

Zur Regulation der
Proteintranslokase des Endoplasmatischen
Retikulums in Eukaryoten

von

Dipl.-Biol. Frank Erdmann

Dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
vorgelegte Dissertation

Osnabrück, im April 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Funktion des Endoplasmatischen Retikulums	1
1.2	Die Protein-Translokase des Endoplasmatischen Retikulums: Der Sec61-Komplex	2
1.2.1	Targeting der Präproteine an die ER-Membran	3
1.2.2	Der cotranslationale Transport	4
1.2.3	Der posttranslationale Transport	8
1.2.4	Modifikationen der Proteine nach abgeschlossener Translokation	9
1.3	Das Endoplasmatische Retikulum als intrazellulärer Calciumspeicher	9
1.3.1	Translokation-vermittelter Calcium-Ausstrom aus dem ER-Lumen	10
1.4	Calmodulin	11
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Verwendete Proben	16
2.1.1	Proben des Translokation-Komplexes aus <i>Canis familiaris</i>	16
2.1.1.1	Raue Mikrosomen, RM	16
2.1.1.2	Puromycin-Kalium gewaschene raue Mikrosomen, PKRM	16
2.1.1.3	Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex	16
2.1.2	Proben des Translokation-Komplexes aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.1.2.1	Raue Mikrosomen	18
2.1.3	Weitere Proben	18
2.1.3.1	Ubiquitin conjugating enzyme 6, Ubc6	18
2.1.3.2	Preprocecropin A, PPcecA	19
2.1.3.3	Calmodulin	19
2.1.3.4	Ribosomen	19
2.1.3.5	Tom40	20
2.1.3.6	SecYEG-Komplex	20
2.2	Biochemische Methoden	20
2.2.1	Flotation im Dichtegradienten	20
2.2.2	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	21
2.2.3	SDS-Gelelektrophorese	21
2.2.4	Detektion gelabelter Proteine im Polyacrylamidgel	21
2.2.5	Anfärbung der Proteine im Polyacrylamidgel	21
2.2.6	Westernblot	22

2.2.7	Fluoreszenzmarkierung des Sec61 α IQ-Peptides	22
2.2.8	Reinigung des gelabelten Sec61 α IQ-Peptides mittels HPLC und Massenspektrometrie	23
2.2.9	Modifikation der Lipidkomposition der Probenliposomen	23
2.2.10	Induzieren des Sec61-Kanals in RM-Präparationen	24
2.3	Elektrophysiologische und biophysikalische Methoden	24
2.3.1	Die planare Bilayer Technik	24
2.3.2	Aufbau der Messkammer	25
2.3.3	Der Messstand	26
2.3.4	Elektrischer Aufbau	27
2.3.5	<i>Liquid junction</i> Potenziale	29
2.3.6	Aufbereiten des Bilayerlipides	29
2.3.7	Herstellung des Bilayers	29
2.3.8	Fusion der Probenliposomen mit dem planaren Bilayer	30
2.3.9	Leitwertbestimmung	31
2.3.10	Leitwertsättigung	33
2.3.11	Aktivitäten der Elektrolytlösungen	33
2.3.12	Biionische Messungen	34
2.3.13	Umkehrpotenzial und Selektivität	34
2.3.14	Abschätzung des Porendurchmessers aus dem Leitwert	36
2.3.15	Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit	37
2.3.16	Mean-Variance Plot	37
2.3.17	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	38
2.4	Verwendete Chemikalien	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus <i>Canis familiaris</i>	41
3.1.1	Fusion der Proben mit dem planaren Bilayer	41
3.1.2	Schaltverhalten des Sec61-Komplexes	42
3.1.3	Leitwerte	44
3.1.4	Konzentrationsabhängigkeit der Leitwerte	46
3.1.5	Umkehrpotenzial und Selektivität	47
3.1.6	Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit	50
3.1.7	Biionische Messungen	51
3.1.8	Interaktion mit Lanthan- und Aluminiumionen	53
3.1.9	Abschätzung der Porengröße aus den Leitwerten	56
3.1.10	Regulation des Sec61-Komplexes durch Calmodulin	57

3.1.10.1	Biochemische Ergebnisse	57
3.1.10.2	Elektrophysiologische Ergebnisse	58
3.1.10.3	Putative Calmodulin-Bindestellen	64
3.1.10.4	Bindungsstudien mittels Fluoreszenz-Korrelations- Spektroskopie	66
3.1.11	Veränderungen durch Ribosomen	68
3.2	Charakterisierung der rauen Mikrosomen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	71
3.2.1	Fusion der Proben mit dem planaren Bilayer	71
3.2.2	Experimente mit Sec61p-Mutanten	71
3.2.3	Schaltverhalten	72
3.2.4	Leitwerte	74
3.2.5	Umkehrpotenzial	75
3.2.6	Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit	75
3.2.7	Abschätzung der Porendurchmessers aus den Leitwerten	76
4	Diskussion	77
4.1	Fusion der Proben mit dem planaren Bilayer	77
4.2	Schaltverhalten und Leitwerte des Sec61-Komplexes	79
4.3	Konzentrationsabhängigkeit des Leitwertes	84
4.4	Umkehrpotenzial und Selektivität	84
4.5	Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit und <i>voltage gating</i>	88
4.6	Interaktion mit Lanthan- und Aluminiumionen	88
4.7	Abschätzung des Porendurchmessers aus den Leitwerten	90
4.8	Regulation des Sec61-Komplexes durch Calmodulin	91
4.9	Veränderungen durch Ribosomen	96
4.10	Eigenschaften der rauen Mikrosomen aus <i>C. familiaris</i> und <i>S. cerevisiae</i>	98
5	Zusammenfassung	100
	Anhang	102
	Literatur	102
	Abbildungsverzeichnis	119
	Tabellenverzeichnis	121
	Abkürzungsverzeichnis	122

