

Aus dem Institut für Biologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann

**Über den Einfluss zytosolischer
Targetingfaktoren auf die Translokation kleiner
Proteine in das endoplasmatische Retikulum des
Säugers**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Julia Tritz
aus Bonn

Lübeck 2016

1. Berichterstatter: PD Dr. Kai-Uwe Kalies

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2016

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 12.10.2016

I. Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Proteintranslokation in das endoplasmatische Retikulum	1
1.1.1.	Cotranslationale Translokation von Substratproteinen in das endoplasmatische Retikulum	2
1.1.2.	Posttranslationale Translokation von Substratproteinen in das endoplasmatische Retikulum	6
1.2.	Calmodulin-Interaktion mit Substratproteinen und Inhibitoren	10
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	14
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Material	15
2.1.1.	Bakterienstämme	15
2.1.2.	Plasmide	15
2.1.3.	Oligonukleotide	17
2.1.4.	Antikörper	18
2.1.5.	Medien und Puffer	18
2.1.6.	Antibiotika, Chemikalien und Enzyme	20
2.1.7.	Kits, Materialien und Software	21
2.1.8.	Geräte	21
2.2.	Methoden	22
2.2.1.	Übernachtskulturen, Glycerinstocks und Plasmidpräparation	22
2.2.2.	Die „Halbvektorenstrategie“ als Klonierungsstrategie für Proteine ohne Signalsequenz	22
2.2.2.1.	Polymerasekettenreaktion	23
2.2.2.2.	Restriktionsverdau	24
2.2.2.3.	Phosphorylierung	25
2.2.2.4.	Ligation	25
2.2.3.	Plasmid-Transformation in <i>Escherichia coli</i>	25
2.2.4.	Klonierung und Überexpression von CaM-His ₆	25
2.2.5.	Klonierung und Überexpression des MYLK2-His ₆ -Peptids	26
2.2.6.	Depletion des endogenen Calmodulins aus dem Retikulozytenlysat	26
2.2.7.	Bindung von <i>in vitro</i> synthetisierten Proteinen an CaM-His ₆	26
2.2.8.	<i>In vitro</i> Transkription	27
2.2.9.	<i>In vitro</i> Translation	27
2.2.10.	<i>In Vitro</i> Translokationsassays	28
2.2.10.1.	<i>In vitro</i> Translokationsassay im Retikulozytenlysat	28
2.2.10.2.	<i>In Vitro</i> Translokationsassay im Weizenkeimextrakt	29
2.2.11.	Ammoniumsulfatfällung	29
2.2.12.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.2.13.	Western Blot und immunochemische Detektion von Proteinen	30

2.2.14.	Präparation von Mikrosomen	30
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Einfluss von SRP auf die co- und posttranslationale Translokation von kleinen, sekretorischen Säugerproteinen in das Endoplasmatische Retikulum	32
3.1.1.	SRP unterstützt die Translokation von kleinen, sekretorischen Säugerproteinen	32
3.1.2.	SRP unterstützt nicht die posttranslationale Translokation von kleinen, sekretorischen Proteinen	35
3.1.3.	Die Erhöhung der cotranslationalen Translokationsrate durch SRP setzt eine Mindestlänge von 46 Aminosäuren voraus	37
3.1.4.	Die posttranslationale Translokationsraten aller Proteinvarianten werden von SRP nicht beeinflusst	39
3.2.	Abhängigkeit der co- und posttranslationalen Translokation sekretorischer Säugerproteine von Calmodulin	42
3.2.1.	Die sekretorischen Substratproteine interagieren mit CaM-His ₆	42
3.2.2.	Calmodulin hat einen gesteigerten Einfluss auf die posttranslationale Translokation von kleinen, sekretorischen Säugerproteinen	47
3.2.3.	Calmodulin ist für die posttranslationale Translokation des Säugerproteins Prähistatin3 essentiell	50
3.2.4.	Calmodulin hat keinen Einfluss auf die cotranslationale Translokation von kleinen, sekretorischen Säugerproteinen	53
3.2.5.	TFP hemmt die cotranslationale Translokation CaM-unabhängig	54
3.3.	Der Einfluss von Trifluoperazin auf die cotranslationale Translokation	57
3.3.1.	Trifluoperazin inhibiert die Translokation von pPI78mer und pPI86mer im Retikulozytenlysat und Weizenkeimextrakt nicht bzw. weniger effektiv	57
3.3.2.	Unter dem Einfluss von Trifluoperazin behindern 80S-Ribosomen die Translokation des pPI-Verkürzungsproteins 78mer	62
3.3.3.	Die unter dem Einfluss von Trifluoperazin und 80S-Ribosomen vorliegende Inhibierung der Translokation kann durch Zugabe von SRP aufgehoben werden	64
4.	Diskussion	68
4.1.	SRP ist als zytosolischer <i>Targetingfaktor</i> an der cotranslationalen Translokation kleiner, sekretorischer Proteine in das endoplasmatische Retikulum von Säugern beteiligt	68
4.2.	Die Bedeutung von Calmodulin als <i>Targetingfaktor</i> in der co- und posttranslationalen Translokation kleiner, sekretorischer Säugerproteine	72
4.3.	Trifluoperazin als Inhibitor in der cotranslationalen Translokation	77
4.3.1.	Inhibiert TFP das <i>Targeting</i> auf Seiten von Ribosom, SRP oder der Signalsequenz?	78
5.	Zusammenfassung	83
6.	Literaturverzeichnis	85
7.	Danksagung	102

II. Abkürzungsverzeichnis

(pp) α F	(Präpro) α -Faktor
°C	Grad Celcius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
³⁵ S	³⁵ Schwefel
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
CaM	Calmodulin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(pp)CecA	(Präpro)CecropinA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EK	Endkonzentration
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FL	<i>full length</i>
fwd	<i>forward</i> , Richtungsangabe für Oligonukleotide
(p)His1	(Prä)Histatin1
(p)His3	(Prä)Histatin3
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i> , Luria-Bertani Medium
M	Molar
min	Minute
MP	Membranpuffer
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDNA	Plasmid-DNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase-gekoppelt
(p)PI	(Prä)Prolaktin

PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i> , Richtungsangabe für Oligonukleotide
RM	<i>rough membranes</i> (raue ER-Mikrosomen)
RL	Retikulozytenlysat
Rpm	<i>rounds per minute</i> (Drehzahl pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
SS	Signalsequenz
(p)Stat	(Prä)Statherin
h	Stunde
T7	Bakteriophage T7
Tab.	Tabelle
U	<i>Unit</i>
ü. N.	über Nacht
WKE	Weizenkeimextrakt

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des cotranslationalen Transportweges von sekretorischen Proteinen ins endoplasmatische Retikulum (ER).....	2
Abb. 2: Schematische Übersicht der Interaktion zwischen <i>Signal Recognition Paricle</i> (SRP) und seinem Rezeptor im Säugersystem.....	3
Abb. 3: Schematische Darstellung des posttranslationalen Transportweges von sekretorischen Proteinen ins endoplasmatische Retikulum (ER) von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Abb. 4: Schematische Darstellung verschiedener zytosolischer Rekrutierungsfaktoren in der posttranslationalen Translokation sekretorischer Proteine.	9
Abb. 5: Dreidimensionale Struktur von Calmodulin in unterschiedlichen Konformationen.	11
Abb. 6: Chemische Strukturen von A) TFP (CID: 5566), B) W7 (CID: 124887) und C) E6 (CID: 6610268).	12
Abb. 7: Schematischer Ablauf der Halbvektorenstrategie am Beispiel von Prähistatin3:	23
Abb. 8: SRP verbessert den Transport von kleinen sekretorischen Säugerproteinen.	34
Abb. 9: SRP hat keinen Einfluss auf den posttranslationalen Transport von kleinen sekretorischen Säugerproteinen.	36
Abb. 10: SRP erhöht die Transportrate der cotranslationalen Translokation ab einer Proteinlänge von mindestens 46 AS.....	38
Abb. 11: SRP hat keinen Einfluss auf die posttranslationale Translokation von verkürzten Prähistatin3- Proteinvarianten.	40
Abb. 12: Umpufferung und Aufkonzentrierung des überexprimierten CaM-His ₆	43
Abb. 13: <i>In vitro</i> synthetisierte sekretorische Säugerproteine binden an Ca ²⁺ CaM-His ₆	44
Abb. 14: <i>In vitro</i> synthetisierte sekretorische Säugerproteine ohne Signalsequenz binden nicht an Ca ²⁺ CaM-His ₆	46
Abb. 15: Renaturierung des überexprimierten und denaturierten MYLK-His ₆ -Peptids.....	47
Abb. 16: Das Retikulozytenlysat kann von endogenem Calmodulin depletiert werden.....	48
Abb. 17: CaM steigert die posttranslationale Translokation von kleinen sekretorischen Säugerproteinen.	49
Abb. 18: Die posttranslationale Translokation lässt sich durch Calmodulin-Inhibitoren hemmen und durch zusätzliches exogenes Calmodulin regenerieren.....	51
Abb. 19: Eine Zugabe von CaM hat keinen Einfluss auf die cotranslationale Translokation kleiner sekretorischer Proteine.	53
Abb. 20: Die cotranslationale Translokation im depletierten Retikulozytenlysat kann nach Trifluoperazin (TFP)-Inhibierung nicht durch exogenes Calmodulin wiederhergestellt werden.....	55
Abb. 21: Die Translokation der pPI-Verkürzungsvarianten 78mer und 86mer wird im Retikulozytenlysat durch Trifluoperazin nicht bzw. weniger stark inhibiert.....	59

Abb. 22: Die Translokation der pPI-Verkürzungsvarianten 78mer und 86mer läuft – auch in Anwesenheit von TFP – SRP-unabhängig im Weizenkeimextrakt ab.	61
Abb. 23: In Anwesenheit von Trifluoperazin verhindern 80S-Ribosomen die Translokation des pPI-78mer.	63
Abb. 24: Die Inhibierung der Translokation des pPI-78mers durch 80S-Ribosomen unter TFP kann durch SRP aufgehoben werden.	65
Abb. 25: Der Hemmeffekt von Trifluoperazin auf die Translokation von pPI kann durch entsprechende Konzentrationen von SRP aufgehoben werden.	66
Abb. 26: Einfluss von TFP auf die co- und posttranslationale Translokation von einigen kleinen sekretorischen Proteinen.	81

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: PCR-Programm Proteine ohne Signalsequenz.	24
Tab. 2: PCR-Programm pPI-Verkürzungsvarianten.	24
Tab. 3: Die in der Aminosäuresequenz vorkommenden Histidine führen zu einer unspezifischen Bindung der Imidazolringe an immobilisiertes Ni ²⁺	72
Tab. 4: Die Signalsequenz von Prästatherin (P02808) besitzt den höchsten GRAVY-Wert und ist somit am hydrophobsten.	76

1. Einleitung

1.1. Proteintranslokation in das endoplasmatische Retikulum

Die Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) stellt für viele Proteine, die nicht im Zytosol verbleiben, den ersten Schritt in ihrer Biogenese dar. Ausgehend vom ER werden sie entlang des sekretorischen Weges zum Golgi-Apparat transportiert. Der Transport zwischen ER, Golgi und weiteren Bestimmungsstellen (Lysosomen, Endosomen, Plasmamembran) erfolgt dabei durch Abschnürung der Proteine in Vesikeln. Das raue ER ist zudem der initiale Eintrittsort für viele integrale Membranproteine (Palade *et al.*, 1975; Blobel & Dobberstein, 1975 I und II).

Die Proteintranslokation über das raue ER ist ein evolutionär hoch konservierter Prozess. So lassen sich Ähnlichkeiten in Bezug auf die SecY-abhängige Translokation oder die Signalpeptidase bei Bakterien finden. Entsprechende Homologe dazu wurden ebenfalls in Archaeen identifiziert (Lee & Bernstein, 2001; zusammengefasst in Zimmermann *et al.*, 2011).

ER-translozierbare Proteine besitzen eine abspaltbare amino-terminale Signalsequenz, um zum ER dirigiert zu werden. Generell ist die Struktur einer 15 bis 30 Aminosäuren langen Signalsequenz charakterisiert durch einen meist positiv geladenen n-Terminus, einen zentralen, hydrophoben, alpha-helikalen Teil und eine mehr polare c-terminale Region, welche die Spaltstelle für die Signalsequenz beinhaltet (Heijne, 1985).

Der Transport vom Zytosol über die ER-Membran ins endoplasmatische Lumen kann co- oder posttranslational ablaufen (zusammengefasst in Dudek *et al.*, 2015 und Zimmermann *et al.*, 2011; Panzner *et al.*, 1995b). Beiden Transportwegen ist gemein, dass die Translokation in das ER-Lumen über den heterotrimeren Sec61 Kanal, bestehend aus α -, β - und γ -Sec61, erfolgt (Hartmann *et al.*, 1994). 10 Transmembranhelices des Sec61 α bilden dabei die zentrale Translokationspore. Diese ist durch einen sogenannten *Plug* mit Dichtungsring verschlossen. Ist die Translokationspore im aktiven Zustand, tritt der *Plug* aus dem Zentrum des Kanals. Der Dichtungsring umschließt die translozierende Polypeptidkette, was die Pore impermeabel für kleine Moleküle macht (zusammengefasst in Park & Rapoport, 2012; Plath *et al.*, 1998; van der Berg *et al.*, 2004). Nach erfolgreicher Translokation erhalten die Polypeptide ihre charakteristische Faltung und werden bis auf ER-residente Proteine über den vesikulären Transportweg an ihre Zielkompartimente, wie z. B. den Golgi-Apparat, die Lysosomen oder Endosomen, transportiert (Palade, 1975). Kommt es zu einer falschen Faltung, werden die Proteine zurück ins Zytosol dirigiert und im Zuge der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) im Proteasom abgebaut (Meusser *et al.*, 2005).

1.1.1. Cotranslationale Translokation von Substratproteinen in das endoplasmatische Retikulum

Die cotranslationale Translokation erfolgt noch bevor die Synthese der Polypeptidkette am Ribosom vollendet ist. Sobald die hydrophobe Signalsequenz der zu transportierenden Proteine das Ribosom verlassen hat, bindet das *Signal Recognition Particle* (SRP) an diese und dirigiert den Ribosomen-naszierende-Kette (RNC)-Komplex zur Membran des endoplasmatischen Retikulums (Egea *et al.*, 2005; Meyer & Dobberstein, 1980 I und 1980 II; Walter & Blobel, 1981 II; Walter *et al.*, 1981).

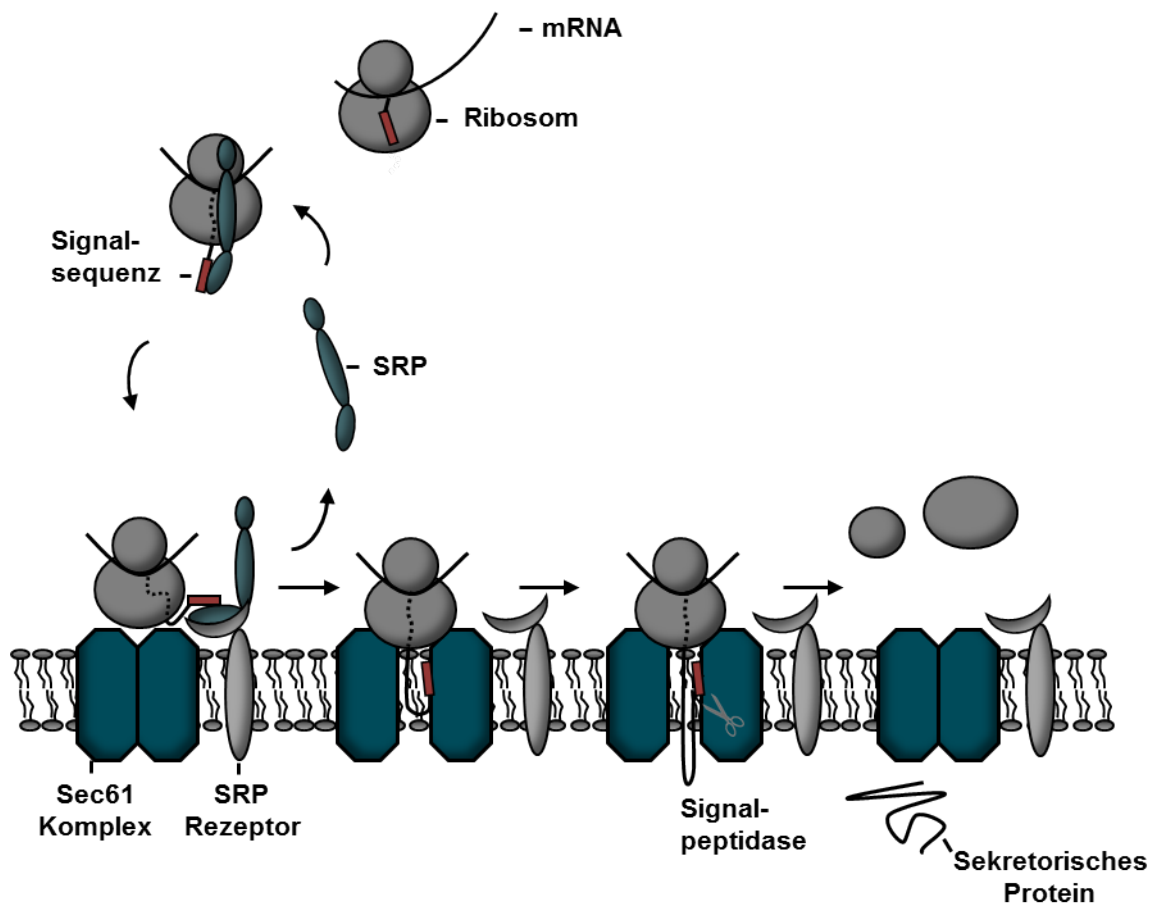


Abb. 1: Schematische Darstellung des cotranslationalen Transportweges von sekretorischen Proteinen ins endoplasmatische Retikulum (ER).

Sobald die Signalsequenz (SS) der naszierenden Kette aus dem Ribosom ausgetreten ist, bindet das *Signal Recognition Particle* (SRP) an diese. Durch die Bindung pausiert die Translation und die naszierende Kette wird in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. SRP dirigiert den Ribosomen-naszierende-Kette (RNC)-Komplex an die ER-Membran. Dort bindet SRP an den SRP-Rezeptor (SR). Die SRP-SS-Bindung löst sich, die SS wird auf den Sec61-Kanal übertragen und die Translation wird wieder aufgenommen. Durch GTP-Hydrolyse löst sich SRP von dem SR. Der RNC-Komplex bindet fest an die Sec61-Translokationspore. Die naszierende Kette wird durch den Sec61-Kanal auf die luminalen Seite geschleust und stabilisiert dabei den geöffneten Zustand des Kanals. Sobald die Schnittstelle zur Abtrennung der Signalsequenz im Lumen für den Signalpeptidasekomplex zugänglich ist, wird die Signalsequenz abgespalten.

SRP ist ein Ribonukleoproteinkomplex, welcher aus einer 7SL-RNA und sechs Proteinen (SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68, SRP72) besteht (Walter *et al.*, 1981). Funktionell kann SRP in zwei Bereiche eingeteilt werden: in die S-Domäne und in die Alu-Domäne. Dabei

beinhaltet die S-Domäne mehr als die Hälfte der 7SL-RNA, die Proteine SRP19 und SRP54 sowie das Heterodimer SRP68-SRP72. Für die Erkennung der Signalsequenz und die GTP-abhängige Interaktion von SRP mit seinem Rezeptor ist SRP54 das bedeutendste Protein der S-Domäne (Connolly & Gilmore, 1989; Gundelfinger *et al.*, 1983; Siegel & Walter, 1988). SRP54 umfasst eine amino-terminale Domäne (N), eine zentrale GTPase Domäne (G) (oft als NG-Domäne zusammengefasst) und eine Methionin-reiche carboxy-terminale Domäne (M) (Bernstein *et al.*, 1989; Lütcke *et al.*, 1992). Die M- und NG-Domäne sind über einen hochkonservierten und extrem flexiblen *Linker* miteinander verbunden, welcher zum einen starke strukturelle Konformationsänderungen von SRP54 zulässt und zum anderen zwischen

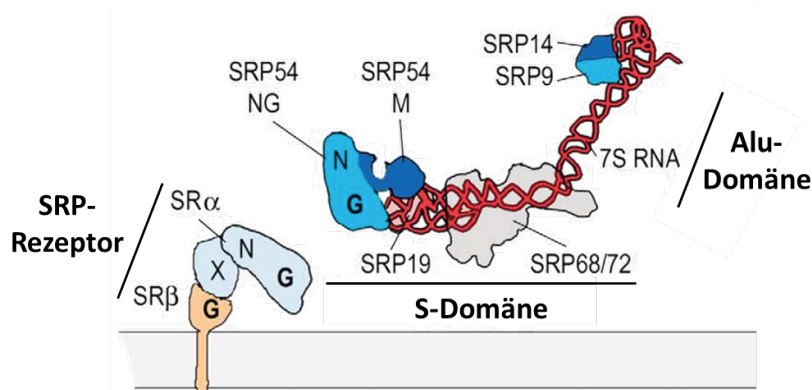


Abb. 2: Schematische Übersicht der Interaktion zwischen *Signal Recognition Particle* (SRP) und seinem Rezeptor im Säugersystem.

SRP kann in zwei Domänen eingeteilt werden – in die S-Domäne und die Alu-Domäne. Die 7SL-RNA bildet das Rückgrat des SRP und ist in rot dargestellt. Die zugehörigen SRP-Proteine sind wie folgt gefärbt: SRP14, dunkelblau; SRP9, türkis; SRP68/72, grau; SRP19, rosa; SRP54 M-Domäne, dunkelblau und SRP54 NG-Domäne, türkis. Der SRP-Rezeptor (SR) unterteilt sich in eine α -Untereinheit (hellblau) und in eine β -Untereinheit (orange). Die NG-Domäne der α -Untereinheit fungiert als Bindungsstelle für SRP, wohingegen der SR mit der β -Untereinheit in der Membran verankert ist. G demonstriert die GTPase-Domänen. Modifiziert nach Halic & Beckmann, 2004.

den beiden Domänen vermittelt (Hainzl *et al.*, 2011). Die M-Domäne beinhaltet vier amphipathische Helices, die sich um eine hydrophobe Region anordnen. Durch diese hydrophobe Bindetasche kann die Signalsequenz erkannt und gebunden werden. Sie stellt zudem den Bindungsort für die Signalsequenz dar (Bernstein *et al.*, 1989; Keenan *et al.*, 1998; Zopf *et al.*, 1990). Obwohl Signalsequenzen in ihrer Form, Länge und Aminosäuresequenz sehr unterschiedlich sein können, erfolgt die Erkennung durch SRP. Dazu wurde angenommen, dass dieser Erkennungsmechanismus ausschließlich auf eine Region in der M-Domäne zurückzuführen ist. Diese besteht aus 8 – 12 hydrophoben Aminosäuren, die vorwiegend eine α -Helix ausbilden (Gierasch, 1989; Hatsuzawa *et al.*, 1997; von Heijne, 1985). Generell ist ein Mindestmaß an Hydrophobizität der Signalsequenz notwendig, damit SRP an die Signalsequenz binden kann. Eine neuere Studie mit Untersuchungen zur SRP-Interaktion im Bakteriensystem zeigte, dass die Hydrophobizität nicht als einziger Indikator für das Erkennungspotenzial von SRP herangezogen werden kann. So werden z. B. naszierende Ketten SRP-abhängig wie auch SRP-unabhängig transportiert, obwohl nur geringe Unterschiede in der Hydrophobizität der Signalsequenzen vorliegen. Oder die Interaktion mit SRP kommt dennoch nicht zustande, obwohl das Mindestmaß an

Hydrophobizität gegeben ist (Huber *et al.*, 2005). Mittels kryoelektronenmikroskopischer (Cryo-EM) Strukturanalysen in Kombination mit Strukturdaten der M-Domäne aus älteren Studien (Bately *et al.*, 2000; Clemons *et al.*, 1999; Keenan *et al.*, 1998) fanden Voorhees und Hegde (2015) jüngst zwei bis dahin noch unbekannte Helices ($\alpha C1$ und $\alpha C2$), wobei $\alpha C2$ in der hydrophoben Bindetasche des SRP54 als „Platzhalter“ positioniert vorliegt. Bei Anwesenheit einer zu bindenden Signalsequenz, kann diese durch einen Positionswechsel von $\alpha C2$ mit der Bindetasche interagieren. In diesem Zusammenhang vermuteten sie, dass die biophysikalischen Eigenschaften von $\alpha C2$ die notwendigen Gegebenheiten einer funktionellen Signalsequenz vorgeben könnten. Dieses Platzhalterprinzip publizierten sie ebenfalls in ihrer neuesten Veröffentlichung zur Untersuchung der Bindung der Signalsequenz an den Sec61-Kanal. Sie zeigten, dass die Signalsequenz die Position von Helix 2 des Sec61 α einnimmt. Diese Ergebnisse könnten auf einen generellen Mechanismus bezüglich des Erkennungspotenzials divergenter Signalsequenzen hindeuten (Voorhees & Hegde, 2016).

Im Gegensatz zur S-Domäne ist die Alu-Domäne zuständig für die notwendige Verlangsamung der Translation. Sobald die Signalsequenz einer naszierenden Kette den ribosomalen Kanal verlassen hat, bindet SRP54 an die Signalsequenz. Diese Bindung führt zu strukturellen Veränderungen des SRP, die es der Alu-Domäne (SRP9-SRP14) ermöglichen mit den Bindestelle für die Elongationsfaktoren am Ribosom zu interagieren. Es wird vermutet, dass SRP68/72 dabei zwischen S- und Alu-Domäne vermittelt. Durch ausbleibende Bindung der Elongationsfaktoren kommt es zu dem Translationsarrest, um die naszierende Kette vor Faltung und Degradation zu schützen und sie so translokationskompetent zu halten (Halic *et al.*, 2004; Siegel & Walter, 1986; Walter & Blobel, 1981 III; Wolin & Walter, 1989).

Während des SRP-abhängigen cotranslationalen Transports wird einem ribosomenständigen Heterodimer, bestehend aus α - und β -Untereinheit, eine Rolle beim Transport des RNC-Komplexes zur ER-Membran zugesprochen: Der *nascent chain-associated complex* (NAC) ist an die Exitseite des Ribosoms angegliedert und erhält dadurch Kontakt mit der naszierenden Kette bei der Translation. Es wird vermutet, dass dieser Kontakt bereits vor der SRP-Bindung stattfindet und somit bereits im Vorfeld eine fehlgeleitete Interaktion zwischen SRP und Polypeptidkette ohne vorhandene Signalsequenz verhindert werden kann (Beatrix *et al.*, 2000; Wiedmann *et al.*, 1994). NAC kann jedoch auch mit RNC-Komplexen interagieren, die eine Signalsequenz besitzen (del Alamo *et al.*, 2011), oder mit der Signalsequenz in direkte Wechselwirkungen treten (Zhang *et al.*, 2012). Des Weiteren zeigten Zhang *et al.* (2012), dass NAC insbesondere in der frühen Phase der Rekrutierung von SRP zum RNC-Komplex benötigt wird. Sobald die Signalsequenz das Ribosom verlassen hat, bindet SRP hochaffin an die Signalsequenz ohne die Beteiligung von NAC. Das deutet darauf hin, dass NAC Informationen über die noch im Ribosom verborgen liegende naszierende Kette an SRP vermittelt.

In der Literatur wird bei einem SRP-abhängigen cotranslationalen Transport eines Proteins von einer notwendigen Minimallänge von 70 AS ausgegangen. Dies liegt darin begründet, dass bei fortlaufender Translation mindestens 30 – 40 AS im ribosomalen Tunnel verborgen vorliegen, während die n-terminale Signalsequenz der naszierenden Kette an der ribosomale

Exitseite das Ribosom exponiert vorliegt (Malkin & Rich, 1967; zusammengefasst von Hardesty & Kramer, 2001). Eine effektive SRP-Signalsequenz-Interaktion durch vollständige Exposition der ca. 20 AS langen Signalsequenz am RNC-Komplex kann bei einer Proteinelänge von 70 AS somit stattfinden (Walter & Blobel, 1981 III; Zimmermann *et al.*, 1990). Umso überraschender ist es, dass hier in der Arbeitsgruppe Ergebnisse der Dissertation von Vivica Stokes darauf hindeuteten, dass Proteine mit einer Länge von nur 46 AS cotranslational transloziert werden (Dissertation Vivica Stokes, 2011). Dies wirft die Frage auf, ob es sich bei dem Transport zur ER-Membran solch kleiner Proteine um einen SRP-abhängigen Transportweg handelt.

Die Rekrutierung des RNC^{+SRP}-Komplexes zur ER-Membran wird durch die Bindung von SRP an seinen membranständigen Rezeptor (SR) vermittelt. Der SRP-Rezeptor besteht in Eukaryonten aus zwei Untereinheiten: SR α und SR β . Der dimere Komplex ist über die SR β -Untereinheit mit der ER-Membran verankert (Lauffer *et al.*, 1985). SR α besitzt ebenfalls eine N- und eine G-Domäne, welche mit der N- und G-Domäne des SRP54 interagieren. Beide NG-Domänen verfügen über eine GTPase-Funktion (Bernstein *et al.*, 1989; Römisch *et al.*, 1989). Die N- und G-Domäne des SRP54 binden GTP-abhängig an den SR. Die Bindung zur Signalsequenz löst sich und der RNC-Komplex erhält so erstmals Kontakt zu der Translokationspore (Gilmore *et al.*, 1982 I und II; Gilmore & Blobel, 1983; Peluso *et al.*, 2000). Die Signalsequenz wird an den Translokationskanal übertragen. Der Translationsarrest wird aufgehoben und die Polypeptidkette kann durch die Sec61-Translokationspore hindurch auf die luminalen Seite transportiert werden. Währenddessen dissoziiert durch GTP-Hydrolyse SRP von seinem Rezeptor. Der RNC-Komplex ist nun hochaffin an den Sec61-Kanal gebunden.

Durch eine schleifenartige, mit dem n-Terminus zum Zytosol gerichtete Anlagerung der hydrophoben Signalsequenz an die Innenseite des Kanals beginnt die Öffnung der Translokationspore. Die Inserierung der Signalsequenz an die Kanalinnenseite von Sec61 α trennt dabei dessen Transmembrandomänen 2b und 7 und destabilisiert den zentralen *Plug*, der der Abdichtung des Kanals dient (van den Berg *et al.*, 2004). Die translozierende Polypeptidkette stabilisiert im Folgenden die geöffnete Konformation der Pore (Trueman *et al.*, 2011). Der *Plug* kann erst wieder in das Zentrum der Translokationspore zurückkehren, wenn die gesamte Polypeptidkette den Kanal Richtung Lumen verlassen hat.

In Experimenten mit rekonstituierten Mikrosomen konnte gezeigt werden, dass das Sec61-Trimer ein elementarer Bestandteil der Translokation ist (Akamaru *et al.*, 1991; Görlich & Rapoport, 1993). Im Gegensatz zur β -Untereinheit sind die α - und γ -Untereinheit des trimeren Sec61-Komplexes hochkonserviert und für die Zelle essentiell. Sec61 α bildet maßgeblich die im Inneren wässrige Pore und umschließt die Polypeptidkette während der Translokation (Crowley *et al.*, 1993; Mothes *et al.*, 1994).

Sobald die Schnittstelle für den Signalpeptidasekomplex auf der luminalen Seite zugänglich ist, wird die Signalsequenz abgetrennt (Antonin *et al.*, 2000; Jackson und Blobel, 1977; Weihofen *et al.*, 2002). Das prozessierte Protein wird schließlich ins Lumen entlassen.

Neben Prozessierung und Faltung können Proteine im Lumen des ER weiter modifiziert werden. So bewirkt die Konsensussequenz „Asn-X-Thr/Ser“ die Übertragung von

verzweigten Zuckerketten durch den in das Translokon integrierten Oligosaccharyltransferasekomplex (Chen *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2009; Pfeffer *et al.*, 2014; Silberstein & Gilmore, 1996). Die im ER-Lumen vorliegenden translozierten und modifizierten Proteine können dann den sekretorischen Transportweg über Vesikeltransport durchlaufen.

1.1.2. Posttranslationale Translokation von Substratproteinen in das endoplasmatische Retikulum

Neben der zuvor beschriebenen cotranslationalen Translokation können manche Proteine auch über den sogenannten „posttranslationalen Transportweg“ zur ER-Membran gelangen. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass die Peptide bereits fertig synthetisiert auf der zytosolischen Seite vorliegen und somit nach der Translation der mRNA Ribosomen- und SRP-unabhängig zur Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert werden (zusammengefasst in Johnson *et al.*, 2013). Dabei werden Proteine mit einem einzelnen c-terminalen Membrananker (Transmembrandomäne, TMD) über den TRC40-Transportweg in Säuger-ER-Membranen posttranslational inseriert. Diese Proteine werden als *tail-anchored* Proteine bezeichnet (Stefanovic & Hegde, 2007)

Die TMD von *tail anchored* Proteinen aus dem Säuger wird zunächst von einem sogenannten *pre-targeting*-Komplex – bestehend aus TRC35, UBLA und SGTA – erkannt und gebunden. BAG6 spielt ebenfalls eine Rolle bei der Bindung des frisch synthetisierten *tail anchored* Proteins (Leznicki *et al.*, 2010; Mariappan *et al.*, 2010). Der Transport zur ER-Membran erfolgt über TRC40 (auch Asna-1 genannt). WRB (Get1p) und CAML (Get2p) bilden den membranständigen Rezeptor für TRC40 (Schuldiner *et al.*, 2008; Stefanovic & Hegde, 2007). Nach Abell *et al.* (2004) soll auch SRP im posttranslationalen Transport einige *tail anchored* Proteine zur ER-Membran rekrutieren. SRP agiert dabei möglicherweise als Schutzschild für den hydrophoben Membrananker, um so das Protein integrationskompetent zu halten (Rabu *et al.*, 2009).

Gewisse *tail anchored* Proteine werden hingegen unabhängig von *Targetingfaktoren* und membranständigen Proteinen in die ER-Membran inseriert (Brambillasca *et al.*, 2006; High & Abell, 2004). Als Beispiel ist hier das Cytochrom B5 zu nennen. In solch einem Fall wird von einer „unassitierten posttranslationalen Integration“ gesprochen (D'Arrigo *et al.*, 1993; Takagaki *et al.*, 1983).

Der posttranslationale Transportweg von sekretorischen Proteinen wurde darüber hinaus ausgiebig in *Saccaromyces cerevisiae* mit verschiedenen Substratproteinen, darunter als prominentester Vertreter für lösliche Proteine der prepro- α -Faktor (pp α F), untersucht (Rapoport *et al.*, 1999). Die freigesetzten Polypeptidketten des pp α F werden im Zytosol durch Interaktion mit Hsp40/Hsp70 Chaperonen vor Degradation geschützt (Chirico *et al.*, 1988; Chirico, 1992; Deshaies *et al.*, 1988; Ngosuwana *et al.*, 2003). Sie verbleiben löslich und translokationskompetent und werden über die heptamere Translokationspore der Hefe,

bestehend aus dem trimeren Sec61p-Kanal mit assoziiertem Sec62p/63p/71p/72p-Komplex, ATP-abhängig ins ER-Lumen transportiert (Deshaies *et al.*, 1991; Ngosuwan *et al.*, 2003; Path *et al.*, 1998). Um einen Transport der gesamten Polypeptidkette ohne ein Rückrutschen ins Zytosol zu gewährleisten, bindet auf der luminalen Seite in regelmäßigen Abständen das Hsp70 Chaperon Kar2p an die transportierte Kette (Liebermeister *et al.*, 2001; Matlack *et al.*, 1999). Kar2p wird von der J-Domäne des Sec63p zur Verfügung gestellt. Die Signalsequenz wird bei den meisten Proteinen durch den Signalpeptidasekomplex abgetrennt, sobald die Spaltstelle dem Enzymkomplex zugänglich ist. Kar2p löst sich von der Polypeptidkette und das prozessierte Peptid liegt im Lumen vor.

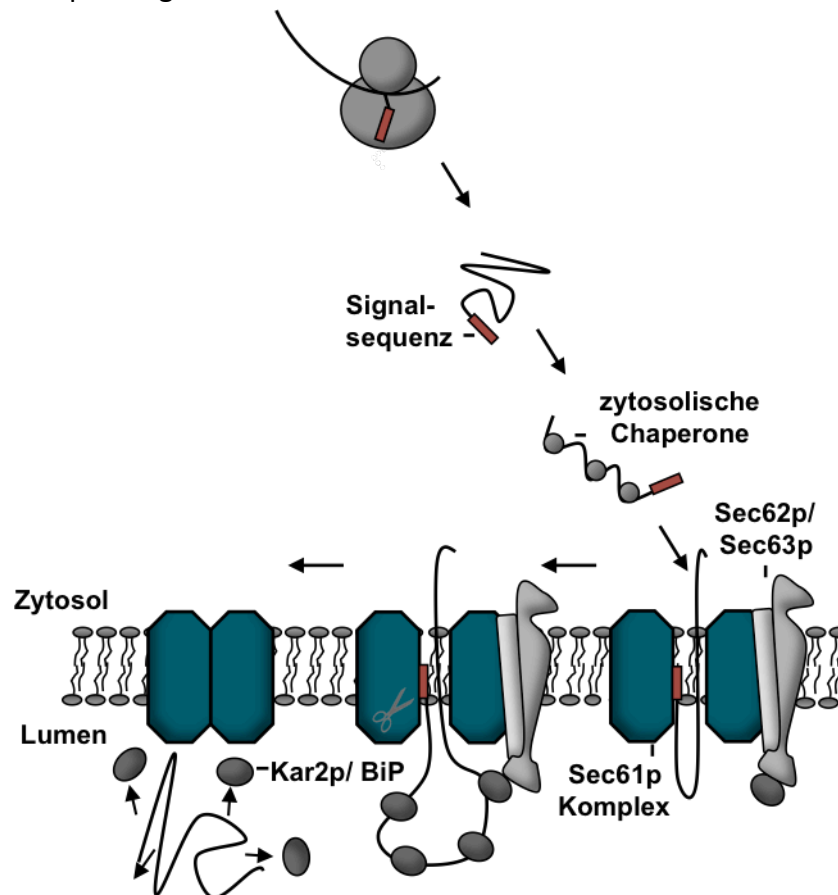


Abb. 3: Schematische Darstellung des posttranslationalen Transportweges von sekretorischen Proteinen ins endoplasmatische Retikulum (ER) von *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Synthese des Polypeptids ist bereits auf der zytosolischen Seite abgeschlossen. An die aus dem Ribosom entlassene Polypeptidkette binden zytosolische Chaperone, um sie kompetent für die Translokation durch den heptameren Sec-Komplex zu halten (hier nur Sec61p, Sec62p und Sec63p dargestellt). Nach Ablösung der zytosolischen Chaperone, bindet die Signalsequenz an das Innere des Sec61p-Kanals. Die Polypeptidkette wird auf die luminalen Seite transportiert. Um ein Zurückrutschen der Kette zurück auf die zytosolische Seite zu unterbinden, wird über die J-Domäne des Sec63p luminales Kar2p (im Säuger BiP) übertragen. Sobald im Lumen die Schnittstelle zur Abtrennung der Signalsequenz dem Signalpeptidasekomplex zugänglich ist, wird die Signalsequenz abgespalten. Kar2p löst sich wieder und das Peptid liegt prozessiert im Lumen vor.

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass der posttranslationale Transportweg nicht den niederen Eukaryonten vorbehalten ist, sondern auch von Metazoenproteinen eingeschlagen werden kann. Die posttranslational transportierten Proteine von Vielzellern haben gemein, dass sie ungewöhnlich klein sind (<70 Aminosäuren) und oft Vorstufen von antimikrobiellen

Peptiden und Hormonen sind. Ihre Vorläuferproteine scheinen schlicht zu kurz, als dass SRP effektiv binden könnte, bevor sie das Ribosom verlassen haben (Brogden, 2005; Schlenstedt *et al.*, 1990; Zimmermann *et al.*, 1990). Den ersten Hinweis auf einen posttranslationalen Transport in das ER von Säugern (Hudemikrosomen) lieferten Zimmermann und Mollay, 1986, mit dem Vorläuferprotein Präpromellittin des Honigbienengiftes. Translokationsexperimente mit Präpromellittin erfolgten in den zellfreien Systemen Retikulozytenlysat (RL) und Weizenkeimextrakt (WKE). Zu den weiteren gefundenen Substratproteinen, die unabhängig von SRP transportiert werden können, zählen das Präprocecropin A (ppCecA) aus der Motte und das Präpropeptid GLa aus dem Frosch. Beide Substratproteine konnten erfolgreich im RL in Hudemikrosomen posttranslational transloziert werden, sodass ihre um die Signalsequenz verkürzte Form nachweisbar war (Boman *et al.*, 1989; Schlenstedt *et al.*, 1990; Schlenstedt & Zimmermann, 1987). In neueren Untersuchungen konnte zudem eine posttranslationale Translokation auch für einige kleine Säugerproteine (<70 AS) nachgewiesen werden (Johnson *et al.*, 2012; Dissertation Vivica Stokes, 2011).

Die posttranslationale Translokation dieser Proteine, wie die der Hefeproteine, läuft ATP abhängig ab und die Peptidketten müssen im Zytosol translokationskompetent gehalten werden (Müller & Zimmermann, 1987; Schlenstedt & Zimmermann, 1987; Schlenstedt *et al.*, 1990; Schlenstedt *et al.*, 1992). Lange Zeit war unklar, wie im Einzelnen das *Targeting* zur ER-Membran innerhalb des posttranslationalen Transports abläuft. Eine Substanz, die eine ähnliche Funktion übernimmt wie das SRP beim cotranslationalen Transport und die Polypeptidketten zur ER-Membran rekrutiert, war nicht bekannt. Erst neuere Studien zeigen, dass für einige Peptide *Targetingfaktoren* für einen Transport zur ER-Membran notwendig sind. So übernimmt Calmodulin (CaM) eine Funktion als *Targetingfaktor* im Zytosol für das *Targeting* von ppCecA (Shao & Hegde, 2011). Ebenso spielt TRC40 beim posttranslationalen Transport von ppCecA und von den kleinen, sekretorischen Proteinen Präapelin und Prästatherin eine Rolle auf der zytosolischen Seite (Johnson *et al.*, 2012). Ähnlich wie TRC40 bindet CaM direkt an die Signalsequenz und schirmt diese ab. Johnson *et al.* (2012) beobachtete zudem neben dem neu entdeckten TRC40-abhängigen Transportweg für kleine sekretorische Proteine zum ER einen TRC40-unabhängigen alternativen Weg. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob es sich bei dem TRC40-unabhängigen Transportweg um den CaM-abhängigen Rekrutierungsweg handeln könnte oder möglicherweise weitere bisher unentdeckte Faktoren beim *Targeting* zur ER-Membran eine Rolle spielen könnten. Welcher Rekrutierungsweg eingeschlagen wird und wie die Wege miteinander verknüpft sind, konnte bislang nicht geklärt werden. Ein Einfluss von SRP innerhalb des posttranslationalen Transports bei sekretorischen Proteinen wurde bisher nicht untersucht. Neben diesen zytosolischen *Targetingfaktoren* benötigt die posttranslationale Translokation von kleinen sekretorischen Proteinen zudem Sec62 (Lakkaraju *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012).

