei YP, Torres VE, Somlo S. Isolated polycystic liver disease genes define effectors of polycystin-1 function. *J Clin Invest.* 2017;127(5):1772–1785. doi:10.1172/JCI90129.
9. Besse W, Choi J, Ahram D, Mane S, Sanna-Cherchi S, Torres V, Somlo S. A noncoding variant in GANAB explains isolated polycystic liver disease (PCLD) in a large family. *Hum Mutat.* 2018;39(3):378–382. doi:10.1002/humu.23383.
10. Besse W, Chang AR, Luo JZ, Triffo WJ, Moore BS, Gulati A, Hartzel DN, Mane S; Regeneron Genetics Center, Torres VE, Somlo S, Mirshahi T. ALG9 mutation carriers develop kidney and liver cysts. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(11):2091–2102. doi:10.1681/ASN.2019030298.
11. Besse W, Roosendaal C, Tuccillo L, Roy SG, Gallagher A-R, Somlo S. Adult inactivation of the recessive polycystic kidney disease gene causes polycystic liver disease. *Kidney360.* 2020;1(10):1068–1076. doi:10.34067/kid.0002522020.
12. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG. PKD1 induces p21waf1 and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT

- signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell*. 2002;109(2):157–168. doi:10.1016/S0092-8674(02)00716-X.
13. Boca M, Distefano G, Qian F, Bhunia AK, Germino GG, Boletta A. Polycystin-1 induces resistance to apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(3):637–647. doi:10.1681/ASN.2005050534.
 14. Boerrigter MM, Bongers EMHF, Lugtenberg D, Nevens F, Drenth JPH. Polycystic liver disease genes: Practical considerations for genetic testing. *Eur J Med Genet*. 2021;64(3):104160. doi:10.1016/j.ejmg.2021.104160.
 15. Bolar NA, Golzio C, Živná M, et al. Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 mutations cause autosomal-dominant tubulo-interstitial and glomerulocystic kidney disease with anemia. *Am J Hum Genet*. 2016;99(1):174–187. doi:10.1016/j.ajhg.2016.05.028.
 16. Bräuer M, Zich MT, Önder K, Müller N. The influence of commonly used tags on structural propensities and internal dynamics of peptides. *Monatsh Chem*. 2019;150(5):913–925. doi:10.1007/s00706-019-02401-x.
 17. Breitling J, Aebi M. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(8):a013359. doi:10.1101/cshperspect.a013359.
 18. Brieger A, Plotz G, Hinrichsen I, Passmann S, Adam R, Zeuzem S. C-terminal fluorescent labeling impairs functionality of DNA mismatch repair proteins. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31863. doi:10.1371/journal.pone.0031863.
 19. Camello C, Lomax R, Petersen OH, Tepikin AV. Calcium leak from intracellular stores-- the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium*. 2002;32(5-6):355–361. doi:10.1016/s0143416002001926.
 20. Carvalho P, Stanley AM, Rapoport TA. Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell*. 2010;143(4):579–591. doi:10.1016/j.cell.2010.10.028.
 21. Casascelli J, Schmidt S, DeGray B, Petri ET, Celić A, Folta-Stogniew E, Ehrlich BE, Boggon TJ. Analysis of the cytoplasmic interaction between polycystin-1 and polycystin-2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(5):F1310-F1315. doi:10.1152/ajprenal.00412.2009.
 22. Chauveau D, Fakhouri F, Grünfeld JP. Liver involvement in autosomal-dominant polycystic kidney disease: therapeutic dilemma. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(9):1767–1775. doi: 10.1681/ASN.V1191767.
 23. Chirstensen ST, Pedersen LB, Schneider L, Satir P. Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic*. 2007;8(2):97–109. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00516.x.
 24. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047–1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028.