1 Einleitung

Eine der wichtigsten Funktionen biologischer Membranen ist die Unterteilung eukaryotischer Zellen in abgegrenzte Kompartimente, in denen biochemische Reaktionen unter differenzierten Bedingungen effektiv ablaufen können. Die verschiedenen chemischen Milieus unterscheiden sich im Hinblick auf ihre Proteinzusammensetzung, den pH-Wert und die Konzentration von Salzen. Ihre Bereitstellung beruht auf Membranproteinen, die als Membranporen oder -transporter zusammen mit den Lipiddoppelschichten hochselektive Permeabilitätsbarrieren bilden und den Ionen- und Molekülaustausch intrazellulär zwischen den Organellen, aber auch interzellulär zwischen den Zellen kontrollieren. Die einzelnen Zellkompartimente sind zumeist nicht in der Lage, die für die unterschiedlichen biochemischen Prozesse benötigten membrangebundenen oder löslichen Proteine eigenständig zu synthetisieren. Stattdessen wird der Großteil der Proteine einer Zelle im Zellkern kodiert und durch cytosolische Ribosomen synthetisiert. Anschließend werden die organellspezifischen Vorstufenproteine mit Hilfe der Signalsequenzen an ihren Bestimmungsort adressiert, über die entsprechenden Membranen in die Organellen oder deren Subkompartimente transloziert oder, im Fall von Membranproteinen, in die Membranen inseriert. Diese Vorgänge werden von Proteintranslokasen vermittelt, die als wassergefüllte Poren in den Kompartimentmembranen vorliegen. Sowohl für die Signalerkennung als auch für eine Modifikation der Polypeptidketten nach der Translokation oder Insertion sind weitere Proteine verantwortlich, die oft in Komplexen mit den Proteintranslokasen organisiert sind.

1.1 Aufbau und Funktion des Endoplasmatischen Retikulums

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) durchzieht als engmaschiges Netzwerk das gesamte Cytosol eukaryotischer Zellen. Dabei bildet seine Membran ein zusammenhängendes, dynamisches System tubulärer Struktur, das das Lumen des ER vom Cytosol separiert und direkt in die äußere Membran des Zellkerns übergeht (Borgese et al., 2006). ER-Lumen und perinukleärer Raum bilden somit ein Kontinuum. Sowohl im Lumen als auch an der Membran des ER sind eine Vielzahl anabolischer Stoffwechselprozesse wie beispielsweise die Synthese der Steroidhormone aus der Vorstufe Cholesterin und die Bildung der Phospholipide lokalisiert. Außerdem ist das ER-Lumen die erste Station der Proteinsekretion. Hier werden die Polypeptide nach der Translokation über die ER-Membran modifiziert und ihre Funktionalität über Qualitätskontrollmechanismen sichergestellt. Des Weiteren ist das ER-Lumen als intrazellulärer Calciumspeicher an der Regulation physiologischer und biochemischer Prozesse wie beispielsweise der Muskelkontraktion, der Apoptose und der Exocytose beteiligt.

1.2 Die Protein-Translokase des Endoplasmatischen Retikulums: Der Sec61-Komplex

Bereits 1956 konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass die Membran des ER teilweise mit Ribosomen besetzt ist (raues ER; Palade und Siekevitz, 1956a; Palade und Siekevitz, 1956b). Blobel und Dobberstein (1975) schlugen vor, dass diese Ribosomen Proteine durch einen wassergefüllten Kanal, das Translokon, direkt in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums synthetisieren. Mittlerweile ist dieser cotranslationale Transport als Hauptimportweg für Proteine in die Membran und das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums bei höheren Eukaryoten identifiziert worden (siehe 1.2.2). Daneben wurde ein weiterer Translokon-vermittelter Mechanismus aufgeklärt, über den vollständig cytosolisch synthetisierte Vorstufenproteine posttranslational transportiert werden (1.2.3). Außerdem bewerkstelligt das Translokon die Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine aus dem ER-Lumen in das Cytosol, wo die proteasomale Degradation erfolgt. Einen Überblick über diese als ERAD-System (endoplasmic reticulum associated protein degradation) zusammengefassten Vorgänge bieten Römisch (2005) und Meusser et al. (2005).

Als Kernkomponente des Translokons in Eukaryoten wurde der membranständige, α -helikale Sec61-Komplex identifiziert (Görlich et al., 1992; Görlich und Rapoport, 1993; Hartmann et al., 1994; Wirth et al., 2003). In Bakterien und Archaeen wurde der Sec61-homologe SecY-Komplex aufgeklärt (Brundage et al., 1990). Die zentrale Komponente des heterotrimeren Proteins bildet die Sec61 α -Untereinheit (Sec61p/Ssh1p in Hefe und SecY in Bakterien und Archaeen). Sie besteht aus 10 Transmembranhelices mit cytosolischen N- und C-Termini. Die Sec61 β -Untereinheit (Sbh1p/Sbh2p in Hefe, SecG in Bakterien und Sec β in Archaeen) sowie die Sec61 γ -Untereinheit (Sss1p in Hefe und SecE in Bakterien und Archaeen) durchspannen die Membran mit jeweils einer Helix.

Die Sec61 α -Untereinheit bildet eine wassergefüllte Pore (Crowley et al., 1994; Hamman et al., 1997; Wirth et al., 2003), durch die sowohl Vorstufenproteine transloziert (Mothes et al., 1994; Oliver et al., 1995) als auch Ionen geleitet werden können (Simon und Blobel, 1991; Wirth et al., 2003; Wonderlin, 2009, siehe auch 1.3.1). Die Dimensionen dieser Pore wurden in mehreren Studien untersucht. Fluoreszenz-Quenching Experimente mit NAD⁺ und Antikörper Fab-Fragmenten haben einen Durchmesser von 40-60 Å ergeben (Hamman et al., 1997), während in elektrophysiologischen Untersuchungen Änderungen des Durchmessers von 26-60 Å für Schaltereignisse im Haupt- und Maximalwert beobachtet wurden (Wirth et al., 2003). Saparov et al. (2007) haben aus elektrophysiologischen Experimenten mit dem über Disulfidbrücken im Offenzustand fixierten SecY-Komplex aus *Escherichia coli* Durchmesser von 7 Å und 15 Å abgeleitet,

1.2 Die Protein-Translokase des Endoplasmatischen Retikulums: Der Sec61-Komplex

während die Röntgenkristallstrukturen des inaktiven, geschlossenen SecYE β -Komplexes aus *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg et al., 2004) und die des SecYE-Komplexes aus *Thermus thermophilus* (Tsukazaki et al., 2008) Durchmesser von 5-8 Å bzw. 5-10 Å aufweisen. Aus der Kristallstruktur des SecYEG-Komplexes aus *Thermotoga maritima* (Zimmer et al., 2008) kann ein Wert von 7-12 Å abgeleitet werden. Biochemische Untersuchungen haben ergeben, dass das SecYEG-Translokation über Disulfidbrücken quervernetzte Haarnadelstrukturen transportieren (Tani et al., 1990) und der Sec61-Komplex die Retrotranslokation vollständig gefalteter Proteine vermitteln kann (Tirosh et al., 2003).