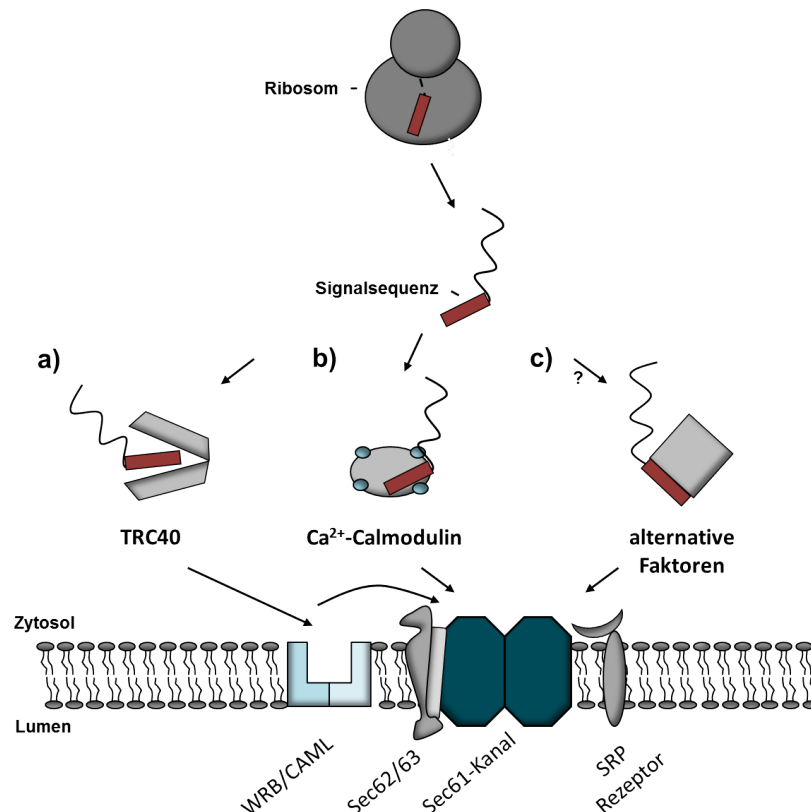


Abb. 4: Schematische Darstellung verschiedener zytosolischer Rekrutierungsfaktoren in der posttranslationalen Translokation sekretorischer Proteine.

Präproteine, deren Synthese bereits im Zytosol abgeschlossen ist, können von verschiedenen zytosolischen Bindungspartnern zur ER-Membran rekrutiert werden. a) Dabei liegt TRC40 assoziiert mit der Signalsequenz des Polypeptids vor. TRC40 bindet zunächst an seinen Rezeptor (WRB/CAML), bevor das Polypeptid durch den Sec61-Kanal transloziert wird. b) Die Polypeptidkette in Interaktion mit Ca²⁺-CaM wird direkt zur Translokationspore rekrutiert. c) Untersuchungen mit TRC40-Depletierung deuten darauf hin, dass neben den genannten zytosolischen Rekrutierungsproteinen noch weitere unbekannte Faktoren diese Aufgabe übernehmen könnten (Johnson *et al.*, 2012).

Unabhängig davon, welche *Targetingfaktoren* auf der zytosolischen Seite von Bedeutung sind, ist den posttranslational transportierten kleinen sekretorischen Proteinen gemein, dass sie über den Sec61-Komplex auf die luminal Seite transloziert werden. So zeigten Experimente mit Lanthanionen und Eeyarestatin-I eine gestörte posttranslationale Translokation von ppCecA und anderen Vorläuferproteinen. Durch den Einsatz von Lanthanionen wird die Dynamik des Sec61-Kanals eingeschränkt. Eeyarestatin-I verhindert die Interaktion zwischen RNC-Komplex und Translokationspore. Die naszierende Kette kann durch Eeyarestatin-I nicht auf den Sec61-Kanal übertragen werden. Die Ergebnisse mit Einsatz dieser sich auf den Sec61-Kanal auswirkenden Substanzen deuten daher auf eine Abhängigkeit der Translokation des ppCecA und anderen Vorläuferproteinen vom Sec61-Kanal hin (Cross *et al.*, 2009; Erdmann *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2012; Shao & Hedge, 2011).

Auch im Säuger gibt es entsprechende Homologe zu den bereits in der Hefe identifizierten Porenproteinen Sec62p und Sec63p. Diese bilden im Säuger zusammen mit Sec61 den Sec-Komplex (Daimon *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Während Sec62 für

den posttranslationalen Transport von kleinen sekretorischen Proteinen (≤ 160 AS) benötigt wird (Lakkaraju *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012), wird Sec63 eine Rolle im co- und posttranslationalen Transport beim Eintreten des Vorläuferproteins in den Sec61-Kanal zugesprochen (Lang *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2000). Zudem aktiviert Sec63 über die J-Domäne BiP (Homolog zu Kar2p) für die Interaktion mit seinen Substraten (Tyedmers *et al.*, 2000).

Nachdem der Sec61-Komplex erfolgreich passiert wurde, muss auch im Säugersystem ein Zurückschleichen der Polypeptidkette verhindert werden. Dabei unterstützt BiP zum einen vermutlich das Öffnen des Sec61-Kanals (Dierks *et al.*, 1996; Klappa *et al.*, 1991; Schäuble *et al.*, 2012) zur Translokation der Polypeptidkette und wirkt zum anderen als „molekulare Ratsche“, indem es auf der luminalen Seite an die frisch transportierte Polypeptidkette bindet und deren Zurückgleiten auf die zytosolische Seite verhindert (Nicchitta & Blobel, 1993; Tyedmers *et al.*, 2003; Shaffer *et al.*, 2005). Der Signalpeptidasekomplex spaltet auf der luminalen Seite die Signalsequenz ab, sobald die Spaltstelle zugänglich ist (Dalbey *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 1986; Jackson und Blobel, 1977). Es erfolgen ggf. N-Glykosylierungen durch die Oligosaccharyltransferase (Chen *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2009; Silberstein & Gilmore, 1996) oder das Einfügen von GPI-Ankern durch die GPI Transamidase im Lumen des ER (Benghezal *et al.*, 1996; Fraering *et al.*, 2001).

Nach bioinformatischen Analysen haben momentan geschätzt über 200 humane sekretorische Proteine das Potenzial, posttranslational transportiert zu werden (Frith *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2012; Shao & Hedge, 2011). Möglicherweise muss diese Zahl durch zukünftig verbesserte Vorhersagemethoden noch weiter nach oben korrigiert werden. Insgesamt zeigt die Komplexität der posttranslationalen Translokation, dass dem lange Zeit neben dem cotranslationalen Transportweg im Schatten gestandenen posttranslationalen Transportweg eine höhere Bedeutung beigemessen werden muss. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die posttranslationale Translokation zukünftig besser charakterisieren zu können.

1.2. Calmodulin-Interaktion mit Substratproteinen und Inhibitoren

Innerhalb des posttranslationalen Transports zur ER-Membran wurde neben TRC40 Calmodulin (CaM) eine Funktion als *Targetingfaktor* zugesprochen (Johnson *et al.*, 2012; Shao & Hegde, 2011). Die Untersuchungen zur Rolle des CaM als *Targetingsubstanz* wurden bisher ausschließlich mit dem Insektenprotein ppCecA durchgeführt (Shao & Hegde, 2011). Dies wirft die Frage auf, ob die Abhängigkeit von CaM im posttranslationalen *Targeting* auf einem Einzelfall beruht oder ob weitere Proteine CaM als *Targetingfaktor* benötigen. Kann in diesem Zusammenhang von einem speziesübergreifenden posttranslationalen Rekrutierungsmechanismus gesprochen werden? Zur Beantwortung dieser Fragen, werden zukünftig weitere *in vitro* Translokationsexperimente mit CaM notwendig sein.

Calmodulin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein mit einer Länge von 148 AS, welches der EF-Hand-Familie angehört. Es nimmt eine bedeutende Rolle bei der Ca^{2+} -abhängigen Signalweiterleitung in eukaryontischen Zellen ein und beeinflusst eine Vielzahl von physiologischen Prozessen mit Ca^{2+} -abhängiger Regulation von Zielenzymen, wie z. B. der *Myosin Light Chain Kinase* (MYLK), der Phosphodiesterase oder von Ca^{2+} -ATPase Pumpen (James *et al.*, 1995; Means *et al.*, 1982 und 1991; Vogel, 1994). Freies oder Ca^{2+} -gebundenes CaM liegt zunächst in einer langgestreckten Konformation vor (Finn *et al.*, 1995; Kretsinger *et al.*, 1986; Kuboniwa *et al.*, 1995). Die beiden Ca^{2+} -bindenden globulären Domänen des Calmodulins sind über einen flexiblen *Linker* miteinander verbunden und beinhalten die hydrophoben Bindetaschen. Kommt es zur Bindung eines Zielproteins an das durch Ca^{2+} aktivierte CaM, ändert sich durch die Flexibilität der *Linker*-Region die Struktur des CaM hin zu einer insgesamt globulären Konformation (Ikura *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1992 und 1993).

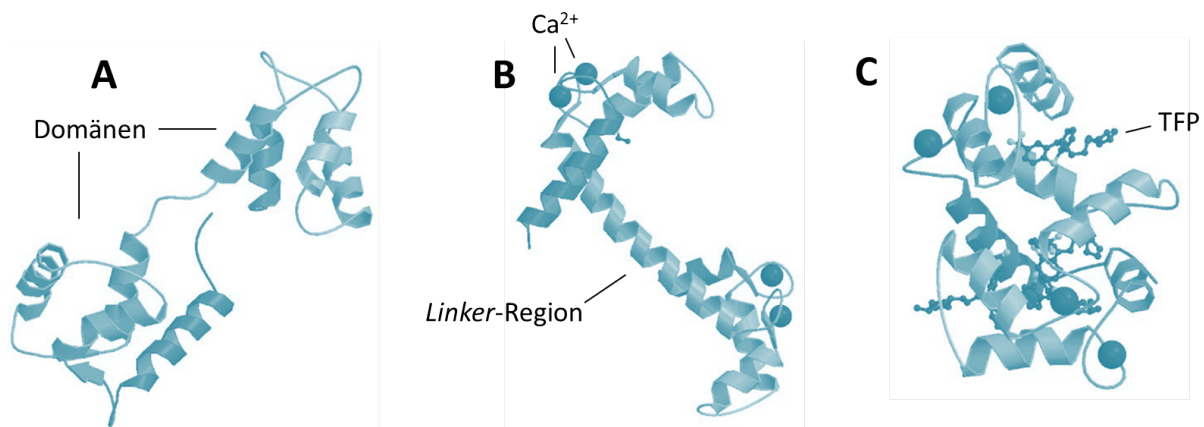


Abb. 5: Dreidimensionale Struktur von Calmodulin in unterschiedlichen Konformationen.

A) Apo-CaM (PDB Code: 1CFD). CaM liegt ohne gebundenes Ca^{2+} in der langgestreckten Konformation vor. B) Ca^{2+} -CaM (PDB Code: 1CLL). Binden Kalziumionen (Kugeln), befindet sich Ca^{2+} -CaM im aktiven Zustand. In den beiden Domänen werden die hydrophoben Bindetaschen zugänglich. C) Ca^{2+} -CaM-TFP-Komplex (PDB Code: 1LIN). Nach Bindung einer Targetsubstanz an Ca^{2+} -CaM ermöglicht die starke Flexibilität der *Linker*-Region eine strukturelle Änderung von der langgestreckten zur globulären Form. Hier mit der Bindung von vier TFP-Molekülen beispielhaft gezeigt. In der globulären Form ist CaM nicht mehr zugänglich für die Bindung von anderen Substratproteinen. Alle Strukturen aus *Protein Data Bank* (PDB).

Die Interaktion von Calmodulin mit seinen Bindungspartnern kann durch verschiedene Inhibitoren unterbunden werden. Zu den stärksten Inhibitoren gehört das Trifluoperazin (10-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)-propyl]-2-(trifluoromethyl)-10H-phenothiazine; TFP), eine antipsychotische Substanz vom Phenothiazine Typ (Jackson & Puett, 1986; Klevit *et al.*, 1981; Levin & Weiss, 1976; Massom *et al.*, 1990).

Die ersten Kristallisationsstudien zur Bindung von TFP an CaM kamen zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen. So zeigten Cook *et al.* (1994), dass lediglich ein TFP-Molekül an CaM gebunden vorlag. Die Arbeitsgruppe um Vandonselaar *et al.* (1994) berichtete hingegen, dass vier TFP-Moleküle an CaM gebunden hatten. Dabei fanden sie jeweils ein TFP in den hydrophoben Bindetaschen der beiden Domänen (n- und c-terminal) des Calmodulins und zwei TFP-Moleküle zwischen diesen beiden Domänen. Mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (*Small-angle X-ray scattering*; SAXS) konnte gezeigt werden, dass ein mit Ca^{2+} -

gesättigtes CaM-Molekül mit vier gebundenen TFP-Molekülen die globulärste Konformation einnimmt (Matsushima *et al.*, 2000). Während Vandonselaar *et al.* (1994) eine Anwesenheit von Kalziumionen für die Bindung von TFP an CaM für unerlässlich hielten, zeigten Matsushima *et al.* (2000), dass TFP auch an Ca^{2+} -freies CaM binden konnte. Dies resultierte jedoch in einer schwächer ausgeprägten strukturellen Veränderung des Calmodulins hin zu der globulären Form.

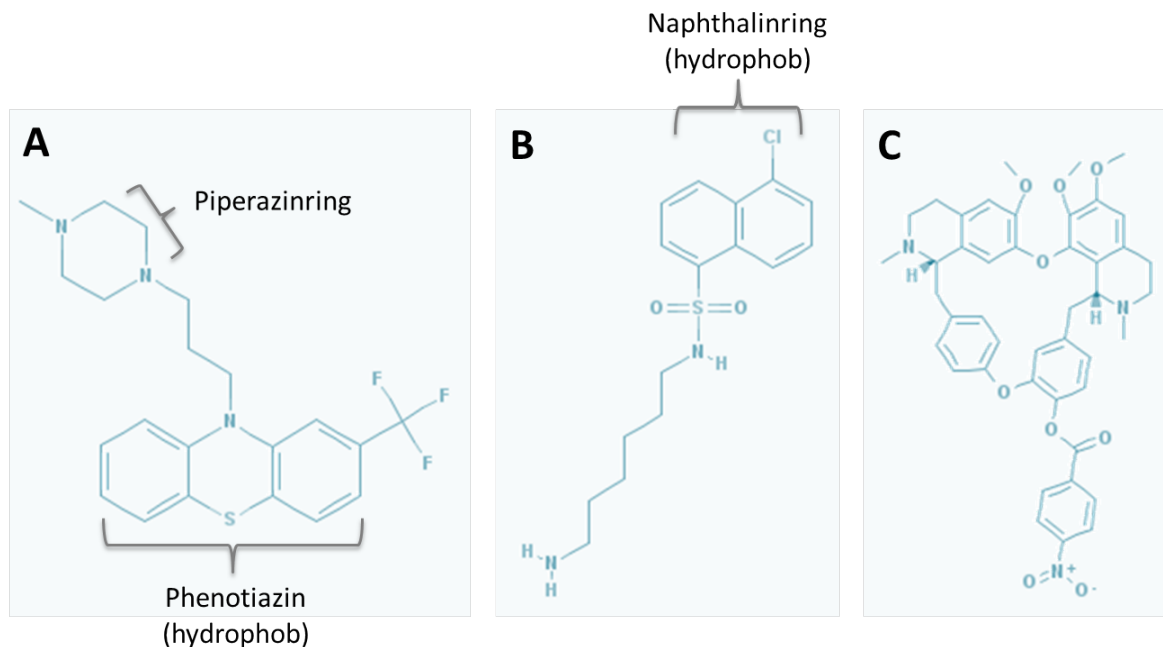


Abb. 6: Chemische Strukturen von A) TFP (CID: 5566), B) W7 (CID: 124887) und C) E6 (CID: 6610268).
Abbildungen modifiziert und aus PUBCHEM.

Interagieren CaM und TFP miteinander, so bindet TFP genau in die hydrophoben Bindungstaschen, die auch für die Bindung von anderen Targetenzymen vorgesehen sind (Cook *et al.*, 1994; Vandonselaar *et al.*, 1994). Besonders am Beispiel von CaM-MYLK-Komplexen konnte gezeigt werden, dass die strukturelle Veränderung durch TFP-Interaktion sehr ähnlich der Konformationsänderung ist, wenn Zielproteine an CaM binden. Für die Bindung von Substratproteinen sind hydrophobe Seitenketten von Aminosäuren verantwortlich. Meistens handelt es sich dabei um die Seitenkette eines Tryptophans (Trp). Es konnte beobachtet werden, dass die Aminosäuren der hydrophoben Bindetasche des CaM, die in einem CaM-MYLK-Komplex Kontakt mit der Trp-Seitenkette des MYLK haben, auch Kontakt zum trizyklischen Ring (Phenotiazin) von TFP haben (Cook *et al.*, 1994).

Neben dem CaM-Inhibitor TFP wurden in dieser Arbeit zwei weitere Antagonisten verwendet: N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulphon-amide (W7) und die Berbamin-Verbindung E6. In Untersuchungen zu W7 konnte gezeigt werden, dass zwei W7-Moleküle mit dem Chloratom des Naphthalinrings voran mit einem Molekül CaM interagieren. Jeweils ein W7-Molekül bindet dabei mit seinem Chloronaphthalinring in die hydrophobe Seitentasche jeder Domäne des Ca^{2+} -Calmodulins (Osawa *et al.*, 1998). Das Ausmaß der strukturellen Veränderung durch Bindung von zwei W7-Molekülen entspricht der Bindung von vier TFP-Molekülen (Matsushima *et al.*, 2000).

Bereits die Beispiele von TFP und W7 als CaM-Antagonisten lassen einen prinzipiellen Inhibierungsmechanismus vermuten. Beide Inhibitoren schirmen durch ihre Interaktion die hydrophoben Seitentaschen des Calmodulins für die Bindung an potentielle Substratenzyme effektiv ab (Vertessy *et al.*, 1998). Der Komplex wird hauptsächlich durch van der Waals Kräfte stabilisiert, welche zwischen den hydrophoben, aromatischen Gruppen des Phenothiazinrings (TFP) und des Naphthalinrings (W7) sowie den hydrophoben Taschen der beiden CaM-Domänen wirken. Daneben stabilisieren elektrostatische Kräfte zwischen positiv geladenen Gruppen des TFP/W7 und den negativ geladenen Gruppen der CaM-Domänen die globuläre Struktur (Cook *et al.*, 1994; Matsushima *et al.*, 2000; Osawa *et al.*, 1998; Vandonselaar *et al.*, 1994).

Der dritte verwendete Inhibitor ist das synthetische E6. Fluoreszenzexperimente mit Dansyl-CaM zeigten, dass der Inhibitor E6 direkt mit CaM interagiert (Hu *et al.*, 1992). Zu dem E6 Inhibitor gibt es bislang keine Kristallografiestudien zur Bindung an Calmodulin.

Im Gegensatz zu der nachgewiesenen Rolle von CaM in der posttranslationalen Translokation von ppCecA (Shao & Hegde, 2001) wurde bislang kein Einfluss von CaM in der cotranslationalen Translokation beobachtet. Somit ist bisher nicht geklärt, ob CaM eine Alternative zum SRP darstellt oder auf weitere Komponenten oder Interaktionswege innerhalb der cotranslationalen Translokation wirkt.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Sekretorische Proteine können über den co- oder den posttranslationalen Transportweg ins endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert werden. Lange wurde angenommen, dass eukaryontische Proteine nur cotranslational transportiert werden, während in niederen Eukaryonten, wie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, einige Proteine über die posttranslationale Translokation elongationsunabhängig in das ER gelangen. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass auch Säugerproteine posttranslational transportiert werden können. Zudem deuten weitere Erkenntnisse darauf hin, dass weitaus kleinere Proteine cotranslational transportiert werden können, als zunächst für einen SRP-abhängigen Weg angenommen wurde.

Zu Beginn sollte über *in vitro* Translokationsexperimente mit den humanen Substratproteinen Prähistatin1 (pHis1, 60 AS), Prähistatin3 (pHis3, 54 AS) und Prästatherin (pStat, 65 AS) untersucht werden, ob der cotranslationale Transport solcher kleinen Proteine SRP-abhängig abläuft. Ist bei einem SRP-abhängigen cotranslationalen Transport eine Mindestlänge der Polypeptidkette erforderlich? Aufgrund der Entdeckung, dass SRP ebenfalls eine Rekrutierungsfunktion unter posttranslationalen Bedingungen bei *tail-anchored* Proteinen einnehmen kann, sollte zudem die Rolle von SRP in der posttranslationalen Translokation von kleinen Säugerproteinen analysiert werden.

Unlängst konnten weitere Substanzen mit einer Rekrutierungsfunktion im posttranslationalen *Targeting* gefunden werden (Calmodulin (CaM) und TRC40). Dies deutet darauf hin, dass der neben dem bereits sehr gut untersuchten cotranslationalen Transportweg bislang weniger beachtete posttranslationale Transportweg komplexer zu sein scheint und weiterer Erforschung bedarf. Der Einfluss von CaM konnte bisher nur für das Insektenprotein PräprocecropinA beobachtet werden. Vor diesem Hintergrund konzentrierten sich die *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit auf die Bedeutung von CaM in der posttranslationalen Translokation von kleinen Säugerproteinen. Ist CaM essentiell für die posttranslationale Translokation dieser Proteine? In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, ob es zu einer direkten Interaktion zwischen der Signalsequenz des Substratproteins und CaM kommt. Zudem sollte untersucht werden, ob CaM möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der cotranslationalen Translokation dieser Substratproteine spielt.

Im Laufe der hier durchgeführten Untersuchungen zur Bedeutung von CaM in der Translokation von kleinen Säugerproteinen zeigte sich eine unerwartete Inhibierung der cotranslationalen Translokation durch Verwendung des etablierten CaM-Inhibitors Trifluoperazin (TFP). Dies führte zu einer Erweiterung der Zielsetzung dieser Arbeit. Hierzu sollte die neuartige translokationsstörende Wirkung des TFP näher charakterisiert werden. Handelt sich hier ebenfalls um eine Inaktivierung des CaM oder wird ein anderer Schritt innerhalb der cotranslationalen Translokation von TFP beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E.coli</i> Tuner TM (DE3) Plac	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1 (DE3)$ $plac1 (Cam^k)$	Novagene
<i>E.coli</i> XL1 blue	$supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi$ $relA1 lac [F' proAB lac1q \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$	Bullock <i>et al.</i> (1987), Stratagene

2.1.2. Plasmide

Name	Eigenschaft	Herkunft
pGEM3- Cecropin-2Met	kodierende Sequenz für PräprocecropinA aus <i>Hyalophora cecropia</i> mit 2 Isoleucinen, die durch 2 Methionine ersetzt wurden; 64 AS; 6,9 kDa	AG Zimmermann Zimmermann <i>et al.</i> , (1990)
pGEM3- Cecropin-2Met- o_SS	kodierende Sequenz für PräprocecropinA aus <i>Hyalophora cecropia</i> mit 2 Isoleucinen, die durch 2 Methionine ersetzt wurden; verkürzt auf die Aminosäuren 22 – 64; ohne Signalsequenz; 42 AS; 4,5 kDa	diese Arbeit
pGEM4- Histatin1-3Met	kodierende Sequenz für humanes Prähistatin1 mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; 60 AS; 7,4 kDa	AG Kalies
pGEM4- Histatin3-3Met	kodierende Sequenz für humanes Prähistatin3 mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; 54 AS; 6,5 kDa	AG Kalies
pGEM4- Histatin3- 34mer-3Met	kodierende Sequenz für humanes Prähistatin3 verkürzt auf die Aminosäuren 1 – 31; mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; 34 AS; 4,0 kDa	AG Kalies

pGEM4-Histatin3-38mer-3Met	kodierende Sequenz für humanes Prähistatin3 verkürzt auf die Aminosäuren 1 – 35; mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; 38 AS; 4,5 kDa	AG Kalies
pGEM4-Histatin3-42mer-3Met	kodierende Sequenz für humanes Prähistatin3 verkürzt auf die Aminosäuren 1 – 39; mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; 42 AS; 5,0 kDa	AG Kalies
pGEM4-Histatin3-46mer-3Met	kodierende Sequenz für humanes Prähistatin3 verkürzt auf die Aminosäuren 1 – 43; mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; 46 AS; 5,5 kDa	AG Kalies
pGEM4-Histatin3-50mer-3Met	kodierende Sequenz für humanes Prähistatin3 verkürzt auf die Aminosäuren 1 – 47; mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; 50 AS; 6,0 kDa	AG Kalies
pGEM4-Histatin3-3Met-o_SS	kodierende Sequenz für humanes Prähistatin3 verkürzt auf die Aminosäuren 19 – 54 und mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; ohne Signalsequenz; 36 AS; 4,6 kDa	diese Arbeit
pGEM4-Stattherin-3Met	kodierende Sequenz für humanes Prästattherin mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; 65 AS; 7,7 kDa	AG Kalies
pGEM4-Stat-3Met-o_SS	kodierende Sequenz für humanes Prästattherin verkürzt auf die Aminosäuren 19 – 6; mit zusätzlich 3 Methioninen c-terminal; ohne Signalsequenz; 46 AS; 5,6 kDa	diese Arbeit
pGEM4-pPI	kodierende Sequenz für bovines Präprolaktin; 229 AS; 25,8 kDa	AG Kalies
pGEM4-pPI-o_SS	kodierende Sequenz für bovines Präprolaktin verkürzt auf die Aminosäuren 30 – 229; ohne Signalsequenz; 199 AS; 22,7 kDa	diese Arbeit

2.1.3. Oligonukleotide

Synthese und Aufreinigung (HPSF) der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon.

Oligonukleotidname	Sequenz (5' → 3')/Herkunft
3Met fwd (TAA-Stop)	ATGATGATGTGATGGTACCGAGC
CaM-His ₆ fwd	CATTGGCGCCATGGCTGATCAGCTGACCGAAG
CaM-His ₆ rev	CGGCGCAAGCTTCTATCATTTTTGCAGTCATCATC
CecA_o_SSfwd	GCGCCGGAACCTAAATGG
CecArev	CATGAATTCCGGTCTCCCTATAGTG
His3_o_SSfwd	GATTCACATGCAAAGAGACATC
His3rev	CATAGTTGGCCTCGAGAGAGTCTG
His3-34 rev	TCTTTTATACCCATGATGTCTC
His3-38 rev	TTCATGGAATTTTCTTTTATACCC
His3-42 rev	TGAATGATGCTTTTCATGG
His3-46 rev	ATAGCCTCGATGTGAATGATGC
His3-50 rev	ATAATTTGATCTATAGCCTCGATG
MYLK fwd	TAATCGGCGCCTACATGCTGCTGAGCGG
MYLK rev	TATGAAAGCTTCTACAGTGCCCCCGAGCTGCTG
pPIfwd	ATGCAGCTGGCTTATCG
pPI_o_SSfwd	ACCCCCGTCTGTCCCAATG
pPIrev	CATGCTCTAGAGTCTGCCAAAGTTGAGC
pPI78mer rev	TTTGGCCTGGGCATAACC
pPI86mer rev	AG Vermeire
pPI100mer rev	AG Vermeire
pPI120mer rev	GGAGCGCAGCAACCCAAG
pPI160mer rev	CATGCCTTCCAGAAGTCG
pPI190mer rev	ATCCTTAGTTTGCAGGGACGGG
PvuI fwd	GTGCTGCCATAACCATGAGTG
PvuI rev	TCGGTCCTCCGATCGTTGTC
Stat_o_SSfwd	GATTCATCTGAAGAGAAATTTTTGCGTAGAATTGGAAG
Statrev	CATGGTGGCTCGAGAGAGTCTGCCAAAG

2.1.4. Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Epitop	Herkunft
Anti-Calmodulin; Rabbit monoclonal	n-terminal	Abcam Ab124742

Sekundäre Antikörper

Name	Eigenschaft	Herkunft
Anti-rabbit IgG; IRDye800 [®]	Kaninchen IgG; gerichtet gegen gesamtes IgG-Molekül; Konjugat mit Fluorophor IRDye800	Rockland Immunochemicals
Anti-rabbit IgG; POD	Kaninchen IgG; gerichtet gegen gesamtes Molekül; Meerrettich Peroxidase Konjugat	Sigma

2.1.5. Medien und Puffer

Anodenpuffer für Tricingelektrophorese

210 mM Tris; pH 8,9 (RT)

Blotpuffer nach Towbin (1979)

25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol; der pH-Wert wurde nicht eingestellt

Blockierungspuffer

5% (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS

DNA-Ladepuffer (5x)

60% (w/v) Saccharose in 1x TAE-Puffer, Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer für Tris-Glycin-Gele nach Lämmli (1970)

25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS; der pH-Wert wurde nicht eingestellt

Elektrophoresepuffer für NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% Gele

50 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, 50 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA; pH 7,3

Kathodenpuffer für Tricingelektrophorese

100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS; pH 8,25 (RT)

LB-Agar (autoklaviert)

LB-Medium, 2% (w/v) Bacto-Agar

Lysogeny Broth (LB) - Medium (autoklaviert)

1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Natriumchlorid

Membranpuffer (MP)

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 250 mM Saccharose, 1 mM DTT

PBS

137 mM Natriumchlorid, 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 10,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2,7 mM Kaliumchlorid; pH 7,4 (RT)

Proteasepuffer (PP)

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 250 mM Saccharose, 140 mM Kaliumacetat, 3 mM Magnesiumacetat

Puffer_{Uz}

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 2 mM Magnesiumacetat, 80 mM Kaliumacetat

Retikulozytenlysat-Puffer (RP)

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 0,5 mM Magnesiumacetat, 80 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT

Retikulozytenlysat-Elutionspuffer (RP_{Elu})

50 mM HEPES-KOH, 0,5 mM Magnesiumacetat, 80 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT, 250 mM Imidazol; pH 8,0

Retikulozytenlysat-Equilibrierungspuffer (RP_{Equ})

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 0,5 mM Magnesiumacetat, 80 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT, 10 mM Imidazol

Retikulozytenlysat-Umpufferungspuffer (RP_U)

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 0,5 mM Magnesiumacetat, 80 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT, 10% Glycerin

Retikulozytenlysat-Waschpuffer (RP_w)

50 mM HEPES-KOH, 0,5 mM Magnesiumacetat, 80 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT, pH 6,3

Retikulozytenlysat-Waschpuffer (RP_{w7U} – RP_{w0U})

50 mM HEPES-KOH, 0,5 mM Magnesiumacetat, 80 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT, 7 M – 0 M Urea; pH 6,3

Saccharosekissen

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 6 mM Magnesiumacetat, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM EDTA, 1,3 M Saccharose

SDS-Probenpuffer (2x)

120 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 4 % SDS, 20 % Glycerin, Bromphenolblau

TAE-Puffer (50x)

2 M Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM EDTA, 5,7 % (v/v) Eisessig

TBST

50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM Natriumchlorid, 0,1% (w/v) Tween-20

2.1.6. Antibiotika, Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
[³⁵ S]-Methionin (370 MBq/ml, >37 TBq/ mmol)	Hartmann Analytik
Acryl/Bis™ (29:1)	Amresco
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Roth
Aquasafe 300 Plus	Zinsser Analytic
Bacto-Agar	BD
Bacto-Pepton	BD
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Bromphenolblau	Merck
Cycloheximid	Sigma Aldrich
Calmodulin	ENZO Life Sciences
Deoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
E6-Berbamin (E6)	ENZO Life Sciences
Enhanced Chemiluminescens (ECL)	PerkinElmer
Ethidiumbromid	Merck
Fast Digest Restriktionsendonucleasen (NheI, Pst1, PvuI)	Life Technologies
GeneRuler DNA Ladders 1kb/Mix	Life Technologies
Guanidin Hydrochlorid (GuHCl)	Sigma Aldrich
Harnstoff ≥ 99,5% (Urea)	Roth
HEPES	Sigma Aldrich
Kaliumacetat	Roth
Magnesiumacetat	Merck
N-(6-Aminoethyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid (W7)	ENZO Life Sciences
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Roth
PAGE Ruler Prestained Protein Ladder	Life Technologies
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich
Proteinase K	Roche
Puromycin	Biomol
Retikulozytenlysate (nukleasebehandelt, inkl. Aminosäure-Mix ohne Methionin bzw. Cystein)	Promega
RNase-Inhibitor RNasin	Promega
Ribonucleosidtriphosphate (rNTPs)	Promega
T4 DNA Ligase (mit dazugehörigem 5x rapid ligation buffer)	Life Technologies
T4 Polynukleotidkinase	Thermo Scientific
T7 RNA Polymerase (inkl. Transkriptionspuffer)	Promega
Tricine ≥ 99%	Sigma Aldrich
Trifluoperazin (TFP)	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth

Trypton	Merck
Weizenkeimextrakt	Promega

2.1.7. Kits, Materialien und Software

Kits, Materialien und Software	Hersteller
AIDA Image Analyzer Software Version 3.52	Raytest
Amicon® Ultra Centrifugal Filters	Millipore
Clone Manager Suite 7	Sci-Ed Software
Criterion™ Tris-Tricine Gele	Biorad
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell
Ni ²⁺ -NTA-Säulenmaterial	Qiagen
NucleoSpin Gel und PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoSpin RNA Clean-up	Macherey-Nagel
NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% Gele	Life Technologies
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Life Technologies
Roti-Fluoro PVDF Membran, Porengröße 0,2 µm	Roth
Whatman Protran Nitrocellulose Transfermembran, Porengröße 0,45µm	Schleicher & Schuell

2.1.8. Geräte

Geräte	Hersteller
Allegra 2IR Zentrifuge	Beckman Coulter
Avanti J-20 XPI Zentrifuge	Beckman Coulter
Criterion Cell für Criterion- und NuPAGE-Gele	Biorad
Eraser	Raytest
Feinwaage A1205-D1	Sartorius Analytic
Horizon 58 Gelelectrophoresis System	Gibco BRL
Flüssig-Szintillationszähler	Wallac
Geldokumentation Intas Gel iX Imager	Intas
Geltrockner Modell 583	Biorad
Kamera LAS-1000	Fuji
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
NanoDrop 2000 Spektralphotometer	Thermo Scientific
Odyssey Infrared Imaging System	Licor
Optima L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Optima Max-XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter

Pharmacia LKB Pump P-1	Pharmacia
Phosphoimager CR-35 Bio	Raytest
Phosphoimager FLA-3000	Fujifilm/Raytest
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
Power Supply Power-Pack Basic	Biorad
Power Supply PS 9009	Gibco BRL
Storage Phosphor Screen BAS-IP SR 2040 E Super Resolution	GE Healthcare Life Sciences
Thermocycler Gene Touch	BioER
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Western Blot Apparatur Panther	Owl Scientific

2.2. Methoden

2.2.1. Übernachtkulturen, Glycerinstocks und Plasmidpräparation

E. coli XL1-blue Zellen wurden in LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin (Selektionsmedium) über Nacht bei 37°C und 180 rpm angezogen. Das Animpfen erfolgte entweder über eine Kultur einer Agarplatte oder aus einem Glycerinstock. Zur Langzeitaufbewahrung wurde ca. ein Milliliter der gewünschten Kulturen mit Glycerinlösung auf eine Endkonzentration von 15% eingestellt. Anschließend wurden diese zur Lagerung bei -80°C in Stickstoff schockgefroren.

Die Präparation von Plasmid-DNA (pDNA) erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel). Nach der Elution der pDNA mit H₂O wurde die Konzentration mit dem Nanodrop Spektralphotometer bestimmt (Thermo Scientific).

2.2.2. Die „Halbvektorenstrategie“ als Klonierungsstrategie für Proteine ohne Signalsequenz

Ziel war es, die Proteine pHis3, pStat, ppCecA und pPI ohne Signalsequenz (His3, Stat, CecA und PI) zu generieren, um das Bindungspotenzial von CaM an die Signalsequenz überprüfen zu können. Hierzu wurden die Konstrukte ohne Signalsequenz über die sogenannte „Halbvektorenstrategie“ erzeugt. Zur Erzeugung eines Halbvektors ohne Sequenzabschnitt für die Signalsequenz (= erster Halbvektor; blaue Pfeile) hybridisierten die hierfür ausgewählten Oligonukleotide (*Primer*) zum einen direkt hinter der Signalsequenz des Proteins an die *Template*-DNA und vervielfältigen diese in 3'-Richtung (mpHis3fwd, fwdStat_o_SS, fwdCecA_o_SS und fwdpPI_o_SS) und zum anderen in 5'-Richtung an der PvuI-Schnittstelle des *Templates* (PvuIrev).

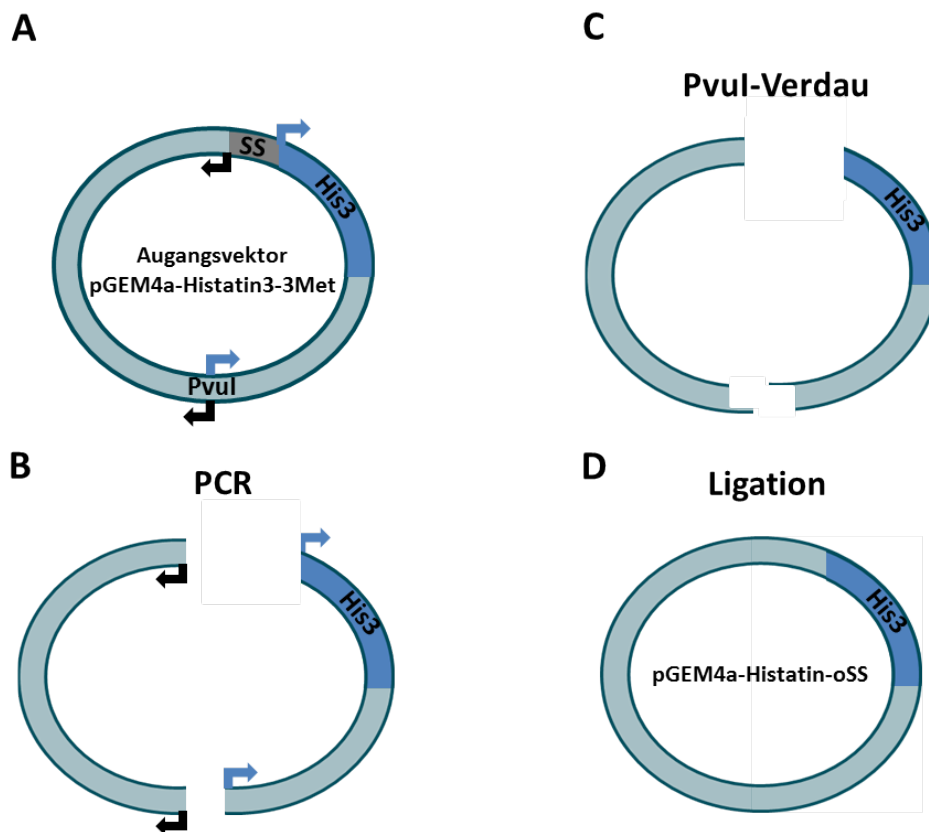


Abb. 7: Schematischer Ablauf der Halbvektorenstrategie am Beispiel von Prähistatin3:

A) Zur Generierung eines Halbvektors ohne Signalsequenzabschnitt wurde die Halbvektorenstrategie angewandt. Durch die ausgewählten *Primer* (A) entstehen mittels PCR zwei Halbvektoren (B). Nach PvuI-Verdau (C) entstehen überstehende Enden, die eine gerichtete Ligation ermöglichen (D).

Der zweite Halbvektor (schwarze Pfeile) wurde mittels der entsprechenden *Reverse-Primer* über eine Vervielfältigung in 5'-Richtung erzeugt (revHis3, revStat, revCecA und revpPI). Die dazugehörigen *Forward-Primer* binden ebenfalls an der PvuI-Schnittstelle (PvuI_{fwd}). Für die PCR wurde die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase verwendet, die Produkte mit glatten Enden generiert. Beide Halbvektoren wurden mit PvuI geschnitten, sodass an der jeweils anderen Seite des Halbvektors ein überstehendes Ende erzeugt wird. Nach Phosphorylierung erleichtern die unterschiedlichen Enden eine korrekte Orientierung bei der Ligation beider Halbvektoren.

2.2.2.1. Polymerasekettenreaktion

Für die Synthese der Halbvektoren wurde als Polymerase für die Polymerasekettenreaktion (PCR) die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase verwendet, eine robuste Polymerase mit sehr geringer Fehlerrate, die glatte Enden generiert. Die genutzten unmodifizierten *Primer* stammten von MWG. Für einen PCR-Ansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA, je 50 pmol *Forward-* bzw. *Reverse-Primer*, je 10 mM dNTPs, 10 µl *Phusion* HF Puffer (5x) und 2 U *Phusion*

Polymerase eingesetzt. Das PCR-Programm wurde an dem *Thermocycler Gene Touch* (Bio ER) durchgeführt und ist in Tab. 1 und Tab. 2 dargestellt.

Anzahl der Zyklen	PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1x	Initiale Denaturierung	98°C	30 s
30x	Denaturierung	98°C	10 s
	<i>Annealing</i>	60°C	30 s
	Elongation	72°C	20 s
1x	Finale Extension	72°C	5 min

Tab. 1: PCR-Programm Proteine ohne Signalsequenz.

Anzahl der Zyklen	PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1x	Initiale Denaturierung	98°C	30 s
30x	Denaturierung	98°C	10 s
	<i>Annealing</i>		30 s
	pPI78mer	51°C	
	pPI120mer, pPI160mer	54°C	
	pPI190mer	54°C	
	Elongation	72°C	20 s
1x	Finale Extension	72°C	5 min

Tab. 2: PCR-Programm pPI-Verkürzungsvarianten.

