

"Untersuchung der Effekte der ERp29-Defizienz auf ER-Stress  
und auf physiologische Parameter *in vitro* und *in vivo*"

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

*Doctor rerum naturalium*

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Irina Hirsch

geb. am: 12.08.1975 in Uwa, Russland

Gutachter /in

1. Prof. Dr. G. Fischer
2. Prof. Dr. T.M. Magin
3. Prof. Dr. E. Schwarz

Halle (Saale), 16.07.2012

---

# Inhalt

1	Literaturübersicht	
1.1	<i>Endoplasmic Reticulum Protein 29</i> (ERp29).....	1
1.1.1	Die Struktur von ERp29.....	1
1.1.2	Vorkommen und biologische Funktionen von ERp29.....	2
1.1.3	Die Rolle von ERp29 bei der Krebsentstehung und bei der Krebsentwicklung .....	3
1.2	Das Endoplasmatische Retikulum und die Proteinfaltungsmaschinerie.....	4
1.3	Ein Beispiel für die Proteinfaltung im ER: Faltung und Prozessierung von Thyreoglobulin.....	5
1.4	Stressantwort auf ungefalteten Proteine (UPR).....	6
1.5	Biologische und physiologische Bedeutung von ER-Stress und UPR.....	9
1.5.1	ER-Stress und Immunität.....	9
1.5.2	ER-Stress und Lipidmetabolismus.....	9
1.6	Intrazellulärer Proteinabbau.....	10
1.6.1	ER-assoziierte Degradation (ERAD).....	10
1.6.1.1	Erkennung von ungefalteten Proteinen.....	11
1.6.1.2	Retro-Translokation von misgefalteten Proteinen in das Zytosol.....	12
1.6.1.3	Ubiquitin-Proteasome System (UPS): Definition, Regulation und biologische Rolle.....	12
1.6.2	Autophagie: Definition, Regulation und biologische Rolle.....	13
1.7	Zelltod.....	14
1.7.1	Apoptose: Definition, Regulation und biologische Rolle.....	15
1.7.2	Nekrose: Definition, Regulation und biologische Rolle.....	16
1.8	Signalintegration im ER: Was ist entscheidend für Überleben und Tod?.....	17
1.9	Mechanismus und Regulation des Lipidstoffwechsels.....	19
2	Untersuchungsobjekt – das transgene Mausmodell.....	22

---

3	Aufgabenstellung und wissenschaftliche Fragen.....	23
4	Material und Methoden	
4.1	Material.....	24
4.1.1	Chemikalien.....	24
4.1.2	Primärantikörper.....	25
4.1.3	Sekundärantikörper.....	26
4.1.4	Größen- und Molekulargewichtsstandards.....	26
4.1.5	Enzyme.....	26
4.1.6	Farbstoffe.....	26
4.1.7	Kits.....	26
4.1.8	Primers.....	27
4.1.9	Material für die Zellkultur.....	27
4.1.10	Medien.....	27
4.1.11	Puffer und Lösungen.....	28
4.1.12	Material für Western Blot.....	28
4.1.13	Geräte.....	29
4.2	Methoden.....	30
4.2.1	Tierhaltung und Zucht.....	30
4.2.2	Primäre Phenotypisierung in <i>German Mouse Clinic</i> .....	30
4.2.3	Phenotypisierung von altersbedingten Veränderungen in ERp29KO Mäusen.....	31
4.2.4	Molekularbiologische Methode - Genotypisierung mittels PCR.....	32
4.2.4.1	Isolierung genomischer DNA.....	32
4.2.4.2	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction - PCR</i> ).....	32
4.2.4.3	Analyse der PCR Produkte mittels DNA Agarose Gel Elektrophorese.....	33
4.2.5	Zellbiologische Methoden.....	34
4.2.5.1	Anlegen von Primärkulturen aus Maus-Embryo-Fibroblasten.....	34
4.2.5.2	Kultivieren und Passagieren von adherenten Zellen.....	34
4.2.5.3	Einfrieren und Auftauen.....	35
4.2.5.4	Spontane Immortalisierung von Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) mittels 3T3 Protokoll.....	35

4.2.5.5	Klonogenität Studien bei embryonalen Fibroblasten.....	35
4.2.5.6	Untersuchung der radialen Zellmigration aus einem Monolayer bei embryonalen Fibroblasten.....	36
4.2.5.7	Anlegen von Primärkulturen aus dermalen Mausfibroblasten.....	36
4.2.5.8	Isolierung von Follikeln aus der murinen Schilddrüse...	37
4.2.5.9	Behandlung von Thyreozyten mit Tunicamycin.....	37
4.2.5.10	Zellkulturbasierte Analyse.....	37
4.2.5.11	Untersuchung der Caspase-3-Aktivität in gestressten Thyreozyten.....	38
4.2.5.12	Induktion von oxidativem Stress bei Fibroblasten.....	39
4.2.5.13	Nachweis der Apoptose und Nekrose mittels Durchflusszytometrie.....	39
4.2.6	Immunzytochemische Methode und Fluoreszenzmikroskopie: Immunfärbung von Fibroblasten.....	40
4.2.7	Proteinanalytische Methoden.....	40
4.2.7.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	40
4.2.7.2	Herstellung von murinen Organextrakten.....	40
4.2.7.3	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Pierce® 660 nm Protein assay Kit.....	41
4.2.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE).....	41
4.2.7.5	Western Blot-Analyse.....	42
4.2.8	Analytische Methode: Konzentrationsbestimmung von Wasserstoffperoxid im Medium mittels <i>ferrous oxidation - xyleneol orange</i> (FOX)-Analyse.....	43
4.2.9	Statistische Auswertung der Messdaten.....	44

## 5 Ergebnisse

5.1	Charakterisierung primärer und immortalierter ERp29-defizienter Zellen.....	45
5.1.1	Spontane Immortalisierung primärer Maus-Embryo-Fibroblasten.....	45
5.1.2	Charakterisierung der primären MEF und der immortalen Zelllinien..	48
5.1.3	Charakterisierung der embryonalen Fibroblasten mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	53
5.1.4	Präparation der dermalen Fibroblasten und ihre Charakterisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	55
5.1.5	Präparation von Thyreozyten.....	57

---

5.2	Untersuchung der Antwort auf oxidativen Stress in embryonalen und adulten ERp29-defizienten Zellen.....	58
5.2.1	Konzentrationsbestimmung von Wasserstoffperoxid im Medium mittels <i>ferrous oxidation - xylenol orange (FOX)</i> -Analyse.....	58
5.2.2	Untersuchung der Antwort auf oxidativen Stress in embryonalen Fibroblasten.....	61
5.2.3	Untersuchung der Antwort auf oxidativen Stress in dermalen Fibroblasten.....	63
5.2.3.1	FACS-Analyse.....	63
5.2.3.2	Western Blot-Analyse.....	65
5.3	Inhibierung der N-Glykosylierung von Thyreoglobulin mittels Tunicamycin-Behandlung.....	67
5.4	Phenotypisierung der ERp29 Knockout Maus.....	71
5.4.1	Reproduktive Eigenschaften.....	72
5.4.1.1	Analyse der reproduktiven Erfolgsrate und der Wurfgröße.....	72
5.4.1.2	Analyse der Genotyp-Verteilung bei Nachwuchs von heterozygoter Verpaarungen und des elterlichen Verhaltens.....	73
5.4.2	Primäre Phenotypisierung der ERp29 KO Maus in der <i>German Mouse Clinic</i> .....	74
5.4.2.1	Steroid-Metabolismus.....	75
5.4.2.2	Klinisch-chemische Analyse von Blutplasma.....	76
5.4.2.3	Analyse der Energie-Balance.....	77
5.4.2.4	Neurologische Phenotypisierung.....	77
5.4.2.5	Analyse des Verhaltens.....	78
5.4.2.6	Analyse der Lungenfunktion.....	79
5.4.2.7	Skelett-Phenotypisierung.....	79
5.4.2.8	Kardiovaskuläre Phenotypisierung.....	80
5.4.2.9	Immunologische Phenotypisierung.....	80
5.4.3	Altersbedingte Veränderungen des Körpergewichtes.....	81
5.4.4	Altersbedingte Veränderungen der Chaperonen-Expression in verschiedenen Organen der KO Maus.....	82
5.4.4.1	Chaperonen- und Leptin-Expression im Gehirn.....	82
5.4.4.2	Chaperonen-Expression im Herz.....	84
5.4.4.3	Chaperonen-Expression in Nieren.....	84

---

5.4.4.4	Expression einiger ER-Chaperone und einiger Fettstoffwechsel-Proteine in Leber.....	85
5.4.4.5	Expression einiger UPR-Proteine in sekretorischen Organen	87
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	
6.1	Untersuchung der Funktion von ERp29 in der Zellkultur.....	88
6.1.1	Maus-Embryo-Fibroblasten als Modell für Studien der Rolle von ERp29 bei der Krebsentstehung und beim oxidativen Stress.....	88
6.1.1.1	Immortalisierung der ERp29-defizienten MEF.....	88
6.1.1.2	Charakterisierung primärer und immortalisierter ERp29KO MEF.....	90
6.1.1.3	Studien der Antwort auf oxidativen Stress bei embryonalen Fibroblasten.....	93
6.1.2	Dermale Fibroblasten als Modell für Studien der Rolle von ERp29 bei der Alterung und beim oxidativen Stress.....	96
6.1.3	Inhibierung der N-Glykosylierung des Thyreoglobulins mittels Tunicamycin-Behandlung.....	99
6.2	Phenotypisierung der ERp29 Knockout Maus.....	101
6.2.1	Verhalten und Reproduktivität.....	101
6.2.2	Endokrinologie und Stoffwechsel.....	103
6.2.3	Immunität.....	104
6.2.4	Anatomie und Organfunktion.....	105
6.3	Untersuchung der Proteinexpression in ERp29-defizienten Organen mittels Western Blot.....	106
6.4	Übersicht über die Effekte der ERp29-Abwesenheit in Maus.....	109
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Literaturliste</b> .....	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>125</b>
Anhang 1	FACS-Messung des Zelltodes bei MEF beim oxidativen Stress.....	125
Anhang 2	FACS-Messung des Zelltodes bei adulten dermalen Fibroblasten beim oxidativen Stress.....	127
Anhang 3	Klinische Chemie.....	128
Anhang 4	Studien von Energie-Metabolismus mittels indirekter Kalorimetrie.	129

---

Anhang 5	Neurologische Phenotypisierung.....	129
Anhang 6	Analyse des Verhaltens.....	130
Anhang 7	Analyse von Körperaufbau mittels NMR.....	131
Anhang 8	Lungenfunktion.....	131
Anhang 9	Kardiovaskuläre Phenotypisierung.....	132
Anhang 10	Immunologische Phenotypisierung.....	133
Anhang 11	Studien der Nozizeption als Reaktion auf die Heizplatte.....	133
Anhang 12	Untersuchung der Augen.....	134
Anhang 13	Hämatologie.....	134
	Abkürzungsverzeichnis.....	135

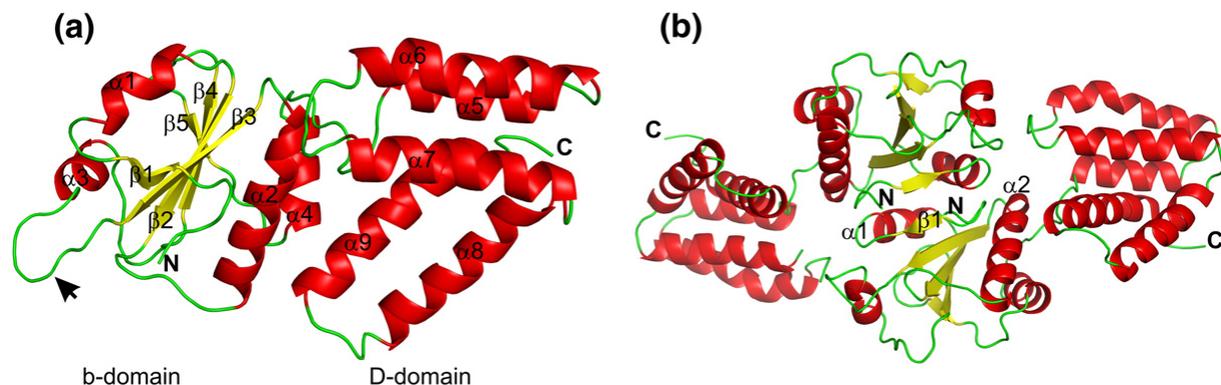
# 1 Literaturübersicht

## 1.1 Endoplasmic Reticulum Protein 29 (ERp29)

### 1.1.1 Die Struktur von ERp29

Das Protein wurde ursprünglich aus humanem und aus Ratengewebe isoliert (Demmer et al., 1997; Ferrari et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass ERp29 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist und ein Molekulargewicht von 24,8 kDa besitzt (Ferrari et al., 1998). ERp29 gehört zur PDI-Familie, weil es eine gewisse Sequenzähnlichkeit zu den Mitgliedern dieser Familie aufweist. ERp29 besitzt kein Thioredoxin-aktives Motiv CXXC, und, als Folge dessen, auch keine Oxidoreduktase- und Isomerase-Aktivität (Ferrari et al., 1998).

Das humane *erp29* Gen befindet sich auf dem Chromosom 12q24.13 und kodiert für das Protein mit 261 Aminosäureresten (Ferrari et al., 1998). ERp29 besteht aus einer redox-inaktiven Trx-ähnlichen b-Domäne und einer C-terminalen,  $\alpha$ -helikalen D-Domäne (Abb. 1 (a)). Letztere enthält eine ER-Rückführung-Signalsequenz KEEL. Die zwei Domänen sind durch eine flexible Schleife (Reste 149 - 159) miteinander verbunden (Barak et al., 2009). ERp29 legt als Homodimer vor, dessen Monomere eine nicht-kovalente Interaktion miteinander eingehen (Abb. 1 (b)) (Ferrari et al., 1998; Barak et al., 2009).



**Abbildung 1. Struktur von humanem ERp29 (Barak et al., 2009).**

(a) Struktur eines ERp29-Monomers, mit der Reihenfolge der Sekundärstrukturelemente. Die Trx-ähnliche b-Domäne ist links gezeigt und die helikale D-Domäne ist rechts gezeigt. Das Dimer ist in (b) gezeigt. (Das Molekül ist um 90° im Vergleich zum Monomer in (a) gedreht). Die Strukturelemente, die an der Dimer-Interaktion teilnehmen, sind markiert.  $\beta$ -Stränge sind gelb,  $\alpha$ -Helices sind in Rot hervorgehoben, Schleifen sind in Grün dargestellt.

Die dreidimensionale Struktur von ERp29 zeigt eine große strukturelle Ähnlichkeit zu seinem Ortholog Wind-Protein aus *Drosophila melanogaster* (Ma et al., 2003). Das Wind-

Protein spielt eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung bei der dorsal-ventralen Differenzierung und für den Pipe-Transport aus ER zum Golgi. Pipe ist ein Golgi-Resident Transmembranprotein Typ II, das ein Homolog des Heparan-Sulfat-2-O-Sulfotransferase in *Mammalia* ist (Sergeev et al., 2001; Kobayashi et al., 1997; Ma et al., 2003, Barnewitz et al., 2004).

### 1.1.2 Vorkommen und biologische Funktionen von ERp29

ERp29 wird ubiquitär in allen Geweben von *Mammalia* exprimiert, eine besonders hohe Expression wurde jedoch in sekretorischen Geweben (Leber, Gehirn, Niere, Speicheldrüse, Schilddrüse usw.) festgestellt (Mkrtchian and Sandalova, 2006).

Ähnlich anderen Mitgliedern der PDI-Familie fungiert das ERp29 als Chaperon und Eskorte-Protein, das vermutlich an der Stabilisierung des monomeren Connexin43 (Cx43) und seinem Transport aus dem ER beteiligt sein soll. Cx43 ist ein *gap junctions*-Protein, das multimere Membran-Kanäle für die interzelluläre Kommunikation bildet. Seine Oligomerisierung findet im Golgi statt. Assemblierung von Cx43-Monomeren zu *gap junctions* ist mit ihrer Stabilisierung durch Disulfid-Brücken zwischen Domänen verbunden. ERp29 besitzt kein katalytisches (CXXC) Motiv, das für die Bildung von Disulfid-Brücken notwendig ist. Es wird vermutet, dass die Stabilisierung der monomeren Form von Cx43 durch die Interaktion mit redox-inaktivem ERp29 stattfindet. ERp29 blockiert dabei Cys-Reste zwischen Domänen und verhindert so ihre Oligomerisierung im ER (Das et al., 2009).

Mehrere Autoren zeigten eine erhöhte ERp29-Expression in durch Radioaktivität (Zhang et al., 2008), Dopamin (Dukes et al., 2008) und Homocystein (Hung et al., 2009) gestressten Zellen, und schließen daraus eine Beteiligung dieses Proteins an der zellulären Stressantwort und, möglicherweise, einen Schutz gegen Stress (Zhang and Putti, 2010). Eine Hochregulation von ERp29, nicht aber von PDI oder BiP, wurde auch beim ER-Stress in Krebszellen festgestellt (Mkrtchian et al., 1998a; Shnyder et al., 2008). Dies weist auf eine Abweichung des ERp29 von der klassischen ER-Stress-Antwort hin (siehe 1.4). Es wurde gezeigt, dass die erhöhte Expression von ERp29 den ER-Stressweg verändert und zum Wachstumsarrest führt. Einen direkten Einfluss von ER-Stress auf die Regulation der ERp29-Transkription konnte nicht nachgewiesen werden (Ferrari et al., 1998). Deshalb erfolgt die Hochregulation von ERp29 unter ER-Stress-Bedingungen wahrscheinlich durch die Beteiligung anderer regulatorischer Elemente, die bei diesem Stimulus betroffen sein könnten. Eine Analyse des *erp29*-Promoters zeigte mehrere Bindungsstellen für eine Anzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren (z.B. GATA-1, Sp1, E2F, CRE-BP1), die die basale Expression von ERp29 durch ihre gemeinsame Aktivität bestimmen (Sargsyan et al., 2002a).

Der genaue Mechanismus der Transkriptionsaktivität von ERp29 in verschiedenen Gewebetypen oder in verschiedenen Zellen bleibt jedoch ungeklärt.

Der nächste Aspekt der Funktion von ERp29, der zur Zeit in der Literatur diskutiert wird, ist seine Beteiligung an der Befruchtung bei *Rodenta*. Mittels LSCM (*laser scanning confocal microscopy*) und mittels Western Blot-Analyse wurde gezeigt, dass während des Reifens von Spermien eine ERp29-Akkumulierung in Zellen des Nebenhodens stattfindet (Guo et al., 2007). Die funktionelle Blockierung von ERp29 durch spezifische Antikörper verhinderte das Durchdringen von Spermien in die Oozyte und reduzierte so die Befruchtungsrate bei Mäusen (Ying et al., 2010). Demzufolge wird vermutet, dass ERp29 ein wichtiger Faktor für die Reifung der Spermien und für die Spermium-Oozyt-Verschmelzung ist.

### **1.1.3 Die Rolle von Erp29 bei der Krebsentstehung und bei der Krebsentwicklung**

In Krebszellen ist die ER-Homeostase durch verschiedene physiologische und pathologische Faktoren, wie z.B. oxidativen Stress, DNA-Schaden,  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug, onkogene Faktoren, gestört. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine Akkumulation von nicht-gefalteten und nicht-nativ gefalteten Proteinen, was zum ER-Stress und demzufolge zur Aktivierung der ER-spezifischen Signalwege führt (Ron and Walter, 2007).

Außerdem spielen epithelial-mesenchymale und mesenchymal-epitheliale Übergänge eine Schlüsselrolle im Krebsverlauf. Der epithelial-mesenchymale Übergang steuert durch die steigende Invasion die Verbreitung von Metastasen und durch die therapeutische Resistenz der Krebsentwicklung bei, während der mesenchymal-epitheliale Übergang einen entscheidenden Prozess für die nachfolgende Bildung von entfernten Metastasen darstellt (Chaffer et al., 2007).

Der epithelial-mesenchymale Übergang kann durch multiple oncogene Signalwege ausgelöst werden. Dies sind: **(1)** der TGF- $\beta$  Signalweg; **(2)** der (Wnt)/ $\beta$ -Catenin Signalweg; **(3)** der AKT-Signalweg; und **(4)** der Notch-Signalweg (Polyak and Weinberg, 2009). Das entscheidende molekulare Ereignis am Ende dieser Signalwege ist die Herunterregulierung des Zell-Adhäsion-Moleküls E-Cadherin (Polyak and Weinberg, 2009; Brcken et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Überexpression von ERp29 in mesenchymähnlichen MDA-MB-231 Brustkrebszellen in dem Verlust des mesenchymalen Zellmarker-Vimentin und im Erwerben von epitheliale Zellmarker-E-Cadherin resultiert (Bambang et al., 2009b). Der ERp29-gesteuerte mesenchymal-epitheliale Übergang wurde durch die Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren Twist, Slug and Ets1 charakterisiert (Bambang et al., 2009b). Somit wurde gezeigt, dass ERp29 eine wichtige Rolle im mesenchymal-epithelialen Übergang in MDA-MB-231 Brustkrebszellen spielt.

Außerdem wurde auch eine hohe Expression von ERp29 in einigen primären Tumoren, wie z.B. Basalzellenkrebs und Lungenkrebs, festgestellt (Cheretis et al., 2006; Shnyder et al., 2008). Trotz mehrerer Untersuchungen ist die Rolle von ERp29 in der Tumorgenese nicht aufgeklärt bzw. zum Teil widersprüchlich. Eine onkogene Rolle von ERp29 in Brustkrebs wurde beispielsweise anhand der ERp29 Knockdown nicht-invasiven MCF-7 Brustkrebszellen mit einer verringerten Krebsbildung abgeleitet (Mkrtchian et al., 2008). Durch spätere Studien wurde jedoch eine tumorsuppressive Wirkung von ERp29 durch die ERp29-transfizierte MDA-MB-231 Xenotransplantante belegt (Bambang et al., 2009b). Es wurde auch gezeigt, dass die Überexpression von ERp29 indirekt in der Transkriptionsaktivität von Genen mit suppressiver Funktion (E-Cadherin und Milz Tyrosin Kinase) resultieren könnte. Außerdem inhibiert ERp29 den epidermalen Wachstumsfaktor (uPAR)/ $\beta$ -Integrin Komplex, der die Zellmigration und die Zellinvasion fördert (Gondi et al., 2007). Diese Daten unterstützen jedoch die Annahme über die Rolle von ERp29 als neuer Modulator von mehreren Signalwegen.

## 1.2 Das Endoplasmatische Retikulum und die Proteinfaltungsmaschinerie

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist eine Organelle mit wichtigen biosynthetischen und Signalfunktionen in eukaryotischen Zellen. Das ER ist nicht nur der größte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, sondern bietet auch eine geeignete Umgebung für die Synthese, Faltung und Modifikationen von Proteinen, die für die Sekretion oder für das Einbauen in die Plasmamembran bestimmt sind. Außerdem ist das ER der wichtigste Ort in der Zelle für die Biosynthese von Steroiden, von Cholesterol und von Lipiden (Berridge, 2002).

Faltung und Assemblierung von Polypeptiden im ER werden von mehreren Chaperonen und  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen unterstützt und überwacht. Gefaltete Proteine müssen eine strenge Kontrolle durch die evolutionär konservierte ER-Qualitätskontrolle bestehen. Dazu gehören drei Klassen von Proteinen: Faltungsenzyme, molekulare Chaperone und Lektine (Calnexin, Calretikulin, EDEM). Die bedeutendsten Beispiele von Foldasen sind *cis-trans* peptidylprolyl Isomerasen und Proteindisulfidisomerasen (PDI).

Molekulare Chaperone ermöglichen die Proteinfaltung durch die Abschirmung der ungefalteten Regionen von umgebenden Proteinen und verhindern die Proteinaggregation durch Interaktion mit hydrophoben Bereichen. Sie werden in mehreren Gruppen unterteilt: HSP70 Chaperone im ER sind BiP, Lhs1p und GRp170 (Schröder and Kaufman, 2005). BiP nimmt zudem an der Translokation von freiwerdenden Polypeptidketten in das ER teil. HSP90 Chaperone (z.B. GRp94/Endoplasmin) erkennen eine Vielzahl von Peptidsubstraten

(abgestimmt mit anderen Chaperonen, wie z.B. BiP) und erleichtern eine Präsentation von immunogenen Peptiden an MHC Klasse I Komplexen. Zusätzlich besitzt PDI die Eigenschaften eines Faltungsenzyms und molekularen Chaperons zugleich. PDI oxidiert Cys-Reste in freiwerdenden Proteinen, was in der Bildung von intra- und intermolekularen Disulfid-Brücken resultiert, während reduzierte PDI wiederum durch die Thioloxydoreduktase ERO1 oxidiert wird. ERO1 überträgt reduzierte Äquivalente zum molekularen Sauerstoff und erzeugt dabei eine stöchiometrische Menge an  $H_2O_2$ . Dies führt zu einer Abnahme des reduzierten Gluthation-Pools (Sevier and Kaiser, 2008).

Der Calnexin/Calretikulin-Zyklus kontrolliert die Konformation von Glykoproteinen und bestimmt, ob ein Protein zum Golgi oder zur ER-assoziierten Degradation (ERAD) transportiert wird.

Die Abweichungen in ER-Funktion verursachen mehrere Krankheiten, die in vier Klassen unterteilt werden (Übersicht bei Schröder und Kaufman, 2005):

1. **Mutante Transportmoleküle.** Mutationen in Transportmolekülen resultieren im Zurückhalten der Beladung im ER. Dazu gehören solche Krankheiten, wie Zystische Fibrose, Amyloide Toxizität und Autosomal-dominante Diabetes bei Akita-Maus.
2. **Fehlerhafte ER-Faltung und Transportmaschinerie** verhindern, dass ein Wildtyp Protein sein Ziel erreicht. Ein typisches Beispiel für diese Krankheitsklasse ist die Faktor V- und Faktor VIII-Defizienz durch die Mutation im Lektinkomplex.
3. **Fehlerhafte UPR-Signalgebung.** Diese Krankheiten werden durch den Ausfall einer UPR-Achse (*unfolded protein response*) verursacht. Das ist als Beispiel Insulin-unabhängiger Diabetes (Wolcott-Rallison Syndrom), bedingt durch die Kinase-Mutation in PERK-Achse.
4. **Hemmung adaptiver Antwort, die durch UPR reguliert wird.** Polyglutamin-Wiederholungen verursachen proteasomale Dysfunktion, das zum Ausfall einer UPR-Achse führt und, als Folge dessen, zur Apoptose-Aktivierung durch das ASK1. Diese Art der Störung verursacht neurodegenerative Krankheiten, wie z. B. Huntington's Krankheit, Spinobulbare muskulare Atrophie u.a.

### 1.3 Ein Beispiel für die Proteinfaltung im ER: Faltung und Prozessierung von Thyreoglobulin

Thyreoglobulin (Tg) ist ein komplexer Klient der ER-Faltungsmaschinerie. Es ist das meist sekretierte Protein von Thyrozyten. Es handelt sich hierbei um ein extrem großes Glykoprotein, das 13 % der gesamten Proteinsynthese ausmacht und als Vorläufer-Protein

für die Synthese von Thyreoidhormonen und als Jod-Speicher dient (Dunn et al., 1985). Ein Tg-Molekül besteht aus 2750-Aminosäureresten, das große Veränderungen durchmacht, bevor es in das follikuläre Lumen als 660 kDa Homodimer freigesetzt wird (Malthiery et al., 1989). Es enthält bis zu 60 intramolekulare Disulfid-Bindungen und 10 - 15 N-gebundene Oligosaccharide pro Tg-Molekül, woraus ein großes Potential für Mißfaltungen erzeugt wird (Kim and Arvan, 1995). Daher kann die Faltung von Tg als eine anspruchsvolle Aufgabe für Chaperone und Faltungsenzyme betrachtet werden.

Tg ist aufgrund eines hohen Expressionsgrades und wegen außergewöhnlicher Langsamkeit beim Ausreifen der quarternärer (dimerische) Struktur ein hervorragendes Modell zur Untersuchung der Proteinfaltungsmaschinerie und des Exports aus dem ER. Die Untersuchung der Tg-Faltung ermöglicht außerdem Studien von einzelnen kinetischen Stadien normaler Polypeptid-Faltung im ER in nicht-transformierten und nicht-infizierten Zellen. Für die Faltung von Tg ist eine starke Unterstützung von Chaperonen erforderlich. Mittels DTT für die langsame Auflösung von Aggregaten *in vivo* wurde gezeigt, dass Calnexin und BiP als sequenzielle molekulare Chaperone in der Tg-Faltung fungieren (Kim and Arvan, 1995). Andere Faltungsfaktoren sind GRp170, GRp94, ERp72, ERp29 und Calreticulin (Kuznetsov et al., 1994; Sargsyan et al., 2002b; Baryshev et al., 2006; Christis et al., 2008). Die Faltung von neusynthetisierten Tg-Molekülen verläuft langsam. Für die oxidative Faltung sind 60 - 90 min notwendig (Di Jeso et al., 2003), weil die Halbwertszeit des ER-Golgi-Transports etwa 90-120 min beträgt.

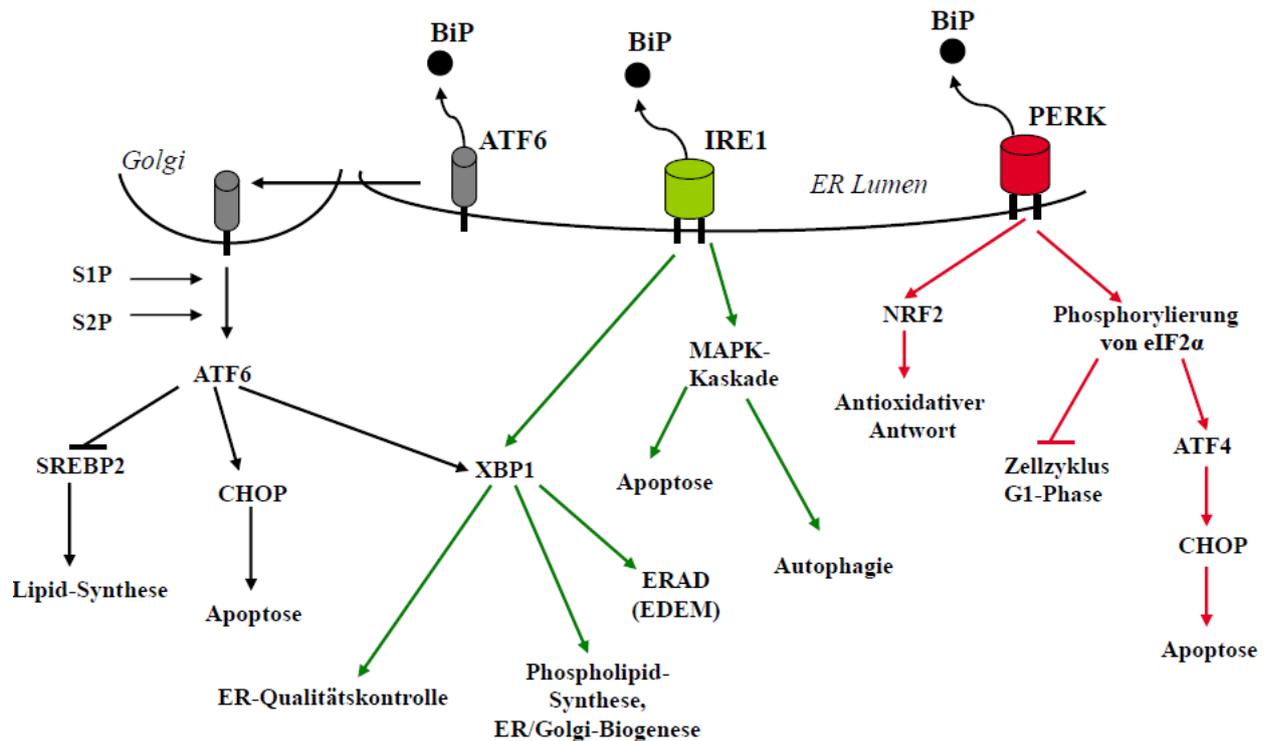
#### **1.4 Stressantwort auf ungefalteten Proteine (UPR)**

Eine gesunde, ungestresste Zelle passt ständig ihre Proteinsynthese- und Degradation-Kapazität an, um eine Anhäufung von falsch gefalteten Proteinen zu vermeiden und um ihre Homeostase aufrechtzuerhalten. Mehrere physiologische und pathologische Zustände, einschließlich Hypoxia,  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug aus ER, oxidativer Stress, virale Infektion usw. können eine Gleichgewichtsstörung zwischen ER-Beladung und ER-Faltungskapazität verursachen. Als Folge deren findet eine Akkumulierung von ungefalteten Proteinen im ER-Lumen statt, die ER-Stress verursacht. Als Antwort auf ER-Stress wird eine evolutionär konservierte Signalkaskade aktiviert, auch bekannt als *unfolded protein response* (UPR) (Verfaillie et al., 2010).

Drei transmembrane Proteine leiten das durch die Akkumulierung von ungefalteten Proteinen entstandene Signal durch die ER-Membran (Abb. 2). Die ER-lumenale Domäne des Typ I Transmembranproteins IRE1 und PERK sind ER-Stress regulierte Oligomerisationsdomänen (Liu et al., 2002). Der Typ II Transmembranprotein-aktivierende Transkriptionsfaktor 6

(ATF6) enthält zwei unabhängige ER-Stress-regulierte Golgi-Lokalisierungssequenzen (GLS) (Shen et al., 2002).

Im inaktiven Zustand sind die lumenalen Domänen von IRE1 und PERK mit BiP assoziiert. Nach dem ER Stress löst sich das BiP durch den Überschuss von ungefalteten im ER-Lumen Proteinen von den lumenalen Domänen der IRE1 and PERK ab. Dabei findet eine Oligomerisierung von IRE1 und PERK sowie die Aktivierung ihrer proximalen Signaltransducer statt.



### Abbildung 2. Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege während UPR

Im Schema sind drei UPR-Achsen dargestellt: BiP - ATF6 (grau), BiP - PERK (rot) und BiP - IRE1 (grün). Über diese Achsen werden mehrere zelluläre Signaltransduktionswege aktiviert, die entweder in der Anpassung der Zelle auf ER-Stress und in ihrem Überleben, oder im programmierten Zelltod resultieren.

Laut diesem Modell ist die Interaktion von BiP mit seinen Substraten kurzlebig. Daher sind für eine Freisetzung von IRE1 und PERK nur kleine Schwankungen in der freien BiP-Population notwendig. In IRE1 $\alpha$  überlappen sich teilweise die Domänen, die für die Signalübertragung, Oligomerisierung und BiP-Bindung notwendig sind (Liu et al., 2002). Dabei kann BiP ein wichtiges Oligomerisierungsmotiv in IRE1 $\alpha$  sogar maskieren und es in seinem inaktiven monomeren Zustand halten (Ma et al., 2002). Die Oligomerisierung von IRE1 resultiert in einer *trans*-Autophosphorylierung, die zur Prozessierung der uXBP1 (*unspliced* XBP1) führt (Calfon et al., 2002). sXBP1 (*spliced* XBP1) kodiert den Transkriptionsfaktor XBP1, der die Transkription von mehreren Genen reguliert. Diese Gene

sind an der ER-Qualitätskontrolle, der ER/Golgi-Biogenese, und auch an den ERAD-Komponenten, der redox-Homeostase und der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt (Lee et al., 2005; Acosta-Alvear et al., 2007). Eine anhaltende Aktivierung von IRE1 ist zur Weiterleitung der MAP-Kinase-Kaskade fähig. Dabei dient das IRE1 als molekulare Plattform für die Rekrutierung des Adaptor-Proteins TRAF2 und der E3 Ubiquitin-Ligase, die zur Aktivierung von ASK1 (Apoptose-Kaskade), von MAP3K und von JNK/p38 MAPK Signaltransduktionsweg führt. In Abhängigkeit vom zellulären Zustand ermöglicht eine Aktivierung von JNK entweder die Aktivierung der Autophagie, oder begünstigt Apoptose als Antwort auf einen anhaltenden oder irreversiblen ER-Stress.

Die Aktivierung von PERK induziert Veränderungen seiner Konformation und erhöht somit seine Affinität für eIF2 $\alpha$ . Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  am Ser51 durch PERK resultiert in einem schnellen Umschalten von der normalen Translation auf ER-Stress und auf Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus (DuRose et al., 2009). PERK phosphoryliert zusätzlich zu eIF2 $\alpha$  auch NRF2. Diese Phosphorylierung begünstigt eine Dissoziation von Keap1, was zur Akkumulierung von Nrf2 im Zellkern führt. Dort bindet NRF2 an Promoter der Gene, die für detoxifizierende Enzyme, wie z.B. HO-1 (*heme oxygenase 1*), kodieren (Ishii et al., 2000). Dies zeigt, dass die PERK-Achse während der UPR in zwei parallele Signaltransduktionswege divergieren kann: PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4-CHOP, der zur Apoptose führt, und PERK-NRF2, deren Rolle im ER in einer Anpassung an den oxidativen Stress besteht.

Alle Isoformen von ATF6 (ATF6 $\alpha$  und ATF6 $\beta$ ) kommen in allen Zelllinien als Typ II transmembrane Proteine vor. ATF6 ist auf ähnliche Art und Weise wie PERK oder IRE1 reguliert. Die Unterschiede bestehen darin, dass BiP nicht die Aktivität von Oligomerisierungsdomänen in ATF6, sondern die Aktivität von zwei Golgi-Lokalisierungssequenzen GLS1 und GLS2 reguliert. Unter normalen Bedingungen bindet BiP nur an GLS1. In Abwesenheit von BiP beim ER-Stress dominiert GLS2, was in der Translokation von ATF6 zum Golgi und seiner Spaltung durch S1P (*site 1 protease*) und S2P (*site 2 protease*) resultiert (Shen et al., 2002). Das N-terminale zytosolische ATF6-Fragment reguliert Aktivität transkriptioneller Zielmoleküle (XBP1) und der Proteine, die sowohl Chaperon-Aktivität, als auch den Abbau von ER-Proteinen steigern. Dadurch spielt das ATF6 eine wichtige Rolle bei der „Erholung“ vom akuten ER-Stress und der Anpassung der Zellen an den chronischen ER-Stress. Außerdem wirkt die ATF6-Aktivierung dem SREBP entgegen und unterdrückt seine lipogene Funktion (Schröder and Kaufman, 2005).

## 1.5 Biologische und physiologische Bedeutung von ER-Stress und UPR

ER-Stress und ER-Homeostase sind für die Aufrechterhaltung der Körperfunktionen auf mehreren Ebenen notwendig.

### 1.5.1 ER-Stress und Immunität

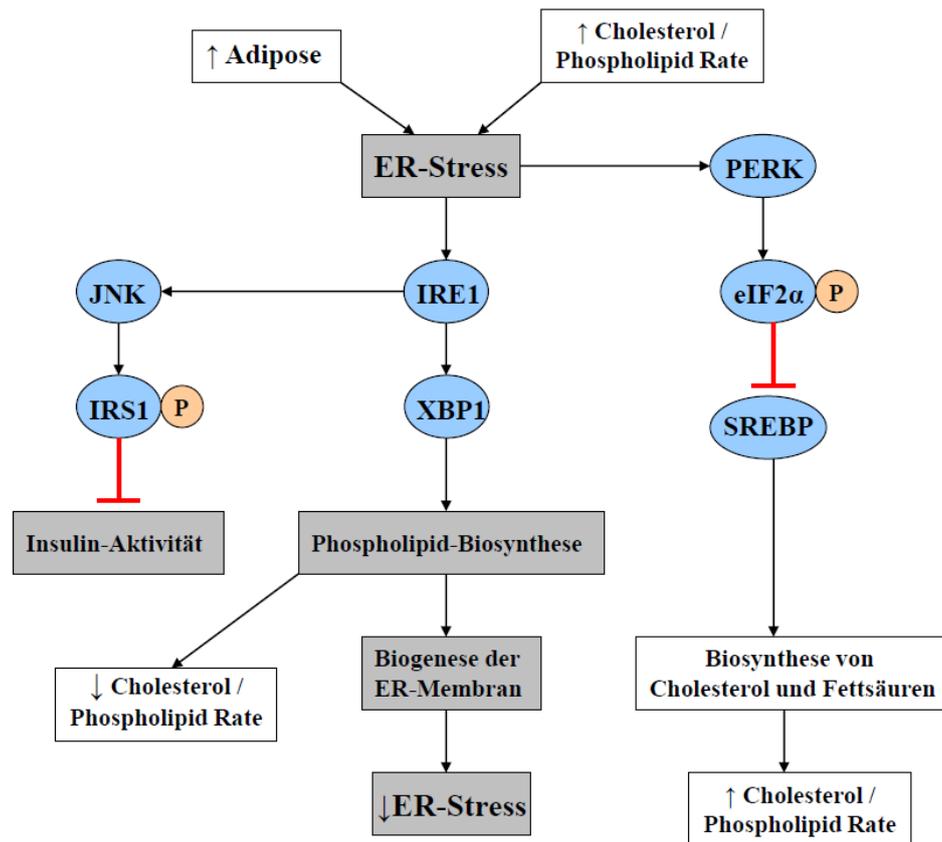
Es gibt immer mehr Beweise, die einen Zusammenhang zwischen ER-Stress und der Funktion des Immunsystems zeigen. Dabei spielen Glukokortikoide der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse eine entscheidende Rolle. Die molekulare Basis dieser Ereignisse ist noch nicht genau geklärt. Bekannt ist aber, dass dabei eine Aktivierung von ATF6 und XBP1 stattfindet, die die Expression von Zytokinen beeinflussen (Smith et al., 2008; Zhou et al., 2010).

### 1.5.2 ER-Stress und Lipidmetabolismus

Ein Überfluss an Nahrung und an Energie stimuliert Fett-Synthese und führt zur Suppression der Proteinsynthese (Fu et al., 2011). Eine steigende Lipidsynthese führt zur Akkumulierung von Cholesterol in ER-Membranen, fördert ER-Stress und aktiviert die UPR (Abb. 3). Dabei findet wahrscheinlich eine Aktivierung des IRE1-JNK-Signalweges statt, der seinerseits die Signalübertragung abwärts vom Insulin-Rezeptor unterdrückt (Scheuner et al., 2005).

Die PERK-vermittelte eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und ATF6-Aktivierung wirken dem SREBP2 entgegen. SREBPs kontrollieren mehrere Signalwege des Lipidstoffwechsels in tierischen Zellen. Sie sind mit ER verbunden und teilen Aktivierungskomponenten mit UPR (Ye et al., 2000).

UPR begünstigt eine Expansion von Lipidkomponenten in der Zellmembran. Die Rolle von IRE1 und XBP1 in der Proliferation von Endomembranen und in der Phospholipid-Biosynthese ist in *Mammalia* konserviert (Sriburi et al., 2004). Dies erklärt wahrscheinlich die essenzielle Rolle von XBP1 bei der Entwicklung von mehreren Typen sekretorischer Zellen (Lee et al., 2005). Es bleibt dennoch unklar, welche Effekte begünstigen die UPR-Aktivierung. Entweder passiert es infolge einer indirekten Störung der Proteinfaltung im ER-Lumen, oder es könnten IRE1, PERK oder ATF6 direkt die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung des ER-Bilayers erkennen (van der Sanden et al., 2003).



**Abbildung 3. Schema der Zusammenhänge zwischen ER Stress und Lipidmetabolismus (Ron and Walter, 2007).**

Akkumulierung von Cholesterol in der ER-Membran führt zum ER-Stress. ER-Stress aktiviert IRE1, dass zur Erhöhung der XBP1-abhängigen Phospholipid-Biosynthese und zur Aktivierung von JNK führt. Durch die Phosphorylierung von IRS1 (insulin receptor substrate-1) unterdrückt JNK die Insulin-Signalwirkung und führt so zur Insulin-Resistenz. Die PERK-vermittelte Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  wirkt der Aktivierung von SREBP entgegen und reduziert dadurch die Cholesterol-Synthese.

## 1.6 Intrazellulärer Proteinabbau

Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen der Proteinsynthese und dem Proteinabbau ist grundlegend wichtig für die korrekte Zellfunktion, die zelluläre Homeostase und das Überleben der Zellen in wechselnder extrazellulärer Umgebung. Zwei Systeme führen in fast allen Zelltypen zu einem kompletten Abbau von intrazellulären Proteinen: den ER-assoziierten Proteinabbau (ERAD) durch das Ubiquitin-Proteasome System (UPS) und das Autophagie-lysosomales System (Meusser et al., 2005; Orenstein and Cuervo, 2010; Korolchuk et al., 2010).

### 1.6.1 ER-assoziierte Degradation (ERAD)

ERAD ist ein zellulärer Signaltransduktionsweg, der falsch gefaltete ER-Proteine zur Ubiquitinylierung und danach zum proteasomalen Abbau lenkt. ERAD besteht aus drei

Schritten: Erkennung von falsch gefalteten Proteinen im ER, Retro-Translokation in das Zytosol und Ubiquitin-abhängiger Abbau durch die Proteasomen.

### 1.6.1.1 Erkennung von ungefalteten Proteinen

#### *Erkennung von ungefalteten Proteinen durch BiP*

BiP hat eine N-terminale ATPase und eine C-terminale Substrat-bindende Domäne. In der ADP-bindenden Form hat BiP eine hohe Affinität für die Proteinsubstrate. Substrate binden an BiP und stimulieren seine ATPase-Aktivität. Ein Wechsel von ADP zu ATP setzt das Substrat von BiP frei. Die nachfolgende ATP-Hydrolyse bringt BiP zu der ADP-bindenden Form zurück. Beide Reaktionen, Nukleotidwechsel und ATP-Hydrolyse, werden durch Ko-Chaperone und Nukleotid-Austauschfaktoren reguliert (Schröder and Kaufman, 2005).

BiP wechselt zwischen monomeren und oligomeren Zuständen. Im oligomeren Zustand ist BiP durch die Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung post-translationall modifiziert. Nur monomeres unmodifiziertes BiP assoziiert mit ungefalteten Proteinen (Hendershot et al., 1988). Die Akkumulierung von ungefalteten Proteinen erhöht die Population von monomerem BiP. Hierbei dient vermutlich das oligomere BiP als eine Speicherpopulation für die monomere Form (Gething, 1999). Dies ist das erste Ereignis bei der Signaltransduktion als Antwort auf die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER-Lumen.

#### *Erkennung von ungefalteten Proteinen durch UGGT*

In Gegensatz zu BiP erkennt UGGT gleichzeitig zwei Merkmale bei ungefalteten Proteinen: freiliegende hydrophobe Sequenzen und Oligosaccharid-Reste. UGGT erkennt den *N*-Acetylglucosamin Rest (Sousa and Parodi, 1995). Die strukturelle Flexibilität dieses Restes und der benachbarten Aminosäurereste kann der bestimmende Faktor bei der Erkennung von ungefalteten Proteinen durch UGGT sein (Wormald and Dwek, 1999)

Falsch gefaltete oder, im Falle von multimeren Proteinen, nicht korrekt oligomerisierte Proteine werden durch ERAD in das Cytosol transportiert und weiter durch Proteasome abgebaut.

#### *Erkennung von ungefalteten Proteinen durch Mitglieder der PDI-Familie*

Mitglieder der PDI-Familie sind multi-Domäne Proteine mit katalytischen a- und nicht-katalytischen b-Domänen. Dabei ist die b'-Domäne von PDI notwendig und ausreichend für die Bindung kleiner Peptide, während die zwei katalytischen Domänen vermutlich zur Bindung von größeren Peptiden und nicht-nativen Proteinen beitragen. Die Bindungsspezifität von PDI basiert vermutlich auf hydrophoben Wechselwirkungen mit Peptiden. Speziell in der PDIb'-Domäne wird dies wahrscheinlich durch die Anreicherung hydrophober Aminosäuren in der Substratbindungstasche verursacht (Hatahet and Ruddock, 2007). Hinsichtlich der

Substrat-Bindungsspezifität der übrigen PDI-Familienmitglieder existieren dagegen nur wenige Erkenntnisse.

#### *Erkennung von ungefalteten Proteinen durch ERp29*

Das ERp29 gehört zur PDI-D-Subfamilie der PDI-Proteine. Diese Unterteilung erfolgte aufgrund der Präsenz einer C-terminalen D-Domäne (siehe 1.1.1). Mittels Immunpräzipitation wurde eine Interaktion von ERp29 mit einigen ER-Proteinen, unter anderem mit BiP, nachgewiesen. Der Mechanismus dieser Erkennung ist zwar unklar, es wird jedoch vermutet, dass ERp29 als Homodimer ein Bindungspotenzial besitzt (Mkrtchian et al., 1998b). Ein indirekter Hinweis auf ERp29-Erkennungsmotiv wurde durch die Studien von seinem Ortholog Wind-Protein aus *Drosophila melanogaster* erhalten (Barnewitz et al., 2004). Es wurde festgestellt, dass die D-Domäne aus murinem ERp29 funktionell die D-Domäne von Wind-Protein im Pipe-Prozessing ersetzen kann. Die Bindungseigenschaften dieser Proteine sind vermutlich auf die Arg<sup>215</sup>-, Arg<sup>218</sup>- und Leu<sup>232</sup>-Reste zurückzuführen sind, da die Mutagenese dieser Reste im Wind-Protein den Pipe-Transport zum Golgi verhindern konnte. Außerdem sind diese Aminosäurereste in allen PDI-D-Proteinen hoch konserviert sind (Barnewitz et al., 2004).

#### **1.6.1.2 Retro-Translokation von misgefalteten Proteinen in das Zytosol**

Da das Ubiquitin-Proteasome System im Zytoplasma lokalisiert ist, werden falsch gefalteten Proteine aus dem ER in das Zytosol zurücktransportiert. Der Proteinkomplex Sec61 bildet Kanäle, die für den Transport von misgefalteten Proteinen notwendig sind. Damit dieser Transport stattfinden kann, ist eine Polyubiquitylierung der misgefalteten Proteine notwendig. Dies wird durch die Ubiquitin-bindenden Faktoren gewährleistet (Liu and Ye, 2011).

#### **1.6.1.3 Ubiquitin-Proteasome System (UPS): Definition, Regulation und biologische Rolle**

UPS ist ein zytosolischer Proteasen-Komplex, der aus mehreren Untereinheiten besteht und den Abbau von Ubiquitin-markierten Proteinen erlaubt. Ubiquitin ist ein Polypeptid, das aus 76 Aminosäureresten besteht (Ciechanover et al., 1980). Die Spezifität und die Selektivität dieser Markierung wird durch drei Enzyme gewährleistet: E1 (Ubiquitin-aktivierende Enzym), E2 (Ubiquitin-konjugierende Enzym) und E3 (Ubiquitin-Ligase) (Löwe et al., 1995; 2010; Nijholt et al., 2011). Durch die Ubiquitylierung werden die UPS-Substrate markiert und zu den Proteasomen transportiert. Die Untereinheiten des proteosomalen regulatorischen Komplexes erkennen den Ubiquitin-Tag, entfernen ihn und vermitteln eine Entfaltung des

Substrates. Dies ermöglicht den Zugang zum katalytischen Bereich eines Proteasoms (Pickart, 2001; Pickart and Eddins 2004).

Durch Proteasome werden Proteine zu Oligopeptiden abgebaut, die später in das Zytoplasma oder in das Nukleoplasma freigesetzt werden und dort mit Hilfe von löslichen Peptidasen zu Aminosäuren abgebaut werden. Mit bestimmten Ausnahmen sind die meisten Proteasom-Substrate kurzlebige Proteine, wie z.B. neu synthetisierte, falsch gefaltete und regulatorische Proteine, die in die Zellteilung, in die Signalübertragung und in die Transkription involviert sind. Phosphorylierte und oxidierte Proteine werden auch bevorzugt durch diese zytosolische Proteasen abgebaut (Orenstein and Cuervo, 2010; Korolchuk et al., 2010).

### 1.6.2 Autophagie: Definition, Regulation und biologische Rolle

Autophagie ist einer von mehreren Mechanismen für die Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase. Dieser Signaltransduktionweg ist kein direkter Zelltodweg, sondern ein evolutionär konservierter, partieller Selbstverdau. Vermittelt durch den lysosomalen Abbau ist dieser Weg für die Degradation von langlebigen zellulären Proteinen und Organellen verantwortlich. Der Begriff „Autophagie“ umfasst drei Prozesse: Mikroautophagie, Makroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie.

**Mikroautophagie** ist am besten in Hefe untersucht, kommt aber auch in Säugerzellen vor. Für Mikroautophagie ist ein nichtspezifischer Transfer von cytosolischen Komponenten in ein Lysosom von Bedeutung (Dubouloz et al., 2005). Der Abbau von Substraten findet hier durch die lysosomalen Hydrolasen statt (Ahlberg and Glaumann, 1985; Uttenweiler et al., 2007).

Während der **Chaperon-vermittelten Autophagie** (CMA *chaperone-mediated autophagy*) findet ein selektiver Abbau von spezifischen Substraten (z.B. zytosolische Proteine) statt. Dieser Autophagie-Typ wurde bisher nur für Säugerzellen beschrieben (Orenstein and Cuervo, 2010). Die Selektivität der CMA wird durch zwei Faktoren festgelegt: Durch die Präsenz einer Erkennungssequenz KFERQ an Substrat-Proteinen und durch die Tatsache, dass die entfalteten Proteine eines nach dem anderen in das lysosomale Lumen eintreten können. Die KFERQ-Sequenz wird durch eine Gruppe von Chaperonen und Ko-Chaperonen erkannt, deren wichtigste Mitglieder Hsc70 und HSP90 sind. Hsc70 steuert die CMA-Substrate zu den Lysosomen, interagiert mit dem CMA-Rezeptor und ermöglicht so wahrscheinlich die Substrat-Entfaltung. HSP90 ist nicht nur für die Substrat-Entfaltung verantwortlich (Agarraberes and Dice, 2001), sondern stabilisiert auch die wesentlichen Komponenten des Translokationskomplexes (Bandyopadhyay et al., 2008).

**Makroautophagie** ist der meist untersuchte und wichtigste Typ der Autophagie, der zur Bildung von Doppel-Membran-Strukturen (Autophagosomen) führt. Sie beinhalten zytosolisches Material, das in den Lysosomen abgebaut wird. Durch diesen Abbau kann eine selektive Beseitigung von beschädigten Organellen und eine nicht selektive Degradation von löslichen zytosolischen Proteinen gewährleistet werden. (Uttenweiler et al., 2007).