Oligomerisierung und Stöchiometrie des Translokationskomplexes sind Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Dabei wird sowohl ein monomerer Sec61/SecY-Komplex im Translokation postuliert (Van den Berg et al., 2004; Menetret et al., 2007; Kalies et al., 2008; Menetret et al., 2008), als auch eine Oligomerisierung als Dimer, Trimer oder Tetramer vorgeschlagen (Menetret et al., 2000; Beckmann et al., 2001; Breyton et al., 2002; Mori et al., 2003; Snapp et al., 2004; Menetret et al., 2005; Osborne und Rapoport, 2007), in dem jedoch ebenfalls ein einzelner Sec61-Komplex die aktive Translokationspore konstituiert (siehe auch Cannon et al., 2005). Mitra et al. (2005) und Mitra und Frank (2006) haben außerdem ein Modell entworfen, nach dem zwei SecY-Komplexe gemeinsam einen konsolidierten Kanal bilden sollen.

1.2.1 Targeting der Präproteine an die ER-Membran

Die Zielsteuerung der Vorstufenproteine an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums erfolgt zumeist über α -helikale, N-terminale Signalpeptide. Das eigentliche Signal wird dabei nicht durch konservierte Konsensusmotive in der Aminosäureabfolge, sondern über die chemischen Eigenschaften der Signalsequenzen vermittelt (Hegde und Bernstein, 2006). Diese besitzen typischerweise eine Länge von 20-30 Aminosäuren und einen zentralen hydrophoben Abschnitt, der als H-Domäne bezeichnet wird und dessen Charakter die Präproteine für die signal recognition particle- (SRP) abhängige, cotranslationale oder die SRP-unabhängige, posttranslationale Translokation adressiert (Hegde und Bernstein, 2006). Diesbezüglich wurde gezeigt, dass die Affinität der Bindung des SRP an die Signalsequenz von deren Hydrophobizität bestimmt wird (Hatsuzawa et al., 1997), H-Domänen mit geringer Hydrophobizität assoziieren demnach nicht mit dem SRP und werden dadurch automatisch dem posttranslationalen Translokationsmechanismus zugeordnet (Ng et al., 1996; Hegde und Bernstein, 2006). Matoba und Ogrydziak (1998) haben gezeigt, dass die Interaktion mit dem SRP ebenfalls durch die Krümmung der H-Domäne vermittelt wird. Neben dem Translokationsmechanismus wird auch die

1 Einleitung

Orientierung des Vorstufenproteins im Translokationskanal über die Signalsequenz determiniert, ein entscheidender Faktor bei der Insertion von Membranproteinen (Hessa et al., 2007; Lundin et al., 2008).

Die Signalsequenzen löslicher Proteine sowie von Typ I/Typ II Membranproteinen werden während der Translokation vom Signalpeptidase-Komplex (SPC) proteolytisch abgespalten (Alder und Johnson, 2004; siehe 1.2.2). Im Gegensatz dazu dient bei Signal-Anchor Membranproteinen die Transmembranhelix als Signalsequenz, eine Prozessierung durch den SPC findet nicht statt (Alder und Johnson, 2004). Tail-Anchor Membranproteine tragen ebenfalls keine prozessierbare N-terminale Signalsequenz. Ihre Zielsteuerung wird stattdessen sowohl über die Eigenschaften der Transmembrandomäne als auch über den kurzen C-Terminus vermittelt (Borgese et al., 2003).

Die Adressierung der Präproteine kann über verschiedene Modifikationen der Signalsequenzen vor der Translokation reguliert werden. Phosphorylierung oder Myristoylierung bilden beispielsweise die Grundlage für Dual-targeting Mechanismen von Proteinen, die sowohl an das ER als auch mitochondriell adressiert werden (Anandatheerthavarada et al., 1999; Colombo et al., 2005).

1.2.2 Der cotranslationale Transport

Das Targeting der am Exit-Tunnel cytosolischer Ribosomen naszierenden Vorstufenproteine an die ER-Membran bildet den ersten Schritt im cotranslationalen Translokationsmechanismus. Dabei erkennt und bindet der signal recognition particle die N-terminale Signalsequenz, sobald diese den Exit-Tunnel des Ribosoms verlässt. Beim SRP handelt es sich um einen Ribonucleoproteinkomplex für dessen Funktionalität die Untereinheit SRP54 und die Alu-Domäne von besonderer Bedeutung sind. Die SRP54-Untereinheit vermittelt sowohl die Wechselwirkung mit der Signalsequenz am Ribosom (Clemons et al., 1999) als auch mit dem Translokon, während die Alu-Domäne mit der Bindestelle für Elongationsfaktoren am Ribosom interagiert (Halic et al., 2004; Terzi et al., 2004) und damit einen Stopp der Translation (*translational arrest*; Walter und Blobel, 1981; Mason et al., 2000) auslöst. Lakkaraju et al. (2008) haben postuliert, dass dabei die Proteintranslokationsrate im Bezug zur Konzentration freier SRP im Cytosol reguliert wird und es zu einer Vorsortierung der Vorstufenproteine kommt.