2.2.2.2. Restriktionsverdau

Nach Überprüfung der PCR-Produkte im Agarosegel mittels Größenstandard wurden diese mit dem NucleoSpin Gel und PCR *Clean-up* Kit (Macherey-Nagel) entsprechend Herstellerangaben gereinigt und in einer Konzentration von 500 ng zusammen mit dem dazugehörigen Puffer und 2,5 µl *FastDigest* Restriktionendonuklease (2,5 U; Thermo Scientific) in den Restriktionsverdau eingesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Auftrennung der Spaltprodukte im 0,8%-igen Agarosegel. Die gesamte verdaute DNA wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und erneut aufgereinigt (NucleoSpin Gel und PCR *Clean-up* Kit). Die Elution erfolgte mit H₂O.

Zur Herstellung von Proteinen ohne Signalsequenz wurde für den Restriktionsverdau die Restriktionendonuklease PvuI verwandt (s. 2.2.2).

Für eine Linearisierung von pDNA wurden die Restriktionendonukleasen NheI oder PstI entsprechend eingesetzt (s. 2.2.8).

2.2.2.3. Phosphorylierung

Die T4 Polynukleotidkinase (PNK, Thermo Scientific) ermöglicht durch Phosphorylierung am freien 5'-OH-Ende der Desoxyribose der Halbvektoren deren Ligation. Für einen 25 µl Ansatz wurden 100 ng je geschnittenem Halbvektor und 10 U PNK eingesetzt. Der Ansatz wurde im *Rapid Ligation Buffer* unter Zugabe von 1 mM ATP bei 37°C für 30 min inkubiert. Es folgten 10 min bei 75°C.

2.2.2.4. Ligation

Zur Ligation der beiden phosphorylierten Halbvektoren wurden diese im Verhältnis 1:1 eingesetzt und mit 5 Weiss U T4 DNA Ligase versetzt. Die Ligation lief in 1x *Rapid Ligation Buffer* 15 min bei Raumtemperatur ab.

2.2.3. Plasmid-Transformation in *Escherichia coli*

Zur Transformation der ligierten Halbvektoren wurden 100 µl chemokompetente *Escherichia coli* (*E.coli*) *XL1-blue* Zellen (vom Institut zur Verfügung gestellt) mit 10 µl Ligationsansatz versetzt. Nach einer Minute Inkubation bei 0°C erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für ebenfalls eine Minute, gefolgt von einer weiteren Minute bei 0°C. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium hinzugefügt und der Transformationsansatz eine Stunde bei 37°C und 800 rpm kultiviert. Die Bakterien wurden im Folgenden auf LB-Ampicillin-Selektionsplatten (0,1 mg/ml Ampicillin) im Verhältnis 1/10 und 9/10 ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Überprüfung der Transformation erfolgte Aufreinigung und Restriktionsverdau der Plasmid-DNA ausgewählter Klone (s. dazu 2.2.2.2). Es wurden die Restriktionsenzyme PvuII und NheI verwandt. Verwies die Auftrennung der Spaltprodukte mittels eines 0,8%-igen Agarosegels auf eine erfolgreiche Klonierung, so wurde die Plasmid-DNA durch die Firma GATC Biotec AG sequenziert. Eine Auswertung der Sequenzen erfolgte abschließend mit der *Clone Manager Suite 7 Software* (Sci-Ed Software).

2.2.4. Klonierung und Überexpression von CaM-His₆

Die Klonierung in den Expressionsvektor pProExHTa erfolgte, um n-terminal ein His₆-Tag anzuhängen und Calmodulin in *E. coli* überzuexprimieren. Die Überexpression und Ni²⁺-NTA-Aufreinigung unter nativen Bedingungen des CaM-His₆-Konstrukts wurde für diese Arbeit von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Kalies durchgeführt. Die Umpufferung und Aufkonzentrierung erfolgte über einen Amicon® Ultra *Centrifugal* Filter in Retikulozytenlysat-Umpufferungspuffer (RP_U). Die Konzentration des CaM-His₆-Konzentrats wurde über einen BSA-Standard ermittelt. Anhand der Signale von 2 – 5 µg des BSA-

Standards ließ sich eine Regressionsgerade mit einem Korrelationsfaktor von $r^2=0,99$ erstellen. Daraus ließ sich eine mittlere Konzentration des CaM-His₆-Konzentrats von 90 µg/µl errechnen. CaM-His₆ in RP_U konnte direkt in die Translokationsexperimente eingesetzt werden.

2.2.5. Klonierung und Überexpression des MYLK2-His₆-Peptids

Die CaM-bindende Sequenz aus der *Myosin Light Chain Kinase 2* wurde in den Expressionsvektor pProExHTa kloniert und das Protein überexprimiert. Dadurch wurden der CaM-bindenden Sequenz von MYLK2 n-terminal 6 Histidine zugefügt (MYLK-His₆-Peptid). Die Klonierung in pProExHTa und Überexpression wurden für diese Arbeit von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Kalies durchgeführt. Da das MYLK-His₆-Peptid nach Überexpression nicht löslich vorlag, wurde das Peptid zunächst mit 8 M Harnstoff und 6 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) denaturiert in Lösung gebraucht. 500 µl mit RP_{Equ} equilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose wurde mit 7 mg denaturiertem MYLK-His₆-Peptid für zwei Stunden über ein Pumpsystem (LKB Pump P-1, Pharmacia) zyklisch beladen. Die Renaturierung des MYLK-His₆-Peptids an der Ni²⁺-NTA-Säule erfolgte durch sechs Waschschriffe mit Waschpuffern abnehmender Harnstoffkonzentration (RP_{W7U} – RP_{W0U}). Zur Überprüfung der Bindung wurde zum Schluss eine kleine Menge beladene *Beads* entnommen. Für die folgende Depletion des endogenen Calmodulins verblieben die MYLK-His₆-Peptide an der Ni²⁺-NTA-Säule.

2.2.6. Depletion des endogenen Calmodulins aus dem Retikulozytenlysat

Zur Depletion des RL wurden zunächst 2 ml RL mit 1 ml RP verdünnt. Es folgte eine zyklische Beladung der mit MYLK-His₆-Peptid beladenen Ni²⁺-NTA-Säule (s. 2.2.5) mit 3 ml verdünntem RL. Nach einer zyklischen Beladung von 2 Stunden wurde das geschlossene Pumpsystem geöffnet und der Durchfluss abgenommen. Dieser Durchfluss stellte das um CaM depletierte RL dar, welches für weitere Experimente eingesetzt wurde. Die Überprüfung der Depletion erfolgte mittels Western Blot Analyse. Nach Quantifizierung der detektierten Signale ergab sich eine verbleibende Restmenge von 3,7% endogenem Calmodulin im depletierten RL.

2.2.7. Bindung von *in vitro* synthetisierten Proteinen an CaM-His₆

Zur Untersuchung einer direkten Interaktion von den *in vitro* synthetisierten Proteinen (s. 2.2.8 und 2.2.9) mit (pHis3, ppCecA, pStat und pPI) und ohne Signalsequenz (His, CecA, Stat und PI) an rekombinantes CaM-His₆ wurden die Proteine zunächst im RL bei 25°C in 45 min synthetisiert. Die Ni²⁺-NTA-Agarose wurde mit 10 Säulenvolumen RP equilibriert. Für jeweils einen Bindungsansatz wurden im Anschluss 10 µl Ni²⁺-NTA-Agarose abgenommen. Parallel dazu wurde rekombinantes CaM-His₆ mit 10 mM Calcium versetzt und 20 µl RL-Translationsansatz mit 10 µl RP verdünnt. Dieses 30 µl RL-Puffer-Gemisch wurde mit Ca²⁺-

CaM-His₆ (50 µg) für 20 min bei 25°C vorinkubiert und anschließend auf die Ni²⁺-NTA-Agarose gegeben. Hier ist zu erwähnen, dass eine Variation des Versuchs darin bestand, dass die Ni²⁺-NTA-Agarose zuerst mit Ca²⁺-CaM-His₆ beladen wurden und dann das RL-Puffer-Gemisch auf die Säule gegeben wurde. Bei beiden Variationen folgte eine Inkubation von 1,5 h bei 4°C und 550 rpm (*Batch*-Verfahren; Thermomixer Comfort, Eppendorf). Der Reaktionsansatz wurde anschließend anzentrifugiert und die nicht gebundene Fraktion abgenommen. Es schloss sich ein zweimaliger Waschschrift mit je 10 Säulenvolumen RP an. Das potenziell an CaM-His₆ gebundene Protein wurde mit 10 µl RP_{Elu} eluiert. Dieser Elutionsschritt wurde dreimal wiederholt. Die Agarose *Beads* und Proben der Fraktionen wurden abschließend mit einem Säulenvolumen SDS-Probenpuffer auf 60°C für 10 min erhitzt. Nach Anzentrifugation der Agarose *Beads* wurde der Überstand abgenommen und zusammen mit den Proben der Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.2.8. *In vitro* Transkription

Zum besseren Ablauf der *in vitro* Transkription wurde die gewünschte pDNA zunächst mit dem entsprechenden *FastDigest*-Restriktionsenzym (NheI oder PstI) für 15 min bei 37°C mit je 5 µl Enzym pro 50 µl Ansatz linearisiert. Daran schloss sich die Aufreinigung mittels NucleoSpin Gel und PCR *Clean-up* Kit und die Messung der Konzentration über das *NanoDrop* Spektralphotometer an.

1 µg linearisierte pDNA wurde in die anschließende *in vitro* Transkription eingesetzt (50 µl Ansatz). Diese erfolgte unter Zugabe von 1x Transkriptionspuffer (mitgeliefert), 0,5 mM rNTPs, 10 mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 100 U RNasin und 10 – 20 U T7 RNA Polymerase für insgesamt 4 h unter zwischenzeitlicher zusätzlicher Gabe von 10 – 20 U T7 RNA Polymerase und 0,5 mM rNTPs. Die erhaltene mRNA wurde mit dem NucleoSpin RNA *Clean-up* Kit aufgereinigt, 2x mit je 25 µl RNase-freiem Wasser eluiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C verwahrt.

2.2.9. *In vitro* Translation

Für die zellfreie Proteinsynthese wurde Retikulozytenlysat (RL) oder Weizenkeimextrakt (WKE, Promega) verwandt. Um das RL von Membranen und aggregierten Proteinen zu klären erfolgte zunächst ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C (Eppendorf, 5417 R). Für einen 10 µl RL-Ansatz wurden 6 µl RL, 0,2 µl Aminosäuremix ohne Methionin (je Aminosäure 1 mM), 40 U RNasin und 0,3 µl [³⁵S]Methionin (0,1 MBq) eingesetzt. Bei der Verwendung des Weizenkeimextraktes wurden 5 µl WKE, 0,8 µl Aminosäuremix ohne Methionin mit der gleichen Menge an radioaktiv markiertem Methionin verwandt. Die optimale Menge an mRNA wurde zunächst über eine Titration bestimmt und liegt üblicherweise bei den hier durchgeführten Versuchen zwischen 0,5 µl – 1,5 µl pro Translationsansatz. Die Translation erfolgte bei 25°C für 45 min.

2.2.10. *In Vitro* Translokationsassays

2.2.10.1. *In vitro* Translokationsassay im Retikulozytenlysat

Für ein Translokationsexperiment unter cotranslationalen Bedingungen wurden dem in 2.2.9 beschriebenen Translationsansatz zusätzlich raue Mikrosomen zugeführt (0,3 – 0,5 eq/10 µl Ansatz). Dabei ist ein Äquivalent (eq) nach Walter *et al.* (1981 I) definiert als die Membranmenge, die bei 280 nm eine optische Dichte von 50 besitzt. Der gesamte Ansatz wurde bei 25°C 45 min inkubiert.

Für die Translokation unter posttranslationalen Bedingungen erfolgte vor der Zugabe der Mikrosomen die Inhibierung der Elongation mittels 1 mM Cycloheximid für 10 min auf Eis. Anschließend wurden die in dem Lysat enthaltenen Ribosomen bei 70.000 rpm für 30 min und 4°C abzentrifugiert (Beckman Coulter, Optima Max-XP Ultrazentrifuge, Rotor TLA 100) und dem geklärten 10 µl-Ansatz 3 – 5 eq Mikrosomen zugeben. Die posttranslationale Translokation lief zunächst 20 min auf Eis ab, gefolgt von einer Inkubation für 20 min bei 25°C.

Als Translokationskontrolle wurden sowohl die Hälfte der co- als auch die Hälfte der posttranslationalen Translokationsansätze mit einem Volumen Proteinase K (0,5 mg/ml in PP) für 30 min bei 15°C inkubiert. Die andere Hälfte des Ansatzes wurde mit einem Volumen PP versetzt und entsprechend behandelt. Durch diese Behandlung kann überprüft werden, ob das zu untersuchende Protein geschützt vor der Proteinase K in den Mikrosomen vorliegt. Die Reaktion wurde durch 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gestoppt. Zuletzt wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt, bei 60°C 10 min denaturiert und soweit erforderlich bei -20°C verwahrt. Sollten die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen werden, so wurden 20 % des ursprünglichen Translationsansatzes nach Ammoniumsulfatfällung oder 2,5 % des Ansatzes ungefällter Proben eingesetzt.

In den Versuchen mit pPI-Verkürzungsproteinen (s. Tab. 2) – hier pPI-Varianten mit fehlendem Stoppcodon auf mRNA-Ebene – lief die Translation je nach Ansatz in Ab- oder Anwesenheit von TFP (200 µM) ab. Zur Translokation wurden raue Mikrosomen (0,5 eq/10 µl Ansatz) zugegeben und für 10 min auf Eis und für weitere 10 min bei 25°C inkubiert. Es folgte eine Puromycin-Behandlung (2 mM) für 7 min bei 25°C. Nach Proteinase K-Kontrollverdau und PMSF-Inkubation wurde der Ansatz in 400 µl RP aufgenommen und bei 70.000 rpm für 10 min in Beckmann Reaktionsgefäßen mit entsprechenden Adaptern ultrazentrifugiert (Optima Max-XP Ultrazentrifuge, Rotor TLA 100.3). Die Probenpellets wurden mit SDS-Probenpuffer bei 80°C 10 min denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zur Untersuchung des Einflusses einer ansteigenden Menge von unprogrammierten 80S-Ribosomen auf die Translokation von pPI-Verkürzungsvarianten, wurden diese direkt nach der Zugabe von rauhen Mikrosomen in die Translokationsansätze mit und ohne TFP (200 µM) titriert (120 – 960 nM/10 µl Ansatz). Sollte in diesem Zusammenhang zusätzlich der Einfluss von SRP untersucht werden, so wurde in Anwesenheit von TFP neben der Titration von 80S-Ribosomen ebenfalls SRP zu den Translokationsansätzen titriert (0 – 75 nM). Der

weiterer Ablauf der Translokation entspricht den Versuchen mit pPI-Verkürzungsproteinen (s.o.).

2.2.10.2. *In Vitro* Translokationsassay im Weizenkeimextrakt

Für eine *in vitro* Translokation im Weizenkeimextrakt erfolgte zunächst eine Hochsalz-Behandlung der Mikrosomen mit 500 mM KOAc und 15 mM Mg(OAc)₂.

Unter cotranslationalen Bedingungen wurde zum Translationsansatz, bestehend aus *in vitro* hergestellter mRNA, WKE, Aminosäuremix, RNasin, den hochsalzgewaschenen Mikrosomen (KRM; von AG Kalies zur Verfügung gestellt) und [³⁵S]Methionin, SRP (25 nM) zugegeben. Die Translation erfolgte bei 25°C 45 min, gefolgt von Proteinase K- und PMSF-Inkubation.

Unter posttranslationalen Bedingungen wurde zunächst *in vitro* translatiert, mit Cycloheximid die Translation gestoppt und die Ribosomen abzentrifugiert. Dem Translokationsansatz wurden dann sowohl KRM als auch SRP hinzugefügt. Nach der Translokation erfolgte auch hier die Behandlung mit Proteinase K und PMSF.

Bei der Durchführung von Translokationsexperimenten mit pPI-Verkürzungsvarianten in An- und Abwesenheit von TFP wurde TFP in einer Konzentration von 400 µM eingesetzt. Der weitere Ablauf der Experimente entsprach den Experimenten mit Verkürzungsproteinen im RL (s. 2.2.10.1).

2.2.11. Ammoniumsulfatfällung

Sollten die Proteine aufkonzentriert und/oder die Translokationsansätze von Globin aus dem RL befreit werden, so wurden die Proben nach Proteinase K- und PMSF-Inkubation mit Ammoniumsulfat gefällt. Dazu wurden die 10 µl-Ansätze mit 100 µl 60%iger Ammoniumsulfatlösung versetzt und nach 10-minütiger Inkubation auf Eis 45 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf, 5415 R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in weiteren 55 µl 60%iger Ammoniumsulfatlösung resuspendiert. Es schloss sich ein weiterer 45-minütiger Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm und 4°C an. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 60°C 10 min erhitzt.

2.2.12. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 60°C (bei der Verwendung von pPI-Verkürzungsproteinen bei 80°C) erhitzt und die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) angewandt. Je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine wurden SDS-Tris-Glycin-Gele (12,5% Acrylamidanteil), Tricinegele (nach Schagger & Jagow (1987); 13% Acrylamidanteil), Criterion Tris-Tricine Gele der Firma Biorad oder NuPAGE-Gele der Firma Life

Technologies (Bis-Tris, 4-12% Acrylamidanteil) eingesetzt. Nach der Auftrennung wurden die Proteine durch 20-minütige Inkubation mit 15%iger Essigsäure fixiert und die Gele anschließend in drei Waschsritten à 10 min gewässert. Als nächstes wurden die Gele getrocknet, sodass sie zur Detektierung der radioaktiven Signale mit dem Phosphoimager (FLA-3000/CR-35 Bio) auf *Image Plates* aufgelegt werden konnten. Als Analyseprogramm wurde im Anschluss die *AIDA Image Analyzer Software* verwendet.

2.2.13. Western Blot und immunochemische Detektion von Proteinen

Um eine immunologische Detektion der aufgetrennten Proteine zu erzielen, wurden das Gel, *Blotting*-Papier und Membranen (Nitrocellulose- oder PVDF-Membran) in Blotpuffer nach Towbin (1979) vorinkubiert. Bei Verwendung von PVDF-Membranen wurden diese zu Beginn in Methanol aktiviert. Die Proteine wurden nach dem *Semi-Dry*-Prinzip mit einer Stromstärke von 2 mA/cm^2 für 54 min aus dem Gel auf die Membran übertragen. Nach einer einstündigen Behandlung mit Blockierungspuffer bei RT wurde die Membran über Nacht mit dem Erstantikörper bei 4°C inkubiert. Der Erstantikörper wurde 1:2.500 in PBS mit 5% Magermilchpulveranteil verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT folgte. Die IRDye800®-Sekundärantikörper wurden 1:10.000 in PBS angesetzt und die POD-Sekundärantikörper 1:10.000 in PBS mit 5% Magermilchpulveranteil. Der Sekundärantikörper wurde durch erneutes dreimaliges Waschen der Membran mit TBST entfernt. Zur Detektion der Signale wurde die Membran zuletzt einmal mit H₂O gewaschen und unter der Verwendung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern mit dem *Odyssey Infrared Imaging System* gescannt. Wurden hingegen POD-gekoppelte Antikörper verwendet, so wurden nach Inkubation mit 1 ml ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*, Luminol und Oxidationsreagenz) die Proteinsignale mit einer CCD-Kamera LAS-1000 detektiert.

2.2.14. Präparation von Mikrosomen

Für die Präparation von Mikrosomen wurde nach Walter und Blobel (1983) das Pankreas aus Hund oder Schaf zügig nach Eintritt des Todes entnommen und zunächst von größeren Gefäßen und Fett gesäubert. Nach einer groben Zerkleinerung folgte eine gleichmäßige Homogenisierung mittels maschinellern Pottern. Daran schloss sich der erste Zentrifugationsschritt für 10 min bei 3.000 rpm und 4°C an (Beckman Coulter, Avanti J-20 XPI, JA-14). Während Zelltrümmer verworfen wurden, wurde der Überstand erneut 10 min bei 8.100 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman Coulter, Avanti J-20 XPI, JA-14). Der daraus resultierende Überstand wurde zuletzt durch ein Saccharosekissen (1,3 M) für 3,5 Stunden bei 45.000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert (Beckman Coulter, Optima L-90K, Type 45Ti). Die pelletierten Mikrosomen wurden vorsichtig in Membranpuffer resuspendiert und die Absorption bei 280 nm in 1% SDS gemessen. Eine optische Dichte von 50 bei 280 nm

entspricht dabei einer Konzentration von 1 eq/ μ l (Walter *et al.*, 1981 I). Schockgefroren durch flüssigen Stickstoff wurden die Mikrosomen bei -80°C gelagert.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von SRP auf die co- und posttranslationale Translokation von kleinen, sekretorischen Säugerproteinen in das Endoplasmatische Retikulum

3.1.1. SRP unterstützt die Translokation von kleinen, sekretorischen Säugerproteinen

Der sekretorische Weg von Proteinen beginnt mit ihrer Translokation über den Sec61-Kanal in das Endoplasmatische Retikulum (ER) (Rapoport, 2007). In höheren Eukaryonten dominiert der cotranslationale Transportweg, bei dem das *Signal Recognition Particle* (SRP) an die hydrophobe Signalsequenz der naszierenden Ketten bindet und so der Ribosom-naszierende-Kette (RNC)-Komplex zur ER-Membran an den Sec61-Kanal dirigiert wird. Lange entsprach es der allgemeinen Lehrmeinung, dass insbesondere kleine Proteine, wie z.B. das PräprocecropinA, ausschließlich über den posttranslationalen Transportweg SRP- und Ribosomen-unabhängig zu der ER-Membran gelangen (Lakkaraju *et al.*, 2012, Schlenstedt *et al.*, 1992; Schlenstedt & Zimmermann, 1987; Shao & Hegde, 2011). Von diesen besonders kurzen Proteinen wurde angenommen, dass das Zeitfenster zur Interaktion zwischen Signalsequenz und SRP zu kurz ist.

Ergebnisse einer Dissertation dieser Arbeitsgruppe deuten dennoch darauf hin, dass auch sehr kurze Proteine ($\leq 7,7$ kDa; ≤ 65 AS) cotranslational in das ER transportiert werden können (Dissertation Vivica Stokes, 2011). Dies wirft die Frage auf, ob SRP eine Rolle in dem *Targeting* solcher kurzen Proteine spielt und ob es sich um eine SRP-abhängige cotranslationale Translokation handelt.

Um die Frage nach einer Abhängigkeit von SRP im cotranslationalen Transport von insbesondere kleinen Proteinen in das ER untersuchen zu können, wurde ein zellfreies Translations- und Translokationssystem gewählt, indem endogenes SRP als *Targeting-substanz* nicht zur Verfügung steht. Unter diesen Voraussetzungen kann genau beobachtet werden, ob eine exogene Zugabe von SRP einen Effekt auf die Translokation dieser kleinen Proteine hat. Das für die von Stokes durchgeführten Translokationsversuche verwendete Retikulozytenlysat mit endogenem Säuger-SRP brachte diese Eigenschaft nicht mit. Aufgrund dessen wurde hier der Weizenkeimextrakt (WKE) als zellfreies System ausgewählt. Dieser bietet den Vorteil, dass Weizenkeim-SRP nicht an Säuger-SRP-Rezeptoren bindet. Zudem wurden Hochsalzgewaschene Schafsmikrosomen (SKRM) eingesetzt. Eine vorausgehende Behandlung der Mikrosomen mit Kalium- und Magnesiumacetat (500 mM KOAc, 15 mM $Mg(OAc)_2$) löst Schafs-SRP ab. Ob tatsächlich Translokationsbedingungen ohne funktionelles SRP vorlagen, wurde durch ein Kontrollexperiment mit pPI überprüft. pPI gilt als ein rein cotranslational transportiertes Protein (Gilmore *et al.*, 1982 I, und II) und benötigt zwingend

SRP für seine Translokation. Ein cotranslationaler Transport von pPI im WKE mit SKRM sollte demnach nicht möglich sein. Erst durch das Zufügen von exogenem SRP sollte pPI translozierbar sein.

Zur Durchführung des Kontrollexperiments erfolgte eine *in vitro* Synthese und Translokation des pPI im WKE in Anwesenheit von radioaktivem Methionin, 0,5 eq Schafsmikrosomen und exogenem SRP. Als eine Kontrolle der Translokation gilt der Proteinase K-Verdau. Das Enzym baut dabei jene Proteine ab, welche nicht ins ER transportiert wurden. Ist hingegen prozessiertes Protein nach Proteinase K-Verdau zu detektieren, zeigt dies, dass es durch die ER-Membran vor dem Enzymabbau geschützt wurde. Nach der Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese wurden die radioaktiven Signale mit einem Phosphoimager aufgenommen und mit dem Analyseprogramm AIDA quantifiziert. Eine erfolgreiche Translokation zeigt sich im Autoradiogramm durch eine zweite Proteinbande niedrigeren Molekulargewichts. Dies ist das um die Signalsequenz verkürzte und in das ER Lumen eingeschleuste Protein. Die Translokationseffizienz beläuft sich i. d. R. nicht auf 100%, das heißt nicht prozessiertes Protein ist ebenfalls vorhanden (gekennzeichnet durch ein „p“ vor dem Proteinnamen). Zur Quantifizierung wurden die Signalintensitäten der Proteinbanden des prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteins gemessen und ins Verhältnis zum Gesamtprotein pro Ansatz gesetzt ($\frac{\text{prozessiertes Protein} \times 100\%}{(\text{nicht prozessiertes Protein} + \text{prozessiertes Protein})}$). Die für das Säulendiagramm verwendeten Werte der Ansätze mit SKRM aber ohne exogenes SRP wurden gleich 100% gesetzt.

Das Kontrollexperiment mit pPI zeigte eine cotranslationale Translokation erst durch Zugabe von exogenem SRP (Abb. 8 A; Spur 5 und 6). Eine Translokation ohne exogenes SRP war nicht möglich (Abb. 8 A; Spur 3 und 4). Dieses Kontrollexperiment bestätigte somit, dass die Translokationsansätze frei von funktionellem SRP vorlagen und nur eine exogene Zugabe von SRP die Translokation ermöglichte.

Unter diesen Bedingungen ohne funktionelles endogenes SRP wurden auch die folgenden cotranslationalen Experimente mit den zu untersuchenden kleinen Säugerproteinen durchgeführt. Hierfür wurden die Substratproteine Prähistatin1 (pHis1, 60 AS), Prähistatin3 (pHis3) und Prästatherin (pStat) ausgewählt. Nach *in vitro* Synthese und Translokation mit radioaktivem Methionin in An- oder Abwesenheit von SKRM und exogenem SRP, wurde ein Teil der Ansätze mit Proteinase K behandelt und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse der Translokationsexperimente mit pHis1, pHis3 und pStat zeigten, dass durch die Zugabe von exogenem SRP (Abb. 8 B; Spur 5 und 6) die Translokationseffizienz aller drei Proteine unter cotranslationalen Bedingungen im Vergleich zu den Ansätzen ohne funktionelles SRP (Abb. 8 B; Spur 3 und 4) gesteigert werden konnte. Besonders deutlich fällt der Anstieg der Translokationsrate bei dem Substratprotein pStat auf. Im Gegensatz zu dem Kontrollprotein pPI ist in Abwesenheit von SRP bei den verwendeten kleinen Substratproteinen eine basale Translokationsrate zu verzeichnen. Dies bedeutet, dass auch ein SRP-unabhängiger Transport der untersuchten kleinen Säugerproteine möglich ist. Die Translokation kann jedoch nach Zugabe von SRP deutlich stimuliert werden. Vor dem Hintergrund, dass SRP eine Rolle in dem posttranslationalen Transport von einigen *tail anchored* Proteinen zugesprochen wurde (Abell *et al.*, 2004) und mit den hier verwendeten

Mikrosomen prinzipiell eine co- und posttranslationale Translokation ablaufen kann, kann zu diesem Zeitpunkt nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich bei dem offensichtlichen SRP-abhängigen Transport um einen cotranslationalen Transport handelt.

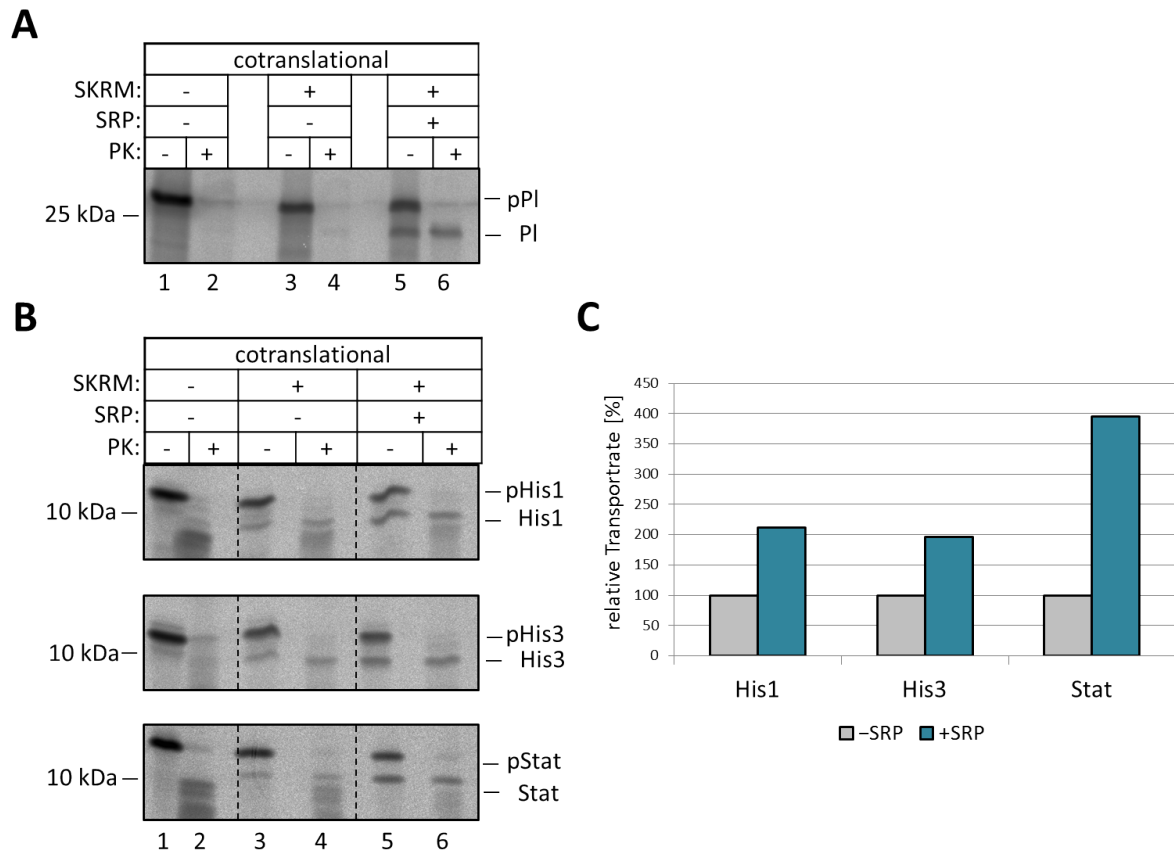


Abb. 8: SRP verbessert den Transport von kleinen sekretorischen Säugerproteinen.

Die *in vitro* Synthese und Translokation der Proteine pPI (A), pHis1, pHis3 und pStat (B) fanden im Weizenkeimextrakt (WKE) in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin und je nach Ansatz mit SKRM und exogenem SRP statt. Zur Kontrolle der Translokation wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Die Proteine in SDS-Probenpuffer wurden mittels Elektrophorese über Tricingele aufgetrennt und die radioaktiven Signale über einen Phosphoimager aufgenommen. Das Autoradiogramm wurde mit dem Analyseprogramm AIDA ausgewertet. C) Dabei wurde der Anteil des prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteins (Spur 4 und 6) am Gesamtprotein (z.B. His1 x 100% / (pHis1 + His1)) errechnet und der resultierende Wert unter den Bedingungen „mit Membranen aber ohne SRP“ (Spur 4) gleich 100% gesetzt (graue Säulen). SKRM: Hochsalz-gewaschene, raue Schafsmembranen, PK: Proteinase K, pHis1: Prähistatin1, pHis3: Prähistatin3, pStat: Prästatherin, pPI: Präprolaktin, SRP: *Signal Recognition Particle*

3.1.2. SRP unterstützt nicht die posttranslationale Translokation von kleinen, sekretorischen Proteinen

Da in dem vorherigen Experiment nicht entschieden werden konnte, ob es sich bei dem beobachteten SRP-abhängigen Transport der untersuchten kleinen Proteine um den co- oder posttranslationalen Transportweg handelt, wurde im Folgenden die Translokation der drei Substratproteine unter posttranslationalen Bedingungen durchgeführt. Der posttranslationale Transportweg unterscheidet sich von dem cotranslationalen Transportweg darin, dass die Peptide bereits fertig synthetisiert im Zytosol vorliegen und die meisten freien Peptidketten Ribosomen- und SRP-unabhängig zu der ER-Membran gelangen (zusammengefasst in Johnson *et al.*, 2013). Durch eine Inhibierung der Translation mittels Cycloheximid und Abzentrifugation der Ribosomen bietet ein posttranslationaler Versuchsassay den Vorteil, dass ein parallel ablaufender cotranslationaler Transport nicht mehr möglich ist und es sich somit um reine posttranslationale Transportbedingungen handelt.

Zur Erzeugung von Bedingungen für ein reines posttranslationales Translokationsexperiment wurden die Ansätze nach der Translation mit [³⁵S]Methionin zunächst mit Cycloheximid behandelt, um eine Elongation der naszierenden Kette zu verhindern. Zudem wurden die Ribosomen durch Ultrazentrifugation sedimentiert und verworfen. Dem Überstand wurde zur Translokation je nach Ansatz Schafsmikrosomen und SRP zugefügt. Die Translokationskontrolle durch eine Proteinase K-Behandlung sowie die Detektion und Auswertung der radioaktiven Signale erfolgte entsprechend dem cotranslationalen Translokationsexperiment.

Da das Kontrollprotein pPI ein rein cotranslational transportiertes Protein ist, konnte unter posttranslationalen Bedingungen, wie erwartet, keine Translokation ohne oder mit Zugabe von exogenem SRP detektiert werden (Abb. 9 A; Spur 3 und 4, 5 und 6). Es konnte hingegen eine basale posttranslationale Translokation bei allen drei untersuchten Substratproteinen beobachtet werden. Die posttranslationale Translokationsrate ließ sich durch Zugabe von exogenem SRP bei den Substratproteinen pHis1 und pHis3 nicht steigern. Lediglich bei pStat konnte ein geringer Anstieg des Anteils der prozessierten Proteine verzeichnet werden. Vergleicht man jedoch die stimulierenden Effekte durch exogene SRP-Gabe unter cotranslationalen Bedingungen mit den Beobachtungen aus dem posttranslationalen Translokationsexperiment, so kam es zu einer deutlich geringeren Steigerung der Translokationsrate von pStat unter posttranslationalen Bedingungen.

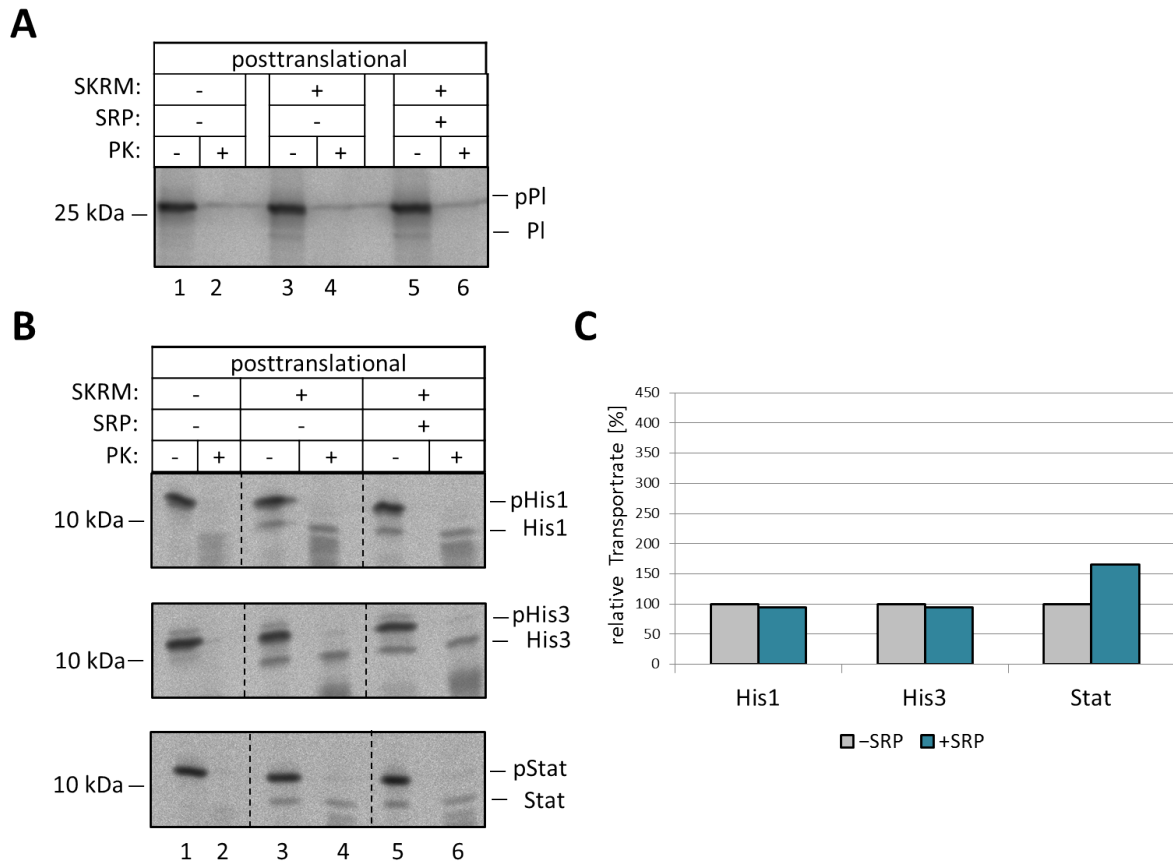


Abb. 9: SRP hat keinen Einfluss auf den posttranslationalen Transport von kleinen sekretorischen Säugerproteinen.

A) und B) Die *in vitro* Synthese von pPI, pHis1, pHis3 und pStat erfolgte im Weizenkeimextrakt (WKE) in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin. Die Ansätze wurden mit Cycloheximid behandelt und die Ribosomen mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und verworfen. Je nach Probe wurde dem Ansatz SKRM und SRP hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation zur Translokation der Proteine. Die Translokationskontrolle erfolgte über einen Proteinase K-Verdau. Die Gelelektrophorese erfolgte mit Tricingelen. Die Proteinsignale wurden mit einem Phosphoimager aufgenommen und mit der AIDA-Software analysiert. C) Der Anteil des prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteins (Spur 4 und 6) wurde am Gesamtprotein (z.B. His1 x 100% / (pHis1 + His1)) errechnet. Der Anteil des prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteins in dem Ansatz „mit Membranen aber ohne SRP“ (Spur 4) wurde gleich 100% gesetzt (graue Säulen). SKRM: Hochsalz-gewaschene, raue Schafsmembranen, PK: Proteinase K, pHis1: Prähistatin1, pHis3: Prähistatin3, pStat: Prästatherin, pPI: Präprolaktin, SRP: *Signal Recognition Particle*

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Substratproteine pHis1 und pHis3 SRP-unabhängig posttranslational transportiert wurden. Die beobachtete Stimulation durch exogenes SRP unter cotranslationalen Bedingungen ist demnach auf einen SRP-abhängigen cotranslationalen Transport zurückzuführen. Für das Substratprotein pStat kann ein SRP-anhängiger posttranslationaler Transport nicht ausgeschlossen werden. Da der cotranslationaler Transport durch exogene SRP-Gabe jedoch stärker erhöht werden konnte, spricht dies ebenfalls für einen SRP-abhängigen cotranslationalen Transport von pStat.

3.1.3. Die Erhöhung der cotranslationalen Translokationsrate durch SRP setzt eine Mindestlänge von 46 Aminosäuren voraus

Nachdem gezeigt wurde, dass auch kleinere Proteine SRP-abhängig cotranslational ins ER transportiert werden können, stellte sich die Frage nach einer Proteinmindestlänge zur Interaktion mit SRP. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Substratprotein ausgewählt, welches in den vorherigen Untersuchungen eindeutig SRP-unabhängig posttranslational und SRP-abhängig cotranslational transportiert wurde. In den folgenden Experimenten wurden somit pHis3-Verkürzungsvarianten erzeugt, indem von dem Protein pHis3 mit 54 AS ausgehend um je 4 AS verkürzte Varianten hergestellt wurden (50mer – 38mer).

Da in diesem Experiment Hunde-Mikrosomen verwendet wurden, wurde die Überprüfung der cotranslationalen Translokationsbedingungen ohne funktionelles SRP mit pPI im WKE ebenfalls unter Verwendung von mit Hochsalz-gewaschenen Hundemembranen (HKRM) durchgeführt (Abb. 10 C). Nach Proteinase K-Verdau und Auswertung der Signalintensitäten konnte auch hier keine cotranslationale Translokation von pPI ohne exogenes SRP beobachtet werden (Abb. 10 C; Spur 3 und 4). Eine Translokation wurde hingegen durch exogene Zugabe von SRP wieder möglich (Abb. 10; Spur 5 und 6). Dies bedeutete, dass die HKRM frei von funktionellen SRP waren.

Zur Untersuchung des Einflusses von SRP auf die cotranslationale Translokation der Prähistatin3-Varianten wurden diese *in vitro* im WKE zusammen mit HKRM und exogenem SRP synthetisiert und cotranslational transloziert. Die Überprüfung der Translokation der pHis3-Proteinvarianten erfolgte über den Verdau mit Proteinase K. Zur Quantifizierung der Translokationsraten wurden die Signale des prozessierten, Proteinase K-geschützten Proteins in Bezug zum Gesamtprotein (z.B. $\text{His1} \times 100\% / (\text{pHis1} + \text{His1})$) errechnet. Das Autoradiogramm nach elektrophoretischer Auftrennung zeigte, dass eine Zunahme der Translokationsraten für die His3-Varianten 54mer bis einschließlich 46mer unter Zugabe von exogenem SRP beobachtet werden konnte (Abb. 10 A; Spur 5, 6, 11, 12, 17 und 18). Ab einer Länge von ≤ 42 AS konnte kein translokationssteigernder Einfluss von SRP auf den cotranslationalen Transport beobachtet werden (Abb. 10 A; Spur 23, 24, 29 und 30). Bei der nächsten Verkürzungsstufe (38mer) ließ sich das prozessierte, Proteinase K-geschützte Protein nicht mehr ausreichend auftrennen, sodass zur Quantifizierung in diesem Falle die Signalintensitäten des prozessierten Proteins ohne Proteinase K im Ansatz herangezogen wurden (Abb. 10 A; Spur 27 und 29).