25. Cnossen WR, Drenth JPH. Polycystic liver disease: an overview of pathogenesis, clinical manifestations and management. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:69. doi:10.1186/1750-1172-9-69.
26. Cnossen WR, Te Morsche RHM, Hoischen A, Gilissen C, Chrispijn M, Venselaar H, Mehdi S, Bergmann C, Veltman JA, Drenth JP. Whole-exome sequencing reveals LRP5 mutations and canonical Wnt signaling associated with hepatic cystogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(14):5343–5348. doi:10.1073/pnas.1309438111.
27. Cnossen WR, Te Morsche RHM, Hoischen A, Gilissen C, Venselaar H, Mehdi S, Bergmann C, Losekoot M, Breuning MH, Peters DJ, Veltman JA, Drenth JP. LRP5 variants may contribute to ADPKD. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(2):237–242. doi:10.1038/ejhg.2015.86.
28. Cornec-Le Gall E, Olson RJ, Besse W, et al. Monoallelic mutations to DNAJB11 cause atypical autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Am J Hum Genet.* 2018;102(5):832–844. doi:10.1016/j.ajhg.2018.03.013.
29. Davila S, Furu L, Gharavi AG, et al. Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet.* 2004;36(6):575–577. doi:10.1038/ng1357.
30. Delling M, Indzhukulian AA, Liu X, Li Y, Xie T, Corey DP, Clapham DE. Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors. *Nature.* 2016;531(7596):656–660. doi:10.1038/nature17426.
31. Erdmann F, Schäuble N, Lang S, Jung M, Honigmann A, Ahmad M, Dudek J, Benedix J, Harsman A, Kopp A, Helms V, Cavalié A, Wagner R, Zimmermann R. Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 2011;30(1):17–31. doi:10.1038/emboj.2010.284.
32. Farhan H, Rabouille C. Signalling to and from the secretory pathway. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 2):171–180. doi:10.1242/jcs.076455.
33. Fedeles SV, Tian X, Gallagher A-R, Mitobe M, Nishio S, Lee SH, Cai Y, Geng L, Crews CM, Somlo S. A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nat Genet.* 2011;43(7):639–647. doi:10.1038/ng.860.
34. Garcia-Gonzalez MA, Menezes LF, Piontek KB, Kaimori J, Huso DL, Watnick T, Onuchic LF, Guay-Woodford LM, Germino GG. Genetic interaction studies link autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease in a common pathway. *Hum Mol Genet.* 2007;16(16):1940–1950. doi:10.1093/hmg/ddm141.
35. Gemmer M, Förster F. A clearer picture of the ER translocon complex. *J Cell Sci* 2020;133(3):jcs231340. doi:10.1242/jcs.231340.
36. González-Perrett S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, Harris PC, Reisin IL, Arnaout MA, Cantiello HF. Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant

- polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):1182–1187. doi:10.1073/pnas.98.3.1182.
37. Gorlich D. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*. 1993;75(4):615–630. doi:10.1016/0092-8674(93)90483-7.
 38. Hardy E, Tsiokas L. Polycystins as components of large multiprotein complexes of polycystin interactors. *Cell Signal*. 2020;72:109640. doi:10.1016/j.cellsig.2020.109640.
 39. Hartmann E, Sommer T, Prehn S, Görlich D, Jentsch S, Rapoport TA. Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature*. 1994;367(6464):654–657. doi:10.1038/367654a0.
 40. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(8):421–438. doi:10.1038/s41580-020-0250-z.
 41. Hwang J, Qi L. Quality control in the endoplasmic reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(8):593–605. doi:10.1016/j.tibs.2018.06.005.
 42. Ito K, Shimokawa-Chiba N, Chiba S. Sec translocon has an insertase-like function in addition to polypeptide conduction through the channel. *F1000Res*. 2019;8:F1000. doi:10.12688/f1000research.21065.1.
 43. Janssen MJ, Salomon J, Te Morsche RHM, Drenth JPH. Loss of heterozygosity is present in SEC63 germline carriers with polycystic liver disease. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e50324. doi:10.1371/journal.pone.0050324.
 44. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017;46:505–529. doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
 45. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–821. doi:10.1126/science.1225829.
 46. Kalies K-U, Allan S, Sergeyenko T, Kröger H, Römisch K. The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J*. 2005;24(13):2284–2293. doi:10.1038/sj.emboj.7600731.
 47. Katzen F. Gateway(®) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov*. 2007;2(4):571–589. doi:10.1517/17460441.2.4.571.
 48. Kiesel P, Alvarez Viar G, Tsoy N, Maraschini R, Gorilak P, Varga V, Honigmann A, Pigino G. The molecular structure of mammalian primary cilia revealed by cryo-electron tomography. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(12):1115–1124. doi:10.1038/s41594-020-0507-4.