Die Bindung des SRP an den SRP-Rezeptor (SRP-R) in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums führt den Komplex aus Ribosom und naszierender Kette an das Translokon. Dem membranständigen ERj1 wird ebenfalls eine Funktion bei der Koordination des Ribosom-Translokon-Komplexes zugeschrieben (Blau et al., 2005; Dudek et al., 2005). Darüber hinaus hat ERj1 über die entsprechende Interaktion mit dem Ribo-

1.2 Die Protein-Translokase des Endoplasmatischen Retikulums: Der Sec61-Komplex

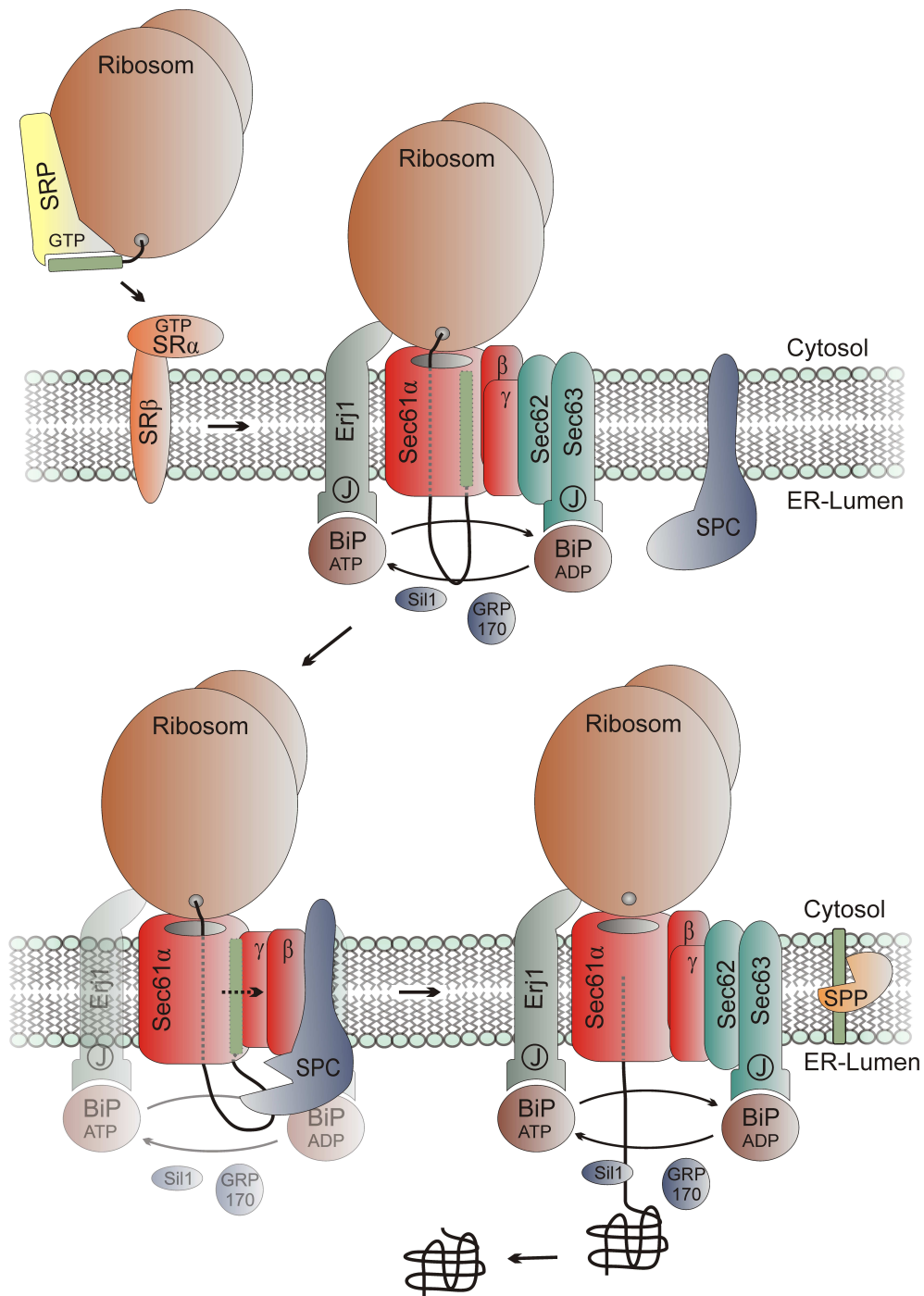


Abbildung 1.1: Ablauf der cotranslationalen Translokation in höheren Eukaryoten
Abgeändert nach Zimmermann et al. (2006).

som einen regulatorischen Einfluss auf die Translation (Dudek et al., 2002; Dudek et al., 2005). Sowohl bei der Untereinheit SRP54 des SRP als auch bei der cytosolischen SRα-Untereinheit und der membranständigen SRβ-Untereinheit des SRP-R handelt es sich

1 Einleitung

um GTPasen. Helmers et al. (2003) haben vorgeschlagen, dass die β -Untereinheit des Sec61 als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für SRP β agiert und so die Assemblierung des SRP-R aus SR α und SRP β Translokation-vermittelt reguliert wird. Jiang et al. (2008) konnten zeigen, dass die Sec61 β -Untereinheit in *Saccharomyces cerevisiae* entscheidend für die Wechselwirkung zwischen SRP-R und dem Sec61-Heterotrimer ist und eine Deletion von Sbh1p und Sbh2p entsprechend einen Defekt im cotranslationalen Targeting zur Folge hat. Im GTP-gebundenen Zustand interagieren SRP54 und SR α direkt miteinander (Egea et al., 2004; Focia et al., 2004). Dieses löst eine Konformationsänderung in der SRP54-Untereinheit aus, die eine Bindung des Ribosoms an das Translokation ermöglicht, den *translational arrest* aber aufrecht erhält (Halic et al., 2006). Die GTPase-Aktivität des so assemblierten SRP-SRP-R-Komplexes wird aktiviert, das Signalpeptid an das Translokation übergeben (Shan et al., 2007) und je nach Ladungsverteilung in der Signalsequenz im Fall eines löslichen Proteins mit einem 180°-Loop (N-Terminus verbleibt im Cytosol; Goder und Spiess, 2003; Goder et al., 2004) oder im Fall eines Membranproteins mit unterschiedlicher Orientierung (N- oder C-Terminus verbleibt im Cytosol; Hessa et al., 2007; Lundin et al., 2008) in den Translokationskanal eingefädelt. Nach GTP-Hydrolyse dissoziieren SRP und SRP-R und der SRP löst sich vom Ribosom (Connolly et al., 1991; Song et al., 2000). Damit wird der *translational arrest* aufgehoben und das Vorstufenprotein direkt in den Translokationskanal synthetisiert.