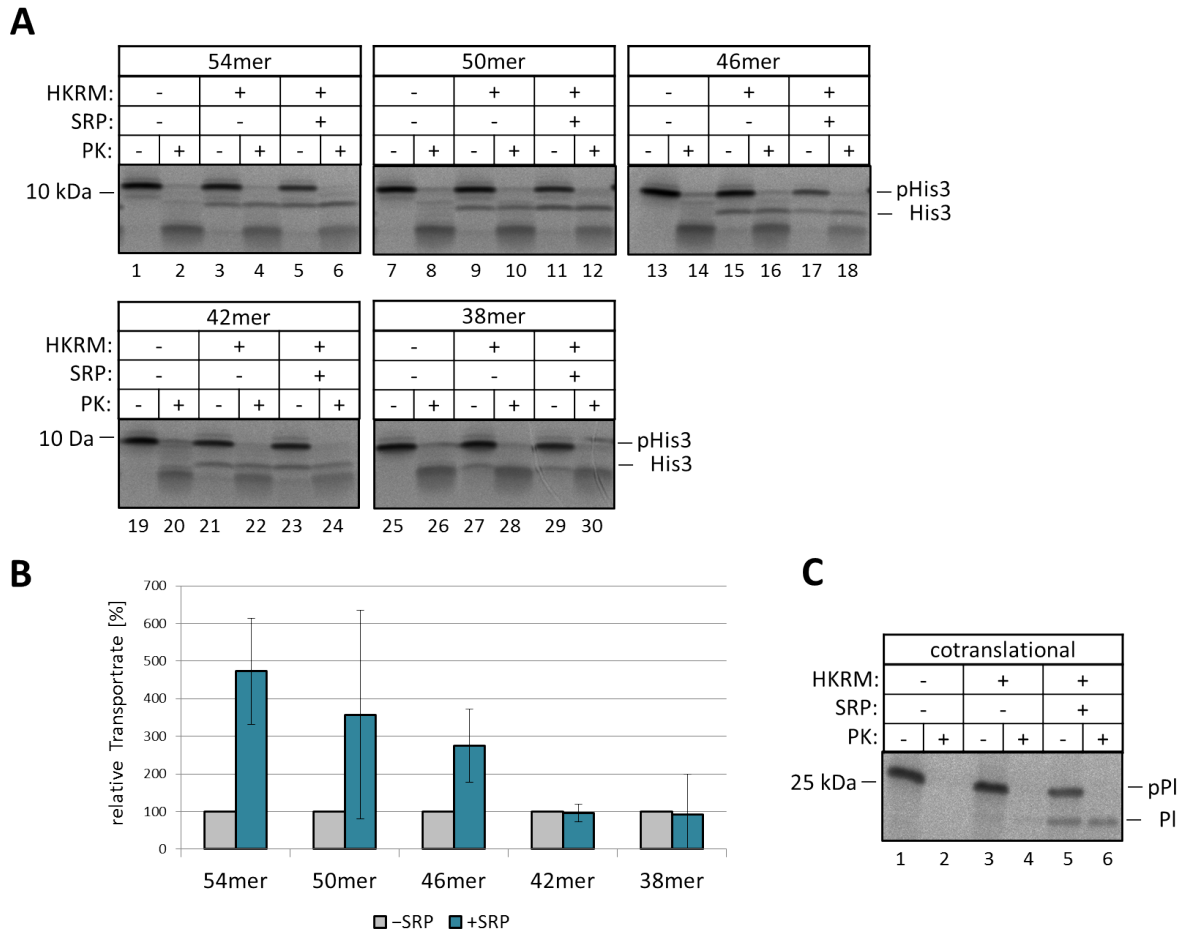


Abb. 10: SRP erhöht die Transportrate der cotranslationalen Translokation ab einer Proteinlänge von mindestens 46 AS.

A) Verkürzungsvarianten von Prähistatin3 wurden *in vitro* im Weizenkeimextrakt (WKE) mit [³⁵S]Methionin und teils Hochsalz-gewaschenen Hundemembranen (HKRM) und SRP synthetisiert und transloziert. Eine Translokationskontrolle erfolgte durch Proteinase K-Verdau. Die Auftrennung der in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proteine erfolgte im Criterion Tricingel. Die radioaktiven Signale wurden durch einen Phosphoimager ausgelesen und mit dem AIDA Programm quantifiziert. B) Der Anteil des prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteins in Anwesenheit von Membranen aber ohne SRP wurde anteilig am Gesamtprotein (His3 x 100% / (pHis3 + His3)) errechnet und auf 100% gesetzt (graue Säulen). Das Experiment erfolgte 3x (n = 3). C) Kontrolltranslokationsexperiment mit pPI und HKRM zur Überprüfung der Bedingungen ohne funktionelles SRP im WKE-Translokationssystem. Die Beschriftung „54mer“ bedeutet beispielhaft in dieser und den folgenden Abbildungen, dass es sich um Prähistatin3 mit 54 AS handelt. Die weiteren Abkürzungen dieser Art sind entsprechend zu verstehen. HKRM: Hochsalz-gewaschene, raue Hundemembranen, PK: Proteinase K, pPI: Präprolaktin, SRP: *Signal Recognition Particle*

Alle in diesem Experiment verwendeten Verkürzungsvarianten zeigten eine Translokation ohne funktionelles SRP und ohne exogenes SRP (Abb. 10 A; Spur 3, 4, 9, 10, 15, 16, 21, 22, 27 und 28). Bei allen getesteten Proteinvarianten liegt demnach eine „Grundtranslokation“ vor, bei der es sich wahrscheinlich um den SRP-unabhängigen posttranslationalen Transport handelt. Betrug die Proteinlänge aber 46 AS oder mehr, lief parallel dazu ein SRP-abhängiger Transportweg ab (cotranslationaler Transport). Für einen sehr wahrscheinlich SRP-abhängigen cotranslationalen Transport der His3-Verkürzungsvarianten kann demnach eine Proteinmindestlänge von 46 AS entdeckt werden.

3.1.4. Die posttranslationale Translokationsraten aller Proteinvarianten werden von SRP nicht beeinflusst

Durch die doch zum Teil erheblichen Verkürzungen des reifen Teils von pHis3, hatten sich die Ladungsverhältnisse innerhalb des Proteins mehr oder weniger verschoben. Je kürzer der reife Teil des Proteins, umso größer der Anteil der hydrophoben Signalsequenz im Verhältnis zur Gesamtsequenzlänge. Somit war es an dieser Stelle wichtig zu überprüfen, ob die hier verwendeten kleinen Proteinvarianten eine SRP-Abhängigkeit unter posttranslationalen Bedingungen aufweisen würden.

Die *in vitro* Synthese wurde im Weizenkeimextrakt in Anwesenheit von [³⁵S]Methionin durchgeführt. Für eine posttranslationale Translokation wurden die Translation mit Cycloheximid gehemmt und die Ribosomen aus dem Translationsansatz durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde aufgeteilt und je nach Ansatz mit SKRM und exogenem SRP versetzt. Nach der Translokation folgte zu deren Kontrolle eine Proteinase K-Inkubation. Nach Auftrennung der Proteine über ein Tricingel erfolgte die Aufnahme der radioaktiven Signale mit einem Phosphoimager. Das Autoradiogramm wurde mit dem AIDA Programm ausgewertet. Dabei wurden die Signale der um die Signalsequenz verkürzten und Proteinase K-geschützten Proteine prozentual zum Gesamtprotein (His3 x 100% / (pHis3 + His3)) des Ansatzes errechnet.

Im Gegensatz zur cotranslationalen Translokation der Verkürzungsvarianten konnten die Translokationsraten unter posttranslationalen Bedingungen durch Zufügen von SRP nicht gesteigert werden (Abb. 11 A; Spur 5, 6, 11, 12, 17, 18, 23, 24, 29 und 30). Dieses Resultat steht im Einklang mit den Ergebnissen der SRP-unabhängigen Translokation im posttranslationalen Transport des pHis3-Ausgangsproteins (Abb. 9 A und B). Es sei erwähnt, dass auch im posttranslationalen Translokationsexperiment die Auftrennung des prozessierten 38mer nicht mehr ausreichend war. Aufgrund dessen wurden zur Quantifizierung auch hier die Proteinbanden des prozessierten Proteins ohne Proteinase K im Ansatz herangezogen. Vermutlich ist der Anstieg der Translokationsrate des 38mer bei exogener SRP-Gabe eher auf die unzureichende Quantifizierung zurückzuführen, als auf eine SRP-Abhängigkeit. Das heißt, nach der Translation werden Prähistatin3-Varianten (54mer – 42mer) ins Zytosol abgegeben und gelangen ohne SRP zur ER-Membran. Die posttranslationale Translokation der getesteten pHis3-Verkürzungsvarianten 54mer – 42mer ist somit unbeeinflusst von SRP.

Die Ergebnisse zur SRP-Unabhängigkeit der posttranslationalen Translokation der hier getesteten His3-Proteinvarianten beweist demnach auch, dass der beobachtete Anstieg der Translokationsraten dieser Proteinderivate unter cotranslationalen Bedingungen auf einen SRP-abhängigen cotranslationalen Transport zurückzuführen ist. Dies steht im Einklang mit dem His3-Ausgangsprotein.

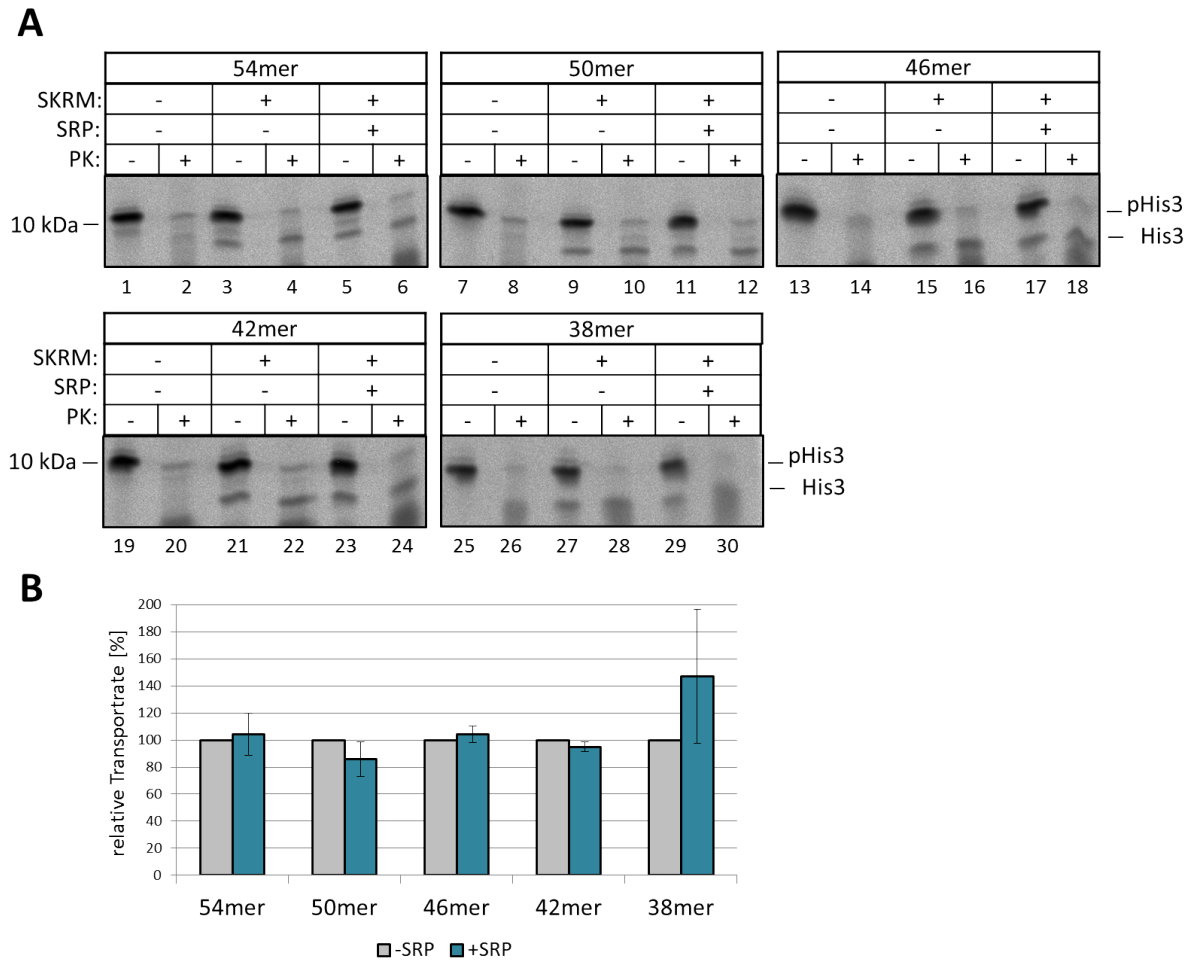


Abb. 11: SRP hat keinen Einfluss auf die posttranslationale Translokation von verkürzten Prähistatin3-Proteinvarianten.

A) Die *in vitro* Synthese der pHis3-Varianten erfolgte im Weizenkeimextrakt (WKE) mit radioaktiv markiertem Methionin. Um posttranslationale Bedingungen zu schaffen, wurde der Translationsansatz im Anschluss mit Cycloheximid behandelt und die Ribosomen durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde je nach Ansatz mit SRP und Hochsalz-gewaschenen Schafsmembranen versetzt und die Translokation anschließend mit einem Proteinase K-Verdau kontrolliert. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer erhitzt. Nachdem die radioaktiv markierten Proteine elektrophoretisch im Tricingel aufgetrennt wurden, erfolgte die Aufnahme der Signale mit dem Phosphoimager und die Quantifizierung über AIDA. B) Das prozessierte und Proteinase K-geschützte Protein wurde anteilig am Gesamtprotein ($\text{His3} \times 100\% / (\text{pHis3} + \text{His3})$) des Ansatzes berechnet. Wurden im Ansatz Membranen aber kein SRP zugegeben, so wurden die Werte gleich 100% gesetzt (graue Säulen). Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. SKRM: Hochsalz-gewaschene, raue Schafsmembranen, PK: Proteinase K, SRP: *Signal Recognition Particle*

Zu den Untersuchungen zum Einfluss von SRP auf die Translokation von kleinen sekretorischen Säugerproteinen kann zusammenfassend gesagt werden, dass ein Einfluss von SRP auf die cotranslationale Translokation der hier untersuchten kleinen Säugerproteine festgestellt werden konnte. Der cotranslationale Transport der Proteine Prähistatin1 und Prähistatin3 und wahrscheinlich auch der von Prästatherin läuft SRP-abhängig ab. Für die Interaktion von pHis3 mit SRP ist eine Proteinmindestlänge von 46 AS notwendig. Die Translokation von pHis1 und pHis3 unter posttranslationalen Bedingungen konnte im Gegensatz dazu nicht durch eine SRP-Zugabe gesteigert werden. Ein Einfluss von SRP auf die posttranslationale Translokation von pStat kann hingegen nicht mit Sicherheit

ausgeschlossen werden. SRP hat weder bei den *full length*-Proteinen pHis1 und pHis3 noch bei den pHis3-Verkürzungsvarianten (54mer – 42mer) einen Einfluss auf die posttranslationale Translokation. Wenn das *Targeting* der verwendeten Histatine zur ER-Membran unter posttranslationalen Bedingungen nicht durch SRP vollzogen wird, wirft dies die Frage auf, ob diese Funktion von einem anderen Protein ausgeübt wird.

3.2. Abhängigkeit der co- und posttranslationalen Translokation sekretorischer Säugerproteine von Calmodulin

3.2.1. Die sekretorischen Substratproteine interagieren mit CaM-His₆

Für einige ausgewählte Proteine wurden bereits posttranslational relevante *Targetingfaktoren* gefunden. Doch bislang ist es nicht gut verstanden, ob *Targetingfaktoren* eine generelle Funktion in dem posttranslationalen *Targeting* haben oder nur bestimmte Proteine diese Faktoren für ihren posttranslationalen Transport benötigen. Es konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Proteinen zu der ER-Membran unter posttranslationalen Bedingungen von unterschiedlichen *Targetingfaktoren* übernommen werden kann. Johnson *et al.* (2012) zeigte in diesem Zusammenhang, dass TRC40 in die posttranslationale Translokation des Insektenproteins ppCecA und der humanen Proteine pStat und pApelin involviert ist. Shao und Hegde (2011) wiesen Calmodulin eine Funktion in der Rekrutierung von ppCecA zu der ER-Membran nach. Nachdem in dieser Arbeit eine Involvierung von SRP als *Targetingsubstanz* bereits für die Substratproteine pHis1 und pHis3 ausgeschlossen werden konnte, wurde in den folgenden Experimenten die Rolle des Calmodulins als *Targetingfaktor* in der posttranslationalen Translokation von kleinen sekretorischen Säugerproteinen untersucht.

Die Sequenz des Calmodulins verfügt über einen Methionin-reichen Bereich, dessen flexible hydrophobe Seitenketten Substratproteine binden können. Eine ähnliche Methionin-reiche Bindungstasche existiert ebenfalls beim *Signal Recognition Particle* (Keenan *et al.*, 1998) wie auch bei Get3 (Mateja *et al.*, 2009), mit der eine Bindung zur Signalsequenz/Transmembrandomäne einhergeht. Die Studie von Shao und Hegde (2011) zeigte durch *Photo Crosslinking*-Experimente mit PräprocecropinA (ppCecA), einem Insektenprotein aus der Motte *Hyalophora cecropia*, dass eine Annäherung zwischen CaM und der Signalsequenz vorliegt und CaM ein bedeutender Bindungspartner für die Signalsequenz kleiner sekretorischer Proteine auf der zytosolischen Seite sein könnte.

Aufgrund des scheinbar bestehenden Bindungspotentials von CaM zu Signalsequenzen sollte zunächst im Folgenden überprüft werden, ob eine Bindung kleiner sekretorischer Proteine zum CaM nicht nur im Insektensystem, sondern auch im Säugersystem besteht. Stellt dabei die Signalsequenz bei Säugerproteinen das Bindungsmotif für CaM dar? Zur Validierung der Methode wurde neben den zu untersuchenden Proteinen Prähistatin3 (pHis3) und Prästatherin (pStat) auch stets das PräprocecropinA mitgeführt. Als ein zweites Kontrollprotein wurde das Präprolaktin in dieses Experiment mit aufgenommen, welches zum einen als streng cotranslational transportiertes sekretorisches Protein gilt und im Vergleich zu den bisher in dieser Arbeit verwendeten Proteinen einen längeren reifen Teil besitzt.

Um eine Bindung zwischen CaM und dem Substratprotein untersuchen zu können, wurde mit 6 Histidinen versehenes Calmodulin (CaM-His₆) rekombinant hergestellt und zur

weiteren Verwendung aufkonzentriert. Die Umpufferung erfolgte in Retikulozytenlysat-Umpufferungspuffer (RP_U). Die Konzentration des CaM-His₆-Konzentrats wurde im Coomassie-Gel über einen BSA-Standard ermittelt. Die Abb. 12 zeigt, dass das rekombinant hergestellte CaM-His₆ sowohl vor als auch nach der Konzentrierung hinreichend rein vorlag.

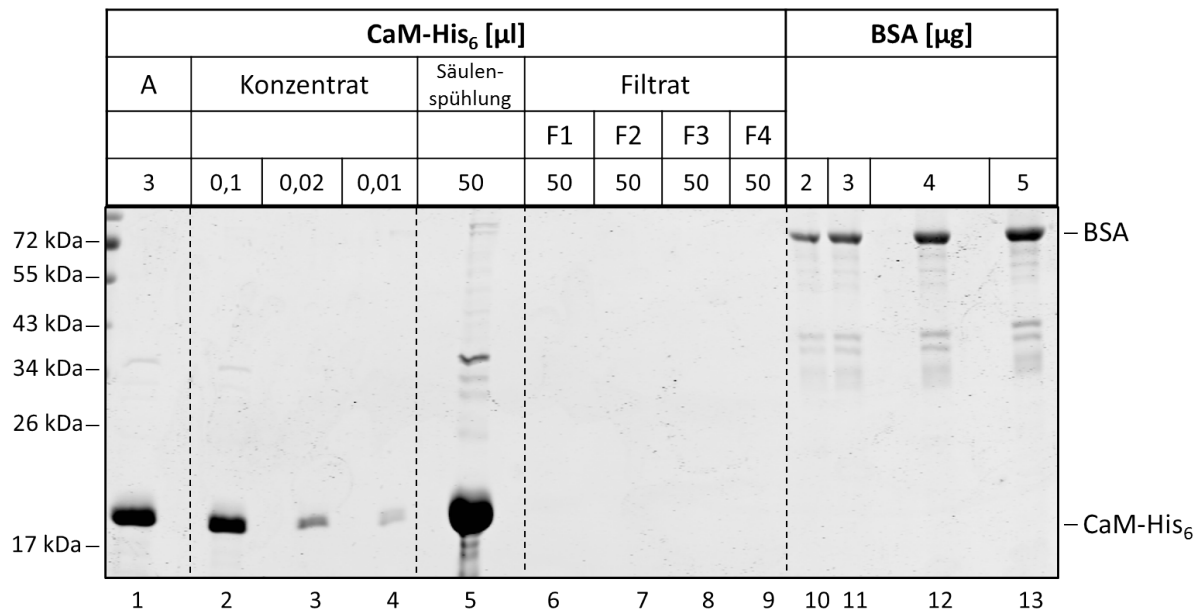


Abb. 12: Umpufferung und Aufkonzentrierung des überexprimierten CaM-His₆.

Die Umpufferung und Aufkonzentrierung von CaM-His₆ erfolgte mittels eines Amicon® Ultra *Centrifugal* Filters in Retikulozytenlysat-Umpufferungspuffer (RP_U). Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches mit Coomassie-Färbelösung angefärbt wurde. Die gefärbten Proteinbanden des Konzentrats wurden anhand eines BSA-Standards quantifiziert und die Konzentration des Konzentrats berechnet. A: Ausgang, BSA: *Bovine Serum Albumin*, CaM-His₆: rekombinantes, His-getaggttes Calmodulin

Ni²⁺-NTA *Beads* wurden im Weiteren mit Retikulozytenlysat-Puffer (RP) equilibriert und CaM-His₆ (50 μg/Ansatz) mit Ca²⁺ (10 mM) vorinkubiert (Ca²⁺CaM-His₆). Die zu testenden Proteine wurden *in vitro* in 20 μl Retikulozytenlysat (RL) mit radioaktiv markiertem Methionin synthetisiert. Der Translationsansatz wurde zur Vergrößerung des Volumens mit 10 μl RP verdünnt, mit Ca²⁺CaM-His₆ (+ CaM) versetzt und nach einer Inkubationsphase auf die equilibrierten Ni²⁺-NTA *Beads* (10 μl) gegeben. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Ca²⁺CaM-His₆ mitgeführt (- CaM). Die Bindung erfolgte in einem Thermomixer bei 550 rpm und ~4°C für 1,5 Stunden. Nach zweimaligem Waschen der Ni²⁺-NTA *Beads* mit RP erfolgte die Elution des potentiell an Ca²⁺CaM-His₆ gebundenen Proteins mittels 250 mM Imidazol. Die Proteine wurden durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinsignale mit einem Phosphoimager analysiert (Abb. 13 A, C, E und G). Die detektierten Signale der Ausgangsfraktion (A) wurden für die grafische Darstellung gleich 100% gesetzt (Abb. 13 B, D, F und H). Die Summe der Signale der Elutionen (E1 – E4) wurden zusammen mit der *Bead*-Fraktion (B) anteilig daran als gebundenes Protein berechnet. Der Anteil des in den Elutionsfraktionen und in der *Bead*-Fraktion detektierten Proteinsignals in Abwesenheit von Ca²⁺CaM-His₆ wurde mit dem entsprechenden Proteinsignal in Anwesenheit von Ca²⁺CaM-His₆ verglichen.

Wenn $\text{Ca}^{2+}\text{CaM-His}_6$ im Probenansatz anwesend war, zeigte die Auswertung, dass bei den untersuchten Substratproteinen durchgehend ein Anstieg der radioaktiven Signalintensitäten der gebundenen Proteine ($\Sigma(E_1, E_2, E_3, E_4, B)$) zu beobachten war (Abb. 13 A, C, E und G). Überraschend war die Zunahme der Bindung des Kontrollproteins pPI in Gegenwart

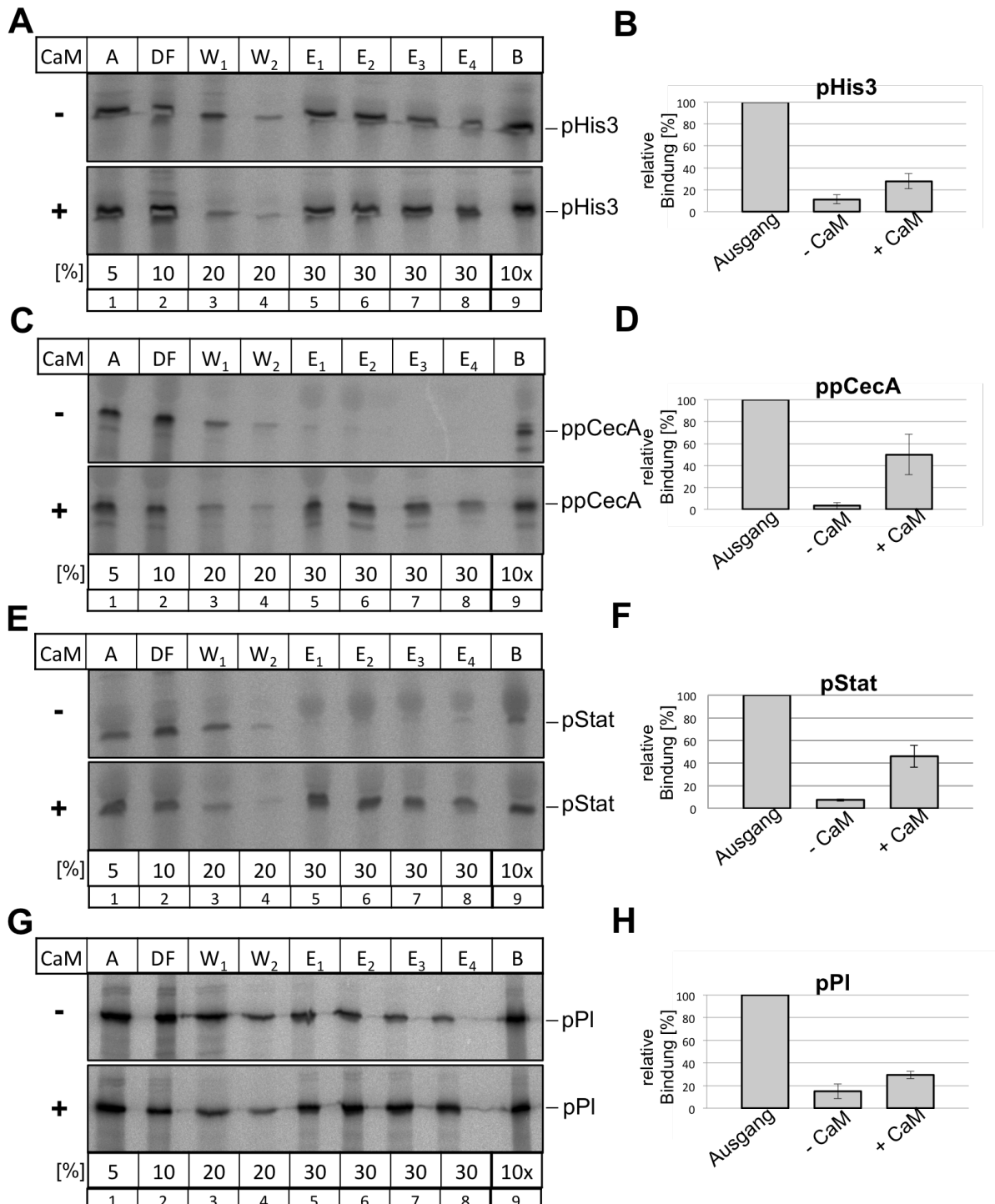


Abb. 13: *In vitro* synthetisierte sekretorische Säugerproteine binden an $\text{Ca}^{2+}\text{CaM-His}_6$.

A), C), E) und G) Um Ni^{2+} -NTA *Beads* mit zuvor rekombinant hergestellten, Histidin getaggtten CaM-His_6 wurde zu beladen, wurden die Ni^{2+} -NTA *Beads* mit Retikulozytenlysat-Puffer (RP) equilibriert. CaM-His_6 wurde mit Ca^{2+} inkubiert. Die gewünschten Proteine wurden jeweils *in vitro* im RL in Anwesenheit von [^{35}S]Methionin synthetisiert und anschließend teilweise mit $\text{Ca}^{2+}\text{CaM-His}_6$ vorinkubiert. Diese Ansätze mit und ohne $\text{Ca}^{2+}\text{CaM-His}_6$ wurden auf die equilibrierten Ni^{2+} -NTA *Beads* gegeben und inkubiert, bevor die Ni^{2+} -NTA *Beads* in einem weiteren Schritt mit RP gewaschen wurden. Die Proteine wurden von den *Beads* mit Imidazol (250 mM) eluiert

und diese sowie die übrigen Fraktionen anteilig in SDS-Probenpuffer erhitzt und über ein Tricingel aufgetrennt. B), D), F) und H) Die radioaktiven Signale der Ausgangsfraktion (A) wurden in der Grafik gleich 100% gesetzt. Die Summe der Signalintensitäten der Elutionen (E1 – E4) und der *Beads* (B) bildet den prozentualen Anteil des gebundenen Proteins im Bindungsexperiment ohne oder mit Ca^{2+} CaM-His₆. In den Diagrammen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen. A: Ausgang, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, E: Elution, B: *Beads*, CaM: rekombinantes, His₆-getaggttes, Ca^{2+} -inkubiertes Calmodulin, pHis3: Prähistatin3, ppCecA: PräprocecropinA, pStat: Prästatherin, pPI: Präprolaktin

von Ca^{2+} CaM-His₆, da pPI streng cotranslational transportiert wird und CaM bisher nur eine Rekrutierungsfunktion im posttranslationalen Transport zugesprochen wird (Abb. 13 G). Es scheint, dass CaM generell eine Affinität zu hydrophoben Signalsequenzen besitzt und dass die Länge des Proteins hierbei keine Rolle spielt. Ebenfalls auffallend ist eine starke Hintergrundbindung unter Ca^{2+} CaM-His₆-Bedingungen bei den Substratproteinen pHis3 und pPI (Abb. 13 A und G).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass neben dem reproduzierbaren Bindungseffekt des Insektenproteins ppCecA an Calmodulin (Abb. 13 C) auch eine Assoziation der getesteten Säugerproteine zu Ca^{2+} CaM-His₆ gezeigt werden konnte (Abb. 13 A, E und G).

Um die Frage zu beantworten, ob für die Bindung an Calmodulin die Signalsequenz verantwortlich ist, wurde das oben beschriebene Bindungsexperiment mit den Substratproteinen ohne Signalsequenz durchgeführt. Als Kontrolle wurde das entsprechende Protein mit Signalsequenz aufgetragen, um die Verschiebung hin zu einem geringeren Molekulargewicht der Konstrukte durch Entfernen der Signalsequenz zu visualisieren.

Bei allen vier untersuchten Proteinen konnte nach Abzug der Hintergrundsignale keine Erhöhung der Bindungskapazität in Anwesenheit von Ca^{2+} CaM-His₆ festgestellt werden (Abb. 14). Durch das Fehlen der Signalsequenz konnte offensichtlich keine Bindung zwischen dem an Ni^{2+} -NTA gebundenem Ca^{2+} CaM-His₆ und dem Substratprotein zustande kommen. Dies lässt den Schluss zu, dass auch bei den hier untersuchten Säugerproteinen die Signalsequenz das Bindungsmotif für Calmodulin darstellt.

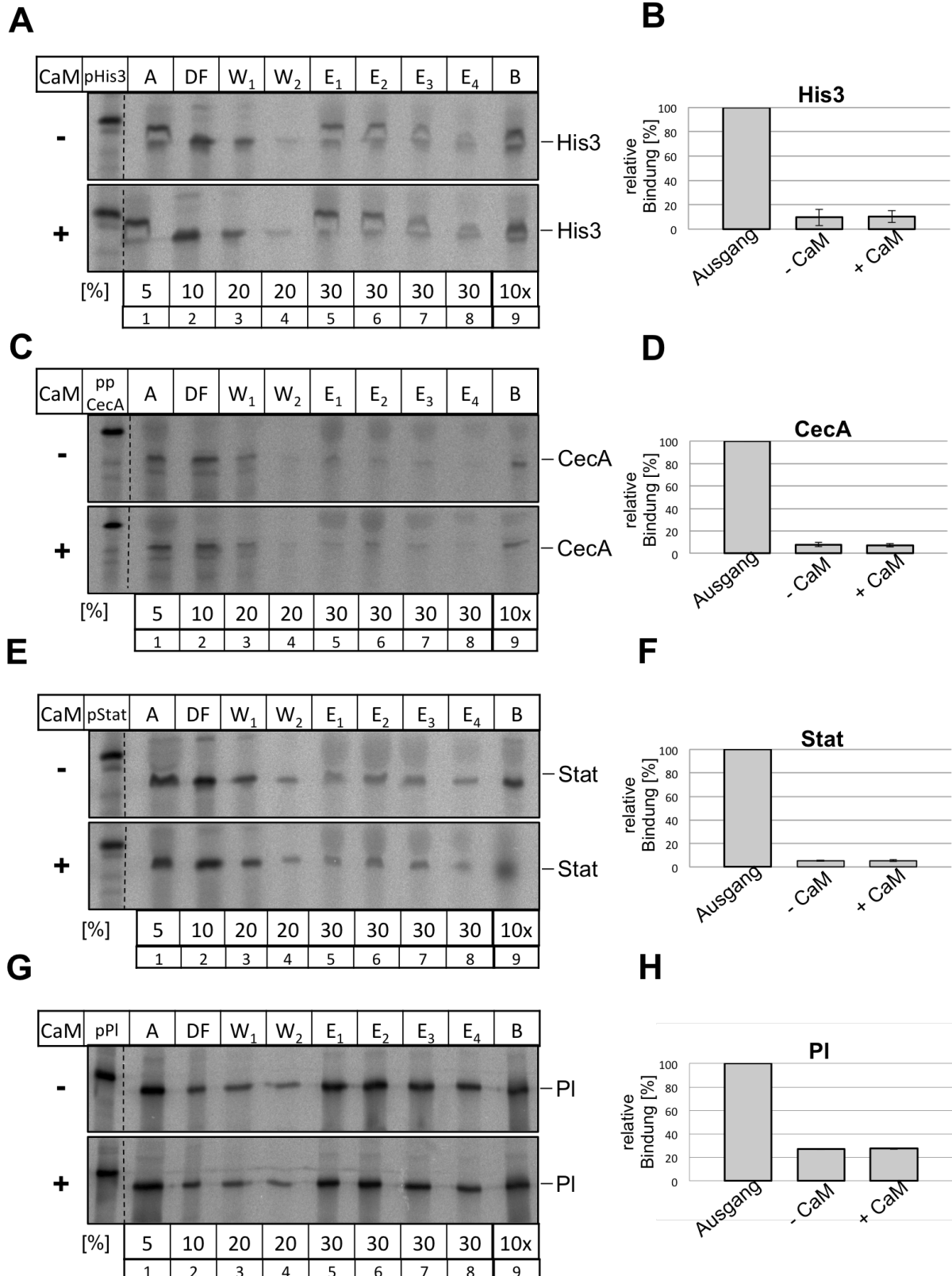


Abb. 14: *In vitro* synthetisierte sekretorische Säugerproteine ohne Signalsequenz binden nicht an Ca²⁺CaM-His₆. A), C), E) und G) Nach *in vitro* Synthese der sekretorischen Proteine ohne Signalsequenz im RL wurden die durch [³⁵S]Methionin radioaktiv markierten Proteine teils mit Ca²⁺CaM-His₆ vorinkubiert. Die Proben wurden auf zuvor equilibrierte Ni²⁺-NTA Beads gegeben. Die Beads wurden in einem nächsten Schritt mit RP gewaschen und die gebundenen Proteine durch Imidazol eluiert. Die Beads und übrigen Fraktionen wurden anteilig abschließend in SDS-Probenpuffer erhitzt und elektrophoretisch auf einem Tricingel aufgetrennt. B), D), F) und H) Für die Darstellung im Diagramm wurde das radioaktive Signal der Ausgangsfraktion (A) gleich 100% gesetzt und die Signalintensitäten der gebundenen Proteine, welche sich aus der Summe $\Sigma=(E_1+E_2+E_3+E_4+B)$ ergeben,

anteilig an A gezeigt. Die Experimente wurden unabhängig voneinander dreimal durchgeführt. Aus ihnen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. A: Ausgang, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, E: Elution, B: *Beads*, CaM: rekombinantes, His₆-getaggttes, Ca²⁺-inkubiertes Calmodulin, pHis3: Prähistatin3, ppCecA: PräprocecropinA, pStat: Prästatherin, pPl: Präprolaktin

3.2.2. Calmodulin hat einen gesteigerten Einfluss auf die posttranslationale Translokation von kleinen, sekretorischen Säugerproteinen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CaM prinzipiell auch mit der Signalsequenz der hier getesteten sekretorischen Säugerproteinen interagieren kann (s. 3.2.1), sollte im Weiteren der Frage nachgegangen werden, ob diese Interaktion essentiell für eine posttranslationale Translokation der eingesetzten Substratproteine ist.

Um zu untersuchen, ob eine zusätzliche exogene Gabe von rekombinantem CaM (ENZO Life Sciences) zu einer verbesserten posttranslationalen Translokationsrate führt, war ein Translokationssystem erforderlich, aus dem zuvor Calmodulin depletiert wurde. Die Depletion des Retikulozytenlysats erfolgte über eine CaM-bindende Sequenz der *Myosin Light Chain Kinase* (MYLK-Peptid). Die kodierende Sequenz wurde in den Vektor pProExHTa kloniert, um ein His₆-Tag anzuhängen, exprimiert und aufgereinigt. Bei der Aufreinigung zeigte sich, dass das MYLK-His₆-Peptid nicht löslich vorlag und mit 8 M Harnstoff und 6 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) in Lösung gebracht werden musste. Die Renaturierung des MYLK-His₆-Peptids erfolgte an Ni²⁺-NTA-*Beads* über sechs Waschschritte mit Waschpuffern abnehmender Harnstoffkonzentration (RP_{W7U} – RP_{W0U}) (Abb. 15; Spur 3 – 8).

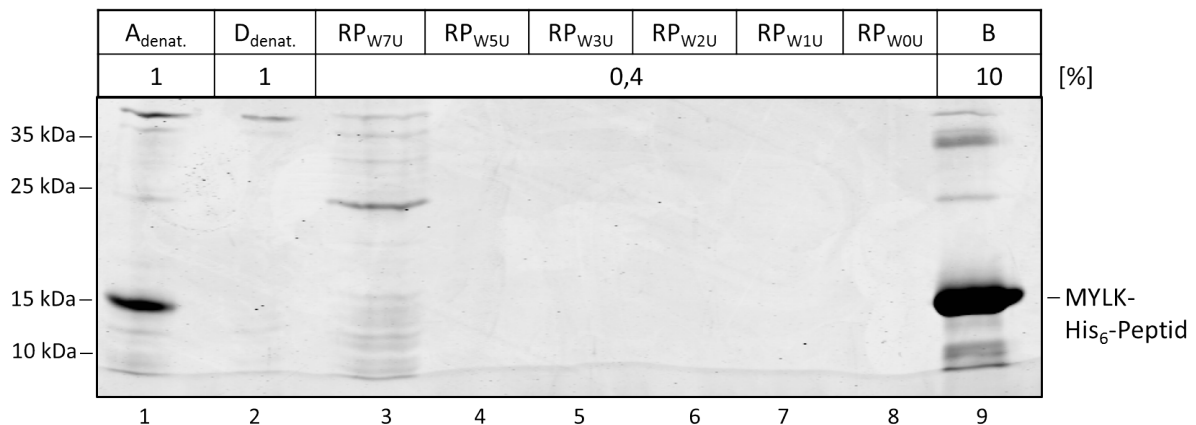


Abb. 15: Renaturierung des überexprimierten und denaturierten MYLK-His₆-Peptids.

Nach der Denaturierung von MYLK2-His₆ und Bindung an Ni²⁺-NTA-*Beads* erfolgte die Renaturierung an der Säule durch mehrmaliges Waschen der MYLK2-His₆-*Beads* mit Waschpuffern abnehmender Harnstoffkonzentration. A_{denat.}: denaturierter Ausgang; D_{denat.}: denaturierter Durchfluss; RP_{W7U} – RP_{W0U}: Retikulozytenlysats-Waschpuffer mit 7 M – 0 M Harnstoff; B: mit MYLK2-His₆-Peptid beladene *Beads*

Es folgte eine cyclische Beladung der mit MYLK-His₆-Peptid beladenen Ni²⁺-NTA-*Beads* mit RL. Nach 2 Stunden wurde das Pumpsystem geöffnet und der Durchfluss entnommen. Der Durchfluss stellte das um CaM depletierte RL dar. Um zu überprüfen, ob und wieviel endogenes Calmodulin nach der Depletierung im RL verblieben ist, erfolgte eine Western

Blot Analyse (Abb. 16). Dazu wurden Volumina von 1 – 40 μL nicht depletiertes RL und 10 – 40 μL depletiertes RL auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE analysiert. Das nicht depletierte Lysat wurde mock-behandelt und über nicht beladene Ni^{2+} -NTA-Beads gegeben. Die immunologische Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte über den anti-Calmodulin Erstantikörper und anti-Kaninchen-POD Zweitantikörper mittels ECL. Die Proteinsignale wurden mit einer LAS-1000 Kamera aufgenommen und im Anschluss mit dem AIDA Programm quantifiziert. Es wurden eindeutige Signale auf der Höhe des zu erwartenden Molekulargewichts von CaM (ca. 17 kDa) detektiert.