Die Regulation der Autophagie beruht auf mehreren Autophagie-spezifischen Genen (*atg*), die durch einen hohen Konservierungsgrad zwischen verschiedenen Spezies gekennzeichnet sind (He and Klionsky, 2009). Autophagie kann in vier Stadien unterteilt werden:

1. Induktion: Durch externe/interne Impulse (z.B. Mangel an Nährstoffen) wird mTOR inhibiert, das zur Induktion der Autophagie führt (Hoyer-Hansen and Jäättelä, 2007).
2. Beim nächsten Stadium wird die Bildung von Autophagosomen durch PI3K und ATG6, bekannt auch als „Beclin1“, eingeleitet. Dabei werden cytosolische Proteine und Organellen in die Vesikel eingeschlossen. Der Ursprung dieser Vesikel ist noch unklar, sie könnten aber vom ER stammen (Hoyer-Hansen and Jäättelä, 2007; Lepine et al., 2011). Für die Bildung von Autophagosomen ist außerdem ein multimerer Komplex aus ATG5-ATG12-Dimer und ATG16L notwendig. Zusätzlich ist das ATG5 zur Aktivierung der Apoptose fähig (Eisenberg-Lerner et al., 2009).
3. Andockung und Verschmelzung mit Lysosomen. Der Inhalt von Autophagosomen löst sich in Lysosomen durch den Abbau durch lysosomale Proteasen.
4. Beim letzten Stadium findet ein Zerfall von autophagischen Vesikeln statt.

Obwohl schon unter normalen Bedingungen ein bestimmtes Level der Makroautophagie und der CMA Aktivität in verschiedenen Zellen und Gewebetypen detektierbar ist (basale Autophagie), werden beide unter Stressbedingungen maximal aktiviert (induzierte Autophagie). Die Aktivierung dieser Signaltransduktionswege ist oft sequentiell, vermutlich gibt es einen *cross-talk* zwischen Makroautophagie und CMA (Kaushik et al., 2008). Eine Blockierung dieser beiden Formen der Autophagie hat eine direkte Auswirkung auf die proteasomale Aktivität. Es wurde eine Anhäufung von polyubiquitinierten Proteinen während der akuten Phase der CMA-Blockade beobachtet. Oft ist das eine Form von Proteinaggregaten, die durch das Proteasom-System beseitigt wird (Korolchuk et al., 2009).

## 1.7 Zelltod

Dauerhafter ER-Stress beeinträchtigt die Schutzmechanismen, die die korrekte Proteinfaltung und die Degradation defekter Proteine gewähren. Dies führt schließlich zur Fehlfunktion von Organellen und zum Zelltod. Untersuchungen zum Zelltod haben eine lange

wissenschaftliche Geschichte seit Anfang des 19. Jahrhunderts. Die erste morphologische Klassifizierung verschiedener Zellarten wurde von Schweichel und Merker (1973) unternommen. Dabei unterteilten sie den Zelltod in drei Typen: Typ I Zelltod verbunden mit Heterophagie, Typ II Zelltod verbunden mit Autophagie und Typ III Zelltod ohne Verdauung. Mittlerweile werden, gemäß den neuesten morphologischen und biochemischen Erkenntnissen, Apoptose, Autophagie (siehe 1.6.2.) und Nekrose unterschieden (Kroemer et al., 2005).

### **1.7.1 Apoptose: Definition, Regulation und biologische Rolle**

Die häufigste und bisher am besten definierte Zelltodart ist die Apoptose, die 1972 erstmalig beschrieben wurde (Kerr et al., 1972). Apoptose (oder programmierter Zelltod) ist ein in eukaryotischen Zellen evolutionär konserviertes Programm, das zur Eliminierung der betroffenen Zelle führt.

Der programmierte Zelltod ist sowohl in verschiedenen Entwicklungsstadien, als auch im adulten Zustand erforderlich, um defekte oder entartete Zellen kontrolliert zu entfernen. Dadurch kann das Gleichgewicht zwischen proliferierenden und sterbenden Zellen geschaffen werden. Die Apoptose hat eine zentrale Stellung bei der Regulation des Immunsystems und wirkt durch die Eliminierung autoreaktiver sowie nicht mehr benötigter aktivierter T-Zellen Autoimmunerkrankungen entgegen. Außerdem werden entartete oder mit Viren infizierte Zellen durch die Apoptose beseitigt und so großer Schaden, wie z.B. eine Tumorbildung, verhindert. Dementsprechend sind die Störungen von apoptotischen Prozessen für viele Krankheitsbilder charakteristisch. Tumorzellen entwickeln oft während der Tumorgenese eine Resistenz gegenüber bestimmten Apoptose-Stimuli (Brown and Attardi, 2005).

Zu morphologischen Charakteristika der Apoptose gehören ein Abrunden und Ablösen der Zellen und eine Reduzierung des Zellvolumens (Pyknose). Der Kern wird dabei fragmentiert und das Chromatin kondensiert, während die nukleäre DNA durch gezielte Spaltung zwischen den Nukleosomen degradiert wird. Die Zellmembran bleibt bis zum Ende der Apoptose intakt, zeigt aber eine Vesikelbildung (*blebbing*). Anschließend wird die Zelle fragmentiert und apoptotische Körperchen gebildet, die durch Phagozyten (Makrophagen, dendritische Zellen) aufgenommen und eliminiert werden (Lauber et al., 2004).

Für die meisten charakteristischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle sind die Mitglieder der Caspasen-Familie (Aspartatspezifische Cysteinyln-Proteasen) verantwortlich. Diese Proteasen werden während der Apoptose kaskadenartig aktiviert und führen durch die gezielte Spaltung einer Vielzahl von Substraten das apoptotische Programm aus. Insgesamt

wurden 15 Mitglieder dieser Protein-Familie identifiziert, von denen elf im Menschen exprimiert werden (Reed et al., 2003). Sie werden entsprechend ihrer Funktion und der Sequenzhomologien in einen inflammatorischen und einen apoptotischen Zweig eingeteilt. Der apoptotische Zweig ist beim Menschen und bei der Maus bis auf das Vorkommen von Caspase-10, die eine hohe Homologie zur humanen Caspase-8 aufweist, identisch (Jänicke et al., 2006).

Der apoptotische Zweig kann nach Funktion und Aufbau der Caspasen in zwei weitere Gruppen geteilt werden, die Initiator- und die Effektor-Caspasen. Die Effektor-Caspasen werden im Verlauf der Apoptose durch Initiator- und andere Effektor-Caspasen kaskadenartig aktiviert.

Zwei Signaltransduktionswege kontrollieren die Apoptose – ein intrinsischer Weg, der auf die intrazelluläre Schäden (z.B. DNA-Schädigung) reagiert und ein extrinsischer Weg, der auf die extrazelluläre Impulse reagiert. Intrinsischer Apoptose-Signalweg verläuft über die Mitochondrien-Aktivierung, die daraufhin Cytochrom c freisetzen und die Caspasen-Kaskade initiieren (Li et al., 1997; Slee et al., 1999). Außerdem bildet sich während der Apoptose eine Öffnung an den Mitochondrien - PTP (*permeability transition pore*), die beide mitochondriale Membranen durchspannt (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Dies führt zu einem Ionen-Gleichgewicht zwischen Zytoplasma und mitochondrialer Matrix und damit zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003).

Extrinsischer Apoptose-Signalweg wird über Todesrezeptoren und ihre Liganden induziert. Todesrezeptoren sind Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie, die aus 29 Rezeptoren und 19 Liganden besteht (Aggarwal, 2003). Nach Bindung des entsprechenden Liganden wird eine Oligomerisierung der TNF-Rezeptore induziert, und Caspasen-Kaskade aktiviert. Über den TNF-Rezeptor werden nicht nur Apoptose- sondern auch Überlebenssignale übermittelt, die hauptsächlich auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zurückzuführen sind (Wajant et al., 2003).

Der Erfolg einer Apoptose-Induktion hängt von der Stärke des Signals, den Expressionsmengen der pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder ab (Hockenbery et al., 1990).

### **1.7.2 Nekrose: Definition, Regulation und biologische Rolle**

Nekrose wurde traditionell als eine Konsequenz von physiko-chemischem Stress und daher als ein zufälliger und unkontrollierter Prozess beschrieben. Mittlerweile wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Nekrose ebenso kontrolliert und programmiert wie die Caspasen-

abhängige Apoptose abläuft, und eine wichtige Zelltodart, die sowohl pathologisch, als auch physiologisch relevant ist (Festjens et al., 2006).

Zu morphologischen Charakteristika der Nekrose gehören Zytoplasmaschwellung, irreversible Schädigung der Plasmamembran und Organellen-Zerfall. Der DNA-Abbau geschieht in nekrotischen Zellen randomisiert durch die extrazelluläre DNase I oder durch die lysosomale DNase II, was letztendlich einen DNA-Schmier auf dem Agarose-Gel ergibt (Fiers et al., 1999).

Nekrotischer Zelltod ist zwar kein Ergebnis einer bestimmten Signalkaskade, dennoch geschieht er als eine Folge mehrerer biochemischen und molekularen Ereignisse auf verschiedenen zellulären Ebenen. Nekrose kann durch drei aufeinanderfolgenden Phasen charakterisiert werden: Initiation, Weiterleitung und Ausführung. Es gibt aber keine klare Differenzierung zwischen diesen Phasen (Festjens et al., 2006).

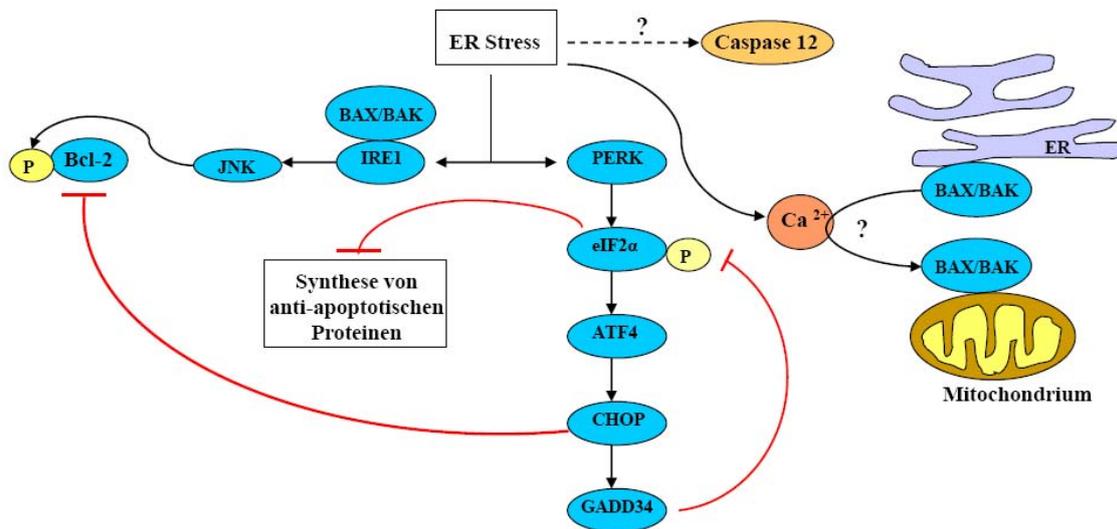
$\text{Ca}^{2+}$  und ROS (*reactive oxygen species*) sind die Hauptbeteiligten an der Weiterleitungs- und an der Ausführungsphase der Nekrose, die direkt oder indirekt Schädigungen von Proteinen, Lipiden und DNA verursachen. Am Ende werden die Zellorganellen und die Zellintegrität zerstört. Während der Nekrose tritt der zelluläre Inhalt in den Extrazellulärraum aus, was eine Entzündung hervorruft. Zellen, die durch die Nekrose sterben, leiten die pro-inflammatorische Signalkaskade durch die Aktivierung der Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen ein.

Da die Nekrose sowohl bei physiologischen, als auch bei pathophysiologischen Prozessen auftritt, könnte diese Art vom Zelltod zur Eliminierung von Krebszellen und zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien auf deren Basis nützlich sein (Festjens et al., 2006).

## **1.8 Signalintegration im ER: Was ist entscheidend für Überleben und Tod?**

Die Präsenz eines zytotoxischen Potenzials durch die Akkumulierung von nicht-gefalteten oder falsch gefalteten Proteinen führt zur Überlastung und Störung des ER-Faltungsmilieus in Verbindung mit der Zelltod-Aktivierung (Abb. 4). Der molekulare Mechanismus dieser Kaskaden ist noch nicht vollständig geklärt.  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER kann zum Beispiel an der Aktivierung von zytoplasmatischen Proteasen, die zum Zelltod beitragen, beteiligt sein (Nakagawa and Yuan, 2000). Es bleibt aber unklar, wie ER-Stress den  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust begünstigt. ER-Stress kann auch eine Aktivierung von verschiedenen Todeseffektoren, wie BAK und BAX zur Folge haben (Wei et al., 2001). Sie leiten das Signal durch die Mitochondrien oder durch die Caspase-12 weiter. Aktivierte Caspase-12 induziert weitere

Caspase-Kaskade durch die Spaltung von proCaspase-9 und proCaspase-3. Dieser Signaltransduktionsweg ist unabhängig von Apaf-1 und von der mitochondrialen Cytochrom c-Freisetzung. Aus dem ER freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden schnell durch die Mitochondrien aufgenommen. Dies könnte zum Kollaps des inneren Membranpotenzials führen und darauffolgend zur Apoptose (Nakagawa et al., 2001).



**Abbildung 4. ER-Stress und Zelltod (nach Ron und Walter, 2007).**

Ein hypothetisches Schema der Beziehung zwischen ER-Stress und Zelltod setzt eine Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration voraus. Dies fördert die Translokation der Todeseffektoren BAX und BAK aus dem ER in die Mitochondrien und eine Aktivierung von Caspase-12. Die IRE1-vermittelte Aktivierung von JNK kann zum Zelltod durch die Phosphorylierung und Inaktivierung des anti-apoptotischen Regulators Bcl-2 beitragen. Diese Aktivierung könnte sich im Komplex mit BAX/BAK abspielen. Die PERK-vermittelte Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  kann durch die Synthese-Inhibierung von anti-apoptotischen Proteinen zum Zelltod beisteuern. Als Beispiel dafür dient die Hemmung der Bcl-2-Expression durch den Transkriptionsfaktor CHOP. Die schützende Wirkung der PERK-Achse gegen den Zelltod besteht in der negativen Rückkopplung, die bei UPR eine eIF2 $\alpha$ -Dephosphorylierung fördert.

Die anti-apoptotischen Effekte von Bcl-2 werden durch den Transkriptionsfaktor CHOP herunterreguliert. Die CHOP-Expression beim ER-Stress ist durch das ATF6 hochreguliert, und durch die Synthese von ATF4 nach der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  durch PERK begünstigt (siehe 1.4). Der komplette Ausfall von PERK-vermittelter eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung erhöht die Empfindlichkeit der Zellen zum Tod beim ER-Stress. Andererseits induziert die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  die CHOP-Transkription (Harding et al., 2000). Die Deregulierung der CHOP-Expression fördert den Zelltod, während sein kompletter Verlust die ER-gestresste Zellen von der Apoptose schützt (Zinsner et al., 1998). Es wird außerdem vermutet, dass das Überleben beim milden ER-Stress durch die

Instabilität von UPR-induzierten Zelltod-Mediatoren wie CHOP und GADD34 ermöglicht wird. Laut diesem Modell übersteigt die Konzentration dieser Proteine den Todesschwellwert nur nach einem anhaltenden und heftigen Stress (Rutkowski et al., 2006). Mittlerweile gibt es einige Untersuchungen zur Rolle von ERp29 während der UPR. Es wurde gezeigt, dass die exogene Expression von ERp29 erhöhtes Spleißen der XBP1-mRNA in MDA-MB-231 Brustkrebszellen hervorruft (Zhang and Putti, 2010). Eine Überexpression von ERp29 in diesen Zellen verringerte zwar die basale Expression von eIF2 $\alpha$ , beeinflusste aber nicht die Phosphorylierung des eIF2 $\alpha$  (Zhang and Putti, 2010). Niedrige eIF2 $\alpha$ -Expression verursachte vermutlich eine Herunterregulation von Cyclin D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>, eine Aktivierung der Expression von Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (p15, p21 and p27) und, als Folge deren, den Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Demzufolge kann die erhöhte Expression von ERp29 den ER-Stressweg verändern und zum Wachstumsarrest führen.

Durch weitere Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass p38 und XBP1 die ERp29-Expression in Brustkrebszellen negativ regulieren und so auf einen Zusammenhang zwischen ERp29 und ER-Stress hinweisen (Bambang et al., 2009a). Die Regulation verläuft vermutlich über die p38-PERK-eIF2 $\alpha$ -Achse. Repression dieser Achse in ERp29-transfizierten Zellen hemmte die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und schützte die Zellen gegen die Caspase-3-vermittelten Apoptose (Gao et al., 2011).

Der gegenwärtige Stand dieser Untersuchungen basiert auf indirekten Studien in transfizierten Zellen und führt zu kontroversen Aussagen über den Aktivierungsmechanismus (z.B. Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ ) während der UPR. Demzufolge erfordert eine Aufklärung der ERp29-Stellung beim ER-Stress weiterer Untersuchungen.

## **1.9 Mechanismus und Regulation des Lipidstoffwechsels**

Lipide sind Wasser-unlösliche organische Verbindungen mit vielfältigen Funktionen in lebenden Organismen. Als ein wichtiger Bestandteil der biologischen Membran sind sie für ihre Integrität zuständig. Lipide dienen als Energie-Speicher, als enzymatische Co-Faktoren, als Hormone und als intrazelluläre Signal-Träger (Xenoulis and Steiner, 2010).

Lipidstoffwechsel ist ein komplexer Vorgang, der mehrere Prozesse beinhaltet und darum in zwei Stufen unterteilt wird (Xenoulis and Steiner, 2010). Die Erste Stufe – exogener Lipidstoffwechsel - beginnt mit der Verdauung von Fetten im Verdauungstrakt. Hier werden die Fette emulgiert und mit Hilfe von verschiedenen Enzymen (pankreatische und Darm-Lipasen) zerlegt. In der Dünndarmwand (in Enterozyten) werden die Produkte dieser Hydrolyse in Form von Fettsäuren, Monoglyceriden und Cholesterol aufgenommen. Aus

diesen entstehen dann zusammen mit Apoproteinen Chylomikronen, die in die Lymphe abgegeben werden und schließlich in die Blutbahn gelangen. Im Blut werden Lipide mit Hilfe von Lipoproteinen zur Leber transportiert. Insgesamt ca. 80 % der aus der Verdauung stammenden Triglyceride werden vom Muskel- und Fettgewebe aufgenommen.

Im endogenen Lipidstoffwechsel werden dagegen Lipoproteine hepatischen Ursprungs metabolisiert und aus dem Blut ausgeschleust. Daran sind vor allem drei Typen von Lipiden beteiligt: VLDL (*very low-density lipoproteins*), LDL (*low-density lipoproteins*) und HDL (*high-density lipoproteins*).

Eine wichtige Rolle im endogenen Lipidmetabolismus spielt das PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*). Das PPAR $\alpha$  ist ein Hormonen-Rezeptor, der im Zellkern lokalisiert ist und durch eine Reihe von strukturell unterschiedlichen Verbindungen (*peroxisome proliferators*) aktiviert wird. PPAR $\alpha$  steuert die Aktivität von allen Fettsäure-Oxidationssystemen (mitochondriale und peroxisomale  $\beta$ -Oxidation und mikrosomale  $\omega$ -Oxidation) und reguliert daher das Energie-Gleichgewicht. Anhaltende Aktivierung von PPAR $\alpha$  führt zur Entwicklung hepatozellulärer Karzinoma als Ergebnis des dauerhaften oxidativen und ER-Stresses (Pyper et al., 2010).

Im Allgemeinen untersteht die Regulation des Lipidstoffwechsels der Hypothalamus-Kontrolle. Der Hypothalamus ist ein Teil des zentralen Nervensystems, der anatomisch durch die Ansammlung von neuronalen Kernen definiert werden kann (Dieguez et al., 2011). Die Hypothalamus-Kerne sind für die Nährstoffe, Hormone und Neurotransmitter empfindlich und an der Regulation der Energie-Homeostase beteiligt.

Die Regulation der Hormonsekretion erfolgt über komplexe negative und positive Rückkopplungsmechanismen. Bei der funktionellen Verbindung verschiedener endokriner Drüsen spricht man von einer Achse. Die Hauptachsen des endokrinen Systems sind die Achsen Hypothalamus-Hypophysen-periphere Drüsen. Dauerhaft erhöhte Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse führt beispielsweise zur erhöhten Freisetzung von Cortisol bei Menschen, die in Insulin-Resistenz, in viszeralen Fettablagerung, in Osteopenie und Osteoporose resultiert (Plotsky and Meany, 1993; Mello et al., 2003).

Das prominenteste Beispiel dafür ist jedoch die Regulation der Hypothalamus-Aktivität durch das Hormon Leptin. Leptin wird durch das „*obese*“-Gen kodiert und hauptsächlich von Fettzellen und vom Hypothalamus freigesetzt und steht somit an der Spitze der Hypothalamus-Hypophysen-periphere Drüsen-Achsen. Die Leptin-Rezeptoren befinden sich in niedrigen Konzentrationen (5 - 8 %) in vielen Geweben des menschlichen Körpers (Galic

et al., 2010). Am meisten sind sie im Gehirn (etwa 30-40 %), speziell in Hypothalamuskernen und in den Gehirn-Regionen, die für die Futteraufnahme zuständig sind, vertreten (Tartaglia, 1997). Die Hochregulation dieses Hormons hemmt das Auftreten vom Hungergefühl und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Fettstoffwechsels und reproduktiver Funktion von *Mammalia*. Dementsprechend führt seine Herunterregulation zur Fettsucht und Sterilität (Zhang et al., 1994, Karsenty, 2006; Bab and Yimiya, 2010). Die lipolytische Aktivität dieses Hormons findet über die Suppression der AMPK-Aktivität im Hypothalamus statt (Steinberg et al., 2006). In Skelettmuskeln führt seine Aktivität zur erhöhten Fettsäure-Oxidation (Minokoshi et al., 2002).

Störungen der Regulation des Lipidstoffwechsels führen zu Pathologien. Eine davon ist die Fettleibigkeit, die durch einen rapiden Anstieg in der Bevölkerung Industrieländer gekennzeichnet ist und ein akutes Gesundheitsproblem darstellt. Dieses metabolische Syndrom ist für die Entstehung der Insulin-Resistenz (Diabetes Typ-II), kardiovaskulärer Krankheiten und der Leber-Verfettung verantwortlich (Galic et al., 2010). Untersuchung der molekularen und biochemischen Mechanismen des Fettstoffwechsels und seiner Regulation eröffnet große Perspektiven für die Entwicklung neuartiger Therapien bei der Bekämpfung von oben genannten Krankheiten.

## 2 Untersuchungsobjekt – das transgene Mausmodell

Während der letzten Jahrzehnten zeigte sich die Maus als ein nützliches Tiermodell für die Untersuchung der genetischen Faktoren, die in die Entstehung und in den Verlauf verschiedener Krankheiten involviert sind. Dabei bieten speziell Knockout Mäuse eine attraktive Möglichkeit für die vollständige Blockade eines Gens, um deren Auswirkungen zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden die ERp29 Knockout Mäuse vom Stamm C57BL/6N verwendet. Das ist der meist benutzte Stamm, der etwa um 1920 von Abbie Lathrop (Grandby, Massachusetts, USA) etabliert wurde (Hedrich and Bullock, 2006). Ursprünglich wurde dieser Stamm für Karzinogenese-Studien gezüchtet. Mäuse dieses Stammes sind auch bekannt für ihre verstärkte Vorliebe für Alkohol und Narkotika, deshalb werden sie für die Suchtstudien eingesetzt. Außerdem werden sie bei kardiovaskulären Studien und als „background“ Stamm für spontane oder zielgerichtete Mutationen benutzt. Die Mäuse vom Stamm C57BL/6N haben eine schwarze Fellfarbe und dunkelbraun-pigmentierte Augen. Sie zeigen durchschnittliche bis gute Verpaarungseigenschaften, bei mittlerer Wurfgröße (Beck et al., 2000).

Die ERp29KO Mäuse wurden ursprünglich von C. Guo und D.M. Ferrari (Max-Planck-Institut, Göttingen) durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen von C57BL/6N Mäusen erzeugt. Danach wurden sie durch mehrere Rückkreuzungen mit Wildtyp Mäusen in Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vom Hintergrund gesäubert. WT C57BL/6N Mäuse wurden von Charles River (C.R., Kisslegg, Germany) bezogen.

Durch das kontinuierliche Inbreeding werden Mäuse produziert, die genetisch einheitlich und homozygot für C57BL/6N Allelen sind. Die Einheitlichkeit des inbreden Stammes reduziert die Anzahl der möglichen Fehlerquellen, da unterschiedliche Stämme große Unterschiede in physiologischen Parametern samt Proteinexpression aufzeigen können.

### 3 Aufgabenstellung und wissenschaftliche Fragen

Der Einsatz von ERp29KO Mäusen als Modell empfiehlt sich insbesondere aufgrund der widersprüchlichen Studien aus den erwähnten siRNA-Studien an ERp29 Knockdown Zellen (Bambang et al., 2009a; Zhang and Putti, 2010). Die Interpretationsschwierigkeiten beim Einsatz der siRNA werden durch das KO-System umgangen. Außerdem bietet sich bei vollständiger ERp29-Blockade die Möglichkeit zur Untersuchung alternativer ERp29-unabhängiger Reaktionswege und möglicher Auswirkungen einer ERp29-Langzeitblockade, wie z.B. während der Alterung.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Hat die ERp29-Abwesenheit Auswirkungen auf wichtigste Lebensfunktionen im Maus-Modell? In Langzeitstudien wurden die Parameter Körpergewicht, Reproduktivität sowie die Bluteigenschaften und Organmorphologie am histologischen Präparat bewertet.
2. Welche Chaperone werden lokal von der ERp29-Abwesenheit beeinflusst? Welche Kompensationsmechanismen fallen auf?
3. Wie reagieren ERp29 defiziente Zellen auf die Anhäufung von ungefalteten Proteinen (UPR) und auf oxidativen Stress. Welche Signaltransduktionswege werden durch die ERp29-Abwesenheit beeinflusst? In diesem Zusammenhang erfolgte die Beurteilung
  - verschiedener Zelltodwege: Apoptose, Nekrose und Autophagie
  - der UPR anhand der Expression von spezifischen UPR-Signalmolekülen.

Mit diesen Studien soll ein Beitrag zur Klärung der Rolle von ERp29 im Stoffwechsel, sein Zusammenspiel mit anderen Chaperonen des Körpers aufgeklärt werden, insbesondere seine potentielle Beteiligung an der Pathogenese. Damit könnten weitere Voraussetzungen für die Entwicklung und Evaluierung neuartiger Therapiestrategien geschaffen werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Herkunft	Katalognummer
Aceton		
Agarose low EEO	AppliChem	A2114
Albumin-Fraktion V	AppliChem	A1391
Ammonium ferrous sulfate (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	Sigma	203505
Borsäure	Sigma	31146
CHAPS	Roth	1479.2
Chicago sky blue	Sigma	C8679
Diamide	Sigma	D3648
DMSO	AppliChem	A3672
EDTA	KMF optiChem	KMF.08-549
Ethanol	Merck	1.00983.2511
Glycerin	Sigma	15524
Glycin	Serva	23390
Harnstoff	GEHealthcare	17-1319-01
HEPES	Roth	9105.3
Imidazol	Roth	3899.2
KCl	AppliChem	A3582
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	1.04873
Menadion sodium bisulfite	Sigma	M2518
Methanol		
NaCl	AppliChem	A2942
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem	A3567
Paraformaldehyd	Sigma	P6148
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma	P8465
Schwefelsäure	Merck	
SDS	AppliChem	A2572
D-Sorbitol	Sigma	85529
Thioharnstoff	GE Healthcare	RPN6301
Trichloressigsäure	Merck	1.00807
Tris	Applichem	A1086
Tween 20	Sigma	P7949
Triton X-100	Applichem	A4975
Tunicamycin	Calbiochem	654380
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma	H1009

## 4.1.2 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezifikation	Anwendung Verdünnung
Anti- $\beta$ -Aktin-Peroxidase	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das N-terminale Segment. (Sigma-Aldrich, # A3854)	WB 1:25000
Anti-ATF6	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das N-terminale Segment (18 Aminosäurereste). (Abcam, #37149)	WB 1:1000
Anti-ATF4 $\alpha$	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Segment. (Abcam, # ab 23760)	WB 1:1000
Anti-ATG5	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das N-terminale Segment (Epitop humane 1-50). (Abcam, # ab 54033)	WB 1:1000 IF 1:200
Anti-alfa CaBP2 (ERp72)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (MPG Göttingen)	WB 1:1000
Anti-Calnexin	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (MPG Göttingen)	WB 1:1000
Anti-Calreticulin	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (MPG Göttingen)	WB 1:1000
Anti-Caspase-3	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die aktive + pro Caspase 3. (Abcam, # ab 47131)	WB 1:1000
Anti-Connexin 43	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Segment (Epitop 363–382). (Sigma-Aldrich, # C 6219)	IF 1 : 500
Anti-Cytochrom c	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das N-terminale Segment. (Abcam, # ab 76237)	WB 1:1000
Anti-eIF2alfa	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Segment. (Cell Signaling Technology, # 9722)	WB 1:1000
Anti-eIF2alfa (Phospho Ser51)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die umgebende Ser51 Aminosäurereste. (Cell Signaling Technology, # 9721)	WB 1:1000
Anti-ERp29	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (MPG Göttingen)	WB 1:1000
Anti-ERp46	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen TXNDC5 (Epitop murine 76-417). (Abcam, # ab 10292)	WB 1:500
Anti-GADD 153 (CHOP)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das gesamte murine GADD153 (Epitop 1-168). (Santa Cruz Biotech., # sc 575)	WB 1:1000
Anti-GAPDH	Monoklonaler Maus-Antikörper. (Sigma-Aldrich, # G9295)	WB 1:1000
Anti-GRp78 (BiP)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Segment. (Sigma-Aldrich, # SAB 4501452)	WB 1:1000
Anti-GRp94	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Segment. (Sigma-Aldrich, # G 4420)	WB 1:1000
Anti-Hsc70	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Segment. (Abcam, # ab 51052)	WB 1:1000
Anti-LAMP-2A	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Segment. (Abcam, # ab 18528)	WB 1:1000 IF 1: 200
Anti-PDI	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (MPG Göttingen)	WB 1:1000
Anti-P5	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (MPG Göttingen)	WB 1:1000
Anti-PPAR $\alpha$	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das N-terminale Segment (Epitop murine 1-18). (Abcam, # ab 8934)	WB 1:1000
Anti-Thyreoglobulin	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Segment. (Abcam, # ab 56192)	WB 1:1000
Anti-XBP1	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das N-terminale Segment (Epitop 18 Aminosäurereste). (abcam, # ab37152)	WB 1:1000
Anti-Vimentin	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper. (abcam, # C 8545)	IF 1:200

### 4.1.3 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Konjugat	Herkunft	Anwendung Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	HRP	Bio-Rad	WB 1:10000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Cy5	Jackson laboratories Inc., USA	WB 1:10000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Cy3	Jackson laboratories Inc., USA	IF 1:10000

### 4.1.4 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Bezeichnung	Herkunft	Katalognummer
Page Ruler™ prestained protein ladder	Fermentas	SM0671
1 kb DNA-Längenstandard Gene Ruler™	Fermentas	SM0311
100 bp DNA-Längenstandard Gene Ruler™	Fermentas	SM0321

### 4.1.5 Enzyme

Bezeichnung	Herkunft	Katalognummer
Accutase	PAA	L11-007
Collagenase Typ I	Sigma	C0130
Dispase	Gibco	17105-041
DyNAzyme™ DNA Polymerase 1U/μl	Finnzymes	F505S
Proteinase K	Qiagen	1017738
RNase A from bovine pancreas	Sigma	R5125
Taq DNA Polymerase	Fermentas	EP0403
Trypsin/EDTA 0,05% in PBS	PAA	L11-004

### 4.1.6 Farbstoffe

Bezeichnung	Herkunft	Katalognummer
Bis-Benzimide H33342 trihydrochloride (HOECHST 33342)	Sigma	B2261
Bromphenolblau	Sigma	B5525
<i>Endoplasmic reticulum stain</i>	Chemicon international	90322
Kristallviolett	Sigma	C3886
Trypan blau-Lösung 0,4 %	Sigma	T8154
Xylenolorange Natriumsalz	Fluka	33825

### 4.1.7 Kits

Bezeichnung	Herkunft	Katalognummer
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	51306
Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit	Pierce	34080
Supersignal West Dura Extended Duration	Pierce	34075
Annexin-V FITC Apoptose Detection Kit	BD Biosciences	556547

EnzChek® Caspase-3 assay kit	Invitrogen	E13184
Pierce ® 660 nm Protein assay Kit	Thermo scientific	22660

#### 4.1.8 Primers

Alle Primers wurden von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert.

Primer p366: CTGGCAACTCCAATGGAGGCCTCTGGTG

Primer p393: CTCAGGAAGATCGCACTCCAGCCAGCTTTC

Primer p278: TGCTCCTGGGCCTGCTGCTCCTCTTTGCTCCGCAC

Primer p304: CTTGGCATGCTAACCAGTTCTCTCGGCCATCTCC

#### 4.1.9 Material für die Zellkultur

Bezeichnung	Herkunft
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
Glasobjektträger, 8-Kammer	BD Falcon
Deckgläser 22 x 22 mm	Menzel-Gläser Germany
Kryoröhrchen, 2 ml	Greiner bio-one
Costar assay Platte, 96-Well, black polystyrene	Corning Incorporated
Neubauer-Kammer, Tiefe 0,100 mm 0,0025 mm <sup>2</sup>	Marienfeld Germany
Sterile Pipettenspitzen 5ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated
Costar Platten: 96-Well, 6-Well	Corning Incorporated
Zellkulturplatten Cell Star 15 cm, 10, cm, 3 cm	Greiner bio-one
Zellabkratzer 25 cm	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml, 15 ml	Corning Incorporated
Zellsieb 70 µm nylon filter	BD Falcon

#### 4.1.10 Medien

##### Fibroblasten-Medium

DMEM high Glucose (4,5 g/L)	PAA
15 mM HEPES (pH 7.4)	Sigma
100 U/ml Penicillin	PAA
100 µg/ml Streptomycin	PAA
25 µg/ml Ampicillin	Sigma
1 mM Sodumpyruvat	PAA
2 mM L-Glutamin	PAA
10% (v/v) FCS	PAA

**Thyreozyten-Medium**

DMEM nutrient mixture F-12	Sigma
Ham	
2 mM L-Glutamin	PAA
100 U/ml Penicillin	PAA
100 µg/ml Streptomycin	PAA
10 µg/ml Insulin	Sigma
10 nM Hydrocortison	Sigma
5 µg/ml Transferrin	Sigma
10 ng/ml Gly-His-Lys-Acetat	Sigma
10 ng/ml Somatostatin	Sigma
1,0 mU/ml TSH	Sigma
5% (v/v) FCS	PAA

**4.1.11 Puffer und Lösungen****PBS Puffer:**

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4

**TBE Puffer:**

89 mM Tris-Cl  
89 mM Borsäure  
2 mM EDTA

**Lysepuffer:**

7 M Harnstoff  
2 M Thioharnstoff  
4 % (w/v) CHAPS  
30 mM Tris-Cl pH 8,5

**FOX Reagenz**

100 µM Xylenolorange  
250 µM Ammonium ferrous sulfate  
100 mM Sorbitol  
25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**SDS PAGE****4 x Ladepuffer:**

160 mM Tris·Cl pH 6,8  
12 % (w/v) SDS  
20 % (v/v) Glycerin  
2 % (w/v) Bromphenolblau  
400 mM DTT

**SDS Laufpuffer:**

25 mM Tris·Cl pH 8,75  
0.1% (w/v) SDS  
200 mM Glycin

**4.1.12 Material für Western blot**

Blotting nitrocellulose Membran (Pall Corp. # P/N66485)

Gel Blotting Papier (Whatman # 10426994)

**Blot-Puffer:**

25 mM Tris/HCl pH 8,3  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol

<b>Blocking-Lösung:</b>	3 % (w/v) BSA in PBS / 0,05 % Tween 20
<b>Incubationspuffer:</b>	1 % (w/v) BSA in PBS / 0,05 % Tween 20
<b>Waschpuffer:</b>	1 % (w/v) BSA in PBS / 0,05 % Tween 20

#### 4.1.13 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
Bio imaging system Gene Genius	Syngene
Blotapparatur und Detektionseinheit: Semi-Dry-Blotter Pegasus	Phase
Centrifuge 5415R	Eppendorf
Centrifuge Rotofix 32	Hettich Zentrifugen
Chemilumineszenz-System Fusion-SL 4.2 MP	Peqlab
Electrophoresis power supply	CONSORT
FACSCalibur	BD Biosciences
Homogenisator Polytron	Kinematika AG
Incubator HERA cell 150	Heraeus
Inversionsmikroskop AE 20	Motic
Konfokalmikroskop EZ-C1	Nikon
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph
MS1 Minishaker	IKA
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Spektrophotometer NanoDrop 2000	Thermo scientific
Neubauer Kammer 0,0025 mm <sup>2</sup>	Marienfeld, Germany
Nukleinsäure-Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad
pH-Meter pH 540 GLP	Multical ®
PCR-Maschine Tpersonal	Biometra
Plate Reader Synergy HTTR w/injectors	Bio-Tek
Präzisionswaage BP 211D, BP1200	Sartorius
Proteinelektrophorese-Kammer	Bio-Rad
Schaukelplattform	GFL
Sterilbank HERA safe	Heraeus instruments
Thermomoxer comfort	Eppendorf
Ultracentrifuge Sorval RC M120 GX	Thermo scientific
UV-Visible Spektrophotometer	Amersham Biosciences
Ultrospec 2100 pro	
Variable Mode Imager Typhoon TRIO+	GE Healthcare
Wasserbad	GFL

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Tierhaltung und Zucht

In dieser Studie wurden Paare und mehr als 200 männliche ERp29-Knockout (KO) und Wildtyp (WT) Mäuse im Alter von 3 bis 24 Monaten des Stammes C57BL/6N untersucht. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal sechs Tieren unter standardisierten Bedingungen bei einem konstanten 12 h Hell-/ Dunkelrhythmus gehalten. Als Nahrung diente standardisiertes Ratten-Mäuse Standard-Diät-Futter (Altromin #1324) und Leitungswasser. Die Durchführung der Tier-experimentellen Untersuchungen ist vom Verwaltungsamt des Landes Sachsen-Anhalt genehmigt.

Zur Zucht wurde jeweils ein Weibchen im gebärfähigen Alter (8 - 40 Wochen) mit einem Männchen (8 - 40 Wochen) zusammengesetzt. Die Nachkommen wurden im Alter von drei bis vier Wochen durch PCR-Analyse der DNA aus Schwanzgewebe genotypisiert. Im Alter von vier Wochen wurden die Jungtiere von den Elterntieren abgesetzt und nach ihrem Geschlecht getrennt.

### 4.2.2 Primäre Phenotypisierung in *German Mouse Clinic*

Für die primäre Phenotypisierung waren 20 KO Männchen und 20 KO Weibchen notwendig. Als Kontrolle diente dieselbe Anzahl an WT Geschwister. Im Alter von sieben Wochen wurden markierte und genotypisierte Mäuse mit einem Gesundheitszeugnis nach FELASA (erweitert) zu unseren Kollaborationspartnern in der *German Mouse Clinic*, Helholtzzentrum München verschickt.

Da ERp29KO Mäuse ursprünglich mit dem Endoparasit *Syphacia sp.* und *Pasteurellaceae* infiziert wurden, erfolgte eine Behandlung der 42 KO Weibchen in einem speziell dafür gesäubertem Raum. Gegen *Pasteurellaceae* bekamen die Mäuse ein Antibiotikum – Baytril® 2,5 % (Bayer HealthCare) mit Trinkwasser (200 mg/L) verabreicht. Diese Behandlung wurde 2 x 14 Tage mit einem Abstand von vier Wochen, wobei das Trinkwasser alle drei Tage gewechselt wurde.

Gegen *Syphacia sp.* bekamen die Mäuse sechs Monate lang eine Spezialdiät – Futter mit einem Zusatz von 3 g/kg Fenbendatol (ssniff Spezialdiäten GmbH, #A112F0300). Die Auswahl der Antibiotika sowie ihre Dosierung und der Behandlungsverlauf fand durch Unterstützung und Betreuung des Tierarztes Dr. Woitow statt.

Drei Monate nach dem Behandlungsbeginn wurden KO Weibchen im Alter von sechs Monaten mit 35 WT Männchen (Fa. Charles River) verpaart. Die Nachkommen dieser Eltern sind heterozygot. Von Geburt an bekamen auch diese Mäuse eine Spezialdiät gegen *Syphacia*

*sp.* Im Alter von vier bis fünf Monaten wurden 84 heterozygote Männchen und 89 Weibchen miteinander verpaart. Aufgrund des mehrfach beobachteten selektiven Fressens der Nachkommen von heterozygoten Eltern (siehe 5.4.1.2) wurden etwa doppelt so viele Mäuse verpaart, wie von der *German Mouse Clinic* empfohlen wurde. Sie wurden an einem Freitag nachmittag zusammengesetzt und am Dienstag der darauf nachfolgender Woche getrennt. So konnten etwa gleiche Geburtstermine bei verschiedenen Weibchen gewährleistet werden. Bei diesen Verpaarungen wurde insbesondere darauf geachtet, nah verwandte Verpaarungen zu vermeiden, um eine möglichst große genetische Diversität zu erhalten. Zwei Wochen nach der Geburt der nächsten Generation wurde die Spezialdiät durch das herkömmliche Futter ersetzt. Mit vier Wochen wurden die Nachkommen heterozygoter Mäuse markiert und anschließend mit Hilfe von Schwanzbiopsie genotypisiert.

Während der gesamter Zucht wurden entsprechend strenge hygienische Maßnahmen getroffen und eingehalten, um eine neue Infektion zu vermeiden. Laut des letzten Gesundheitszeugnisses waren die Mäuse frei von den oben genannten Parasiten. Sie wurden im Alter von sieben Wochen in kleinen Gruppen (drei bis sechs Mäuse pro Karton) für die Phenotypisierung bereitgestellt.

*German Mouse Clinic* ist die erste und bisher einzige weltweit bekannte Einrichtung dieser Art. Hier werden mutante Mäuse aus der ganzen Welt mit Hilfe von standardisierten Protokollen auf mehr als 550 Parameter getestet. Diese Studien beinhalten Untersuchungen des Verhaltens, Aufbau der Knochen und Knorpel, Neurologie, klinische Chemie, Aufbau der Augen, Immunologie, allergische Reaktionen, Steroidmetabolismus, energetische Metabolismus, Funktionen von Lungen, Sehvermögen und Schmerzempfinden, molekulare Phenotypisierung, kardiovaskuläre Analyse sowie Pathologie (Gailus-Durner et al., 2009).

#### **4.2.3 Phenotypisierung von altersbedingten Veränderungen in ERp29KO Mäusen**

Die Untersuchungen stellen einen Vergleich der jeweiligen KO Mäusen mit WT Mäusen im Alter von drei bis zwölf Monaten dar.

Die Messung der Körpermasse [g] bei lebenden Tieren erfolgte zwei Jahre lang. Die Tiere wurden zwischen 10 und 11 Uhr mittels einer Hochpräzisionswaage gewogen.

Für die Proteom-Analyse wurden die Organe nach lethalen CO<sub>2</sub>-Behandlung etwa zeitgleich von KO und WT Mäusen entnommen. Bevor Haut und innere Organe entfernt wurden, wurde die Leber mit einem PBS / Protease Inhibitor Cocktail perfundiert, bis das Organ äußerst blutfrei war. Danach wurden die Organe (Leber, Nieren, Herz, Gehirn, Schilddrüse, Speicheldrüse, Magen, Pankreas, Prostata, Haut) mehrmals mit PBS gewaschen und

entweder für histologische Analysen in Formalin eingelegt, oder für Western Blot-Analyse im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80° C aufbewahrt.

Histologische Analysen dieser Organe wurde von unseren Kollaborationspartnern Dr. U. Lippert (Städtischen Kliniken Dessau) und Dr. B. Naton (*German Mouse Clinic* München) durchgeführt.

#### **4.2.4 Molekularbiologische Methode - Genotypisierung mittels PCR**

##### **4.2.4.1 Isolierung genomischer DNA**

Die Isolierung genomischer DNA aus murinen Zellen, Schwanz- und Embryobiopsien erfolgte laut der Beschreibung aus QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Dabei wurde das Material mit Hilfe einer Protease-Lösung aufgeschlossen. Die Inkubation der Schwanz- und Embryo-Biopsien erfolgte im Thermomixer bei 56 °C über Nacht, der Zellen - vier Stunden bei 56 °C.

Danach wurde die DNA mittels Ethanol gefällt. Alle nachfolgenden Schritte wurden mit Hilfe von QIAamp Spin Säulen durchgeführt, in denen DNA an die Säule gebunden, gewaschen und mit destilliertem H<sub>2</sub>O eluiert wurde. Langfristig wurde DNA bei -20 °C gelagert.

Die Messung der DNA / RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mittels NanoDrop bei 260 nm. Die Reinheit von DNA und RNA wurde aus dem Verhältnis OD bei 260 nm / OD bei 280 nm abgeschätzt. Die Quotient lag über 1,7, was auf eine saubere Präparation hinweist.

##### **4.2.4.2 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR)**

Das Prinzip der PCR ist die selektive und hocheffiziente Anreicherung *in vitro* amplifizierter DNA von definierter Länge und Sequenz. In einem zyklischen Prozeß aus Denaturierung, Annealing und Elongation synthetisiert die thermostabile Taq-DNA-Polymerase in einem exponentiellen Reaktionsverlauf DNA-Fragmente, die von spezifischen Oligonukleotid-Primern flankiert sind.

Die erwarteten Größen der PCR-Produkte betragen für das WT Allel 0,7 kb und für das deletierte ERp29-Allel 2,5 kb. Die Bedingungen für diese Reaktionen sind in den Tab. 1 und Tab. 2 aufgelistet.

**Tabelle 1.** PCR I für das deletierte ERp29-Allel

Komponente	Menge
10 x Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
DNA	100 ng
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer p366 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer p393 (10 pmol/µl)	1 µl
DMSO (5 %)	2,5 µl
DNA Polymerase (FINNZYMES)	2 µl
zugeben ddH <sub>2</sub> O auf 50 µl	

## Parameter

Temperatur	Zeit
1. 94 °C	4 min
2. 94 °C	50 sek
3. 64 °C	50 sek
4. 72 °C	2 min zu Schritt 2 30 Zyklen
5. 72 °C	5 min
6. 4 °C	

**Tabelle 2.** PCR II für das Wildtyp Allel

Komponente	Menge
10 x Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
DNA	100 ng
dNTP (10 mM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
Primer p278 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer p304 (10 pmol/µl)	1 µl
Tag Polymerase (Fermentas)	1 µl
zugeben ddH <sub>2</sub> O auf 50 µl	

## Parameter

Temperatur	Zeit
1. 94 °C	3 min
2. 94 °C	30 sek
3. 58 °C	30 sek
4. 72 °C	1 min zu Schritt 2 30 Zyklen
5. 72 °C	10 min
6. 4 °C	

**4.2.4.3 Analyse der PCR Produkte mittels DNA Agarose Gel Elektrophorese**

Das Prinzip der Methode besteht darin, dass im elektrischen Feld negativ geladene DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode migrieren. Dabei hängt die Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente im Gel von ihrer Größe ab: Je größer das Fragment ist, desto langsamer wandert es im Gel im elektrischen Feld.

Die Trennung der PCR Produkte erfolgte im 1 % Agarose / TBE Gel bei 150 V. Die Banden wurden mit *SYBR safe DNA gel stain* (1:10000 v/v) gefärbt. Dieser Farbstoff bildet

Komplexe mit DNA, die unter UV Licht bei 320 nm sichtbar werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Gene genius Bio image Systems (Syngene) dokumentiert.

#### **4.2.5 Zellbiologische Methoden**

##### **4.2.5.1 Anlegen von Primärkulturen aus Maus-Embryo-Fibroblasten**

Die schwangeren Weibchen (14. – 15. Schwangerschaftstag) wurden durch CO<sub>2</sub>-Behandlung getötet. Danach wurden sie auf einem Präparationsbrett fixiert und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Embryonen wurden durch einen Schnitt in der Bauchdecke steril entfernt und mit PBS mehrmals gewaschen. Jedes Embryo wurde dekapitiert, ausgenommen und in einer Zellkulturplatte mit PBS gewaschen. Mit einem Skalpel zerkleinerte Embryonen wurden mit 5 ml Trypsin / EDTA bei 37 °C inkubiert. Nach 10 - 15 min wurde diese Reaktion durch die Zugabe von 5 ml serumhaltigen Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb filtriert, und 4 min bei 100 x g zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 1 ml Fibroblasten-Medium resuspendiert und auf 10 – 15 cm Platten in 10 – 15 ml Medium ausplattiert. Die adhärenente Kultur von murinen embryonalen Fibroblasten wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

##### **4.2.5.2 Kultivieren und Passagieren von adherenten Zellen**

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte standardmäßig bei 37 °C, atmosphärischer Sauerstoffkonzentrationen (21 % O<sub>2</sub>), 5 % CO<sub>2</sub>, und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Adhärenente Zelllinien aus Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) wurden als Monolayer-Kulturen in Zellkulturplatten subkonfluent gehalten. Sie wurden alle drei Tage passagiert. Für die Subkultivierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie durch fünfminütige Inkubation mit Trypsin / EDTA von der Platte abgelöst. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des gleichen Volumens am serumhaltigen Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und für die Zellzahl-Bestimmung verdünnt. Ein Aliquot dieser Suspension wurde mit 0,4 % Trypan blau-Lösung gefärbt. Die Zellkonzentration (Zellen/ml) wurde nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Kammer nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellkonzentration} = L \times F \times 10^4 / 4$$

L - die Gesamtzahl der Zellen der vier Quadrate

F - Verdünnungsfaktor

10<sup>4</sup> - konstanter Faktor, der sich aus der Größe der Zellkammer ergibt

#### 4.2.5.3 Einfrieren und Auftauen

Ein Teil der expandierten Zellen wurde eingefroren und im flüssigen Stickstoff für die spätere Versuche aufbewahrt. Dafür wurden die von der Platte abgelösten Zellen 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Fibroblasten Medium mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und im *Freezing Container* bei -80 °C über Nacht eingefroren.

Nach Bedarf wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff geholt und im Wasserbad bei + 37 °C aufgetaut. Danach wurden die Zellen mit 3 - 5 ml Fibroblasten-Medium verdünnt, 5 min bei 100 x g zentrifugiert und anschließend in eine Zellkulturplatte ausplattiert.

Für eine bessere Überlebensrate war ein langsames Einfrieren (1°/min) und schnelles Auftauen (maximal 5 min) notwendig.

#### 4.2.5.4 Spontane Immortalisierung von Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) mittels 3T3 Protokoll

Für die Etablierung der C57BL/6N 3T3 Zelllinien wurden frisch isolierte MEF (E 14 - 15) in einer Konzentration von  $1,2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Zellkulturplatte ausgesät. Diese Zellen wurden alle drei Tage passagiert und erneut in der gleichen Dichte ( $1,53 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät (Todaro und Green, 1963). Nach 10 - 12 Passagen durchläuft ein Großteil der Kultur eine sogenannte Krise, aus der die immortalisierten Zellen hervorgehen (15 - 20 Passagen).

Die Zellkonzentration wurde mittels Neubauer-Kammer bestimmt. Für die Ermittlung der Wachstumsrate wurde die absolute Zellzahl nach dreitägiger Kultur (N3) durch die absolute Zellzahl zu Beginn des Experiments (N0) dividiert.

#### 4.2.5.5 Klonogenität Studien bei embryonalen Fibroblasten

Um die Klonogenität zu ermitteln, wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in einer 10 cm Platte mit 10 ml Medium bei Standardbedingungen 14 Tage lang inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Am Versuchsende wurden die Zellkulturplatten mit PBS gewaschen, die Zellen mit einer Kristallviolett-Lösung (0,1 % (v/w) in 70 % (v/v) Ethanol) für 5 min fixiert und zeitgleich gefärbt. Anschließend wurden die Platten mit Leitungswasser gewaschen und sich darauf befindende dunkelblau-gefärbte Kolonien ausgezählt. Die Klonogenität wurde sowohl für die primären Fibroblasten von unterschiedlichen Embryonen als auch für mehrere 3T3 Zelllinien ermittelt.

#### **4.2.5.6 Untersuchung der radialen Zellmigration aus einem Monolayer bei embryonalen Fibroblasten**

Dieser Versuch wurde mit mehreren 3T3 Zelllinien in 6-Loch Platten durchgeführt. Als Ausgangspunkt diente ein Tropfen der Zellsuspension (50  $\mu$ l mit  $1 \times 10^4$  Zellen), der in die Mitte eines Lochs platziert wurde. Die Platten wurden 6 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Die Kontrollplatte (0 h) wurde danach mit 0,1 % (v/w) Kristallviolett in 70 % (v/v) Ethanol angefärbt und der Durchmesser des Tropfens wurde vermessen. Zu anderen Platten wurden 2 ml Medium mit oder ohne karzinogenen *chicago sky blue* (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) zugegeben. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit 0,1 % (v/w) Kristallviolett in 70 % (v/v) Ethanol angefärbt. Die Analyse der Zellmigration erfolgte nach der Methode von Berens und Beaudry (2004). Hierbei wurde das Durchmesser des angefärbten Flecks gemessen und die Migrationsrate [ $\mu$ M/Tag] berechnet.

#### **4.2.5.7 Anlegen von Primärkulturen aus dermalen Mausfibroblasten**

Die primäre dermale Fibroblasten wurden nach der Methode von Lichti et al. (2008) isoliert. Als Quelle für dermale Fibroblasten diente Haut aus dem Rückenbereich männlicher WT und KO Mäuse im Alter von drei und zwölf Monate. Sie wurden durch CO<sub>2</sub>-Behandlung getötet und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Haare auf dem Rücken wurden mit einem Rasierer entfernt. Ein Hautfragment von etwa 4 x 2 cm wurde mit einer Scheere rausgeschnitten und dreimal in sterilen PBS gewaschen. Nach 2 h Inkubation in Dispase-Lösung (136 Units/ml im Fibroblasten Medium) wurde die Epidermis von der Dermis abgelöst. Die Dermis-Proben wurden mit PBS gewaschen und auf die 10 cm Platten ausgebracht. Auf den Platten wurden sie mit einem scharfen Skalpel in etwa 5 mm große Vierecke geschnitten.