Die vektorielle Translokation wird von dem ER-luminalen Protein BiP (IgG heavy chain binding protein) vermittelt. Dabei handelt es sich um ein Chaperon der Hsp70-Familie, das über die J-Domänen der Cochaperone Sec63 (Skowronek et al., 1999; Tyedmers et al., 2000) und ERj1 (Dudek et al., 2002; Dudek et al., 2005; Blau et al., 2005) an den Ribosom-Translokation-Komplex rekrutiert wird und das translozierende Präprotein bindet (Misselwitz et al., 1998). Die ATPase-Aktivität des BiP und damit seine Substrataffinität wird durch die Interaktion mit den J-Domänen reguliert (Tyedmers et al., 2000). Auch die Nukleotidaustauschfaktoren Sil1 (Chung et al., 2002) und Grp170 (Weitzmann et al., 2006) sind an der BiP-Regulation beteiligt. Nach Modellvorstellungen soll BiP während der Translokation als molekulare Ratsche fungieren, ein Mechanismus bei dem die brownische Molekularbewegung im Zusammenspiel mit einem wiederholten Binden der Peptidbindetasche des BiP-Moleküls an die translozierenden Vorstufenproteine zu einem gerichteten Transport führt (Matlack et al., 1999; Tyedmers et al., 2003). Das wiederholte Binden und Entlassen der Präproteine wird dabei von den unterschiedlichen Affinitäten der Substratbindetasche während der ATP-Hydrolysezyklen bestimmt, im ATP-gebundenen Zustand besitzt BiP eine geringe Substrataffinität, die durch die Hydrolyse des ATP zu ADP deutlich erhöht wird (Misselwitz et al., 1998). Einen guten Überblick über den Hsp70-Chaperon-Zyklus bieten Mayer und Bukau (2005) und

1.2 Die Protein-Translokase des Endoplasmatischen Retikulums: Der Sec61-Komplex

Goloubinoff und De Los Rios (2007). Des Weiteren wird BiP auch eine regulatorische Funktion auf das Gating des Translokkanals und damit für die Aufrechterhaltung der Permeabilitätsbarriere an der ER-Membran zugeschrieben. Demnach verschließt BiP die wassergefüllte Pore vor, während und nach der Translokation (Hamman et al., 1998; Haigh und Johnson, 2002; Wirth et al., 2003; Alder et al., 2005), kann diese aber auch koordiniert öffnen (Crowley et al., 1994) und so das Vorstufenprotein luminal entlassen. Für die Insertion polytopischer Membranproteine wurde ein Modell entwickelt, bei dem sich Ribosom und BiP abwechselnd vom Translokkanal ablösen, so dass cytosolische und luminalen Loops des Präproteins entlassen werden können (Liao et al., 1997; Haigh und Johnson, 2002; Alder et al., 2005).

Während der Translokation wird das Vorstufenprotein vom Signalpeptidase-Komplex prozessiert und die N-terminale Signalsequenz proteolytisch abgespalten, eine Voraussetzung für weitere Modifikationen nach Abschluss der Translokation wie Glykosylierung durch die Oligosaccharyl-Transferase (OST) (Chen et al., 2001). Der SPC wird über eine Interaktion der Untereinheit SPC25 mit der β -Untereinheit des Sec61 an das Translokkanal rekrutiert (Kalies et al., 1998). Die abgespaltenen Signalsequenzen werden lateral in die Membran inseriert, dort von der membranständigen Signalpeptid-Peptidase (SPP) intramembran geschnitten (Weihofen et al., 2002) und ins ER-Lumen (Lemberg et al., 2001) oder ins Cytosol (Weihofen et al., 2000) entlassen.

Nach Abschluss der Translokation werden die löslichen Proteine über ein ER-luminales Chaperonsystem weiteren Modifikationen zugeführt (siehe 1.2.4).

In *Saccharomyces cerevisiae* wird der cotranslationale Transport hauptsächlich vom Sec61p-Komplex vermittelt (Prinz et al., 2000b). Dieser wird von den Proteinen Sec61p (homolog zur Sec61 α -Untereinheit in Säugern), Sbh1p (Sec61 β) und Sss1p (Sec61 γ) konstituiert (Panzner et al., 1995). Daneben wurde ein Sec61-homologer Proteinkomplex identifiziert, der als Ssh1p-Komplex bezeichnet wird und die Proteine Ssh1p, Sbh2p und Sss1p zusammenfasst (Finke et al., 1996). Im Gegensatz zum Sec61p-Komplex ist der Ssh1p-Komplex nicht essenziell, Ssh1p Δ -Stämme zeigen keine ausgeprägten Wachstumsdefekte oder Störungen in der Proteintranslokation (Finke et al., 1996; Wittke et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass der Ssh1p-Komplex nicht mit dem für den posttranslationalen Transport essenziellen Sec62p/Sec63p-Komplex interagiert (Wittke et al., 2002). Außerdem bindet Ssh1p Ribosomen mit ähnlicher K_D wie Sec61p (Prinz et al., 2000a). Entsprechend wurde postuliert, dass der Ssh1p-Komplex einen alternativen, cotranslationalen Proteinimportweg darstellt (Wittke et al., 2002). Damit übereinstimmend kann eine Exprimierung von Ssh1p Defekte im Sec61p-vermittelten cotranslationalen Transport kompensieren (Cheng et al., 2005), Sec61p in Null-Mutanten aber nicht ersetzen (Cheng et al., 2005; Finke et al., 1996). Jermy et al. (2006) haben zusätzlich zu Sec61p-

1 Einleitung

und Ssh1p-Komplex den hexameren SEC'-Komplex eingeführt, der ebenfalls die cotranslationale Translokation vermitteln und von den Proteinen Sec61p, Sbh1p, Sss1p, Sec63p, Sec71p und Sec72p konstituiert werden soll.

1.2.3 Der posttranslationale Transport

Neben der cotranslationalen Translokation wurde ein weiterer, SRP-unabhängiger Transportmechanismus aufgeklärt, bei dem die Präproteine vollständig im Cytosol der Zelle synthetisiert und erst anschließend (posttranslational) transloziert werden.