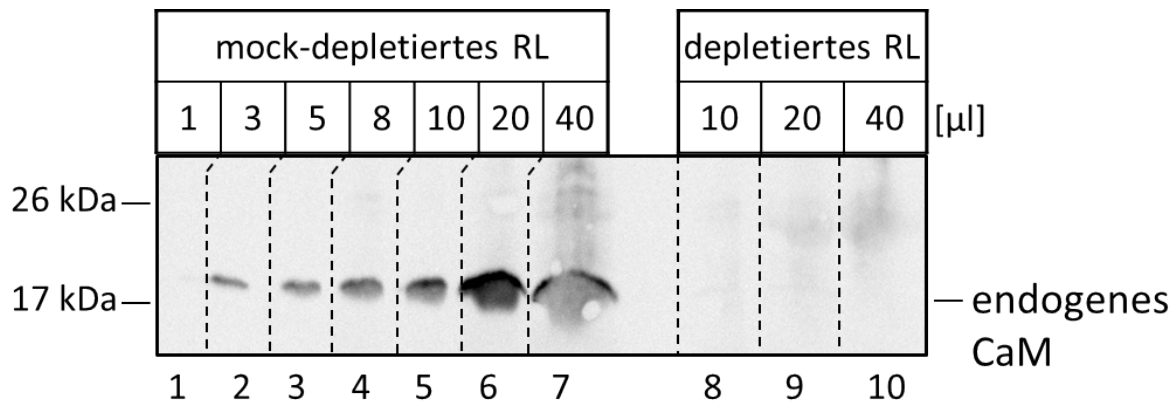


Abb. 16: Das Retikulozytenlysat kann von endogenem Calmodulin depletiert werden. Zur Überprüfung der Depletion von endogenem CaM aus dem RL, wurden die entsprechenden Volumina des depletierten RL und des mock-behandelten RL auf ein SDS-Tris-Glycin-Gel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer dieser Proteine erfolgte mittels Western Blot auf Nitrocellulosemembran. Die Immunodetektion erfolgte mit dem Erstantikörper gegen CaM (Abcam) gefolgt von der Inkubation mit dem anti-Kaninchen-POD Zweitantikörper (Sigma). Die Signale wurden mit einer LAS-1000 Kamera aufgenommen und mit dem Analyseprogramm AIDA ausgewertet.

In den Spuren mit depletiertem RL konnten keine CaM-Signale beobachtet werden (Abb. 16; Spur 8 – 10). Anhand der Signale von 3 – 10 μL nicht depletiertem Retikulozytenlysat ergab sich eine Regressionsgerade mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,99$ (Abb. 16; Spur 2 – 5). Hierüber ließ sich die verbliebende Menge an endogenem CaM im depletierten RL errechnen. Durch Extrapolation ergab sich eine Restmenge von durchschnittlich 3,7 %. Da ein Ergebnis durch Extrapolation zu ungenau erscheinen mag, wurde die Konzentration an CaM in 3 μL RL über die Regressionsgerade errechnet (Abb. 16; Spur 2). Die Proteinbande in Spur 2 ist das letzte detektierbare Signal vor der Nachweisgrenze des Antikörpers. Aufgrund dieser Berechnung ist weniger als 7% endogenes CaM in 40 μL depletiertem RL verblieben. Das depletierte RL wurde somit als von Calmodulin befreit angesehen.

Durch Nutzung des depletierten RL konnte im Folgenden untersucht werden, ob eine posttranslationale Translokation auch ohne CaM bzw. mit einer endogenen CaM-Konzentration unter 7% ablaufen und ob eine Zugabe von exogenem CaM die posttranslationale Translokationsrate steigern kann.

Dazu wurde eine *in vitro* Synthese von Prähistatin3 (pHis3), PräprocecropinA (ppCecA) und Prästatherin (pStat) in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin im depletierten RL durchgeführt. Das Insektenprotein PräprocecropinA wurde dabei erneut als Kontrollprotein

mitgeführt. Das rekombinante CaM wurde mit der dreifachen Menge an Ca^{2+} vorinkubiert (Ca^{2+} -CaM). Zur Herstellung von posttranslationalen Bedingungen wurde die Elongation der Polypeptidkette nach der üblichen Translokationszeit von 45 min durch Cycloheximid gestoppt und im Anschluss die Ribosomen des Translationsansatzes durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde je nach Ansatz mit 15 bzw. 60 μM Ca^{2+} -CaM versetzt. Ein Kontrollansatz ohne exogenes Ca^{2+} -CaM diente zum Vergleich. Nach kurzer Inkubation folgte die Zugabe von rauen Schafsmembranen (5 eq pro Ansatz). Die Überprüfung der Translokation erfolgte durch einen Verdau mit Proteinase K. Die Probenansätze wurden abschließend mit Ammoniumsulfat gefällt, um störende Retikulozyten-Proteine zu entfernen. Die Proteine wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die radioaktiven Signale wurden mit dem FLA-3000 Phosphoimager detektiert und mit dem Analyseprogramm AIDA quantifiziert. Dabei wurden die Signalintensitäten der prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteine ins Verhältnis zum Gesamtprotein (z.B. $\text{His3} \times 100\% / (\text{pHis3} + \text{His3})$) gesetzt und grafisch dargestellt (Abb. 17 B, D, F).

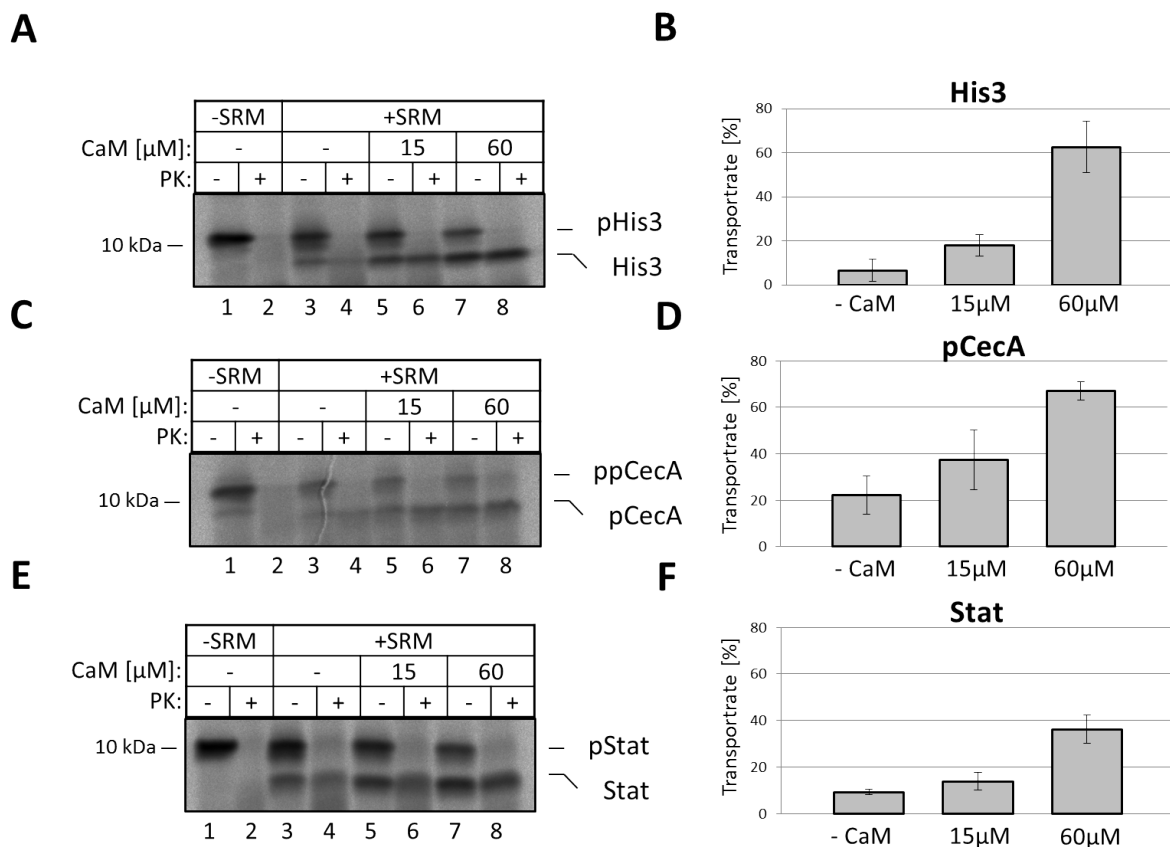


Abb. 17: CaM steigert die posttranslationale Translokation von kleinen sekretorischen Säugerproteinen.

A), C) und E) Zur Durchführung dieses Experiments wurde das von Calmodulin depletierte Retikulozytenlysate (RL) unter der Zugabe von radioaktivem Methionin verwendet. Für posttranslationale Bedingungen wurde nach der *in vitro* Synthese dem Translationsansatz 1 mM Cycloheximid zugefügt und anschließend die Ribosomen durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde je nach Ansatz mit 15 bzw. 60 μM Ca^{2+} -CaM inkubiert und darauffolgend mit 5 eq Schafsmembranen versetzt (A), C) und E) Spur 5 und 6 bzw. 7 und 8). Zur Überprüfung der Translokation wurden die Ansätze mit Proteinase K verdaut. Um störende Proteine aus dem depletierten RL zu entfernen, wurde anschließend eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die Pellets wurden zum Schluss in SDS-Probenpuffer resuspendiert und auf Tracingelen elektrophoretisch aufgetrennt. B), D) und F) Die Analyse der Autoradiogramme erfolgte über einen Phosphoimager mit abschließender Quantifizierung mit der AIDA Software. Die in den Diagrammen dargestellten Signalintensitäten wurden auf den

prozentualen Anteil des Proteinase K-geschützten, prozessierten Proteins, gemessen am Gesamtprotein (z.B. $\text{His3} \times 100\% / (\text{pHis3} + \text{His3})$), bezogen. Die Diagramme stellen jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängig voneinander durchgeführter Versuche dar. SRM: raue Schafsmembranen, CaM: Calmodulin, PK: Proteinase K, pHis3: Prähistatin3, ppCecA: PräprocecropinA, pStat: Prästatherin

In den Autoradiogrammen wie auch in den Auswertungen konnte eine geringe posttranslationale Translokationsrate auch ohne exogenes Ca^{2+} -Calmodulin beobachtet werden (Abb. 17 A, C und E; Spur 3 und 4). Dies könnte auf das nach Depletion noch zurückgebliebene endogene CaM im RL (< 7%) zurückzuführen sein. Mit ansteigender Ca^{2+} -CaM Konzentration ist jedoch eine eindeutige Zunahme der posttranslationalen Translokationsrate aller untersuchter Substratproteine zu verzeichnen (Abb. 17 A, C und E; Spur 5 – 8).

Nach den hier erlangten Ergebnissen scheint CaM eine wichtige Rolle in der posttranslationalen Translokation zu spielen. Durch die eindeutige Erhöhung der Translokationsrate durch Zugabe von exogenem CaM ist es vorstellbar, dass CaM eine generelle Rekrutierungsfunktion im posttranslationalen *Targeting* einnimmt. Ob CaM essentiell für die posttranslationale Translokation ist, kann an dieser Stelle aufgrund der Restmenge an endogenem CaM noch nicht abschließend geklärt werden.

3.2.3. Calmodulin ist für die posttranslationale Translokation des Säugerproteins Prähistatin3 essentiell

Da mit den bisher durchgeführten Untersuchungen noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob CaM essentiell für die posttranslationale Translokation ist, wurde im Folgenden endogenes CaM durch CaM-Inhibitoren inhibiert. Dazu wurden die CaM-Inhibitoren Trifluoperazin (TFP; Cook *et al.*, 1994; Vandonselaar *et al.*, 1994), E6 Berbamin (Hu *et al.*, 1992) und W7 (Hidaka *et al.*, 1981) verwendet. Diese Inhibitoren sind allesamt potente, selektive, zellpermeable Calmodulin-Antagonisten, die an Calmodulin binden können und kompetitiv CaM abhängige Enzyme inhibieren. Es stellte sich die Frage, ob der Einsatz der Inhibitoren durch Inaktivierung des endogenen CaM ebenfalls zu einer Hemmung der posttranslationalen Translokationsrate führt. Zudem wurde untersucht, ob diese mögliche Hemmung einen CaM-spezifischen Effekt darstellt und durch exogenes CaM wieder aufgehoben werden kann.

Um einen Einfluss der Inhibitoren auf die Translation auszuschließen, wurden diese in einem Translokationsvorversuch zum Zeitpunkt der Translation zugesetzt. Bei dem Inhibitor E6 konnte so festgestellt werden, dass bei allen getesteten Konzentrationen (2 μM – 1000 μM) bereits die Translation inhibiert wird. Eine Untersuchung der posttranslationalen Translokation ist somit nur möglich, wenn der E6-Inhibitor erst nach der Translation hinzugegeben wird, so wie in Abb. 18 A, C und E. Bei Vorversuchen zur optimalen Konzentration der beiden weiteren Inhibitoren TFP und W7 ergaben sich bei den hier

teils mit Ca^{2+} -CaM (200 μM ; Spur 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 und 18) versetzt. Zum Translokationsschritt erfolgte die Zugabe von rauen Schafsmembranen (SRM, 5 eq pro Ansatz; Spur 3 – 18). Ein Verdau mit Proteinase K diente als Kontrolle der Translokation. Die Ansätze wurden in Ammoniumsulfat gefällt, die Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen, auf Tricingele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. B), D) und F) Nach der Aufnahme der Signale mit einem Phosphoimager erfolgte deren Quantifizierung mit der AIDA *Software*. Der Signalstärkeanteil des prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteins ohne Inhibitor und ohne Ca^{2+} -Calmodulin im Ansatz wurde gleich 100% gesetzt (Spur 4). Die Signalstärken der weiteren Ansätze wurden anteilig berechnet. Die Versuche wurden für jedes Protein dreimal durchgeführt. Dazugehörige Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in den jeweiligen Diagrammen dargestellt. SRM: raue Schafsmembranen, CaM: Ca^{2+} -Calmodulin, PK: Proteinase K, TFP: Trifluoperazine, E6: E6 Berbamin, W7: N-(6-Aminoheptyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid, pHis3: Prähistatin3, ppCecA: PräprocecropinA, pStat: Prästatherin

Die Autoradiogramme zeigten für die Proteine pHis3 und ppCecA eine vollständige Inhibierung der Translokation in Anwesenheit der drei Hemmstoffe (Abb. 18 A und C; Spur 7, 8, 11, 12, 15 und 16). Bei dem Substratprotein pStat konnte eine deutliche Abnahme der Translokationsrate durch die Inhibitoren beobachtet werden (Abb. 18 E; Spur 7, 8, 11, 12, 15 und 16). Durch Zugabe von zusätzlichem exogenem Ca^{2+} -CaM bei gleichbleibender Inhibitorkonzentration war die Translokation von pHis3 und ppCecA wieder möglich (Abb. 18 A und C; Spur 9, 10, 13, 14, 17 und 18). Auch die Translokation von pStat konnte durch exogenes Ca^{2+} -CaM wieder gesteigert werden (Abb. 18 E; Spur 9, 10, 13, 14, 17 und 18). Die Aufhebung der TFP-Inhibierung durch exogenes CaM scheint im Gegensatz zu den anderen beiden Inhibitoren bei dem Protein pHis3 weniger effektiv zu sein (Abb. 18 A; Spur 9 und 10). Möglicherweise wurde bei dem Substratprotein pHis3 zuviel TFP bzw. zuwenig CaM eingesetzt, um einen deutlicheren Aufhebungseffekt zu erzielen. Vorstellbar wäre auch, dass neben CaM ein weiterer Faktor beeinflusst wird und TFP unspezifischer wirkt als zunächst angenommen. Nichtsdestotrotz konnte die Essentialität von CaM auch für das Substratprotein pHis3 durch den Einsatz der CaM-Inhibitoren E6 und W7 nachgewiesen werden, da diese Inhibitoren eine totale Hemmung der posttranslationalen Translokation bewirkten. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass die Hemmung der Translokation von pHis3 CaM-spezifisch ist, da die E6/W7-Inhibierung durch exogenes CaM aufgehoben werden konnte.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass die Verwendung von etablierten CaM-Inhibitoren ebenfalls zu einer Inhibierung (pHis3, ppCecA) bzw. zu einer Abnahme (pStat) der posttranslationalen Translokation führte. Eine Inaktivierung des endogenen CaM führte somit zu demselben Ergebnis wie eine Depletierung des endogenen CaM. Durch den Einsatz der Inhibitoren konnte hier eindeutig demonstriert werden, dass CaM für die Proteine pHis3 und ppCecA essentiell ist, denn in Anwesenheit der Inhibitoren ist die Translokation vollständig gehemmt. Im Gegensatz dazu wurden die Translokationsraten von pStat durch die Inhibitoren lediglich verringert. Somit scheint hier CaM nicht essentiell für die Translokation von pStat zu sein. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die hemmende Wirkung der Inhibitoren spezifisch gegen CaM gerichtet war, denn dieser Effekt ist durch die Zugabe von exogenem Ca^{2+} -CaM bei allen drei Substratproteinen aufhebbar.

3.2.4. Calmodulin hat keinen Einfluss auf die cotranslationale Translokation von kleinen, sekretorischen Säugerproteinen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die hier getesteten kleinen, sekretorischen Säugerproteine abhängig von SRP cotranslational transportiert werden (s. 3.1.1). Aufgrund der Tatsache, dass CaM prinzipiell an Signalsequenzen von sekretorischen Proteinen zu binden scheint (s. 3.2.1), stellt sich hier daher die Frage, ob CaM in Anwesenheit von SRP auch die cotranslationale Translokation beeinflusst.

Um diese Frage zu untersuchen wurde der Einfluss von Calmodulin auf die cotranslationale Translokation der Proteine pHis3, ppCecA und pStat im depletierten Retikulozytenlysat analysiert. *In vitro* Synthese und Translokation unter [³⁵S]Methionin erfolgten innerhalb einer 45-minütigen Inkubation, nachdem den Ansätzen teils 15 bzw. 60 µM Ca²⁺-CaM und raue Schafsmembranen (0,5 eq/Ansatz) zugefügt wurden. Die Translokationskontrolle erfolgte durch einen Proteinase K-Verdau. Nachdem die Proteine durch Ammoniumsulfat gefällt wurden, konnten diese in SDS-Probenpuffer aufgenommen und über ein Tricingel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Das Autoradiogramm wurde mit dem FLA-3000 Phosphoimager aufgenommen und dessen radioaktive Signale mit dem Quantifizierungsprogramm AIDA ausgewertet.

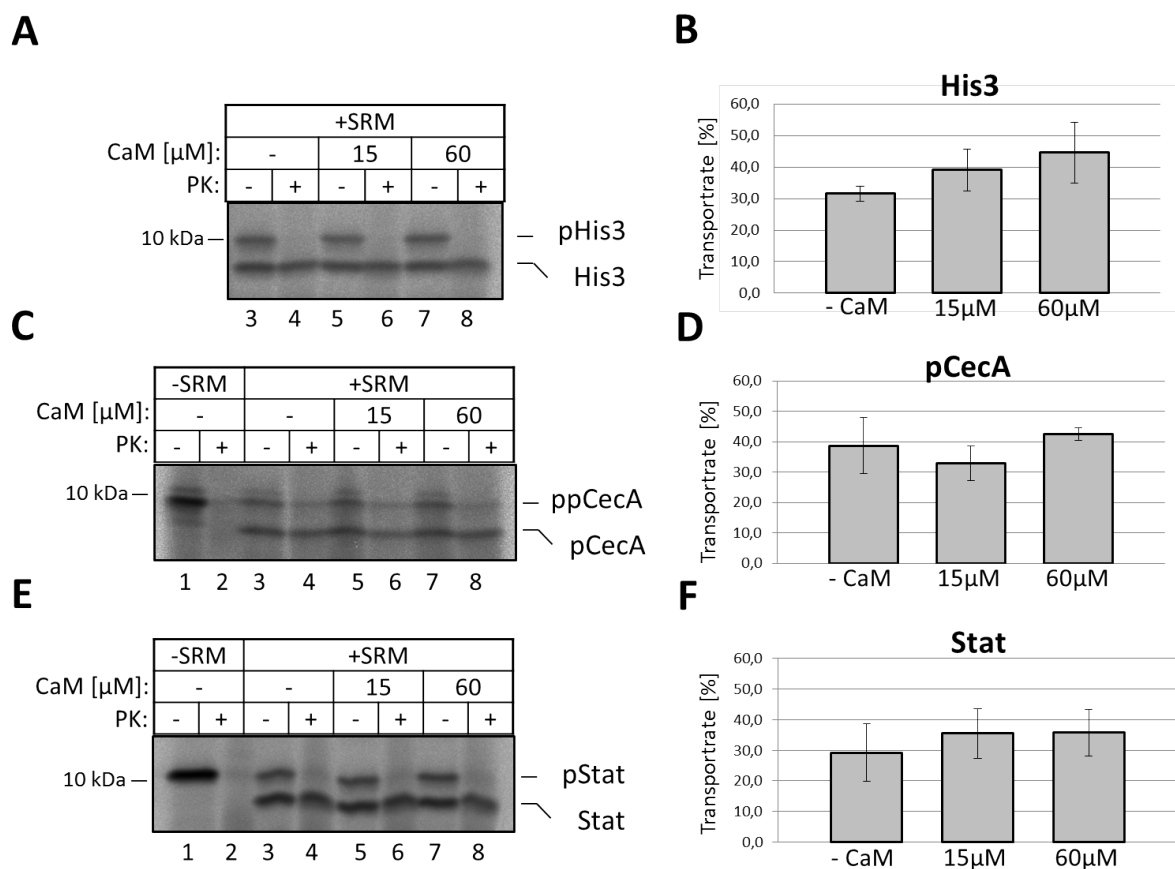


Abb. 19: Eine Zugabe von CaM hat keinen Einfluss auf die cotranslationale Translokation kleiner sekretorischer Proteine.

A), C) und E) Die Synthese der Proteine erfolgte im depletierten Retikulozytenlysat (RL) unter Zugabe von [³⁵S]Methionin. Unter cotranslationalen Bedingungen wurden die Ansätze z. T. mit 15 bzw. 60 µM Ca²⁺-CaM inkubiert (Spur 5 und 6 bzw. 7 und 8), bevor sie mit rauen Schafsmembranen (0,5 eq pro Ansatz) versetzt

wurden (Spur 3 – 8). Die Translokation wurde durch einen Proteinase Verdau kontrolliert. Es erfolgte eine Ammoniumsulfatfällung zum Abtrennen unerwünschter Proteine aus dem RL. In SDS-Probenpuffer gelöst, wurden die pelletierten Proteine auf Tricingele aufgetragen und über Elektrophorese aufgetrennt. B), D) und F) Die Signale der Autoradiogramme wurden mit einem Phosphoimager ausgelesen und mit der Quantifizierungssoftware AIDA analysiert. Die Signalintensitäten der prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteinbanden wurden prozentual zum Gesamtprotein pro Ansatz dargestellt. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Ihre Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in den Diagrammen dargestellt. SRM: raue Schafsmembranen, CaM: Calmodulin, PK: Proteinase K, pHis3: Prähistatin3, ppCecA: PräprocecropinA, pStat: Prästatherin

Es konnte beobachtet werden, dass die cotranslationale Translokation auch im depletierten RL ablaufen kann. Die Translokationsraten der Proben ohne exogenes Ca^{2+} -CaM (Abb. 19 A, C und E; Spur 3 und 4) unterscheiden sich nicht wesentlich von den Translokationsraten der Ansätze mit exogenem Ca^{2+} -CaM (Abb. 19 A, C und E; Spur 5 – 8). Eindeutig ist dieser Effekt bei den Substratproteinen ppCecA und pStat zu sehen, etwas weniger deutlich fällt dieses Phänomen bei dem Substratprotein pHis3 aus. Eine Wirkung des Calmodulins im cotranslationalen Transport, so wie er unter posttranslationalen Bedingungen gesehen wurde, konnte somit nicht beobachtet werden. Die hohen Translokationsraten auch ohne exogenes Ca^{2+} -CaM und die Tatsache, dass diese nicht wesentlich durch eine exogene CaM-Gabe gesteigert werden konnten, deuten darauf hin, dass Calmodulin für die cotranslationale Translokation nicht essentiell ist. Es ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, dass die eventuell verbliebene Restmenge an Calmodulin des depletierten Retikulozytenlysats bereits für den beobachteten cotranslationalen Transport ausreichend war.

3.2.5. TFP hemmt die cotranslationale Translokation CaM-unabhängig

Da bisher die Essentialität von CaM für die cotranslationale Translokation nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde das cotranslationale Translokationsexperiment im depletierten RL in Anwesenheit des CaM-Inhibitors TFP durchgeführt. Dadurch sollte das evt. verbliebene Rest-CaM inhibiert werden.

Bei der Durchführung des cotranslationalen Translokationsexperimentes war TFP bereits zum Zeitpunkt der *in vitro* Synthese und Translokation mit radioaktiv markiertem Methionin im depletierten RL anwesend und lag in einer Endkonzentration von 200 μM vor. Nach partieller Zugabe von Ca^{2+} -CaM (200 μM) wurden 0,5 eq raue Schafsmembranen pro Ansatz zugefügt. Mit einem Protease K-Verdau wurde die Translokation überprüft. Nach Ammoniumsulfatfällung wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Signale wurden mit einem FLA-3000 Phosphoimager aufgenommen und mit dem AIDA Programm analysiert.

Überraschenderweise wurde durch den Einsatz von TFP die cotranslationale Translokation erheblich bzw. vollständig gehemmt (Abb. 20 A, C und E; Spur 5 und 6). Dieser Effekt zeigte sich eindeutig sowohl bei dem Kontrollprotein PräprocecropinA als auch bei den beiden weiteren getesteten Säugerproteinen Prähistatin3 und Prästatherin. Eine Erklärung für

diesen beobachteten Einfluss von TFP könnte sein, dass CaM doch für die cotranslationale Translokation essentiell ist und durch TFP inaktiviert wird. Vorstellbar wäre jedoch auch, dass CaM nicht durch TFP gehemmt wird, sondern TFP einen anderen Faktor innerhalb der cotranslationalen Translokation inhibiert. Falls TFP hier doch als CaM-Inhibitor agiert, so sollte eine Erhöhung der CaM-Konzentration durch exogene Ca^{2+} -CaM-Gabe bei gleichbleibender Inhibitorkonzentration zu einer entsprechenden Aufhebung der Inhibierung führen, wie sie bereits unter posttranslationalen Bedingungen beobachtet wurde (Abb. 18). Eine Zugabe von exogenem Ca^{2+} -CaM unter Anwesenheit des Inhibitors führte zu keiner Regeneration der cotranslationalen Translokation (Abb. 20 A, C und E; Spur 7 und 8). Dies ist der wesentliche Unterschied zur posttranslationalen Translokation, bei der die Translokation in Anwesenheit von Inhibitoren durch Zugabe von exogenem Ca^{2+} -CaM wieder möglich war. Die hier verwendete Konzentration von 200 μM TFP ist um das 2,5-fache geringer als die benötigte TFP-Konzentration zur Inhibierung des posttranslationalen Transportes. Konnten 200 μM Ca^{2+} -CaM die Inhibierung unter posttranslationalen Bedingungen noch aufheben, war dies unter cotranslationalen Bedingungen mit weniger TFP nicht möglich.

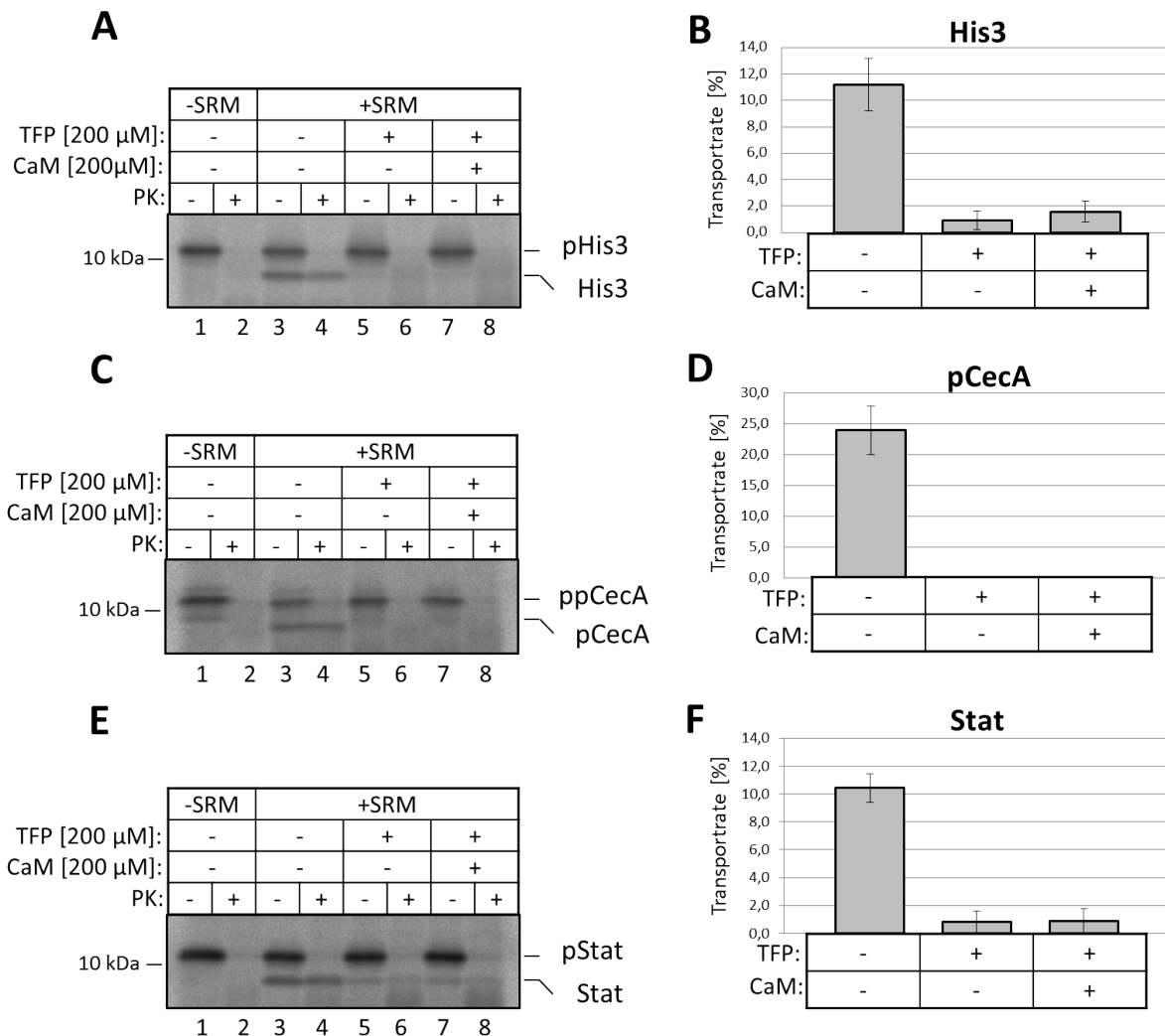


Abb. 20: Die cotranslationale Translokation im depletierten Retikulozytenlysat kann nach Trifluoperazin (TFP)-Inhibierung nicht durch exogenes Calmodulin wiederhergestellt werden.

A), C) und E) Die Ansätze wurden vor der Translation ohne Ca^{2+} -CaM und TFP (A, C und E; Spur 1 – 4), lediglich mit TFP (A, C und E; Spur 5 und 6) oder mit TFP und Ca^{2+} -CaM (A, C und E; Spur 7 und 8) angesetzt. Die *in vitro*

Synthese erfolgte im depletierten RL, wobei die Proteine mit radioaktivem [³⁵S]Methionin markiert wurden. Nach kurzer Inkubation dieser Substanzen wurde den Ansätzen raue Schafsmembranen (SRM) zugefügt, um die Translokation zu ermöglichen (A, C und E; Spur 3 – 8). Diese wurde durch einen Proteinase K-Verdau kontrolliert. Es folgte eine Ammoniumsulfatfällung und die gefällten Proteine wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und erhitzt. B), D) und F) Unter Verwendung von Tricingelen wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und ihre Signale über einen Phosphoimager ausgelesen. Die Analyse erfolgte im Anschluss mit dem AIDA Programm. Die Säulendiagramme ergaben sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen dreier unabhängig voneinander ausgeführter Versuche. Die dargestellten Signalintensitäten beziehen sich auf den Anteil des prozessierten, Proteinase K-geschützten Proteins am Gesamtprotein. SRM: raue Schafsmembranen, CaM: Calmodulin, PK: Proteinase K, TFP: Trifluoperazine, pHis3: Prähistatin3, ppCecA: PräprocecropinA, pStat: Prästatherin

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann die Frage zur Beteiligung von CaM innerhalb der cotranslationalen Translokation nicht beantwortet werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass CaM für die cotranslationale Translokation essentiell ist. Da die Hemmung durch TFP hier nicht CaM-spezifisch war, muss es mindestens eine zweite essentielle Komponente geben, die durch TFP inhibiert wurde. Möglicherweise muss diese Komponente in Kombination mit CaM vorhanden sein, um eine cotranslationale Translokation zu ermöglichen. In diesem Fall könnte CaM auch essentiell sein.

3.3. Der Einfluss von Trifluoperazin auf die cotranslationale Translokation

3.3.1. Trifluoperazin inhibiert die Translokation von pPI78mer und pPI86mer im Retikulozytenlysat und Weizenkeimextrakt nicht bzw. weniger effektiv

Nachdem in 3.2.5 eine eindeutige Inhibierung der cotranslationalen Translokation der getesteten Proteine durch TFP beobachtet werden konnte, sollte im Folgenden der Schritt, in den TFP in die cotranslationalen Translokation eingreift und diese inhibiert, näher definiert werden. Das eigentlich als Calmodulin-Inhibitor bekannte Trifluoperazin bindet an die Methionin-reiche, hydrophobe Sequenz des CaM. Das ebenfalls hydrophobe TFP interagiert dabei genau mit der Bindungstasche des Calmodulins, in die auch andere Proteine binden können, wie z. B. die *Myosin Light Chain Kinase* (Cook *et al.*, 1994). Somit stellt sich die Frage, ob TFP über hydrophobe Bindungsmechanismen auch an die hydrophobe Signalsequenz oder an die Methionin-reiche Bindungstasche des SRP (Keenan *et al.*, 1998) binden könnte und so die Interaktion zwischen Signalsequenz und SRP behindert. Um diese Frage zu beantworten wurden Verkürzungsderivate des Substratproteins pPI in das Translokationsexperiment eingesetzt. Die mRNA dieser Verkürzungsderivate besitzt kein Stoppcodon, wodurch die naszierenden Ketten zunächst über die tRNA gebunden an den Ribosomen vorliegen. Diese tRNA-Bindung simuliert einen SRP-Arrest und die naszierende Kette wird translokationskompetent gehalten. Dadurch gelangen pPI-Verkürzungsvarianten definierter Länge in einem Peptidyl-tRNA-Ribosomen-Komplex zur Membran des endoplasmatischen Retikulums. Dieses *Targeting* des Peptidyl-tRNA-Ribosomen-Komplexes findet SRP-unabhängig statt, da das Ribosom eine hohe Affinität zu dem Sec61-Kanal besitzt. Der Vorteil von Verkürzungsproteinen, deren mRNA kein Stoppcodon mehr besitzt, ist, dass das *Targeting* zu der ER-Membran und die Translokation in das ER-Lumen zeitlich voneinander getrennt ablaufen. Die Translokation wird erst mit Puromycin gezielt gestartet. Puromycin bewirkt dabei, dass die naszierenden Ketten sich von dem Ribosom ablösen können. Somit kann durch die Verwendung dieser Proteinvarianten das *Targeting* losgelöst von der Translokation untersucht werden. Dieses System bringt den weiteren Vorteil mit sich, dass je nach Programmierungsauslastung der Ribosomen ein SRP-abhängiger oder SRP-unabhängiger Transport stattfindet. Liegt eine hohe Programmierungsauslastung vor, so werden die pPI-Verkürzungsderivate SRP-unabhängig zu der ER-Membran transportiert. In diesem Fall existiert eine Population an RNC-Komplexen, die nicht mit einer anderen Population in Konkurrenz stehen. Ist hingegen der Anteil an unprogrammierten Ribosomen sehr hoch, so besteht eine zweite Konkurrenzpopulation an RNC-Komplexen, da durch SRP die Affinität der programmierten Ribosomen erhöht werden kann. Für die programmierten Ribosomen liegt also eine SRP-Abhängigkeit vor. Aufgrund dieser Vorteile wurden zur Untersuchung des Einflusses von TFP auf den cotranslationalen Transport

Translokationsexperimente mit pPI-Verkürzungsderivaten mit 78 (pPI78mer) bzw. 86 (pPI86mer) n-terminal verbliebenden Aminosäuren ohne Stoppcodon auf mRNA-Ebene durchgeführt. Die Wahl der Substratproteine viel auf pPI-Verkürzungsvarianten, da insbesondere das pPI86mer sehr gut in seiner Translokation untersucht ist (z.B. Jungnickel & Rapoport, 1995; Nicchitta et al., 1995; Nicchitta & Zheng, 1997). Zur Überprüfung, ob TFP vergleichbar zu den anderen kleinen *full length*-Substratproteinen auch die Translokation des *full length*-pPI inhibiert, wurde zunächst ein Kontrollversuch durchgeführt. Das Autoradiogramm zeigt eine deutliche Abnahme der Translokationsrate in Anwesenheit von TFP (Abb. 21 A; Spur 5 und 6). Dies entspricht den Beobachtungen der Translokationsversuche mit pHis3, pCecA und pStat (Abb. 20).

Die *in vitro* Synthese von pPI78mer und pPI86mer erfolgte im Anschluss im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von $^{35}\text{S}[\text{Met}]$ und TFP. Sie wurde mit einer kürzeren Translationszeit (20 min) als die Translation von pPI (45 min) durchgeführt. Um die Translokation ins ER zu ermöglichen, wurden den Ansätzen 0,5 eq raue Schafsmembranen zugefügt. Es folgte eine Inkubation mit 2 mM Puromycin, um die Ablösung der naszierenden Kette vom Ribosom zu gewährleisten. Das Eintreten der Proteine ins ER wurde durch den Proteinase K-Verdau kontrolliert. Abschließend wurden die Ansätze ultrazentrifugiert und die Pellets in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine erfolgte über ein NuPAGE Bis-Tris Gel. Die errechneten Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil des prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteins zum Gesamtprotein (z.B. $\text{PI78mer} \times 100\% / (\text{pPI78mer} + \text{PI78mer})$) des Ansatzes.

Sobald Puromycin den entsprechenden Ansätzen zugegeben wurde, wurden die naszierenden Ketten aus den Ribosomen freigesetzt und konnten den Sec61-Kanal ins ER-Lumen passieren (Abb. 21 C und E; PI78mer und PI86mer; Spur 7 – 10). Während bei der Translokation des pPI bei Anwesenheit von TFP noch ein deutlicher Rückgang der Translokationsrate verzeichnet werden konnte (Abb. 21 A und B), trat dies mit den hier verwendeten pPI-Verkürzungsproteinen nicht bzw. nur in abgeschwächter Form auf (Abb. 21 C, D, E, F). Die Verwendung der pPI-Verkürzungsderivate zeigte, dass die Translation wie auch die Translokationsmaschinerie am Sec61 Translokon grundsätzlich auch in Gegenwart von TFP funktionierten. Bei diesen verlangsamten *Targeting*-Bedingungen konnte eine Translokation der Verkürzungsvarianten zur ER-Membran beobachtet werden. Hier handelte es sich vermutlich um einen SRP-unabhängigen Transport. Dies wirft an dieser Stelle die Frage auf, ob TFP in die Interaktion von SRP und Signalsequenz eingreift und die SRP-abhängige Translokation des pPI auf diese Weise verhindert, wohingegen ein SRP-unabhängiger Transport der pPI-Verkürzungsderivaten auch unter TFP abläuft.

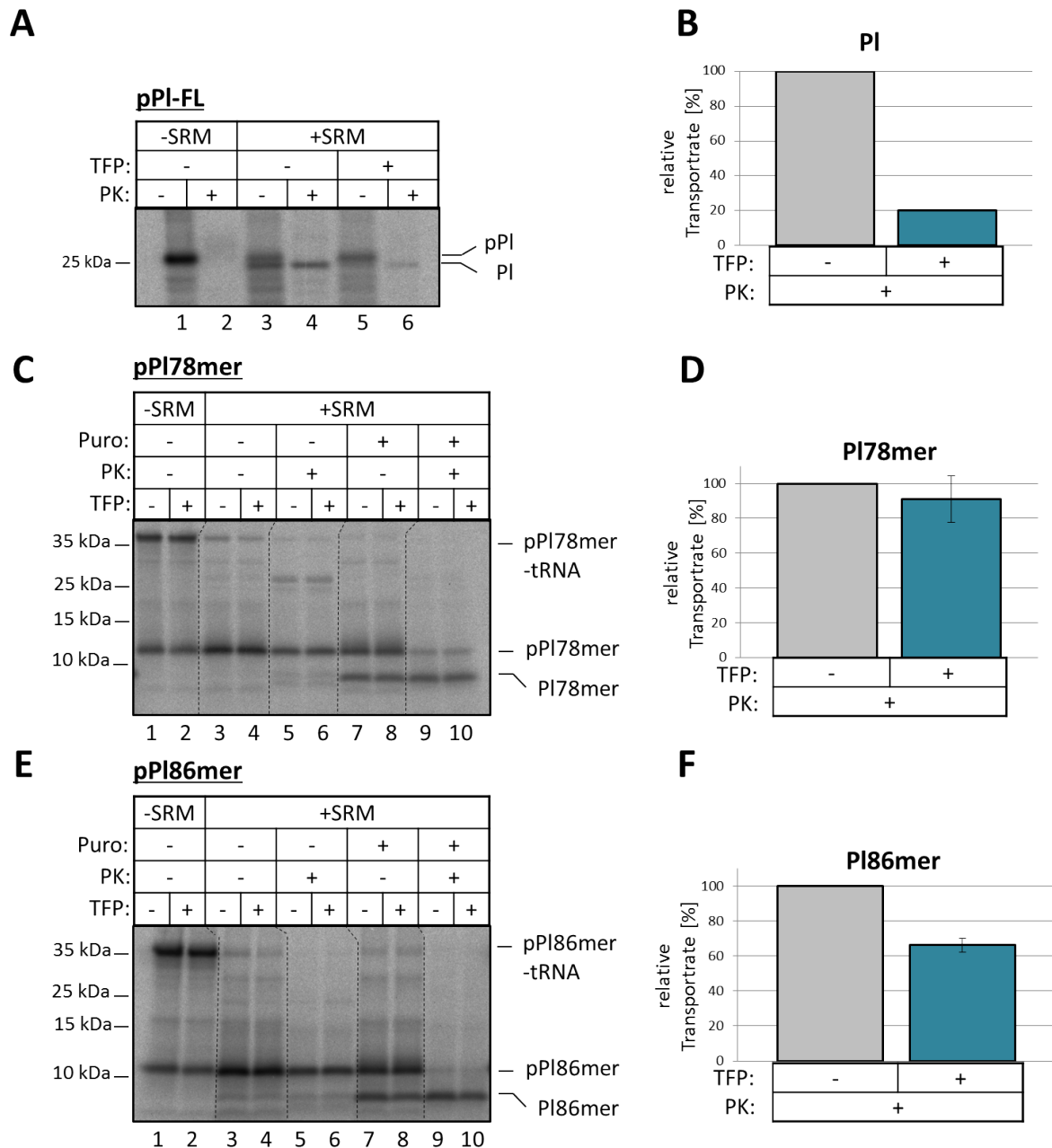


Abb. 21: Die Translokation der pPI-Verkürzungsvarianten 78mer und 86mer wird im Retikulozytenlysat durch Trifluoperazin nicht bzw. weniger stark inhibiert.