Dermale Fibroblasten wandern aus Dermis-Fragmenten auf die Platte. Dabei spielt der Kontakt zwischen Dermis und der Platte eine wichtige Rolle. Um dies zu gewährleisten, werden die Dermis-Fragmente auf einer trockenen und offenen Zellkulturplatte für etwa 15 min zum Antrocknen in der Sterilbank gelassen. Das ist ein kritischer Schritt: Trocknet die Haut zu stark aus, sterben die Zellen ab. Dauert das Antrocknen nicht lange genug, schwimmen die Dermis-Fragmente bei der anschließenden tropfenweise Zugabe von 10 ml Fibroblasten-Medium auf.

Das Kultivieren findet bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Nach drei Tagen in der Kultur wandern die ersten Fibroblasten auf die Platte aus. Nach etwa einer Woche werden die Dermis-Teile entfernt und die Zellen alle drei Tage passagiert.

#### 4.2.5.8 Isolierung von Follikeln aus der murinen Schilddrüse

Thyreozytenhaltige Follikel wurden aus der Schilddrüse männlicher Mäuse im Alter von drei Monate nach der Methode von Jeker et al. (1999) isoliert. Sie wurden durch CO<sub>2</sub>-Behandlung getötet und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Schilddrüse wurde unter sterilen Bedingungen von der Trachee abgetrennt und mit einem scharfen Skalpel in mehrere kleine Teile geschnitten. Danach wurden sie in einem 1,5 ml Tube mit 1 ml Verdauungsmedium (MEM Medium mit 125 units/ml Kollagenase Typ I and 1,2 units/ml Dispase) inkubiert. Die enzymatische Verdauung erfolgte in einem Schüttler bei 37 °C und 400 rpm 45 min lang und diente zur Freisetzung der Follikel und Thyreozyten. Anschließend wurde diese Suspension 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Der einzelne Zellen enthaltende Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Follikeln in 3 ml Thyreozyten-Medium resuspendiert und in 6 cm Platten ausplattiert. Die Follikel wurden etwa eine Woche lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bevor sie für die Versuche verwendet werden konnten.

#### 4.2.5.9 Behandlung von Thyreozyten mit Tunicamycin

Für diese Experimente wurden murine Thyreozyten nach der Präparation eine Woche lang in 6 cm Platten kultiviert. Dabei fand der Mediumwechsel alle drei Tage statt. Danach wurde das Medium durch die verschiedenen Konzentrationen an Tunicamycin im Thyreozyten-Medium ersetzt (Tab. 3).

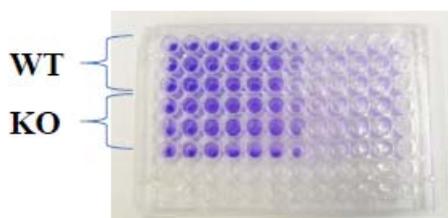
**Tabelle 3.** Behandlungsbedingungen

Inhibitor	Wirkungsweise	Stock in DMSO	Behandlungskonzentration	Behandlungsdauer
Tunicamycin	inhibiert die N-Glykosylierung	5 mg/ml	1,5 µM	18 h
			10 µM	6 h

Die Behandlung mit derselben Menge an DMSO (0,08 %) im Medium diente als Kontrolle. Nach einer bestimmten Zeit (gemäß der Versuchseinleitung) wurden die Zellen geerntet, im flüssigen Stickstoff eingefroren und für weitere Versuche bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.5.10 Zellkulturbasierte Analyse

Zellkulturbasierte Analyse wurde zur Ermittlung des IC<sub>50</sub>-Wertes in 96-Loch Platten eingesetzt. Hierzu wurden für mehrere Substanzen eine Titrationsreihe mit unterschiedlichem Behandlungsdauer getestet (Abb. 5).



**Abbildung 5.** Alle Versuche wurden in 96-Well Platten mit adhärennten Maus-Embryo-Fibroblasten durchgeführt.

Es wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml vorbereitet. Die Bestimmung der Zellkonzentration wurde in einer Neubauer-Zellkammer durchgeführt. 200  $\mu$ l Zellsuspension wurde in jedes Loch ( $2 \times 10^4$  Zellen/Well) pipettiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch das Behandlungsmedium (200  $\mu$ l pro Loch) mit oder ohne Substanz (Kontrolle) ersetzt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit (gemäß des entsprechenden Protokolls) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch die Behandlung lösen sich apoptotische und nekrotische Zellen von der Platte ab. Die lebenden Zellen wurden 10 min mit 4 %-igem PFA fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Fixierte Zellen wurden 30 min mit 100  $\mu$ l 0,02 %-iger (v/w) Kristallviolett-Lösung im Wasser gefärbt. Nach dem zweimaligen Waschen mit Wasser wurden zu jedem Loch 180  $\mu$ l 70 %-iges (v/v) Ethanol zugegeben und drei bis vier Stunden bei leichtem Schütteln inkubiert. Während der Inkubation wird das Kristallviolett aus den fixierten Zellen ins Ethanol freigesetzt. Dabei ist die Menge am Farbstoff direkt proportional zu der Anzahl an Zellen im Loch. Die Absorption des Farbstoffes wurde in einem Platten-Reader bei 590 nm gemessen.

Die Analyse der Messdaten wurde unter Verwenden des “Vier Parameter logistischer Plot“ (Dulfa and Christensen, 2007) durchgeführt.

$$Y = (A-B) / [1 + (x/IC_{50})^S] + B$$

A – maximale Fluoreszenz

B – minimale Fluoreszenz

S – Anstieg

IC<sub>50</sub> – Mittelpunkt des Dynamikbereiches

#### 4.2.5.11 Untersuchung der Caspase-3-Aktivität in gestressten Thyreozyten

Caspase-3 ist ein Schlüsselenzym bei dem Caspase-3-vermittelten Apoptoseweg. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erfolgte unter Verwendung des EnzChek® *Caspase-3 assay kits II* (Molecular Probes). Basis der Methode ist Rhodamin 110 bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Aspartic Säureamid) (Z-DEVD-R110). Dieses Substrat ist ein Bisamid-Derivat, in dem Rhodamin 110 (R110) kovalent mit dem Peptid DEVD verbunden ist. Nach

der enzymatischen Spaltung durch Caspase-3 wird das nicht fluoreszierende Bisamid-Substrat zuerst zum Monamid und anschließend zum fluoreszierenden R110 (Ext./Em. 496/520 nm) umgewandelt. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Menge an gespaltem Substrat und entspricht der Caspase-3-Aktivität. Sie kann in einem Platten-Reader gemessen werden. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erfolgte in lysierten Zellen gemäß des Protokolls des Herstellers.

#### **4.2.5.12 Induktion von oxidativem Stress bei Fibroblasten**

Primäre embryonale, dermale Fibroblasten und 3T3 MEF wurden in 6-Loch Platten mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/Loch ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde dieses Medium gegen das Medium mit dem entsprechenden Reagenz ersetzt: mit Wasserstoffperoxid (0,2 mM, 0,6 mM, 1 mM), mit Menadion (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) und mit Diamid (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M). Nach 6 h Behandlung mit oxidierenden Agenzien wurden die Zellen durch 5 min Behandlung mit Trypsin von der Platte abgelöst, mit PBS gewaschen und mit Annexin V-FITC und Propidium Iodid angefärbt. Anschließend erfolgte die Messung der Apoptose und Nekrose mittels FACS (siehe 4.2.5.13).

#### **4.2.5.13 Nachweis der Apoptose und Nekrose mittels Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode zur Charakterisierung und gleichzeitigen Isolierung von Zellpopulationen dar. Sie erfüllt den Anspruch einer hohen Sensitivität von 0,01 - 0,05 % und Spezifität, die erforderlich sind, um sehr kleine Zellzahlen zu detektieren.

Hierbei wird die Externalisation von Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche apoptotischer Zellen durch FITC-markiertes Annexin V nachgewiesen und der Anteil PS-positiver Zellen quantifiziert. Da auch nekrotische Zellen PS externalisieren, werden sie durch die Propidiumiodid (PI)-Färbung von anderen Zellen deskriminiert. Die intakte Membran lebender und frühapoptotischer Zellen ist für PI nicht durchlässig.

Für die Analyse wurde das Annexin V-FITC Apoptosis detektion Kit I (BD Pharmingen <sup>TM</sup>) verwendet. Zur Färbung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert (5 min 200 x g) und in 1 ml Bindungspuffer resuspendiert. 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden mit 5  $\mu$ l Annexin V-FITC und mit 5  $\mu$ l PI angefärbt. Nach 15 min wurde die Zellsuspension 5-fach verdünnt und innerhalb einer Stunde mit FACS analysiert.

#### **4.2.6 Immunzytochemische Methode und Fluoreszenzmikroskopie: Immunfärbung von Fibroblasten**

Für die Färbung wurden  $0,5 \times 10^4$  Zellen pro Loch in ein 8-Loch Slide ausplattiert. Nach 18 h (über Nacht) wurden die Zellen mit einer Methanol / Aceton Mischung (1:1) 10 min bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  fixiert und permeabilisiert. Danach wurden sie dreimal kurz mit PBS gewaschen und für 30 min in Blocking-Lösung (PBS / 2% (v/v) FBS / 0,5 % (v/v) Triton X-100) inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in der Blocking-Lösung dauerte eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach kurzem Waschen mit PBS erfolgte die 30-minütige Inkubation mit Sekundärantikörper (Ziege Anti-Kaninchen IgG-Cy3). Nachdem die Zellen erneut mit PBS gewaschen wurden, wurden die Zellkerne 30 min mit HOECHST44432 und das endoplasmatische Retikulum 30 min mit *ER-stain* gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen, mit *Mounting-Medium* beschichtet und mit Deckgläsern bedeckt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Konfokalmikroskop EZ-C1 visualisiert. Die Präparate konnten über längere Zeit geschützt vom Licht bei  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  -  $+8\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert werden.

#### **4.2.7 Proteinanalytische Methoden**

##### **4.2.7.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten**

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden frisch sedimentierte oder eingefrorene Zellsedimente auf Eis aufgetaut und mit 20 - 50  $\mu\text{l}$  Lysepuffer versetzt. Danach wurden diese Proben 5 min im Wasserbad bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  sonifiziert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben mit einem entsprechenden Volumen an 4 x Ladepuffer versetzt. Anschließend wurde das Zelllysate entweder gleich analysiert, oder im flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

##### **4.2.7.2 Herstellung von murinen Organextrakten**

Etwa 30 - 100 mg Gewebe (Leber, Herz, Niere, Gehirn, Schilddrüse, Speicheldrüse, Prostata, Pankreas, Magen) wurden zweimal mit PBS gewaschen und in kleine Teile geschnitten. Die Teile wurden in ein Tube übertragen, mit 20 - 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer versetzt und mit dem Mikromörser homogenisiert. Das Homogenisat wurde 20 min bei  $13200 \times g$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube übertragen, erneut mit 20 - 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer versetzt und 20 min bei  $13200 \times g$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### 4.2.7.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Pierce® 660 nm Protein assay Kit

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde in 96-Loch Platten durchgeführt. Für eine Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe aus 2 mg/ml BSA-Standardlösung vorbereitet (Tab. 4).

**Tabelle 4.** Verdünnungsreihe für die Eichgerade

Probe Nr.	1	2	3	4	5	6
<b>BSA Standardlösung</b>	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
<b>Proteinmenge</b>	0 µg	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50 µg

Je 10 µl jeder Probe wurden in eine 96-Loch Platte pipettiert. Zu jedem Loch wurden je 150 µl Pierce-Reagenz zugegeben. Unmittelbar danach wurde die Platte 1 min geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde in einem Platten-Reader bei 660 nm gemessen. Durch den doppelten Messeinsatz konnten Mittelwert und Standardabweichung für jede Probe bestimmt werden. Die Mittelwerte wurden gegen die entsprechenden Proteinkonzentrationen aufgetragen. Es wurde eine lineare Regression (in Excel) erstellt, deren Gleichung für eine Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben diente.

#### 4.2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Diese analytische Methode wird zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld benutzt. Das anionische Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfate*) denaturiert Proteine und verleiht ihnen negative Ladungen, sodaß die Moleküle nur nach dem Molekulargewicht getrennt werden. Bei der in dieser Arbeit benutzten diskontinuierlichen SDS PAGE wandern die Proteine zuerst in ein Sammelgel, in dem sie aufkonzentriert werden und anschließend in ein Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Sammel- und Trenngel unterscheiden sich durch unterschiedliche Porengrößen und pH-Werte.

Durch den Gehalt an Acrylamid kann die Porengröße des Gels variiert werden, je nachdem ob kleine oder große Proteine getrennt werden sollen (8 – 12 %): 8 % für 24 - 205 kDa Proteine, 10 % für 14 – 205 kDa Proteine, 12 % für 14 – 66 kDa Proteine. Zur Herstellung diskontinuierlicher Minigele (100 mm x 80 mm x 1,0 mm) wurde zuerst das SDS Trenngel bis ca. 3,5 cm unter den Rand der vertikalen Glasplatten gegossen und mit 1 ml reinem 2-Propanol überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels, wurde das 2-Propanol entfernt. Das Sammelgel wurde nun auf das Trenngel gegossen und der Kamm luftblasenfrei aufgesetzt (Tab. 5).

Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut, mit Lysepuffer auf 4 µg/µl verdünnt und mit 4 x Ladepuffer versetzt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben (20 µg Protein pro Probe) auf das Gel aufgetragen und bei 150 V aufgetrennt.

**Tabelle 5.** Zusammensetzung der SDS-Gele

Stock-Lösung	Sammelgel	Trenngel		
	4 %	8 %	10 %	14 %
0,4 % SDS, 0,5 M Tris·Cl, pH 6,8	2,5 ml	-	-	-
0,4 % SDS, 1,5 M Tris-Cl, pH 8,9	-	3,9 ml	3,9 ml	3,9 ml
30 % Acrylamid	1,3 ml	4,2 ml	5,3 ml	7,4 ml
H <sub>2</sub> O	6,1 ml	7,5 ml	6,5 ml	4,4 ml
10 % (w/v) Ammonium persulfat	50 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	15 µl	11,3 µl	11,3 µl	11,3 µl

#### 4.2.7.5 Western Blot-Analyse

Western Blot ist eine immunologische Technik, die Dank ihrer Simplität und anschließender informativer Aussagekraft sehr verbreitet ist. Diese Methode besteht aus drei Schritten: Proteintransfer, Immunofärbung und Detektion.

##### *Proteintransfer*

Nach der Auftrennung von Proteinen im SDS Gel wurden sie im Semi-dry Blot System auf einen festen Träger (Nitrocellulose Membran) übertragen. Vor dem Transfer wurden Membran und Whatman Gel Blotpapier entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten und 20 min im Blotpuffer equilibriert.

Die Proteine wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, deshalb wurden die Komponenten des Blots so platziert, dass sich die Membran am positiven Pol und das Gel am negativen Pol befanden. Ober- und unterhalb des Gel-Membran-Systems befanden sich jeweils zwei Schichten von Whatman Papier. Die Stromstärke wurde auf 1 mA/cm<sup>2</sup> Gel eingestellt. Der Transfer von einem Minigel dauerte 90 min bei 50 mA.

##### *Immunofärbung*

Vor der Färbung wurde die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei +4 °C mit der Blocking-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach erfolgte eine Inkubation mit Primärantikörpern (1:1000 in 10 ml Inkubationspuffer) für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei +4 °C. Im nächsten Schritt wurde die Membran dreimal je 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Die

Inkubation mit Sekundärantikörpern (1:10000 in 10 ml Inkubationspuffer) dauerte zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran fünfmal je 10 min mit PBS/0,05 % Tween gewaschen.

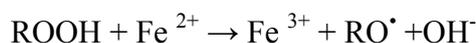
#### *Detektion*

Nach der Färbung mit sekundären HRP-gekoppelten Antikörpern wurden die Proteine mittels Chemolumineszenz detektiert. Signale wurden entweder mit *Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit* oder mit *Supersignal West Dura Extended Duration Substrate kit* (für schwache Signale) laut der Anweisung sichtbar gemacht. Bei dieser Methode wird die Wasserstoffperoxid-Lösung als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase (HRP) benutzt. Die dadurch entstehenden Radikale lösen eine Chemolumineszenz-Reaktion aus, welche zur Schwärzung der Membran an der Position des gebundenen HRP-gekoppelten Antikörpers führt. Durch die Luminol/enhancer-Lösung erfolgt eine Amplifikation des Signals. Die Bilder wurden mittels CCD Kamera Fusion-SL 4.2 MP (chemiluminescence system, peqlab) aufgenommen.

Wenn für die Färbung Ziege Anti-Kaninchen Cy3- oder Cy5-gekoppelte Sekundärantikörper benutzt wurden, erfolgte eine Fluoreszenzdetektion mittels Typhoon TRIO+-Scanner. Die Signalintensität wurde mit Adobe Photoshop CS3 gemessen und analysiert. Die gemessenen Intensitäten wurden nach der Ladekontrolle ( $\beta$ -Aktin, GAPDH) normiert und als %-Anteil der Kontrolle berechnet.

#### **4.2.8 Analytische Methode: Konzentrationsbestimmung von Wasserstoffperoxid im Medium mittels *ferrous oxidation - xylenol orange* (FOX)-Analyse**

Mittels dieser spezifischen und sensitiven Methode ist es möglich, kleine Mengen an Wasserstoffperoxid in verschiedenen organischen Substanzen und Medien zu bestimmen (Gay and Gebicki, 2003). Die FOX Methode basiert auf der Oxidation von Fe (II) zu Fe (III) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid unter sauren Bedingungen (Bou et al., 2008).



Der Farbstoff Xylenolorange (XO) [3,3'-Bis(N,N-bis(carboxy-methyl)aminomethyl)-o-cresolsulfonephthalein] tetrasodium Salz bildet mit Fe (III) einen Farbkomplex, der bei 540 - 600 nm absorbiert. Die Absorption wurde in einer Plastikkuvette, in der zu 950  $\mu$ l FOX Reagenz 50  $\mu$ l Probe zugegeben wurden, gemessen. Die Farbe entwickelte sich bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min (Gay et al., 1999). Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$A = \varepsilon * c * d, \text{ wobei}$$

A - Absorption

$\varepsilon$  - Extinktionskoeffizient,  $M^{-1}cm^{-1}$

d - Pfadlänge, cm

c - Konzentration der absorbierenden Substanz, M

Der Extinktionskoeffizient beträgt  $44000 M^{-1}cm^{-1}$  (Gay et al., 1999, Bou et al., 2008), die Pfadlänge 1 cm.

#### **4.2.9 Statistische Auswertung der Messdaten**

Die meisten Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Mittels t-Test wurden die P-Werte zwischen WT und KO berechnet. Statistische Signifikanz wurde als  $P < 0,05$  definiert. Alle Berechnungen wurden in Excel durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte bezüglich der Rolle von ERp29 untersucht: Zelluläre Prozesse und *in vivo* Effekte. In der ersten Hälfte dieses Kapitels wird die Rolle von ERp29 im Stoffwechsel, seine Beteiligung an verschiedenen Signalkaskaden und die potentielle Beteiligung an der Krebspathogenese untersucht. Die Analyse der *in vivo* Effekte in der zweiten Hälfte des Kapitels erfolgte anhand der Langzeitstudien und der primären Phenotypisierung der ERp29KO Mäuse. Einige Untersuchungen wurden in Hinsicht auf die aktuellen Studien aus der Literatur durchgeführt.

### 5.1 Charakterisierung primärer und immortaler ERp29-defizienter Zellen

Für diese Charakterisierung wurden embryonale und adulte Zellen verwendet, die verschiedene Ontogenese-Stadien repräsentieren. Die embryonalen Zellen haben aufgrund eines hohen proliferativen Potentials einen großen Vorteil für experimentelle Arbeiten.

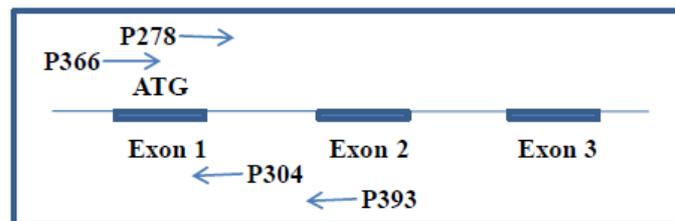
Alle Versuche mit adulten Zellen gestalteten sich hingegen als sehr aufwendig. Adulte Zellen teilen sich nur begrenzt und sind nur in kleinen Mengen von einer Maus verfügbar. Die murine Schilddrüse ist beispielsweise nur 2 mm groß. Deshalb konnten nur die Experimente wiederholt werden, die Genotyp-relevante Unterschiede zeigten, da jede Wiederholung einen Zugriff auf die Ursprungsquelle erforderte.

#### 5.1.1 Spontane Immortalisierung primärer Maus-Embryo-Fibroblasten

In der Literatur wurden bereits einige Studien im Hinblick auf die spontane Immortalisierung der primären murinen Fibroblasten beschrieben. Für die vorliegende Arbeit war es jedoch entscheidend, den Einfluss von ERp29 in zwei wichtigen Situationen bezüglich der malignen Veränderungen zu vergleichen: Die spontane Immortalisierung, die der erste Schritt in Richtung Transformation ist (Baserga, 1997), und die Fähigkeit der Zellen zur Klonogenität und zur Migration (Kuzumaki et al., 1996). Daher wurde im ersten Teil der Arbeit zunächst die Rolle von ERp29 in der spontanen Immortalisierung von primären C57BL/6N Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) untersucht.

Für die spontane Immortalisierung von MEF wird im Allgemeinen das von Todaro und Green (1963) etablierte 3T3-Protokoll angewendet. Die primären Fibroblasten werden alle drei Tage in einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro 5 cm Kulturschale ausgesät bis die Zellen ihr Proliferationslimit erreichen und ihr Wachstum einstellen. Durch spontane Mutationen und epigenetische Veränderungen, die während der Kultivierung auftreten können, werden nur wenige Zellen von den Seneszenz-auslösenden Mechanismen unabhängig und proliferieren unbegrenzt. Die Zellen sind immortal bzw. immortalisiert. Im

Folgenden wurden primäre C57BL/6N MEF bis zum Auftreten immortalisierter Zellen passagiert und das Proliferationsverhalten wurde charakterisiert. Die primären MEF stammen aus der Verpaarung ERp29-heterozygoter C57BL/6N Mäuse in laboreigener Züchtung. Embryonen wurden am 14. – 15. Schwangerschaftstag entnommen, die MEF isoliert und ihr Genotyp anhand spezifischer PCR untersucht (Abb. 6). Mittels PCRI wurde ERp29KO-Gen 2,5 kb groß amplifiziert. Dafür wurden zwei Primer verwendet: Primer 366 bindet vor dem ATG-Start Kodon und Primer 393 bindet am lacZ-Fragment des ERp29-Vektors (Abb. 38).



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung der Primer-Bindungsstellen für die Genotypisierung.

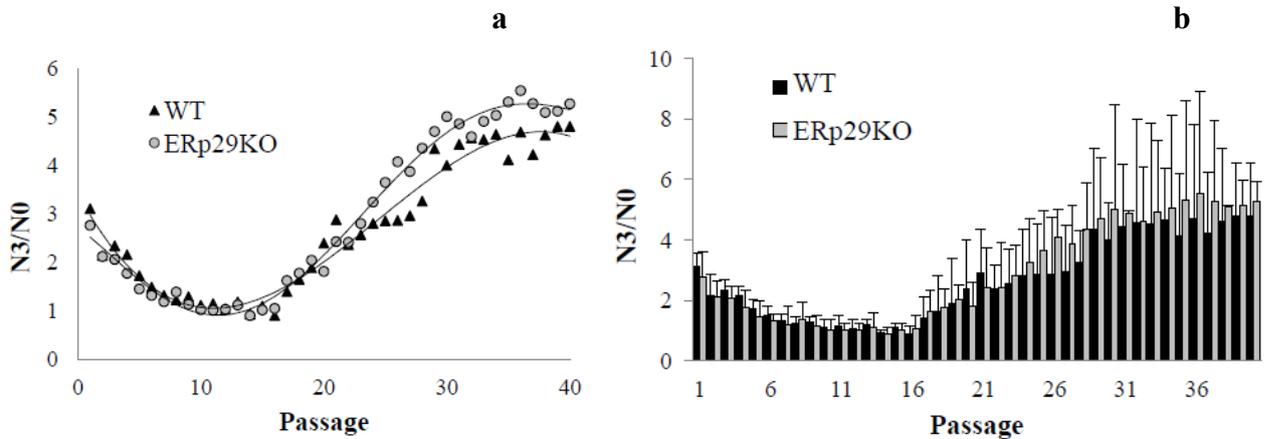
Auf dem Bild sind die Bindungsstellen für Primers 366 und 393 (PCRI) und für Primers 278 und 304 (PCRII) dargestellt.

Für PCRII (WT-Gen 0,7 kb groß) wurden der Primer 278, der am Start-Kodon bindet, und der Primer 304, der am Intron zwischen Exon 1 und Exon 2 bindet, verwendet. Dieses Intron fehlt im ERp29KO Gen. Wenn die beiden PCR-Reaktionen für eine Probe positiv waren, deutete dies auf eine Heterozygote hin. Für die Versuche wurden ERp29KO (KO) und WT Zellen als Kontrolle verwendet. Die verbliebenen Zellen wurden kryokonserviert.

Die Immortalisierung erfolgte gleich nach der Präparation der Embryonen (Passage 0) in je zwei 10 cm Kulturschalen pro Zelleinsatz bei Standardbedingungen (21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>). Alle drei Tage wurden primäre Fibroblasten nach dem 3T3-Schema passagiert (siehe 4.2.5.4). Hierbei wurden nur lebenden Zellen berücksichtigt, die anhand der Trypan blaufärbung gezählt wurden (Abb. 7).

Bis zum Erreichen der Seneszenz nach ca. 15 - 20 Tagen wurden  $1,2 \times 10^6$  Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Für die Berechnung dieser und nachfolgender (siehe unten) Zellzahlen wurde die Zelldichte von  $1,53 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> laut dem 3T3 Protokoll berücksichtigt, um die Halbkonfluenz (etwa 60 %) zu gewährleisten und das 3T3-Schema beizubehalten. Die Seneszenz wird durch eine rasant sinkende Wachstumsrate (N<sub>3</sub>/N<sub>0</sub>) charakterisiert. Beim Erreichen einer sogenannten Zellkulturkrise wurde kaum noch eine Zunahme an Zellzahl beobachtet (N<sub>3</sub>/N<sub>0</sub> ≤ 1). Dies ist eine kritische Phase für das Überleben

und für die spontane Mutagenese der Zellen, bei der die interzellulären Kontakten und die interzelluläre Kommunikation eine entscheidende Rolle spielen.



**Abbildung 7.** Immortalisierungsverlauf der ERp29-defizienten MEF im Vergleich zum WT.

MEF wurden nach einem 3T3-Schema alle drei Tage in DMEM / 10 % FCS passagiert. Die Gesamtzellzahl jeder Kulturschale wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zellkammer bestimmt. Die Mittelwerte für die Wachstumsrate ( $N3/N0$ ) wurden gegen die jeweiligen Passagen aufgetragen, um den Immortalisierungsverlauf zu zeigen (a). Im Balkendiagramm (b) sind Mittelwerte für die Wachstumsrate und ihre Standardabweichungen von je vier Zelllinien (vier verschiedene Embryonen) pro Genotyp dargestellt.

Wegen der gesunkenen Gesamtzellzahl wurden während der Zellkulturkrise kleineren Zellkulturplatten (6 cm) bei einer Zellzahl von  $4,3 \times 10^5$  verwendet. Da eine Immortalisierung durch Zufallsereignisse (wie z.B. spontane Mutagenese) möglich wird, werden nicht alle primären Zellen zu immortalisierten Zelllinien. Dabei kann die Abwesenheit einiger Proteine den Immortalisierungsverlauf verändern oder sogar die Immortalisierung verhindern. Für die Beschreibung dieses Phänomens wird die Immortalisierungsrate als prozentualer Anteil immortalisierter Zelllinien zur Anzahl der Einsätze aus primären Zellen ermittelt (Tolstonog et al., 2005). Für diesen Versuch wurden die Zellen von insgesamt je zehn KO und WT Embryonen eingesetzt. Hierbei betrug die Immortalisierungsrate unabhängig vom Genotyp 60 %.

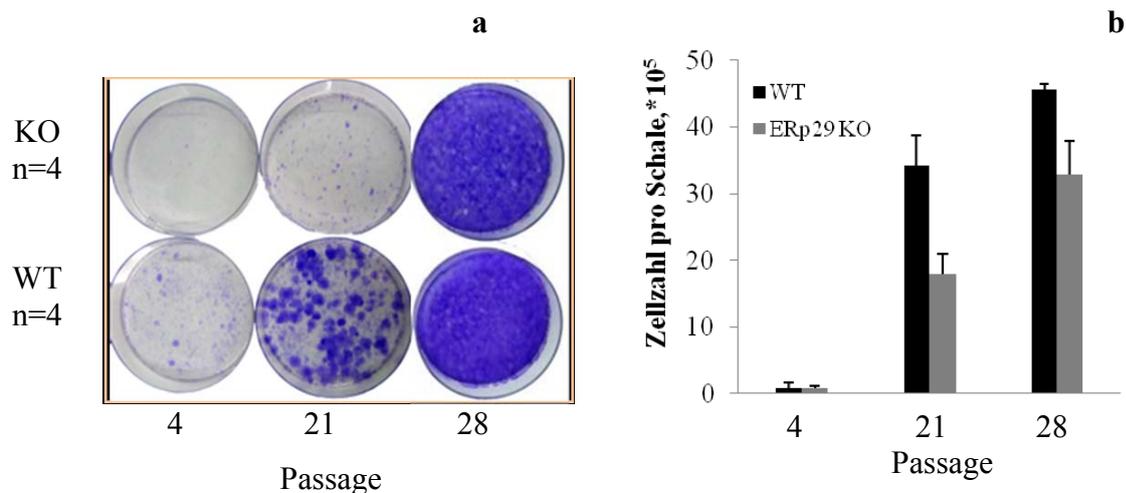
Anhand des Vergleichs der Wachstumskurven der WT und KO Zellen wird deutlich, dass es im Verlauf der Immortalisierung keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum zwischen KO und WT Zellen gab (Abb. 7b). Unabhängig vom Genotyp wurden 3T3 Zelllinien mit sehr unterschiedlichen Wachstumsraten immortalisiert, was anhand der Standardabweichungen in der Plateau-Phase ab der 30. Passage zu sehen ist. In dieser Phase ist die Immortalisierung der Zellen vollendet und ihr Proliferationspotenzial unbegrenzt.

### 5.1.2 Charakterisierung der primären MEF und der immortalen Zelllinien

Eine Charakterisierung der primären MEF und der immortalen Zelllinien erfolgte anhand der Klonogenitätsstudien: Primäre Zellen – Passage 4; Zellen nach der Zellkulturkrise – Passage 21; immortalisierte Zellen – Passage 28.

Spontane Immortalisierung der C57BL/6N MEF führte zu zellulären Veränderungen, die sich in einem verstärkten Proliferationsverhalten (Kolonienzahl und Zellzahl) gegenüber primärer Zellen zeigten. Dies wurde sowohl für WT MEF als auch für KO MEF festgestellt. Im Allgemeinen bildeten primäre Zellen bei einer niedrigen Zelldichte nur wenig Kolonien, was durch fehlenden Zell-Zell-Kontakt zu erklären ist und eine typische Eigenschaft für primäre nicht-maligne Zellen darstellt.

Während für die primären MEF kein Genotyp-relevanter Proliferationsunterschied ( $P = 0,44$ ) nachgewiesen werden konnte, zeigten immortalisierende KO MEF in der Passage 21 (nach der Zellkulturkrise) eine wesentlich verlangsamte Kolonienbildung (Abb. 8a) und eine signifikant reduzierte Gesamtzellzahl ( $P = 0,05$ ) (Abb. 8b). Hierbei wurden die Kolonien mit einem Durchmesser von  $\geq 3$  mm berücksichtigt.



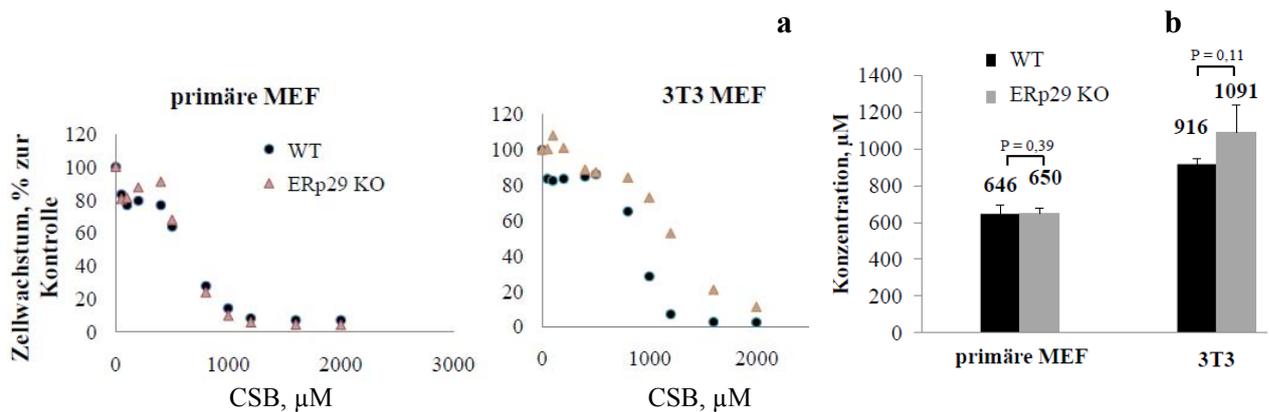
**Abbildung 8.** Proliferationsverhalten der primären und spontan immortalisierten KO MEF im Vergleich zu WT MEF.

Für jeden Einsatz wurden  $1 \times 10^4$  Zellen der Passage 4 (primäre MEF), Passage 21 (nach der Kulturkrise) und Passage 28 (immortalisierte MEF) in 10 cm Kulturschalen verwendet. Nach 14 Tagen wurden entweder je zwei Schalen mit 0,1 % Kristallviolett-Lösung gefärbt, um die Kolonien sichtbar zu machen (a), oder die lebenden Zellen mit der Neubauer-Zellkammer gezählt, um die Gesamtzellzahl pro Schale zu bestimmen. Die gemittelten Gesamtzellzahlen von vier Zelllinien pro Genotyp mit Standardabweichungen sind im Diagramm (b) dargestellt.

Im Laufe der Kultivierung, nach der Zellkulturkrise, bildeten die Zellen immer mehr Kolonien, sodass im Falle der immortalen Zellen (Passage 28) nach zwei Wochen Kultivierung keine einzelnen Kolonien sichtbar waren (Abb. 8a). Aus diesem Grund wurde

das Proliferationsverhalten der immortalisierten MEF nur anhand der Zellzahl pro Platte analysiert (Abb. 8b). Das verlangsamte Wachstum der immortalen KO MEF war hierbei nur als eine Tendenz ( $P = 0,11$ ) im Vergleich zu immortalen WT MEF (Abb. 8b) zu sehen. Da die MEF unabhängig von ihrem Genotyp mit unterschiedlichen Wachstumsraten immortalisiert wurden (siehe 5.1.1), konnten auch im Klonogenität-Versuch für diese Zelllinien keine statistisch signifikante Unterschiede erzielt werden.

Um die weiteren malignen Eigenschaften zu ermitteln wurde das Proliferationsverhalten von primären (Passage 4) und immortalen Zellen (Passage 28) in der Anwesenheit von „chicago sky blue“ (CSB) untersucht. Laut Literatur ist dies ein effektiver Inhibitor, der die Interaktion zwischen dem HIVirus-1 und der Zelle verhindert (Clanton et al., 1992). Weitere Studien zeigten, dass der Azobenzidin-Kern des CSB zu karzinogenen aromatischen Aminen *in vitro* umgewandelt wird (Yin and Hamilton, 2005). Zunächst wurden  $IC_{50}$ -Werte für eine 24 h-Behandlung mit Hilfe von „Vier Parameter logistischer Plot“ (siehe 4.2.5.10) ermittelt (Abb. 9). Dieser Wert repräsentiert die Konzentration an Substanz, die für 50 % Wachstumsinhibition der Zellen *in vitro* notwendig ist.

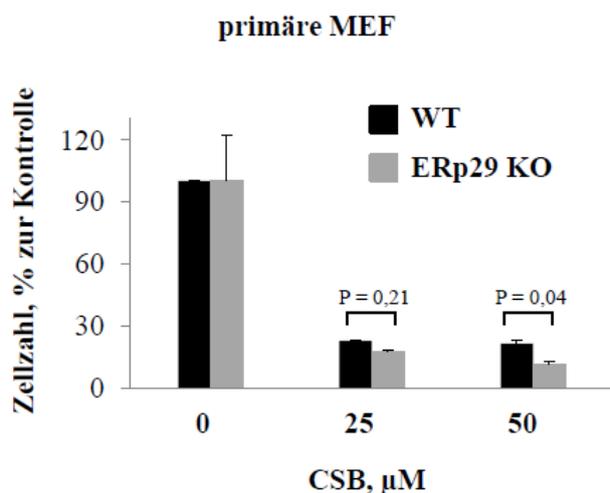


**Abbildung 9.** Vergleichende Schadensantwort bei verschiedenen Konzentrationen an CSB und  $IC_{50}$ -Werte.

Es wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in den Passagen 4 und 28 in jede Vertiefung einer 96-Loch Kulturschale ausplattiert. Nach 18 h Inkubation bei Standardbedingungen wurden die Zellen für weitere 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an CSB behandelt. Danach wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und mit 0,02 % Kristallviolett-Lösung angefärbt. Anhand der Farbintensität, die mit der Zellzahl korreliert, wurde die prozentuale Abnahme der Zellzahl bei der entsprechenden CSB-Konzentration ermittelt und anhand dieser die Toxizitätskurven erstellt (a). Im Balkendiagramm (b) sind die  $IC_{50}$ -Mittelwerte von vier unabhängigen Messungen (primäre Zellen und Zelllinien aus vier Embryonen) mit den jeweiligen Standardabweichungen und den P-Werten dargestellt.

Der  $IC_{50}$  ist ein Maß dafür, wie effektiv eine Substanz ist. Die primären MEF zeigten dabei eine höhere Empfindlichkeit für die CSB-Behandlung ( $IC_{50} \approx 650 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu

immortalen Zellen ( $IC_{50} \approx 950 \mu\text{M}$ ). Dennoch konnten durch diese Untersuchung keine signifikanten, Genotyp-relevanten Unterschiede festgestellt werden. Anhand dieses Versuches wurden zwei Konzentrationen von CSB  $25 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$  ausgewählt, die kein Absterben der Zellen nach 24 h hervorrufen. Diese Konzentrationen wurden für die weiteren Klonogenität-Studien eingesetzt. Hierbei wurde die Kolonienbildung der primären und immortalisierten MEF in Anwesenheit dieses Inhibitors im Kulturmedium untersucht. Die mit CSB behandelten primären Zellen zeigten dabei ein wesentlich reduziertes Zellwachstum\* - um etwa 80 % im Vergleich zur Kontrolle. Genotyp-relevante Unterschiede konnten nach der Behandlung mit  $50 \mu\text{M}$  CSB festgestellt werden. Hierbei zeigten die KO Zellen eine höhere Empfindlichkeit und daher ein signifikant reduziertes Zellwachstum im Vergleich zum WT (Abb. 10).

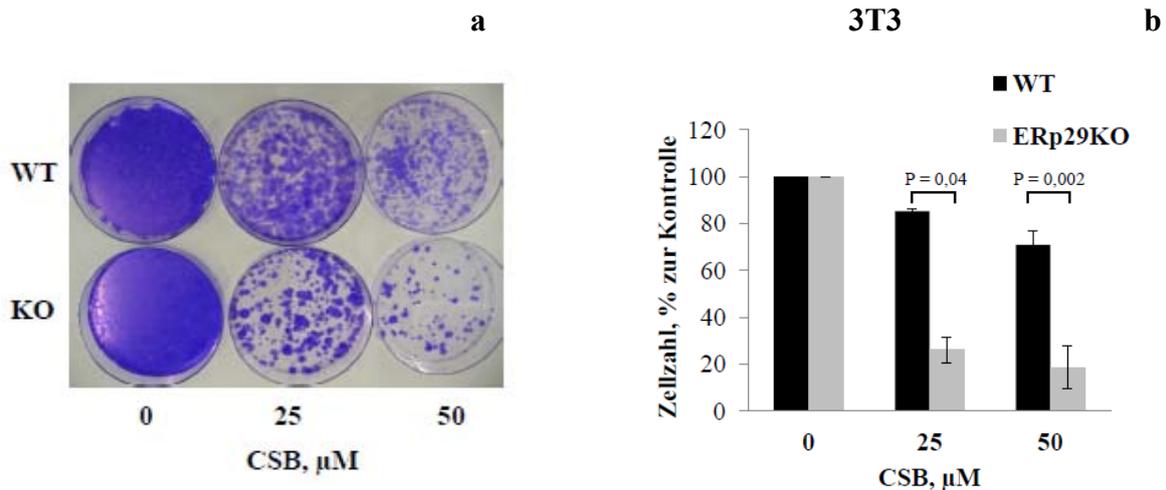


**Abbildung 10.** Einfluss von CSB auf das Proliferationsverhalten von primären MEF.

Für jeden Einsatz wurden  $1 \times 10^4$  primäre Zellen in 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden 14 Tage lang mit  $25 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$  CSB inkubiert. Als Kontrolle diente Medium ohne CSB. Für die Auswertung wurden die lebenden Zellen von je zwei Zellkulturschalen mit der Neubauer-Zellkammer gezählt, um die Gesamtzahl von primären Zellen pro Schale zu bestimmen. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen und den P-Werten dargestellt.

Die immortalen KO Zellen zeigten sich ebenso als mehr empfindlich für die CSB-Behandlung in Gegensatz zu den immortalen WT Zellen. Die KO Zellen wiesen bei  $25 \mu\text{M}$  ein 5-fach und bei  $50 \mu\text{M}$  einen 10-fach reduziertes Zellzuwachs auf (Abb. 11).

\* In der Medizin, speziell in der Onkologie, wird der Begriff „Zellwachstum“ häufig auch mit der Zunahme der Zellzahl (beispielsweise in einem Tumor) gleichgesetzt. Hierbei wachsen (abgesehen von Größenänderungen während der Zellteilung) die einzelnen Zellen nicht, sondern die gesamte Zellkultur.

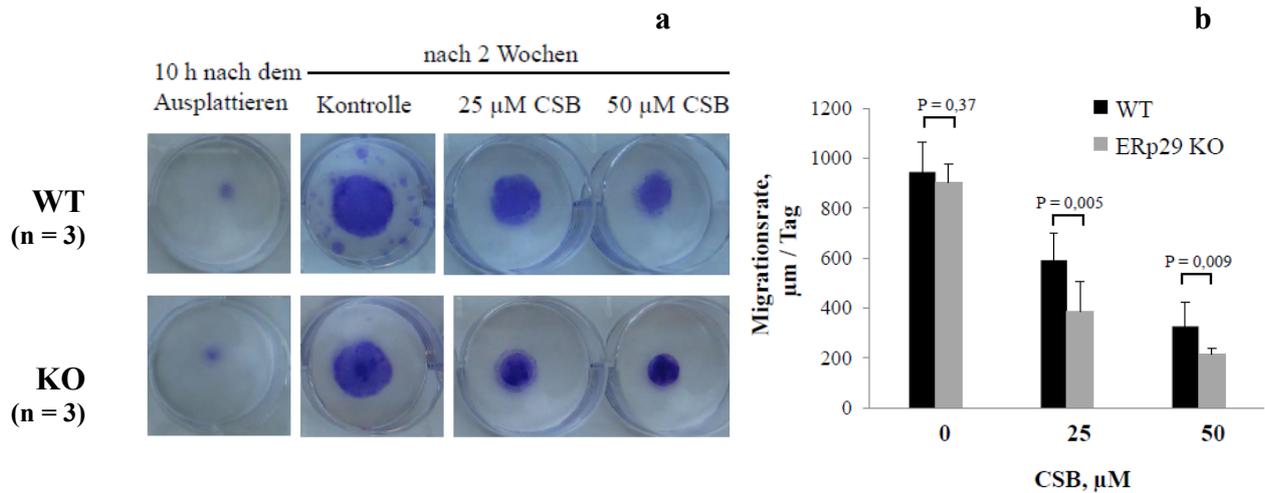


**Abbildung 11.** Einfluss von CSB auf die Proliferation von 3T3 MEF.

Für jeden Einsatz wurden  $1 \times 10^4$  Zellen der Passage 28 in 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden 14 Tage lang mit 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  CSB inkubiert. Als Kontrolle diente Medium ohne CSB. Nach 14 Tagen wurden die lebenden Zellen von je zwei Zellkulturschalen gefärbt (a) und mit der Neubauer-Zellkammer gezählt, um die Gesamtzahl von immortalen Zellen pro Schale zu bestimmen. Im Balkendiagramm (b) sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen und den P-Werten dargestellt.

Ähnliche Tendenzen wurden in Migration-Studien mit immortalen Zellen festgestellt (Abb. 12). Zellmigration gehört zu einer fundamentalen Eigenschaft, die während der embryonalen Entwicklung, bei der Wundheilung und bei der Krebspathogenese eine wichtige Rolle spielt. Durch die Analyse der radialen Verbreitung ist es möglich, die Zellmigration-Antwort auf verschiedene lösliche Substanzen oder die Migrationsveränderungen bei verschiedenen Konzentrationen derselben Substanz zu untersuchen.

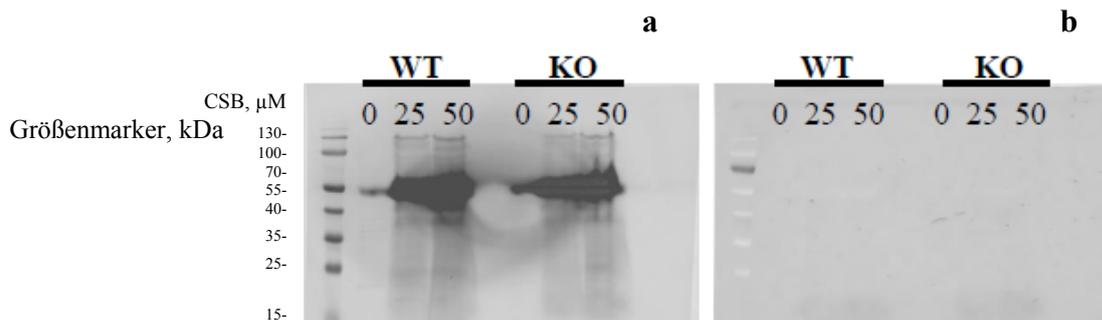
Wie in Abb. 12 zu sehen ist, verlangsamt CSB eine Ausbreitung von KO Zellen wesentlich im Vergleich zu WT Fibroblasten. So wanderten die KO Zellen in Gegenwart von 25  $\mu\text{M}$  CSB durchschnittlich um 200  $\mu\text{m}/\text{Tag}$  und bei 50  $\mu\text{M}$  um etwa 100  $\mu\text{m}/\text{Tag}$  langsamer als die WT Zellen (Abb. 12b).



**Abbildung 12.** Einfluss von CSB auf die radiale Zellmigration von 3T3 KO MEF im Vergleich zu WT MEF.

$1 \times 10^4$  Zellen der Passage 28 (3T3 MEF) je 50  $\mu$ l wurden in eine 6-Loch-Platte pipettiert. Nach einer 14-tägigen Inkubation mit CSB wurden die Zellen mit 0,1 % Kristallviolett-Lösung angefärbt (a). Die Größe der Flecken wurde vermessen und die Migration der Zellen [ $\mu$ m/Tag] berechnet. In Balkendiagramm (b) sind die Mittelwerte der Migrationsrate von drei unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen und den P-Werten dargestellt.

Um die Ursache für das unterschiedliche Proliferationsverhalten zwischen KO und WT festzustellen, wurden die mit CSB behandelten Zellen mittels Western Blot analysiert. Das CSB besitzt eine tief blaue Farbe und verfärbt die Zellen bereits nach einer 24-stündigen Behandlung.



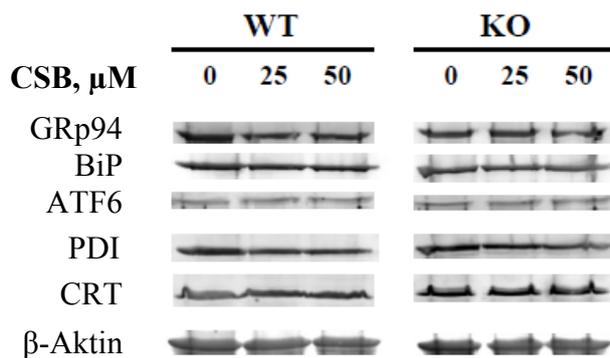
**Abbildung 13.** CSB hat Eigenfluoreszenz bei Ex/Em 650/670 nm.

Die Bilder von Nitrocellulose-Membranen nach dem Transfer der behandelten mit CSB (0, 25 und 50  $\mu$ M) Zellen wurden mit Hilfe des Typhoon TRIO-Scanners bei zwei verschiedenen Ex/Em aufgenommen: Im Cy5-Kanal (Ex/Em 650/670 nm) ergibt das CSB ein intensives Fluoreszenzsignal bei etwa 55 kDa (a). Im Cy3-Kanal (Ex/Em 549/570 nm) konnten keine Signale festgestellt werden (b).

Hierbei wanderte das CSB im SDS-Gel als ein Bestandteil des Zelllysats und war auch nach dem Transfer auf die Nitrocellulose-Membran aufgrund der blauen Färbung bei 55 kDa zu

sehen. Eine Detektion mit Hilfe des Typhoon TRIO-Scanners zeigte, dass CSB eine Eigenfluoreszenz bei Ex/Em 650/670 nm aufweist (Abb. 13a). Daher wurden für die Färbung von Proteinen sekundäre Cy3-gekoppelte Antikörper (Ex/Em 549/570 nm) verwendet, da das CSB in diesem Fluoreszenzkanal keine Signale ergab (Abb. 13b), somit also keine Überlappung der Fluoreszenzspektren vorlag.

Mittels Western Blot wurde eine Reihe der ER-Stress-Proteine analysiert, die an der ER-Qualitätskontrolle (BiP, GRp94, PDI, CRT), an der redox-Homeostase und an der Antwort auf oxidativen Stress (BiP, ATF6) beteiligt sind (Abb. 14).



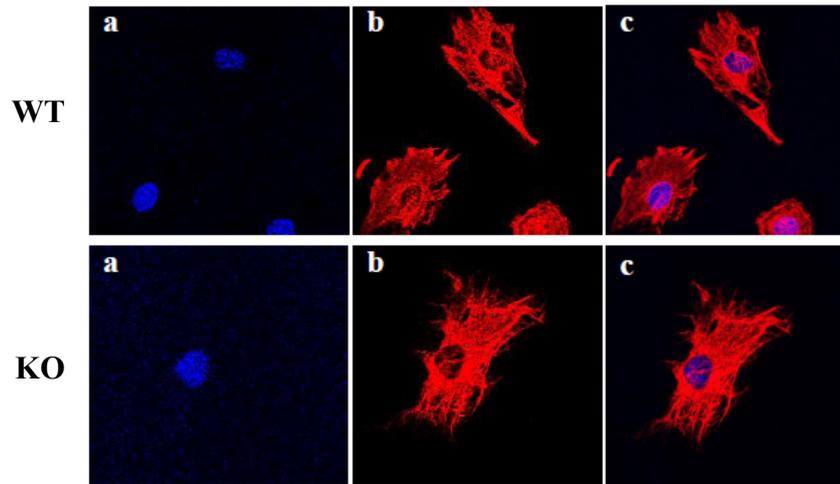
**Abbildung 14.** Western Blot-Analyse einiger ER-Stress-Proteine.

Die Zellen wurden mit 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  CSB behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und im Lysepuffer resuspendiert. 20  $\mu\text{g}$  Protein pro Geltasche wurden auf ein 10 – 14 %-iges SDS Gel aufgetragen. Gezeigt sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die 24-stündige Behandlung mit CSB ergab keine Veränderungen der Expression dieser ER-Proteine im Vergleich zur Kontrolle. Hierbei ist eine Analyse nach einem Vielfachen der Inkubationszeit erforderlich. Allerdings war die Western Blot-Analyse in diesem Fall erschwert. Infolge längerer Inkubationszeiten und der damit einhergehenden steigenden Konzentration durch kumulative CSB-Absorption war die Zelllyse nicht mehr möglich.

### 5.1.3 Charakterisierung der embryonalen Fibroblasten mittels Fluoreszenzmikroskopie

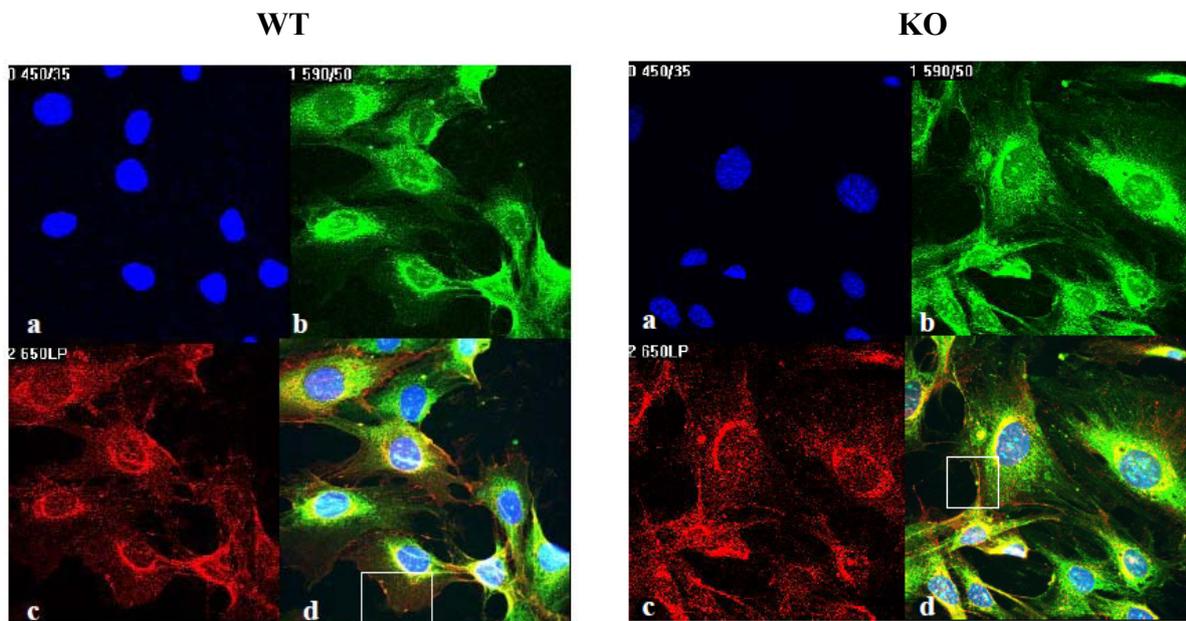
Für die morphologische Charakterisierung der embryonalen Fibroblasten wurde das Zytoskelett mit anti-Vimentin-Antikörpern angefärbt. Vimentin ist ein formgebendes Mikrofilament in Zellen, das außerdem eine wichtige Rolle bei der Krebspathogenese spielt (siehe 1.1.3).