Nach der ribosomalen Proteinbiosynthese im Cytosol von *S. cerevisiae* werden die Vorstufenproteine von einem Chaperonkomplex der Hsp70-Familie, den essenziellen Ssa-Proteinen, gebunden (Chirico et al., 1988). Diese verhindern eine Aggregation der Präproteine und halten sie dadurch in einem transportkompetenten Zustand (Ngosuwan et al., 2003). Wie andere Hsp70-Chaperone interagieren auch die Ssa-Proteine mit Cofaktoren. So wird die ATPase-Aktivität von Ssa1p durch die J-Domäne des Ydj1p (Ngosuwan et al., 2003) und durch Sti1p (Wegele et al., 2003) reguliert. Die Bindung von Ydj1p an Ssa1p ist essenziell für eine Interaktion mit dem Präprotein und die folgende Translokation (McClellan und Brodsky, 2000). Nach ATP-Hydrolyse durch Ssa1p löst sich das Präprotein vom Chaperonkomplex und wird an das Translokon übergeben (Ngosuwan et al., 2003).

Den posttranslationalen Transport in *S. cerevisiae* vermittelt der heptamere SEC-Komplex. Dieser wird vom Sec61p-Komplex (Sec61p, Sbh1p und Sss1p) und dem Sec62p/Sec63p-Komplex (Sec62p, Sec63p, Sec71p Sec72p) konstituiert (Panzner et al., 1995). Nach der Signalsequenzerkennung durch Sec61p, Sec62p und Sec71p (Plath et al., 2004) wird das Präprotein mit einem 180°-Loop in den Translokationskanal eingefädelt (Plath et al., 1998). Die Interaktion von Sec62p mit Sec61p und Sec63p stabilisiert den Komplex (Willer et al., 2003; Wang und Johnson, 2005).

Die J-Domäne des Sec63p interagiert mit dem ER-luminalen Hsp70-Chaperon Kar2p und reguliert dessen ATPase-Aktivität (McClellan et al., 1998; Young et al., 2001). Das BiP-homologe Protein agiert dabei als molekulare Ratsche (Panzner et al., 1995) und vermittelt so eine vektorielle Translokation des Vorstufenproteins durch die Translokationspore (siehe 1.2.2). Des Weiteren unterstützt Kar2p die anschließende Proteinfaltung (Simons et al., 1995). Neben Sec63p sind auch die Nukleotidaustauschfaktoren Lhs1p (Steel et al., 2004) und Sls1p (Kabani et al., 2000) an der Kar2p-Regulation beteiligt. Es wurde vorgeschlagen, dass der Signalpeptidase-Komplex in Hefen über die Interaktion der Untereinheit Spc2p mit Sbh1p/Sbh2p an das Translokon rekrutiert wird (Antonin et al., 2000). Die katalytische Untereinheit Sec11p prozessiert die Signalsequenz

1.3 Das Endoplasmatische Retikulum als intrazellulärer Calciumspeicher

während der Translokation. Diese wird lateral in die Membran entlassen und von der Signalpeptid-Peptidase proteolytisch gespalten (siehe 1.2.2).

Der posttranslationale Translokationsmechanismus wird vermehrt in Hefen, Bakterien und Archaeen genutzt. In höheren Eukaryoten werden vor allem kurze Peptide (<70 Aminosäuren) wie Preprocecropin A (Schlenstedt et al., 1990) und Prepromellitin (Müller und Zimmermann, 1987) posttranslational in das ER-Lumen transloziert. Eine Beteiligung des Translokons an der Insertion von Tail-Anchor-Membranproteinen ist umstritten (Borgese et al., 2007). Für mehrere Mitglieder dieser Proteinfamilie wurde eine posttranslationale, SRP-unabhängige und Sec61-vermittelte Insertion in die Membran des ER postuliert (Abell et al., 2003). Weitere Ergebnisse legen für das Tail-Anchor-Protein Synaptobrevin 2 zudem einen alternativen SRP-abhängigen, posttranslationalen Insertionsmechanismus unter Beteiligung des Translokons nahe (Abell et al., 2004).

1.2.4 Modifikationen der Proteine nach abgeschlossener Translokation

Die abschließende Faltung der löslichen, vollständig translozierten Proteine wird von ER-luminalen Chaperonen wie dem Hsp90-homologen Endoplasmin (GRP94) und im Fall von monoglykosylierten Proteinen von den Lectinchaperonen, dem membranständigen Calnexin und dem löslichen Calretikulin, unterstützt. Peptidbindungen werden von Peptidbindungsisomerasen und spezifischen Prolyl-Peptidyl-Isomerasen modifiziert. Oxidoreduktasen wie die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) katalysieren die Bildung und Reduktion von Disulfidbrücken. Einen guten Überblick über diese Vorgänge bietet Christis et al. (2008).

1.3 Das Endoplasmatische Retikulum als intrazellulärer Calciumspeicher

Die Konzentration freier Calciumionen im Cytosol der Zelle reguliert eine Vielzahl physiologischer und biochemischer Prozesse wie Muskelkontraktion, Exocytose und Apoptose (Berridge et al., 2000). Das Endoplasmatische Retikulum spielt bei den signalvermittelnden Mechanismen eine entscheidende Rolle als hochdynamischer intrazellulärer Calciumspeicher, aus dem Ca^{2+} koordiniert durch Inositol-1,4,5-Trisphosphat- und Ryanodin-Rezeptoren (IP3-R/RyR) entlassen wird. Stimuliert wird diese Freisetzung durch Calcium selber (*Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*, CICR), welches entweder durch Ionenkanäle der Plasmamembran wie NMDA-Rezeptoren oder Ca_v -, TRP-, und CRAC-(Stim/Orai) Kanäle aus dem extrazellulären Medium in das Cytosol einströmt, oder aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Die Sensitivität der IP3- und Ryanodin-Rezeptoren für Ca^{2+} -Ionen wird wiederum über die second-messenger Moleküle Inositol-

1 Einleitung

1,4,5-Trisphosphat (IP3) und zyklische ADP-Ribose (cADP-R) reguliert. Die Synthese von IP3 an der Plasmamembran über Phospholipase C unterliegt extrazellulären Agonisten der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. cADP-R wird im Cytosol der Zelle durch die ADP-Ribosyl-Zyklase CD38 gebildet. Einen Überblick über diese Vorgänge bieten Berridge et al. (2003) und Clapham (2007).