A) *In vitro* Synthese mit [³⁵S]Methionin und Translokation des pPI-Ausgangspoteins (229 AS) mit Zugabe von 200 μM TFP. Die Verkürzungsproteine pPI78mer (C) und pPI86mer (E), deren mRNA sich durch das Fehlen eines Stoppcodons auszeichnet, wurden *in vitro* mit radioaktiv markiertem Methionin im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von TFP synthetisiert und anschließend mit rauen Schafsmembranen (SRM, 0,5 eq/Ansatz) versetzt. Die Abtrennung der naszierenden Kette vom Ribosom und die Translokation erfolgte durch eine Puromycin-Inkubation (2 mM). Zur Überprüfung des Transportes in das endoplasmatische Retikulum wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Es folgten Ultrazentrifugation und Resuspension der Pellets in SDS-Probenpuffer. Die Proben wurden auf ein NuPAGE Bis-Tris Gel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Signalintensitäten entsprechen der Proteinmenge von prozessierten PI (B), PI78mer (D) bzw. PI86mer (F) mit vorheriger Proteinase K-Inkubation und in Anwesenheit von Puromycin gemessen am Gesamtprotein (z.B. PI78mer x 100% / (pPI78mer + PI78mer)). Die Werte des Ausgangszustands ohne TFP wurden gleich 100% gesetzt. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich durch drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. SRM: raue Schafsmembranen, PK: Proteinase K, TFP: Trifluoperazine, Puro: Puromycin, FL: *Full length*, pPI: Präprolaktin

Da in dem bisher verwendeten Retikulozytenlysate je nach Programmierungsauslastung ein SRP-unabhängiges wie auch SRP-abhängiges *Targeting* ablaufen kann, wurde nun das Experiment ohne funktionelles SRP zusätzlich im WKE durchgeführt (Abb. 22 C und E). Dadurch wurde die Möglichkeit eines SRP-unabhängigen Transports der pPI-Verkürzungsvarianten 78mer und 86mer unter TFP untersucht. Es galt zunächst in einem Kontrollexperiment erneut den inhibierenden Einfluss von TFP auf die Translokation von pPI im WKE nachzuweisen. Zudem wurde die Abwesenheit von funktionellem SRP kontrolliert (Abb. 22 A).

Bei dem Kontrollexperiment stellte sich heraus, dass ein cotranslationaler Transport des Präprolaktins im WKE mit Hochsalz-gewaschenen rauen Schafsmembranen ohne exogenes SRP nicht möglich war (Abb. 22 A; Spur 3 und 4). Die Abwesenheit von funktionellem SRP konnte somit gezeigt werden. Durch Zufügen von 25 nM SRP zum Versuchsansatz war pPI translozierbar (Abb. 22 A; Spur 5 und 6). Überraschenderweise wurde mit einer Konzentration von 200 μ M TFP die Translokation im WKE nicht gehemmt (Abb. 22 A; Spur 7 und 8). Eine Inhibierung konnte erst bei einer Konzentration von 400 μ M beobachtet werden (Abb. 22 A; Spur 9 und 10). Die Konzentration von verfügbarem TFP scheint im WKE geringer zu sein. Dies könnte damit erklärt werden, dass TFP nicht nur mit dem endogenen Weizen-SRP interagiert, sondern auch mit dem zusätzlichen exogenen SRP. Aufgrund dessen wurde in den folgenden Experimenten, bei denen als zellfreies System der Weizenkeimextrakt gewählt wurde, eine TFP-Konzentration von 400 μ M verwendet.

Die Translokationsexperimente mit den pPI-Verkürzungsproteinen im WKE wurden entsprechend zu den Versuchen im RL durchgeführt. Es wurden lediglich zwei weitere Ansätze mit exogenem SRP mitgeführt (Abb. 22 C und E; Spur 9 – 12). SRP wurde dabei zum Zeitpunkt der Translation zugesetzt.

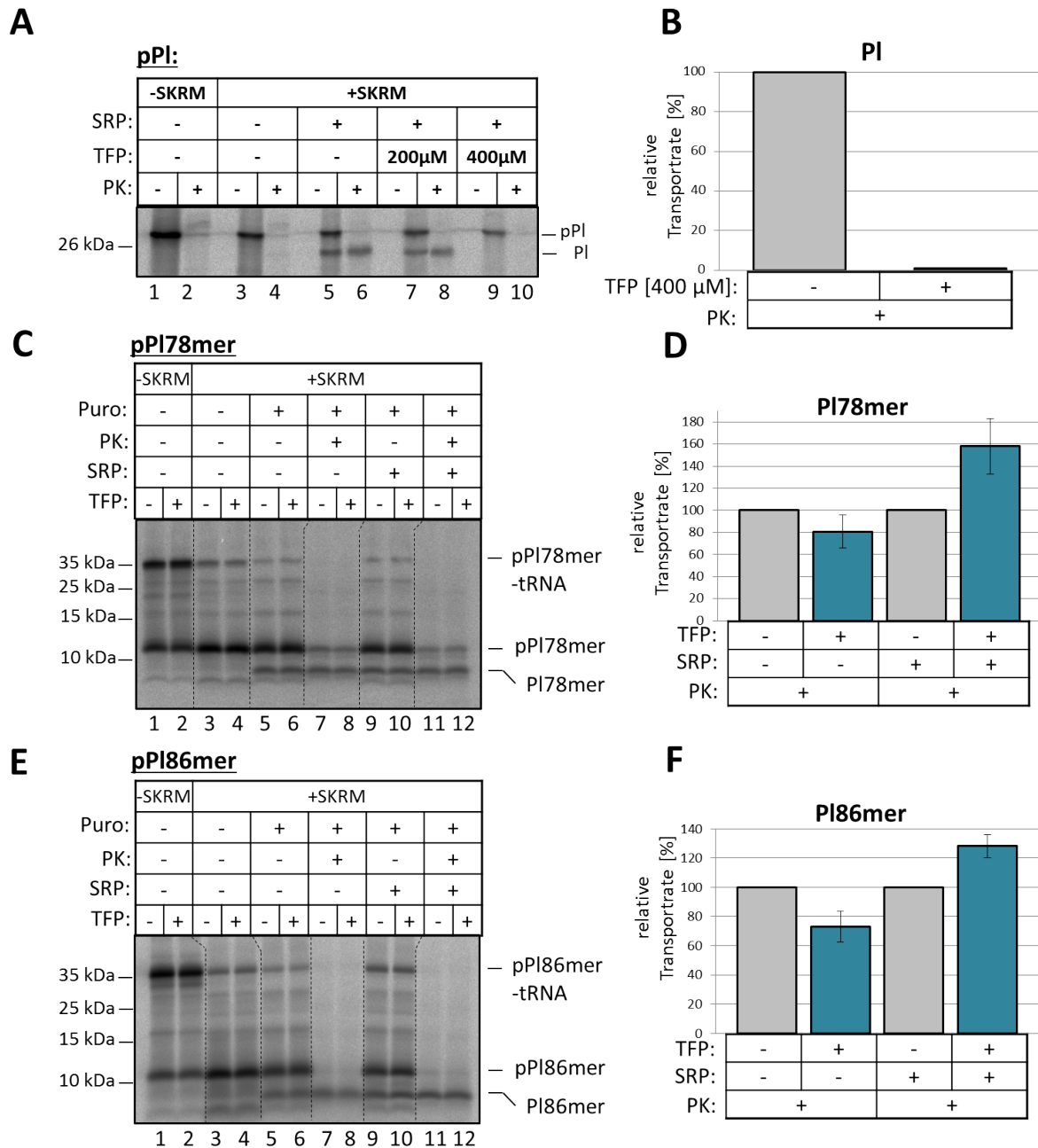


Abb. 22: Die Translokation der pPI-Verkürzungsvarianten 78mer und 86mer läuft – auch in Anwesenheit von TFP – SRP-unabhängig im Weizenkeimextrakt ab.

A) *In vitro* Synthese mit radioaktiv markiertem Methionin und Translokation des Ausgangsproteins pPI (229 AS) im Weizenkeimextrakt (WKE)-Translationssystem unter Zugabe von SRP und TFP. Die Verkürzungsproteine pPI78mer (C) und pPI86mer (E) wurden mit [³⁵S]Methionin im *in vitro* WKE-System in Anwesenheit von SRP und TFP synthetisiert. Nach Zugabe von rauen, mit Hochsals-behandelten Schafsmembranen (SKRM) wurde die Translokation durch Puromycin gestartet. Es folgte als Kontrollschritt für die Translokation der Proteinase K-Verdau. Die Ansätze wurden ultrazentrifugiert. Zur Elektrophorese der Proteine wurden NuPAGE Bis-Tris Gele verwendet. Die Analyse der Signale erfolgte über ein Autoradiogramm und die Quantifizierung mit der AIDA Software. Die Signalintensitäten des prozessierten, Proteinase K-geschützten und zuvor mit Puromycin behandelten PI (B), PI78mer (D) und PI86mer (F) wurden prozentual zum Gesamtprotein (z.B. PI78mer x 100% / (pPI78mer + PI78mer)) errechnet. Die Werte des Ausgangszustands ohne TFP wurden gleich 100% gesetzt. Die zugrundeliegenden Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus n = 3 Versuchen. SKRM: raue, Hochsals-behandelte Schafsmembranen, PK: Proteinase K, TFP: Trifluoperazine, Puro: Puromycin, FL: *full length*, pPI: Präprolaktin

Die Autoradiogramme der Translokationsexperimente mit pPI78mer (Abb. 22 C) und pPI86mer (Abb. 22 E) im WKE zeigten, dass die Translokation dieser Verkürzungsvarianten auch ohne exogenes SRP möglich war. Um die Signalsequenz verkürztes und Proteinase K-geschütztes Protein konnte nach Puromycinzugabe sowohl in Abwesenheit wie auch in Anwesenheit von TFP detektiert werden (Abb. 22 C und E; Spur 5 – 12). Die Translokation der beiden getesteten pPI-Verkürzungsproteinen ist unter TFP ohne funktionelles SRP möglich, ihre Translokationsraten können jedoch bei Verfügbarkeit von SRP noch weiter gesteigert werden (Abb. 22 C und E; Spur 9 – 12). Dies bedeutet, dass unter den gewählten Bedingungen TFP weder auf das *Targeting* noch auf die Translokation dieser Verkürzungsderivate einen inhibierenden Einfluss hat.

Durch die Translokationsexperimente mit den pPI-Verkürzungsderivaten im RL sowie im WKE in Anwesenheit von TFP konnte eindeutig demonstriert werden, dass die Translation nicht negativ beeinflusst wurde, dass die Mikrosomen intakt waren und dass die Translokation über den Sec61-Kanal in das ER-Lumen funktionierte. Der Angriffspunkt von TFP kann demnach näher auf das *Targeting* eingegrenzt werden. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das SRP-abhängige *Targeting* von *full length*-Proteinen von TFP beeinflusst wird.

3.3.2. Unter dem Einfluss von Trifluoperazin behindern 80S-Ribosomen die Translokation des pPI-Verkürzungsproteins 78mer

Wenn die Hypothese, dass TFP in das *Targeting* bzw. in die Interaktion von SRP mit dem RNC-Komplex eingreift, zutreffend ist, so müsste ein Überschuss an unprogrammierten 80S-Ribosomen in Anwesenheit von TFP zu einer Abnahme der Translokationsrate führen. In der Annahme, dass sich bei der ungestört ablaufenden Translokation der pPI-Verkürzungsderivate unter TFP ein Komplex aus Ribosom und naszierender Kette aber ohne SRP (RNC^{-SRP}-Komplex) bildet, stünde dieser RNC^{-SRP}-Komplex in Konkurrenz zu auch stets anwesenden unprogrammierten Ribosomen (Borgese *et al.*, 1974; Kalies *et al.*, 1994). Sowohl unprogrammierte als auch programmierte Ribosomen (RNC^{-SRP}-Komplex) sind in der Lage, mit ähnlich hoher Affinität an den Sec61-Kanal zu binden. Eine Bindung von SRP an die Signalsequenz der naszierenden Kette (RNC^{+SRP}-Komplex) hätte hingegen eine deutliche Steigerung der Affinität zum Sec61-Kanal gegenüber leeren Ribosomen wie auch RNC-Komplexen ohne SRP zur Folge (Schaletzky & Rapoport, 2006).

Um dies zu untersuchen, wurde die Synthese des pPI78mer *in vitro* im Retikulozytenlysat in An- oder Abwesenheit von 200 μ M TFP durchgeführt. Es wurden raue Schafsmikrosomen und unprogrammierte eukaryontische 80S-Ribosomen in aufsteigender Konzentration zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 0°C für 10 min und bei 25°C für weitere 10 min. Nach Translokation durch Puromycinbehandlung und Ultrazentrifugation der Versuchsansätze wurden die Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die zuvor mit [³⁵S]Met markierten Proteine wurden letztlich mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

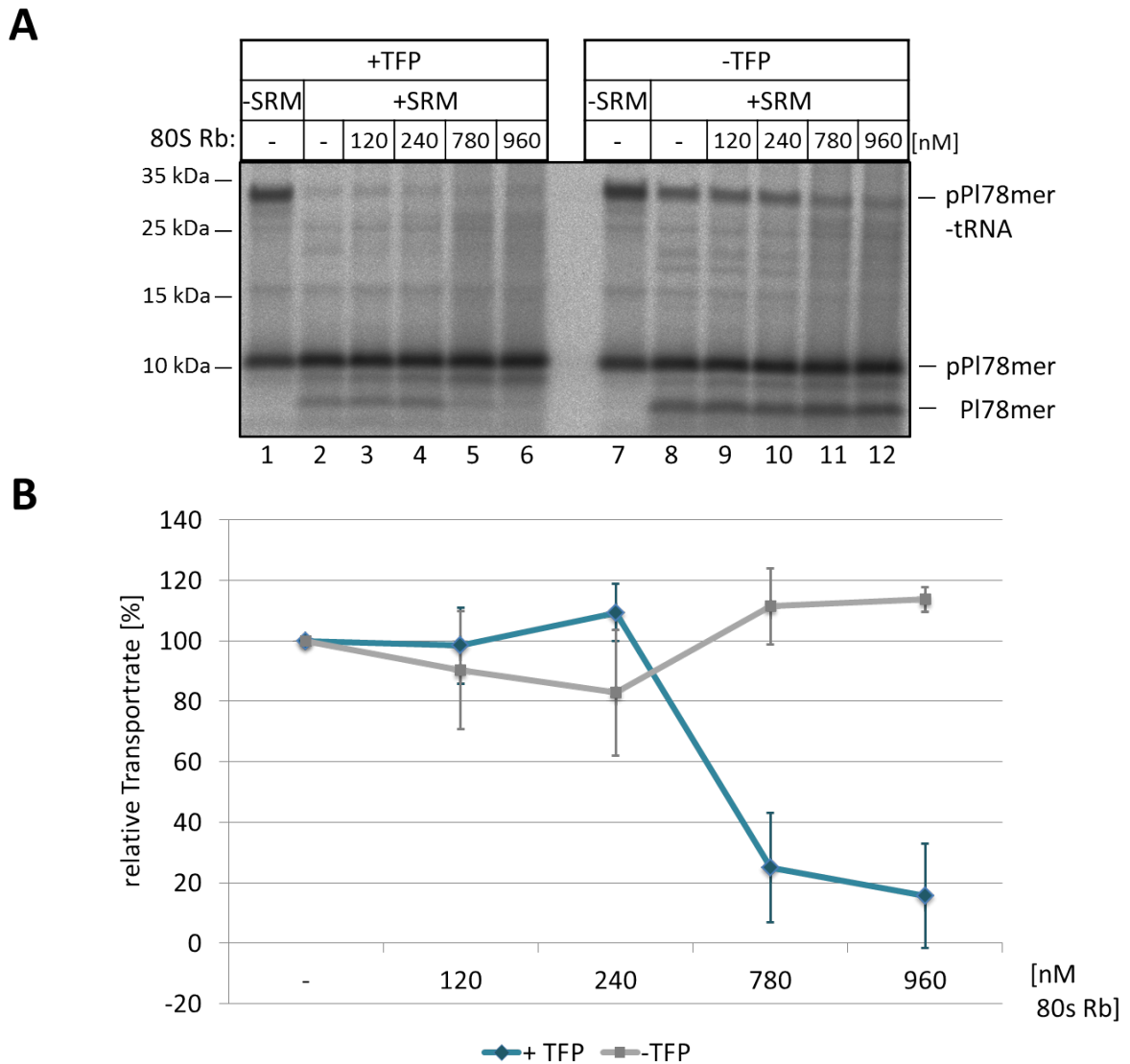


Abb. 23: In Anwesenheit von Trifluoperazin verhindern 80S-Ribosomen die Translokation des pPI-78mer.

A) pPI-78mer wurde *in vitro* mit radioaktiv markiertem Methionin im Retikulozytenlysat unter Anwesenheit von 200 μ M TFP synthetisiert. Es wurden zunächst raue Schafsmembranen, gefolgt von entsprechenden Konzentrationen an unprogrammierten 80S-Ribosomen zugesetzt. Durch eine Behandlung mit Puromycin wurden die naszierenden Ketten vom Ribosom gelöst und die Translokation wurde gestartet. Die Proben wurden ultrazentrifugiert und die Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mit einem NuPAGE Bis-Tris Gel elektrophoretisch aufgetrennt und ihre Signale mit einem Phosphoimager aufgenommen. B) Die Quantifizierung erfolgte durch das AIDA Programm. Das Kurvendiagramm zeigt die Signalintensitäten des prozessierten Proteins anteilig am Gesamtprotein ($\text{PI78mer} \times 100\% / (\text{pPI78mer} + \text{PI78mer})$), wobei der Wert ohne 80S-Ribosomen gleich 100% gesetzt wurde (Spur 2 und 8). Die weiteren Werte sind anteilig daran errechnet. Die dazugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen resultierten aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen. SRM: raue Schafsmembranen, TFP: Trifluoperazine, pPI: Präprolaktin, Rb: Ribosomen

Die durch einen Phosphoimager aufgenommenen radioaktiven Signalintensitäten zeigten in Anwesenheit des TFP deutlich geringere Translokationsraten (Abb. 23 A; PI78mer; Spur 5 und 6) ab einer eingesetzten Ribosomenmenge von 780 nM. Dagegen verblieben die Translokationsraten in Abwesenheit von TFP bei allen getesteten Ribosomenkonzentrationen konstant (Abb. 23 A; PI78mer; Spur 9 – 12).

Es ist somit davon auszugehen, dass unter TFP RNC^{-SRP}-Komplexe zur ER-Membran gelangen und so eine Translokation des pPI-78mer ermöglicht wird. Ein Überschuss an 80S-Ribosomen unterbindet diese Möglichkeit durch direkte Konkurrenz um freie Sec61-Kanäle. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass das *Targeting* der *full length*-Proteine auf Ebene der SRP-Signalsequenz-Interaktion durch TFP gestört wird.

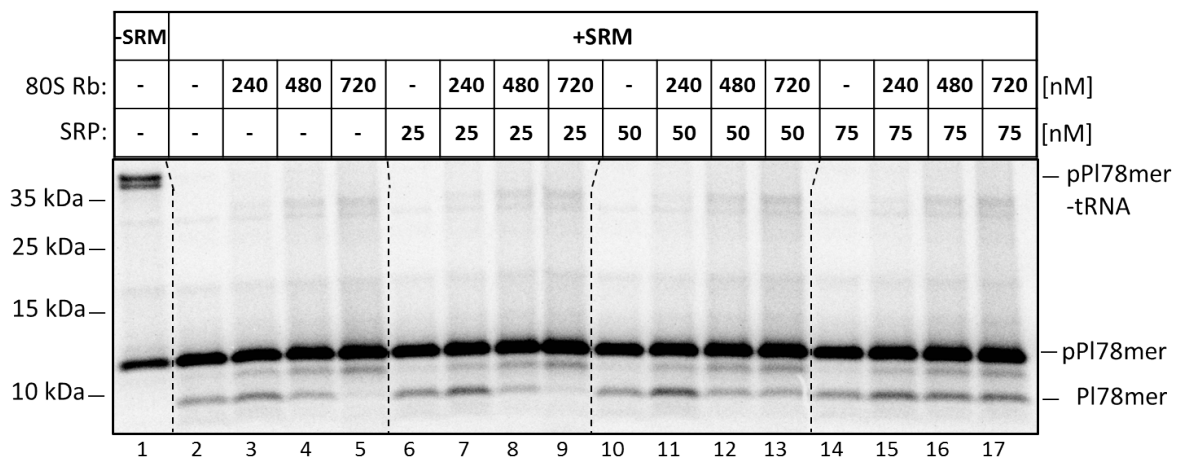
3.3.3. Die unter dem Einfluss von Trifluoperazin und 80S-Ribosomen vorliegende Inhibierung der Translokation kann durch Zugabe von SRP aufgehoben werden

Wenn durch den Einfluss von TFP die Bindung zwischen SRP und der Signalsequenz behindert wird, TFP also möglicherweise an die hydrophobe Bindetasche des SRP oder an die hydrophobe Signalsequenz bindet, dann steht TFP in direkter Konkurrenz zu der Signalsequenz bzw. zum SRP. Vor diesem Hintergrund sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine Erhöhung der SRP-Konzentration – trotz der Anwesenheit von TFP und 80S-Ribosomen – die Translokation wieder ermöglicht.

Dazu wurde das pPI78mer *in vitro* im Retikulozytenlysat mit 200 µM TFP und radioaktiv markiertem Methionin synthetisiert und zur Translokation je nach Ansatz 0,5 eq raue Schafsmembranen und 0 – 720 nM 80S-Ribosomen hinzugefügt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 0 – 75 nM SRP. Nach Abtrennung der naszierenden Peptidkette vom Ribosom durch Puromycin erfolgte die Translokation. Die Proben wurden ultrazentrifugiert und die Pellets in SDS-Probenpuffer gelöst und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Aufnahme des Autoradiogramms erfolgte durch den CR-35 Bio Phosphoimager (Abb. 24 A), bevor die radioaktiven Signale mit AIDA quantifiziert wurden. Die Menge an transloziertem Protein wurde dabei prozentual zur Menge des Gesamtproteins (PI78mer x 100% / (pPI78mer + PI78mer)) der einzelnen Ansätze errechnet und in Abb. 24 B grafisch dargestellt.

Die Translokationsansätze ohne (Abb. 24 A; Spur 2 – 5) oder mit 25 nM exogenem SRP (Abb. 24 A; Spur 6 – 9) zeigten eine Inhibierung der Translokation ab einer Konzentration von 480 nM 80S-Ribosomen. Die Translokation wurde nahezu vollständig bei einer Konzentration von 720 nM 80S-Ribosomen gehemmt (Abb. 24 A; Spur 5 und 9). Wurde die exogene Zugabe von SRP hingegen auf 50 nM (Abb. 24 A; Spur 10 – 13) erhöht, konnte zunächst eine leichte Aufhebung der Inhibierung der Translokation detektiert werden (Abb. 24 A; Spur 12 und 13). Durch eine weitere Erhöhung der exogenen SRP-Konzentration auf 75 nM (Abb. 24 A; Spur 14 – 17) wurde eine vollständige Kompetition des Inhibitors beobachtet (Abb. 24 A; Spur 16 und 17).

A



B

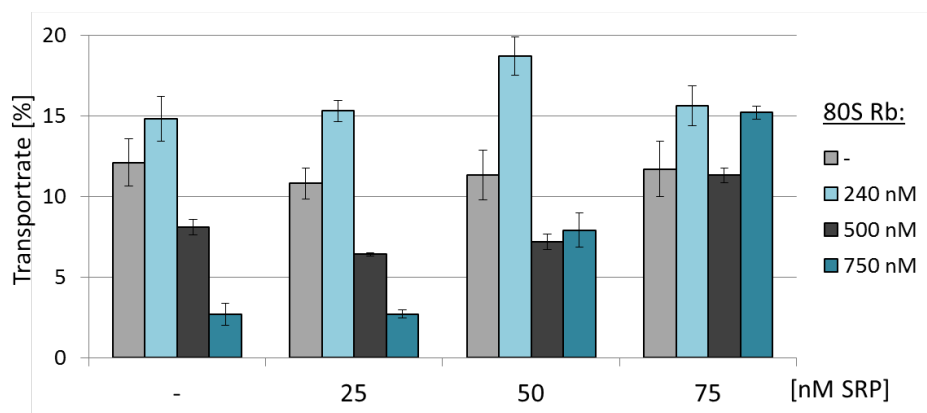


Abb. 24: Die Inhibierung der Translokation des pPI-78mers durch 80S-Ribosomen unter TFP kann durch SRP aufgehoben werden.

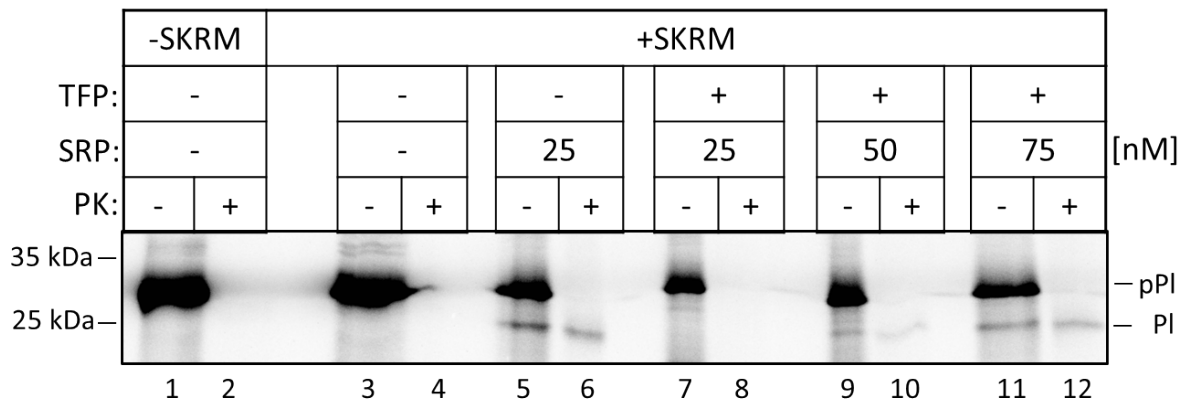
A) Das pPI-Verkürzungsprotein wurde *in vitro* in Anwesenheit von TFP und [³⁵S]Methionin im Retikulozytenlysat synthetisiert. Es wurden raue Schafsmembranen (SRM) sowie die entsprechenden Konzentrationen an 80S-Ribosomen (0 – 720 nM) und SRP (0 – 75 nM) je Ansatz hinzugegeben. Nach Translokation durch Puromycinbehandlung wurden die Proben ultrazentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Durch Gelelektrophorese wurden die radioaktiv markierten Proteine aufgetrennt und ihre Signale mit dem CR-35 Bio Phosphoimager aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte im Anschluss mit dem AIDA-Programm. Die in B) verwendeten Werte beziehen sich auf den prozentualen Anteil des prozessierten Proteins (PI-78mer) im Verhältnis zum Gesamtprotein (PI78mer × 100% / (pPI78mer + PI78mer)) des Ansatzes. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen. SRM: raue Schafsmembranen, pPI: Präprolaktin, SRP: *Signal Recognition Particle*, Rb: Ribosomen

Dieser Versuch verdeutlicht, dass bei gleichbleibender TFP- und 80S-Ribosomen-Konzentration SRP die spezifische Komponente darstellt, die die Translokation wieder ermöglichen kann.

Bisher konnte diese Konkurrenz von SRP und TFP nur mit den Verkürzungsvarianten gezeigt werden, daher wurde der Einfluss von SRP auf die Inhibierung durch TFP auch in einem nicht verlangsamten System mit dem *full length*-pPI untersucht. Bei der Translokation von pPI wurde der negative Einfluss von TFP auf die Translokation bereits gezeigt (Abb. 21 A). Im Gegensatz zu den Experimenten mit pPI-Verkürzungsproteinen, deren mRNA kein Stoppcodon besitzt, laufen hier *Targeting* und Translokation des *full length*-pPI zeitgleich ab, was natürlicheren Bedingungen entspricht. Für Translokationsexperimente in denen ein SRP-

Einfluss untersucht werden soll, ist als zellfreies Translations- und Translokationssystem der WKE als System ohne funktionelles SRP erneut am besten geeignet. Somit wurden im folgenden Experiment sowohl die Synthese als auch die Translokation von pPI je nach Probe in Anwesenheit von TFP, SRP und Hochsalz-gewaschenen Schafsmembranen (SKRM) im WKE durchgeführt.

A



B

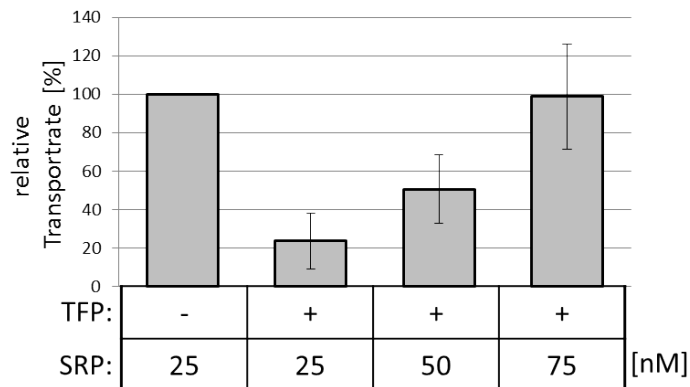


Abb. 25: Der Hemmeffekt von Trifluoperazin auf die Translokation von pPI kann durch entsprechende Konzentrationen von SRP aufgehoben werden.

A) Präprolaktin wurde *in vitro* im Weizenkeimextrakt in An- bzw. Abwesenheit von TFP (400 μ M), SRP (0 – 75 μ M) und Hochsalz-gewaschenen Schafsmembranen (0,5 eq/10 μ l) synthetisiert und transloziert. Der Proteinasen K-Verdau lieferte die Kontrolle der Translokation. Die Proben wurden mit Ammoniumsulfat gefällt, in SDS-Probenpuffer gelöst und über ein SDS-Tris-Glycin-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion und Analyse der radioaktiven Signale erfolgte mit dem CR-35 Bio Phosphoimager und AIDA. B) Die Signale des prozessierten und Proteinase K-geschützten Proteins des Versuchsansatzes ohne TFP und mit 25 nM SRP wurden gleich 100% gesetzt. Die Signale der Prozessierungsbanden unter Proteinase K-Behandlung wurden entsprechend dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Werte ergaben sich aus drei Versuchen. SKRM: Hochsalz-gewaschene, raue Schafsmembranen, TFP: Trifluoperazin, PK: Proteinase K, pPI: Präprolaktin, SRP: *Signal Recognition Particle*

Die Detektion der mit [35 S]Met radioaktiv markierten Proteine zeigte, dass eine Translokation ohne exogenes SRP unter den hier vorliegenden Bedingungen nicht möglich war (Abb. 25 A; Spur 3 und 4). Erst durch Zufuhr von 25 nM SRP, eine Konzentration, die in dieser Arbeit üblicherweise zu Translokationsexperimenten im WKE hinzugegeben wurde,

war eine Translokation zu beobachten (Abb. 25 A; Spur 5 und 6). Des Weiteren wurde eine Inhibierung der Translokation durch TFP in Gegenwart von 25 nM exogenem SRP verzeichnet (Abb. 25 A; Spur 7 und 8). In den Ansätzen mit höheren exogenen SRP-Konzentrationen (50 und 75 nM) konnte hingegen eine klare Translokation detektiert werden (Abb. 25 A; Spur 9 – 12). Eine Kompetition des Inhibitors durch SRP konnte somit auch für pPI im Weizenkeimextrakt gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass TFP hier unter cotranslationalen Bedingungen nicht als Calmodulin-Inhibitor agiert, sondern es auf zytosolischer Seite zu einer für TFP neuartigen Inhibierung der SRP-Signalsequenz-Interaktion kommt. Die hier gezeigten Daten deuten darauf hin, dass TFP über hydrophobe Wechselwirkungen an SRP oder die Signalsequenz bindet und so die Interaktion dieser beeinträchtigt. Unter Verwendung von pPI-Verkürzungsderivaten in Anwesenheit von TFP konnte gezeigt werden, dass die Translation und die Translokation an der ER-Membran selbst nicht gestört sind. Darüber hinaus ließ sich eine Inhibierung des pPI-78mers durch Zugabe von 80S-Ribosomen detektieren. Das Zufügen von SRP (≥ 50 nM) konnte diesen Inhibierungseffekt wieder aufheben. Dies deutet darauf hin, dass TFP in das *Targeting* von Proteinen eingreift und die Interaktion von SRP mit der Signalsequenz stört. Eine Translokation des *full length*-Proteins unter cotranslationalen Bedingungen ist in Anwesenheit von TFP auf Grund dessen nicht möglich.

4. Diskussion

4.1. SRP ist als zytosolischer *Targetingfaktor* an der cotranslationalen Translokation kleiner, sekretorischer Proteine in das endoplasmatische Retikulum von Säugern beteiligt

Die Translokation von sekretorischen Proteinen ins endoplasmatische Retikulum (ER) kann cotranslational oder posttranslational ablaufen. Die cotranslationale Translokation zeichnet sich durch einen SRP-abhängigen Transport des Ribosom-naszierende-Ketten (RNC)-Komplexes zur ER-Membran aus. In der posttranslationalen Translokation wird hingegen die im Zytosol bereits fertig synthetisierte Polypeptidkette SRP- und Ribosomen-unabhängig ins ER-Lumen transloziert.

Kleine Proteine werden aufgrund ihrer Kettenlänge für eine Interaktion mit SRP innerhalb des cotranslationalen *Targetings* für zu kurz angesehen. Deshalb wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass kleine Proteine über den posttranslationalen Transportweg in das ER gelangen (Müller & Zimmermann 1987 und 1988). Trotzdem liegen Hinweise auf eine cotranslationale Translokation von Proteinen dieser Größenordnung vor (Dissertation Vivica Stokes, 2011). Dies führte zu der Frage, ob die hier getesteten kleinen Säugerproteine (≤ 6 kDa) SRP-abhängig cotranslational transportiert werden können. Die Experimente wurden im WKE ohne funktionelles endogenes SRP unter der Verwendung von Hochsalz-gewaschenen Membranen und der Zugabe von exogenem SRP durchgeführt. Eine Kontrolle dieser Bedingungen ohne funktionelles SRP erfolgte durch ein Translokationsexperiment mit pPI, welches ausschließlich cotranslational transportiert wird.

Unter cotranslationalen Bedingungen wurde durch SRP-Zugabe eine Steigerung der Translokationsrate der Substratproteine pHis1, pHis3 und pStat detektiert. Dieser Effekt war bei pStat am deutlichsten zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt konnte nicht eindeutig gesagt werden, ob es sich bei dem SRP-abhängigen Transport um einen cotranslationalen Transport handelte, denn die hier verwendeten Membranen ermöglichten sowohl eine co- als auch eine posttranslationale Translokation und SRP wurde bereits eine Beteiligung an dem posttranslationalen Transport einiger *tail anchored* Proteine zugesprochen (Abell et al., 2004; Rabu et al., 2009). Demnach wäre eine Beteiligung von SRP in einem parallel ablaufenden posttranslationalen Transport ebenfalls vorstellbar gewesen. Die Durchführung des Experiments unter posttranslationalen Bedingungen zeigte, dass durch exogene SRP-Zugabe keine zum cotranslationalen Transport vergleichbare Steigerung der Translokationsrate zu verzeichnen war. Der Anteil des prozessierten Proteins stieg gar nicht (pHis1, pHis3) oder nur in sehr geringem Maße (pStat) in Anwesenheit von SRP an. Dies zeigte, dass die unter cotranslationalen Bedingungen vermehrt translozierten kleinen Proteine SRP-abhängig cotranslational transportiert wurden. Zudem wurde die Mindestlänge

von pHis3 zur Interaktion mit SRP untersucht. Hierzu konnte ein stimulierender Einfluss von SRP bis zu einer Kettenlänge von ≥ 46 AS nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von Vivica Stokes, die diese Verkürzungsvarianten in Translokationsexperimenten im Retikulozytenlysat mit endogenem SRP eingesetzt hatte (Dissertation Vivica Stokes, 2011). Die Annahme, dass zur vollständigen Exposition der Signalsequenz und Interaktion mit SRP die naszierende Kette eine Länge von 50 – 60 AS haben muss, basiert auf Translokationsexperimenten mit Präprolaktin (Matlack & Walter, 1995). Strukturprognosen zeigten für die Sequenz von pPI helikale Bereiche (Strukturprognoseprogramm „CFSSP“ Chou & Fasman *Secondary Structure Prediction Server*). Auch die hier untersuchten kleinen Säugerproteine weisen Sequenzbereiche auf, für die helikale Strukturen vorhergesagt werden. Neueren Studien zufolge ist es nicht ungewöhnlich, dass α -Helices bereits innerhalb gewisser Bereiche des ribosomalen Tunnels ausgebildet werden können (Bhushan *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2016; Nilsson *et al.*, 2015; Wilson & Beckmann, 2011). Der ribosomale Tunnel verfügt über eine Länge von 80 – 100 Å und eine Breite von 10 – 20 Å (1 Å = 100 pm). Während der Translation kann dieser ca. 30 AS einer langgestreckten naszierenden Kette umschließen (Kramer *et al.*, 2009). Bei Proteinen mit Sequenzbereichen für α -Helices könnte die naszierende Kette gefaltet im ribosomalen Kanal vorliegen. In solch einem Fall umschließt der ribosomale Tunnel bis zu 60 AS (Kramer *et al.*, 2009). Im Vergleich zu einer langgesteckten naszierenden Kette wären demnach für naszierende Ketten mit helikalen Strukturen zusätzliche aufeinanderfolgende Aminosäuren notwendig, bis die Signalsequenz aus dem ribosomalen Tunnel austreten kann. Diese mögliche Faltung innerhalb des ribosomalen Tunnels macht es noch unwahrscheinlicher, dass die Signalsequenz der hier verwendeten kleinen Substratproteine und der pHis3-Verkürzungsproteine ausreichend exponiert für eine direkte cotranslationale Interaktion mit SRP vorliegt.

Die dennoch beobachtete translokationssteigernde Wirkung von SRP bis zu einer Mindestlänge von 46 AS könnte durch die Interaktion von SRP mit dem RNC-Komplex in dem sogenannten *scanning*-Modus begründet werden. Studien von Ogg und Walter wie auch von Voorhees und Hegde zeigten mittels Kryoelektronenmikroskopie (Cryo-EM), dass die Anlagerung von SRP an den RNC-Komplex nicht erst mit dem Austritt der Signalsequenz vorliegt, sondern diese Interaktion bereits vorher stattfinden kann. Wird keine Signalsequenz detektiert, löst sich SRP wieder ab. Andernfalls rekrutiert SRP den RNC-Komplex zur ER-Membran. SRP befindet sich dabei in einem sog. *scanning*-Modus, um noch im ribosomalen Tunnel verborgene Signalsequenzen zu identifizieren (Ogg & Walter, 1995; Voorhees und Hegde, 2015). Bei His3-Vorläuferproteinen ≥ 46 AS verbleibt SRP offensichtlich lange genug an dem RNC-Komplex bis eine Interaktion zur Signalsequenz auch nach Termination der Translation eingegangen werden kann. Bei Vorläuferproteinen ≤ 42 AS könnte die Zeitspanne bis zur Termination und Austritt der Signalsequenz zu lang sein. SRP würde in diesem Fall den *scanning*-Modus verlassen und sich vom RNC-Komplex ablösen. Ein SRP-abhängiges cotranslationales *Targeting* der His3-Vorläuferproteine ≤ 42 AS ist dann nicht möglich.

In den von Jungnickel und Rapoport (1995) durchgeführten *Crosslinking*-Experimenten mit pPI-Verkürzungsvarianten (43mer – 86mer) ohne Stoppcodon auf mRNA-Ebene definierten sie eine Mindestlänge von 51 AS, die zu der Interaktion mit SRP und für das *Targeting* zu der ER-Membran benötigt wird. Die gefundenen *Crosslinking*-Partner waren SRP54 und Sec61 α . Daneben beobachteten sie eine Annäherung der Verkürzungsvariante 43mer zu einem 32 – 34 kDa großen Protein. Sie vermuteten, dass es sich bei diesem Protein um den *nascent chain-associated complex* (NAC) handeln könnte. Translokationsexperimente mit den erzeugten pPI-Verkürzungsproteinen wurden von dieser Arbeitsgruppe nicht vorgenommen. Obwohl in diesen *Crosslinking*-Experimenten photoreaktive Substanzen zum Einsatz kamen und es sich um Verkürzungsvarianten, die kein Stoppcodon auf der mRNA besaßen, handelte, liegt im Vergleich dazu die hier gefundene Mindestlänge von 46 AS für einen SRP-abhängigen cotranslationalen Transport von His3-Verkürzungsvarianten in einem ähnlichen Proteinlängenbereich.