49. Kim S, Nie H, Nesin V, Tran U, Outeda P, Bai CX, Keeling J, Maskey D, Watnick T, Wessely O, Tsiokas L. The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling. *Nat Cell Biol.* 2016;18(7):752–764. doi:10.1038/ncb3363.
50. Klein MC, Lerner M, Nguyen D, Pfeffer S, Dudek J, Förster F, Helms V, Lang S, Zimmermann R. TRAM1 protein may support ER protein import by modulating the phospholipid bilayer near the lateral gate of the Sec61-channel. *Channels (Austin).* 2020;14(1):28–44. doi:10.1080/19336950.2020.1724759.
51. Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol.* 2002;4(3):191–197. doi:10.1038/ncb754.
52. La Rovere RML, Roest G, Bultynck G, Parys JB. Intracellular Ca(2+) signaling and Ca(2+) microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. *Cell Calcium.* 2016;60(2):74–87. doi:10.1016/j.ceca.2016.04.005.
53. Lang S, Erdmann F, Jung M, Wagner R, Cavalie A, Zimmermann R. Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels (Austin).* 2011;5(3):228–235. doi:10.4161/chan.5.3.15314.
54. Lang S, Benedix J, Fedeles SV, Schorr S, Schirra C, Schäuble N, Jalal C, Greiner M, Hassdenteufel S, Tatzelt J, Kreutzer B, Edelmann L, Krause E, Rettig J, Somlo S, Zimmermann R, Dudek J. Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 8):1958–1969. doi:10.1242/jcs.096727.
55. Lang S, Pfeffer S, Lee P-H, Cavalié A, Helms V, Förster F, Zimmermann R. An update on Sec61 channel functions, mechanisms, and related diseases. *Front Physiol.* 2017;8:887. doi:10.3389/fphys.2017.00887.
56. Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology.* 2004;127(5):1565–1577. doi:10.1053/j.gastro.2004.08.006.
57. Lee-Law PY, van de Laarschot LFM, Banales JM, Drenth JPH. Genetics of polycystic liver diseases. *Curr Opin Gastroenterol.* 2019;35(2):65–72. doi:10.1097/MOG.0000000000000514.
58. Li A, Davila S, Furu L, Qian Q, Tian X, Kamath PS, King BF, Torres VE, Somlo S. Mutations in PRKCSH cause isolated autosomal dominant polycystic liver disease. *Am J Hum Genet.* 2003;72(3):691–703. doi:10.1086/368295.
59. Lloyd DJ, Wheeler MC, Gekakis N. A point mutation in Sec61 α 1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes.* 2010;59(2):460–470. doi:10.2337/db08-1362.
60. Lu H, Galeano MCR, Ott E, et al. Mutations in DZIP1L, which encodes a ciliary-transition-zone protein, cause autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nat Genet.* 2017;49(7):1025–1034. doi:10.1038/ng.3871.