Das Calcium-Signal wird im Cytosol sowohl bezüglich der örtlichen als auch der zeitlichen Ausdehnung strikt reguliert. So führt die Calcium-Freisetzung durch IP3-R und RyR zu lokal erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen die als Calcium-Puffs oder -Sparks bezeichnet werden (Cheng und Lederer, 2008) und sowohl lokale biochemische Prozesse regulieren als auch über einen *saltatorischen* Mechanismus weitere IP3-R und RyR in der Membran des ER aktivieren und so zellweite Calcium-Signale auslösen können. Diese breiten sich zumeist als Calcium-Wellen über das Cytoplasma aus und vermitteln sowohl über die Charakteristik ihrer Transienten als auch über die Frequenz ihres Auftretens (Calcium-Oszillationen) unterschiedliche Signalwirkungen (Berridge et al., 2003; Berridge, 2006).

Über der Membran des ER besteht im Ruhezustand der Zelle ein Calcium-Gradient von 3-4 Größenordnungen ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} \approx 50 \text{ nM}-100 \text{ nM}$ (Yu und Hinkle, 2000; Smith et al., 2001), $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{lum}} \approx 500 \text{ }\mu\text{M}$ (Yu und Hinkle, 2000; Alvarez und Montero, 2002)). Er ist das Resultat eines basalen Calcium-Leckstromes (Camello et al., 2002) dem ein kontinuierlicher, aktiver Calcium-Uptake durch SERCA-ATPasen (Wuytack et al., 2002) entgegenwirkt. Eine eindeutige Identifizierung der an der Vermittlung dieser Leckströme beteiligten Kanäle und Transporter ist bisher nicht gelungen. Es konnte gezeigt werden, dass Presenilin (Tu et al., 2006), Pannexin 1 (Vanden Abeele et al., 2006) und trunkierte Formen des Typ 1 IP3-Rezeptors (Verbert et al., 2008) und der SERCA-ATPase 1 (Chami et al., 2008) sowie das anti-apoptotische Bcl-2 (Pinton und Rizzuto, 2006) zur Calcium-Leckleitfähigkeit der ER-Membran beitragen können. Außerdem wurde die Beteiligung eines Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Kanals (Wissing et al., 2002; Beauvois et al., 2004), eines Kationenkanals (Giunti et al., 2007) und des Sec61-Translokons postuliert (1.3.1).

1.3.1 Translokon-vermittelter Calcium-Ausstrom aus dem ER-Lumen

Verschiedene Studien haben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Translokons am passiven Calcium-Ausstrom aus dem ER geliefert. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass der Sec61-Komplex einen wassergefüllten, ionenleitenden Kanal in der Membran des ER konstituiert (Simon und Blobel, 1991; Wirth et al., 2003; Wonderlin, 2009). Heritage und Wonderlin (2001), Lizak et al. (2006) und Giunti et al. (2007)

konnten zeigen, dass dieser Kanal auch für kleine ungeladene und anionische Moleküle permeabel ist. Des Weiteren variiert die Permeabilität der ER-Membran in Abhängigkeit von der Proteintranslokation (Roy und Wonderlin, 2003).

Mit Hilfe Calcium-sensitiver Farbstoffe wurde die cytosolische und ER-luminale Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen *in vivo* untersucht. Dabei konnte ein Translokation-vermittelter Calcium-Ausstrom nach Behandlung des rauen ERs mit Puromycin oder Pactamycin in Verbindung mit einer Inhibierung der SERCA-ATPase mit Thapsigargin gezeigt werden (Lomax et al., 2002; Van Coppenolle et al., 2004; Flourakis et al., 2006; Ong et al., 2007; Amer et al., 2009). *In vitro*-Experimente mit rauen Mikrosomen, Puromycin und radioaktivem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bestätigen diese Ergebnisse (Giunti et al., 2007). Puromycin induziert als Analogon der Aminoacyl-tRNA einen vorzeitigen Abbruch der Kettensynthese im Ribosom, gefolgt vom Freisetzen der Polypeptidkette (Darken, 1964). Pactamycin inhibiert die Initiation der Translation (Kappen et al., 1973). Entsprechend werden nach Pactamycin-Behandlung keine aktiven Ribosom-Translokation-Komplexe gebildet, nach Abschluss der Translokation inaktive Ribosom-Translokation-Komplexe werden stabilisiert. Somit wird übereinstimmend beschrieben, dass der Calcium-Ausstrom vom Substrat-freien Ribosom-Translokation-Komplex vermittelt wird, ein Zustand der auch *in vivo* zu beobachten ist. Mehrere Studien haben ergeben, dass Ribosomen nach Beendigung der Translokation teilweise in einer stabilen Assoziation mit dem Translokation verbleiben (Borgese et al., 1973; Seiser und Nicchitta, 2000; Potter und Nicchitta, 2002; Schaletzky und Rapoport, 2006). Auch ein Screening des *Drosophila*-Genoms mittels RNA-Interferenz legt eine Beteiligung des Sec61-Kanals am Calcium-Ausstrom aus dem ER-Lumen nahe (Zhang et al., 2006). Flourakis et al. (2006) und Ong et al. (2007) stellen außerdem einen physiologischen Zusammenhang zwischen Translokation-vermittelter $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -Depletion und der Induzierung von *store-operated calcium entry*- (SOCE) Prozessen an der Plasmamembran her.

1.4 Calmodulin

Eines der wichtigsten Calcium-sensorischen Moleküle eukaryotischer Zellen ist Calmodulin (CaM), das sowohl im Cytosol als auch im Nukleus lokalisiert ist und zu einem Großteil in membranassoziiierter Form vorliegt. Es handelt sich um ein monomeres Protein mit überwiegend alpha-helikaler Sekundärstruktur und einem Molekulargewicht von 16,7 kDa, das evolutiv hoch konserviert ist (Copley et al., 1999).

Strukturell zeigt Calmodulin zwei globuläre, homologe Domänen an N- und C-Terminus, die über eine α -Helix miteinander verbunden sind (Abbildung 1.2). Jede der Domänen besitzt zwei *helix-loop-helix*- (*hlh*) Motive, die auch als EF-Hand-Motive bezeichnet

1 Einleitung

werden und jeweils ein Ca^{2+} -Ion binden können. Die Motive EF_1 und EF_2 bilden die N-terminale Domäne, EF_3 und EF_4 die C-terminale Domäne des Proteins, wobei EF_1 und EF_2 sowie EF_3 und EF_4 jeweils über ein kurzes, antiparalleles β -Faltblatt miteinander verbunden sind (Strynadka und James, 1989).