Lakkaraju *et al.* (2012) wiesen dagegen nach, dass Verkürzungsproteine >160 AS SRP-abhängig zur ER-Membran transportiert werden. Substratproteine \leq 100 AS gelangen über einen Sec62-abhängigen posttranslationalen Transportweg zur ER-Membran, während Substratproteine zwischen 120 und 160 AS beide Transportwege einschlagen können. Zur Unterdrückung der SRP-Funktion im cotranslationalen *Targeting* wurde bei Lakkaraju *et al.* nicht das Weizenkeimlysat verwendet, sondern über RNA-Interferenz SRP14, SR α und Sec62 in HeLa-Zellen herunterreguliert. Ob es sich bei den Sec62-abhängig transportierten Substratproteinen um posttranslational transportierte Proteine handelte, wurde *in vitro* im Retikulozytenlysate untersucht. Zudem verwendeten sie für ihre Untersuchungen Ausgangsproteine, die alle größer als die hier eingesetzten Ausgangsproteine waren. Möglicherweise sind die beobachteten Unterschiede zur Proteinmindestlänge auf die verschiedenen Substratproteine zurückzuführen. In den für diese Arbeit durchgeführten Translokationsexperimenten wurden kleinere Substratproteine verwandt.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass kleine Säugerproteine sowohl SRP-abhängig cotranslational als auch SRP-unabhängig posttranslational in das ER transportiert werden können. Es ist vorstellbar, dass mit der Möglichkeit der Nutzung beider Transportwege die Translokationseffizienz von kleinen Proteinen in das ER erhöht werden kann. Auch wenn ein cotranslationaler Transport von kleinen Proteinen prinzipiell möglich ist, so ist das Zeitfenster zur Interaktion von SRP mit der Signalsequenz kleiner als bei größeren Proteinen. Zudem könnte zum Zeitpunkt einer Sekretion von vielen größeren Proteinen, die ausschließlich den cotranslationalen Transportweg einschlagen, die Kapazität der an dem cotranslationalen *Targeting* beteiligten Komponenten überlastet sein. Die drohende Proteolyse kleiner Peptide, die vor einer SRP-RNC-Interaktion bereits in das Zytosol entlassen wurden, könnte durch den alternativen posttranslationalen Transportweg verhindert werden.

Um der Gefahr vor Proteolyse oder Verdrängung durch größere Proteine zu entgehen, stellt sich an dieser Stelle die Frage, warum kleine Proteine nicht ausschließlich den posttranslationalen Transportweg nutzen. Durch die bereits verfügbaren Cryo-EM-Strukturanalysen zur Visualisierung der naszierenden Ketten innerhalb des ribosomalen

Tunnels konnte gezeigt werden, dass der ribosomale Kanal nicht nur eine passive Funktion innerhalb des cotranslationalen Transports einnimmt, sondern z.B. an der Regulation der Translation der zu synthetisierten Proteine beteiligt ist. Eine Blockierung der Translation benötigt eine spezifische Interaktion zwischen bestimmten Bereichen der naszierenden Kette und den Komponenten des ribosomalen Tunnels (zusammengefasst in Wilson & Beckmann, 2011). Des Weiteren spekulierten Wilson und Beckmann, dass die Interaktion zwischen naszierender Kette und ribosomalem Tunnel eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen der Synthese eines Proteins und den weiter benötigten *Targetingfaktoren* und Chaperonen sowie der folgenden Translokation an der ER-Membran einnimmt. Das *Targeting* über den RNC-Komplex innerhalb des cotranslationalen Transports kleiner Proteine könnte somit wichtig für eine funktionierende Translation und Translokation sein. Der Umfang der gebildeten *Targetingfaktoren* oder Chaperone könnte ebenfalls den parallel ablaufenden posttranslationalen Transport regulieren. Diese Aspekte sprechen dafür, dass die Möglichkeit über beide Transportwege zu der ER-Membran transportiert zu werden auch für kleine Proteine sinnvoll ist.

4.2. Die Bedeutung von Calmodulin als *Targetingfaktor* in der co- und posttranslationalen Translokation kleiner, sekretorischer Säugerproteine

Da bisher nicht untersucht wurde, ob CaM eine Rolle als *Targetingfaktor* im Säugersystem spielt, wurde hier der Einfluss von CaM als potenzielle *Targtingsubstanz* untersucht.

Es wurde zunächst eine Interaktion zwischen CaM und den hier untersuchten kleinen Säugerproteinen (pHis3 und pStat) wie auch den Kontrollproteinen ppCecA und pPI nachgewiesen. Dies geschah mit Affinitätschromatographie unter Verwendung einer His-getaggen Variante von CaM, welche mit Kalzium beladen wurde (Ca²⁺CaM-His₆).

Bei den Proteinen pHis3 und pPI kam es zu einer offensichtlichen Hintergrundbindung auch in Abwesenheit von Ca²⁺CaM-His₆. In Anwesenheit von Ca²⁺CaM-His₆ ließ sich jedoch zusätzlich ein Anstieg der radioaktiven Signalintensitäten dieser Proteine in den Elutionen und *Bead*-Fraktionen verzeichnen, sodass auch hier von einer Interaktion zwischen Calmodulin und Protein ausgegangen werden konnte. Die Hintergrundbindung kann damit erklärt werden, dass die beiden Proteine pHis3 und pPI jeweils 7 Histidine in ihrer Aminosäuresequenz besitzen. Die Sequenz von PräprocecropinA und Prästatherin beinhaltet im Vergleich dazu keine Histidine (Tab. 3). pHis3 und pPI verfügen daher über ein höheres Potential, schon von sich aus mit den Imidazolringen ihrer Histidine an immobilisiertes Ni²⁺ zu binden und später über Imidazol mit abgelöst zu werden.

Prähistatin3:

MKFFVFALIL ALMLSMTGAD SHAKRHHGYK RKFHEKHSH RGYRSNYLYD N

PräprocecropinA:

MNFSRIFFV FACLTALAMV NAAPEPKWKL FKKIEKVGQN IRDGIKAGP AVAVVGQATQ IAKG

Prästatherin:

MKFLVFALIL ALMVSMIGAD SSEEKFLRRI GRFGYGYGPY QPVPEQPLYP QPYQPQYQQY TF

Präprolaktin:

MDSKGSSQKG SRLLLLLVVS NLLCQGVVS TPVCPNGPGN CQVSLRDLFD RAVMVSHYIH
 DLSSEMFNEF DKRYAQGKGF ITMALNSCHT SSLPTPEDKE QAQQTHHEVL MSLILGLLRS
 WNDPLYHLVT EVRGMKGAPD AILSRAIEIE EENKRLLEGM EMIFGQVIPG AKETEPYPVW
 SGLPSLQTKD EDARYSAFYN LLHCLRRDSS KIDTYLKLLN CRIIYNNNC

Tab. 3: Die in der Aminosäuresequenz vorkommenden Histidine führen zu einer unspezifischen Bindung der Imidazolringe an immobilisiertes Ni²⁺.

Die Histidine wurden rot markiert. Die Sequenzen von Prähistatin3 (P15516), PräprocecropinA (P01507), Prästatherin (P02808) und Präprolaktin (P01239) stammen aus UniprotKB.

Der Bindungsort von $\text{Ca}^{2+}\text{CaM-His}_6$ am Substratprotein konnte bei allen hier verwendeten Substratproteinen auf die Signalsequenz eingegrenzt werden, da die in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten ohne Signalsequenz keine bzw. keine erhöhte Bindung zum $\text{Ca}^{2+}\text{CaM-His}_6$ zeigten.

Diese Ergebnisse zur Interaktion von CaM mit der Signalsequenz der untersuchten Substratproteine gehen einher mit den Beobachtungen von Shao und Hegde (2011), welche eine Signalsequenz-spezifische Annäherung von CaM an das Insektenprotein ppCecA über *Crosslinking*-Experimente nachweisen konnten.

Überraschenderweise konnte auch eine Interaktion von CaM mit dem streng cotranslational transportierten pPI detektiert werden. pPI wurde zunächst nur als Kontrollprotein und als ein Vertreter für Proteine höheren Molekulargewichts (26 kDa) eingesetzt. Da CaM bisher nur eine Rolle als *Targetingfaktor* in der posttranslationalen Translokation zugeschrieben wird, war diese Interaktion zunächst verwunderlich. Es konnte jedoch durch andere Studien gezeigt werden, dass Ca^{2+} -CaM an amphiphile Helices (Fischer *et al.*, 1994) und an hydrophobe, bereits abgespaltene Signalsequenzfragmente von pPI und dem *HIV-1 envelope protein p-gp160* binden kann (Martoglio *et al.*, 1997). Ergebnisse aus *Crosslinking*-Experimenten aus der Dissertation von Neuhof (2000) deuteten darauf hin, dass die Signalsequenz des pPI86mer mit CaM interagiert. Dies lässt die zunächst unerwartete Zunahme der Bindungskapazität des streng cotranslational transportierten Vergleichs-proteins pPI in Gegenwart von $\text{Ca}^{2+}\text{CaM-His}_6$ weniger überraschend erscheinen.

Dies führt zu der Hypothese, dass CaM mit diversen, vielleicht sogar mit jeglichen, hydrophoben Signalsequenzen interagiert, unabhängig von der Länge der Polypeptidkette oder, ob diese über den cotranslationalen oder posttranslational Transportweg zu der ER-Membran transportiert wird. Die Tatsache, dass CaM ein potentieller Bindungspartner für Signalsequenzen von Proteinen ist, führt zu der Spekulation, dass CaM auch innerhalb des cotranslationalen *Targetings* eine Bindung zu der Signalsequenz naszierender Ketten eingehen kann. Möglicherweise spielt CaM auf diese Weise auch eine Rolle in dem cotranslationalen *Targeting* von Proteinen zu der ER-Membran. Bisher wurden noch keine Daten bezüglich einer Funktion des CaM innerhalb des cotranslationalen *Targetings* veröffentlicht.

Um einen Einfluss von CaM auf das cotranslationale Targeting zu untersuchen, wurden Translokationsexperimente mit den Substratproteinen im depletierten Retikulozytenlysat unter Zugabe von exogenem CaM durchgeführt. Alle drei Substratproteine zeigten bereits in Abwesenheit von CaM eine Translokationsrate von 30 – 40%. Basierend auf den hier in der Arbeitsgruppe gewonnenen Erfahrungen mit *in vitro* Translokationsexperimenten in zellfreien Systemen entspricht dies einer sehr guten Translokationsrate. Durch Zugabe von exogenem CaM verblieben die Translokationsraten konstant gut und konnten nicht wesentlich gesteigert werden. Durch den Einsatz des CaM-Inhibitors TFP zur Inhibierung von eventuell verliehenem Rest-CaM konnte zwar eine eindeutige Inhibierung der Translokation beobachtet werden, aber diese konnte im Gegensatz zu den Translokationsexperimenten unter posttranslationalen Bedingungen durch exogene CaM-Zugabe nicht wieder aufgehoben werden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Neuhof (2000). Ihre Dissertationsergebnisse deuteten darauf hin, dass SRP im Vergleich zu CaM bevorzugt an Signalsequenzen gebunden wird, obwohl CaM im Vergleich zu SRP (10 nM) in ihren Untersuchungen im Überschuss (3 – 30 μM ; Rogers & Strehler, 1996) vorhanden war. Diese Tatsache erklärte sie mit einer vermuteten höheren Affinität von SRP zum RNC-Komplex, was später durch Flanagan *et al.*, (2003) mit detektierten K_D -Werten für SRP im nanomolaren Bereich bestätigt wurde.

Die Translokationsexperimente von Erdmann *et al.* (2011) erweckten zunächst den Anschein, dass CaM eine translokationssteigernde Wirkung auch unter cotranslationalen Bedingungen hatte. In einem Translokationsexperiment mit pPI86mer bei einer Konzentration von 200 μM Ca^{2+} ohne exogenes CaM war eine Translokation nicht zu beobachten. Erst durch Zufügen von 60 μM exogenem CaM wurde pPI86mer prozessiert. Da auch Shao und Hegde (2011) einen störenden Effekt auf die Translokation bei einer Ca^{2+} -Konzentration $> 100 \mu\text{M}$ beobachteten, ist bei Erdmann *et al.* eher davon auszugehen, dass CaM in diesem Fall vielmehr eine chelatierende Funktion übernimmt. CaM reduziert die Konzentration an freiem Kalzium durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen. Eine Titration mit verschiedenen CaM-Konzentrationen wurde bei Erdmann *et al.* nicht vorgenommen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CaM zwar potenziell an Signalsequenzen binden kann, aber unter cotranslationalen Bedingungen CaM keine Alternative zu dem *Targetingfaktor* SRP zu sein scheint. Um abschließend zu klären, ob CaM eine Rolle in dem cotranslationalen *Targeting* übernimmt, müssten Translokationsexperimente im WKE durchgeführt werden. Durch den Einsatz von WKE als zellfreies Lysat zusammen mit Hochsalz-gewaschenen Membranen würde dem Experiment funktionelles SRP entzogen werden. Durch Zugabe von CaM könnte untersucht werden, ob zusätzliches exogenes CaM doch die Rekrutierungsfunktion von SRP in der cotranslationalen Translokation übernehmen könnte. Die physiologischen Konzentrationen von Pflanzen-Calmodulin scheinen in diesem Zusammenhang nicht ausreichend zu sein, denn ein cotranslatationaler Transport von pPI ist ohne exogenes SRP nicht möglich (Abb. 8).

Im Gegensatz zu den Translokationsversuchen unter cotranslationalen Bedingungen zeigten die Autoradiogramme eine deutliche Steigerung der posttranslationalen Translokation von pHis3, ppCecA und pStat nach Zugabe von 15 μM bzw. 60 μM exogenem CaM im depletierten RL. Der translokationssteigernde Effekt durch exogenes CaM war bei den Proteinen pHis3 und ppCecA am deutlichsten zu beobachten (Abb. 17). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der bereits gezeigten CaM-Abhängigkeit des Mottenproteins ppCecA im posttranslationalen Transport (Shao & Hegde, 2011) und deutet darauf hin, dass zytosolische Substanzen für den posttranslationalen Transport zur ER-Membran eine wichtige Rolle spielen. Die Funktion von CaM als *Targetingfaktor* ist offenbar speziesübergreifend und lässt sich sowohl mit Insektenproteinen als auch – wie hier gezeigt – mit Säugerproteinen nachweisen.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass CaM nicht nur einen translokationssteigernden Einfluss auf die Translokation von kleinen sekretorischen

Proteinen hat, sondern dass für die posttranslationale Translokation von pHis3 und ppCecA CaM sogar essentiell ist. Dies konnte durch die Verwendung von CaM-Inhibitoren gezeigt werden (Abb. 18). Der inhibitorische Effekt konnte durch Zugabe von exogenem CaM wieder aufgehoben werden. Dies beweist, dass die Inhibitoren spezifisch gegen CaM gerichtet sind. Eine Erhöhung der CaM-Konzentration bewirkt eine Kompetition des Inhibitors, sodass CaM wieder für das posttranslationale *Targeting* zur Verfügung steht. Lediglich bei dem Substratprotein Prästatherin konnte unter der Verwendung der drei CaM-Inhibitoren ohne exogenes CaM schwache Translokationsbanden prozessierten Proteins detektiert werden (Abb. 18 E und F). Ausgehend von einer eventuell verbliebenen Restmenge an endogenem CaM des eingesetzten depletierten Retikulozytenlysats benötigen einige Proteine möglicherweise weniger CaM für ihre Translokation.

Wahrscheinlicher ist es hingegen, dass die schwachen detektierten Stat-Translokationsbanden auch in Abwesenheit von CaM mit einem parallel ablaufenden Rekrutierungsweg zur ER-Membran zu erklären sind. Diese Vermutung wird durch die bereits in 3.1.2 beschriebenen Ergebnissen zum Einfluss von SRP auf die posttranslationale Translokation gestützt. Ausgerechnet bei dem Substratprotein pStat wurde im Gegensatz zu den anderen untersuchten Substratproteinen ein leichter Anstieg der posttranslationalen Translokationsrate durch exogene SRP-Zufuhr beobachtet, was auf eine Involvierung von SRP in das posttranslationale *Targeting* von pStat hindeutet. Darüber hinausgehend erbachten Johnson *et al.* (2012) den Nachweis zu TRC40 als *Targetingsubstanz* nicht nur für die Substratproteine ppCecA und pApelin, sondern auch für das Protein pStat. TRC40 war zunächst für seine Rolle im posttranslationalen *Targeting* von *tail anchored* (TA) Proteinen bekannt (Favaloro *et al.*, 2008; Stefanovic & Hegde 2007). Strukturell und funktionell wird es als das Homolog zu Get3 in Hefen gesehen (Bozkurt *et al.*, 2009; Mateja *et al.*, 2009; Suloway *et al.*, 2009; Yamagata *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass es offensichtlich ein Netzwerk von *Targetingsubstanzen* in dem posttranslationalen *Targeting* gibt. Welche Rekrutierungsproteine bevorzugt an die Signalsequenzen der Polypeptidketten binden und ob das Fehlen eines *Targetingfaktors* durch einen anderen ersetzt werden kann, scheint von Protein zu Protein unterschiedlich zu sein. Die hier erzielten Ergebnisse deuten auf eine bevorzugte Bindung von pHis3 und ppCecA an Calmodulin hin, während pStat auch in Abwesenheit von CaM in geringem Maße alternative Wege nutzen kann. Es ist nicht auszuschließen, dass bei der Wahl der *Targetingsubstanzen* auch Unterschiede in der Hydrophobizität bei der Interaktion zwischen Rekrutierungsprotein und Signalsequenz eine Rolle spielen (Ng *et al.*, 1996; Rabu *et al.*, 2008). Wie in Tab. 4 dargestellt, unterscheidet sich jedoch die Anzahl der hydrophoben Aminosäuren (AS) in der Signalsequenz der betrachteten Substratproteine nicht wesentlich. Für einen besseren Vergleich wurden die GRAVY (*grand average of hydropathy*)-Werte für die einzelnen Signalsequenzen herangezogen und miteinander verglichen. Der GRAVY-Wert ergibt sich aus den addierten Hydrophobizitätswerten (Kyte & Doolittle, 1982), die durch die Anzahl der Aminosäuren der Sequenz dividiert werden. Je positiver der GRAVY-Wert, umso hydrophober ist die Sequenz. Der GRAVY-Wert für pHis3 beträgt 1,979, für ppCecA 1,591 und für pStat 2,274. Die Signalsequenz von pStat verfügt somit über den höchsten GRAVY-Wert und ist im Vergleich zu den anderen Proteinen

am hydrophobsten. Möglicherweise bedeutet dies, dass TRC40 bevorzugt hydrophobere Signalsequenzen bindet als CaM.

Protein	Signalsequenz	GRAVY-Wert
pHis3	MKFFVFALIL ALMLSMTGA	1,979
ppCecA	MNFSRIFFFV FACLTALAMV NA	1,591
pStat	MKFLVFAMIL ALMVSMIGA	2,274

Tab. 4: Die Signalsequenz von Prästatherin (P02808) besitzt den höchsten GRAVY-Wert und ist somit am hydrophobsten.

Es wurden ausschließlich die Signalsequenzen der Substratproteine aufgelistet. Die hydrophoben Aminosäuren wurden grau hinterlegt. Die Sequenzen stammen aus UniprotKB. Die GRAVY-Werte wurden auf der Website <http://web.expasy.org/protparam/> errechnet.

Die treibende Kraft für die Rekrutierung der Polypeptidkette zu der ER-Membran könnte die Bindung von Ca^{2+} -CaM an ein von Erdmann *et al.* (2011) entdecktes IQ-Motif am Sec61-Kanal darstellen. Dieses IQ-Motif befindet sich am zytosolischen n-Terminus der α -Untereinheit des Sec61-Komplexes. Durch die Kalzium-abhängige Bindung von CaM an das IQ-Motif schließt der Sec61-Kanal und ein Ca^{2+} -Efflux aus dem ER-Lumen in das Zytosol wird verhindert. Eine Beeinträchtigung der co- oder posttranslationalen Translokation von präsekretorischen Proteinen in Anwesenheit von Calmodulin konnte nicht verzeichnet werden. Zudem beobachteten sie eine Ca^{2+} -unabhängige Bindung von CaM an aufgereinigte, rekonstituierte Sec61-Komplexe, welche nicht in einem Verschluss des Sec61-Kanals resultierte. Bioinformatische Analysen ließen darauf schließen, dass es eine zweite Ca^{2+} -unabhängige Bindungsstelle am Sec61 γ geben könnte (Erdmann *et al.*, 2011). Für die hier in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bedeutet dies, dass an ein Polypeptid gebundenes Ca^{2+} -CaM entweder an das IQ-Motif des Sec61 α binden könnte und die Translokation trotz Schließen des Sec61-Kanals ungestört abläuft oder der Ca^{2+} -CaM-Polypeptid-Komplex nutzt die zweite vermutete Bindungsstelle am Sec61 γ .

Aufgrund der erzielten Ergebnisse kann spekuliert werden, dass *Targetingfaktoren* ein Instrument zur Regulation der Proteintranslokation und somit der Weiterleitung der Proteine an ihre Zielorte darstellen. Während ein Einfluss von CaM auf den posttranslationalen Transport bei allen getesteten kleinen Substratproteinen zu beobachten war, deutete sich eine Funktion von SRP in dem posttranslationalen Transport nur für das Substratprotein pStat an. So könnten gewisse *Targetingsubstanzen* (wie möglicherweise CaM) proteinübergreifend Einfluss nehmen und andere *Targetingsubstanzen* (wie möglicherweise SRP) nur spezielle Proteine regulieren.

4.3. Trifluoperazin als Inhibitor in der cotranslationalen Translokation

Es konnte gezeigt werden, dass die cotranslationale Translokation auch ohne exogenes CaM im depletierten Retikulozytenlysat ablaufen konnte und dass eine Zugabe von exogenem CaM im Gegensatz zu den Translokationsversuchen unter posttranslationalen Bedingungen zu keiner Erhöhung der Translokationsrate führte. Aufgrund dessen war der eindeutige Inhibierungseffekt durch TFP umso überraschender. Anders als im posttranslationalen Translokationsversuch konnte die Inhibierung nicht durch exogenes CaM aufgehoben werden. Dies ließ die Vermutung zu, dass TFP im cotranslationalen Transport nicht als CaM-Inhibitor agierte, sondern eine bislang unbekannte CaM-unabhängige Hemmfunktion ausführt. Weitere Experimente dahingehend zeigten, dass eine inhibierende Wirkung von TFP auf die pPI-Verkürzungsvarianten pPI78mer und pPI86mer nicht bzw. weniger effektiv auftrat. In Anwesenheit von TFP behinderten 80S-Ribosomen die Translokation des pPI78mers. Dieser hemmende Einfluss der 80S-Ribosomen konnte jedoch durch eine Zugabe von SRP aufgehoben werden. Die Inhibierung des *full length*-pPI durch TFP wurde ebenfalls durch höhere Konzentrationen an SRP aufgehoben. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass TFP auf der Ebene des cotranslationalen *Targetings* die Interaktion von SRP und Signalsequenz stört. Das heißt, hier konnte nachgewiesen werden, dass sobald SRP für ein effektives *Targeting* benötigt wird, eine Translokation in Anwesenheit von TFP nicht stattfindet.

Die Dissertationsergebnisse von Nico Schäuble (2013) deuten darauf hin, dass weitere etablierte CaM-Antagonisten CaM-unabhängig die cotranslationale Translokation inhibieren (Ophiobolin A, Calmidazolium und Phenoxybenzamin). Eine derartige Inhibierung mit diesen Inhibitoren konnte er unter postrationalen Bedingungen nicht beobachten. In dem Modell von Schäuble wirkt CaM als Regulator der Ca^{2+} -Konzentration des ER-Lumens durch Schließen oder Öffnen des Sec61-Kanals abhängig von der Bindung des CaM an das IQ-Motif, welches an der Sec61 α -Untereinheit lokalisiert ist. Eine zu hohe Ca^{2+} -Konzentration wirkt sich negativ auf die Translokation aus. So zeigten Shao und Hegde (2011) eine posttranslationale Translokation von ppCecA bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentration von 100 nM, während ab einer Konzentration von 100 μM die Translokation beeinträchtigt wurde. Demnach muss es sich bei den drei oben genannten Inhibitoren um eine CaM-unabhängigen Inhibierung handeln, denn sonst wäre durch CaM-Inaktivierung, Öffnen des Sec61-Kanals und Ca^{2+} -Efflux ebenso die posttranslationale Translokation betroffen gewesen. Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Experimenten mit CaM-Inhibitoren konnte Schäuble jedoch keinen Einfluss von TFP auf die co- oder auf die postrationale Translokation sehen. Er postulierte dies für die auch hier verwendeten Substratproteine pPI und ppCecA, erbrachte aber keinen Nachweis für ppCecA durch eine entsprechende Abbildung. Der hier in dieser Arbeit beobachtete inhibierende Einfluss von TFP auf die cotranslationale Translokation kann nicht auf einen störenden Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration zurückgeführt werden, da unter TFP-Bedingungen und Zugabe von

zusätzlichem SRP ein cotranslationaler Transport mit pPI möglich ist (Abb. 25). Dies bestätigt, dass es sich bei der Hemmung der cotranslationalen Translokation der hier untersuchten Proteine um eine CaM-unabhängige Inhibierung durch TFP handeln muss.

Eine membranschädigende Wirkung von TFP, wie es von Haßdenteufel *et al.* (2011) ab einer TFP-Konzentration von >150 μM erwähnt wurde, konnte hier nicht festgesellt werden. In Anwesenheit von 200 μM TFP konnten die pPI-Verkürzungsvarianten über die ER-Membran transloziert werden und lagen Proteinase-K-geschützt vor (Abb. 21 und Abb. 22). Eine mögliche Permeabilisierung der verwendeten ER-Mikrosomen durch TFP als Grund für die detektierte Inhibierung der *full length*-Substratproteine konnte hier somit ausgeschlossen werden.

Generell sollte bei Experimenten mit chemischen/synthetischen Inhibitoren bedacht werden, dass diese unbemerkt auch in andere Reaktionsmechanismen eingreifen können. Deshalb ist es von Vorteil, wenn der zu untersuchende Prozess durch weitere Inhibitoren mit gleicher, bekannter Wirkung untersucht wird. Dies wurde hier unter Verwendung eines zweiten CaM-Inhibitors (W7) umgesetzt (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigte der Einsatz von W7 in dem cotranslationalen Translokationsexperiment bei allen getesteten Proteinen eine Hemmung der Translokation. Eine exogene CaM-Gabe konnte die W7-Inhibierung nicht wieder aufheben. Beide synthetischen Substanzen, die mit ihren aromatischen Gruppen (Phenotiazin bei TFP und Naphtalinring bei W7) in die hydrophoben Bindetaschen des CaM binden, rufen eine Konformationsänderung des CaM hin zur globulären Form hervor und verhindern damit die Interaktion zum Substratprotein (Cook *et al.*, 1994; Osawa *et al.*, 1998; Vandonselaar *et al.*, 1994). Dementsprechend konnte hier gezeigt werden, dass zwei Inhibitoren mit bekanntem, identischem Wirkungsmechanismus den gleichen Inhibierungseffekt in der cotranslationalen Translokation hervorrufen. Dies unterstützt die Hypothese, dass es einen zweiten CaM-unabhängigen Angriffspunkt von TFP und W7 zur Inhibierung der cotranslationalen Translokation zu geben scheint.

4.3.1. Inhibiert TFP das *Targeting* auf Seiten von Ribosom, SRP oder der Signalsequenz?

Nach den hier in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen greift TFP in das cotranslationale *Targeting* von Proteinen ein. Ein möglicher Angriffspunkt von TFP könnte sich am Ribosom befinden und die Interaktion zwischen SRP und Ribosom stören. Daneben wäre die Bindung von TFP an die Signalsequenz oder an SRP vorstellbar, was in einer gestörten Interaktion von Signalsequenz mit SRP resultieren würde.

Die hier eingesetzte Menge an TFP (200 μM) steht einer physiologischen SRP-Konzentration von ca. 10 nM gegenüber (Siegel & Walter, 1988), was einem 20.000-fachen Überschuss an TFP gegenüber SRP entspricht. Die Dissoziationskonstanten (K_D) von SRP mit unprogrammierten Ribosomen (71 nM), mit Ribosomen mit naszierender Kette und umschlossener Signalsequenz (RNC-Komplex; 8 nM) und mit RNC-Komplexen mit

exponierter Signalsequenz (0,05 – 0,38 nM) fallen in den nanomolaren Bereich (Flanagan *et al.*, 2003). Da die Bindungsaffinitäten zwischen SRP und Ribosom – insbesondere wenn die Signalsequenz bereits den ribosomalen Kanal verlassen hat – sehr hoch sind, ist es eher unwahrscheinlich, dass TFP in die Interaktion zwischen SRP und Ribosom eingreift. Lediglich der erhebliche Überschuss an TFP könnte der hohen Affinität von SRP zum Ribosom entgegenwirken.

Ein Argument für die Bindung von TFP an die Signalsequenz ist die Tatsache, dass nicht alle aus dem Ribosom austretenden Signalsequenzen durch SRP vor Fremdbindung geschützt werden. Schätzungen, wie viele translatierende Ribosomen auf ein SRP-Molekül entfallen, deuten darauf hin, dass in *E.coli*, in Hefen wie auch in Säugerzellen ein SRP-Molekül auf 10 – 100 translatierende Ribosomen entfällt (Flanagan *et al.*, 2003; Jensen & Petersen, 1994; Ogg & Walter, 1995). Demnach ist es gut vorstellbar, dass nicht jedes translatierende Ribosom SRP-gebunden vorliegt. Eine Abschirmung der aus dem ribosomalen Kanal austretenden Signalsequenz bliebe aus und TFP könnte in diesem Fall mit der Signalsequenz in Interaktion treten.

Zudem zeigen Kristallisationsstudien zur Untersuchung der SRP-Signalsequenz-Interaktion, dass die Signalsequenz im ribosomalen Tunnel bereits eine helikale Struktur zur Stabilisierung annimmt (Clemons *et al.*, 1999; Frauenfeld *et al.*, 2011). Ob diese helikale Struktur eine zwingende Voraussetzung für eine erfolgreiche Erkennung und Bindung durch SRP54 ist, ist noch unklar. Obwohl sich Signalsequenzen prinzipiell innerhalb des Translokons wieder entfalten können (Wilson & Beckmann, 2011), scheint beim Austritt aus dem ribosomalen Tunnel die helikale Struktur zu dominieren. Das Strukturvorhersageprogramm „Jpred v.4“ prognostiziert für alle hier verwendeten Proteine (pPI, pHis3, ppCecA und pStat) eine helikale Anordnung. Sollten bei der SRP-Signalsequenz-Interaktion helikale Strukturen tatsächlich eine notwendige Struktur darstellen, so spräche dies gegen eine direkte Wechselwirkung von TFP/ W7 mit SRP. Denn bei den verwendeten Inhibitoren handelt es sich um synthetische Substanzen ohne helikale Strukturen. TFP und W7 wiederum sind in der Lage, an Aminosäureresten von Helices der CaM-Bindetasche zu binden. Vandonselaar *et al.* (1994) zeigte, dass jeweils ein TFP-Molekül in der n-terminalen und c-terminalen Domäne des CaM binden kann und gleichzeitig bis zu zwei weitere TFP Moleküle direkt mit der verbindenden Helix zwischen diesen beiden Domänen interagieren können. Aufgrund dieser Eigenschaft ist eher davon auszugehen, dass der inhibierende Effekt im cotranslationalen Transport durch eine Bindung von TFP an die helikale Signalsequenz hervorgerufen wird.

Das genauere Betrachten der Bindungsmechanismen des Inhibitors TFP mit CaM zeigt jedoch erstaunliche Parallelen zur Interaktion des SRP mit der n-terminalen Signalsequenz oder einer Transmembrandomäne (TMD) einer naszierenden Kette. CaM besitzt zwei Domänen, die jeweils eine Bindetasche beinhalten. Die Interaktion eines Substratproteins mit CaM führt zu einer Konformationsänderung von der langgestreckten, offenen Form in die globuläre, geschlossene Form (Ikura *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1992 und 1993). Wird CaM durch TFP gehemmt, besetzt dieser Inhibitor exakt die Bindetaschen der Substratproteine für CaM und führt zu einer strukturellen Veränderung sehr ähnlich den strukturellen

Veränderungen, die normalerweise durch die Substratprotein-Bindung hervorgerufen werden (Cook *et al.*, 1994; Vandonselaar *et al.*, 1994). Eine ähnliche hydrophobe Bindetasche ist in der M-Domäne des SRP54 zur Interaktion mit der Signalsequenz zu finden (Bernstein *et al.*, 1989; Keenan *et al.*, 1998; Zopf *et al.*, 1990). Insofern ist es gut vorstellbar, dass TFP an die Bindetasche des SRP54 bindet, eine Interaktion von SRP mit der Signalsequenz unterbindet und so in das cotranslationale *Targeting* von Proteinen eingreift. Auch nach dem bereits erwähnten Modell von Ogg & Walter (1995) bzw. Voorhees und Hegde (2015), wonach SRP zunächst in einem sog. *scanning*-Modus an das Ribosom bindet und überprüft, ob die austretende naszierende Kette über eine Signalsequenz verfügt, ist in diesem *scanning*-Modus die Bindetasche des SRP54 frei und TFP könnte an diese binden. Für eine Interaktion von TFP mit SRP spricht zudem die Flexibilität der Bindetasche von SRP. Proteine, die für den Transport in das ER (mit n-terminaler Signalsequenz) oder den Einbau in die ER-Membran (mit TMD) bestimmt sind, besitzen keine einheitlichen Signalsequenzen. Durch sehr flexible hydrophobe Seitenketten der Bindetasche in der M-Domäne des SRP54 können diversen Signalsequenzen trotzdem effizient erkannt und gebunden werden (Bernstein *et al.*, 1989; Janda *et al.*, 2010; Keenan *et al.*, 1998). Diese Interaktion ist somit nicht auf eine bestimmte Sequenz oder ein spezifisches Motif festgelegt. Demnach ist eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen TFP und der anpassungsfähigen Bindetasche von SRP gut vorstellbar. Ähnlich kann CaM eine Vielzahl an Substratenzymen mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen in seinen hydrophoben Bereichen der beiden Domänen binden. Auch hier scheinen die Unterschiede hinsichtlich der Sequenz gut tolerierbar. Die ähnlichen Bindungsmechanismen von SRP54 und CaM sowie die Flexibilität ihrer Bindetaschen lassen somit eine Interaktion von TFP mit SRP54 am wahrscheinlichsten erscheinen.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Modell für einen störenden Einfluss von TFP auf die co- und posttranslationale Translokation der hier untersuchten kleinen Proteine: 1) Entgegen der allgemeinen Lehrmeinung, dass kleine Proteine ausschließlich den posttranslationalen Transportweg einschlagen, konnte hier gezeigt werden, dass kleine Proteine sowohl SRP-abhängig cotranslational als auch posttranslational transportiert werden können. 2) Kommt es zu dem cotranslationalen *Targeting* zu der ER-Membran kann TFP in die Interaktion zwischen SRP und Signalsequenz am RNC eingreifen und diese Bindung inhibieren. Ob diese inhibierende Wirkung auf eine Bindung und Blockierung des SRP und/oder der Signalsequenz zurückzuführen ist, kann abschließend nicht beurteilt werden. Dazu sind weitere Untersuchungen erforderlich. Hierzu könnten z. B. *Crosslinking*-Experimente oder *Surface Plasmon Resonance* (SPR)-Analysen zum Nachweis einer TFP-SRP/Signalsequenz-Interaktion durchgeführt werden. 3a) Schlagen die kleinen Proteine den posttranslationalen Transportweg ein, so kann ebenfalls das SRP-abhängige posttranslationale *Targeting* – welches bei pStat aufgrund der Resultate dieser Arbeit als alternativer *Targetingweg* vermutet wird – durch TFP blockiert werden. An dieser Stelle könnte TFP ebenfalls einen inhibierenden Einfluss auf die SRP-abhängig posttranslational transportieren *tail anchored*

Proteine einnehmen. 3b) TFP inaktiviert zudem den posttranslationalen *Targetingfaktor* Calmodulin. 3c) Abschließend bleibt noch zu untersuchen, ob TFP auch eine hemmende Wirkung auf die *Targetingsubstanz* TRC40 hat, denn TRC40 besitzt eine ähnlich hydrophobe Bindetasche wie SRP54 (zusammengefasst in Shao und Hegde, 2011 I).

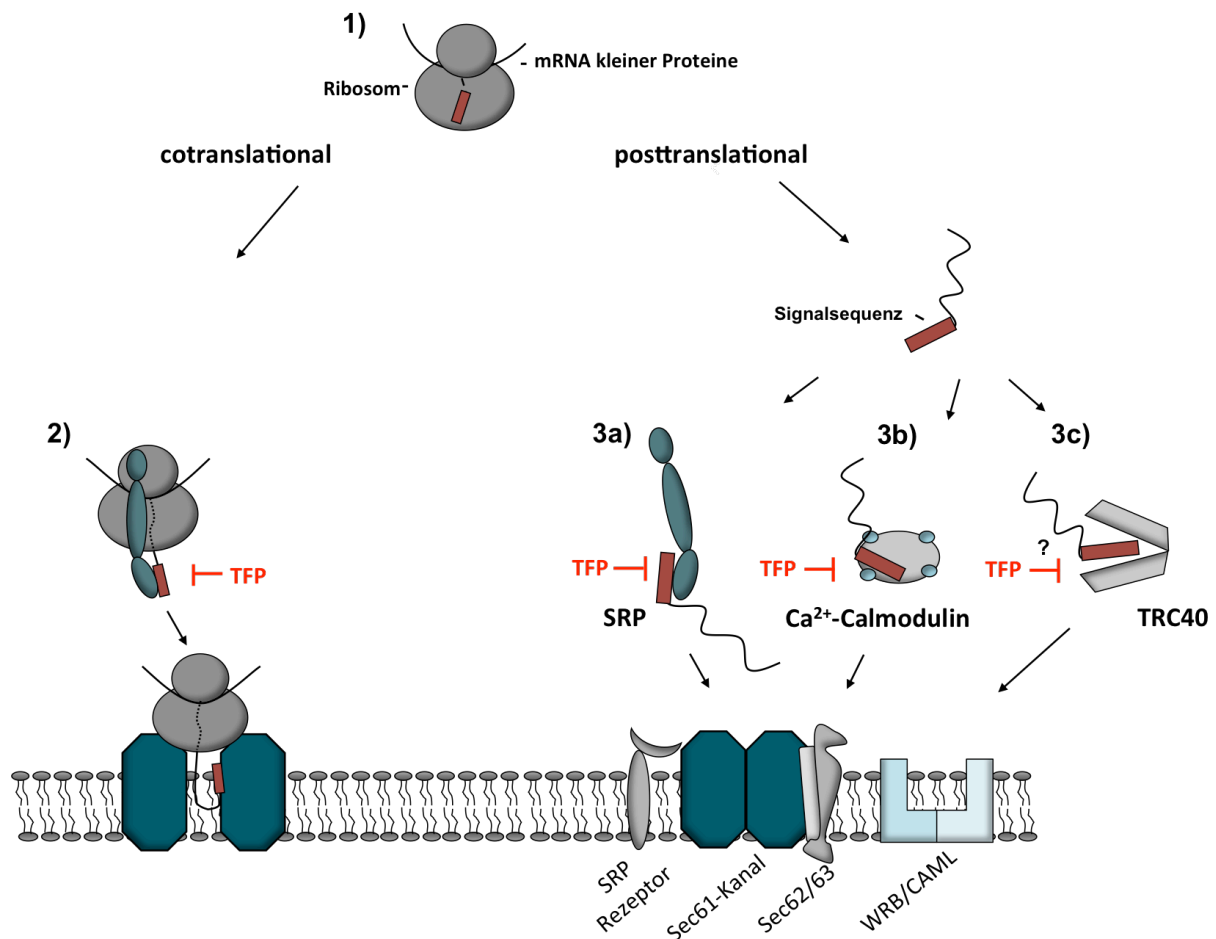


Abb. 26: Einfluss von TFP auf die co- und posttranslationale Translokation von einigen kleinen sekretorischen Proteinen.

Gerade für TFP ist es von Bedeutung, jegliche Wirkmechanismen zu kennen, da TFP als Neuroleptikum zugelassen ist (Handelsname: Jatroneural). Neuroleptika werden bei akuten Psychosen eingesetzt, bei denen es zu einer erhöhten präsynaptischen Produktion und Ausschüttung von Dopamin kommt (zusammengefasst von Howes & Kapur, 2009). In einer Hirnregion unterhalb des Großhirns binden große Mengen an Dopamin an den postsynaptischen Anteil eines speziellen Dopamin-Rezeptortyps (D2). Eine sinnvolle Blockade der Dopamin-D2-Interaktion durch Einsatz von Neuroleptika liegt bei 50 – 70% dieser Rezeptoren. Eine höhere Blockierungsrate würde zu Nebenwirkungen führen oder bestehende Nebenwirkungen verstärken (Abi-Dargham & Larnelle, 2005; Davis & Chen, 2004; Seeman *et al.*, 2005).

TFP ist somit keine Substanz, die ausschließlich im Rahmen von zellbiologischen Experimenten eingesetzt wird, sondern als Medikation dem menschlichen Körper zugeführt

wird. Insofern sind neue Erkenntnisse zur Wirkung von TFP insbesondere für Pharmazie und Neuropsychiatrie interessant, um z. B. Nebenwirkungen weiter reduzieren zu können. Darüber hinaus kann TFP als Inhibitor der Proteintranslokation in das endoplasmatische Retikulum genutzt werden. Solche Inhibitoren können bei der Entwicklung von Krebsmedikamenten von Bedeutung sein, denn ein *Screening* potentieller Krebstherapeutika zeigte oft eine Beteiligung des Sec61-Kanals (Junne *et al.*, 2015; Luesch *et al.*, 2002; zusammengefasst in Römisch & Kalies, 2015). Zudem ermöglicht ein Einsatz dieser Inhibitoren weitere Untersuchung hinsichtlich verschiedener Phasen des *Targetings* und der Translokation von Proteinen.

5. Zusammenfassung

Sekretorische Proteine werden im Zytosol synthetisiert. Falls sie entlang des sekretorischen Weges transportiert werden und ihr Bestimmungsort ein anderer als das Zytosol ist, können sie über zwei unterschiedliche Transportwege in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert werden. Dort werden sie gegebenenfalls modifiziert und gelangen anschließend zu ihren Zielorten. Ein möglicher Transportweg läuft parallel zur Translation ab (cotranslationaler Transport). Der zweite mögliche Transportweg ist der posttranslationale Transport. Hier werden die Polypeptidketten nach vollendeter Translation ins Zytosol freigelassenen und ribosomenunabhängig zur ER-Membran transportiert.

Zu Beginn dieser Arbeit sollte der Einfluss des *Signal Recognition Particels* (SRP) bei dem co- und posttranslationalen Transport von kleinen sekretorischen Säugerproteinen näher beleuchtet werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Substratproteine pHis1, pHis3 und pStat, welche aufgrund ihrer Kettenlänge eigentlich zu kurz für eine Interaktion mit SRP sind, sowohl über das cotranslationale *Targeting* als auch über das posttranslationale *Targeting* zu der ER-Membran transportiert werden können. Das cotranslationale *Targeting* benötigt dabei eine Mindestlänge von 46 AS. Ein Einfluss von SRP unter posttranslationalen Bedingungen, welcher bei einigen *tail-anchored* Proteinen gezeigt worden war, konnte bei den hier untersuchten sekretorischen Säugerproteinen nicht beobachtet werden.