61. Ma M, Gallagher A-R, Somlo S. Ciliary mechanisms of cyst formation in polycystic kidney disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(11):a028209. doi:10.1101/cshperspect.a028209.
62. MacDonald BT, He X. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12):a007880. doi:10.1101/cshperspect.a007880.
63. Masyuk TV, Masyuk AI, Larusso NF. Therapeutic targets in polycystic liver disease. *Curr Drug Targets.* 2017;18(8):950–957. doi:10.2174/1389450116666150427161743.
64. Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, Roarty K, Li MZ, Fang JE, Herschkowitz JI, Burrows AE, Ciccia A, Sun T, Schmitt EM, Bernardi RJ, Fu X, Bland CS, Cooper TA, Schiff R, Rosen JM, Westbrook TF, Elledge SJ. The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(9):3665–3670. doi:10.1073/pnas.1019736108.
65. Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, Smedt H de, Missiaen L. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(6):a004317. doi:10.1101/cshperspect.a004317.
66. Meyer HA, Grau H, Kraft R, Kostka S, Prehn S, Kalies KU, Hartmann E. Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem.* 2000;275(19):14550–14557. doi:10.1074/jbc.275.19.14550.
67. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 2003;33(2):129–137. doi:10.1038/ng1076.
68. Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* 1975;189(4200):347–358. doi: 10.1126/science.1096303.
69. Park S-J, Li C, Chen YM. Endoplasmic Reticulum calcium homeostasis in kidney disease: pathogenesis and therapeutic targets. *Am J Pathol.* 2021;191(2):256–265. doi:10.1016/j.ajpath.2020.11.006.
70. Pennekamp P, Karcher C, Fischer A, Schweickert A, Skryabin B, Horst J, Blum M, Dworniczak B. The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol.* 2002;12(11):938–943. doi:10.1016/s0960-9822(02)00869-2.
71. Pfeffer S, Dudek J, Gogala M, Schorr S, Linxweiler J, Lang S, Becker T, Beckmann R, Zimmermann R, Förster F. Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nat Commun.* 2014;5(1):3072. doi:10.1038/ncomms4072.
72. Pfeffer S, Dudek J, Zimmermann R, Förster F. Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(10):2122–2129. doi:10.1016/j.bbagen.2016.06.024.

73. Pfeffer S, Dudek J, Schaffer M, Ng BG, Albert S, Plitzko JM, Baumeister W, Zimmermann R, Freeze HH, Engel BD, Förster F. Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex. *Nat Commun.* 2017;8(1):14516. doi:10.1038/ncomms14516.
74. Plumb R, Zhang Z-R, Appathurai S, Mariappan M. A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR. *Elife* 2015;4:e07426. doi:10.7554/eLife.07426.
75. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, et al. Mutations in GANAB, encoding the Glucosidase II α Subunit, cause autosomal-dominant polycystic kidney and liver disease. *Am J Hum Genet.* 2016;98(6):1193–1207. doi:10.1016/j.ajhg.2016.05.004.
76. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol.* 2001;184(1):71–79. doi:10.1007/s00232-001-0075-4.
77. Qian Q, Li A, King BF, Kamath PS, Lager DJ, Huston J 3rd, Shub C, Davila S, Somlo S, Torres VE. Clinical profile of autosomal dominant polycystic liver disease. *Hepatology.* 2003;37(1):164–171. doi:10.1053/jhep.2003.50006.
78. Rabouille C, Hui N, Hunte F, Kieckbusch R, Berger EG, Warren G, Nilsson T. Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides. *J Cell Sci.* 1995;108(Pt 4):1617–1627. PMID: 7615680
79. Russo A. Understanding the mammalian TRAP complex function(s). *Open Biol.* 2020;10(5):190244. doi:10.1098/rsob.190244.
80. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2415–2420. doi:10.1073/pnas.0712168105.
81. Santos-Laso A, Izquierdo-Sanchez L, Rodrigues PM, Huang BQ, Azkargorta M, Lapitz A, Munoz-Garrido P, Arbelaiz A, Caballero-Camino FJ, Fernández-Barrena MG, Jimenez-Agüero R, Argemi J, Aragon T, Elortza F, Marzioni M, Drenth JPH, LaRusso NF, Bujanda L, Perugorria MJ, Banales JM. Proteostasis disturbances and endoplasmic reticulum stress contribute to polycystic liver disease: New therapeutic targets. *Liver Int.* 2020;40(7):1670–1685. doi:10.1111/liv.14485.
82. Schäfer A, Wolf DH. Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *EMBO J.* 2009;28(19):2874–2884. doi:10.1038/emboj.2009.231.
83. Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, Linxweiler J, Dudek J, Blum R, Helms V, Paton AW, Paton JC, Cavalié A, Zimmermann R. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J.* 2012;31(15):3282–3296. doi:10.1038/emboj.2012.189.