**Abbildung 15.** Morphologie der 3T3 Fibroblasten.

Immortale Zellen wurden mit Aceton/Methanol (1:1) fixiert und anschließend doppelt gefärbt: **(a)** Zellkern - blau (HOECHST33342) und **(b)** Vimentin – rot (Cy3); **(c)** – Überlagerung der beiden Färbungen. 400x Vergrößerung.

Im Zytoplasma embryonaler Fibroblasten ist ein Netzwerk der Vimentinfilamente erkennbar (Abb. 15). Die Zellen haben eine typische Form, die durch mehrere Ausläufer ausgeprägt ist. Dabei sind keine Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Vimentin-Verteilung oder Farbintensität zu erkennen.



**Abbildung 16:** Connexin 43-Verteilung in 3T3 Fibroblasten.

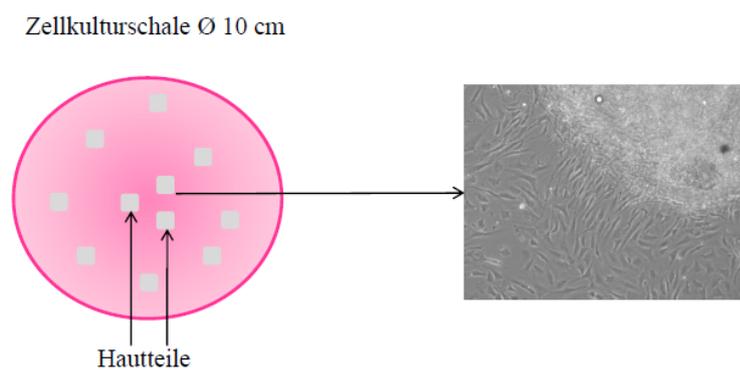
Immortale Zellen wurden mit Aceton/Methanol (1:1) fixiert und anschließend gefärbt: **(a)** Zellkern - blau (HOECHST33342), **(b)** endoplasmatisches Retikulum - grün (ER-stain); **(c)** Cx43 – rot (Cy3); **(d)** – Überlagerung der drei Färbungen. Punktförmige Ansammlungen von Cx43 an der Zellmembran sind Cx43-Oligomere (weiß eingerahmt). 400x Vergrößerung.

Laut Untersuchungen von Das et al. (2009) ist das ERp29 an der Stabilisierung des monomeren Connexin43 (Cx43) und seinem Transport aus dem ER beteiligt. Oligomerisiertes Cx43 bildet *gap junctions* in der Zellmembran, die bei der interzellulären Kommunikation und bei der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielen (Söhl and Willecke, 2004). Daraufhin wurden embryonale KO Fibroblasten mit anti-Cx43-Antikörpern angefärbt. Als Kontrolle wurden embryonale WT Fibroblasten von Geschwister-Embryonen verwendet. Zeitgleich wurde eine ER-Färbung durchgeführt.

Durch Überlagerung des roten (Cx43-Färbung) und des grünen Kanals (ER-Färbung) ist die Cx43-Verteilung im ER der Zellen erkennbar (Abb. 16d). Anhand dieser Färbung konnten keine Genotyp-relevante Unterschiede in der Cx43-Verteilung im ER festgestellt werden. An der Oberfläche der Zellen sind unabhängig vom Genotyp punktförmige Cx43-Ansammlungen (weiß eingerahmt) zu sehen, die vermutlich den Cx43-Oligomeren zuzuordnen sind (Abb. 16d).

#### 5.1.4 Präparation der dermalen Fibroblasten und ihre Charakterisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Der gesamte Ablauf der Zellpräparation ist in Abb. 17 dargestellt. Die Hautfragmente wurden auf einer Zellkulturschale platziert und mit DMEM / 10% FCS überschichtet. Nach zwei bis drei Tagen fangen die Zellen an, aus der Haut in die Schale zu wandern. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Hautfragmente entfernt und die Zellen standardmäßig in andere Zellkulturschalen umgesetzt (siehe 4.2.5).

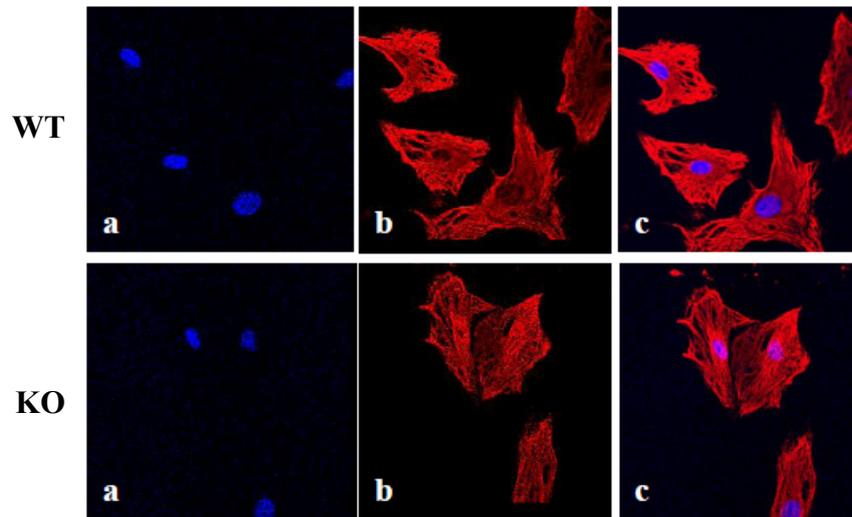


**Abbildung 17.** Präparation von adulten dermalen Fibroblasten aus muriner Haut.

Links ist die schematische Darstellung des Versuchsaufbaus, rechts ist der Rand eines Hautfragments mit ausgewanderten Fibroblasten unter dem Mikroskop zu sehen. 200x Vergrößerung.

Erst nach drei Passagen erreichten die Zellen die erforderliche Zelldichte und konnten für die Versuche eingesetzt werden. Auf eine längere Kultivierung musste verzichtet werden, weil die Zellen abzusterben begannen. Zwar stellte sich die vierte Passage als optimale für die Versuche dar, jedoch war die Zellzahl sehr gering (etwa  $2 \times 10^5$ ). Dies führte dazu, dass für

jeden Versuch ein Zugriff auf die Ursprungsquelle erforderlich war, die Präparation also erneut mit neuen Gewebeproben erfolgen mußte.

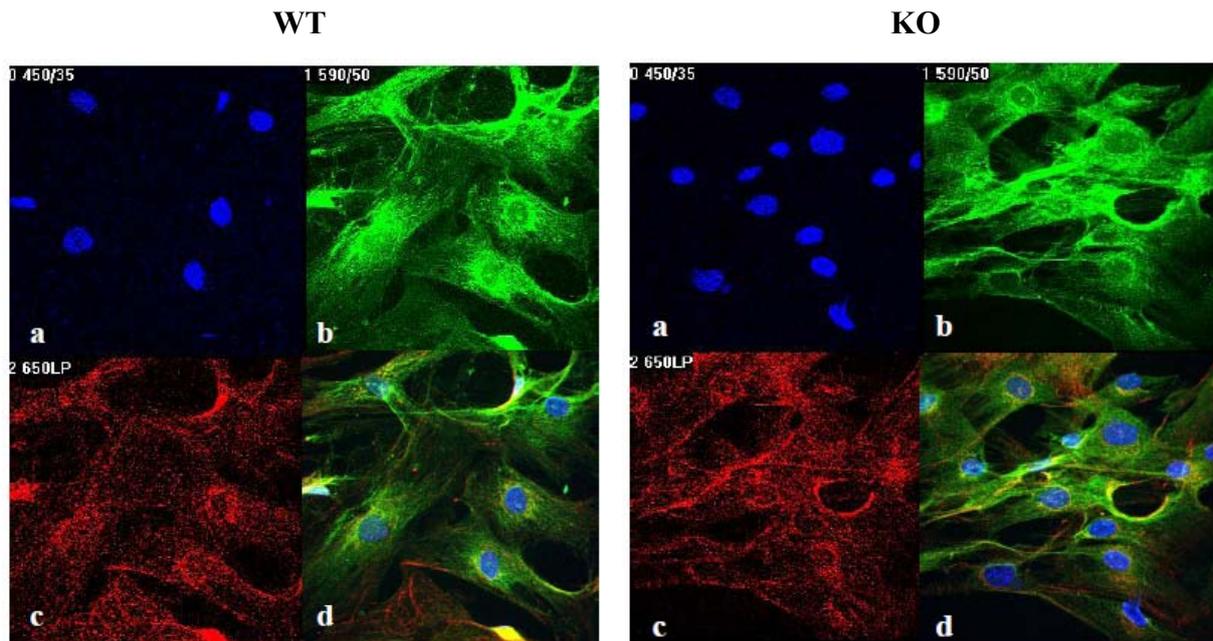


**Abbildung 18.** Morphologie der murinen dermalen Fibroblasten.

Immortale Zellen wurden mit Aceton / Methanol (1 : 1) fixiert und anschließend doppelt gefärbt: **(a)** Zellkern – blau (HOECHST33342) und **(b)** Vimentin – rot (Cy3); **(c)** – Überlagerung der beiden Färbungen. 400x Vergrößerung.

Ähnlich wie die embryonalen Fibroblasten haben auch dermale Fibroblasten einen mesenchymalen Ursprung. Das Zytoskelet dieser Zellen wird zum Großteil aus Vimentinfilamenten gebildet (Abb. 18). Sie haben eine typische Form, die durch mehrere Ausläufer geprägt ist. Im Zytoplasma dieser Zellen ist sowohl bei WT als auch bei KO ein Netzwerk der Vimentinfilamente erkennbar. Dabei sind keine Genotyp-relevanten Unterschiede in der Vimentin-Verteilung oder der Farbintensität zu erkennen.

Da Cx43 an der Zellmigration und an der Wundheilung beteiligt ist (Solan and Lampe, 2009), wurde seine Verteilung auch in dermalen Fibroblasten untersucht. Ähnlich wie bei embryonalen Fibroblasten (siehe 5.1.3) konnten auch in diesen adulten Zellen keine Genotyp-relevanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 19). Unabhängig vom Genotyp zeigten die Zellen eine gleichmäßige Cx43-Verteilung im ER. Die intensive Färbung entlang der Membran dieser Zellen könnte auf eine Ansammlung der Cx43-Oligomere hindeuten.



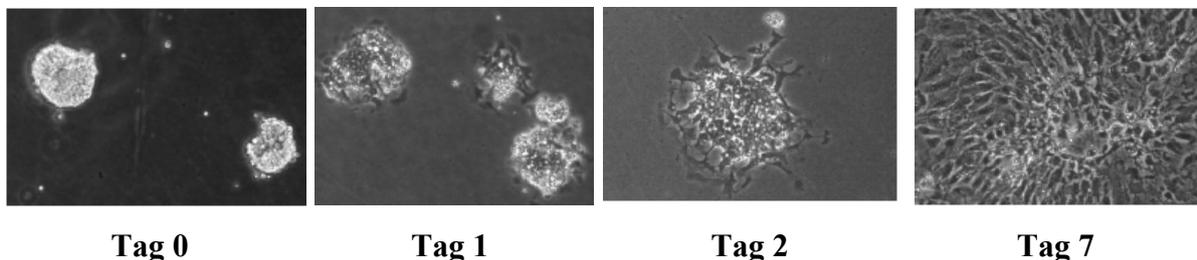
**Abbildung 19.** Connexin43-Verteilung in murinen dermalen Fibroblasten.

Die Zellen wurden mit Aceton / Methanol (1 : 1) fixiert und anschließend gefärbt: **(a)** Zellkern – blau (HOECHST33342), **(b)** endoplasmatisches Retikulum – grün (ER stain); **(c)** Connexin 43 – rot (Cy3); **(d)** – Überlagerung der drei Färbungen. 400x Vergrößerung.

### 5.1.5 Präparation von Thyrozyten

In einigen aktuellen Studien mit ERp29 Knockdown Zellen wurde dem ERp29 eine Chaperonen-Aktivität und Eskort-Funktion in sekretorischen Vorgängen zugeschrieben (siehe 1.1.2). Zur Untersuchung dieser Funktionen wurden adulten Thyrozyten als ein geeignetes Modell ausgewählt.

Thyrozyten sind sekretorische Follikelepithelzellen der Schilddrüse. Die primäre Zellkultur aus murinen Thyrozyten wurde nach dem Protokoll von Jeker et al. (1999) etabliert.



**Abbildung 20.** Thyrozyten wachsen in der Zellkultur als Bestandteil der Follikel.

**Tag 0:** Nach der Isolierung wurden die Follikel im Medium resuspendiert, setzten sich auf dem Plattenboden ab und wurden adhärent; **Tag 1:** Follikel wurden flacher und fingen an, sich auszubreiten; **Tag 2:** Follikel verloren ihre dreidimensionale Form, wuchsen aber dennoch als mehrschichtige Zellkultur weiter; **Tag 7:** Nach einer Woche wurde die Zellkultur zu etwa 80 % konfluent und war versuchstauglich. 200x Vergrößerung.

Adulte Thyreozyten wurden aus murinen Schilddrüsen präpariert und als ein Bestandteil der Follikel in der Zellkultur kultiviert (Abb. 20). Schilddrüsenfollikel sind mikroskopisch kleine Bläschen. Der Innenraum dieser Follikel hat einen kolloidalen Inhalt und dient als Speicher für Proteine, die aus umliegenden Thyreozyten exportiert werden. KO Follikel wiesen keine äußerliche Unterschiede zu WT Follikel auf. Auch während der Kultivierung konnten keine Auffälligkeiten bezüglich der Vitalität oder des Wachstums der ERp29-defizienten Follikel festgestellt werden.

Nur als Teil der Follikel sind die Thyreozyten zur Thyreoglobulin-Synthese fähig. Dies erschwert zum Teil die experimentelle Arbeit mit diesen Zellen, weil die gängigen Methoden für Zellsuspensionen, wie z.B. FACS, in diesem Fall nicht anwendbar sind. Die Auswahl an Methoden beschränkt sich daher auf die Analysen, die mit Zelllysate durchgeführt werden können.

## **5.2 Untersuchung der Antwort auf oxidativen Stress in embryonalen und adulten ERp29-defizienten Zellen**

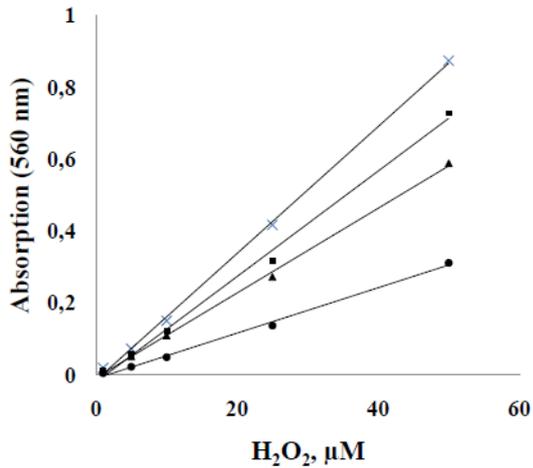
Oxidativer Stress spielt eine große Rolle bei mehreren zellulären Prozessen. Als Signalträger dienen dabei ROS (*reactive oxygen species*), die sowohl in kleinen Mengen an der Stressantwort und regulatorischen Mechanismen beteiligt sind, als auch in großen Konzentrationen eine schädliche Wirkung in der Zelle erzielen.

Zur Untersuchung wurden drei oxidierende Substanzen verwendet: Wasserstoffperoxid, Diamid und Menadion. Die Auswahl der Stoffe basierte dabei auf ihren oxidierenden Eigenschaften in der Zelle, die zur Bildung von ROS fähig sind.

### **5.2.1 Konzentrationsbestimmung von Wasserstoffperoxid im Medium mittels *ferrous oxidation - xylenol orange (FOX)*-Analyse**

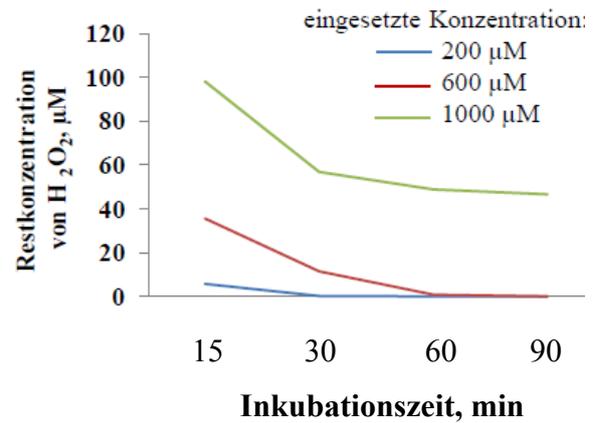
Die Zugabe der Wasserstoffperoxid-Lösung zu den Zellen ist ein kritischer Punkt während der Behandlung. Aufgrund der hohen Reaktivität wird  $H_2O_2$  im serumhaltigen Medium schnell zersetzt. Deshalb war es notwendig festzustellen, in wiefern sich die eingesetzte Wasserstoffperoxid-Konzentration von der vorhandenen im Medium unterscheidet. Außerdem spielte die zeitliche Konzentrationsänderung als Kontrolle für den gleichwertigen Stress zwischen verschiedenen Experimenten eine wichtige Rolle.

Diese Veränderungen wurden mittels der spezifischen und sensitiven FOX-Methode analysiert (Gay et al., 2003). Dabei bildet  $H_2O_2$  mit Xylenolorange farbige Komplexe, die bei 560 nm absorbieren.



**Abbildung 21.** Eichgeraden von Xylenolorange-Farbkomplexen erzeugt durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  in verschiedenen Medien.

(x)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Wasser ( $y=0,0176x-0,0144$ ); (■)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in DMEM ( $y=0,0146x-0,0193$ ); (▲)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in DMEM mit Phenolrot ( $y=0,0118x-0,0079$ ); (●)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in DMEM mit Phenolrot und mit 10 % FCS ( $y=0,0063x-0,0102$ ).



**Abbildung 22.** Verlauf der Konzentrationsveränderung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in DMEM mit Phenolrot und mit 10 % FCS.

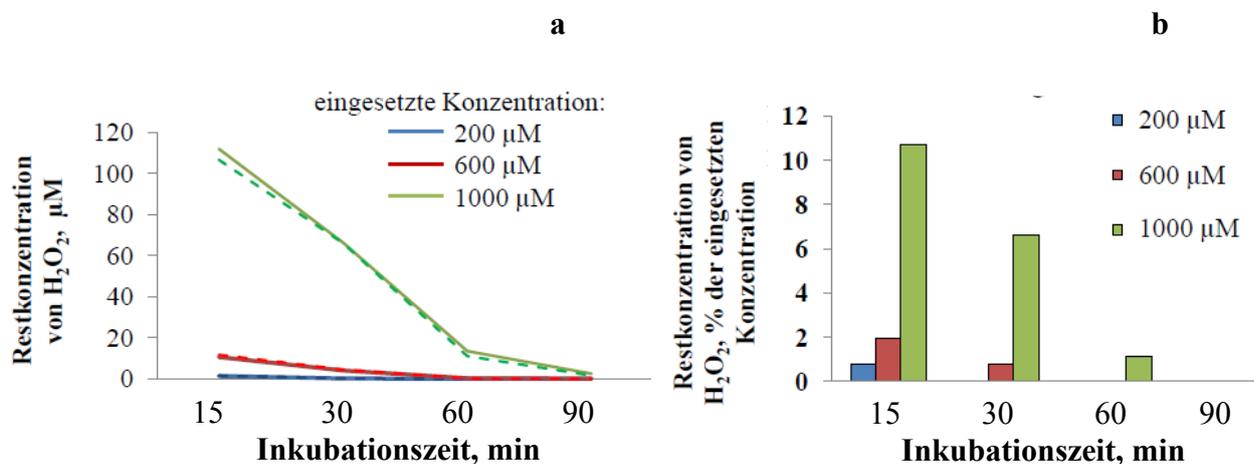
Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eingesetzt und deren Restkonzentrationen im serumhaltigen Medium nach mehreren Inkubationszeiten analysiert.

Im Bereich von  $5 \mu\text{M}$  bis  $60 \mu\text{M}$  steigt die Absorption des Xylenolorange-Komplexes direkt proportional zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in Wasser (Abb. 21). Dieser lineare Bereich wurde für weitere Titrationsversuche verwendet, um den Einfluss verschiedener Medium-Komponenten auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zersetzung zu untersuchen. Weitere Analysen zeigten, dass bereits DMEM ohne zusätzliche Komponenten eine Veränderung der Absorption hervorruft. Eine niedrigere Absorption könnte durch die im Medium vorhandenen Bestandteile, wie Salze und Glukose, verursacht werden. Diese Absorption wurde weiter durch die Zugabe des Indikators Phenolrot verringert. Eine wesentliche Reduzierung der Absorption zeigte sich jedoch bei der Zugabe von 10 % FCS zum Medium. Hierbei sanken die Absorptionswerte bei allen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen, was auf dessen Zersetzung durch das FCS hindeutet.

Für die Studie des zeitlichen Ablaufs der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zersetzung im serumhaltigen Medium wurden drei Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200 \mu\text{M}$ ,  $600 \mu\text{M}$  und  $1000 \mu\text{M}$ ) verwendet, die auch für die FACS-Analyse eingesetzt wurden. Diese  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösungen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und in bestimmten Zeitabständen wurde die Restkonzentration analysiert (Abb. 22). Damit die Absorptionswerte im linearen Bereich ( $0,2 - 0,8$ ) bleiben, wurden verdünnten Proben gemessen und die daraus errechneten Konzentrationen entsprechend ihrem Verdünnungsfaktor multipliziert: 1 : 1000, 1 : 500, 1 : 100, 1 : 1, ohne Verdünnung.

Wie in Abb. 23 zu sehen ist, werden niedrigere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen unter diesen Bedingungen sehr schnell zersetzt. Bereits nach 15 min Inkubationszeit verblieben von 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nur 10  $\mu\text{M}$ , nach 30 min war hier kein Wasserstoffperoxid mehr detektierbar. 600  $\mu\text{M}$  zersetzten sich nach einer 60-minütigen Inkubation, während von 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte nach 90 min noch etwa 50  $\mu\text{M}$  detektiert werden konnten.

Da die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zersetzung stark von mehreren Faktoren abhängt (Zelldichte, Zellvitalität, Verdünnungsschema der Stock-Lösung), diente die FOX-Analyse in Stress-Studien als zusätzliche Kontrolle zwischen verschiedenen Experimenten. Diese Untersuchung zeigte, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Medium mit embryonalen Fibroblasten schneller zerstört wurde, als im zellfreien Medium (Abb. 23a). Es konnten aber keine Genotyp-relevanten Unterschiede festgestellt werden.

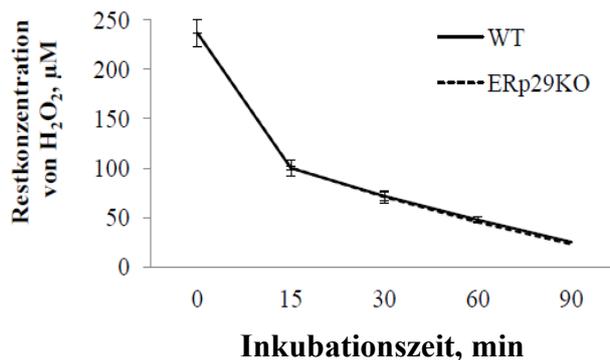


**Abbildung 23.** Zeitliche Veränderung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in Medium mit embryonalen Fibroblasten.

MEF wurden in DMEM mit Phenolrot und mit 10 % FCS kultiviert und in diesem Medium mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eingesezt und deren Restkonzentration in Serumhaltigen Medium bei mehreren Inkubationszeiten analysiert. Der Verlauf der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zersetzung im Medium der WT Zellen ist mit durchgezogenen Linien, im Medium der KO Zellen mit gestrichelten Linien dargestellt. Die Farbe jeder Linie entspricht der eingesezten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (a). Im Diagramm (b) sind die absolute  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Restkonzentrationen als der %-Anteil zur eingesezten Konzentration abgebildet.

Im Medium beider Zelltypen waren 200  $\mu\text{M}$  und 600  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid bereits nach 15 min kaum noch detektierbar (entsprechend 1 % und 2 %). 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zersetzten sich nach 60 min Inkubationszeit (1 % Restkonzentration), während in Medium ohne Zellen unter gleichen Bedingungen auch nach 90 min 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (etwa 5 %) detektiert werden konnten (Abb. 23b).

Auf die gleiche Art und Weise wurde auch die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zersetzung in Medium mit adulten dermalen Fibroblasten kontrolliert. Wegen der begrenzter Verfügbarkeit dieser Zellen wurde für den Stress-Versuch nur eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (1 mM) eingesetzt, die dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert für embryonale Fibroblaste entspricht (siehe 5.2.2). Für die Analyse wurden dermale Fibroblasten sowohl von jungen (drei Monate alt), als auch von alten (zwölf Monate alt) Mäusen verwendet. Da das Alter der Zellen keinen Einfluss auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zersetzung zeigte, sind hier nur Ergebnisse für dermale Fibroblasten von jungen Mäusen dargestellt (Abb. 24).

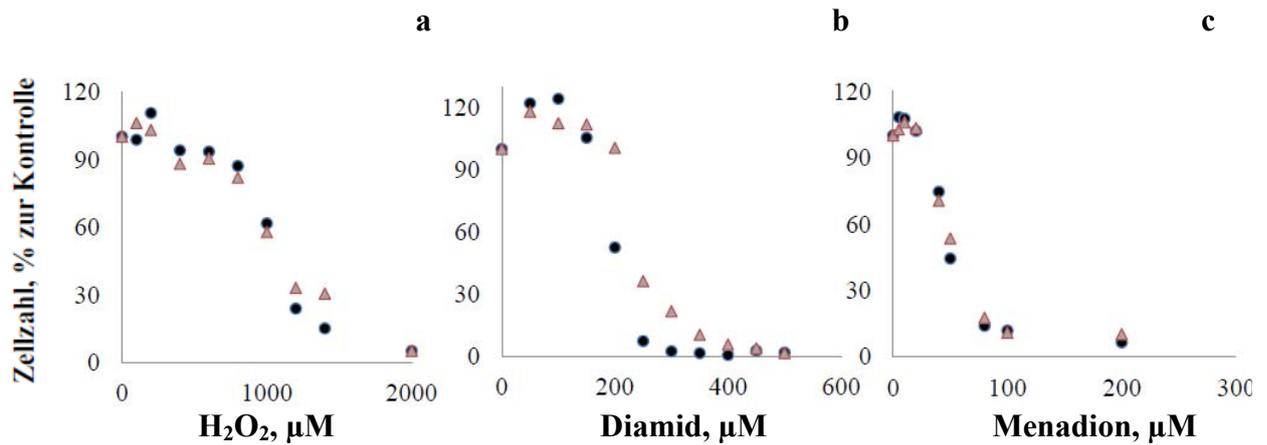


**Abbildung 24.** Zeitliche Veränderung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Medium mit dermalen Fibroblasten aus jungen Mäusen. Dermale Fibroblasten wurden mit 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in DMEM mit 10 % FCS behandelt. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Restkonzentration im Medium wurde gegen die entsprechende Inkubationszeit aufgetragen.

Auch im Medium mit dermalen Fibroblasten konnten keine Genotyp-relevanten Unterschiede festgestellt werden. Bemerkenswert ist aber, dass die Zersetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Medium adulter Zellen nicht so schnell verlief, wie bei embryonalen Fibroblasten (Abb. 23). In diesem Versuch blieb auch nach 90 min Inkubationszeit noch eine geringe Menge von Wasserstoffperoxid im Medium (etwa 20  $\mu\text{M}$ ), jedoch war sie wesentlich niedriger, als im Medium ohne Zellen nach derselben Inkubationszeit (etwa 50  $\mu\text{M}$ ).

### 5.2.2 Untersuchung der Antwort auf oxidativen Stress in embryonalen Fibroblasten

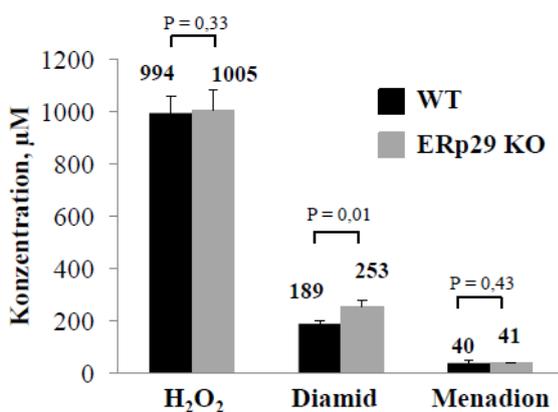
Für die Analyse der Schadensantwort wurden embryonale 3T3 Zellen sechs Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid, Menadion und Diamid behandelt. Der %-Anteil an vitalen Zellen nach der Behandlung wurde gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Daraus wurde für jede Substanz eine Toxizitätskurve erstellt (Abb. 25).



**Abbildung 25.** Vergleich der Schadensantwort von 3T3 KO und 3T3 WT Zellen nach der Behandlung mit oxidativen Substanzen.

WT (●) und KO (Δ) Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a), Diamid (b) und Menadion (c) in einer 96-Loch Platte behandelt. Nach sechs Stunden wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und mit 0,02 % Kristallviolett-Lösung gefärbt. Eine Veränderung der Zellzahl konnte anhand der Farbintensität im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) bestimmt werden. Der prozentuale Anteil lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. WT: n = 5, KO: n = 5.

Anhand der Toxizitätskurven wurde für jede Substanz ein IC<sub>50</sub>-Wert berechnet (Abb. 26). Die Auswertung zeigte, dass die KO MEF die gleiche Sensitivität wie die WT Zellen für die Wasserstoffperoxid- und Menadion-Behandlung haben. Hierbei wurde die größte Resistenz gegen die Wasserstoffperoxid-Behandlung (IC<sub>50</sub> ≈ 1000 µM) festgestellt. Der größte Schadensgrad ergab die Behandlung mit Menadion. Der IC<sub>50</sub>-Wert betrug in diesem Fall etwa 40 µM.

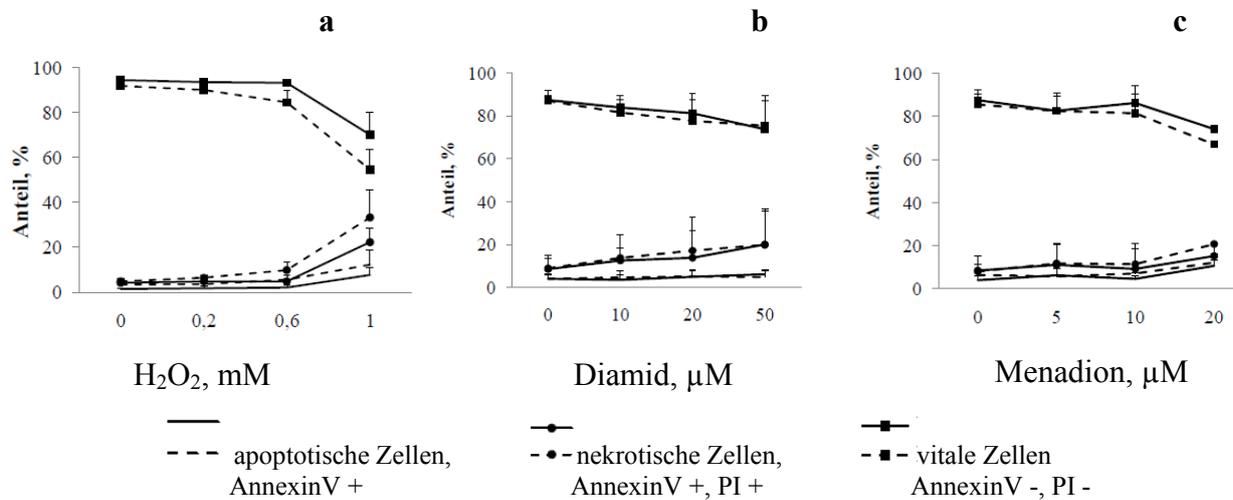


**Abbildung 26.** IC<sub>50</sub>-Werte für verschiedene oxidative Substanzen.

Die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte [µM] wurde mittels Regression "Vier Parameter logistischer Plot" (Dulfa and Christensen, 2007) durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten mit jeder Substanz und der jeweiligen Standardabweichung und P-Werten dargestellt.

Ein Genotyp-relevanter Unterschied wurde nach der Diamid-Behandlung festgestellt. Hierbei zeigten sich die KO Zellen (IC<sub>50</sub> = 259 µM) als weniger empfindlich im Vergleich zu WT Zellen (IC<sub>50</sub> = 189 µM).

Da bei Toxizitätsstudien nur vitale Zellen berücksichtigt werden, wurden zusätzlich FACS-Messungen durchgeführt. Dadurch ist es möglich, drei Zellpopulationen getrennt zu messen: Apoptotische, nekrotische und vitale Zellen (Abb. 27, Anhang 1).



**Abbildung 27.** Analyse des Zelltodes mittels FACS-Messung. WT (durchgezogene Linie) und KO (gepunktete Linie) Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a), Diamid (b) und Menadion (c) behandelt. Der %-Anteil apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen wurde gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. WT: n = 3, KO: n = 3.

Auffallend ist dabei, dass die Zellen unabhängig von der Substanz oder ihrer Konzentration keine wesentliche Veränderung in der Apoptose zeigten. Als Reaktion auf die zunehmende Konzentration wurde eine Zunahme der nekrotischen Zellpopulation gemessen. Diese Analyse zeigte jedoch keine Genotyp-relevanten Unterschiede sowohl in der Apoptose, als auch in der Nekrose (Abb. 27).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von ERp29 bei MEF keine statistisch signifikanten Anomalien bei der Antwort auf den kurzzeitigen oxidativen Stress verursacht.

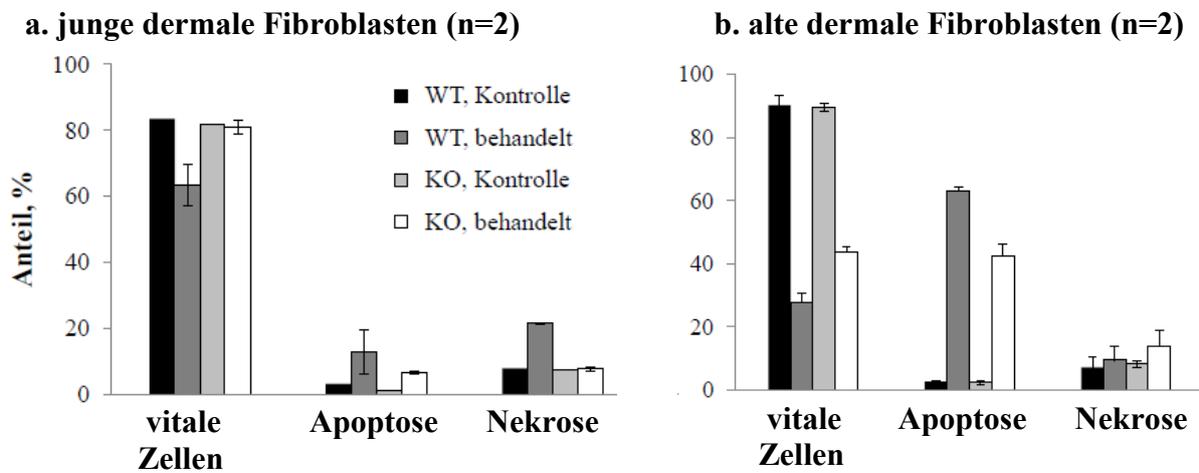
## 5.2.3 Untersuchung der Antwort auf oxidativen Stress in dermalen Fibroblasten

### 5.2.3.1 FACS-Analyse

Im Gegensatz zu embryonalen Fibroblasten besitzen dermale Fibroblasten kein unbegrenztes Teilungspotential und entsprechen dadurch den Eigenschaften des Ursprungsgewebes.

Für die Studien der Stressantwort auf oxidativen Stress wurden die Zellen für sechs Stunden mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Wie bereits festgestellt wurde, entspricht diese Konzentration dem IC<sub>50</sub>-Wert bei embryonalen Fibroblasten (siehe 5.2.2). Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin von der Platte abgelöst. Danach wurde die

Zellsuspension mit Annexin V-FITC / Propidiumiodid gefärbt und mittels FACS analysiert (Anhang 2).



**Abbildung 28.** Antwort auf oxidativen Stress durch die Behandlung mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in dermalen Fibroblasten.

Graphische Darstellung der FACS-Messdaten für junge (a) und alte (b) dermale Fibroblasten. In den Graphen sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen für drei verschiedene Zellpopulationen (vital, apoptotisch, nekrotisch) dargestellt.

Für die Stress-Studien wurden dermale Fibroblasten aus Haut junger (drei Monate alt, n = 2) (Abb. 28a) und alter Mäuse (zwölf Monate alt, n = 2) (Abb. 28b) verwendet. Da die Präparation und Kultivierung von primären Zellen mit einem großen technischen Aufwand, sowie mit einer großen Anzahl der Tiere verbunden sind, wird diese n-Zahl in der wissenschaftlichen Literatur als eine verlässliche Anzahl der Messungen (bzw. Proben) für so eine hoch sensitive Methode wie Durchflusszytometrie akzeptiert (Rayner et al., 2009).

Mittels FACS-Analyse konnten deutliche Genotyp-relevante Unterschiede mit einer hohen statistischen Signifikanz nachgewiesen werden. Generell überlebten KO Fibroblasten den oxidativen Stress besser als WT Zellen. So wurden bei jungen KO Fibroblasten weniger apoptotischen und weniger nekrotische Zellen im Vergleich zu WT Zellen gemessen. Die Vitalität der KO Zellen nach der Behandlung war etwa gleich zu der in der Kontrolle, während sich die Population vitaler WT Zellen nach der Behandlung um etwa 20 % verringerte (Abb. 28a).

Die alten dermalen Fibroblasten waren mehr für den oxidativen Stress anfällig. Unter gleichen Stressbedingungen konnte ein wesentlich höherer Anteil apoptotischer Zellen bei alten Fibroblasten (50 - 70 %) in Vergleich zu jungen Zellen (10 - 20 %) festgestellt werden. Demzufolge war die Population vitaler Zellen im Vergleich zu jungen Fibroblasten zwar

kleiner, die Unterschiede zwischen KO und WT blieben jedoch gleich – etwa 20 % zum Vorteil der KO Fibroblasten.

### 5.2.3.2 Western Blot-Analyse

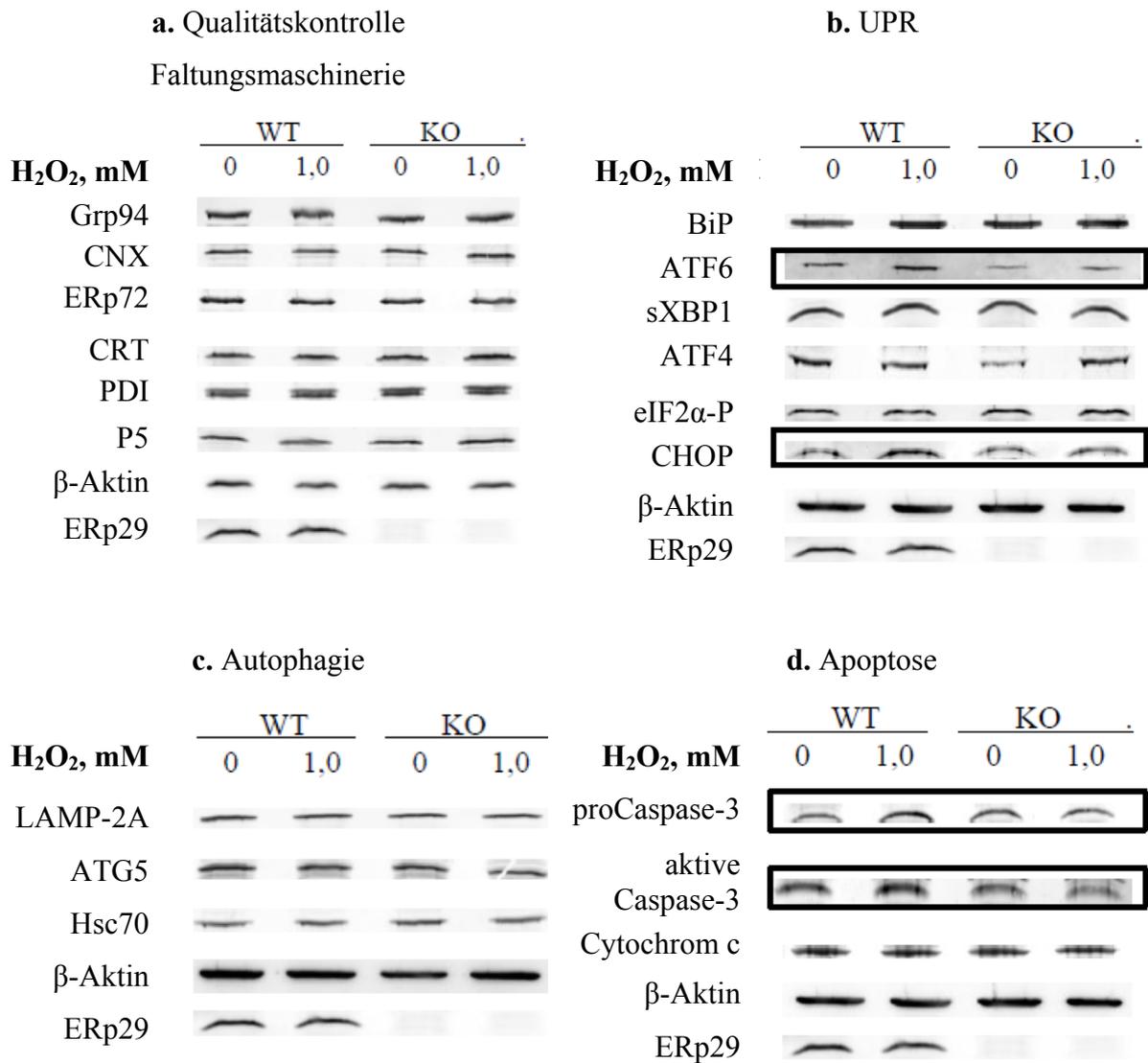
Um die Ursache für den unterschiedlichen Apoptose-Verlauf zwischen WT und KO Zellen festzustellen, wurden einige Elemente der Signalkaskaden in jungen dermalen Fibroblasten mittels Western Blot analysiert. Alte dermale Fibroblasten konnten für diesen Versuch aufgrund niedrigerer Vitalität während der Kultivierung und der daraus folgenden geringeren Zellzahl nicht verwendet werden.

Es ist bekannt, dass oxidativer Stress eine Akkumulierung von ungefalteten Proteinen verursacht und somit eine Stress-Antwort im ER (*unfolded protein response* – UPR) auslöst. In diesem Zusammenhang erfolgte eine Analyse der Expression einiger ER-Chaperone, die an der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle beteiligt sind: GRP94, ERp72, CNX, CRT, PDI und P5 (Abb. 29a). In ERp29-defizienten Zellen sowie in WT Zellen, konnten nach der Behandlung keine sichtbare Veränderungen der Expression dieser ER-Proteine festgestellt werden.

Bei der Analyse der UPR-Kaskade war eine geringe Genotyp-unabhängige Erhöhung der BiP-Expression um etwa 20 % zu sehen (Abb. 29b, 30). Aus der Literatur ist bekannt, dass selbst eine kleine BiP-Hochregulation ausreichend ist, um UPR einzuleiten (siehe 1.4).

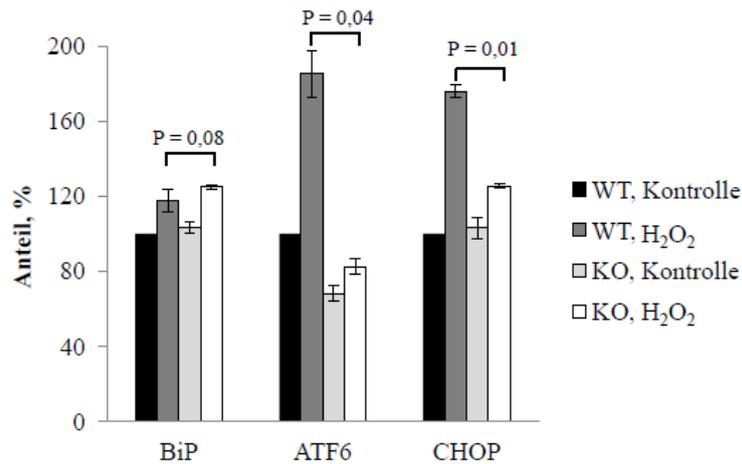
Die Western Blot-Analyse weiterer Proteine zeigte zudem unterschiedliche ATF6-Levels in ungestressten Zellen: um etwa 30 % weniger in KO Zellen (WT vs. KO  $P = 0,03$ ) (Abb. 30). Nach der  $H_2O_2$ -Behandlung fand die ATF6-Hochregulation um etwa 20 % in KO und um 80 % in WT Zellen statt. Somit war das ATF6-Gesamtlevel in gestressten KO Zellen um 90 % niedriger im Vergleich zu gestressten WT Zellen.

ER-Stress und Aktivierung der UPR ist in der Lage, die Autophagie zu aktivieren (siehe 1.6.3). Unsere Analyse zeigte aber keine Aktivierung dieser Signalkaskade sowohl in mutanten als auch in WT Zellen (Abb. 29c). Außerdem ist ATF6 für die Aktivierung und Hochregulation der aktiven Form von XBP1 (sXBP1) und CHOP zuständig (siehe 1.4). Das sXBP1 ist unter anderem für das Überleben der Zellen durch die Regulation von ERAD im ER verantwortlich. Durch die Western Blot-Analyse konnte jedoch keine sXBP1-Erhöhung als Folge des oxidativen Stresses in dermalen Fibroblasten festgestellt werden. Dies korreliert auch mit dem unveränderten Expressionslevel der ER-Proteine (Abb. 29a, 29b).



**Abbildung 29.** Vergleich der Schadensantwort in dermalen Fibroblasten nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid.

Die Zellen wurden 6 h mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in DMEM mit 10 % FCS behandelt. Gezeigt sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse verschiedener Signaltransduktionswege: Qualitätskontrolle und Faltungsmaschinerie (**a**), UPR (**b**), Autophagie (**c**) und Apoptose (**d**). β-Aktin diente als Ladekontrolle, ERp29 als Genotypkontrolle. Proteinbanden, die Genotyp-relevante Unterschiede der Expression zeigten, sind schwarz eingerahmt.



**Abbildung 30.** Densitometrische Analyse einiger UPR-Proteine nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung.

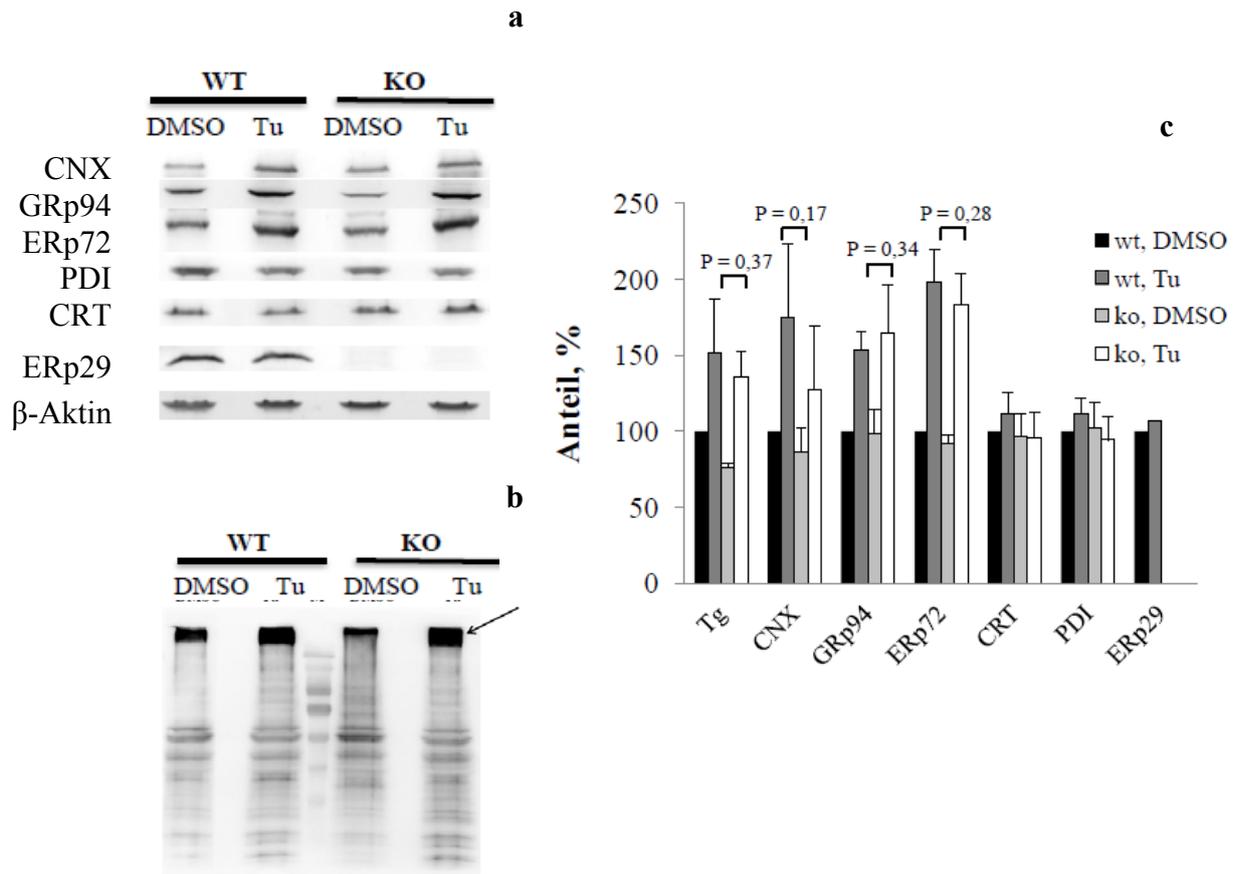
Die Balken repräsentieren Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen und P-Werten der densitometrischen Auswertung einiger UPR-Proteine, die bei der Western Blot-Analyse Genotyp-relevante Unterschiede zeigen. WT: n = 3; KO: n = 3.

Bemerkenswert ist allerdings, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung kaum eine CHOP-Aktivierung in KO Zellen induzierte, während in WT Zellen eine Hochexpression um etwa 60 % stattfand.

In diesem Zusammenhang wurden einige Mitglieder der Apoptose-Kaskade analysiert. Dadurch wurde in behandelten WT Zellen eine Hochregulation der proCaspase-3 und der aktiven Caspase-3 ermittelt, was auf ihre Aktivierung und auf die eingeleitete Apoptose hindeutet. In KO Zellen konnte hingegen kaum eine Caspase-3-Aktivierung festgestellt werden (Abb. 29d). Diese Daten korrelieren mit den FACS-Ergebnissen (siehe 5.2.3.1) und zeigen somit, dass die KO dermale Fibroblasten eine im Vergleich zu WT Zellen niedrigere Sensitivität für den oxidativen Stress haben.

### 5.3 Inhibierung der N-Glykosylierung von Thyreoglobulin mittels Tunicamycin-Behandlung

Thyreoglobulin (Tg) bildet einen Disulfid-verbundenen Komplex mit einem Molekulargewicht über 2000 kDa. Es enthält bis zu 60 intramolekulare Disulfid-Bindungen und 10 - 15 N-gebundenen Oligosacchariden pro Tg-Molekül. Die Blockierung der N-Glykosylierung führt zur Akkumulierung des Proteins im ER und, als Folge dessen, zum UPR. Um UPR auszulösen wurden Thyreozyten mit 1,5 µg/ml Tunicamycin für 18 h behandelt.



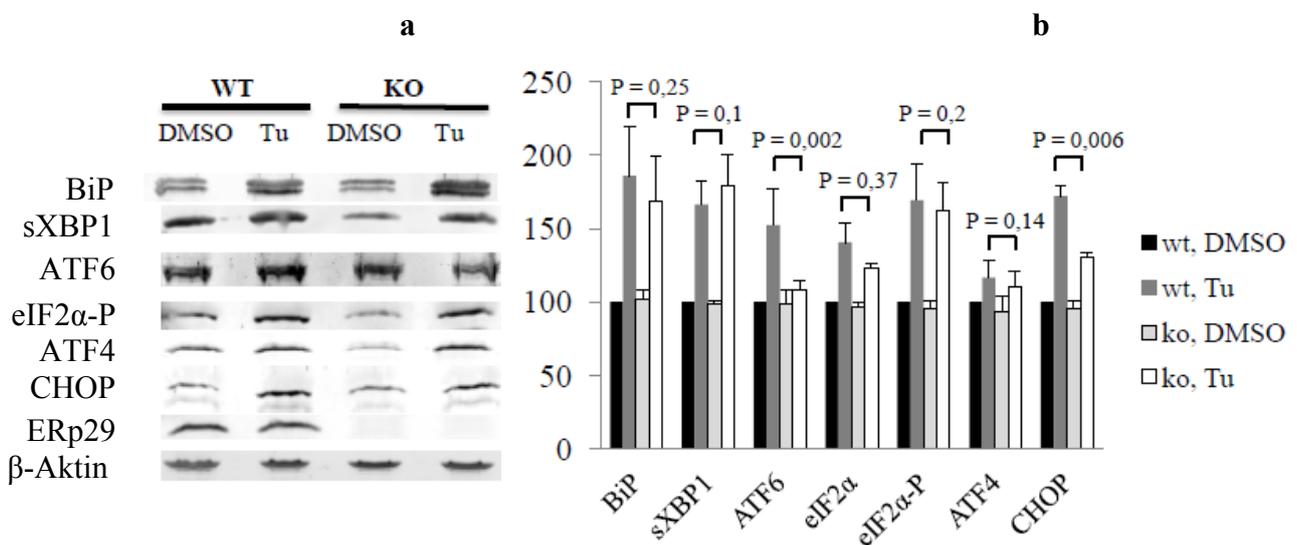
**Abbildung 31.** Vergleich der Expression einiger ER-Chaperone und des Thyreoglobulins in Thyreozyten nach der Tunicamycin-Behandlung.