Da es bisher nur wenige Untersuchungen darüber gibt, ob *Targetingfaktoren* ein generelles Instrument in dem posttranslationalen Transport darstellen oder ob und inwieweit verschiedene Proteine spezielle *Targetingfaktoren* benötigen, wurde der Einfluss von Calmodulin (CaM) als solch ein *Targetingfaktor* im posttranslationalen Transportweg der Substratproteine pHis3, ppCecA und pStat untersucht. Dazu konnte in der vorliegenden Arbeit CaM als ein genereller *Targetingfaktor* für die Substratproteine pHis3 und ppCecA identifiziert werden. Für das Substratprotein pStat deuten die hier erzielten Ergebnisse noch auf mindestens eine weitere *Targetingsubstanz* innerhalb des posttranslationalen Transports hin. Der Bindungsort der Interaktion zwischen CaM und Substratprotein konnte auf die Signalsequenz eingegrenzt werden. Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass Calmodulin als *Targetingfaktor* auch spezieübergreifend eine Rolle bei der posttranslationalen Translokation von kleinen sekretorischen Proteinen spielt und für die posttranslationale Translokation von pHis3 und ppCecA sogar essentiell ist. Ein derartiger Einfluss von CaM beim cotranslationalen Transport konnte bei den hier untersuchten Substratproteinen hingegen nicht festgestellt werden.

Überraschenderweise hemmte der CaM-Inhibitor Trifluoperazin die cotranslationale Translokation von allen hier untersuchten Substratproteinen. Diese Inhibierung geht offenbar nicht auf die Inaktivierung von CaM zurück. Translokationsexperimente in Anwesenheit von TFP mit pPI-Verkürzungsproteinen und Titration von 80S-Ribosomen und

SRP weisen vielmehr auf eine TFP-induzierte Störung der Interaktion zwischen SRP und Signalsequenz hin. Somit blockiert TFP nicht nur die CaM-abhängige posttranslationale Translokation, sondern es konnte zudem eine neuartige inhibierende Wirkung auf die cotranslationale Translokation entdeckt werden.

6. Literaturverzeichnis

- B. M. ABELL, M. R. POOL, O. SCHLENKER, I. SINNING, S. HIGH**, Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO J* 23, 2755-2764 (2004).
- A. ABI-DARGHAM, M. LARUELLE**, Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry* 20, 15-27 (2005).
- J. AKIMARU, S. MATSUYAMA, H. TOKUDA, S. MIZUSHIMA**, Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6545-6549 (1991).
- W. ANTONIN, H. A. MEYER, E. HARTMANN**, Interactions between Spc2p and other components of the endoplasmic reticulum translocation sites of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 34068-34072 (2000).
- A. BABU, G. ORR, J. GULATI**, Calmodulin supports the force-generating function in desensitized muscle fibers. *J Biol Chem* 263, 15485-15491 (1988).
- Y. S. BABU, J. S. SACK, T. J. GREENHOUGH, C. E. BUGG, A.R. MEANS, W. J. COOK**, Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* 315, 37-40 (1985).
- H. BARLE, P. ESSÉN, B. NYBERG, H. OLIVECRONA, M. TALLY, M. A. MCNURLAN, J. WERNERMAN, P. J. GARLICK**, Depression of liver protein synthesis during surgery is prevented by growth hormone. *Am J Physiol* 276, E620-627 (1999).
- R. T. BATEY, R. P. RAMBO, L. LUCAST, B. RHA, J. A. DOUDNA**, Crystal structure of the ribonucleoprotein core of the signal recognition particle. *Science* 287, 1232-1239 (2000).
- B. BEATRIX, H. SAKAI, M. WIEDMANN**, The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* 275, 37838-37845 (2000).
- T. BECKER, S. BHUSHAN, A. JARASCH, J. P. ARMACHE, S. FUNES, F. JOSSINET, J.UMBART, T. MIELKE, O. BERNINGHAUSEN, K. SCHULTEN, E. WESTHOF, R. GILMORE, E. C. MANDON, R. BECKMANN, R.**, Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science* 326, 1369-1373 (2009).
- M. BENGHEZAL, A. BENACHOUR, S. RUSCONI, M. AEBI, A. CONZELMANN**, Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J* 15, 6575-6583 (1996).
- H. D. BERNSTEIN, M. A. PORITZ, K. STRUB, P. J. HOBEN, S. BRENNER, P. WALTER**, Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature* 340, 482-486 (1989).

- M. J. BERRIDGE**, The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32, 235-249 (2002).
- S. BHUSHAN, M. GARTMANN, M. HALIC, J. P. ARMACHE, A. JARASCH, T. MIELKE, O. BERNINGHAUSEN, D. N. WILSON, D., R. BECKMANN**, alpha-Helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* 17, 313-317 (2010).
- G. BLOBEL, B. DOBBERSTEIN**, Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67, 835-851 (1975 I).
- G. BLOBEL, B. DOBBERSTEIN**, Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* 67, 852-862 (1975 II).
- G. BLOBEL, V. R. POTTER**, Ribosomes in rat liver: an estimate of the percentage of free and membrane-bound ribosomes interacting with messenger RNA in vivo. *J Mol Biol* 28, 539-542 (1967).
- H. C. BOMAN, I. A. BOMAN, D. ANDREU, Z. Q. LI, R. B. MERRIFIELD, G. SCHLENSTEDT, R. ZIMMERMANN**, Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B. *J Biol Chem* 264, 5852-5860 (1989).
- N. BORGESSE, W. MOK, G. KREIBICH, D. D. SABATINI**, Ribosomal-membrane interaction: in vitro binding of ribosomes to microsomal membranes. *J Mol Biol* 88, 559-580 (1974).
- G. BOZKURT, G. STJEPANOVIC, F. VILARDI, S. AMLACHER, K. WILD, G. BANGE, V. FAVALORO, K. RIPPE, E. HURT, B. DOBBERSTEIN, I. SINNING**, Structural insights into tail-anchored protein binding and membrane insertion by Get3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21131-21136 (2009).
- S. BRAMBILLASCA, M. YABAL, M. MAKAROW, N. BORGESSE**, Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J Cell Biol* 175, 767-777 (2006).
- J. L. BRODSKY, J. GOECKELER, R. SCHEKMAN**, BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9643-9646 (1995).
- K. A. BROGDEN**, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3, 238-250 (2005).
- X. CHEN, C. VANVALKENBURGH, H. LIANG, H. FANG, N. GREEN**, Signal peptidase and oligosaccharyltransferase interact in a sequential and dependent manner within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276, 2411-2416 (2001).
- W. J. CHIRICO**, Dissociation of complexes between 70 kDa stress proteins and presecretory proteins is facilitated by a cytosolic factor. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 1150-1156 (1992).

- W. J. CHIRICO, M. G. WATERS, G. BLOBEL**, 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332, 805-810 (1988).
- W. M. CLEMONS, K. GOWDA, S. D. BLACK, C. ZWIEB, V. RAMAKRISHNAN**, Crystal structure of the conserved subdomain of human protein SRP54M at 2.1 Å resolution: evidence for the mechanism of signal peptide binding. *J Mol Biol* 292, 697-705 (1999).
- T. CONNOLLY, R. GILMORE**, Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein. *J Cell Biol* 103, 2253-2261 (1986).
- T. CONNOLLY, R. GILMORE**, The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57, 599-610 (1989).
- W. J. COOK, L. J. WALTER, M. R. WALTER**, Drug binding by calmodulin: crystal structure of a calmodulin-trifluoperazine complex. *Biochemistry* 33, 15259-15265 (1994).
- B. C. CROSS, C. MCKIBBIN, A. C. CALLAN, P. ROBOTI, M. PIACENTI, C. RABU, C. M. WILSON, R. WHITEHEAD, S. L. FLITSCH, M R. POOL, S. HIGH, E. SWANTO**, Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 122, 4393-4400 (2009).
- K. S. CROWLEY, S. LIAO, V. E. WORRELL, G. D. REINHART, A. E. JOHNSON**, Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78, 461-471 (1994).
- K. S. CROWLEY, G. D. REINHART, A. E. JOHNSON**, The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* 73, 1101-1115 (1993).
- A. D'ARRIGO, E. MANERA, R. LONGHI, N. BORGESE**, The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways. *J Biol Chem* 268, 2802-2808 (1993).
- M. DAIMON, S. SUSU, K. SUZUKI, T. KATO, K. YAMATANI, H. SASAKI**, Identification of a human cDNA homologue to the Drosophila translocation protein 1 (Dtrp1). *Biochem Biophys Res Commun* 230, 100-104 (1997).
- R. E. DALBEY, G. VON HEIJNE**, Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. *Trends Biochem Sci* 17, 474-478 (1992).
- J. M. DAVIS, N. CHEN**, Dose response and dose equivalence of antipsychotics. *J Clin Psychopharmacol* 24, 192-208 (2004).
- M. DEL ALAMO, D. J. HOGAN, S. PECHMANN, V. ALBANESE, P. O. BROWN, J. FRYDMAN, J.**, Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol* 9, e1001100 (2011).

- V. DENIC**, A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man. *Trends Biochem Sci* 37, 411-417 (2012).
- R. J. DESHAIES, B. D. KOCH, M. WERNER-WASHBURNE, E. A. CRAIG, R. SCHEKMAN**, A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805 (1988).
- R. J. DESHAIES, S. L. SANDERS, D. A. FELDHEIM, R. SCHEKMAN**, Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349, 806-808 (1991).
- T. DIERKS, J. VOLKMER, G. SCHLENSTEDT, C. JUNG, U. SANDHOLZER, K. ZACHMANN, P. SCHLOTTERHOSE, K. NEIFER, B. SCHMIDT, R. ZIMMERMANN**, A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO J* 15, 6931-6942 (1996).
- P. F. EGEA, R. M. STROUD, P. WALTER**, Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* 15, 213-220 (2005).
- F. ERDMANN, M. JUNG, S. EYRISCH, S. LANG, V. HELMS, R. WAGNER, R. ZIMMERMANN**, Lanthanum ions inhibit the mammalian Sec61 complex in its channel dynamics and protein transport activity. *FEBS Lett* 583, 2359-2364 (2009).
- F. ERDMANN, N. SCHÄUBLE, S. LANG, M. JUNG, A. HONIGMANN, M. AHMAD, J. DUDEK, J. BENEDIX, A. HARSMAN, A. KOPP, V. HELMS, A. CAVALIÉ, R. WAGNER, R. ZIMMERMANN**, Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 30, 17-31 (2011).
- E. A. EVANS, R. GILMORE, G. BLOBEL**, Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 581-585 (1986).
- V. FAVALORO, M. SPASIC, B. SCHWAPPACH, B. DOBBERSTEIN**, Distinct targeting pathways for the membrane insertion of tail-anchored (TA) proteins. *J Cell Sci* 121, 1832-1840 (2008).
- B. E. FINN, J. EVENÄS, T. DRAKENBERG, J. P. WALTHO, E. THULIN, S. FORSÉN**, Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin. *Nat Struct Biol* 2, 777-783 (1995).
- J. J. FLANAGAN, J. C. CHEN, Y. MIAO, Y. SHAO, J. LIN, P. E. BOCK, A. E. JOHNSON, A. E.**, Signal recognition particle binds to ribosome-bound signal sequences with fluorescence-detected subnanomolar affinity that does not diminish as the nascent chain lengthens. *J Biol Chem* 278, 18628-18637 (2003).
- M. FLOURAKIS, F. VAN COPPENOLLE, V. LEHEN'KYI, B. BECK, R. SKRYMA, N. PREVARSKAYA**, Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA₂-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J* 20, 1215-1217 (2006).

- P. FRAERING, I. IMHOF, U. MEYER, J. M. STRUB, A VAN DORSSELAER, C. VIONNET, A. CONZELMANN, A.**, The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol Biol Cell* 12, 3295-3306 (2001).
- J. FRAUENFELD, J. GUMBART, E. O. SLUIS, S. FUNES, M. GARTMANN, B. BEATRIX, T. MIELKE, O. BERNINGHAUSEN, T. BECKER, K. SCHULTEN, R. BECKMANN, R.**, Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat Struct Mol Biol* 18, 614-621 (2011).
- M. C. FRITH, A. R. FORREST, E. NOURBAKHS, K. C. PANG, C. KAI, J. KAWAI, P. CARNINCI, Y. HAYASHIZAKI, T. L. BAILEY, S. M. GRIMMOND, S. M.**, The abundance of short proteins in the mammalian proteome. *PLoS Genet* 2, e52 (2006).
- L. M. GIERASCH**, Signal sequences. *Biochemistry* 28, 923-930 (1989).
- R. GILMORE, G. BLOBEL**, Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation. *Cell* 35, 677-685 (1983).
- R. GILMORE, G. BLOBEL, P. WALTER**, Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* 95, 463-469 (1982).
- R. GILMORE, P. WALTER, G. BLOBEL**, Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 95, 470-477 (1982).
- M. GOGALA, T. BECKER, B. BEATRIX, J. P. ARMACHE, C. BARRIO-GARCIA, O. BERNINGHAUSEN, R. BECKMANN, R. M.**, Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion. *Nature* 506, 107-110 (2014).
- D. GÖRLICH, T. A. RAPOPORT**, Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, 615-630 (1993).
- M. GREINER, B. KREUTZER, S. LANG, V. JUNG, A. CAVALIÉ, G. UNTEREGGER, R. ZIMMERMANN, B. WULLICH, B.**, Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. *Prostate* 71, 1074-1083 (2011).
- E. D. GUNDELFINGER, E. KRAUSE, M. MELLI, B. DOBBERSTEIN**, The organization of the 7SL RNA in the signal recognition particle. *Nucleic Acids Res* 11, 7363-7374 (1983).
- T. HAINZL, S. HUANG, G. MERILÄINEN, K. BRÄNNSTRÖM, A. E. SAUER-ERIKSSON**, Structural basis of signal-sequence recognition by the signal recognition particle. *Nat Struct Mol Biol* 18, 389-391 (2011).
- M. HALIC, T. BECKER, M. R. POOL, C. M. SPAHN, R. A. GRASSUCCI, J. FRANK, R. BECKMANN**, Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* 427, 808-814 (2004).

- M. HALIC, R. BECKMANN**, The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* 15, 116-125 (2005).
- B. D. HAMMAN, L. M. HENDERSHOT, A. E. JOHNSON**, BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758 (1998).
- Y. HARADA, H. LI, W. J. LENNARZ**, Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6945-6949 (2009).
- B. HARDESTY, G. KRAMER**, Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66, 41-66 (2001).
- E. HARTMANN, T. SOMMER, S. PREHN, D. GÖRLICH, S. JENTSCH, T. A. RAPOPORT**, Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367, 654-657 (1994).
- S. HASSDENTEUFEL, N. SCHÄUBLE, P. CASSELLA, P. LEZNICKI, A. MÜLLER, S. HIGH, M. JUNG, R. ZIMMERMANN**, Ca²⁺-calmodulin inhibits tail-anchored protein insertion into the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Lett* 585, 3485-3490 (2011).
- K. HATSUZAWA, M. TAGAYA, S. MIZUSHIMA**, The hydrophobic region of signal peptides is a determinant for SRP recognition and protein translocation across the ER membrane. *J Biochem* 121, 270-277 (1997).
- H. HIDAKA, Y. SASAKI, T. TANAKA, T. ENDO, S. OHNO, Y. FUJII, T. NAGATA**, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4354-4357 (1981).
- H. HIDAKA, T. YAMAKI, M. NAKA, T. TANAKA, H. HAYASHI, R. KOBAYASHI**, Calcium-regulated modulator protein interacting agents inhibit smooth muscle calcium-stimulated protein kinase and ATPase. *Mol Pharmacol* 17, 66-72 (1980).
- S. HIGH, B. M. ABELL**, Tail-anchored protein biosynthesis at the endoplasmic reticulum: the same but different. *Biochem Soc Trans* 32, 659-662 (2004).
- O. D. HOWES, S. KAPUR**, The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull* 35, 549-562 (2009).
- Z. Y. HU, Y. S. GONG, W. L. HUANG**, Interaction of berbamine compound E6 and calmodulin-dependent myosin light chain kinase. *Biochem Pharmacol* 44, 1543-1547 (1992).
- D. HUBER, D. BOYD, Y. XIA, M. H. OLMA, M. GERSTEIN, J. BECKWITH**, Use of thioredoxin as a reporter to identify a subset of Escherichia coli signal sequences that promote signal recognition particle-dependent translocation. *J Bacteriol* 187, 2983-2991 (2005).

- M. IKURA, G. BARBATO, C. B. KLEE, A. BAX**, Solution structure of calmodulin and its complex with a myosin light chain kinase fragment. *Cell Calcium* 13, 391-400 (1992).
- M. IKURA, G. M. CLORE, A. M. GRONENBORN, G. ZHU, C. B. KLEE, A. BAX, A.**, Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* 256, 632-638 (1992).
- A. E. JACKSON, D. PUETT**, Binding of trifluoperazine and fluorene-containing compounds to calmodulin and adducts. *Biochem Pharmacol* 35, 4395-4400 (1986).
- R. C. JACKSON, G. BLOBEL**, Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5598-5602 (1977).
- P. JAMES, T. VORHERR, E. CARAFOLI**, Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem Sci* 20, 38-42 (1995).
- C. Y. JANDA, J. LI, C. OUBRIDGE, H. HERNÁNDEZ, C. V. ROBINSON, K. NAGAI, K.**, Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature* 465, 507-510 (2010).
- N. JOHNSON, K. POWIS, S. HIGH**, Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2403-2409 (2013).
- N. JOHNSON, F. VILARDI, S. LANG, P. LEZNICKI, R. ZIMMERMANN, S. HIGH**, TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *J Cell Sci* 125, 3612-3620 (2012).
- B. JUNGNIKEL, T. A. RAPOPORT**, A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 82, 261-270 (1995).
- T. JUNNE, J. WONG, C. STUDER, T. AUST, B. W. BAUER, M. BEIBEL, B. BHULLAR, R. BRUCCOLERI, J. EICHENBERGER, D. ESTOPPEY, N. HARTMANN, B. KNAPP, P. KRASTEL, N. MELIN, E. J. OAKELEY, L. OBERER, R. RIEDL, G. ROMA, S. SCHUIERER, F. PETERSEN, J. A. TALLARICO, T. A. RAPOPORT, M. SPIESS, D. HOEPFNER, D.** Decatransin, a new natural product inhibiting protein translocation at the Sec61/SecYEG translocon. *J Cell Sci* 128, 1217-1229 (2015).
- K. U. KALIES, D. GÖRLICH, T. A. RAPOPORT**, Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol* 126, 925-934 (1994).
- K. U. KALIES, K. RÖMISCH**, Inhibitors of Protein Translocation Across the ER Membrane. *Traffic* 16, 1027-1038 (2015).
- R. J. KEENAN, D. M. FREYMAN, P. WALTER, R. M. STROUD**, Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. *Cell* 94, 181-191 (1998).
- P. KLAPPA, P. MAYINGER, R. PIPKORN, M. ZIMMERMANN, R. ZIMMERMANN**, A microsomal protein is involved in ATP-dependent transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *EMBO J* 10, 2795-2803 (1991).

- R. E. KLEVIT, B. A. LEVINE, R. J. WILLIAMS**, A study of calmodulin and its interaction with trifluoperazine by high resolution ¹H NMR spectroscopy. *FEBS Lett* 123, 25-29 (1981).
- G. KRAMER, D. BOEHRINGER, N. BAN, B. BUKAU**, The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16, 589-597 (2009).
- R. H. KRETSINGER, S. E. RUDNICK, L. J. WEISSMAN**, Crystal structure of calmodulin. *J Inorg Biochem* 28, 289-302 (1986).
- H. KUBONIWA, N. TJANDRA, S. GRZESIEK, H. REN, C. B. KLEE, A. BAX, A.**, Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat Struct Biol* 2, 768-776 (1995).
- J. KYTE, R. F. DOOLITTLE**, A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132 (1982).
- U. K. LAEMMLI**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- A. K. LAKKARAJU, R. THANKAPPAN, C. MARY, J. L. GARRISON, J. TAUNTON, K. STRUB**, Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell* 23, 2712-2722 (2012).
- S. LANG, J. BENEDIX, S. V. FEDELES, S. SCHORR, C. SCHIRRA, N. SCHÄUBLE, C. JALAL, M. GREINER, S. HASSDENTEUFEL, J. TATZELT, B. KREUTZER, L. EDELMANN, E. KRAUSE, J. RETTIG, S. SOMLO, R. ZIMMERMANN, J. 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* 125, 1958-1969 (2012).
- S. LANG, F. ERDMANN, M. JUNG, R. WAGNER, A. CAVALIE, R. ZIMMERMANN**, Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels (Austin)* 5, 228-235 (2011).
- L. LAUFFER, P. D. GARCIA, R. N. HARKINS, L. COUSSENS, A. ULLRICH, P. WALTER**, Topology of signal recognition particle receptor in endoplasmic reticulum membrane. *Nature* 318, 334-338 (1985).
- H. C. LEE, H. D. BERNSTEIN**, The targeting pathway of Escherichia coli presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3471-3476 (2001).
- R. W. LENZ, M. J. CORMIER**, Effects of calmodulin-binding drugs on the guinea pig spermatozoon acrosome reaction and the use of these drugs as vaginal contraceptive agents in rabbits. *Ann N Y Acad Sci* 383, 85-97 (1982).
- R. M. LEVIN, B. WEISS**, Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol Pharmacol* 13, 690-697 (1977).

- R. M. LEVIN, B. WEISS**, Specificity of the binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of phosphodiesterase and to a series of other calcium-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 540, 197-204 (1978).
- P. LEZNICKI, A. CLANCY, B. SCHWAPPACH, S. HIGH**, Bat3 promotes the membrane integration of tail-anchored proteins. *J Cell Sci* 123, 2170-2178 (2010).
- W. LIEBERMEISTER, T. A. RAPOPORT, R. HEINRICH**, Ratcheting in post-translational protein translocation: a mathematical model. *J Mol Biol* 305, 643-656 (2001).
- P. J. LIN, C. G. JONGSMA, M. R. POOL, A. E. JOHNSON**, Polytopic membrane protein folding at L17 in the ribosome tunnel initiates cyclical changes at the translocon. *J Cell Biol* 195, 55-70 (2011).
- M. LINXWEILER, S. SCHORR, N. SCHÄUBLE, M. JUNG, J. LINXWEILER, F. LANGER, H. J. SCHÄFERS, A. CAVALIÉ, R. ZIMMERMANN, M. GREINER**, Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells. *BMC Cancer* 13, 574 (2013).
- H. LUESCH, W. Y. YOSHIDA, R. E. MOORE, V. J. PAUL**, New apratoxins of marine cyanobacterial origin from Guam and Palau. *Bioorg Med Chem* 10, 1973-1978 (2002).
- H. LÜTCKE, S. HIGH, K. RÖMISCH, A. J. Ashford, B. Dobberstein**, The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences. *EMBO J* 11, 1543-1551 (1992).
- L. I. MALKIN, A. RICH**, Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *J Mol Biol* 26, 329-346 (1967).
- M. MARIAPPAN, X. LI, S. STEFANOVIC, A. SHARMA, A. MATEJA, R. J. KEENAN, R. S. HEGDE**, A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* 466, 1120-1124 (2010).
- J. MARINO, G. VON HEIJNE, R. BECKMANN**, Small protein domains fold inside the ribosome exit tunnel. *FEBS Lett* 590, 655-660 (2016).
- L. MASSOM, H. LEE, H. W. JARRETT**, Trifluoperazine binding to porcine brain calmodulin and skeletal muscle troponin C. *Biochemistry* 29, 671-681 (1990).
- A. MATEJA, A. SZLACHCIC, M. E. DOWNING, M. DOBOSZ, M. MARIAPPAN, R. S. HEGDE, R. J. KEENAN**, The structural basis of tail-anchored membrane protein recognition by Get3. *Nature* 461, 361-366 (2009).
- K. E. MATLACK, B. MISSELWITZ, K. PLATH, T. A. RAPOPORT**, BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-564 (1999).

- K. E. MATLACK, P. WALTER**, The 70 carboxyl-terminal amino acids of nascent secretory proteins are protected from proteolysis by the ribosome and the protein translocation apparatus of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 270, 6170-6180 (1995).
- N. MATSUSHIMA, N. HAYASHI, Y. JINBO, Y. IZUMI**, Ca²⁺-bound calmodulin forms a compact globular structure on binding four trifluoperazine molecules in solution. *Biochem J* 347 Pt 1, 211-215 (2000).
- W. E. MEADOR, A. R. MEANS, F. A. QUIOCHO**, Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 257, 1251-1255 (1992).
- W. E. MEADOR, A. R. MEANS, F. A. QUIOCHO**, Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. *Science* 262, 1718-1721 (1993).
- A. R. MEANS, J. S. TASH, J. G. CHAFOULEAS**, Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol Rev* 62, 1-39 (1982).
- A. R. MEANS, M. F. VANBERKUM, I. BAGCHI, K. P. LU, C. D. RASMUSSEN**, Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther* 50, 255-270 (1991).
- B. MEUSSER, C. HIRSCH, E. JAROSCH, T. SOMMER**, ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7, 766-772 (2005).
- D. I. MEYER, B. DOBBERSTEIN**, A membrane component essential for vectorial translocation of nascent proteins across the endoplasmic reticulum: requirements for its extraction and reassociation with the membrane. *J Cell Biol* 87, 498-502 (1980 I).
- D. I. MEYER, B. DOBBERSTEIN**, Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 87, 503-508 (1980 II).
- H. A. MEYER, H. GRAU, R. KRAFT, S. KOSTKA, S. PREHN, K. U. KALIES, E. HARTMANN, E.**, Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* 275, 14550-14557 (2000).
- W. MOTHE, S. PREHN, T. A. RAPOPORT**, Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* 13, 3973-3982 (1994).
- G. MÜLLER, R. ZIMMERMANN**, Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *EMBO J* 6, 2099-2107 (1987).
- G. MÜLLER, R. ZIMMERMANN**, Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: energy requirements for membrane insertion. *EMBO J* 7, 639-648 (1988).

- L. MÜLLER, M. D. DE ESCAURIAZA, P. LAJOIE, M. THEIS, M. JUNG, A. MÜLLER, C. BURGARD, M. GREINER, E. L. SNAPP, J. DUDEK, R. ZIMMERMANN, R.**, Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. *Mol Biol Cell* 21, 691-703 (2010).
- A. NEUHOF, M. M. ROLLS, B. JUNGNICHEL, K. U. KALIES, T. A. RAPOPORT**, Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. *Mol Biol Cell* 9, 103-115 (1998).
- NEUHOF, A.** (2000) 'Early Steps in Cotranslational Translocation of Proteins across the ER Membrane: A Biochemical and Structural Analysis', Dissertationsschrift, Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin.
- D. T. NG, J. D. BROWN, P. WALTER**, Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134, 269-278 (1996).
- J. NGOSUWAN, N. M. WANG, K. L. FUNG, W. J. CHIRICO**, Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 278, 7034-7042 (2003).
- C. V. NICCHITTA, G. BLOBEL**, Luminal proteins of the mammalian endoplasmic reticulum are required to complete protein translocation. *Cell* 73, 989-998 (1993).
- C. V. NICCHITTA, E. C. MURPHY, R. HAYNES, G. S. SHELNESS**, Stage- and ribosome-specific alterations in nascent chain-Sec61p interactions accompany translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* 129, 957-970 (1995).
- C. V. NICCHITTA, T. ZHENG**, Regulation of the ribosome-membrane junction at early stages of presecretory protein translocation in the mammalian endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 139, 1697-1708 (1997).
- O. B. NILSSON, R. HEDMAN, J. MARINO, S. WICKLES, L. BISCHOFF, M. JOHANSSON, A. MÜLLER-LUCKS, F. TROVATO, J. D. PUGLISI, E. P. O'BRIEN, R. BECKMANN, G. VON HEIJNE, G.**, Cotranslational Protein Folding inside the Ribosome Exit Tunnel. *Cell Rep* 12, 1533-1540 (2015).
- S. C. OGG, P. WALTER**, SRP samples nascent chains for the presence of signal sequences by interacting with ribosomes at a discrete step during translation elongation. *Cell* 81, 1075-1084 (1995).
- M OSAWA, M. B. SWINDELLS, J. TANIKAWA, T. TANAKA, T. MASE, T. FURUYA, M. IKURA**, Solution structure of calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition. *J Mol Biol* 276, 165-176 (1998).
- G. PALADE**, Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 867 (1975).
- S. PANZNER, L. DREIER, E. HARTMANN, S. KOSTKA, T. A. RAPOPORT**, Posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 31-40 (1995).

- E. PARK, J. F. MÉNÉTRÉ, J.C. GUMBART, S. J. LUDTKE, W. LI, A. WHYNOT, T. A. RAPOPORT, C. W. AKEY**, Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation. *Nature* 506, 102-106 (2014).
- E. PARK, T. A. RAPOPORT**, Preserving the membrane barrier for small molecules during bacterial protein translocation. *Nature* 473, 239-242 (2011).
- E. PARK, T. A. RAPOPORT**, Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys* 41, 21-40 (2012).
- H. R. PELHAM, R. J. JACKSON**, An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67, 247-256 (1976).
- P. PELUSO, D. HERSCHLAG, S. NOCK, D. M. FREYMAN, A. E. JOHNSON, P. WALTER**, Role of 4.5S RNA in assembly of the bacterial signal recognition particle with its receptor. *Science* 288, 1640-1643 (2000).
- S. PFEFFER, J. DUDEK, M. GOGALA, S. SCHORR, J. LINXWEILER, S. LANG, T. BECKER, R. BECKMANN, R. ZIMMERMANN, F. FÖRSTER**, Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nat Commun* 5, 3072 (2014).
- K. PLATH, W. MOTHE, B. M. WILKINSON, C. J. STIRLING, T. A. RAPOPORT**, Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94, 795-807 (1998).
- T. POWERS, P. WALTER**, Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. *Science* 269, 1422-1424 (1995).
- A. PRINZ, C. BEHRENS, T. A. RAPOPORT, E. HARTMANN, K. U. KALIES**, Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J* 19, 1900-1906 (2000).
- W. C. PROZIALECK, B. WEISS**, Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 222, 509-516 (1982).
- C. RABU, V. SCHMID, B. SCHWAPPACH, S. HIGH**, Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? *J Cell Sci* 122, 3605-3612 (2009).
- C. RABU, P. WIPF, J. L. BRODSKY, S. HIGH**, A precursor-specific role for Hsp40/Hsc70 during tail-anchored protein integration at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 283, 27504-27513 (2008).
- D. RADEN, R. GILMORE**, Signal recognition particle-dependent targeting of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum in the absence and presence of the nascent polypeptide-associated complex. *Mol Biol Cell* 9, 117-130 (1998).
- J. C. RAMSEY, W. J. STEELE**, A procedure for the quantitative recovery of homogeneous populations of undegraded free and bound polysomes from rat liver. *Biochemistry* 15, 1704-1712 (1976).

- T. A. RAPOPORT**, Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663-669 (2007).
- T. A. RAPOPORT, B. JUNGnickel, U. KUTAY**, Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* 65, 271-303 (1996).
- T. A. RAPOPORT, K. E. Matlack, K. Plath, B. MISSELWITZ, O. STAECK**, Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* 380, 1143-1150 (1999).
- J. H. REITHINGER, J. E. KIM, H. KIM**, Sec62 protein mediates membrane insertion and orientation of moderately hydrophobic signal anchor proteins in the endoplasmic reticulum (ER). *J Biol Chem* 288, 18058-18067 (2013).
- R. RIZZUTO, T. POZZAN**, Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86, 369-408 (2006).
- K. RÖMISCH, J. WEBB, J., HERZ, S. PREHN, R. FRANK, M. VINGRON, B. DOBBERSTEIN**, Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two E. coli proteins with putative GTP-binding domains. *Nature* 340, 478-482 (1989).
- H. SCHÄGGER, G. VON JAGOW**, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379 (1987).
- J. SCHALETZKY, T. A. RAPOPORT**, Ribosome binding to and dissociation from translocation sites of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 17, 3860-3869 (2006).
- N. SCHÄUBLE, S. LANG, M. JUNG, S. CAPPEL, S. SCHORR, Ö. ULUCAN, J. LINXWEILER, J. DUDEK, R. BLUM, V. HELMS, A. W. PATON, J. C. PATON, A. CAVALIÉ, R. ZIMMERMANN, R.** BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J* 31, 3282-3296 (2012).
- SCHÄUBLE, N.**, 'Charakterisierung der Funktionen von Calmodulin und BiP bei der Regulation des humanen Sec61-Komplexes', Dissertationsschrift, Institut für Theoretische Medizin und Biowissenschaften, Universität des Saarlands. (2013)
- G. SCHLENSTEDT, G. H. GUDMUNDSSON, H. G. BOMAN, R. ZIMMERMANN**, A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J Biol Chem* 265, 13960-13968 (1990).
- G. SCHLENSTEDT, G. H. GUDMUNDSSON, H. G. BOMAN, R. ZIMMERMANN**, Structural requirements for transport of preprocecropinA and related presecretory proteins into mammalian microsomes. *J Biol Chem* 267, 24328-24332 (1992).
- G. SCHLENSTEDT, R. ZIMMERMANN**, Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *EMBO J* 6, 699-703 (1987).

- M. SCHULDINER, J. METZ, V. SCHMID, V. DENIC, M. RAKWALSKA, H. D. SCHMITT, B. SCHWAPPACH, J. S. WEISSMAN, J. S.**, The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* 134, 634-645 (2008).
- P. SEEMAN, D. WEINSHENKER, R. QUIRION, L. K. SRIVASTAVA, S. K. BHARDWAJ, D. K. GRANDY, R. T. PREMONT, T. D. SOTNIKOVA, P. BOKSA, M. EL-GHUNDI, B. F. O'DOWD, S. R. GEORGE, M. L. PERREAULT, P. T. MÄNNISTÖ, S. ROBINSON, R. D. PALMITER, T. TALLERICO, T.**, Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3513-3518 (2005).
- K. L. SHAFFER, A. SHARMA, E. L. SNAPP, R. S. HEGDE**, Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function. *Dev Cell* 9, 545-554 (2005).
- S. SHAO, R. S. HEGDE**, A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell* 147, 1576-1588 (2011).
- S. SHAO, R. S. HEGDE**, Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 25-56 (2011 I).
- A. S. SHAW, P. J. ROTTIER, J. K. ROSE**, Evidence for the loop model of signal-sequence insertion into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7592-7596 (1988).
- T. SHIMIZU, M. HATANO**, Interaction of trifluoperazine with porcine calmodulin 19F NMR and induced CD spectral studies. *FEBS Lett* 160, 182-186 (1983).
- T. SHIMIZU, M. HATANO, Y. MUTO, Y. NOZAWA**, Interaction of trifluoperazine with Tetrahymena calmodulin. A 19F NMR study. *FEBS Lett* 166, 373-377 (1984).
- V. SIEGEL, P. WALTER**, Removal of the Alu structural domain from signal recognition particle leaves its protein translocation activity intact. *Nature* 320, 81-84 (1986).
- V. SIEGEL, P. WALTER**, Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: analysis of biochemical mutants of SRP. *Cell* 52, 39-49 (1988).
- S. SILBERSTEIN, R. GILMORE**, Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J* 10, 849-858 (1996).
- S. STEFANOVIC, R. S. HEGDE**, Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128, 1147-1159 (2007).
- STOKES, V.** (2012) 'Nachweis und Charakterisierung des post-translationalen Transports kleiner Proteine in das Endoplasmatische Retikulum des Säugers', Dissertationsschrift, Institut für Biologie, Universität zu Lübeck.

- C. J. SULOWAY, J. W. CHARTRON, M. ZASLAVER, W. M. CLEMONS**, Model for eukaryotic tail-anchored protein binding based on the structure of Get3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14849-14854 (2009).
- Y. TAKAGAKI, R. RADHAKRISHNAN, K. W. WIRTZ, H. G. KHORANA**, The membrane-embedded segment of cytochrome b5 as studied by cross-linking with photoactivatable phospholipids. II. The nontransferable form. *J Biol Chem* 258, 9136-9142 (1983).
- S. F. TRUEMAN, E. C. MANDON, R. GILMORE**, Translocation channel gating kinetics balances protein translocation efficiency with signal sequence recognition fidelity. *Mol Biol Cell* 22, 2983-2993 (2011).
- J. TYEDMERS, M. LERNER, C. BIES, J. DUDEK, M. H. SKOWRONEK, I. G. HAAS, N. HEIM, W. NASTAINCZYK, J. VOLKMER, R. ZIMMERMANN**, Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7214-7219 (2000).
- J. TYEDMERS, M. LERNER, M. WIEDMANN, J. VOLKMER, R. ZIMMERMANN**, Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 4, 505-510 (2003).
- B. VAN DEN BERG, W. M. CLEMONS, I. COLLINSON, Y. MODIS, E. HARTMANN, S. C. HARRISON, T. A. RAPOPORT**, X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36-44 (2004).
- M. VANDONSELAAR, R. A. HICKIE, J. W. QUAIL, L. T. DELBAERE**, Trifluoperazine-induced conformational change in Ca(2+)-calmodulin. *Nat Struct Biol* 1, 795-801 (1994).
- K. VERMEIRE, T. W. BELL, V. VAN PUYENBROECK, A. GIRAUT, S. NOPPEN, S. LIEKENS, S. SCHOLS, E. HARTMANN, K. U. KALIES, M. MARSH**, Signal peptide-binding drug as a selective inhibitor of co-translational protein translocation. *PLoS Biol* 12, e1002011 (2014).
- VERTESSY, B. G., HARMAT, V., BÖCSKEI, Z., NÁRAY-SZABÓ, G., OROSZ, F. AND OVÁDI, J.**, Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry* 37, 15300-15310 (1998).
- F. VILARDI, H. LORENZ, B. DOBBERSTEIN**, WRB is the receptor for TRC40/Asna1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *J Cell Sci* 124, 1301-1307 (2011).
- H. J. VOGEL**, Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem Cell Biol* 72, 357-376 (1994).
- G. VON HEIJNE**, Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 184, 99-105 (1985).
- R. M. VOORHEES, R. S. HEGDE**, Structures of the scanning and engaged states of the mammalian SRP-ribosome complex. *Elife* 4, (2015).

- P. WALTER, G. BLOBEL**, Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* 91, 557-561 (1981 III).
- P. WALTER, G. BLOBEL**, Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 91, 551-556 (1981 II).
- P. WALTER, G. BLOBEL**, Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol* 96, 84-93 (1983).
- P. WALTER, I. IBRAHIMI, G. BLOBEL**, Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 91, 545-550 (1981 I).
- F. WANG, E. C. BROWN, G. MAK, J. ZHUANG, V. DENIC**, A chaperone cascade sorts proteins for posttranslational membrane insertion into the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 40, 159-171 (2010).
- A. WEIHOFFEN, K. BINNS, M. K. LEMBERG, K. ASHMAN, B. MARTOGGIO**, Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 296, 2215-2218 (2002).
- B. WIEDMANN, H. SAKAI, T. A. DAVIS, M. WIEDMANN**, A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370, 434-440 (1994).
- K. WILD, K. R. ROSENDAL, I. SINNING**, A structural step into the SRP cycle. *Mol Microbiol* 53, 357-363 (2004).
- D. N. WILSON, R. BECKMANN**, The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling. *Curr Opin Struct Biol* 21, 274-282 (2011).
- S. L. WOLIN, P. WALTER**, Signal recognition particle mediates a transient elongation arrest of preprolactin in reticulocyte lysate. *J Cell Biol* 109, 2617-2622 (1989).
- A. YAMAGATA, H. MIMURA, Y. SATO, M. YAMASHITA, A. YOSHIKAWA, S. FUKAI, S.** Structural insight into the membrane insertion of tail-anchored proteins by Get3. *Genes Cells* 15, 29-41 (2010).
- X. ZHANG, R. RASHID, K. WANG, S. O. SHAN**, Sequential checkpoints govern substrate selection during cotranslational protein targeting. *Science* 328, 757-760 (2010).
- X. ZHANG, S. O. SHAN**, Fidelity of cotranslational protein targeting by the signal recognition particle. *Annu Rev Biophys* 43, 381-408 (2014).
- Y. ZHANG, U. BERNDT, H. GÖLZ, A. TAIS, S. OELLERER, T. WÖLFLE, E. FITZKE, S. ROSPERT**, NAC functions as a modulator of SRP during the early steps of protein targeting to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 23, 3027-3040 (2012).

- R. ZIMMERMANN, S. EYRISCH, M. AHMAD, V. HELMS**, Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808, 912-924 (2011).
- R. ZIMMERMANN, C. MOLLAY**, Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum. Requirements for membrane insertion, processing, and sequestration. *J Biol Chem* 261, 12889-12895 (1986).
- R. ZIMMERMANN, M. ZIMMERMANN, H. WIECH, G. SCHLENSTEDT, G. MÜLLER, F. MOREL, P. KLAPPA, C. JUNG, W. W. COBET**, Ribonucleoparticle-independent transport of proteins into mammalian microsomes. *J Bioenerg Biomembr* 22, 711-723 (1990).
- D. ZOPF, H. D. BERNSTEIN, A. E. JOHNSON, P. WALTER**, The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBO J* 9, 4511-4517 (1990).

7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Enno Hartmann für die Vergabe des Themas und für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Biologie der Universität zu Lübeck anfertigen zu können.

Zudem möchte ich mich bei PD Dr. Kai-Uwe Kalies für die umfassende Betreuung, kritischen Diskussionen und hilfreichen Hinweise während der Phase der Experimente wie auch während des Verfassens der vorliegenden Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. Christian Schmidt und dem Isotopenlabor für die Möglichkeit die Räumlichkeiten nutzen zu dürfen und die stets freundliche Unterstützung.

Weiterhin möchte ich die kollegiale Zusammenarbeit mit Suse Allan, Katharina Hauptenthal und Frauke Kerlin sowie den Mitarbeitern der Biologie hervorheben und bedanke mich herzlich für das sehr angenehme Arbeitsklima und die praktischen Tipps.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Norbert Tautz, der sich bereit erklärt hat als Gutachter diese Arbeit zu prüfen.

Zudem danke ich Petra Schweitzer, die stets ein offenes Ohr für Sorgen und Ängste hatte und mir motivierend und unterstützend zur Seite stand.

Ich möchte mich herzlichst bei meiner Familie bedanken, die es mir ermöglicht hat zu studieren und mir während dieser Promotion beigestanden und mir stets Kraft gegeben hat.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meinem Verlobten Benjamin Fritz, der mit Bravour als Fachfremder meine Arbeit Korrektur gelesen hat und darüber hinaus meine Launen ertragen und mich stets aus Kräften unterstützt hat.