84. Schmid-Burgk JL, Höning K, Ebert TS, Hornung V. CRISPaint allows modular base-specific gene tagging using a ligase-4-dependent mechanism. *Nat Commun.* 2016;7(1):12338. doi:10.1038/ncomms12338.
85. Schoebel S, Mi W, Stein A, Ovchinnikov S, Pavlovicz R, DiMaio F, Baker D, Chambers MG, Su H, Li D, Rapoport TA, Liao M. Cryo-EM structure of the protein-conducting ERAD channel Hrd1 in complex with Hrd3. *Nature.* 2017;548(7667):352–355. doi:10.1038/nature23314.
86. Schubert D, Klein M-C, Hassdenteufel S, et al. Plasma cell deficiency in human subjects with heterozygous mutations in Sec61 translocon alpha 1 subunit (SEC61A1). *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1427–1438. doi:10.1016/j.jaci.2017.06.042.
87. Schulze U, Vollenbröker B, Braun DA, van Le T, Granado D, Kremerskothen J, Fränzel B, Klosowski R, Barth J, Fufezan C, Wolters DA, Pavenstädt H, Weide T. The Vac14-interaction network is linked to regulators of the endolysosomal and autophagic pathway. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(6):1397–1411. doi:10.1074/mcp.M113.034108.
88. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79–94. doi:10.1007/s00018-015-2052-6.
89. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, Flask CA, Novick AC, Goldfarb DA, Kramer-Zucker A, Walz G, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(14):5466–5471. doi:10.1073/pnas.0509694103.
90. Streets AJ, Newby LJ, O'Hare MJ, Bukanov NO, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ong ACM. Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(7):1804–1815. doi:10.1097/01.asn.0000076075.49819.9b.
91. Sun Z, Brodsky JL. Protein quality control in the secretory pathway. *J Cell Biol.* 2019;218(10):3171–3187. doi:10.1083/jcb.201906047.
92. Sundaram A, Plumb R, Appathurai S, Mariappan M. The Sec61 translocon limits IRE1 α signaling during the unfolded protein response. *Elife* 2017;6:e27187. doi:10.7554/eLife.27187.
93. Suwabe T, Chamberlain AM, Killian JM, King BF, Gregory AV, Madsen CD, Wang X, Kline TL, Chebib FT, Hogan MC, Kamath PS, Harris PC, Torres VE. Epidemiology of autosomal-dominant polycystic liver disease in Olmsted county. *JHEP Rep.* 2020;2(6):100166. doi:10.1016/j.jhepr.2020.100166.