Die Thyreozyten wurden für 18 h mit 1,5 µg/ml Tunicamycin (Tu) behandelt. Die Expression einiger ER-Chaperone (**a**) und des Tg (**b**) wurde mittels Western Blot analysiert. ERp29 diente als Genotyp-Kontrolle. Bei der densitometrischen Analyse wurden alle Proteinbanden auf β-Aktin normiert, das als Ladekontrolle diente (**c**). Für die Analyse der Tg-Expression wurden sowohl das volllänge Protein (mit einem Pfeil markiert), als auch seine Prozessierungsbanden verwendet (**b**). WT: n = 5; KO: n = 5.

Die Stressantwort wurde im Zelllysate mit Hilfe von Western Blot analysiert. Zuerst wurde das Expressionslevel von Chaperonen, die an der Faltung von Tg beteiligt sind, analysiert (Abb. 31). Die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung ermöglicht es, einen Überblick über die vorhandenen Unterschiede zu bekommen (Abb. 31c). Bereits nicht-behandelte KO Thyreozyten exprimierten in der Zellkultur etwa 20 % (WT vs. KO P = 0,03) weniger Tg im Vergleich zu WT Zellen (Abb. 31b, c). Die Inhibierung der N-Glykosylierung führte zur Akkumulierung des Tg in Zellen. Hierbei ergab eine Quantifizierung der Tg-Banden wesentliche Schwankungen in seiner Expression nach der Behandlung. Sein Expressionslevel stieg in behandelten WT und KO Zellen um etwa 50 - 70 % im Vergleich zur Kontrolle (DMSO-behandelte Zellen).

Im Allgemeinen gab es keine signifikanten Genotyp-relevanten Unterschiede in der Expression der ER-Chaperone während der UPR: Die Expressionslevel von GRp94 und CNX stiegen in den behandelten Zellen um 50 %, von ERp72 - sogar um 100 %. Keine Veränderung der Expression wurde für CRT, PDI und ERp29 (speziell in WT Zellen) festgestellt.

Analyse einiger Mitglieder der UPR-Kaskade zeigte eine etwa 70 %-ige Steigerung des BiP-Levels in beiden Zelltypen (Abb. 32). BiP dient als ein Marker für ER-Stress, weil es im Zusammenspiel mit Transmembranproteinen IRE1, ATF6 und PERK eine Stressantwort auf die ungefalteten Proteine (UPR) auslöst.



**Abbildung 32.** Vergleich der Expression einiger UPR-Proteine in Thyrozyten ausgelöst durch die Tunicamycin-Behandlung.

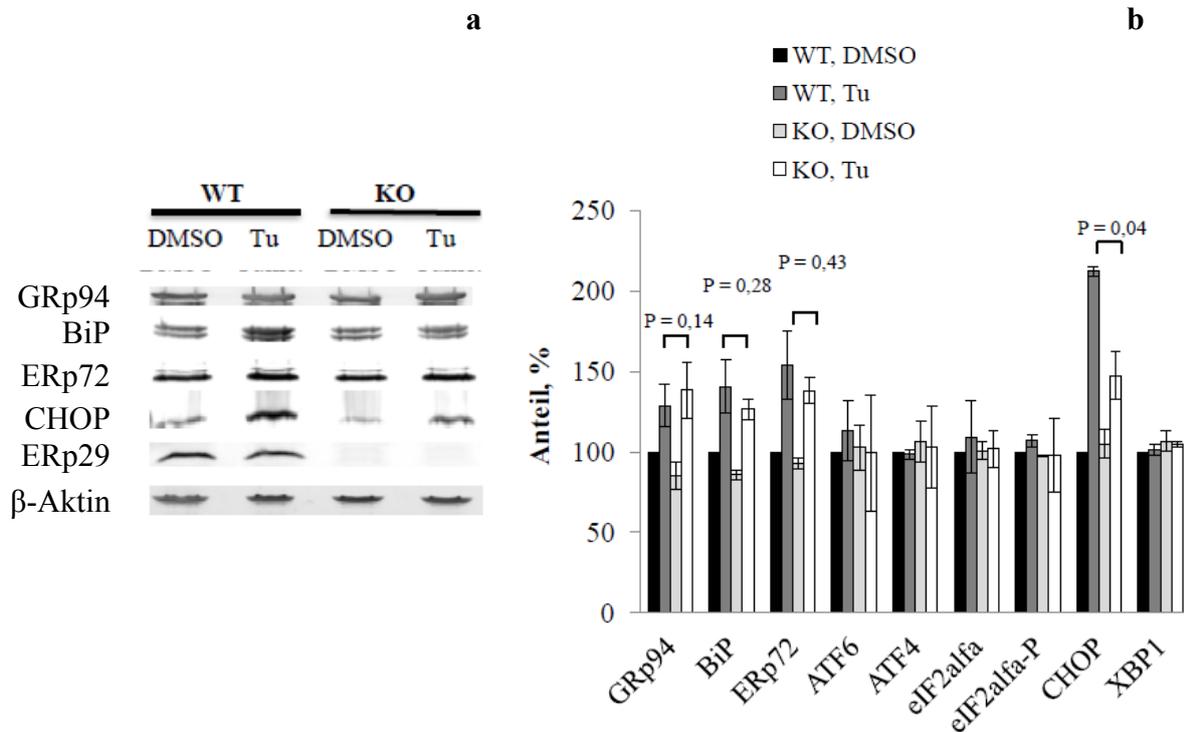
Die Thyrozyten wurden für 18 h mit 1,5 µg/ml Tunicamycin (Tu) behandelt. Die Expression einiger Mitglieder der UPR wurde mittels Western Blot analysiert (a). Das ERp29 diente als Genotyp-Kontrolle. Bei der densitometrischen Analyse wurden alle Proteinbanden auf β-Aktin normiert, das als Ladekontrolle diente (b). Hierbei wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Eine Aktivierung der IRE1-Achse hat die Erhöhung des sXBP1-Levels und das Überleben der Zellen zur Folge. Wie aus Abb. 32 hervorgeht, bewirkte die Behandlung mit 1,5 µM Tunicamycin eine Erhöhung der Expression von sXBP1 um ca. 80 % unabhängig vom Genotyp. Die Aktivierung der PERK-Achse verläuft über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors eIF2α und über die nachfolgende ATF4-Aktivierung. Die ERp29-Absenheit scheint keine Auswirkung auf die Aktivierung dieser Achse zu haben. Außerdem fand in behandelten Thyrozyten in Abwesenheit von ERp29 keine Aktivierung

der dritten UPR-Achse – ATF6-Achse statt. In WT Zellen wurde hingegen eine um etwa 70 % erhöhte Expression festgestellt.

Einer der letzten Botenstoffe in der UPR-Kaskade ist CHOP, das für die Aktivierung der Apoptose verantwortlich ist (Piacentini et al., 2004). Als Folge der niedrigeren ATF6-Expression in gestressten KO Zellen fand vermutlich auch die Hochexpression von CHOP nur um etwa 30 %, während sie in WT Zellen etwa 70 % betrug (Abb. 32).

In diesem Zusammenhang wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem die Auswirkung vom akuten Stress auf die Chaperonen-Expression und auf die UPR-Aktivierung untersucht werden sollte (Abb. 33).



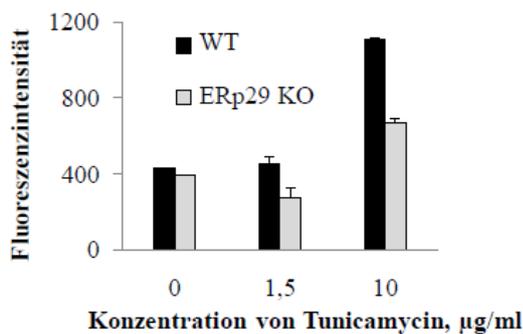
**Abbildung 33.** Vergleich der Expression einiger ER-Chaperone in Thyreozyten nach dem akuten Stress ausgelöst durch die Tunicamycin-Behandlung.

Die Thyreozyten wurden für 6 h mit 10 µg/ml Tunicamycin (Tu) behandelt. Die Expression der ER-Chaperone und einiger Mitglieder der UPR wurde mittels Western Blot analysiert (**a**). Das ERp29 diente hierbei als Genotyp-Kontrolle. Bei der densitometrischen Analyse wurden alle Proteinbanden auf β-Aktin normiert, das als Ladekontrolle diente (**b**). Hierbei wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Dafür wurden die Zellen mit einer wesentlich höheren Konzentration an Tunicamycin (10 µg/ml) für sechs Stunden behandelt. Die Western Blot-Analyse zeigte eine Akkumulierung einiger Chaperone (GRp94 - um 30 – 40 %; ERp72 – um 50 %; BiP – um 40 - 50%) unabhängig von Genotyp (Abb. 33).

Unter diesen Bedingungen konnte für fast alle UPR-Proteine (ATF6, ATF4, eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ -P, sXBP1) keine Aktivierung nachgewiesen werden (Western Blot-Bilder nicht gezeigt). Nur eine CHOP-Hochoexpression war in beiden Zelltypen deutlich zu erkennen. Im Vergleich zum milden Stress (1,5  $\mu$ g/ml 18 h, Abb. 32) war sie wesentlich höher. Auch beim akuten Stress konnte in KO Zellen eine wesentlich niedrigere CHOP-Expression (um etwa 60 %) im Vergleich zu WT Zellen festgestellt werden.

Die Aktivierung von CHOP führt zur Caspase-3-vermittelten Apoptose (siehe 1.4). Eine Analyse der Caspase-3-Aktivität wurde im Zelllysate nach einem milden (18 h, 1,5  $\mu$ g/ml) und nach einem akuten (6 h, 10  $\mu$ g/ml) Stress durchgeführt. Da die murine Schilddrüse sehr klein ist, wurden für den Versuch insgesamt 12 Mäuse verwendet: Sechs WT Mäuse (n = 2 für jede Behandlung) und sechs KO Mäuse (n = 2 für jede Behandlung). Durch diese Analyse konnte gezeigt werden, dass die Caspase-3-Aktivierung in Thyreozyten nur beim akuten Stress stattfindet (Abb. 34).



**Abbildung 34.** Analyse der Caspase-3-Aktivität in Thyreozyten nach der Tunicamycin-Behandlung.

Die Fluoreszenzintensität wurde in Zelllysaten gemessen und gegen die entsprechende Tunicamycin-Konzentration aufgetragen. Fluoreszenzintensität korreliert mit der Menge an gespaltenem Bisamid-Substrat und entspricht der Caspase-3-Aktivität (siehe 4.2.5.11). WT: n = 2, KO: n = 2.

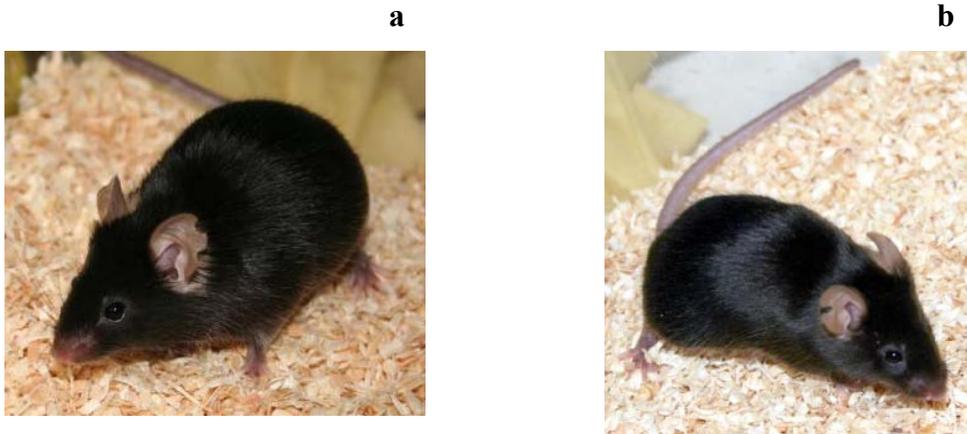
Die Behandlung der KO Zellen mit 1,5  $\mu$ g/ml Tunicamycin scheint keine Auswirkung auf die Caspase-3-Aktivität zur Folge zu haben. Beim akuten Stress war die Caspase-3-Aktivität in KO Zellen wesentlich niedriger als in WT Zellen (WT vs. KO P = 0,01), was auch mit dem niedrigeren CHOP-Level in gestressten KO Zellen übereinstimmt (Abb. 33).

## 5.4 Phenotypisierung der ERp29 Knockout Maus

Mausmodelle sind unerlässliche Hilfsmittel für die Untersuchung der grundlegenden Krankheitsmechanismen, der Umwelteinflüsse und der genetischen Risiko-Faktoren.

Die ERp29KO Maus wurde im Jahr 2003 an der Georg-August-Universität zu Göttingen hergestellt (Guo, 2003). Dafür wurde die Standard-Methode – *gene targeting* durch die homologe Rekombination verwendet. Hergestellte auf diese Art mutante Tiere werden für die Studien der Gen-Funktion *in vivo* verwendet.

Nach unseren ersten Beobachtungen wiesen die KO Mäuse weder äußerliche Anomalien (Abb. 35), noch Auffälligkeiten im Verhalten auf. Ihre Zuordnung fand mittels Genotypisierung anhand von zwei PCR-Reaktionen statt (siehe 5.1).



**Abbildung 35.** ERp29KO (a) und WT Maus (b) vom Stamm C56bl/6N dargestellt. Das Ausschalten des *erp29*-Gens verursacht keine auffällende äußerliche Veränderungen bei den Mäusen.

## 5.4.1 Reproduktive Eigenschaften

### 5.4.1.1 Analyse der reproduktiven Erfolgsrate und der Wurfgröße

Die Trächtigkeit und Anzahl der Jungtiere pro Trächtigkeit sind Messungen reproduktiver Erfolgsrate (Crawley, 1999). Die Messungen und ihre Dokumentation wurden drei Jahre lang durchgeführt. Für diese Studien wurden verpaarte Weibchen im Alter von vier bis sechs Monate berücksichtigt.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse aus der hauseigenen Verpaarungen vorgestellt. Da für die meisten Versuche bevorzugt WT und KO Geschwister aus heterozygoten Verpaarungen benutzt wurden, war die Anzahl von verpaarten WT Weibchen im Vergleich zu KO und heterozygoten Weibchen wesentlich niedriger.

Diese Daten zeigen eine allgemeine Tendenz zur Verringerung der Anzahl entbundener Weibchen und Weibchen mit Jungtieren unabhängig vom Genotyp. Besonders ausgeprägt ist diese Tendenz bei heterozygoten Weibchen, sodass nur 60 % der Weibchen ihren Nachwuchs großziehen, während es bei WT und KO Weibchen etwa 15 % mehr sind.

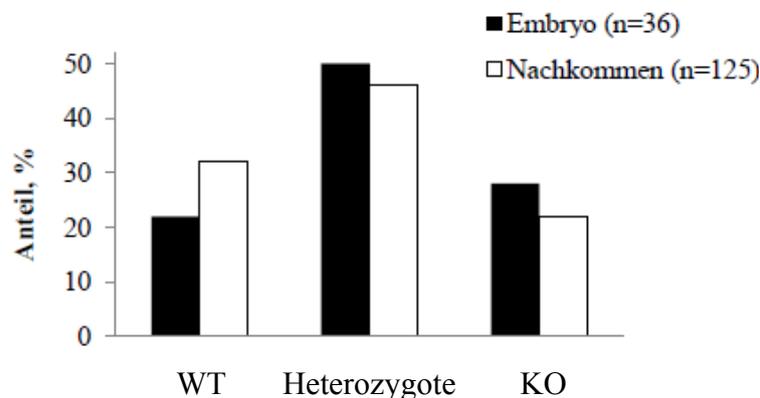
**Tabelle 6.** Charakteristika reproduktiver Erfolgsraten und der Wurfgröße

Parameter	WT	KO	Heterozygote
Anzahl verpaarter Weibchen	34	64	72
Anteil entbundener Weibchen	82,3 %	78,1 %	70,8 %
Anteil der Weibchen mit Jungtieren	73,5 %	70,3 %	59,7 %
Wurfgröße	5,5 ± 3,1	5,2 ± 2,3	5,7 ± 2,6
Anzahl ausgewachsener Jungtiere im Wurf	5,2 ± 3,1	4,6 ± 2,8	5,2 ± 2,9

Die mittlere Wurfgröße, sowie die Anzahl von ausgewachsenen Jungtieren im Wurf der KO Weibchen war niedriger, als bei WT und heterozygoten Weibchen. Eine Tendenz zu größeren Würfen zeigten heterozygote Weibchen. Dies wurde jedoch durch eine niedrigere Überlebensrate bei ausgewachsenem Nachwuchs im Vergleich zum WT ausgeglichen (Tab. 6).

#### 5.4.1.2 Analyse der Genotyp-Verteilung bei Nachwuchs von heterozygoter Verpaarungen und des elterlichen Verhaltens

Da für viele Versuche WT und KO Geschwister erforderlich waren, wurden vorwiegend heterozygote Mäuse untereinander verpaart. Gemäß des zweiten Mendel'schen Gesetzes beträgt die Genotyp-Verteilung der Nachkommen bei diesen Kreuzungen: 25 % WT : 50 % Heterozygoten : 25 % KO. Unsere Untersuchungen zeigten, dass diese Verteilung der bei den Embryonen entspricht (Abb. 36).



**Abbildung 36.** Genotyp-Verteilung in heterozygoten Kreuzungen. Für diese Studien wurden sowohl Embryos (E15), als auch geborene Mäuse von heterozygoten Eltern berücksichtigt.

Bei der Genotypisierung von 4-wöchigen Jungtieren von heterozygoten Paaren wurde festgestellt, dass vorwiegend WT zum Nachteil von KO Geschwister überleben (Abb. 36). Es

handelt sich um eine Differenz von 20 %, die bei späteren Verpaarungen berücksichtigt wurde.

Das elterliche Verhalten kann durch die Beobachtung des Mutter-Nachwuchs-Verhaltens (Zurückbringens von Jungtieren in das Nest, Zusammensitzen mit den Jungtieren im Nest) beurteilt werden (Crawley, 1999). Dies konnte beim Umsetzen in einen sauberen Käfig beobachtet werden. Bei diesem Vorgang ist eine vorläufige Trennung der Eltern von den Jungtieren unvermeidlich, weil zuerst die Eltern und danach ihr Nachwuchs umgesetzt werden. Unabhängig vom Genotyp löste das Umsetzen ein unruhiges, suchendes Verhalten bei Eltern aus. Beim Zusammensetzen brachten die Eltern ihren Nachwuchs an eine andere Stelle und deckten diesen mit den im Käfig vorhandenen Papiertüchern ab. Diese Beobachtung des elterlichen Verhaltensmusters ist ein wichtiges Mittel für die Untersuchung der Notwendigkeit zum Testen der sensorischen Fähigkeit, weil die Anomalien dieses Verhaltens z.B. durch die Taubheit oder Blindheit der Eltern verursacht werden könnten (Crawley, 1999).

#### 5.4.2 Primäre Phenotypisierung der ERp29 KO Maus in der *German Mouse Clinic*

Da die ERp29KO Maus keine äußerliche Unterschiede zum WT aufweist, wurde es notwendig die primäre Phenotypisierung in der *German Mouse Clinic* (GMC) durchzuführen.

Durch die primäre phenotypische Analyse können grundlegende physiologische Parameter an einer großen Menge an Mäusen relativ schnell und einfach gemessen werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse (Tab. 7) repräsentieren eine Gemeinschaftsarbeit von Arbeitsgruppe Ferrari (MPF) und GMC (Helmholtzzentrum und Technische Universität zu München).

**Tabelle 7.** Eine Übersicht über die Analysen und Ergebnisse der primären Phenotypisierung von ERp29 KO Mäusen

Studien	Analyse	Unterschiede	Beschreibung für ERp29 KO Maus vs. WT
Steroid Metabolismus	Kortikosteron, Androstenedion, Testosteron	ja	Tendenz zum höheren Gehalt an Kortikosteron im Blut; Ein niedrigerer Gehalt an Testosteron bei männlichen Mutanten
Klinische Chemie	Vereinfachter IpGGT	nein	<b>Anhang 3</b>
	Gehalt von Lipiden im Blut	ja	Tendenz für einen erhöhten Gehalt von Triglyceriden und freien Fettsäuren im Blut
Energetischer Metabolismus	Indirekte Kalorimetrie	ja	Tendenz für eine erhöhte Futteraufnahme, <b>Anhang 4</b>

Neurologie	Modifizierte SHIRPA Grifstärke, rotarod	ja	Tendenz für die reduzierte Grifstärke bei männlichen Mutanten, <b>Anhang 5</b>
Verhalten	Offenes Feld Startle-Reflex, PPI	ja	Niedrigere Aktivität bei der senkrechten Aufrichtung; Tendenz für die niedrigere akustische Startle-Reaktivität (ASR); erhöhte Präpulsinhibition, <b>Anhang 6</b>
Dysmorphologie	Anatomische Beobachtungen	nein	<b>Anhang 7</b>
	DXA, X-ray	ja	Niedrigere Knochendichte
Funktion der Lunge	Ganzkörper-Plethysmographie	ja	Niedrigere respiratorische Rate <b>Anhang 8</b>
Kardiovaskuläre Studien	Blutdruck	nein	
	EKG, Echo	ja	längerer PQ-Interval, <b>Anhang 9</b>
Immunologie, Allergologie	FACS Analyse von PBC, Ig-Konzentration	ja	Signifikant reduziert Anzahl an T-Zellen, weniger CD62L-exprimierenden Zellen innerhalb von T-Zell-Cluster; Weniger B-Zellen, <b>Anhang 10</b>
Nozizeption	Heizplatte	nein	<b>Anhang 11</b>
Auge	Augengröße (LIB)	nein	<b>Anhang 12</b>
	Ophthalmoskopie, Schlitzlampe	nein	
Hämatologie	<i>animal blood counter</i> (ABC)	nein	<b>Anhang 13</b>
Pathologie	makro- und mikroskopische Analyse	nein	Es wurden folgenden Organe untersucht: Haut, Bewegungsapparat, Auge, Gehirn, Kleinhirn, Herz, Arterien, Trachea, Lunge, Zähne, Speicheldrüse, Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Milchdrüse, Pankreas, Halslymphknoten, Milz, Schilddrüse, Nebenniere, Nieren, Harnblase, Hoden, Nebenhoden, Eierstöcke, Gebärmutter, Vagina.
Molekulare Phenotypisierung	<i>expression-profiling</i>	nein	

Eine Übersicht einiger Methoden und der dazugehörigen Ergebnissen der Phenotypisierung ist unten (5.4.2.1 – 5.4.2.9) dargestellt.

#### 5.4.2.1 Steroid-Metabolismus

Steroide kontrollieren Differenzierungs- und Proliferationsprozesse in Zellen und im Gewebe. Sie sind auch an der Regulation der Apoptose und Neuroregeneration beteiligt. Defekte im Steroid-Metabolismus steuern zur Pathogenese von mehreren verschiedenen Krankheiten bei, so wie Krebs, Knochen- und Knorpel-Erkrankungen (Osteoporose) oder

neuronale Krankheiten (Herman, 2003). Daher könnte ein Screening auf die Anomalien von Steroiden in Maus-Plasma von großem Interesse sein.

Die Analyse der Hormonen-Konzentration wurde in 50 µl Blutplasma mittels Hochdurchsatz LC-MS/MS Technologie durchgeführt und zeigte Unterschiede im Kortikosteron- und Testosteron-Gehalt (Tab. 8).

**Tabelle 8.** Gehalt von Steroid-Hormonen in Maus-Plasma

Hormone [nmol/l]	Kontrolle (WT)		ERp29KO	
	♂ (n = 10)	♀ (n = 10)	♂ (n = 8)	♀ (n = 10)
Kortikosteron	300,9	606,1	334,8 ↑	616,2 ↑
Androstenedion	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Testosteron	4,2	< 0,4	1,6 ↓	< 0,4

Im Allgemeinen haben die Weibchen unabhängig von ihrem Genotyp eine doppelt so hohe Konzentration an Kortikosteron wie Männchen. Innerhalb jeder Geschlechtsgruppe wurde eine Tendenz für eine höhere Kortikosteron-Konzentration bei KO Mäusen festgestellt. Während bei weiblichen Mutanten diese Erhöhung etwa 2,7 % zum Grundlevel (WT-Level) beträgt, ist sie bei männlichen Mutanten wesentlich höher – bis 10 % des Grundlevels (WT vs. KO  $P < 0,05$ ).

Testosteron sorgt für die geschlechtsspezifische Entwicklung sekundärer Merkmalen und für die Reifung von Spermatozoen zu Spermien. Außerdem besitzt dieses Hormon eine anabole Wirkung. Die Quantifizierung von Testosteron zeigte Geschlecht-spezifische Unterschiede in beiden genetischen Gruppen und zwar eine wesentlich niedrigere Konzentration bei Weibchen (Tab. 8). Ein niedrigerer Testosteron-Gehalt wurde bei mutierten Männchen festgestellt - fast um 60 % niedriger im Vergleich zum WT.

#### 5.4.2.2 Klinisch-chemische Analyse von Blutplasma

Da viele genetische Veränderungen direkt oder indirekt zu veränderten Organfunktionen führen, erfolgte eine Untersuchung von diagnostischen Labor-Parametern, die klinisch-chemische und hämatologische Phänotypisierung zur flächendeckenden Charakterisierung von mutierten Mäusen. Dabei wurden 21 Parameter am Olympus AU400 Autoanalyzer (Olympus, Hamburg) untersucht: Die Konzentration verschiedener Substrate, Proteine und Elektrolyte, Enzymaktivität im Blutplasma u.a.

Es wurde ein höherer Gehalt von Fettabbauprodukten im Blut männlicher KO Mäuse festgestellt (Tab. 9). Während für die Triglyceride dieser Unterschied eher als eine Tendenz zu bezeichnen ist, war die Konzentration an freien Fettsäuren im Blutplasma signifikant höher im Vergleich zu WT Mäusen.

Die Konzentration am Cholesterol, das als Grundstoff für den Metabolismus von Steroid-Hormonen dient, blieb aber unverändert. Keine Unterschiede konnten auch im Glukose-Gehalt festgestellt werden.

**Tabelle 9.** Metabolische Phenotypisierung von Mäusen

	<b>Cholesterol mmol/l</b>	<b>HDL- Cholesterol mmol/l</b>	<b>nicht-HDL- Cholesterol mmol/l</b>	<b>Freie Fettsäuren mmol/l</b>	<b>Triglyceride mmol/l</b>	<b>Glukose mmol/l</b>
♂ Kontrolle (n = 10)	2,45±0,23	1,74±0,17	0,71±0,07	0,52±0,07	0,66±0,1	11,52±1,5
♂ ERp29KO (n = 8)	2,42±0,12	1,74±0,07	0,69±0,07	0,57±0,02↑	0,72±0,11↑	11,00±1,8
P – Wert WT vs. KO	0,76	0,89	0,58	0,05	0,28	0,53

#### 5.4.2.3 Analyse der Energie-Balance

Diese Phenotypisierung kann auch in Bezug auf Anomalien in der Energie-Balance durchgeführt werden. Dabei werden Parameter wie Futter-Aufnahme und Energie-Assimilation auf den Aufnahme-Teil der Energie-Balance bezogen. Die metabolische Rate, Körpertemperatur und Bewegungsaktivität sind wiederum Parameter zur Untersuchung der Energie-Verbrauch. Die metabolische Rate wurde mittels indirekter Kalorimetrie durch die Messung der O<sub>2</sub>-Aufnahme und CO<sub>2</sub>-Produktion analysiert, ergab aber keine Genotyp-spezifischen Unterschiede (Anhang 4).

Zwar wurde bei KO Mäuse eine Tendenz für die erhöhte Futteraufnahme ( $5,0 \pm 0,6$  g) im Vergleich zum WT ( $4,5 \pm 0,4$  g) festgestellt (WT vs. KO P = 0,04), doch wurden keine weitere Parameter der Energie-Balance dadurch beeinflusst. Auch die Messung des Körpergewichts bei jungen Mäuse zeigte keine signifikanten Unterschiede (Anhang 4).

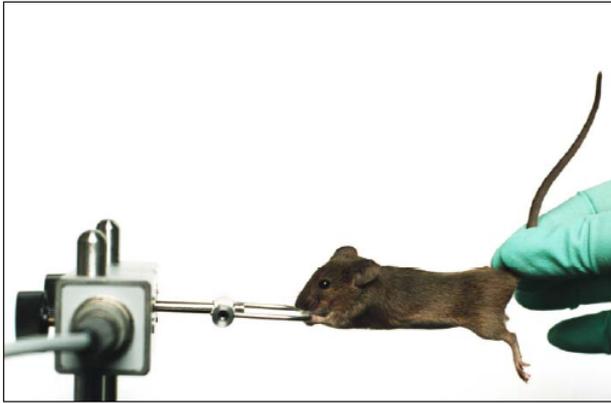
#### 5.4.2.4 Neurologische Phenotypisierung

Die Untersuchung dieser Parameter wurde nach dem modifizierten SHIRPA-Protokoll (Rogers et al., 1997) durchgeführt. Das Protokoll stellt eine Serie von einzelnen Beobachtungen und einfachen Tests zur Kontrolle verschiedener Reflexe bereit.

Die Griffstärke wird zur Bewertung der Muskelfunktion verwendet. Es wurden Messungen der Griffstärke der Vorderpfoten und kombiniert der Vorderpfoten / Hinterpfoten vorgenommen (Abb. 37).

Bei der Untersuchung zeigten weibliche Mäuse keine Genotyp-relevanten Unterschiede. Geschlechtsspezifische Unterschiede waren bei WT Mäusen deutlich ausgeprägt: somit

zeigten Weibchen eine signifikant niedrigere Belastbarkeit (WT vs. KO  $P < 0,05$ ) für zwei und für vier Pfoten im Vergleich zu Männchen. Dies ist nicht der Fall bei KO Mäusen, denn die männlichen Mutanten sind genauso belastbar wie die weiblichen Mäuse und dementsprechend wesentlich schwächer als WT Männchen (WT vs. KO  $P < 0,05$ ) (Anhang 5).



**Abbildung 37.** Messung der Griffstärke bei Mäusen.

Dafür wurde die Belastung [g] als maximale Kraft gemessen, die eine Maus an der Signalwandler-gekoppelten Stange ansetzt, wenn sie langsam fortgezogen wird, bevor sie den Griff loslässt.

Diese Quantifizierung ergibt nicht nur Informationen über die Muskelfunktion, sondern auch kann auf die Defekte in motorischen Signaltransduktionswegen und in neuromuskulären Verbindungen hindeuten.

#### 5.4.2.5 Analyse des Verhaltens

Ziel dieses Screening ist die Untersuchung der molekularen und genetischen Grundlagen emotionaler Funktionen und der Wahrnehmung, die auch für die menschlichen neuropsychiatrischen Funktionsstörungen relevant sind.

Für die Analyse des spontanen Verhaltens wurde der modifizierte Loch-Kammer-Test (Ohl et al., 2001) verwendet. Dabei können die einzelnen Mäuse die Test-Bühne innerhalb von 5 min unbehindert erforschen. Die Verhaltensmessung wurde mit Hilfe einer Kamera, die über dem Zentrum der Test-Bühne angebracht war, aufgezeichnet und mittels Videoverfolgung analysiert. Dieser Test ermöglicht eine umfangreiche Analyse einer ganzen Reihe von Verhaltensparameter, wie z.B. Bewegungsaktivität, erforschendes Verhalten, Erregung, Emotionalität, Gedächtnis und soziale Affinität.

Die Aktivitätsanalyse der senkrechten Aufrichtung zeigte, dass die KO Mäuse im Allgemeinen weniger aktiv waren als die WT Mäuse. Besonders deutlich waren diese Unterschiede (um etwa 20 %) bei männlichen Mäusen ausgeprägt (Anhang 6).

Bei der Untersuchung des Angst-bedingtes Verhaltens wurde festgestellt, dass männliche KO Mäuse im Gegensatz zu WT Männchen etwa 10 % mehr Zeit (WT vs. KO  $P = 0,06$ ) in der

Mitte der Bühne und zu den Weibchen im Allgemeinen verbringen. Dies ist auch ein Hinweis auf niedrigere Erforschungsaktivität bei ERp29-defizienten Männchen (Anhang 6). Zusätzlich wurden die Aspekte des Lernens und des Gedächtnisses durch die Untersuchung der Geruchserkennung, des Angst-Gedächtnisses, der Objekterkennung und des sozialen Verhaltens bewertet. Eine bedeutende Rolle wird dabei dem akustischen Schreckreizreflex und der Präpulsinhibition zugeordnet, die bei der Schizophrenie nur eingeschränkt vorhanden sind und als Endophenotyp dieser Krankheit betrachtet werden (Crawley, 1999).

Die Präpulsinhibition entspricht physiologisch der Filterfunktion des gesunden Gehirns für Außenreize. Durch schwächere Reize stellt sich das Gehirn auf mögliche weitere Reize ein. Dadurch vermindert sich der Erschreckungseffekt. Bei allen Präpulsintensitäten wiesen die KO Mäuse eine Tendenz zur stärkeren Inhibition im Vergleich zum WT auf (WT vs. KO  $0,5 \leq P < 1$ ) (Anhang 6).

#### **5.4.2.6 Analyse der Lungenfunktion**

Die Lungenfunktion wird durch eine Versuchsserie bewertet, um die möglichen Anomalien des Atemmusters in ungestressten Mutanten bei verschiedenen Aktivitäten (Schlaf, Erholung, Aktivität) festzustellen. Spontanes Atmen wurde mittels Ganzkörper Plethysmographie (Fa Buxco) untersucht. Dabei wurden Druckschwankungen, bedingt durch das Ein- und Ausatmen, sowie Temperatur- und Feuchtigkeit-Veränderungen während der Atmung, 40 min lang gemessen und in Signale transformiert, die durch eine automatische Datenanalyse in mehreren Atmungsparameter (respiratorische Rate, Minutenventilation, Ein- und Ausatmen-Zeit usw.) umgerechnet wurden.

Eine Untersuchung der grundlegenden Lungenfunktionen zeigte, dass KO Männchen eine signifikant niedrigere respiratorische Rate (WT vs. KO  $P < 0,05$ ) aufweisen (Anhang 8).

#### **5.4.2.7 Skelett-Phenotypisierung**

Das Skelett ist das drittgrößte Organsystem im Körper, das aus Knochen und Knorpel besteht. Die Untersuchung mutanter Mäuse trägt zur Aufklärung von Krankheiten wie Osteoarthritis, Osteoporose usw. bei. Diese Untersuchung wurde mittels zwei nicht-invasiven Techniken: DXA (*dual-energy X-ray absorption*) und *X-ray imaging* durchgeführt. Diese Techniken werden üblicherweise zur Diagnostik von Osteoporose und von Defekten der Knochenmineralisierung verwendet.

Die Analyse der Knochendichte (*bone mineral density* - BMD) bei männlichen Mäusen zeigte, dass die KO Mäuse einen niedrigeren BMD-Wert ( $42 \pm 1 \text{ mg/cm}^2$ ) im Vergleich zum WT ( $45 \pm 1 \text{ mg/cm}^2$ ) aufweisen (WT vs. KO  $P < 0,05$ ).

#### 5.4.2.8 Kardiovaskuläre Phenotypisierung

Die Herzphysiologie bei *Mammalia* kann anhand des Elektrokardiogramms (EKG) untersucht werden. Durch diese Messung können mehrere Parameter, wie die elektrische Aktivität, Rhythmus der Herzschläge, Verbreitung der Erregung innerhalb des Herzgewebes und zusätzliche Information über die leitenden Eigenschaften (Funktion von Ionenkanälen), erfasst werden. Fast alle Herzpathologien verursachen verschiedene EKG-Veränderungen.

Die Messung der EKG wurde einige Minuten lang an narkotisierten Mäusen (Isofluran-Narkose) durchgeführt. Dabei wurden sowohl unipolare (aVR, aVF, aVL), als auch bipolare (I, II, III) Ableitungen verwendet.

Es wurde festgestellt, dass KO Mäuse ein verlängertes PQ-Intervall (WT vs. KO  $P < 0,05$ ) aufweisen (Anhang 9). Dieses Intervall ist ein Ausdruck der atrioventrikulären Leitungszeit, also der Zeit zwischen dem Beginn der Erregung der Vorhöfe und der Kammern (Erregungsüberleitungszeit).

Das Herzgewicht männlicher KO Mäuse war im Vergleich zu WT Männchen signifikant niedriger (WT vs. KO  $P < 0,05$ ) und entsprach etwa dem Herzgewicht weiblicher Probanden. Das Herzgewicht weiblicher Probanden zeigte hingegen keine Genotyp-relevanten Unterschiede (WT vs. KO  $P > 0,05$ ) (Anhang 9).

#### 5.4.2.9 Immunologische Phenotypisierung

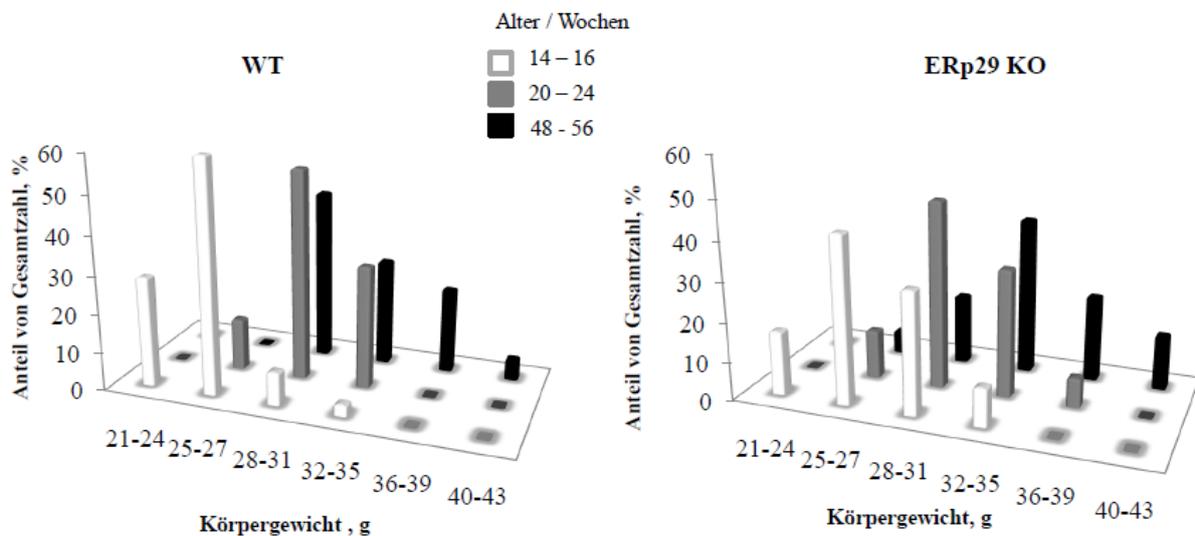
Bei der immunologischen Phenotypisierung wurden verschiedene Leukozyten-Populationen im peripheren Blut und der Immunoglobulin-Level im Blutplasma gemessen. Das Verhältnis der Leukozyten-Populationen im Blut ist dabei genetisch reguliert. Für die gleichzeitige Analyse der Zellzahl und Oberflächenmarker wurde die *multi-colour flow cytometry* genutzt. Verschiedene Stadien von T-Zellen im Thymus können durch die Färbung von CD4 und CD8 identifiziert werden. Auf diese Art und Weise wurde eine signifikant reduzierte Anzahl an CD4 und CD8 exprimierenden T-Zellen festgestellt (WT vs. KO  $P < 0,05$ ) (Anhang 10). T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunantwort zuständig. CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten werden als Helferzellen angesehen; ihr Rezeptor erkennt MHC-Klasse-II-Moleküle. CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gelten als zytotoxische T-Zellen.

Die Anzahl der B-Zellen im Blut mutanter Mäuse hingegen war deutlich höher (WT vs. KO  $P < 0,05$ ) als beim WT (Anhang 10). B-Zellen sind die Träger der humoralen Immunantwort (Bildung von Antikörpern). Sie entstehen im Knochenmark. B-Zellen werden durch körperfremde Strukturen (Antigene) aktiviert und produzieren daraufhin gegen diese Antigene gerichtete Antikörper.

### 5.4.3 Altersbedingte Veränderungen des Körpergewichtes

Um den Effekt des fehlenden Proteins ERp29 auf die Gewichtsentwicklung zu quantifizieren, wurde deren Verlauf zwei Jahre lang für folgenden Altersgruppen bestimmt: Junge Mäuse (14 - 16 Wochen), reife Mäuse (20 - 24 Wochen) und alte Mäuse (48 - 56 Wochen).

Als Kriterium für diese Einteilung diente die Reproduktivität der Mäuse. Die höchste Aktivität erreichen sie im Alter von etwa fünf bis sechs Monaten und werden dann als „reif“ bezeichnet. Hierzu wurden mehrere homozygote ERp29-defiziente Mäuse und ihre WT Geschwister in definierten Zeitabständen zwischen 10 – 11 Uhr gewogen.



**Abbildung 38.** Effekt der ERp29-Defizienz auf die altersbedingte Gewichtsentwicklung.

Für die Gewichtsbestimmung wurden mehrere männliche Geschwister der heterozygoten Verpaarungen verwendet. Die Anzahl der Tiere ist: n = 75 WT und n = 150 KO. Jede Reihe von Säulen repräsentiert die Gewichtsverteilung (% der Gesamtzahl) innerhalb einer Altersgruppe. Zur Analyse wurden je Genotyp jeweils drei Altersgruppen verwendet.

In Abb. 38 ist schon bei jungen KO Mäusen (weiße Balken) eine deutliche Tendenz zum höheren Gewicht zu sehen. Während die meisten jungen WT Mäuse in einem Gewichtsbereich von 21 - 27 g zusammengefasst werden können, sind die meisten jungen ERp29-defizienten Mäuse in einem Bereich von 25 - 31 g verteilt. Diese Unterschiede wurden durch eine Analyse älterer Mäuse deutlicher: Während das dominierende Gewicht bei alten WT Mäusen zwischen 28 - 31 g liegt, sind es bei alten KO Mäusen 32 - 35 g (schwarze Balken). Die letzteren zeigten auch einen um etwa 15 % in Vergleich zu den gleichaltrigen WT Mäusen höheren % Anteil von übergewichtigen Mäusen (über 35 g).

#### **5.4.4 Altersbedingte Veränderungen der Chaperonen-Expression in verschiedenen Organen der KO Maus**

ERp29 kommt ubiquitär in allen Geweben von *Mammalia* vor, doch eine besonders hohe Expression wurde in sekretorischen Geweben (Leber, Gehirn, Niere, Speicheldrüse, Schilddrüse usw.) festgestellt (Mkrtchian and Sandalova, 2006). Da diesem Protein Chaperonen-Aktivität zugeschrieben wird, war es interessant zu untersuchen, welche Auswirkungen seine Abwesenheit auf die Expression anderer Proteine der Faltungsmaschinerie und der Qualitätskontrolle hat und welche altersbedingten kompensatorischen Mechanismen auffallen. Dafür wurde die Expression einiger ER-Proteine im Gewebe junger (drei Monate alt) und alter (zwölf Monate alt) Mäuse mittels Western Blot analysiert. Diese Proteine sind an der Proteinfaltung, an der Qualitätskontrolle und an der Stressantwort auf die ungefalteten Proteine (BiP/GRp78) beteiligt.

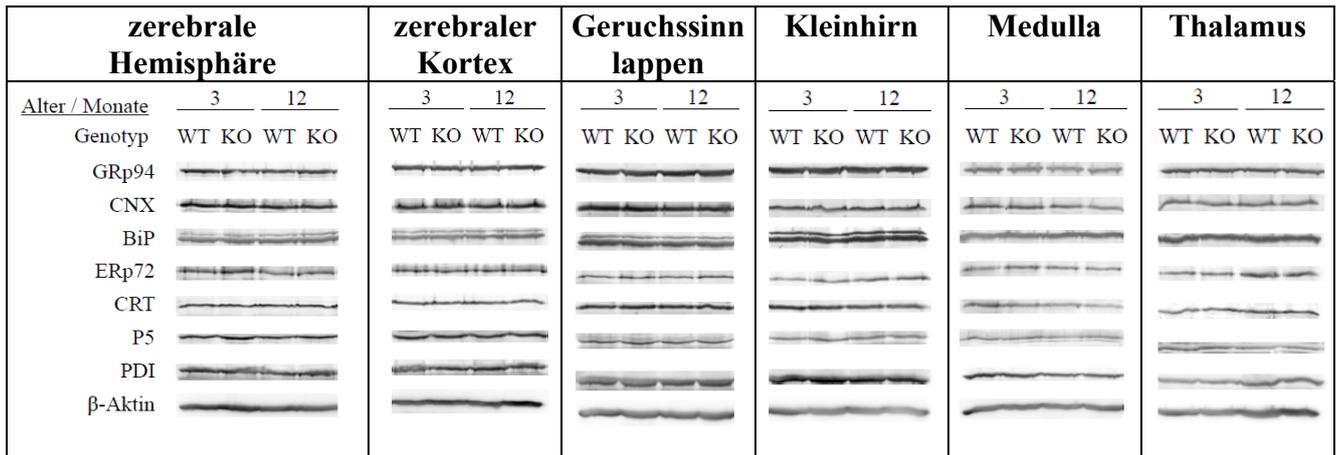
##### **5.4.4.1 Chaperonen- und Leptin-Expression im Gehirn**

Laut der primären Phenotypisierung verursacht die Abwesenheit von ERp29 einige neuronale Veränderungen und Anomalien des Verhaltens bei den Mäusen. Diese Erscheinungen stehen unter Kontrolle verschiedener Teilen des Gehirns, die einen unterschiedlichen histologischen Aufbau und unterschiedlichen Stoffwechsel haben.

Es wurden mehrere Gehirnbereiche mittels Western Blot analysiert: *Medulla oblongata* - der hinterste Gehirnteil; zerebraler Kortex (Großhirnrinde) - äußerste Schicht des Großhirns, an der Kommunikation und Erinnerung beteiligt; die zerebrale Hemisphäre - symmetrische Großhirnhälften, die über die Kommissuren miteinander verbunden sind; Thalamus - der größte Teil des Zwischenhirns; Kleinhirn - ein Teil des Hinterhirns, erfüllt wichtige Aufgaben bei der Steuerung der Motorik.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Veränderungen in der Chaperon-Struktur (z.B. bei BiP) dramatische Auswirkungen auf das Gehirn während der Embryogenese und bei adulten Mäusen zur Folge hat. Daraufhin wurde postuliert, dass die Reifung und Migration neuronaler Zellen auch Sekretionsvorgänge eine große Sensitivität für die fehlerhafte ER-Qualitätskontrolle aufweist (Mimura et al., 2008).

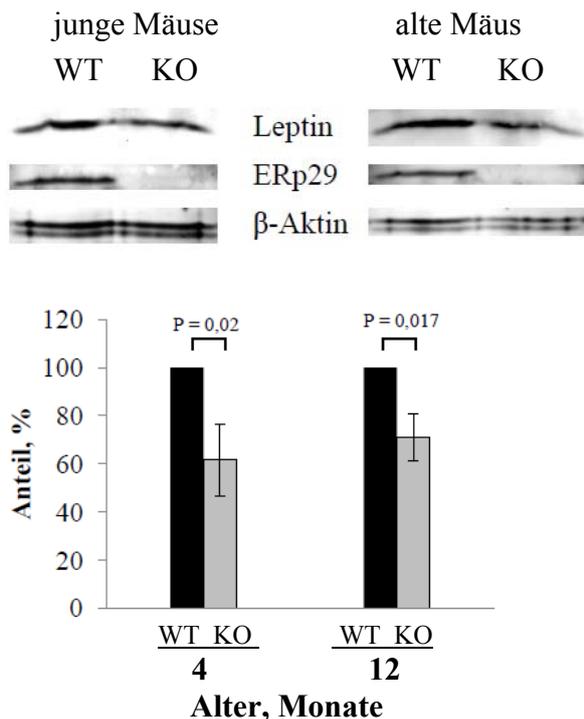
Analyse der ER-Proteine im Gehirn nicht-gestresster Mäuse zeigte keine Genotyp-bedingten oder altersspezifischen Veränderungen (Abb. 39). In diesem Fall verursachte die Abwesenheit von ERp29 keine Veränderungen der Expression der untersuchten Chaperone, die für die korrekte Proteinfaltung und Qualitätskontrolle zuständig sind. Vermutlich findet im ER auch keine Akkumulierung von ungefalteten Proteinen statt, weil das BiP-Level, das als ein sensibles Zeichen für UPR dient, in allen Gehirn-Teilen unverändert blieb.



**Abbildung 39.** Western Blot-Analyse der Expression einiger ER-Proteine in verschiedenen Gehirnteilen.

Für diese Vergleichsanalyse wurden Organbiopsien von jeweils drei männlichen KO Mäusen vs. drei männlichen WT Mäuse im Alter von drei und zwölf Monaten verwendet. Die Proteine wurden in 10 - 12 % SDS PAGE Gelen getrennt und mit spezifischen Antikörpern angefärbt. β-Aktin dient dabei als Ladekontrolle.

Aufgrund der Befunde bezüglich des Fettstoffwechsels und der Tendenz zum Übergewicht bei KO Mäuse wurde die Leptin-Expression im Hypothalamus untersucht. Dieses Hormon spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Fettstoffwechsels und der reproduktiven Funktion von *Mammalia* (siehe 1.9). Bei der Western Blot-Analyse wurde festgestellt, dass die Leptin-Expression im Hypothalamus der KO Männchen unabhängig von ihrem Alter um etwa 30 % im Vergleich zu WT Männchen herunterreguliert ist (Abb. 40).

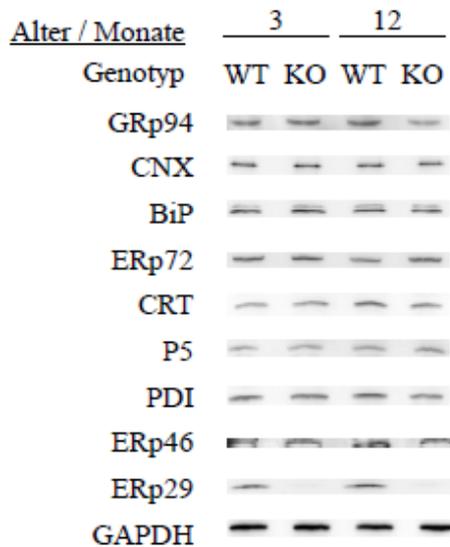


**Abbildung 40.** Leptin-Expression im Hypothalamus.

Für diese Vergleichsanalyse wurden Organbiopsien von jeweils drei männlichen KO Mäusen vs. drei männlichen WT Mäuse im Alter von vier und zwölf Monaten verwendet. Gezeigt sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern (a). Bei der densitometrischen Analyse wurden alle Banden auf β-Aktin normiert, das als Ladekontrolle diente. Hierbei wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt (b).

#### 5.4.4.2 Chaperonen-Expression im Herz

Da die KO Mäuse gewisse Veränderungen in der elektrischen Aktivität (EKG) im Herzen zeigten und männliche Mutanten ein signifikant niedrigeres Herzgewicht aufwiesen, wurde untersucht, ob diese Anomalien durch die Veränderungen der Faltungskapazität in mutanten Mäusen auftreten könnten.



**Abbildung 41.** Western Blot-Analyse der Expression einiger ER-Proteine im Herz.

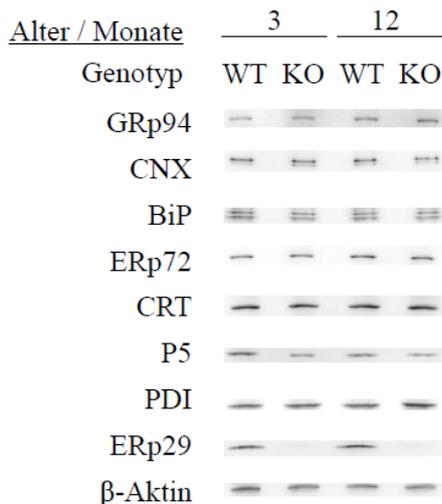
Für diese Vergleichsanalyse wurden Organ-Biopsien von jeweils drei männlichen KO Mäusen vs. drei männlichen WT Mäusen im Alter von drei und zwölf Monaten verwendet. Die Proteine wurden in 8 - 10 % SDS PAGE Gelen getrennt und mit spezifischen Antikörpern angefärbt. ERp29 dient dabei als Genotyp-Kontrolle und GAPDH als Ladekontrolle.

Die Western Blot-Analyse der untersuchten ER-Chaperonen ergab keine signifikanten Genotyp-spezifischen oder altersbedingten Veränderungen (Abb. 41).

#### 5.4.4.3 Chaperonen-Expression in Nieren

Die Niere als zentrales Regulationsorgan des Wasser- und Elektrolythaushalts sorgt für die Konstanzhaltung des inneren Milieus, der Homeostase. Neben der Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen (v.a. Kreatinin und Harnstoff) ist sie für die Aufrechterhaltung des Ionen- bzw. Elektrolytgleichgewichts ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) und die Regulation des Säure-Base-Haushalts verantwortlich. Die Störung dieser Regulation führt zum ER-Stress und als Folge dessen zur Veränderung der Expression einiger Chaperone in den Nieren, wie z.B. BiP, GRp94, CNX, CRT (Karar et al., 2008).

Daraufhin wurde die Expression mehrerer Chaperone in Abwesenheit von ERp29 untersucht. Dabei zeigte die Western Blot-Analyse keine Genotyp-spezifischen oder altersbedingten Veränderungen (Abb. 42).