94. Thielges MC, Chung JK, Axup JY, Fayer MD. Influence of histidine tag attachment on picosecond protein dynamics. *Biochemistry*. 2011;50(25):5799–5805. doi:10.1021/bi2003923.
95. Tretter T, Pereira FP, Ulucan O, Helms V, Allan S, Kalies K-U, Römisch K. ERAD and protein import defects in a sec61 mutant lacking ER-luminal loop 7. *BMC Cell Biology*. 2013;14(1):56. doi:10.1186/1471-2121-14-56.
96. UniProt Knowledgebase, <https://www.uniprot.org/>, Zugriff am 25.04.2021
97. Van Aerts RMM, van de Laarschot LFM, Banales JM, Drenth JPH. Clinical management of polycystic liver disease. *J Hepatol*. 2018;68(4):827–837. doi:10.1016/j.jhep.2017.11.024.
98. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, Prevarskaya N. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 18):4135–4142. doi:10.1242/jcs.01274.
99. Van de Laarschot LFM, Te Morsche RHM, Hoischen A, Venselaar H, Roelofs HM, Crossen WR, Banales JM, Roepman R, Drenth JPH. Novel GANAB variants associated with polycystic liver disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1):302. doi:10.1186/s13023-020-01585-4.
100. Van den Berg B, Clemons WM, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*. 2004;427(6969):36–44. doi:10.1038/nature02218.
101. Van Keimpema L, De Koning DB, Van Hoek B, Van Den Berg AP, Van Oijen MG, De Man RA, Nevens F, Drenth JP. Patients with isolated polycystic liver disease referred to liver centres: clinical characterization of 137 cases. *Liver Int*. 2011;31(1):92–98. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02247.x.
102. Van Nieuwenhove E, Barber JS, Neumann J, et al. Defective Sec61 α 1 underlies a novel cause of autosomal dominant severe congenital neutropenia. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(5):1180-1193. doi:10.1016/j.jaci.2020.03.034.
103. Wallace DP. Cyclic AMP-mediated cyst expansion. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(10):1291–1300. doi:10.1016/j.bbadis.2010.11.005.
104. Wang S, Zhang J, Nauli SM, Li X, Starremans PG, Luo Y, Roberts KA, Zhou J. Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia. *Mol Cell Biol*. 2007;27(8):3241–3252. doi:10.1128/MCB.00072-07.
105. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of

- cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell*. 1998;2(2):247–251. doi:10.1016/S1097-2765(00)80135-5.
106. Wiertz EJ, Tortorella D, Bogoy M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*. 1996;384(6608):432–438. doi:10.1038/384432a0.
107. Wu X, Cabanos C, Rapoport TA. Structure of the post-translational protein translocation machinery of the ER membrane. *Nature*. 2018;566(7742):136–139. doi:10.1038/s41586-018-0856-x.
108. Yamaguchi T, Pelling JC, Ramaswamy NT, Eppler JW, Wallace DP, Nagao S, Rome LA, Sullivan LP, Grantham JJ. cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int*. 2000;57(4):1460–1471. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00991.x.
109. Yamaguchi T, Wallace DP, Magenheimer BS, Hempson SJ, Grantham JJ, Calvet JP. Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40419–40430. doi:10.1074/jbc.M405079200.
110. Yu Y, Ulbrich MH, Li MH, Buraei Z, Chen XZ, Ong AC, Tong L, Isacoff EY, Yang J. Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(28):11558–11563. doi:10.1073/pnas.0903684106.
111. Zimmermann R, Eyrich S, Ahmad M, Helms V. Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1808(3):912–924. doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.015.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Uni.-Prof. Dr. Hartmut Schmidt für das Anvertrauen der ersten laborchemischen Untersuchungen von der durch ihn entdeckten Mutation bedanken.

Ebenso gilt ein Dankeschön Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Krahn, der sein Labor für die Arbeit zur Verfügung gestellt hat und mir bei der Planung des Projekts zur Seite stand.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Pavel Nedvetsky, der mir Rund um die Uhr an allen Tagen der Woche jegliche Fragen zur Laborarbeit und wissenschaftlichen Praxis beantwortet hat. Ich danke ihm für seine zuverlässige und freundschaftliche Unterstützung in der Ausarbeitung der Projektplanung sowie praktischen Umsetzung. Von ganzem Herzen möchte ich mich für seine zur Verfügung gestellte Expertise und das hohe zeitliche Aufkommen bedanken, die meine Doktorarbeit in dieser Form erst ermöglichten.

Des Weiteren möchte ich meinen Dank der gesamten AG Medizinische Zellbiologie aussprechen, die stets eine freundliche Arbeitsatmosphäre kreierten und mich durch ihre Kollegialität und Anleitungen wesentlich unterstützten.

Auch meiner ganzen Familie sowie nahen Freunden gilt ein großer Dank. Durch ihre fürsorgliche Unterstützung im privaten Bereich konnte ich schwierigere Phasen stets meistern.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Dank an die Medizinische Fakultät Münster ausdrücken, die mich, im Rahmen des MedK-Programmes, mit lehrreichen Seminaren und finanziellen Zuschüssen unterstützt hat.