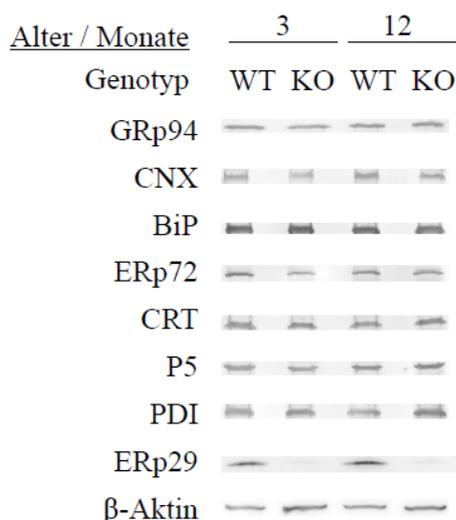
**Abbildung 42.** Western Blot-Analyse der Expression einiger ER-Proteine in Nieren.

Für diese Vergleichsanalyse wurden Organ-Biopsien von jeweils drei männlichen KO Mäusen vs. drei männlichen WT Mäuse im Alter von drei und zwölf Monaten verwendet. Die Proteine wurden in 8 - 10 % SDS PAGE Gelen getrennt und mit spezifischen Antikörpern angefärbt. ERp29 dient dabei als Genotyp-Kontrolle und β-Aktin als Ladekontrolle.

#### 5.4.4.4 Expression einiger ER-Chaperone und einiger Fettstoffwechsel-Proteine in Leber

Die Leber ist das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels und die größte Drüse des Körpers bei Wirbeltieren. Die wichtigsten Aufgaben sind die Produktion von Gerinnungsfaktoren, die Speicherung von Glukose und Vitaminen, die Gallenproduktion und damit einhergehend der Abbau und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen.

Die Western Blot Analyse der ER-Chaperone ergab jedoch keine Genotyp-spezifischen und altersbedingten Unterschiede (Abb. 43).



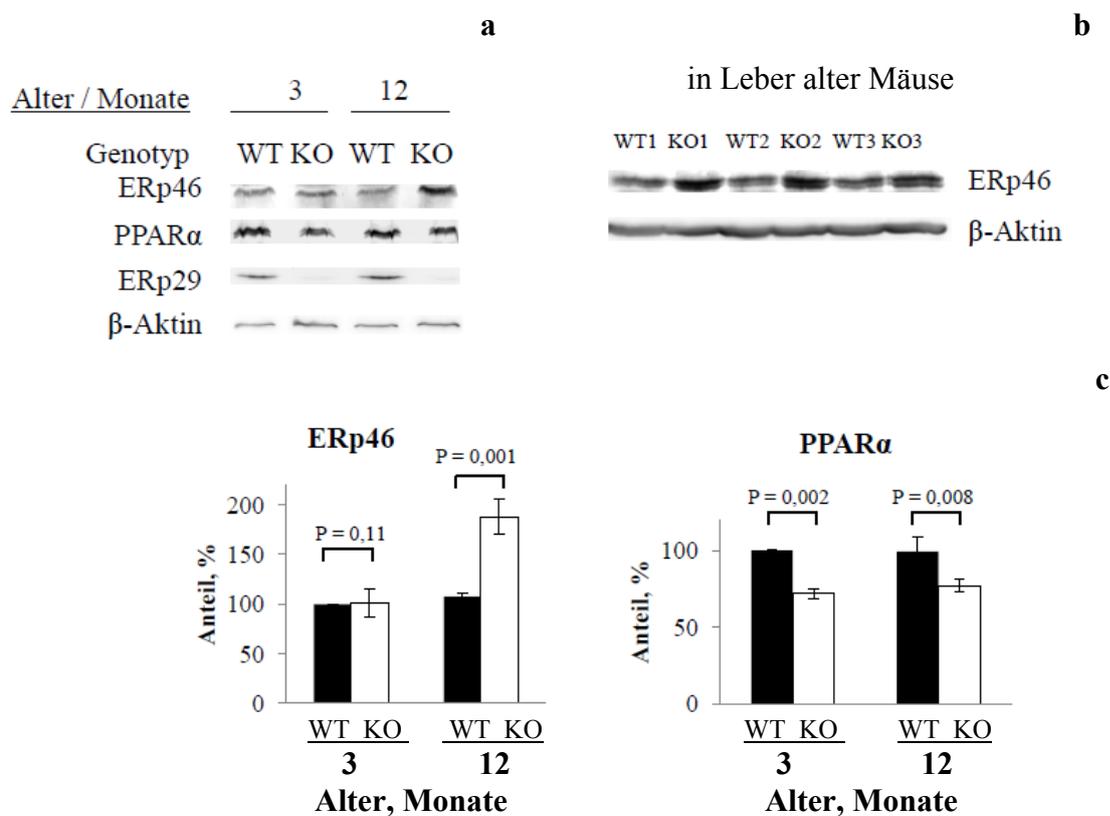
**Abbildung 43.** Western Blot-Analyse der Expression einiger ER-Proteine in Leber.

Für diese Vergleichsanalyse wurden Organbiopsien von jeweils drei männlichen KO Mäusen vs. drei männlichen WT Mäuse im Alter von drei und zwölf Monaten verwendet. Die Proteine wurden in 10 - 12 % SDS PAGE Gelen getrennt und mit spezifischen Antikörpern angefärbt. ERp29 dient dabei als Genotyp-Kontrolle und β-Aktin als Ladekontrolle.

Die Leber ist eng in die Steuerung des Fettstoffwechsels involviert. In der Leber findet die Synthese von Cholesterin und den heraus abgeleiteten Gallensäuren, die Speicherung von Fett in Form von Lipoproteinen und der Abbau von Steroidhormonen statt.

In diesem Zusammenhang erfolgte die Western Blot-Analyse einiger Proteine des Fettstoffwechsels. Dabei stellte sich heraus, dass die ERp46-Expression in der Leber alter KO Mäuse doppelt so hoch im Vergleich zur Leber alter WT Mäuse war (Abb. 44). Bemerkenswert war dabei, dass die jungen Mäuse keine Genotyp-spezifische Unterschiede aufwiesen. Erst vor Kurzem wurde bekannt, dass ERp46 am Fettstoffwechsel beteiligt sein kann (Charlton et al., 2010).

Ein Schlüsselrezeptor im Lipidstoffwechsel in der Leber ist PPAR $\alpha$ . Durch die Western Blot-Analyse wurde eine niedrigere Expression dieses Rezeptors (um etwa 20 %) in KO-Leber unabhängig vom Alter der Mäuse festgestellt (Abb. 44a, 44c).



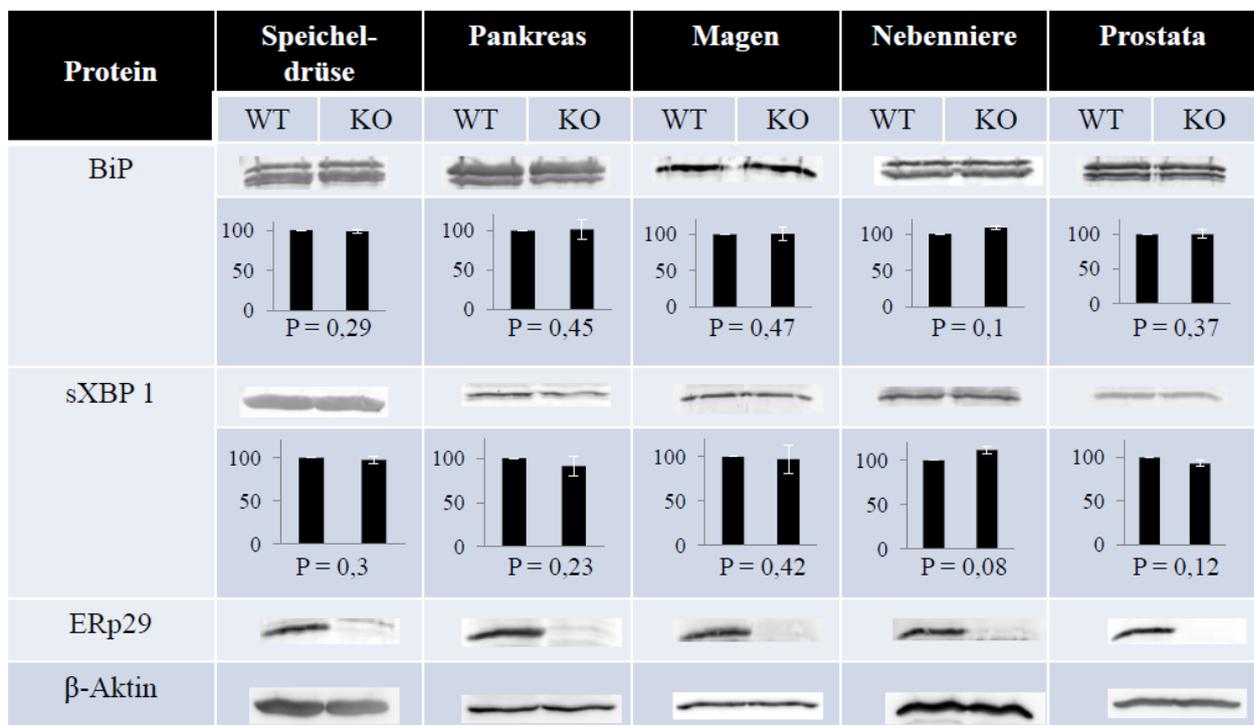
**Abbildung 44.** Western Blot-Analyse der Expression einiger Fettstoffwechsel-Proteine in der Leber.

Für diese Vergleichsanalyse wurden Organ-Biopsien von jeweils drei männlichen KO Mäusen vs. drei männlichen WT Mäuse im Alter von drei und zwölf Monaten verwendet. Die Proteine wurden in 10 - 12 % SDS PAGE Gelen getrennt und mit spezifischen Antikörpern angefärbt. **(a)** Western Blot-Analyse der Proteine, die am Fettstoffwechsel beteiligt sind; **(b)** um den Einfluss von Randeffekten bei der densitometrischen Auswertung auszuschließen, wurde Leberlysate alter KO und WT Mäuse abwechselnd auf das Gel aufgetragen; **(c)** densitometrische Auswertung von Western Blot-Banden, normiert auf  $\beta$ -Aktin (Ladekontrolle). Hierbei wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

#### 5.4.4.5 Expression einiger UPR-Proteine in sekretorischen Organen

Wie mehrere Autoren bereits zeigten, wurde eine besonders hohe Expression von ERp29 in sekretorischen Geweben festgestellt (Mkrтчian and Sandalova, 2006; Sargsyan et al., 2004). Daraufhin wurde dem ERp29 eine Chaperonen-Aktivität bei sekretorischen Vorgängen zugeordnet. Darüber hinaus würde die Abwesenheit von ERp29 eine Anhäufung von ungefalteten oder falsch gefalteten Proteinen verursachen und als Folge dessen die *unfolded protein response* (UPR) hervorrufen.

In dieser Arbeit wurden einige Proteine der UPR-Kaskade in mehreren sekretorischen Geweben männlicher KO Mäusen mittels Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten die selben Gewebe der männlichen WT Mäuse (Abb. 45).



**Abbildung 45.** Western Blot-Analyse der UPR-Proteine in sekretorischen Organen.

Für diese Vergleichsanalyse wurden Organe von jeweils vier männlicher KO Mäuse vs. vier männlicher WT Mäuse im Alter von zwölf Wochen verwendet. Für jedes Protein sind sowohl die Western Blot-Banden, als auch ihre densitometrische und statistische Auswertung dargestellt. ERp29 diente dabei als Genotyp-Kontrolle und β-Aktin als Ladekontrolle.

Durch diese Analyse konnten Organ-spezifische Unterschiede in der Expression von BiP und sXBP1 gezeigt werden, es konnten jedoch keine Genotyp-relevanten Veränderungen festgestellt werden. Das gleichbleibende Expressionlevel dieser Proteine könnte als Hinweis auf die normalen Funktionen des sekretorischen Gewebes auch in Abwesenheit von ERp29 in ungestressten Mäusen betrachtet werden.

## 6 Diskussion

Gezielte Genmutation-Technologien repräsentieren ein kraftvolles Werkzeug für die biomedizinische Forschung. Bei Knockout Mäusen wird ein Gen gezielt ausgeschaltet, um seine Funktion *in vivo* zu untersuchen. Diese Arbeit beschreibt einen Teilaspekt der Forschung unserer Arbeitsgruppe, deren Ziel die Aufklärung der Rolle von ERp29 in der Zelle und im gesamten Organismus ist. Die ERp29KO Maus ist das einzige lebende Maus-Modell, der ein Protein, ein Mitglied der PDI Familie, fehlt. Alle bisherigen Versuche zum Ausschalten anderer PDI-Proteine führten zum Mißerfolg durch die embryonale oder postnatale Letalität (Garbi et al., 2006; Coe and Michalak, 2010; [www.euromphenome.org](http://www.euromphenome.org)).

### 6.1 Untersuchung der Funktion von ERp29 in der Zellkultur

Es gibt mittlerweile viele Untersuchungen über die biologische Funktion von ERp29. Einige sind zum Teil widersprüchlich. Außerdem geben sie keine Antwort über den Wirkmechanismus des ERp29 und über die Signaltransduktionswege, an denen es beteiligt sein könnte.

Für die Untersuchung der Rolle von ERp29 bei der Krebspathogenese wurden in dieser Arbeit Vergleichsstudien zwischen immortalisierten ERp29-defizienten 3T3 Zelllinien und WT 3T3 Zelllinien durchgeführt.

Primäre adulte Zellen dienen zur Untersuchung einiger Aspekte von Zellfunktionen in einer normalen diploiden Zellpopulation, die in ihren Eigenschaften für einen gesunden Organismus repräsentativ sind.

#### 6.1.1 Maus-Embryo-Fibroblasten als Modell für Studien der Rolle von ERp29 bei der Krebsentstehung und beim oxidativen Stress

Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) bieten im Vergleich zu anderen Zell-Typen mehrere Vorteile als Modell-System für verschiedene Studien. Sie sind relativ einfach zu isolieren und zu kultivieren. Außerdem stellen diese Zellen ein geeignetes System für die Untersuchung der Funktion einzelner Gene in der Apoptose, der Zellzyklusregulation, Immortalisation, Seneszenz usw. dar.

##### 6.1.1.1 Immortalisierung der ERp29-defizienten MEF

Primäre embryonale Fibroblasten werden aus dem ganzen Embryo isoliert. Dadurch entsteht eine heterogene Population von Zellen mit unterschiedlichem Ursprung und unterschiedlicher Entwicklungsgeschichte.

Die Zellen wurden nach dem 3T3-Protokoll immortalisiert, das bereits im Jahr 1963 von Todaro und Green etabliert wurde. Dafür wurden die Zellen als subkonfluenter Monolayer kultiviert und alle drei Tage geteilt. Die Immortalisierung der ERp29-defizienten Fibroblasten verlief unter diesen Bedingungen ähnlich wie bei WT Fibroblasten (Abb. 7). Unabhängig vom Genotyp reduzierten primäre embryonale Fibroblasten ihr Wachstumspotential während der ersten zwölf Passagen bis zum Wachstumsminimum in der 15. Passage (Zellkulturkrise). Die Zellkulturkrise wird vermutlich durch die Kultivierungsbedingungen *in vitro* ausgelöst. Im Gegensatz zu den Bedingungen im Organismus fehlen den embryonalen Fibroblasten in der Zellkultur natürliche Botenstoffe und Zell-Zell-Kontakte, die das Wachstum und die Teilung der Zellen streng kontrollieren. Stattdessen werden die Zellen mit einer veränderten Nährstoffzusammensetzung im Medium und mit einer höheren Sauerstoff-Konzentration konfrontiert. Dies löst vermutlich die zelluläre Stressantwort aus, die mit Seneszenz und mit Zelltod meistar Zellen verbunden ist (Sherr and DePinho, 2000).

Nach der Zellkulturkrise erhöhten die Zellen durch die verminderte Verdoppelungszeit als immortalisierende Zellen unabhängig vom Genotyp kontinuierlich ihre Wachstumskapazität. Dies ist der erste Schritt in Richtung der malignen Transformation (Baserga, 1997). Es gibt zwei mögliche Ursachen für die spontane Immortalisierung von MEF, die in der Literatur diskutiert werden. Zum Einen sind zur spontanen Immortalisierung nur die embryonale Fibroblasten von *Rodenta* fähig. Die menschliche Fibroblasten beispielsweise sind nach einer bestimmten Verdoppelungsanzahl in der Kultur absterben (Hayflick, 1965). Die Ursache dafür könnte an der Telomerase-Aktivität liegen. Telomerase ist ein Enzym, das aus einer RNA-Komponente und einer katalytischen Einheit besteht (Goytisolo and Blasco, 2002). Jede Teilung humaner Fibroblasten verursacht eine Verkürzung der Telomere aufgrund unvollständiger DNA-Replikation, was letztendlich zur Seneszenz und Absterben der Zellen führt. Die progressive Telomere-Erosion ist in den Zellen verhindert, die eine hohe Telomerase-Expression aufweisen. (Blackburn, 2001). Viele somatische Zellen exprimieren nicht genug Telomerase. Im Gegensatz dazu besitzen die MEF extrem lange Telomeren und, so wie Krebszellen, eine hohe Telomerase-Expression (Serrano and Blasco, 2002).

Zum anderen finden während der Zellteilung in einigen Zellen spontane Mutationen statt. DNA der murinen Fibroblasten während der Zellkulturkrise ist reich an Brüchen in der Einzelstrang DNA (Macieira-Coelho and Azzarone, 1988). Einer der Auslöser dafür ist der höhere Sauerstoffgehalt unter Zellkultur-Bedingungen, der den oxidativen Stress in Zellen und infolgedessen die erhöhte Mutationsfrequenz verursacht. Auch die veränderte

extrazelluläre Umgebung, wie z.B. die Versorgung mit Wachstumsfaktoren und fehlende interzelluläre Kontakte, führt zum vermehrten Auftreten der Mutationen (Busutil et al., 2003). Einige dieser Mutationen sichern das Überleben der Zellen während der Zellkulturkrise und machen die Zellen immortal (unbegrenzt lebend).

Da solche Mutationen stochastisch und nicht kontrollierbar sind, entstehen Zelllinien, die sich nicht nur aus verschiedenen Embryonen, sondern in verschiedenen Zelleinsätzen aus einem Embryo unterscheiden. Diese Unterschiede können sich in verschiedenen Wachstumskinetiken oder in verschiedenen Stressantworten äußern. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass das Ausschalten einiger Gene die Proliferationskinetik beeinflussen kann. Beispielsweise treten Vimentin-defiziente embryonale Fibroblasten wesentlich schneller in die Zellkulturkrise ein und zeigen nach der Immortalisierung eine extrem niedrige Proliferationsrate (Tolstonog et al., 2005). Offensichtlich beeinflusste die Abwesenheit von ERp29 in MEF weder ihre Proliferationskinetik, noch ihre Immortalisierungsrate. Letztere betrug unabhängig vom Genotyp 60 % der Anzahl eingesetzter Embryonen.

Nach dem 3T3-Protokoll immortalisierte Zelllinien besitzen sowohl die Eigenschaften von Krebszelllinien (unbegrenzt lebend), als auch Eigenschaften primärer Zellen durch ihre Fähigkeit zur Zell-Zell-Kontaktinhibition (Todaro and Green, 1963). Diese Eigenschaften machen 3T3 Zelllinien zu einem beliebten Modell für verschiedene Stress-Studien.

#### **6.1.1.2 Charakterisierung primärer und immortalisierter ERp29KO MEF**

Die chromosomale Instabilität während der Immortalisierung der MEF gilt auch als Kennzeichen vieler Tumore und wird häufig als Ursache für die Tumorentstehung angesehen (Rajagopalan et al., 2003). Weitere Merkmale der malignen Veränderungen stellen die verstärkte Klonogenität und die Migration der Zellen dar (Kuzumaki et al., 1996).

Durch Klonogenität-Studien kann die Fähigkeit einzelner Zellen zur Kolonienbildung ermittelt werden, was einen Teil des proliferativen Potentials der Zelle darstellt. Dafür wurden Zellen aus drei Wachstumsphasen eingesetzt: primäre Zellen (Passage 4), Zellen nach der Zellkulturkrise (Passage 21) und immortale 3T3 Zellen (Passage 28).

Die spontane Immortalisierung der C57BL/6N MEF führte zu zellulären Veränderungen, die sich in einem verstärkten Proliferationsverhalten gegenüber primären Zellen zeigten (Abb. 8). Dies wurde sowohl für WT, als auch für KO MEF festgestellt. Im Allgemeinen bildeten primären MEF bei einer niedrigen Zelldichte nur wenig Kolonien, was eine typische Eigenschaft für die primären nicht-malignen Zellen darstellt (Kuzumaki et al., 1996). Im Laufe der Kultivierung, nach der Zellkulturkrise, bildeten diese Zellen immer mehr

Kolonien (Passage 21), sodass für die immortalen Zellen (Passage 28) nach zwei Wochen Kultivierung keine einzelnen Kolonien sichtbar waren. Während für die primären MEF kein Genotyp-relevanter Proliferationsunterschied nachgewiesen werden konnte, zeigten immortalisierende KO MEF in der Passage 21 (nach der Zellkulturkrise) eine wesentlich verlangsamte Kolonienbildung und eine signifikant reduzierte Gesamtzellzahl. Im Laufe der Kultivierung, nach der Zellkulturkrise, bildeten die Zellen immer mehr Kolonien, sodass im Fall der immortalen Zellen (Passage 28) nach zwei Wochen Kultivierung keine einzelnen Kolonien sichtbar waren. Hierbei kann das verlangsamte Wachstum der immortalen KO MEF im Vergleich zu immortalen WT MEF nur als eine Tendenz bezeichnet werden. Dies lag an unterschiedlichen Genotyp-unspezifischen Wachstumsraten der immortalen MEF (siehe 5.1.1), die für den Klonogenitätsversuch eingesetzt wurden.

Um die weiteren malignen Eigenschaften zu ermitteln wurde das Proliferationsverhalten von primären (Passage 4) und immortalen Zellen (Passage 28) in der Anwesenheit von *chicago sky blue* (CSB) untersucht. Das CSB ist ein effektiver Inhibitor, der die Interaktion zwischen HIVirus-1 und der Zelle verhindert (Clanton et al., 1992). Außerdem wird der Azobenzidin-Kern des CSB zu karzinogenen aromatischen Aminen *in vitro* umgewandelt (Yin and Hamilton, 2005).

In Toxizitätsstudien (24 h Behandlung) konnte eine höhere Empfindlichkeit primärer Fibroblasten für die CSB-Behandlung ( $IC_{50} \approx 650 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu immortalen Zellen ( $IC_{50} \approx 950 \mu\text{M}$ ) festgestellt werden; es gab jedoch keine Genotyp-relevante Unterschiede (Abb. 9). Der toxische Effekt von CSB scheint auch Zelltyp-abhängig zu sein, da die Behandlung von ARPE-19 Zellen mit der doppelten Konzentration an CSB (2 mM) kaum eine Beeinträchtigung der Vitalität (90 %) verursachte (Haritoglou et al., 2005).

Erst in Klonogenitätsstudien zeigten sich primäre und immortale KO Zellen als mehr empfindlich für die CSB-Behandlung im Gegensatz zu WT Zellen. Hierbei wiesen die immortale KO Zellen bei 25  $\mu\text{M}$  einen 5-fach und bei 50  $\mu\text{M}$  einen 10-fach reduzierten Zellzuwachs auf (Abb. 11). Ähnliche Tendenzen wurden in Migration-Studien mit immortalen Zellen festgestellt. Zellmigration gehört zu einer fundamentalen Eigenschaft, die während der embryonalen Entwicklung, bei der Wundheilung und bei der Krebspathogenese eine wichtige Rolle spielt (Berens and Beaudry, 2004). Dabei verbreiteten sich KO MEF in Anwesenheit von CSB wesentlich langsamer als WT Zellen (Abb. 12).

Es handelte sich bei Klonogenitäts- und bei Migrationsstudien um einen milden Langzeitstress, weil die Zellen 14 Tage lang mit niedrigen CSB-Konzentrationen behandelt wurden. Die dadurch entstandenen inhibitorischen Effekte könnten sowohl durch die direkte

CSB-Wirkung als auch indirekt durch dessen Zerfallprodukte (aromatische Amine) verursacht werden. CSB ist bekanntlich ein Farbstoff, der eine tiefblaue Farbe hat (Islam et al., 2011). Die Färbung basiert auf einer chemischen Reaktion zwischen den Sulfonsäure-Gruppen des Farbstoffes und den nukleophilen Gruppen, wie z.B. Aminogruppen des Lysins und Arginins oder Hydroxogruppen anderer Aminosäuren, auf der Proteinoberfläche. Dadurch werden Proteinmoleküle mit diesem Farbstoff beschichtet (Tsopeles and Sutton, 2002). Vermutlich führt diese chemische Modifikation der Proteinoberfläche zur Einschränkung oder gar zum Verlust der Funktionalität einiger Proteine. Außerdem kann der Azobenzidin-Kern des CSB *in vitro* zu karzinogenen aromatischen Aminen umgewandelt werden (Yin and Hamilton, 2005). Letztere verursachen in der Zelle DNA-Schaden, erzeugen ROS und führen so zu den malignen Veränderungen in der Zelle (Skipper et al., 2010).

Laut der Literatur verhindert das ERp29 die Krebs-Entwicklung. Klinische Studien zeigten sinkende mit der Krebs-Progressierung ERp29-Expression, während die ERp29-Überexpression zu G0/G1-Arrest führte und in der Proliferation-Inhibierung der MDA-MB-231 Zellen resultierte. Daraufhin wurde das ERp29 als neuer Regulator in Betracht gezogen, der zur Suppression des Krebs-Wachstums fähig war (Bambang et al., 2009b). Unsere Untersuchungen zeigten aber, dass das karzinogene CSB die Kolonienbildung und die Migration der 3T3 KO Zellen wesentlich stärker als die der 3T3 WT Fibroblasten hemmte.

Um die Ursache für das unterschiedliche Proliferationsverhalten zwischen KO und WT festzustellen, wurden die mit CSB behandelten Zellen mittels Western Blot analysiert. CSB besitzt eine tiefblaue Farbe und verfärbt die Zellen bereits nach einer 24-stündiger Behandlung. Aufgrund der Eigenfluoreszenz von CSB (Ex/Em 600/690 – 720 nm) (Islam et al., 2011) konnte nach dem Proteintransfer auf der Nitrozellulose-Membran ein intensives Fluoreszenzsignal im Cy5-Kanal detektiert werden (Abb 13a). Da CSB nicht nur mit der Proteinoberfläche interagiert, sondern auch mit steigender Konzentration Dimere und höhere Aggregate in der Lösung bildet (Islam et al., 2011), war der kummulative Effekt mit steigender CSB-Konzentration (25  $\mu$ M vs. 50  $\mu$ M) deutlich zu erkennen. Daher wurden für die Proteinfärbung auf der Membran Cy3-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet, weil das CSB in diesem Fluoreszenzkanal keine Signale ergab (Abb. 13b).

Mittels Western Blot wurde eine Reihe der ER-Stress-Proteine analysiert, die an der ER-Qualitätskontrolle (BiP, GRp94, PDI, CRT), an der redox-Homeostase und an der Antwort auf oxidativen Stress (BiP, ATF6) beteiligt sind. Allerdings ergab die 24-stündige CSB-Behandlung keine Veränderungen der Expression dieser ER-Proteine im Vergleich zur

Kontrolle (Abb.14). Eine Analyse der Proben nach längeren Inkubationszeiten war wegen der kumulativen Effekte von CSB technisch nicht möglich. Der Einsatz anderer Inhibitoren mit ähnlicher Struktur aber niedrigerem IC<sub>50</sub>-Wert könnte als mögliche Problemlösung in Betracht gezogen werden. Dies wäre im Rahmen einer erweiterten wissenschaftlichen Arbeit zu überprüfen.

In Hinsicht auf maligne Veränderungen spielen außerdem die epithelial-mesenchymale und mesenchymal-epitheliale Übergänge eine Schlüsselrolle. Wenn eine ERp29-Überexpression zum mesenchymal-epitheliale Übergang und zum Vimentin-Verlust führte (Bambang et al., 2009b), zeigten unsere Untersuchungen keine Auffälligkeiten in der Zytoskelett-Organisation, in der intrazellulären Vimentin-Verteilung in ERp29-defizienten Zellen (Abb. 15).

Eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, sowie bei der Wundheilung spielt auch Connexin43 (Cx43). Beispielsweise zeigten die Mäuse mit einer reduzierten Cx43-Expression eine schnellere Wundheilung (Solan and Lampe, 2009). Trotz neuerer Untersuchungen, in denen die Rolle von ERp29 als Chaperon bei der Stabilisierung des monomeren Cx43 im ER gezeigt wurde (Das et al., 2009), wiesen ERp29-defiziente Zellen keine Unterschiede in der Cx43-Verteilung im Vergleich zum WT auf. Dabei konnten in beiden Zelllinien punktförmige Cx43-Ansammlungen (Cx43-Oligomere) an der Zelloberfläche festgestellt werden (Abb. 16). Cx43 ist ein *gap junction*-Protein, das multimere Membran-Kanäle für die interzelluläre Kommunikation bildet. Diese Kanäle sind an den elektrophysiologischen Prozessen in Herzmuskel und im Gehirn beteiligt. Sein Verlust (Cx43(-/-) Mäuse) resultiert in neonataler Letalität (Söhl and Willecke, 2004). Falls ERp29 für die Stabilisierung von Cx43 und für die Bildung von *gap junctions* essenziell wäre, hätten die ERp29KO Mäuse vermutlich keine Überlebenschance oder litten an schweren Herz-Erkrankungen. Dies konnte jedoch durch unsere Studien widerlegt werden.

Somit konnte die Rolle von ERp29 bei der Krebsentstehung und bei der Stabilisierung des Cx43 nicht bestätigt werden. Dennoch dürfen unsere Untersuchungen nicht als Widerspruch der Literatur-Daten betrachtet werden. Dies könnte ein Hinweis auf die Komplexität der ERp29-Funktion in der Zelle sein und bedarf Untersuchungen weiterer Signaltransduktionswege und möglicherweise anderer methodischer Ansätze.

### **6.1.1.3 Studien der Antwort auf oxidativen Stress bei embryonalen Fibroblasten**

Molekularer Sauerstoff ist für mehrere biologische Ereignisse notwendig, die mit aerober Existenz verbunden sind. Dies ist mit ständiger ROS-Produktion verbunden. Diese Nebenprodukte sind potentielle Regulatoren der Zellfunktion. Sie können aber auch zu

oxidativen Schädigungen führen, die die antioxidative Kapazität der Zelle überladen, was in der Apoptose oder Nekrose resultieren kann (Buettner, 2011).

In dieser Arbeit wurden 3T3 Zelllinien mit oxidativen Substanzen verschiedener Schadensgraden behandelt: Wasserstoffperoxid, Diamid und Menadion. Die größte Resistenz zeigten embryonale Fibroblasten gegen die Wasserstoffperoxid-Behandlung ( $IC_{50} \approx 1000 \mu M$ ), unabhängig von ihrem Genotyp (Abb. 25a, 26). Wasserstoffperoxid ist ein in kleinen Mengen natürlich in der Zelle vorkommender Stoff, der an mehreren zellulären Regulationsmechanismen, unter anderem an der Regulation des Zellwachstums und des Zellzyklus beteiligt ist (Buettner, 2011).

Größere Empfindlichkeit wurde nach der Behandlung mit Diamid festgestellt (Abb. 25b, 26). Hierbei zeigten sich KO MEF als weniger empfindlich ( $IC_{50} = 189 \mu M$ ) für diese Art von oxidativem Stress im Vergleich zum WT ( $IC_{50} = 253 \mu M$ ). Diamid ist ein mild oxidierendes Agens, das leicht die Zellmembran durchdringt und nicht-enzymatisch mit den intrazellulären Thiolen reagiert, ohne lipoperoxidative Effekte zu verursachen (Piccirillo et al., 2009). Mittels FACS-Analyse konnten diese Genotyp-relevanten Unterschiede jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 27b). Der Grund dafür könnte an der technischen Ausführung der Versuche liegen. Bei der FACS-Analyse können vitale, apoptotische und nekrotische Zellen mit einer hohen statistischen Signifikanz durch die Erfassung einer großen Zellzahl gemessen werden. Die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes basiert auf der Färbung adhärenter Zellen nach ihrer Fixierung. Dabei wird der  $IC_{50}$ -Wert indirekt über die Konzentrationsbestimmung des durch die adhärenenten Zellen absorbierten Farbstoffes berechnet (siehe 4.2.5.10). Nach eigener Beobachtung gehen einige Zellen beim akuten Stress ohne Apoptose-Stadium direkt in die Nekrose über und bleiben dadurch an der Zellkulturplatte fixiert. Dies wurde in mehreren unabhängigen Versuchen anhand der Propidiumiodid-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Bilder nicht gezeigt). Diese nekrotischen adhärenenten Zellen und zum Teil auch die Zellkulturplatte selbst absorbieren den Farbstoff und ergeben ein falsch positives Signal. Dennoch ist diese Methode für die Rasterung und für die Etablierung neuer Bedingungen gut geeignet, weil sie ohne großen technischen und zeitlichen Aufwand durchgeführt werden kann. Hierbei ist jedoch eine Verifizierung der Daten durch andere Methoden, wie z.B. FACS-Analyse, erforderlich.

Der größte Schadensgrad bei den embryonalen Fibroblasten wurde durch die Behandlung mit Menadion verursacht (mit einem  $IC_{50} \approx 40 \mu M$  unabhängig vom Genotyp der Zellen) (Abb. 25c, 26). Menadion oder Vitamin  $K_3$  ist ein Quinon, das zur Gruppe der K-Vitamine gehört.

Es bewirkt Radikalbildung durch eine Serie zytotoxischer Reaktionen. Menadion inhibiert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle aus dem extrazellulären Medium und verursacht somit größere Schäden in der Zelle als Diamid oder Wasserstoffperoxid (Kawamura et al., 2010).

Auch durch die FACS-Analyse konnten keine Genotyp-spezifische Unterschiede sowohl in der Apoptose, als auch in der Nekrose nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid und mit Menadion festgestellt werden (Abb. 27a, 27c).

Vergleichbare Studien wurden von Piccirillo et al. (2009) mit AGS-Zellen durchgeführt. Diese Krebszelllinie zeigte etwa die gleiche Sensitivität für die Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Diamid ( $\text{IC}_{50}$ ) wie 3T3 MEF in unseren Studien. Allerdings stellten diese Autoren fest, dass die gleiche Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  kaum eine Apoptose-Veränderung im Vergleich zur Kontrolle verursachte und bezeichneten AGS-Zellen daher als  $\text{H}_2\text{O}_2$ -resistent.

Im Gegensatz zu Diamid ist  $\text{H}_2\text{O}_2$  relativ instabil. Die Angaben in der Literatur über die wirksame Wasserstoffperoxid-Konzentration sind sehr unterschiedlich. Sie erfassen einen großen Konzentrationsbereich von 25 - 50  $\mu\text{M}$  im serumfreien Medium (Cano et al., 2009; Iwakami et al., 2011) bis zum Bereich einige mM im serumhaltigen Medium (Keil et al., 2006). Aufgrund der hohen Reaktivität wird das  $\text{H}_2\text{O}_2$  im serumhaltigen Medium schnell zersetzt. Dies wurde in Rahmen dieser Arbeit mittels spezifischer und sensitiver FOX-Methode analysiert. Dank dieser Methode ist es möglich, kleine Mengen an Wasserstoffperoxid in verschiedenen organischen Substanzen und Medien zu bestimmen (Gay et al., 2003). Dabei bildet  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Xylenolorange farbige Komplexe, die bei 560 nm absorbieren. Außerdem spielt die zeitliche Konzentrationsänderung als Kontrolle für den gleichwertigen Stress zwischen verschiedenen Experimenten eine wichtige Rolle.

Mittels der FOX-Analyse wurde festgestellt, dass bereits nach 15 min Inkubation von 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nur 10  $\mu\text{M}$  bleiben (Abb. 22). Nach 30 min war hier kein Wasserstoffperoxid detektierbar. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung lag bei MEF bei 1000  $\mu\text{M}$  eingesetzter Konzentration (Abb. 26), die nach 15 min Inkubation der 100  $\mu\text{M}$  Restkonzentration im Medium entsprach (Abb. 22).

Laut Literatur sind die Zellen in der Lage, ihre Umgebung durch die Sekretion verschiedener Stoffe zu verändern. Als Antwort auf oxidativen Stress wird beispielsweise das Enzym Katalase freigesetzt, das das Wasserstoffperoxid im Medium zerstört und auf diese Art seine schädliche Wirkung auf Zellen verringert (Shuvaev et al., 2009). In diesem Zusammenhang entstand die Vermutung, dass die Abwesenheit von ERp29 durch die Veränderung in sekretorischen Vorgängen eine veränderte Zersetzung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Medium von KO Zellen hervorrufen könnte.

Unsere Analyse zeigte eine schnellere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zersetzung im Medium mit Zellen, als im zellfreien Medium (Abb. 22, 23). Im Medium beider Zelltypen waren 200  $\mu\text{M}$  und 600  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid bereits nach 15 min kaum detektierbar (entsprechend 1 % und 2 %). 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  verschwanden nach 60 min Inkubationszeit (1 % Restkonzentration), während im Medium ohne Zellen auch nach 90 min 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (etwa 5 %) detektiert werden konnten. Allerdings konnten im Zersetzungsverlauf keine Genotyp-spezifischen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 23a).

In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von ERp29 bei MEF keine Anomalien bei der Antwort auf durch Wasserstoffperoxid, Diamid und Menadion ausgelösten oxidativen Stress verursacht.

### **6.1.2 Dermale Fibroblasten als Modell für Studien der Rolle von ERp29 bei der Alterung und beim oxidativen Stress**

Alterung ist durch den Abfall in physiologischen Funktionen charakterisiert, was letztendlich zu altersbedingten Krankheiten und zur Sterblichkeit führt. Die Mechanismen, die zu einer Veränderung der Funktionen führen, sind noch unklar. Einige Hinweise deuten auf die Beteiligung endogener Oxidationsmittel an der Entstehung von altersbedingten Fehlern. Zu diesen Oxidantien gehören Superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), Wasserstoffperoxid und das Hydroxyl-Radikal ( $\text{HO}\cdot$ ). Sie schädigen zelluläre Makromoleküle wie DNA, Proteine und Lipide. Dies geschieht vermutlich über die Zerstörung der Integrität von Mitochondrien. Ein Rückgang der Mitochondrien-Funktion führt zur vermehrter Produktion von Oxidantien und zu niedrigerer ATP-Produktion (Keil et al., 2006). Dies ist mit der Abnahme der Energie-abhängiger Prozesse und der ATP-vermittelten Signaltransduktionswegen, wie z.B. Apoptose, verbunden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass humane Fibroblasten von jungen Spendern (17 - 60 Jahre alt) nach der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung für Nekrose (nicht für Apoptose) weniger sensitiv als alte Zellen (von 60 - 80 Jahre alten Spendern) sind, was auf einen mangelhaften ATP-Level zurückzuführen ist (Miyoshi et al., 2006). Allerdings wurde diese Behandlung 16 h lang in einem FCS-freien Medium durchgeführt. FCS enthält eine Menge an Nährstoffen, Vitaminen und Wachstumsfaktoren, die für das Überleben primärer Zellen außerhalb des Körpers und ohne hormonelle Kontrolle essenziell sind. Allein der FCS-Entzug verursacht das Absterben von primären Zellen durch Nekrose.

In dieser Arbeit wurde eine Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in DMEM / 10 % FCS durchgeführt. Da das FCS eine schnelle  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerstörung fördert (gezeigt durch die FOX-Analyse) wurden 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eingesetzt, die dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert embryonaler Fibroblasten entsprechen (siehe 6.1.1). FOX-Analyse zeigte, dass diese Konzentration etwa 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (effektive

Restkonzentration) im Medium nach 15 min Inkubationszeit entspricht. So wie im Falle mit embryonalen Fibroblasten wurde im Medium mit dermalen Fibroblasten das Wasserstoffperoxid schneller zersetzt als im zellfreien Medium (Abb. 24).

In einer anderen Arbeit wurde höhere Sensivität beim oxidativen Stress in humanen dermalen Fibroblasten von alten Spendern anhang der LDH-Freisetzung nachgewiesen. Als Grund dafür wurde die altersbedingte Chaperonen-Defizienz in Betracht gezogen (Tandara et al., 2006). Alterung wird generell durch eine Abnahme der regulatorischen Funktionen der Zelle charakterisiert. Unter Stress-Bedingungen ist ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren für die Aufrechterhaltung der Homeostase in der Zelle notwendig, was in einer alternden Zelle nicht mehr gewährleistet werden kann. Es gibt sicherlich mehrere Faktoren, unter anderem auch die oben genannten, die dabei eine wichtige regulatorische Rolle spielen.

Entsprechend der Literaturangaben für humane dermale Fibroblasten wurde auch für murine dermale Fibroblasten von alten Mäusen (12 Monate alt) eine höhere Sensitivität unabhängig vom Genotyp im Vergleich zu Zellen aus jungen Mäusen (drei Monate alt) für die Behandlung mit Wasserstoffperoxid festgestellt (Abb. 28). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Alterung dieselben Veränderungen regulatorischer Mechanismen unabhängig von ERp29 auslöst. Auffallend ist jedoch, dass die KO Fibroblasten sowohl von jungen, als auch von alten Mäusen im Allgemeinen eine signifikant niedrigere Apoptose-Rate im Vergleich zu WT Mäusen hatten.

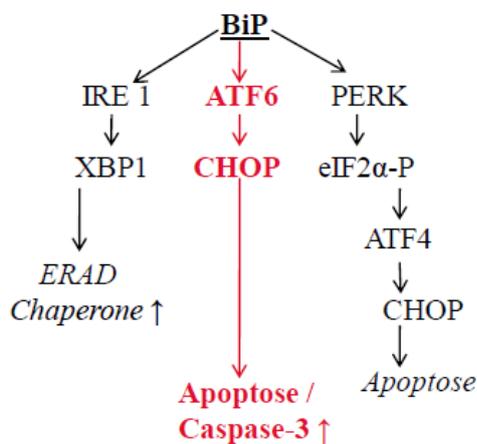
Die möglichen Ursachen unterschiedlicher Apoptose-Regulation wurden mittels Western Blot in jungen dermalen Fibroblasten analysiert. Alte dermale Fibroblasten konnten für diesen Versuch aufgrund niedrigerer Vitalität während der Kultivierung und der daraus resultierenden geringeren Zellzahl nicht verwendet werden.

Western Blot-Analyse zeigte keine Aktivierung der Faltungsmaschinerie (Abb. 29a) und der Autophagie (Abb 29c). Der oxidative Stress löste in dermalen Fibroblasten, unabhängig von ihrem Genotyp, eine Aktivierung der UPR-Kaskade aus (Abb. 29b). Dabei wurde der gleiche Anstieg des BiP-Levels (um 20 %) unabhängig vom Genotyp der Zellen beobachtet (Abb. 30). BiP dient als ein Marker für ER-Stress und löst im Zusammenspiel mit den Transmembranproteinen IRE1, ATF6 und PERK eine Stressantwort auf die ungefalteten Proteine (UPR) aus.

Die Analyse weiterer Mitglieder der UPR-Kaskade zeigte einen im Vergleich zu WT niedrigeren ATF6-Level (um 30 %) in ungestressten KO Zellen. Nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung fand die ATF6-Hochregulation um etwa 20 % in KO und um 80 % in WT Zellen statt. Somit war das ATF6-Gesamtlevel in gestressten KO Zellen um 90 % niedriger im Vergleich zu

gestressten WT Zellen (Abb. 30). Laut der Literatur ist das ATF6 für die Aktivierung und Hochregulation von XBP1 und von CHOP zuständig (Verfaillie et al., 2010). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung bewirkte aber keine sXBP1-Erhöhung in beiden Zelltypen (Abb. 29b). sXBP1 ist für das Überleben der Zellen durch die Regulation der ERAD und EDEM im ER verantwortlich. Sein unverändertes Expressionslevel in gestressten Zellen korrelierte zudem mit der inaktiven Fatungsmaschinerie.

Der proapoptotische Transkriptionsfaktor CHOP war in WT Zellen um etwa 60 % hochexpressiert. Hingegen konnte in KO Zellen kaum eine CHOP-Aktivierung festgestellt werden. CHOP induziert eine Hochregulation des BH3-only Proteins Bim und aktiviert über Caspase-12 den Caspase-3-vermittelten Apoptoseweg (Piacentini et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass in KO Zellen auch nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung keine Caspase-3-Aktivierung stattfindet. In WT Zellen konnte eine höhere proCaspase-3-Expression und entsprechende Hochregulation der aktiven Caspase-3 mittels Western Blot-Analyse gezeigt werden (Abb. 29d). Diese Daten entsprechen den FACS-Messungen (Abb. 28) und deuten auf eine im Vergleich zum WT niedrigere Sensitivität der ERp29-defizienten Zellen für die Apoptose hin.



**Abbildung 46.** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Regulation der UPR-Kaskade in dermalen Fibroblasten beim oxidativen Stress. Die UPR-Kaskade besteht aus drei Achsen. Abhängig vom Stress-Stimuli und vom Zelltyp können diese Achsen beim ER-Stress unterschiedlich reguliert werden. Anhand der Western Blot-Analyse wurde festgestellt, dass die ATF6-CHOP-Achse (rot markiert) in KO Zellen beim ER-Stress weniger aktiv war als in WT Zellen.

Die Analyse der Antwort auf oxidativen Stress in jungen dermalen Fibroblasten zeigte Genotyp-spezifische Unterschiede bei der UPR-Aktivierung. Mittels Western Blot-Analyse wurde festgestellt, dass in WT Fibroblasten nur die ATF6-CHOP-Achse nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung aktiviert wurde (Abb. 46). Da die Aktivierung der ATF6-CHOP-Achse, gefolgt von der Caspase-3-Aktivierung, Apoptose auslöst, konnte eine Zunahme der apoptotischen Zellen beim oxidativen Stress für WT Fibroblasten festgestellt werden. In KO Fibroblasten blieb die ganze UPR-Kaskade hingegen inaktiv. Daher konnte durch 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine Apoptose in jungen KO Fibroblasten ausgelöst werden. Die alten Fibroblasten zeigten

dieselben Genotyp-spezifischen Unterschiede aber eine höhere Empfindlichkeit zum oxidativen Stress. Vermutlich würden die alten Zellen auch größere Unterschiede bei der UPR-Aktivierung zeigen. Da das Zellmaterial für die Western Blot-Analyse allerdings nicht ausreichend war, könnten Antikörper-beschichtete Chips als mögliche Problemlösung in Betracht gezogen werden. Dies ist jedoch kostenintensiv und wäre im Rahmen einer erweiterten wissenschaftlichen Arbeit zu überprüfen.

### **6.1.3 Inhibierung der N-Glykosylierung des Thyreoglobulins mittels Tunicamycin-Behandlung**

Die Blockierung der N-Glykosylierung führt zur Akkumulierung des Proteins im ER und, als Folge dessen, zur UPR. Diese Inhibierung wurde durch die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin erreicht. Tunicamycin ist ein Gemisch von homologen Nukleosid-Antibiotika, das die GPTase und somit den ersten Schritt der Glykoprotein-Synthese inhibiert.

Die Inhibierung der N-Glykosylierung durch die Behandlung mit Tunicamycin blockiert den intrazellulären Tg-Transport (vom ER zum Golgi) durch die biologisch irreversible Proteinaggregation (Kim and Arvan, 1995). Wie erwartet, verursachte die Inhibierung der N-Glykosylierung unabhängig vom Genotyp eine Tg-Akkumulierung in den Zellen. Dies bewirkte auch eine Hochregulation der Faltungshelfer (CNX, GRp94, ERp72) (Abb.31).

Erst bei der Aktivierung der UPR-Kaskade konnten einige Genotyp-spezifischen Unterschiede festgestellt werden. Dabei wurden zwei Arten vom ER-Stress untersucht: milder Stress (1,5 µg/ml, 18 h Behandlung) und akuter Stress (10 µg/ml, 6 h Behandlung). Beide Arten von Stress sind unabhängig vom Genotyp der Zellen durch gleichen Anstieg des BiP-Levels gekennzeichnet.

Beim milden dauerhaften Stress in WT Zellen wurde mittels Western Blot-Analyse eine Aktivierung der gesamten UPR-Kaskade festgestellt, die in der Hochregulation der ATF6, ATF4, XBP1, CHOP und der Phosphorylierung des eIF2 $\alpha$  resultierte (Abb.32). Die Aktivierung der PERK-Achse verläuft über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors eIF2 $\alpha$  und über die nachfolgende ATF4-Aktivierung (siehe 1.4). Die ERp29-Abwesenheit scheint keine Auswirkung auf die Aktivierung dieser Achse, sowie auf die Aktivierung der IRE1-Achse zu haben.

Genotyp-relevante Unterschiede wurden bei der Aktivierung der ATF6-CHOP-Achse festgestellt. Während in WT Thyreozyten nach der Tunicamycin-Behandlung eine 50 %ige ATF6-Zunahme festgestellt werden konnte, zeigten die KO Zellen keine ATF6-Hochregulation. Auch das CHOP-Level war in gestressten KO Zellen im Vergleich zum WT wesentlich niedriger (Abb. 32). Seine Hochexpression findet in KO Zellen vermutlich nur

aufgrund der ATF4-Aktivierung statt, während in WT Zellen zwei UPR-Achsen (ATF6- und PERK-ATF4-Achsen) daran beteiligt sind.

Beim akuten Stress waren alle untersuchten Chaperone (GRp94, BiP, ERp72) hochreguliert. Eine Hochregulation der UPR-Proteine (ATF6, ATF4, eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ -P, XBP1) konnte nicht festgestellt werden. Trotzdem war eine CHOP-Aktivierung in beiden Zelltypen deutlich zu erkennen, die im Vergleich zum milden Stress auch wesentlich höher war. Auch beim akuten Stress hatten die KO Zellen ein wesentlich niedrigeres CHOP-Level (etwa 150 %) im Vergleich zu etwa 210 % in WT Zellen (Abb.33). Vermutlich findet beim akuten Stress zu einem frühen Zeitpunkt eine Aktivierung der UPR-Kaskade statt, die später zur Aktivierung anderer Signaltransduktionwege in der Zelle führt. Daher konnte nach sechs Stunden nur eine CHOP-Hochregulation detektiert werden.

Wie bereits in neuronalen Zellen gezeigt wurde, führt die CHOP-Hochregulation beim ER-Stress zur JNK-Phosphorylierung und zur Apoptose-Aktivierung. Daran ist Caspase-12, ein ER-Resident, beteiligt. Ihre Aktivierung führt zur Caspase-3-vermittelten Apoptose (Morishima et al., 2002; Reijonen et al., 2008). Durch die Analyse der Caspase-3-Aktivität konnte gezeigt werden, dass ihre Aktivierung in Thyreozyten nur beim akuten Stress stattfand (10  $\mu$ g/ml Tunicamycin). Allerdings war ihre Aktivität in KO Zellen im Vergleich zu der in WT Zellen wesentlich niedriger, was auch mit dem CHOP-Level in gestressten Zellen übereinstimmt.

Laut neuesten Untersuchungen ist ERp29 an der UPR-Aktivierung bei durch Doxorubicin ausgelösten genotoxischen Stress beteiligt. Seine Rolle bei der Apoptose-Regulation scheint jedoch nicht eindeutig zu sein. Beispielsweise zeigten Gao et al. (2011), dass in ERp29-überexprimierenden MDA-MB-231 Zellen eine p58(IPK)-Hochregulation stattfindet. Letztere ist in der Lage die Phosphorylierung des eIF2 $\alpha$  zu verhindern, was zur Herunterregulation der gesamten PERK-ATF4-CHOP-Caspase-3-Achse führte (Gao et al., 2011). Demzufolge zeigten die ERp29-überexprimierende Zellen eine Unterdrückung der Apoptose im Vergleich zur Kontrolle. Farmaki et al. (2011) konnten hingegen keinen Effekt auf die eIF2 $\alpha$ -Regulation in ERp29-überexprimierenden A549 Zellen zeigen. Da die mutante Form von ERp29 doch zur Inhibierung der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung führte, schlugen sie vor, dass das ERp29 nur „bedingt“ die Aktivierung der PERK-Achse regulieren kann. Dennoch definierten sie das ERp29 als einen neuen Regulator der Stressantwort über die UPR-Kaskade.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die ERp29-Abwesenheit keine Veränderungen in der Tg-Synthese oder in der Prozessierung verursacht, aber eine wichtige regulatorische Rolle in

der UPR-Kaskade beim akuten ER-Stress spielt und somit beeinflusst die nachfolgende Apoptose-Aktivierung. Ähnlich den dermalen KO Fibroblasten (siehe 6.1.2) war auch in KO Thyreozyten die Aktivität der ATF6-CHOP-Achse während der UPR herunterreguliert. Dies führte zur Apoptose-Resistenz in adulten KO Thyreozyten.

Daher wäre eine detaillierte Untersuchung der UPR beim akuten und beim milden ER-Stress in ERp29-defizienten Zellen von großer Bedeutung, um die neuen Einsatzpunkte für die Therapie der ER-bedingten Krankheiten (siehe 1.2) zu schaffen.

## **6.2 Phenotypisierung der ERp29 Knockout Maus**

Die untersuchten ERp29 Knockout Mäuse wiesen nach unseren ersten Beobachtungen weder äußerliche Anomalien (Abb. 35), noch Auffälligkeiten im Verhalten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren dieses Stammes (C57BL/6N) auf. Doch durch die mehrjährige Studien und primäre Phenotypisierung in GMC wurden Genotyp-spezifische Unterschiede auf den Gebieten: Verhalten, Endokrinologie und Stoffwechsel, Anatomie und Immunologie festgestellt. Um die Heterogenität der Tierpopulation zu reduzieren, wurden KO und WT Geschwister Mäuse untersucht.

### **6.2.1 Verhalten und Reproduktivität**

Anhand von Parameter wie Trächtigkeit und Anzahl der Jungtiere pro Trächtigkeit kann die reproduktive Erfolgsrate als ein Aspekt der reproduktiven Eigenschaften bestimmt werden (Crawley, 1999).

Die Beobachtung des elterlichen Verhaltensmusters ergab keine Auffälligkeiten zwischen Wildtyp (WT), Knockout (KO) und heterozygoten Eltern. Unabhängig vom Genotyp wurde ein unruhiges und suchendes Verhalten der Eltern während der Trennung vom Nachwuchs beim Umsetzen beobachtet. Allerdings ergab die Genotypisierung des Nachwuchses von heterozygoten Eltern keine typische Genotyp-Verteilung 1 WT : 2 Heterozygote : 1 KO. Nach mehrjährigen Beobachtungen wurde festgestellt, dass die heterozygoten Eltern entweder ganz, oder zum Teil ihre Nachkommen fressen. So konnte gezeigt werden, dass nur 60 % der verpaarten heterozygoter Weibchen ihre Nachkommen großziehen. Im Vergleich dazu beträgt diese Rate bei WT und KO Weibchen etwa 73 % (Tab. 6). Zwar haben heterozygote Weibchen nach der Geburt größere Würfe als WT oder KO Weibchen, doch in einem Alter von 4 Wochen sind die Würfe von WT und heterozygoten Weibchen gleich groß (Tab. 6). Die Genotyp-Verteilung im Wurf nach dem Absetzen von heterozygoten Eltern wurde zum Vorteil von WT Nachkommen verschoben. Dabei handelt es sich vermutlich um das selektive Fressen von KO Neugeborenen nach der Geburt. Diese Annahme konnte durch die

Tatsache, dass die embryonale Genotyp-Verteilung (E15) dem Mendel'schen Gesetz entspricht, bestätigt werden (Abb. 36). Durch diese Studien konnte festgestellt werden, dass die Abwesenheit von ERp29 keine Nachteile für die embryonale Entwicklung der KO Mäuse bringt, fördert aber postnatale Mortalität. Dieses Erkenntnis wurde bei der Planung von heterozygoten Verpaarungen berücksichtigt, weil die Nachkommen für die Vergleichsstudien zwischen WT und KO verwendet wurden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Wurfgröße und die Anzahl der lebenden Jungtieren bei KO Weibchen kleiner war als die der WT und Heterozygoten (Tab. 6). Es wird vermutet, dass ERp29 ein wichtiger Faktor für die Reifung der Spermien und für die Spermium-Oozyt-Verschmelzung ist. Guo et al. (2007) zeigten mittels LSCM (*laser scanning confocal microscopy*) und mittels Western Blot-Analyse, dass während des Reifens von Spermien eine ERp29-Akkumulierung in den Zellen des Nebenhodens stattfindet. Die funktionelle Blockierung von ERp29 durch spezifische Antikörper verhinderte das Eindringen von Spermien in die Oozyte und reduzierte so die Befruchtungsrate bei Mäusen (Ying et al., 2010).

Andere Verhaltensaspekte können bestimmte Symptome aufdecken, die für einige Krankheiten relevant sind. Für die Analyse des Schizophrenie-bezogenes Verhaltens diene beispielsweise die Untersuchung der Präpulsinhibition, die sowohl bei Menschen, als auch bei Mäusen ähnlich quantifizierbar ist. Die Einschränkungen dieses sensomotorischen Reflexes deuten gewöhnlich auf Schizophrenie hin. Die Untersuchung der KO Mäusen ergab aber eine Tendenz für stärkere Inhibition (ein zurückhaltendes Verhalten) im Vergleich zum WT (siehe 5.4.2.5).

Das Angst-bedingte Verhalten kann durch die Untersuchung der Mäuse im „offenen Feld“ charakterisiert werden. Typischerweise neigen die Mäuse im hellbeleuchteten offenen Feld dazu, sich eher an der Wand aufzuhalten, als in der Mitte. KO Männchen verbrachten etwa 10 % mehr Zeit in der Mitte, als WT Männchen und als Weibchen im Allgemeinen.

Zwar zeigten die KO Männchen im „offenen Feld“ weniger „ängstliches“ Verhalten, wurden sie jedoch durch die Schreckreize im anderen Versuch mehr inhibiert. Dieser auf den ersten Blick widersprüchliches Ergebnis lässt sich besser erläutern, wenn die anderen Untersuchungen, beispielsweise die Untersuchung der Griffstärke, berücksichtigt werden. Diese wurde als Charakteristik der Muskelstärke benutzt und zeigte, dass die Pfoten männlicher Mutanten um etwa 20 % schwächer sind, als die von WT Männchen und auch nicht stärker sind als die von Weibchen (siehe 5.4.2.4). Unter zusätzlicher Berücksichtigung niedrigerer Aktivität bei der senkrechten Aufrichtung männlicher Mutanten könnten alle

oben genannten Untersuchungen auf ein passives Verhalten bei den männlichen Mutanten hindeuten. Dies könnte als Hinweis auf sowohl motorische als auch sensorische Einschränkungen in Betracht gezogen werden.

### **6.2.2 Endokrinologie und Stoffwechsel**

Das endokrine System beinhaltet physiologische Mechanismen, die zusammen mit dem Nervensystem und dem Immunsystem die Kommunikation zwischen Zellen und Organen ermöglichen. Die vielschichtige Funktion des endokrinen Systems besteht vor allem in der Steuerung von langfristigen Prozessen wie Reproduktion, Wachstum, Homeostase lebenswichtiger Systeme (Wasser- und Elektrolythaushalt), sowie des Energiestoffwechsels.

Die Regulation der Hormonsekretion erfolgt über komplexe negative und positive Rückkopplungsmechanismen. Bei der funktionellen Verbindung verschiedener endokriner Drüsen spricht man von einer Achse. Die Hauptachsen des endokrinen Systems sind die Achsen Hypothalamus-Hypophysen-periphere Drüsen.

Bei der primären Phenotypisierung wurde mittels Hochdurchsatz LC-MS/MS Technologie ein unterschiedlicher Kortikosteron- und Testosteron-Gehalt im Plasma männlicher Mutante festgestellt (Tab. 8). Kortikosteron (Kortikosteron bei Nagetieren, Cortisol bei Menschen) ist ein Glukokortikoid, das zentrale Effektorhormon für die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse). Dieses Hormon stellt eine Hauptdeterminante bei der Stress-Antwort dar.

Grundsätzlich ist die Kortikosteron-Konzentration im Blut geschlechtsspezifisch. Die bei weiblichen Mäusen gemessene Konzentration an Kortikosteron war doppelt so hoch, wie bei Männchen, was einem normalen Wertspiegel entspricht und bereits in der Literatur beschrieben wurde (Goel and Bale, 2010). Doch innerhalb jeder Geschlechtsgruppe wurde eine Tendenz für höhere Kortikosteron-Konzentration bei KO Mäusen festgestellt. Während dieser Unterschied bei KO Männchen etwa 10 % zum WT beträgt, ist er bei Weibchen wesentlich niedriger - nur 2,7 %.

Im Ratten-Modell wurde gezeigt, dass eine Aktivierung der Kortikosteron-Freisetzung in einer Erhöhung der Herzrate, des Blutdruckes und des Metabolismus resultiert. KO Männchen zeigten Abweichungen im Fettstoffwechsel, und zwar einen höheren Gehalt an Fettabbauprodukten (freie Fettsäuren und Triglyceride) im Blut.

Die neuesten Studien zeigten, dass eine dauerhafte Prominenz der HHN-Hyperaktivität bei Menschen mit Depressionen und Angststörungen verbunden ist und ein Zusammenhang mit Psychopathologie bei Erwachsenen zeigt. Somit wären die Störungen des Angst-bedingten Verhaltens bei KO Mäusen erklärbar. Es lässt sich dabei vermuten, dass eine dauerhafte

Erhöhung der Kortikosteron-Freisetzung in einem Depression-ähnlichen Zustand resultiert und oben beschriebenes passives Verhalten bei KO Mäusen verursacht (siehe 6.2.1). Niedrigere Aktivität bei KO Mäusen verursacht vermutlich auch eine signifikant niedrigere respiratorische Rate.

Die Quantifizierung des Testosterons zeigte, wie erwartet, Geschlecht-spezifische Unterschiede in beiden genetischen Gruppen, und zwar eine wesentlich niedrigere Konzentration bei Weibchen. Es wurde außerdem ein signifikant niedrigerer Testosteron-Gehalt bei mutanten Männchen festgestellt – um fast 60 % im Vergleich zum WT. Laut der Literatur sind Glukokortikoide in der Lage die Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse auf mehreren Ebenen zu kontrollieren und die reproduktive Funktion zu hemmen. (Handa et al., 1994; Swaab et al., 2005). Dies führt zur Apoptose-Induktion bei testikulären Keimzellen. Darin ist die Aktivierung spezifischer Gene, wie Bcl-2 Familie, p53 und Fas, involviert (Sasagawa et al., 2001). Somit wäre die kleinere Wurfgröße bei ERp29-defizienten Mäusen erklärbar (siehe 6.1.1).

Im Allgemeinen hat die HHN-vermittelte Glukokortikoid-Sekretion sowohl adaptive, als auch negative Auswirkungen. Die akute Freisetzung von Cortisol bei Menschen während Stress ist für eine Erhöhung der Herzfunktion einerseits und für die Wachstumshemmung und Hemmung reproduktiver Funktion andererseits verantwortlich. Diese physiologische Reaktionen haben adaptive Eigenschaften, sind aber durch die begrenzte Körper-Kapazität limitiert. Die chronische Erhöhung von Cortisol ist im Gegenteil fast immer schädlich und resultiert in Insulin-Resistenz, in viszeralen Fettablagerungen, in Osteopenie und Osteoporose und in der Inhibierung von T-Zellen (zelluläre Immunität) (Plotsky and Meaney, 1993; Mello et al., 2003).

### **6.2.3 Immunität**

Glukokortikoide haben im Allgemeinen immunsuppressive und anti-entzündliche Wirkung. Das physiologische Level von endogenen Glukokortikoiden kann wichtige positive Auswirkungen auf verschiedene Aspekte der Immunantwort haben. Glukokortikoide werden in Nebennieren produziert und haben eine tiefgreifende Auswirkung auf immunologische Prozesse. Die Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem neuroendokrinen System ist beidseitig und wird über die Zytokine vermittelt (Turnbull and Rivier, 1999).

Die primäre Phenotypisierung zeigte eine signifikant reduzierte Anzahl an CD4 und CD8 exprimierenden T-Zellen bei ERp29-defizienten Mäusen (siehe 5.4.2.9). T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunantwort zuständig. CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten werden als Helferzellen angesehen. Ihr Rezeptor erkennt MHC-Klasse-II-Moleküle. CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

(Killerzellen) gelten als zytotoxische T-Zellen, deren Rezeptor die Antigene erkennt, die von antigenpräsentierenden Zellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind vor allem im peripheren Blut und in stark durchbluteten lymphatischen Geweben wie den parafollikulären Regionen von Lymphknoten, Milz und Tonsillen zu finden. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kann man dagegen eher im Knochenmark und in den lymphatischen Geweben der Magen-Darm-Schleimhaut, der Atmungsorgane und der Harnwege nachweisen. Diese Befunde stimmen mit den Literaturangaben überein. Beispielsweise zeigten Hyperkortisolämie-Patienten (mit Cushing's Krankheit) reduzierte *in vitro* Freisetzung von T-Zell IL-2 und von löslichem IL-2 Rezeptor im Vergleich zur Kontrolle (Daynes and Araneo, 1989; Sauer et al., 1994).

Weniger ist über die Rolle der Glukokortikoide in Funktion von B-Zellen und über die Produktion von Antikörpern bekannt. Einige Quellen berichten über eine positive Korrelation zwischen der endogenen Stress-induzierten Erhöhung von Glukokortikoiden und Antikörperproduktion, andere Experimente zeigten eine negative Korrelation oder gar keine Auswirkung auf das Antikörper-Level (Übersicht bei Fleshner et al., 2001).

Mittels FACS-Messung wurde festgestellt, dass die Anzahl der B-Zellen im Blut mutanter Mäuse im Vergleich zum WT deutlich erhöht war. B-Zellen sind die Träger der humoralen Immunantwort (Bildung von Antikörpern). Sie entstehen im Knochenmarkt. B-Zellen werden durch die körperfremde Strukturen (Antigene) aktiviert und produzieren daraufhin gegen diese Antigene gerichtete Antikörper.

#### **6.2.4 Anatomie und Organfunktion**

Wie es bereits erwähnt wurde, haben die KO Mäuse einen Stress-ähnlichen Zustand und sind einer erhöhten Kortikosteron-Freisetzung ausgesetzt.

Es wurde bereits bei Menschen gezeigt, dass eine chronische Erhöhung von Cortisol fast immer schädlich ist. Sie resultiert in Insulin-Resistenz, in viszeralen Fettablagerungen, in Osteopenie und Osteoporose (Mello et al., 2003). Ähnliche Studien in einem Ratten-Modell zeigten, dass der chronische milde Stress, infolge erhöhten Kortikosteron-Konzentration im Serum, zum Verlust der Knochenmasse und Knochenarchitektur führt (Bab and Yirmiya, 2010). Entsprechend dieser Literaturangaben wurden auch männliche KO Mäuse durch einen niedrigeren BMD-Wert ( $42 \pm 1 \text{ mg/cm}^2$ ) im Vergleich zum BMD-Wert des WT ( $45 \pm 1 \text{ mg/cm}^2$ ) charakterisiert (siehe 5.4.2.7).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine dauerhaft erhöhte Konzentration von endogenem Kortikosteron (z.B. beim Stress) das Auftreten von Hypertonie steigert und zur Manifestation von kardiovaskulären Krankheiten führt (Scheuer et al., 2004). Es wurde

festgestellt, dass die KO Mäuse eine Tendenz zur Verlängerung des PQ-Intervalls aufweisen. Dieses Intervall ist ein Ausdruck der atrioventrikulären Leitungszeit, also der Zeit zwischen dem Beginn der Erregung der Vorhöfe und der Kammern (Erregungsüberleitungszeit). Dieses Phänomen tritt bei Ausdauersportler auf und ist als AV-Block I bekannt. Ursache dafür hängt mit den Veränderungen des vegetativen Nervensystems zusammen (Crouse et al., 2009).

Bemerkenswert ist auch der Unterschied im Herzgewicht bei männlichen Mäusen. Während weibliche Mäuse keine Genotyp-spezifische Unterschiede aufweisen, ist das Herzgewicht von KO Männchen im Vergleich zu WT Männchen signifikant niedriger und entspricht etwa dem Herzgewicht weiblicher Probanden (siehe 5.4.2.8).

Der Wirkmechanismus der Glukokortikoide auf die Herzfunktion ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass diese Hormone, die während eines dauerhaften Stresses freigesetzt werden, auf Glukokortikoid-Rezeptoren und möglicherweise auf Mineralokortikoid-Rezeptoren innerhalb der *Medulla oblongata* wirken. Dadurch wird neuronale Ausgangsinformation aus den Kernen von *Medulla oblongata* verändert, was wiederum die Aktivität anderer Kerne des zentralen Nervensystems verändert. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine neuronale und humorale Veränderung der kardiovaskulären Funktionen, die im Auftreten von Herzrhythmusstörung resultieren können (Scheuer, 2011).

### **6.3 Untersuchung der Proteinexpression in ERp29-defizienten Organen mittels Western Blot**

ERp29 kommt ubiquitär in allen Geweben von *Mammalia* vor, doch eine besonders hohe Expression wurde in sekretorischen Geweben (Leber, Gehirn, Niere, Speicheldrüse, Schilddrüse usw.) festgestellt (Mkrtchian and Sandalova, 2006). Da diesem Protein eine Chaperonen-Aktivität zugeschrieben wird, waren die Studien seiner Abwesenheit auf die Expression anderer Proteine der Faltungsmaschinerie und der Qualitätskontrolle und auf die altersbedingte kompensatorische Mechanismen von großem Interesse.

Dafür wurde die Expression einiger ER-Proteine (CRT, CNX, BiP, PDI, GRp94, ERp72, P5) im Gewebe junger (drei Monate alt) und alter (zwölf Monate alt) Mäuse mittels Western Blot-Analyse untersucht. Diese Proteine sind an der Proteinfaltung, der Qualitätskontrolle und der Stressantwort auf Akkumulierung der ungefalteten Proteine beteiligt (siehe 1.2).

Expression der ER-Proteine wurde in folgenden Organen analysiert: Gehirn, Leber, Herz und Niere. Diese Untersuchung zeigte keine Genotyp-relevanten oder altersspezifischen Veränderungen. In diesem Fall verursachte die Abwesenheit von ERp29 keine

Veränderungen der Chaperonen-Expression (GRp94, ERp72, CNX, CRT, PDI), die für eine korrekte Proteinfaltung und Qualitätskontrolle zuständig sind. Ebenso blieb das BiP-Level, das als ein sensitives Zeichen für UPR dient, in allen Organen unverändert. Dies stimmt mit vorherigen Untersuchungen überein, in denen mittels Western Blot-Analyse keine Anomalien in der Expression oben genannter Chaperone in der Leber, im Herz und in der Niere der jungen KO Mäuse nachgewiesen werden konnte (Diao, 2008).

Keine BiP- und sXBP1-Akkumulierung konnte in sekretorischen Geweben mit einem hohen Protein-*turnover* (Speicheldrüse, Nebenniere, Prostata, Magen, Pankreas) nachgewiesen werden (Abb. 45). Während BiP die Stressantwort auf die Akkumulierung von ungefalteten Proteinen einleitet, steht sXBP1 am Ende dieser Signalkaskade und dient als Signalbote zwischen UPR und anderen Signalkaskaden, wie z.B. Apoptose, Qualitätskontrolle und Faltungsmaschinerie. Ein gleichbleibendes Expressionlevel dieser Proteine könnte als Hinweis auf normale Funktionen sekretorischer Gewebe auch in Abwesenheit von ERp29 in ungestressten Mäusen betrachtet werden.

In Bezug auf die primäre Phenotypisierung kann somit die erhöhte Glykokortikoid-Sekretion in Nebennieren nicht im Zusammenhang mit den untersuchten Chaperonen oder mit der UPR stehen. Doch die Folgen der HHN-Hyperaktivität bei KO Mäusen sind repräsentativ und beinhalten sowohl den erhöhten Gehalt an Fettabbau-Produkten im Blut, als auch steigende Fettleibigkeit mit zunehmendem Alter.

Durch unsere Langzeitstudien wurde festgestellt, dass bereits junge KO Männchen eine deutliche Tendenz zum höheren Gewicht aufweisen. Diese Tendenz wurde mit zunehmendem Alter verstärkt: Während das dominierende Gewicht bei alten WT Mäusen bei 28 - 31 g liegt, sind es bei alten KO Mäusen - 32-35 g. Letztere zeigten auch einen höheren %-Anteil von übergewichtigen Mäusen um etwa 15 % im Vergleich zu den gleichaltrigen WT Mäusen (Abb. 38).

Die Ursache dafür liegt vermutlich in der gestörten Expression des Proteohormons Leptin. Durch die Western Blot-Analyse konnte in dieser Arbeit eine niedrigere Leptin-Expression im Hypothalamus der KO Mäuse (um 30 %) im Vergleich zum WT nachgewiesen werden (Abb. 40). Leptin ist ein Adipozytokin, das durch das *obese*-Gen kodiert und hauptsächlich vom Hypothalamus und von Fettzellen (Adipozyten) freigesetzt wird (Buettner et al., 2008). Somit steht es an der Spitze der Hypothalamus-Hypophysen-periphere Drüsen-Achsen. Die Hochregulation dieses Hormons hemmt das Auftreten des Hungergefühls und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Fettstoffwechsels und der reproduktiven Funktion von *Mammalia*. Dementsprechend führt seine Herunterregulation zur Fettsucht und Sterilität

(Karsenty, 2006; Bab and Yimiya, 2010). Für eine gestörte Leptin-Regulation bei ERp29-defizienten Mäusen sprechen mehrere Fakten: erhöhte Futterraufnahme, das Übergewicht und eine niedrigere Reproduktivität im Vergleich zum WT. Demzufolge führte die niedrigere Leptin-Expression in KO Mäusen zu einer scheinbaren Unterernährung, die zur Stimulierung der HHN-Achse führt (Chan and Mantzoros, 2005).

Die neuesten Untersuchungen zeigten, dass im adipösen ER eine Suppression mehrerer Proteine (für Proteinsynthese und für Transportfunktionen), aber Stimulierung der Lipid-Synthese ohne signifikante Veränderungen im Chaperonen-Gehalt stattfindet. Veränderungen im ER-Fettsäuren- und ER-Lipid-Zusammensetzung resultieren in einer Inhibierung von SERCA (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase)-Aktivität und im ER-Stress. Diese Art von ER-Stress spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Insulin-Resistenz und bei der Diabetis während der Verfettung (Fettleibigkeit) (Fu et al., 2011).

Die Leber ist stark in die Steuerung des Fettstoffwechsels involviert. In Leber findet Synthese von Cholesterin und den heraus abgeleiteten Gallensäuren, die Speicherung von Fett in Form von Lipoproteinen und der Abbau von Steroidhormonen statt.

Ein Schlüsselrezeptor im Stoffwechsel in der Leber ist PPAR $\alpha$ , das in der Leber KO Mäuse beider Altersgruppen um 20 % weniger im Vergleich zu WT Mäusen exprimiert wurde (Abb. 44). PPAR $\alpha$  spielt eine dominante Rolle beim Fettsäureabbau und bei der Synthese der Ketonkörper in der Leber. Es wurde gezeigt, dass die PPAR $\alpha$  KO Maus nicht zu einer effizienten Induktion der Gene, die an der Fettsäure-Oxidation beteiligt sind, in der Lage war. Dies resultierte in einer Fettablagerung in der Leber und in der Hyperlipidämie (Hashimoto et al., 2000). Außerdem kontrolliert das PPAR $\alpha$  die Lipidsynthese durch die Regulation der SREBP-Aktivität (Knight et al., 2005). Die SREBP-Familie besteht aus drei Transmembranproteinen, die im ER-Membran lokalisiert sind. Ihre Aktivierung erfolgt nach der proteolytischen Spaltung der zytoplasmatischen N-terminalen Domäne und resultiert in der transkriptionellen Aktivierung der lipogenen Gene (Wong and Sul, 2010). PPAR $\alpha$  ist außerdem an der Immunantwort beteiligt. Dieser Rezeptor reguliert die Dauer einer Entzündungsreaktion durch die Einschränkung der Zytokine-Expression (IL-1, TNF- $\alpha$ , COX-2 u.a.) (Pyper et al., 2010). Bei *Rodenta* wird die PPAR $\alpha$ -Expression durch verschiedene physiologische Bedingungen, wie z.B. Stress, Wachstumshormone, Glukokortikoide, Insulin und Leptin reguliert (Pyper et al., 2010).

Durch die Western Blot-Analyse wurde festgestellt, dass das Expressionslevel von ERp46 in der Leber alter KO Mäuse im Vergleich zu Leber alter WT Mäuse doppelt so hoch war (Abb. 44). Bemerkenswert ist dabei, dass die jungen Mäuse keine Genotyp-spezifischen

Unterschiede aufwiesen. Im Herzen konnten hingegen weder Genotyp-spezifische, noch altersbedingte Veränderungen der ERp46-Expression nachgewiesen werden. Erst vor Kurzem wurde bekannt, dass ERp46 antidiabetische Wirkung hat und über die Interaktion mit AdipoR1 am Fettstoffwechsel beteiligt ist (Charlton et al., 2010). Wahrscheinlich wurden die Veränderungen der Regulation dieses Proteins nicht direkt durch die Abwesenheit des ERp29 verursacht, sondern war indirekt mit der Fettakkumulierung in der Leber und vermutlich mit dem Diabetes-ähnlichen Zustand verbunden.

In früheren Arbeit wurde mittels 2D DIGE-Analyse eine höhere ApolipoproteinA1-Expression (KO / WT = 1,34, P < 0,05) in der KO Leber gezeigt (Diao, 2008). Die Hochregulation dieses Proteins erfolgt vermutlich wie bei ERp46 infolge der Fettakkumulierung in der Leber. Hierbei begünstigt das lipidfreie ApolipoproteinA1 den Abstrom des Makrophagen-Plasmamembran-Cholesterols und der Phospholipide durch den ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). Die erhöhte Aktivität dieses Transporters wird in Zusammenhang mit seiner schützenden Wirkung gegen Atherosklerose gebracht (Shao et al., 2012).

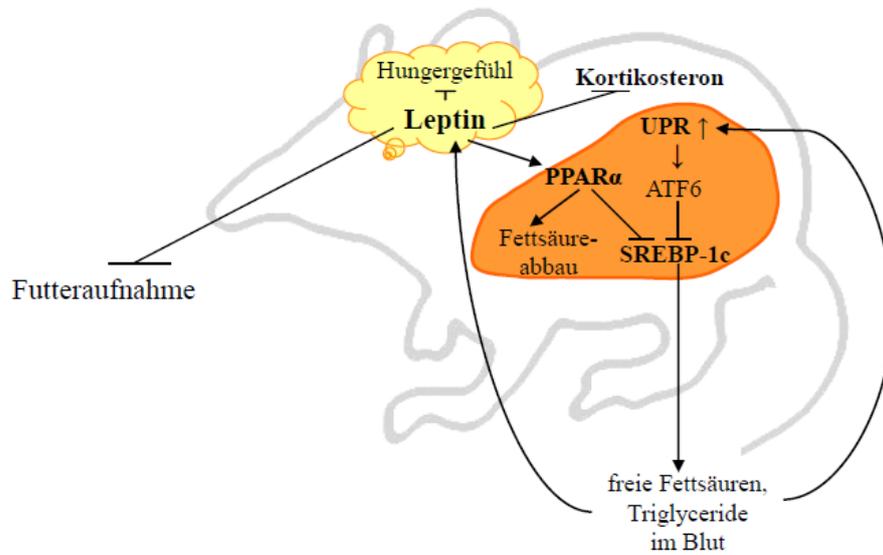
#### **6.4. Übersicht über die Effekte der ERp29-Abwesenheit in Maus**

Die ERp29KO Maus ist das einzige lebende Maus-Modell, der ein Protein, ein Mitglied der PDI Familie, fehlt.

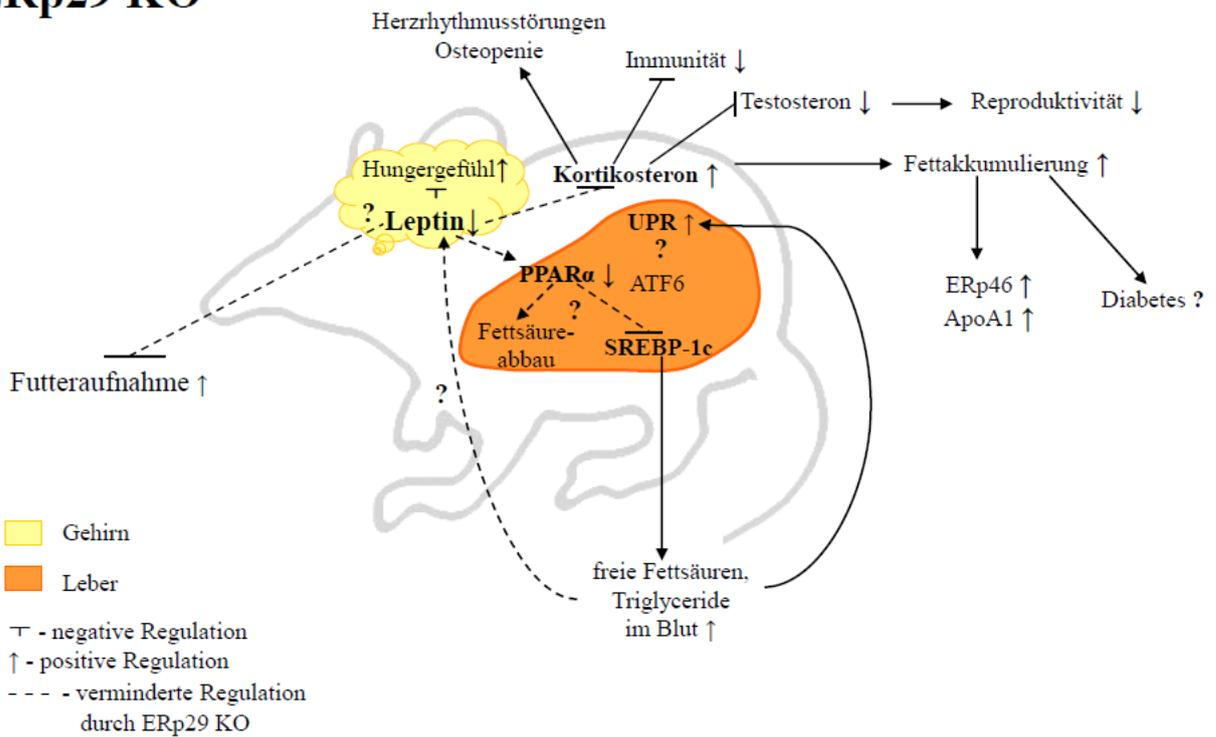
Die Analyse der Antwort auf oxidativen Stress in jungen dermalen WT Fibroblasten zeigte eine Aktivierung der ATF6-CHOP-Achse und der Caspase-3-vermittelten Apoptose. In KO Fibroblasten blieb hingegen die ganze UPR-Kaskade inaktiv, was in einer Apoptose-Resistenz resultierte. Auch in adulten KO Thyreozyten war die Aktivität der ATF6-CHOP-Achse, und infolge dessen der Apoptose, während der UPR herunterreguliert.

Nach unseren ersten Beobachtungen wiesen die untersuchten ERp29KO Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren dieses Stammes (C57BL/6N) weder äußerliche Anomalien, noch Auffälligkeiten im Verhalten auf. Die Analyse der Protein-Expression und die primäre Phänotypisierung zeigten jedoch wesentliche Veränderungen im Lipidstoffwechsel bei KO Mäusen, die mit zunehmendem Alter in Fettleibigkeit resultierten (Abb. 47).

**WT**



**ERp29 KO**



**Abbildung 47.** Schematische Darstellung der Auswirkungen der ERp29-Abwesenheit auf den Lipidstoffwechsel bei Mäusen.

Hierbei sind die regulatorischen Knotenpunkte fett markiert. Die mit einem Fragezeichen markierten Stellen könnten möglicherweise mit ERp29 direkt zusammenhängen und erfordern daher weitere Untersuchungen. Das Schema ist im Text erläutert.

Hungergefühl und Futteraufnahme wird durch das Proteohormon Leptin reguliert. Bei der überflüssigen Versorgung des Körpers mit Nährstoffen steigt die Konzentration an freien Fettsäuren und Triglyceriden im Blut. Dies führt zum ER-Stress und zur UPR einerseits und zur erhöhten Leptin-Expression im Hypothalamus und im Fettgewebe andererseits. Leptin ist ein regulatorischer Knotenpunkt des Fettstoffwechsels. Seine Hochregulation resultiert in der Hemmung des Hungergefühls und der Futteraufnahme, in der PPAR $\alpha$ -Aktivierung und in der negativen Regulation der Kortikosteron-Freisetzung. PPAR $\alpha$  aktiviert den Fettsäureabbau und hemmt das SREBP-1c und somit die Lipogenese. SREBP-1c ist ein Mitglied der SREBP-Familie, das im lipogenen Gewebe hochexpressiert ist. Sein lipogener Effekt kann durch die erhöhte Fütterung / Insulin induziert werden. (Wong and Sul, 2010). Außerdem führt die UPR-Induktion mit nachfolgender ATF6-Aktivierung zur negativen Regulation des SREBP (siehe 1.4). Dadurch sinkt die Konzentration an freien Fettsäuren und Triglyceriden im Blut. Dies ist eine vereinfachte Darstellung des Regelkreises bei der Regulation des Fettstoffwechsels bei WT Mäusen.

In ERp29-defizienten Mäusen ist das Leptin, trotz erhöhter Konzentration an freien Fettsäuren und Triglyceriden im Blut, herunterreguliert. Dies resultiert in der erhöhten Futteraufnahme, in der vermehrten Kortikosteron-Freisetzung und in der Herunterregulation des PPAR $\alpha$ . Letztere führt zum verminderten Fettsäureabbau und zur Aktivierung der SREBP-1c-vermittelten Lipogenese. Da in der Zellkultur keine Aktivierung der ATF6-Achse in adulten KO Zellen während der UPR nachgewiesen werden konnte, wäre es denkbar, dass diese Achse auch *in vivo* beim ER-Stress inaktiv bleibt. Somit würde der zweite regulatorische Mechanismus der SREBP-1c-Hemmung ausfallen. Eine dauerhaft erhöhte Kortikosteron-Freisetzung führt zur Osteopenie, zur Schwächung des Immunsystems, zur Unterdrückung der reproduktiven Funktion und zur niedrigeren Bewegungsaktivität. Die dauerhafte Präsenz der HHN-Achse und die wahrscheinlich verminderte PPAR $\alpha$ - oder gar fehlende ATF6-Kontrolle der SREBP-1c-Aktivität führen mit zunehmendem Alter zur Fettablagerung. Anhand erhöhter Expression des antidiabetischen ERp46 und des antiatherosklerotischen ApolipoproteinA1 (ApoA1 in der Abb. 47) in der Leber lässt sich vermuten, dass die alten KO Mäuse einem Diabetes-ähnlichen Zustand ausgesetzt sind.

Möglicherweise ist die mangelhafte Leptin-Expression die Ursache dieser Veränderungen. Fraglich ist, ob das ERp29 direkt in die Leptin-Synthese involviert oder indirekt an der Regulation seiner Aktivität beteiligt ist? Unklar ist auch die Beteiligung des ERp29 an der ATF6-Aktivierung während der UPR. Detaillierter Untersuchungen erfordert außerdem die Rolle des PPAR $\alpha$  beim Fettstoffwechsel und speziell bei der Regulation der SREBP-1c-

---

Aktivität. Die Klärung dieser Fragen könnte einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Diabetes-Entstehung und zur Entwicklung neuer Therapien für seine Behandlung erbringen. Somit könnte die ERp29-defiziente Maus als ein geeignetes Modell für Diabetes-Studien eingesetzt werden.

## 7 Zusammenfassung

ERp29 ist ein ER-Protein aus der Familie der PDI-Proteine. Hinweise auf seine Funktion in der Literatur basieren auf den Untersuchungen in der Zellkultur und erwiesen sich zum Teil als widersprüchlich. Als Alternative für die Untersuchung der Rolle des ERp29 bietet sich die vollständige Blockade dieses Proteins in einem Knockout (KO) Maus-Modell. Die ERp29KO Maus ist das einzige lebende Maus-Modell, der ein Mitglied der PDI Familie fehlt. Ein Vorteil dieses Modells ist die Möglichkeit zur Untersuchung der Auswirkungen einer ERp29-Langzeitblockade auf wichtige physiologische Lebensfunktionen *in vivo*. Die Effekte der ERp29-Defizienz auf die Stressantwort wurden in ERp29KO Zellen in verschiedenen Ontogenese-Stadien analysiert.

Die Abwesenheit von ERp29 beeinflusste bei embryonalen Fibroblasten (MEF) weder den Immortalisierungsverlauf, noch ihre Immortalisierungsrate. Immortalisierende KO MEF zeigten nach der Zellkulturkrise eine im Vergleich zum Wildtyp (WT) wesentlich verlangsamte Kolonienbildung und eine signifikant reduzierte Gesamtzellzahl. Im Gegensatz zu immortalen 3T3WT Zellen zeigten sich immortale 3T3KO Zellen in Klonogenitäts- und Migrationsstudien als mehr empfindlich für die Behandlung mit dem karzinogenen Farbstoff *chicago sky blue*. Die Abwesenheit von ERp29 verursachte bei embryonalen Fibroblasten keine Anomalien bei der Antwort auf durch Wasserstoffperoxid, Diamid und Menadion ausgelösten oxidativen Stress. Durch die Analyse der Stressantwort in adulten dermalen Fibroblasten wurde festgestellt, dass die ATF6-CHOP-Caspase-3-Achse der „*unfolded protein response*“-Kaskade in KO Zellen beim oxidativen Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung) weniger aktiv war als in WT Zellen. Auch in adulten KO Thyrozyten war die Aktivität der ATF6-CHOP-Caspase-3-Achse beim ER-Stress (Tunicamycin-Behandlung) herunterreguliert. Dies führte zur Apoptose-Resistenz in allen untersuchten adulten KO Zellen.

Die ERp29 Knockout Mäuse wiesen nach unseren ersten Beobachtungen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren weder äußerliche Anomalien, noch Auffälligkeiten im Verhalten auf. Die Analyse der Protein-Expression in Leber und die primäre Phenotypisierung in der *German Mouse Clinic* zeigten jedoch wesentliche Veränderungen im Lipidstoffwechsel der KO Mäuse, die mit zunehmendem Alter in Fettleibigkeit resultierten. Die ERp29-defizienten Mäuse wurden durch eine im Vergleich zum WT höhere Futteraufnahme, eine niedrigere Aktivität und eine niedrigere Reproduktivität charakterisiert. Außerdem konnte bei KO Mäusen eine niedrigere Leptin-Expression im Hypothalamus, eine erhöhte Freisetzung des Stress-Hormons Kortikosteron, eine niedrigere Knochendichte und Herzrhythmusstörungen festgestellt werden.

## 8 Literaturliste

Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks *Mol Cell*. Vol. 6, 53-66, 2007.

Agarraberes FA and Dice JF. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *Journal of Cell Science*. Vol. 114, 2491-2499, 2001.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. Vol. 3, 745-756, 2003.

Ahlberg J and Glaumann H. Uptake-Microautophagy- and Degradation of exogenous Proteins by Isolated Rat Liver Lysosomes. *Experimental and molecular pathology*. Vol. 42, 78-88, 1985.

Bab IA and Yirmiya R. Depression and bone mass. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 170-175, 2010.

Bambang IF, Lu D, Li H, Chiu LL, Lau QC, Koay E, Zhang D. Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells. *Experimental cell research*. Vol. 315, 1964-1974, 2009a.

Bambang IF, Xu S, Zhou J, Salto-Tellez M, Sethi SK, Zhang D. Overexpression of endoplasmic reticulum protein 29 regulates mesenchymal-epithelial transition and suppresses xenograft tumor growth of invasive breast cancer cells. *Laboratory investigation*. Vol. 89, 1229-1242, 2009b.

Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Molecular and cellular biology*. 5747-5763, 2008.

Barak NN, Neumann P, Sevvana M, Schutkowski M, Naumann K, Malesević M, Reichardt H, Fischer G, Stubbs MT, Ferrari DM. Crystal structure and functional analysis of the protein disulfide isomerase-related protein ERp29. *Journal of molecular biology*. Vol. 385, 1630-1642, 2009.

Barnewitz K, Guo C, Sevvana M, Ma Q, Sheldrick GM, Söling H-D, Ferrari DM. Mapping of a substrate-binding site in the protein disulfide isomerase-related chaperone Wind based on protein function and crystal structure. *J Biol Chem*, Vol. 279, 39829-39837, 2004.

Baryshev M, Sargsyan E, Mkrtchian S. ERp29 is an essential endoplasmic reticulum factor regulating secretion of thyroglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 340, 617-624, 2006.

Baserga R. The price of independence. *Exp Cell Res*. Vol. 236, 1-3, 1997.

Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing M, Fisher E. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature genetics*. Vol. 24, 2000.

Berens ME and Beaudry C. Radial monolayer cell migration assay. *Methods in molecular medicine*. Vol. 88, 2004.

Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell calcium*. Vol. 32, 235-249, 2002.

Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. Vol. 106, 661-673, 2001.

Bou R, Codony R, Tres A, Decker E, Guardiola F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry*. Vol. 377, 1-15, 2008.

Bracken CP, Gregory PA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*. Vol. 66, 1682-1699, 2009.

- Brown JM and Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. Vol. 5, 231-237, 2005.
- Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, Su K, Cheng B, Li X, Harvey-White J, Schwartz GJ, Kunos G, Rossetti L. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med*, Vol. 14, 667-675, 2008.
- Buettner GR. Superoxide Dismutase in Redox Biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem*. Vol. 11, 341-346, 2011.
- Busuttill RA, Rubio M, Dolle ME, Campisi J, Vijg J. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell*. Vol. 2, 287-294, 2003.
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. Vol. 415, 92-96, 2002.
- Cano C, Gommeaux J, Pietri S, Culcasi M, Garcia S, Seux M, Barelier S, Vasseur S, Spoto RP, Pe'busque M-J, Dusetti NJ, Iovanna JL, Carrier A. Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1 Is a Major Mediator of p53 Antioxidant Function. *Cancer Res*. Vol. 69, 219-226, 2009.
- Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*. Vol. 185, 7-19, 2007.
- Chan JL and Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet*. Vol. 366, 74-85, 2005.
- Charlton HK, Webster J, Kruger S, Simpson F, Richards AA, Whitehead JP. ERp46 binds to AdipoR1, but not AdipoR2, and modulates adiponectin signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 392, 234-239, 2010.
- Cheretis C, Dietrich F, Chatzistamou I, Politi K, Angelidou E, Kiaris H et al. Expression of ERp29, an endoplasmic reticulum secretion factor in basal-cell carcinoma. *Am J Dermatopathol*. Vol. 28, 410-412, 2006.
- Christis C, Lubsen NH, Braakman I. Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J*. Vol. 275, 4700-4727, 2008.
- Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haast AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Biochemistry*. Vol. 77, 1365-1368, 1980.
- Clanton DJ, Moran RA, McMahan JB, Weislow OS, Buckheit RW, Hollingshead MG, Ciminale V, Felber BK, Pavlakis GN, Bader JP. Sulfonic acid dyes: inhibition of the human immunodeficiency virus and mechanism of action. *J acquir immune defic syndr*. Vol. 5, 771-781, 1992.
- Coe H, Michalak M. ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. *Int J Biochem Cell Biol*. Vol. 42, 796-799, 2010.
- Crawley JN. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioural tests. *Brain research*. Vol. 835, 18-26, 1999.
- Crouse SF, Meade T, Hansen BE, Green JS, Martin SE. Electrocardiograms of collegiate football athletes. *Clin Cardiol*. Vol. 32, 37-42, 2009.
- Das S, Smith TD, Das Sarma J, Ritzenthaler JD, Maza J, Kaplan BE, Cunningham LA, Saud L, Hubbard MJ, Rubenstein RC, Koval M. Erp29 restricts Connexin43 oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell*. Vol. 20, 2593-2604, 2009.
- Daynes RA and Araneo BA. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *Eur. J. Immunol*. Vol. 19, 1989.
- Demmer J, Zhou C, Hubbard MJ. Molecular cloning of ERp29, a novel and widely expressed resident of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*. Vol. 402, 145-150, 1997.

Diao D. Study of differential effects of normal and absent chaperone on global protein folding/trafficking, ER stress signalling and apoptosis in cell lines and knock-out animals. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Marthin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2008.

Diéguez C, Vazquez MJ, Romero A, López M, Nogueiras R. Hypothalamic Control of Lipid Metabolism: Focus on Leptin, Ghrelin and Melanocortins. *Neuroendocrinology*, Vol. 94, 1–11, 2011.

Di Jeso B, Ulianich L, Pacifico F, Leonardi A, Vito P, Consiglio E, Formisano S, Arvan P. Folding of thyroglobulin in the calnexin/calreticulin pathway and its alteration by loss of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. Vol. 370, 449-458, 2003.

Dubouloz F, Deloche O, Wanke V, Cameroni E, De Virgilio C. The TOR and EGO protein Complexes Orchestrate Microautophagy in Yeast. *Molecular. Cell*. Vol. 19, 15–26, 2005.

Dukes AA, Van Laar VS, Cascio M, Hastings TG. Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine. *J Neurochem*. Vol. 106, 333-346, 2008.

Dunn JT, Anderson PC, Fox JW, Fassler CA, Dunn AD, Hite LA, Moore RC. The sites of thyroid hormone formation in rabbit thyroglobulin. *J Biol Chem*. Vol. 262, 16948-16952, 1987.

DuRose JB, Scheuner D, Kaufman RJ, Rothblum LI, Niwa M. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 29, 15, 4295-4307, 2009.

Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell death and differentiation*. Vol. 16, 966-975, 2009.

Farmaki E, Mkrtchian S, Papazian I, Papavassiliou AG, Kiaris H. ERp29 regulates response to doxorubicin by a PERK-mediated mechanism. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1813, 1165-1171, 2011.

Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum as the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature Cell Biol*. Vol. 5, 781–792, 2003.

Ferrari DM, Nguyen Van P, Kratzin HD, Soling HD. ERp28, a human endoplasmic reticulum luenal protein, is a member of the protein disulfide isomerase family but lacks a CXXC thioredoxin-box motif. *Eur J Biochem*. Vol. 255, 570-579, 1998.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1757, 1371-1387, 2006.

Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. Vol. 18, 7719-30, 1999.

Fleshner M, Deak T, Nguyen KT, Watkins LR, Maier SF. Endogenous glucocorticoids play a positive regulatory role in the anti-keyhole limpet hemocyanin in vivo antibody response. *J Immunol*. Vol. 166, 3813-3819, 2001.

Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, Lin X, Watkins SM, Ivanov AR, Hotamisligil GS. Aberrant lipid metabolism disrupt calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*. Vol. 473, 528-531, 2011.

Gailus-Durner V, Fuchs H, Adler T, Pimentel AA, Becker L, Bolle I, Calzada-Wack J, Dalke C, Ehrhardt N, Ferwagner B, Hans W, Hölter SM, Hölzlwimmer G, Horsch M, Javaheri A, Kallnik M, Kling E, Lengger C, Mörth C, Mossbrugger I, Naton B, Prehn C, Puk O, Rathkolb B, Rozman J, Schrewe A, Thiele F, Adamski J, Aigner B, Behrendt H, Busch DH, Favor J, Graw J, Heldmaier G, Ivandic B, Katus H, Klingenspor M, Klopstock T, Kremmer E, Ollert M, Quintanilla-Martinez L, Schulz H, Wolf E, Wurst W, and Hrabe' de Angelis M. Systemic First-Line Phenotyping. *Gene Knockout Protocols: Second Edition*, Vol. 530, 2009.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol and Cell Endocrinology*. Vol. 316, 129-139, 2010.

Gao D, Bambang IF, Putti TC, Lee YK, Richardson DR, Zhang D. ERp29 induces breast cancer cell growth arrest and survival through modulation of activation of p38 and upregulation of ER stress protein p58(IPK). *Lab Invest.*, 2011.

Garbi N, Tanaka S, Momburg F, Hammerling GJ. Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol*, Vol. 7, 93–102, 2006.

Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical Biochemistry*. Vol. 273, 149-155, 1999.

Gay C and Gebicki J. Mesurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. *Analytical Biochemistry*. Vol. 315, 29-35, 2003.

Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* Vol. 10, 465–472, 1999.

Goel N and Bale TL. Sex Differences in the Serotonergic Influence on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stress Axis. *Endocrinology*. Vol. 151, 1784–1794, 2010.

Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. Intraperitoneal injection of a hairpin RNA-expressing plasmid targeting urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor and uPA retards angiogenesis and inhibits intracranial tumor growth in nude mice. *Clin Cancer Res*. Vol. 13, 4051-4060, 2007.

Goytisolo FA and Blasco MA. Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models. *Onkogene* Vol. 21, 584-591, 2002.

Guo C. Generation of Endoplasmic Reticulum Protein 28 (Erp28) knock out mouse, and structural and functional analysis of its *Drosophila* homologue, Wind. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen, 2003.

Guo W, Qu F, Xia L, Guo Q, Ying X, Ding Z. Identification and characterization of ERp29 in rat spermatozoa during epididymal transit. *Society for Reproduction and Fertility*. 1470–1626, 2007.

Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav*. Vol. 28, 464–476, 1994.

Harding H, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. *Perk* is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell*. Vol. 5, 897–904, 2000.

Haritoglou C, Yu A, Freyer W, Priglinger SG, Alge C, Eibl K, May CA, Welge-Luessen U, Kampik A. An evaluation of novel vital dyes for intraocular surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci*. Vol. 46, 3315-3322, 2005.

Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem*. Vol. 275, 28918-28928, 2000.

Hatahet F and Ruddock LW. Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *FEBS J*, Vol. 274, 5223-5234, 2007.

Hayflick L. The limited in vitro life time of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. Vol. 37, 614-636, 1965.

He C and Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet*. Vol. 43, 67–93, 2009.

Hedrich HJ and Bullock G. *The laboratory mouse*. Elsevier academic press. 2006.

Hendershot LM, Ting J, Lee AS. Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-Da glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. *Mol. Cell Biol.* Vol. 8, 4250–4256, 1988.

Herman GE. Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum Mol Genet.* Vol. 12, 75-88, 2003.

Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* Vol. 348, 334-336, 1990.

Høyer-Hansen M and Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium Cell Death and Differentiation. Vol. 14, 1576–1582, 2007.

Hung YC, Wang PW, Pan TL, Bazylak G, Leu YL. Proteomic screening of antioxidant effects exhibited by radix *Salvia miltiorrhiza* aqueous extract in cultured rat aortic smooth muscle cells under homocysteine treatment. *J Ethnopharmacol.* Vol. 124, 463-474, 2009.

Ishii T, Itoh K, Takahashi S et al. Transkription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *Journal of biological chemistry.* Vol. 275, 16023-16029, 2000.

Islam N, Paul PK, Hussain SA, Bhattacharjee D. Layer-by-layer assembling and characterizations of dye-polyions onto solid substrate by electrostatic adsorption process. <http://arxiv.org>, 2011.

Iwakami S, Misu H, Takeda T, Sugimori M, Matsugo M, Kaneko S, Takamura T. Concentration-dependent Dual Effects of Hydrogen Peroxide on Insulin Signal Transduction in H4IIEC Hepatocytes. *PloS One.* Vol. 6, 1-10, 2011.

Jänicke RU, Sohn D, Totzke G, Schulze-Osthoff K. Caspase-10 in mouse or not? *Science.* Vol. 312, 1874, 2006.

Jeker LT, Hejazi M, Burek L, Rose NR, Caturegli P. Mouse Thyroid Primary Culture. *Biochemical and biophysical research communications.* Vol. 257, 511-515, 1999.

Karar J, Dolt KS, Qadar Pasha MA. Endoplasmic reticulum stress response in murine kidney exposed to acute hypobaric hypoxia. *FEBS Lett.* Vol. 582, 2521-2526, 2008.

Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: Review Leptin regulation of bone mass. *Cell metabolism.* Vol. 4, 341–348, 2006.

Kaushik S, Massey AC, Mizushima N, and Cuervo AM. Constitutive Activation of Chaperone-mediated Autophagy in Cells with Impaired Macroautophagy. *Molecular Biology of the Cell.* Vol. 19, 2179–2192, 2008.

Kawamura F, Nakanishi M, Hirashima N. Effects of menadione, a reactive oxygen generator, on leukotriene secretion from RBL-2H3 cells. *Biol Pharm Bull.* Vol. 33, 881-885, 2010.

Keil U, Scherping I, Hauptmann S, Schuessel K, Eckert A, Müller WE. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. *Br J Pharmacol.* Vol. 147, 199-208, 2006.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Vol. 26, 239-257, 1972.

Kim PS and Arvan P. Calnexin and BiP act as sequential chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *The journal of cell Biology.* Vol. 128, 29-38, 1995.

Knight BL, Hebbachi A, Hauton D, Brown A-M, Wiggins D, Patel DD, Gibbons GF. A role for PPAR $\alpha$  in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem J.* Vol. 389, 413-421, 2005.

Kobayashi M, Habuchi K, Yoneda M, Habuchi O, Kimata K. Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase. *Journal of biological chemistry.* Vol. 272, 13980-13985, 1997.

- Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol. Cell.* Vol. 33, 517–527, 2009.
- Korolchuk V, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters.* Vol. 584, 1393–1398, 2010.
- Kroemer G and Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* Vol. 11,725-730, 2005.
- Kuznetsov G, Chen LB, Nigam SK. Several endoplasmic reticulum stress proteins, including Erp72, interact with thyroglobulin during its maturation. *The journal of biological chemistry.* Vol. 269, 22990 – 22995, 1994.
- Kuzumaki, T., Matsuda, A., Ito, K., and Ishikawa, K. 1996. Cell adhesion to substratum and activation of tyrosine kinases are essentially required for G1/S phase transition in BALB/c 3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1310, 185-192. 1996.
- Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell.* Vol. 14, 277-287, 2004.
- Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J.* Vol. 24, 4368–4380, 2005.
- Lepine S, Allegood JC, Park M, Dent P, Milstein S and Spiegel S. Spingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell death and differentiation.* Vol. 18, 350-361, 2011.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* Vol. 91, 479-489, 1997.
- Lichti U, Anders J, Yuspa SH. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for *in vitro* analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nature protocols.* Vol. 3, 799-810, 2008.
- Liu CY, Wong HN, Schauerte JA, Kaufman RJ. The protein kinase/endoribonuclease IRE1 that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand independent dimerization domain. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, 18346–18356, 2002.
- Liu Y and Ye Y. Proteostasis regulation at the endoplasmic reticulum: a new perturbation site for targeted cancer therapy. *Cell research.* Vol. 21, 867-883, 2011.
- Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Crystal Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å Resolution. *Science.* Vol. 268, 1995.
- Ma K, Vattem KM, Wek RC, Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress, *J. Biol. Chem.* Vol. 277, 18728–18735, 2002.
- Ma Q, Guo C, Barnewitz K, Sheldrick GM, Soling HD, Uson I, Ferrari DM. Crystal structure and functional analysis of Drosophila Wind, a protein-disulfide isomerase-related protein. *Journal of biological chemistry.* Vol. 278, 44600-44607, 2003.
- Macieira-Coelho A and Azzarone B. The transition from primary culture to spontaneous immortalization in mouse fibroblast populations. *Anticancer Res.* Vol. 8, 669-676, 1988.
- Malthiery Y, Marriq C, Bergé-Lefranc JL, Franc JL, Henry M, Lejeune PJ, Ruf J, Lissitzky S. Thyroglobulin structure and function: recent advances. *Biochimie.* Vol. 71, 195-209, 1989.
- Mello AF, Mello MF, Carpenter LL, Price LH. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev Bras Psiquiatr.* Vol. 25, 231-238, 2003.

Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biol.* Vol. 7, 766–772, 2005.

Mimura N, Yuasa S, Soma M, Jin H, Kimura K, Goto S, Koseki H, Aoe T. Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP. *Mol Cell Biol.* Vol. 28, 293–301, 2008.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* Vol. 415, 339–343, 2002.

Miyoshi N, Oubrahim H, Chock PB, Stadtman ER. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Biochemistry.* Vol. 103, 1727–1731. 2006.

Mkrtchian S, Fang C, Hellman U, Ingelman-Sundberg M. A stress-inducible rat liver endoplasmic reticulum protein, ERp29. *Eur J Biochem.* Vol. 251, 304–313, 1998a.

Mkrtchian S, Baryshev M, Matvijenko O, Sharipo A, Sandalova T, Schneider G, Ingelman-Sundberg M. Oligomerization properties of ERp29, an endoplasmic reticulum stress protein. *FEBS Lett.* Vol. 431, 322–326, 1998b.

Mkrtchian S and Sandalova T. ERp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family. *Antioxidant Redox Signaling.* Vol. 8, 325–337, 2006.

Mkrtchian S, Baryshev M, Sargsyan E, Chatzistamou I, Volakaki AA, Chaviaras N et al. ERp29, an endoplasmic reticulum secretion factor is involved in the growth of breast tumor xenografts. *Mol Carcinog.* Vol. 47, 886–892, 2008.

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T and Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, 34287–34294, 2002.

Nakagawa T and Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* Vol. 150, 887–894, 2000.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature.* Vol. 403, 98–103, 2001.

Natahet F and Ruddock LW. Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *FEBS Journal.* Vol. 274, 5223–5234, 2007.

Newmeyer DD and Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Vol.112, 481–490, 2003.

Nijholt DAT, de Graaf TR, van Haastert ES, Oliveira AO, Berkers CR, Zwart R., Ovaa H, Baas F, Hoozemans JJM and Scheper W. Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome in neuronal cells: implications for Alzheimer's disease. *Cell death and differentiation.* 1–11, 2011.

Ohl F, Holsboer F, Landgraf R. The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput.* Vol. 33, 392–397, 2001.

Orenstein SJ and Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanism and physiological relevance. *Seminars in cell & developmental biology.* Vol. 21, 719–726, 2010.

Piacentini M, Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation.* Vol. 11, 381–389, 2004.

Piccirillo S, Filomeni G, BrüneB, Rotilio G, Ciriolo MR. Redox Mechanisms Involved in the selective activation of Nrf2-mediated resistance *versus* p53-dependent Apoptosis in adenocarcinoma cells. *The journal of biological chemistry.* Vol. 284, 27721–27733, 2009.

- Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* Vol. 70, 503–533, 2001.
- Pickart CM and Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1695, 55–72, 2004.
- Plotsky PM and Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* Vol. 18, 195-200, 1993.
- Polyak K and Weinberg RA. Transition between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Rev Cancer.* Vol. 9, 265-273, 2009.
- Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal.* Vol. 8, 1-21, 2010.
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* Vol. 3, 695-701. 2003.
- Rayner BS, Hua S, Sabaretnam T, Witting PK. Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. *Biochem J.* Vol. 423, 169-177, 2009.
- Reed JC, Doctor K, Rojas A, Zapata JM, Stehlik C, Fiorentino L, Damiano J, Roth W, Matsuzawa S, Newman R, Takayama S, Marusawa H, Xu F, Salvesen G, Godzik A; RIKEN GER Group GSL Members. Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome Res.* Vol. 13,1376-1388, 2003.
- Reijonen S, Putkonen N, Nørremølle A, Lindholm D, Korhonen L. Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins *Experimental cell research.* Vol. 314, 250-260, 2008.
- Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome.* Vol. 10, 711-713, 1997.
- Ron D and Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol. 8, 519-529, 2007.
- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* Vol. 11, 2006.
- Sargsyan E, Baryshev M, Backlund M, Sharipo A, Mkrтчian S. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding a putative endoplasmic reticulum chaperone, ERp29. *Gene.* Vol. 285, 127-139, 2002a.
- Sargsyan E, Baryshev M, Szekely L, Sharipo A, Mkrтчian S. Identification of ERp29, an endoplasmic reticulum luminal protein, as a new member of the thyroglobulin folding complex. *Journal of biological chemistry.* Vol. 277, 17009-17015, 2002b.
- Sargsyan E, Baryshev M, MkrтчianS. The physiological unfolded protein response in the thyroid epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol. 322, 570-576, 2004.
- Sasagawa I, Yazawa H, Suzuki Y, Nakada T. Stress and testicular germ cell apoptosis. *Arch Androl.* Vol. 47, 211-216, 2001.
- Sauer J, Stalla GK, Müller O-A, Arzt E. Inhibition of interleukin-2-mediated lymphocyte activation in patients with Cushing's syndrome: a comparison with hypocortisolemic patients. *Neuroendocrinology.* Vol. 59, 144–151, 1994.
- Scheuer DA, Bechtold AG, Shank SS, Akana SF. Glucocorticoids act in the dorsal hindbrain to increase arterial pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Vol. 286, 458-467, 2004.

Scheuer DA. Regulation of the stress response in rats by central actions of glucocorticoids. *Exp Physiol* 95, 26-31, 2011.

Scheuner D, Vander Mierde D, Song B, Flamez D, Creemers JW, Tsukamoto K, Ribick M, Schuit FC, Kaufman RJ. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in  $\beta$  cells and maintains glucose homeostasis. *Nature Med.* Vol. 11, 757–764, 2005.

Schröder M and Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research.* Vol. 569, 29–63, 2005.

Schweichel JU and Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* Vol. 7, 253-266, 1973.

Sergeev P, Streit A, Heller A, Steinman-Zwicky M. The *Drosophila* dorsoventral determinant PIPE contains ten copies of a variable domain homologous to mammalian heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Devision dynamic.* Vol. 220, 122-132, 2001.

Serrano M and Blasco MA. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Biol.* Vol. 123, 2002.

Sevier CS and Kaiser CA. Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysika Acta.* Vol. 1783, 549-556, 2008.

Shao B, Pennathur S, Heinecke JW. Myeloperoxidase Targets Apolipoprotein A-I, the Major HDL Protein, for Site-Specific Oxidation in Human Atherosclerotic Lesions. *JBC.* 2012.

Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell.* Vol. 3, 99–111, 2002.

Sherr, CJ and DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell.* Vol. 102, 407-410. 2000.

Shnyder SD, Mangum JE, Hubbard MJ. Triplex profiling of functionally distinct chaperones (ERp29/PDI/BiP) reveals marked heterogeneity of the endoplasmic reticulum proteome in cancer. *J Proteome Res.* Vol. 7, 3364-3372, 2008.

Shuvaev VV, Christofidou-Solomidou M, Bhora F, Laude K, Cai H, Dikalov S, Arguiri E, Solomides CC, Albelda SM, Harrison DG, Muzykantor VR. Targeted detoxification of selected reactive oxygen species in the vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther.* Vol. 331, 404-411, 2006.

Skipper PL, Kim MY, Patty Sun H-L, Wogan GN, Tannenbaum SR. Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: old is new again. *Carcinogenesis.* Vol. 31, 50-58, 2010.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* Vol. 144, 281-292, 1999.

Smith JA, Turner MJ, DeLay ML, Klenk EI, Sowders DP, Colbert RA. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response are linked to synergistic IFN- $\beta$  induction via X-box binding protein 1. *Eur. J. Immunol.* Vol. 38, 1194-1203, 2008.

Söhl G and Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research.* Vol. 62, 228–232, 2004.

Solan JL and Lampe PD. Connexin 43 phosphorylation – structural changes and biological effects. *Biochem J.* Vol. 15, 261–272, 2009.

Sousa M and Parodi AJ. The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase, *EMBO J.* Vol. 14, 4196–4203, 1995.

Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* Vol. 167, 35–41, 2004.

Steinberg GR, Watt MJ, Fam BC, Proietto J, Andrikopoulos S, Allen AM, Febbraio MA, Kemp BE. Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology*. Vol 147, 3906-3914, 2006.

Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing research reviews*. Vol. 4, 141-194, 2005.

Tandara AA, Kloeters O, Kim I, Mogford JE, Mustoe TA. Age effect on HSP70: decreased resistance to ischemic and oxidative stress in HDF. *J Surg Res*. Vol. 132, 32-39, 2006.

Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. Vol. 272, 6093-6096, 1997.

Todaro GJ and Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*. Vol. 17, 299-313, 1963.

Tolstonog GV, Belichenko-Weitzmann IV, Lu J, Hartig R, Shoeman RL, Traub U, Traub P. Spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts: Growth Behavior of wild-type and Vimentin-deficient cells in relation to mitochondrial structure and activity. *DNA and cell biology*. Vol. 24, 2005.

Tsopelas C and Sutton R. Why certain dyes are useful for localizing the sentinel lymph node. *J Nucl Med*. Vol. 43, 1377-1382, 2002.

Turnbull AV and River CL. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action. *Physiological reviews*. Vol. 79, 1999.

Uttenweiler A, Schwarz H, Neumann H, Mayer A. The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy. *Molecular biology of the cell*, Vol. 18, 2007.

van der Sanden MH, Houweling M, van Golde LM, Vaandrager AB. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem. J*. Vol. 369, 643-650, 2003.

Verfaillie T, Salazar M, Velasco G and Agostinis P. Linking ER stress to Autophagy: potential implications for cancer therapy. *International journal of cell biology*. 2010.

Vousden KH and Ryan KM. P53 and metabolism. *Nat.Rev. Cancer*. Vol. 9, 691-700, 2009.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. Vol. 10, 45-65, 2003.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. Vol. 292, 727-730, 2001.

Wong RHF and Sul HS. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol*. Vol. 10, 684-691, 2010.

Wormald MR and Dwek RA. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability, *Struct. Fold Des*. Vol. 7, 155-160, 1999.

Xenoulis PG and Steiner JM. Lipid metabolism und hyperlipidemia in dogs. *Vet J*. Vol. 183, 12-21, 2010.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell*. Vol. 6, 1355-1364, 2000.

Yin H and Hamilton AD. Strategies for Targeting Protein-Protein Interactions with Synthetic Agents. *Angew. Chem. Int. Ed*. Vol. 44, 4130 - 4163, 2005.

Ying X, Liu Y, Guo Q, Qu F, Guo W, Zhu Y, Ding Z. Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29), a protein related to sperm maturation is involved in sperm-oocyte fusion in mouse. *Reprod Biol Endocrinol*. Vol. 4, 8-10, 2010.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, Vol. 372, 425–432, 1994.

Zhang B, Wang M, Yang Y, Wang Y, Pang X, Su Y, Wang J, Ai G, Zou Z. ERp29 is a radiationresponsive gene in IEC-6 cell. *J Radiat Res*. Vol. 49, 587-596, 2008.

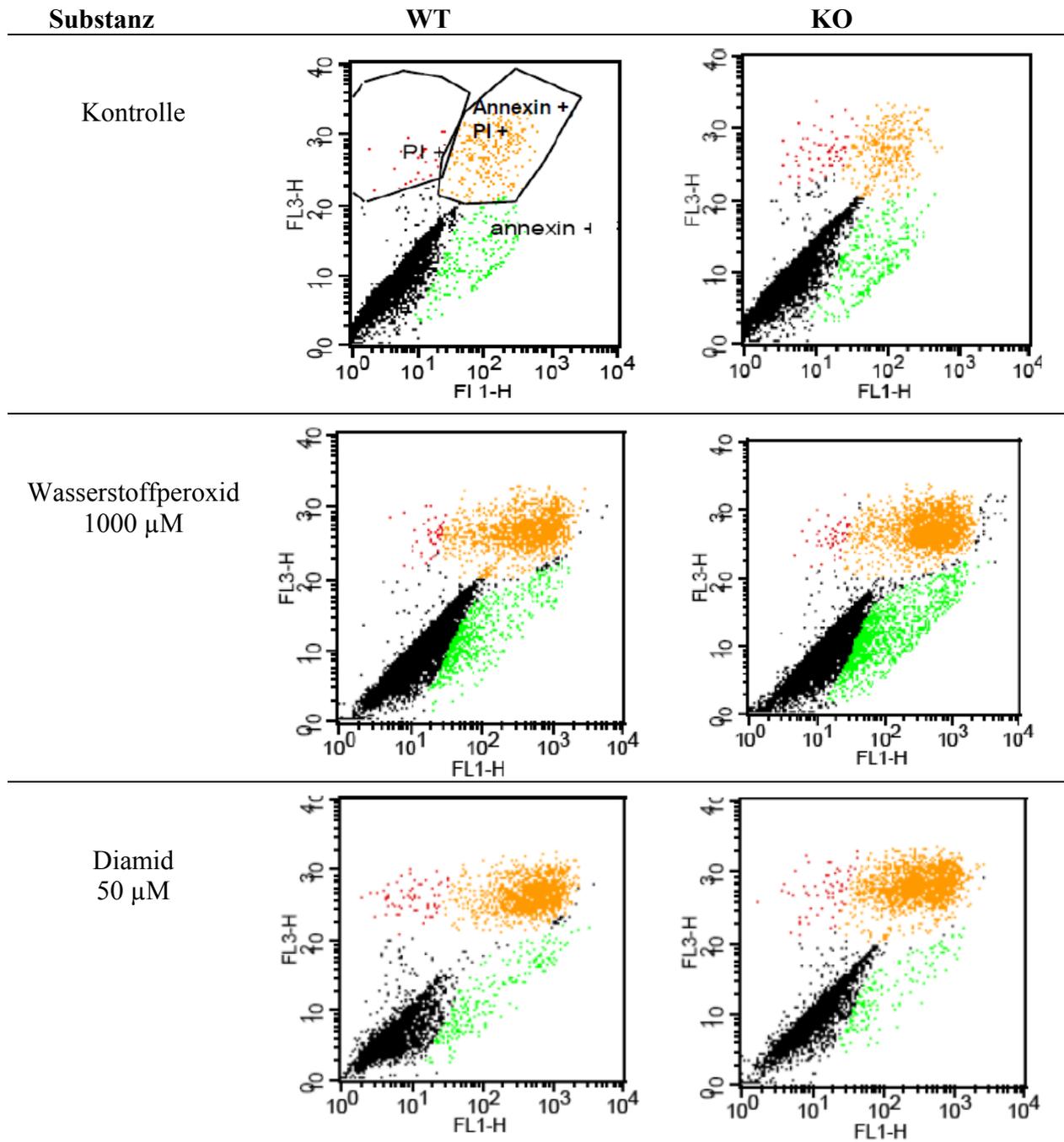
Zhang D and Putti, TC. Over-expression of ERp29 attenuates doxorubicin-induced cell apoptosis through the upregulation of Hsp27 in breast cancer cells. *Exp Cell Res*. Vol. 316, 3522-3531, 2010.

Zhou JY, Zhong HJ, Yang C, Yan J, Wang HY, Jiang JX. Corticosterone exerts immunostimulatory effects on macrophages via endoplasmic reticulum stress. *British Journal of Surgery*. Vol. 97, 281-293, 2010.

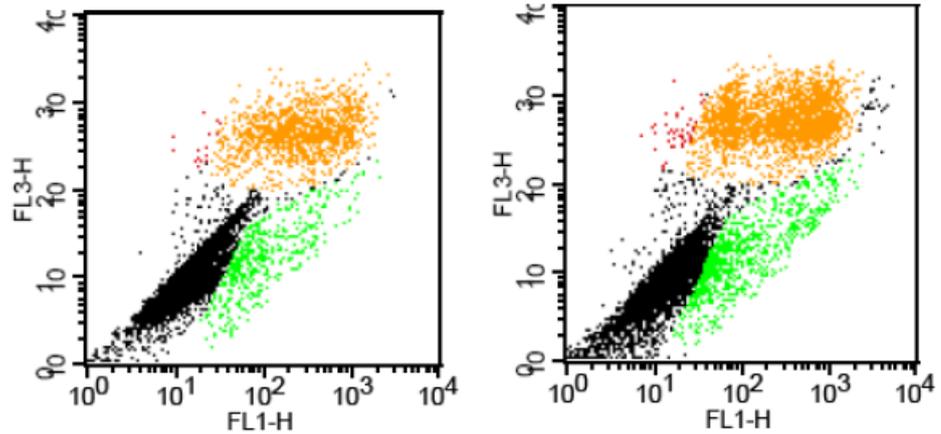
Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. Vol. 12, 982–995, 1998.

## 9 Anhang

### Anhang 1. FACS-Messung des Zelltodes bei MEF beim oxidativen Stress



Menadion  
20  $\mu$ M

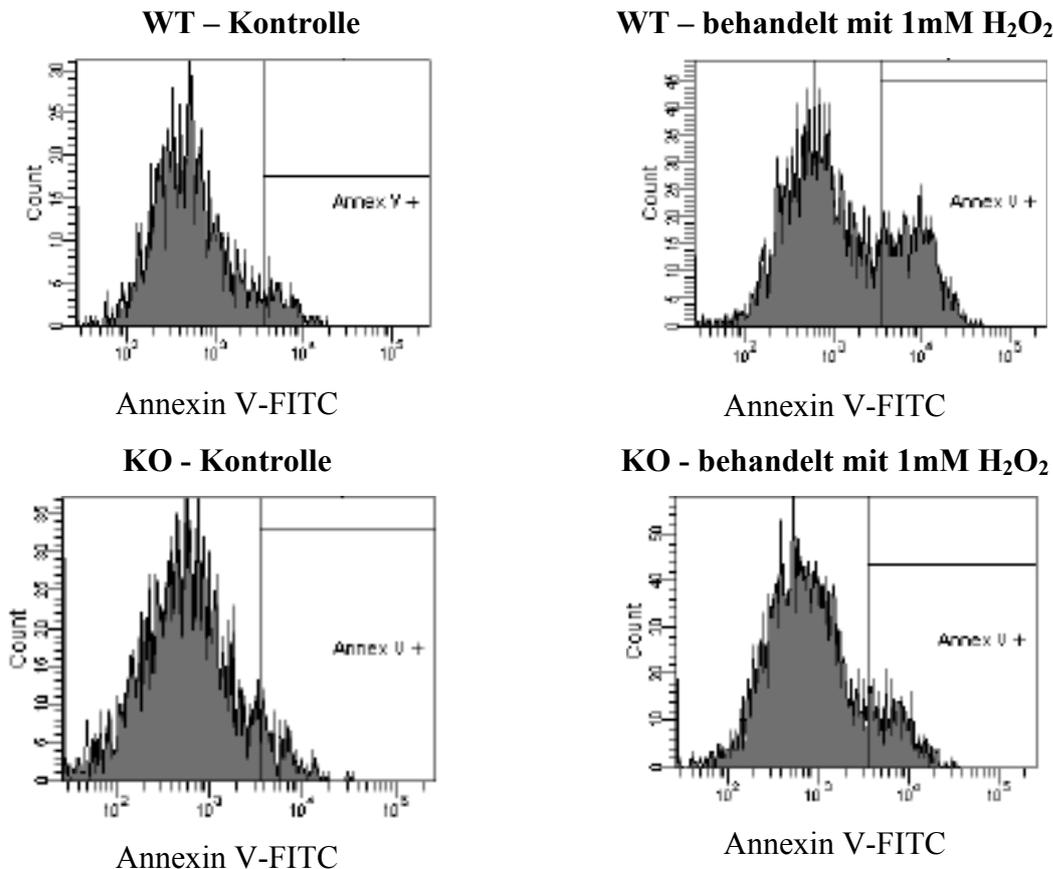


Auf den Dot-Plots sind die vitale Zellen schwarz, apoptotische – grün und nekrotische – orange markiert. Auf der x-Achse (FL1-H) ist die Fluoreszenzintensität der FITC-gekoppelten Annexin V dargestellt. Apoptose-Induktion resultiert unter anderem in der Externalisierung der Phosphatidylserine in der Plasmamembran. Annexin V bindet spezifisch an die Phosphatidylserine und markiert so apoptotische Zellen. Die y-Achse (FL3-H) repräsentiert die Fluoreszenzintensität des Propidiumiodids. Es wurde für die Färbung der nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen verwendet.

#### Auswertung der FACS-Messdaten

Substanz	Genotyp	Zellpopulation, % der Gesamtzahl		
		vital	apoptotisch	nekrotisch
Kontrolle	WT, n=3	87,4 $\pm$ 4,6	4,1 $\pm$ 1,9	8,5 $\pm$ 6,6
	KO, n=3	85,4 $\pm$ 4,7	6,4 $\pm$ 1,3	8,1 $\pm$ 3,4
Wasserstoffperoxid 1000 $\mu$ M	WT, n=3	70,2 $\pm$ 9,8	7,6 $\pm$ 3,5	22,2 $\pm$ 6,3
	KO, n=3	54,6 $\pm$ 8,7	12,1 $\pm$ 6,4	33,2 $\pm$ 12,1
Diamid 50 $\mu$ M	WT, n=3	73,8 $\pm$ 13,3	6,1 $\pm$ 2,2	20,1 $\pm$ 15,5
	KO, n=3	75,4 $\pm$ 13,9	4,8 $\pm$ 2,9	19,8 $\pm$ 16,9
Menadion 20 $\mu$ M	WT, n=3	74,1 $\pm$ 2,2	10,7 $\pm$ 5,6	15,2 $\pm$ 5,8
	KO, n=3	67,0 $\pm$ 3,2	12,2 $\pm$ 1,1	20,8 $\pm$ 1,7

## Anhang 2. FACS-Messung des Zelltodes bei adulten dermalen Fibroblasten beim oxidativen Stress



Auf den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Es sind Annexin V-negative vitale und Annexin V-positive apoptotische (eingerahmt) Zellpopulationen zu sehen.

### Auswertung der FACS-Messdaten

Alter	Substanz	Genotyp	Zellpopulation, % der Gesamtzahl		
			vital	apoptotisch	nekrotisch
Zellen von jungen Mäusen	Kontrolle	WT, n=1	83,4	3,0	7,8
		KO, n=1	81,6	1,2	7,4
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1000 µM	WT, n=2	63,35 ± 6,3	12,8 ± 6,6	21,3 ± 0,3
		KO, n=2	80,8 ± 2,0	6,4 ± 0,2	7,6 ± 0,7
Zellen von alten Mäusen	Kontrolle	WT, n=2	90,2 ± 3,2	2,6 ± 0,1	7,15 ± 3,3
		KO, n=2	89,3 ± 1,4	2,5 ± 0,5	8,15 ± 0,9
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1000 µM	WT, n=2	27,65 ± 3,0	63,0 ± 1,4	9,35 ± 4,4
		KO, n=2	43,8 ± 1,5	42,5 ± 3,5	13,6 ± 5,0

### Anhang 3. Klinische Chemie

#### Glukose-Toleranz-Test

Parameter	Weibchen		Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=10)	WT (n=10)	KO (n=8)
Natrium [mmol/l]	143,2 ± 2,9	141,2 ± 3,9	143,8 ± 1,8	141,0 ± 5,7
Kalium [mmol/l]	4,26 ± 0,4	4,26 ± 0,3	4,56 ± 0,4	4,42 ± 0,3
Chloride [mmol/l]	106,6 ± 2,6	105,3 ± 3,2	105,0 ± 1,1	104,1 ± 4,0
Gesamtproteine [g/l]	48,8 ± 2,3	48,0 ± 1,6	50,2 ± 1,1	48,5 ± 2,1
Albumin [g/l]	26,6 ± 1,3	25,8 ± 1,1	25,6 ± 1,3	24,5 ± 1,4
Kreatinin [μmol/l]	8,7 ± 0,8	9,0 ± 1,0	8,2 ± 1,1	8,2 ± 0,8
Harnstoff [mmol/l]	11,1 ± 1,8	11,0 ± 1,7	10,1 ± 1,4	9,5 ± 0,8

#### Metabolische Phenotypisierung von Mäusen

Parameter	Weibchen		Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=10)	WT (n=10)	KO (n=8)
Cholesterol [mmol/l]	2,0 ± 0,2	1,94 ± 0,2	2,35 ± 0,3	2,17 ± 0,2
Triglyceride [mmol/l]	0,79 ± 0,2	0,83 ± 0,2	1,54 ± 0,4	1,05 ± 0,3
ALAT/GPT [U/l]	22,8 ± 5,3	23,6 ± 6,1	28,2 ± 6,4	22,5 ± 2,4
ASAT/GOT [U/l]	45,4 ± 5,3	51,0 ± 11,9	60,0 ± 14,2	54,2 ± 10,2
α-Amylase [U/l]	634,9 ± 87,7	656,9 ± 38,7	702,5 ± 75,5	727,1 ± 66,8
Glukose [mmol/l]	11,8 ± 1,8	11,7 ± 2,0	13,1 ± 2,1	13,2 ± 1,1
LDH [U/l]	177,09 ± 18,9	180,57 ± 30,2	214,03 ± 57,0	213,7 ± 34,2

ALAT (Alanin-Aminotransferase) = GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase)

ASAT (Aspartat-Amino-Transferase) = GOT (Glutamaz-Oxalacetat-Transaminase)

LDH – Laktat-Dehydrogenase

#### Elementare Phenotypisierung von Mäusen

Parameter	Weibchen		Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=10)	WT (n=10)	KO (n=8)
Calcium [mmol/l]	2,25 ± 0,1	2,23 ± 0,1	2,32 ± 0	2,27 ± 0,1
anorganisches Phosphat [mmol/l]	1,58 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,06 ± 0,3	1,18 ± 0,3
Eisen [μmol/l]	25,2 ± 4,6	28,4 ± 4,8	22,1 ± 2,4	24,0 ± 2,9
ALP [U/l]	146,0 ± 12,0	150,4 ± 13,0	95,6 ± 9,4	97,3 ± 5,8

ALP – alkalische Phosphatase

Parameter	Weibchen		Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=10)	WT (n=10)	KO (n=8)
Ferritin [ng/ml]	149,8 ± 8,6	164,0 ± 6,09	118,8 ± 3,9	132,7 ± 11,2
Transferrin [mg/dl]	138,8 ± 1,7	140,5 ± 1,63	140,3 ± 1,1	134,8 ± 2,2
Eisen [μg/dl]	140,7 ± 8,1	158,5 ± 8,42	123,3 ± 4,2	134,1 ± 5,7
UIBC [μmol/l]	34,4 ± 1,9	32,0 ± 1,9	35,9 ± 0,7	31,8 ± 0,8
TIBC [μg/dl]	333,0 ± 5,1	337,0 ± 4,6	323,6 ± 3,3	311,6 ± 7,3

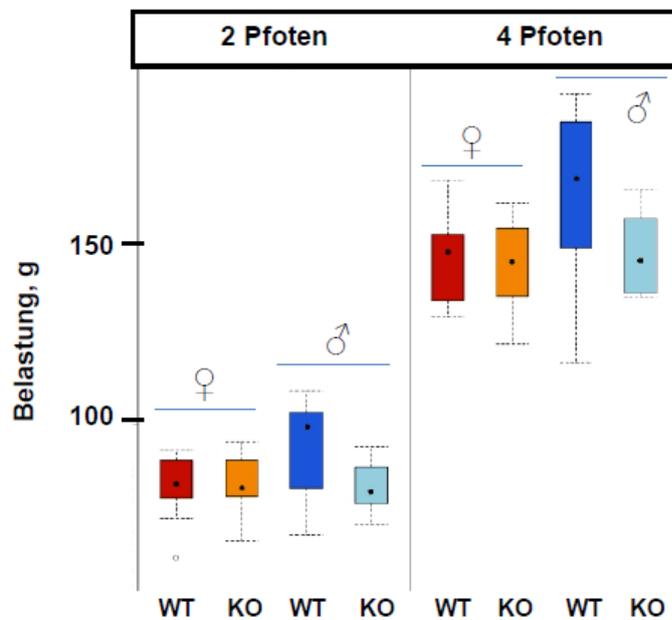
UIBC – unsaturated iron-binding capacity

TIBC – total iron-binding capacity

## Anhang 4. Studien von Energie-Metabolismus mittels indirekter Kalorimetrie

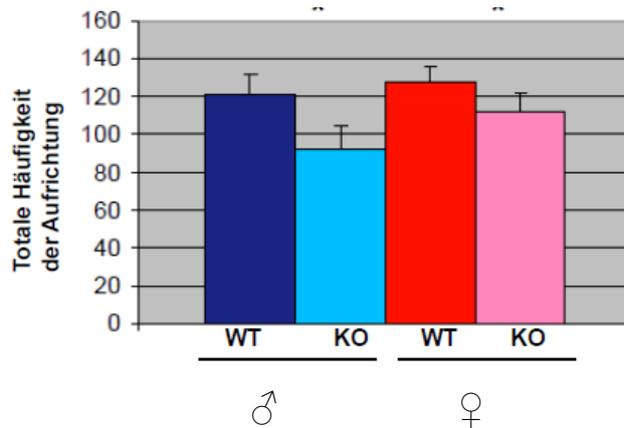
Parameter	Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=8)
Körpermasse [g]	24,8 ± 1,7	23,8 ± 1,3
Körpertemperatur [°C]	36,76 ± 0,3	36,74 ± 0,4
Futteraufnahme [g]	4,5 ± 0,4	5,0 ± 0,6
Durchschnitt V (O <sub>2</sub> ) [ml h <sup>-1</sup> ]	83,5 ± 3,4	82,3 ± 2,6
Min. V (O <sub>2</sub> ) [ml h <sup>-1</sup> ]	50,0 ± 3,5	51,1 ± 4,6
Max. V (O <sub>2</sub> ) [ml h <sup>-1</sup> ]	124,2 ± 5,6	124,8 ± 7,7
Respiratorische Rate	0,88 ± 0,03	0,90 ± 0,04
Durchschnittliche Aktivität [counts]	0,08 ± 0,05	0,09 ± 0,07

## Anhang 5. Neurologische Phenotypisierung



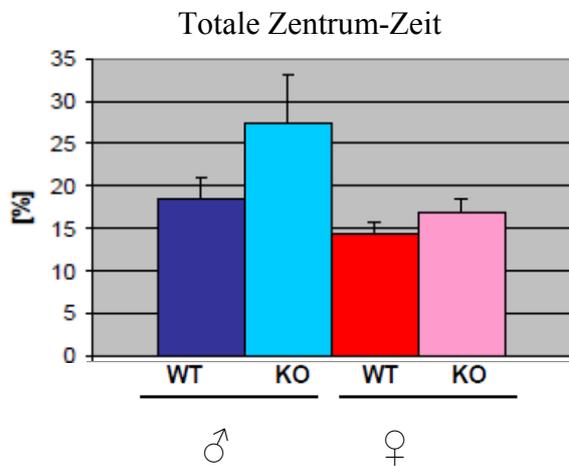
Griffstärke als Parameter der Muskelfunktion. Dafür wurde bei jeder Maus Belastung [g] bei jeder Maus drei Mal nacheinander mit zwei und mit vier Pfoten gemessen. Für den Test wurden folgenden Mäuse verwendet: ♀ WT (n=10), ♀ KO (n=10), ♂ WT (n=10), ♂ KO (n=8).

## Anhang 6. Analyse des Verhaltens



Bewegungsaktivität bei der senkrechten Aufrichtung.

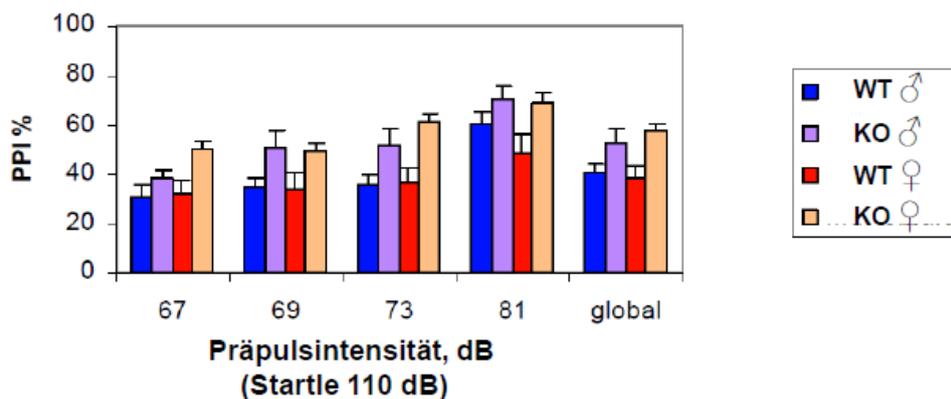
Es wurde beobachtet, wie oft sich jede Maus innerhalb von 5 min. senkrecht aufrichtete. Für den Versuch wurden folgenden Mäuse verwendet: ♀ WT (n=10), ♀ KO (n=10), ♂ WT (n=10), ♂ KO (n=8).



Angst-bedingtes Verhalten.

Dieser Test wurde durch die Berechnung der totalen Zentrum-Zeit [%], die eine Maus in der Mitte der Kammer verbringt, bewertet. Für den Versuch wurden folgenden Mäuse verwendet: ♀ WT (n=10), ♀ KO (n=10), ♂ WT (n=10), ♂ KO (n=8).

Analyse der Gehirnfunktion durch die Messung der Präpulsinhibition (PPI)



Es wurde Reaktion von Mäusen auf Präpulse verschiedener Intensität (67, 69, 73, 81 dB) untersucht. Intensität des Schreckreizes beträgt 110 dB. Die Schreckreaktion in der Form dabei auftretender Muskelkontraktionen der Gesichtsmuskulatur kann mittels Elektromyografie (EMG) gemessen werden.

**Anhang 7. Analyse von Körperaufbau mittels NMR**

Parameter	Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=8)
Fettmasse [g]	6,2 ± 0,7	5,4 ± 0,7
Armmasse [g]	16,5 ± 1,3	16,0 ± 0,8
Körpermasse [g]	26,3 ± 2,1	25,2 ± 1,7

**Anhang 8. Lungenfunktion**

Respiratorische Rate und Zirkularatmung in Ruhe und Aktivität

Parameter	Männchen	
	WT (n=6)	KO (n=6)
in Ruhe		
Respiratorische Rate: f [1/min]	335,5 ± 6,1	315,6 ± 5,7
Inspirationszeit Ti [ms]	57,6 ± 1,5	58,6 ± 2,2
Expirationszeit Te [ms]	121,5 ± 2,2	131,8 ± 1,7
Ti / (Ti + Te)	0,32 ± 0,00	0,31 ± 0,01
Aktivität		
Respiratorische Rate: f [1/min]	471,7 ± 6,7	474,8 ± 4,0
Inspirationszeit Ti [ms]	44,6 ± 0,8	42,9 ± 0,9
Expirationszeit Te [ms]	82,7 ± 1,4	83,5 ± 0,6
Ti / (Ti + Te)	0,35 ± 0,00	0,34 ± 0,01

Inspirierende Volumen und Flußrate in Ruhe und Aktivität

Parameter	Männchen	
	WT (n=6)	KO (n=6)
in Ruhe		
TV [ml]	0,26 ± 0,02	0,21 ± 0,01
PIF [ml/s]	7,5 ± 0,6	6,3 ± 0,5
PEF [ml/s]	4,3 ± 0,4	3,6 ± 0,3
MIF [ml/s]	4,5 ± 0,4	3,7 ± 0,3
MEF [ml/s]	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1
Aktivität		
TV [ml]	0,26 ± 0,01	0,22 ± 0,01
PIF [ml/s]	9,4 ± 0,5	8,3 ± 0,5
PEF [ml/s]	6,1 ± 0,4	5,4 ± 0,4
MIF [ml/s]	5,8 ± 0,3	5,1 ± 0,3
Ti/TT	3,1 ± 0,2	2,6 ± 0,2

TV – inspirierende Luftvolumen je Atemzug (tidal volume)

PIF – inspiratorischer peak flow

PEF – expiratorischer peak flow

MIF – maximal inspiratory flow

MEF – maximal expiratory flow

## Anhang 9. Kardiovaskuläre Phenotypisierung

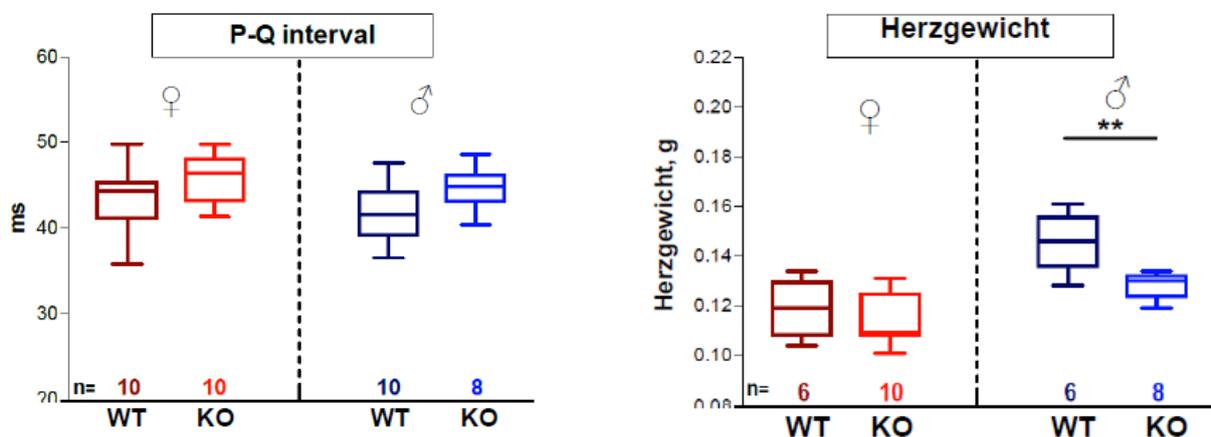
### Elektrokardiogramm

Parameter	Weibchen		Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=10)	WT (n=10)	KO (n=8)
PQ-Interval [ms]	43,5 ± 1,2	45,8 ± 0,8	41,8 ± 1,0	44,7 ± 0,9
Dauer der P-Welle [ms]	19,2 ± 0,6	20,1 ± 0,6	18,7 ± 0,5	18,5 ± 0,6
Dauer des QRS-Komplexes [ms]	10,9 ± 0,3	10,7 ± 0,2	10,8 ± 0,3	11,5 ± 0,2
QT-Interval [ms]	44,9 ± 1,6	42,4 ± 0,4	42,5 ± 0,9	43,9 ± 1,0
RR-Interval [ms]	146,7 ± 5,0	147,3 ± 4,8	138,7 ± 4,9	146,5 ± 5,5
Herz-Rate [bpm]	413,8 ± 13,8	412,6 ± 13,6	437,8 ± 15,7	414,2 ± 15,9
JT-Interval [ms]	4,2 ± 0,5	3,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2
ST-Interval [ms]	34,0 ± 1,6	31,7 ± 0,5	31,7 ± 1,0	32,3 ± 1,1
Q-Amplitude [mV]	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01
R-Amplitude [mV]	3,76 ± 0,22	3,40 ± 0,18	3,26 ± 0,12	3,34 ± 0,34
S-Amplitude [mV]	-1,06 ± 0,15	-0,91 ± 0,15	-0,63 ± 0,08	-0,63 ± 0,13
QRS-Amplitude [mV]	4,83 ± 0,35	4,31 ± 0,24	3,89 ± 0,13	3,97 ± 0,45

### Herzgewicht

Parameter	Weibchen		Männchen	
	WT (n=6)	KO (n=10)	WT (n=6)	KO (n=8)
Körpergewicht [g]	21,8 ± 0,7	21,6 ± 0,6	29,4 ± 1,3	25,6 ± 0,3
Herzgewicht [g]	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,13 ± 0,00
Länge des Unterschenkels [mm]	17,8 ± 0,1	18,2 ± 0,1	18,4 ± 0,2	18,1 ± 0,1
Herzgewicht / Länge des Unterschenkels	6,69 ± 0,21	6,28 ± 0,19	7,91 ± 0,19	7,09 ± 0,10
Herzgewicht / Körpergewicht	5,45 ± 0,08	5,28 ± 0,15	4,98 ± 0,14	5,01 ± 0,006

Graphische Darstellung einiger Herzparameter der KO Mäuse im Vergleich zum WT

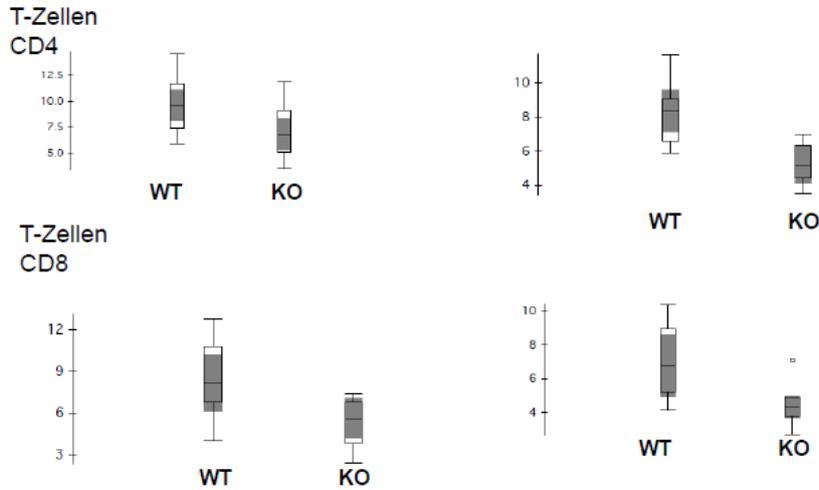


Länge des PQ-Intervalls [ms] repräsentiert den Abstand vom Beginn der P-Welle bis zum Beginn der Q-Zacke

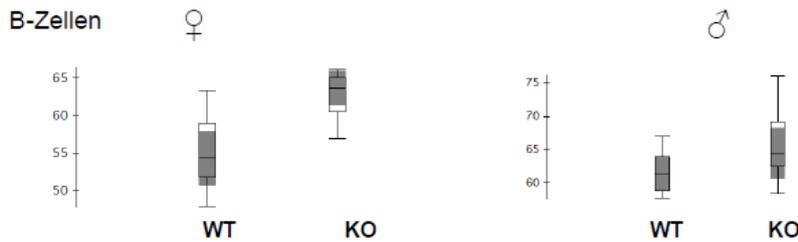
Herzgewicht [g] zeigt signifikante Genotyp-spezifische Unterschiede bei männlichen Mäusen

## Anhang 10. Immunologische Phenotypisierung

Häufigkeit der CD4- und CD8-T-Lymphozyten im Blut



Häufigkeit der B-Zellen im Blut



Allergologie

Parameter	Weibchen		Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=10)	WT (n=10)	KO (n=7)
Gesamt IgE [ng/ml]	55,0 ± 601,0	42,0 ± 56,0	40,7 ± 380,0	76,0 ± 203,0

## Anhang 11. Studien der Nozizeption als Reaktion auf die Heizplatte

Zeitliches Auftreten	Männchen		Weibchen	
	WT (n=10)	KO (n=8)	WT (n=10)	KO (n=10)
Erstes Anzeichen von Schmerz	9,48 ± 0,61	8,57 ± 0,68	10,36 ± 0,60	8,95 ± 0,60
Sekundäre Reaktion	15,11 ± 0,84	13,38 ± 0,94	15,72 ± 0,83	13,88 ± 0,84

Erstes Anzeichen von Schmerz – Anheben oder Ablecken von Vorderpfoten

Sekundäre Reaktion – Hochspringen

**Anhang 12.** Untersuchung der Augen

Spaltlampe – Biomikroskopie

	Netzhaut- arteriendruck	Gesamtlinsen- trübung	Trübung des hinteren Pols	Mikro- phthalmia
Männchen WT (n=10)	10	-	-	-
Männchen KO (n=8)	8	-	-	-
Weibchen WT (n=10)	10	-	-	-
Weibchen KO (n=10)	10	-	-	-

Funduskopie - Spiegelung des Augenhintergrundes

	Netzhaut- arteriendruck	Weißer Flecken	Pigmentflecken, Gefäßschwäche	Gefäß- veränderungen
Männchen WT (n=10)	8	2	-	-
Männchen KO (n=8)	9	1	-	-
Weibchen WT (n=10)	1	7	-	-
Weibchen KO (n=10)	1	9	-	-

Messung der Axenlänge des Augen

Parameter	Männchen	
	WT (n=7)	KO (n=7)
Axenlänge [mm]	3,588 ± 0,021	3,587 ± 0,036
Axenlänge / Körperlänge	0,037 ± 0,0006	0,0366 ± 0,0007

**Anhang 13.** Hämatologie

Parameter	Weibchen		Männchen	
	WT (n=10)	KO (n=10)	WT (n=10)	KO (n=8)
WBC [ $10^3/\text{mm}^3$ ]	6,6 ± 1,1	7,7 ± 1,0	9,2 ± 2,5	10,8 ± 2,7
RBC [ $10^3/\text{mm}^3$ ]	10,4 ± 0,3	10,2 ± 0,2	10,9 ± 0,3	11,0 ± 0,4
PLT [ $10^3/\text{mm}^3$ ]	1342,6 ± 55,6	1351,2 ± 134,4	1351,0 ± 97,1	1345,2 ± 53,4
HGB [g/dl]	15,1 ± 0,3	15,0 ± 0,4	14,4 ± 0,4	15,7 ± 0,3
HCT [%]	51,7 ± 1,0	51,3 ± 1,0	53,8 ± 1,3	54,7 ± 1,6
MCV [fl]	50,0 ± 0,7	50,3 ± 0,5	49,4 ± 0,5	49,7 ± 0,7
MCH [pg]	14,5 ± 0,2	14,7 ± 0,2	14,2 ± 0,2	14,2 ± 0,3
MCHC [g/dl]	29,1 ± 0,2	29,3 ± 0,2	28,7 ± 0,4	28,6 ± 0,4
RDW [%]	13,1 ± 0,2	12,9 ± 0,4	13,3 ± 0,2	13,0 ± 0,2
MPV [fl]	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,1

WBC - Leukozytenzahl

RBC - Erythrozytenzahl

PLT - Trombozytenzahl

HGB - Hämoglobingehalt

HCT – Hämatokrit bezeichnet den Anteil der zellulären Bestandteile am Volumen des Blutes und ist ein Maß für die Zähigkeit des Blutes.

MCV – das mittlere Zellvolumen der roten Blutkörperchen

MCH – der mittlere Zellhämoglobingehalt der roten Blutkörperchen

MCHC – mittlere Zellhämoglobinkonzentration in den roten Blutkörperchen

RDW – Erythrozytengrößenvariabilität (red cell distribution width)

MPV – mittleres Trombozytenvolumen

## Abkürzungsverzeichnis

- ABC – *animal blood counter*  
ADP – Adenosindiphosphat  
AKT – *phosphatidylinositol 3' Kinase (PI3K)/v-akt murine thymoma viral oncogene*  
AMPK – *AMP-activated protein kinase*  
ASK1 – *apoptosis signal-regulating kinase 1*  
ASR – akustische Startle-Reaktivität (Verhalten)  
ATF4 – *activating transcription factor 4*  
ATF6 – *activating transcription factor 6*  
ATG5 – *autophagy protein 5*  
ATG12 – *autophagy protein 12*  
ATG16L – *autophagy protein 16-like*  
ATP – Adenosintriphosphat
- BAK – *Bcl-2 homologous antagonist / killer*  
BAX – *Bcl-2-associated X protein*  
BiP / GRP78 – *binding protein / glucose regulated protein 78*  
Bcl – B-Zell Lymphomen (*B-cell lymphoma*)  
bzw. – beziehungsweise  
BMD – *bone mineral density* [mg/cm<sup>2</sup>]
- CD – *cluster of differentiation* (Immunologie)  
CHOP – *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein*  
CMA – *chaperone-mediated autophagy*  
CNX - Calnexin  
CRT – Calreticulin  
CSB – *chicago sky blue*  
Cx43 – Connexin 43  
Cys – Cystein  
C57BL/6N – Maus-Stamm
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO – Dimethylsulfoxid  
DTT – Dithiothreitol  
DXA – *dual-energy X-ray absorption*
- EDEM – *ER degradation-enhancing alpha-mannosidase*  
eIF2 $\alpha$  – *eukaryotic initiation factor 2 alpha*  
eIF2 $\alpha$ -P – *eukaryotic initiation factor 2 alpha*, phosphorylierte Form  
EKG – Elektrokardiogramm  
Echo – Echokardiografie  
ER – endoplasmatische Retikulum  
ERAD – ER-assoziierte Degradation  
ERO1 – *endoplasmic oxidoreductin-1*  
ERp29 – *endoplasmic reticulum protein 29*  
ERp46 – *endoplasmic reticulum protein 46*  
ERp72 – *endoplasmic reticulum protein 72*  
Ets1 – Transkriptionsfaktor  
Ex/Em – Extinktion / Emission [nm]
- FACS – *fluorescence associated cell sorter*  
FCS – *fetal calf serum*  
FOX – *ferrous oxidation-xyleneol orange*
- GAPDH – *glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase*  
GLS – Golgi-Lokalisierungssequenz  
GMC – *German Mouse Clinic*  
GRp94 – *glucose regulated protein 94*  
GRp170 – *glucose regulated protein 170*

HDL – *high density lipid*  
HHN-Achse – Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse  
Hsc70 – *heat shock cognate protein of 70 kDa*  
HSP70 – *heat shock protein of 70 kDa*  
HSP90 – *heat shock protein of 90 kDa*

IC<sub>50</sub>-Wert repräsentiert die Konzentration an Substanz, die für 50 % Wachstumsinhibition der Zellen *in vitro* notwendig ist.

IF - Immunfärbung  
Ig – Immunoglobulin  
IpGTT – *intraperitoneal glucose tolerance test*  
IRE1 $\alpha$  – *inositol-requiring enzyme 1 alpha*  
IRS1 – *insulin receptor substrate-1*

JNK – Janus-Kinase

Keap1 *Kelch-like ECH-associated protein 1*  
KO – Knockout

LAMP-2A – *lysosomal-associated membrane protein 2A*  
LC3-I – *light chain 3*  
LCSM – *laser scanning confocal microscopy*  
LDH - Laktatdehydrogenase  
LDL – *low-density lipoproteins*  
Lhs1p – HSP70 Chaperon  
LIB – Laser-Interferenz-Biometrie (Phenotypisierung des Auges)

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*  
MEF – Maus-Embryo-Fibroblasten oder murine embryonale Fibroblasten  
MG132 – spezifischer Proteasome-Inhibitor  
MHC – *major histocompatibility complex* (Immunologie)  
mLST8 – *mammalian lethal with sec thirteen*  
MPF – Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung  
mTOR – *mammalian target of rapamycin*  
mTORC1 – *mammalian target of rapamycin komplex 1*

NF- $\kappa$ B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*  
NMR – *nuclear magnetic resonance*  
NRF2 – *NF-E2-related factor 2*

PBC – die primär biliäre Zirrhose ist eine relativ seltene Autoimmunerkrankung  
PCR – *polymerase chain reaction*  
PDI – Protein-Disulfid-Isomerase  
PERK – *protein kinase R-like ER protein kinase*  
PI – Propidiumiodid  
PI3K – Phosphoinositid 3-Kinase  
PPAR $\alpha$  – *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*  
PPI – *prepulse inhibition* (Phenotypisierung des Verhaltens)  
P5 – Protein-Disulfid-Isomerase P5

ROS – *reactive oxygen species*

SDS – *sodium dodecyl sulfate*  
Ser – Serin  
SHIRPA – ein Protokoll, das im Jahr 1997 von Rogers and Mitarbeitern und SmithKlineBeecham für Studien des Verhaltens etabliert wurde  
siRNA – *small interfering* Ribonukleinsäure  
Slug – Transkriptionsfaktor  
S1P – *site 1 protease*  
S2P – *site 2 protease*  
SREBP – *sterol response element-binding protein*

Tg – Thyreoglobulin

TGF $\beta$  - *transforming growth factor- $\beta$*

TNF – *tumor necrosis factor*

TRAF2 – *TNF-receptor associated receptor 2*

Trx – Thioredoxin

Twist – Transkriptionsfaktor

XPB1 – *X box binding protein 1*

UPR – *unfolded protein response*, Stressantwort auf die Akkumulierung der ungefalteten Proteinen im ER

UPS – Ubiquitin-Proteasome System

UV Licht – Ultraviolettstrahlung

VLDL – *very low-density lipoproteins*

WB – Western Blot

(Wnt)/ $\beta$ -catenin – *wingless-type MMTV integration site family*

WT – Wildtyp

## Lebenslauf

Irina Hirsch

Institut 20

06193 Wettin-Löbejün OT Merbitz

### Persönliche Daten

Geburtsdatum 12.08.1975  
Geburtsort Uwa, Russland  
Nationalität russisch  
Familienstand verheiratet, 2 Kinder

### Schulbildung

09.1982 – 06.1992 allgemeinbildende Schule (Uwa, Russland)

### Hochschulstudium

09.1992 – 06.1997 Studium der Biologie, Udmurtische Staatliche Universität (Igzewsk, Russland)

09.1996 – 06.1997 Anfertigung der Diplomarbeit „Biologische und physiologische Besonderheiten von *Ribes rubra* in Udmurtien“ an der Udmurtischen Staatlichen Universität unter Leitung von Prof. Dr. W. W. Tuganaev

02.1998 – 05.2001 Promotionsstudium und Anfertigung der Dissertation an der Russischen Staatlichen Agraruniversität (Moskau, Russland) unter Leitung von Dr. T. D. Nikitochkina

05.2001 Promotion in der Landwirtschaft zum Candidatus Science an der Russischen Staatlichen Agraruniversität (Moskau, Russland)

02.2004 – 11.2007 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

02.2007 – 11.2007 Anfertigung der Diplomarbeit „Rekonstitution von humanen Neuropeptid Y-Rezeptoren (Typ II) in Liposomen“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Leitung von Dr. habil. D. Huster

01.2008 – 12.2011 Promotionsstudium und Anfertigung der Dissertation an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle/Saale) unter Leitung von Prof. Dr. G. Fischer in der Nachwuchsforschungsgruppe von Dr. D. M. Ferrari.

**Berufserfahrung**

09.1997 – 03.2000    Wissenschaftliche Assistentin am Lehrstuhl für Ökologie der Pflanzen,  
Udmurtische Staatliche Universität (Russland)

03.2000 – 10.2002    Stellvertretende Direktorin für wissenschaftliche Arbeit im  
Botanischen Garten der Udmurtischen Staatlichen Universität (Russland)

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Gunter Fischer möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und für die Möglichkeit bedanken, meine Promotionsarbeit an der Max-Planck-Forschungsstelle durchführen zu dürfen.

Dr. David M. Ferrari danke ich für die Vergabe dieses anspruchsvollen und sehr interessanten Themas, sowie für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Den Mitarbeitern der *German Mouse Clinic* danke ich für die Durchführung und Auswertung von Daten primärer Phenotypisierung von ERp29KO Mauslinie.

Allen ehemaligen Mitarbeitern der „AG Ferrari“ möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. E. Prell für Diskussionsbereitschaft und fachliche Unterstützung rund um mein Promotionsthema.

Bei der Max-Planck-Gesellschaft möchte ich mich an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Am meisten danke ich vom ganzen Herzen meiner Familie für ihre Unterstützung. Ich danke meinem Ehemann dafür, dass er mir immer den Rücken frei gehalten hat, um mich voll auf meine Arbeit konzentrieren zu können, trotz der schwierigen Zeit, die wir gemeinsam durchmachen mussten.

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ich habe mich bisher nicht um einen Doktorgrad an dieser oder einer anderen Universität beworben.

Ort, Datum

Unterschrift