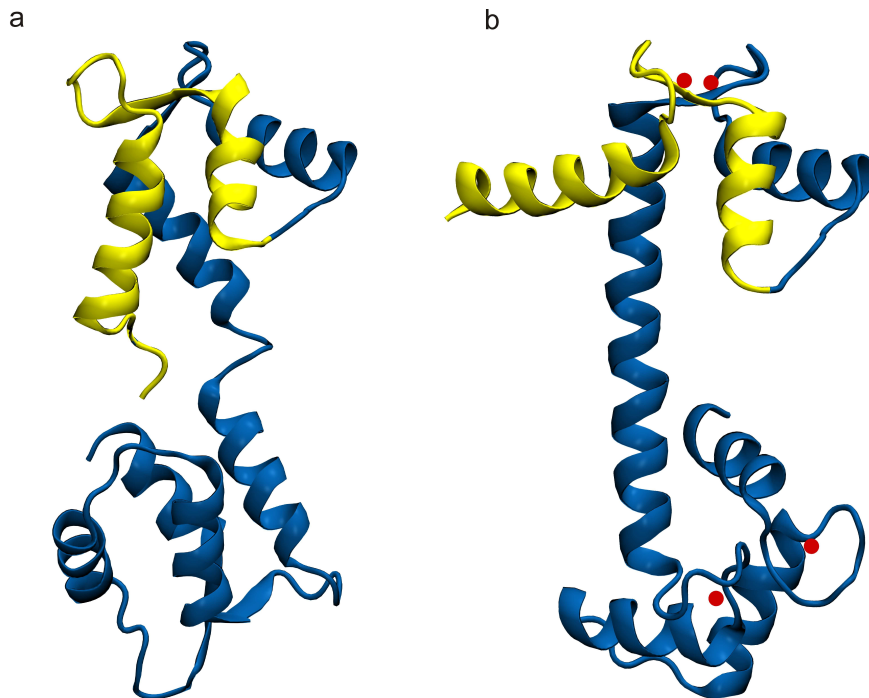


Abbildung 1.2: Dreidimensionale Struktur von ApoCalmodulin und Calmodulin
a: NMR-Struktur von Calcium-freiem ApoCalmodulin aus *Xenopus laevis*, Pdb-Datei 1CFD.pdb (Kuboniwa et al., 1995). **b:** Röntgenkristallstruktur von Calmodulin aus *Homo sapiens*, Pdb-Datei 1CLL.pdb bei einer Auflösung von 1,7 Å (Chattopadhyaya et al., 1992). Die N-terminalen EF_1 -Motive sind gelb, die vier gebundenen Ca^{2+} -Ionen rot hervorgehoben. Die Strukturen wurden mit dem Programm VMD (Humphrey et al., 1996) dargestellt und mit dem Programm Povray (www.povray.org) gerendert.

Die Bindungseigenschaften der N- und C-terminalen Domänen für Calcium unterscheiden sich erheblich. Dabei weist die C-terminale Domäne mit einer K_D von etwa 0,2 μM eine zehnfach höhere Affinität zu Ca^{2+} auf als die N-terminale Domäne (Potter et al., 1983; Ogawa und Tanokura, 1984). Entsprechend werden erst die EF-Motive 3 und 4 und anschließend die Motive 1 und 2 mit Calcium besetzt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Calcium-Bindung an die EF-Motive nicht unabhängig voneinander geschieht, sondern mit positiver Kooperativität erfolgt (Crouch und Klee, 1980; Linse et al., 1991). Für die Bindung eines Calciumions an ein EF-Motiv wurde ein Mechanismus mit zwei aufeinander folgenden Schritten vorgeschlagen, bei dem es zuerst zu einer Interaktion

mit der N-terminalen Helix und dem Loop des *hllh*-Bereiches kommt. Im zweiten Schritt führt eine Rotation der C-terminalen Helix zu einer Konformationsveränderung, nach der das Ca^{2+} -Ion vollständig koordiniert ist (Grabarek, 2005; Grabarek, 2006). Während die beiden Helices des *hllh*-Motives in der Calcium-freien (Apo-) Form in einer nahezu parallelen Ausrichtung vorliegen, sind sie nach der Ca^{2+} - Bindung fast senkrecht zueinander orientiert (Abbildung 1.2). Diese Änderung der interhelikalen Winkel in beiden Domänen hat eine deutliche Veränderung der Gesamtstruktur zur Folge. NMR- und röntgenkristallographische Studien zeigen eine globuläre Struktur für Apo-Calmodulin (Kuboniwa et al., 1995) und eine langgestreckte Struktur für Calmodulin (Chattopadhyaya et al., 1992; Wilson und Brunger, 2000; Abbildung 1.2). Dieser Konformationswechsel vom hydrophilen, kompakten Zustand zur geöffneten Struktur exponiert die hydrophoben Substratbindungstaschen in beiden Domänen, die die Interaktion mit den Calmodulin-Zielproteinen vermitteln. Dabei kommt der zentralen, hoch flexiblen α -Helix eine gesonderte Bedeutung zu (Wilson und Brunger, 2000; Yamniuk und Vogel, 2004). Röntgenkristallstrukturen zeigen, dass sich die zentrale Helix um die α -helikalen CaM-Bindedomänen von Zielproteinen legt und so die Assoziation der hydrophoben Bindestellen von N- und C-Terminus mit den Interaktionspartnern vermittelt wird (Osawa et al., 1999; Schumacher et al., 2001; Yamniuk und Vogel, 2004).

Calmodulin kann sowohl als ApoCaM als auch in der partiell sowie der vollständig mit Calcium gesättigten Konformation mit seinen Bindungspartnern interagieren. Außerdem können N- und C-Terminus spezifisch an unterschiedliche Proteine oder an verschiedene Bindungsstellen eines Zielproteins binden (Vetter und Leclerc, 2003). Die Calcium-Affinität der einzelnen EF-Motive wird wiederum durch die Interaktion von CaM mit seinen Bindungspartnern moduliert (Yamniuk und Vogel, 2004).

Ein Großteil der Calmodulin-Bindedomänen der Zielproteine teilen charakteristische Merkmale. So besitzen sie typischerweise eine Länge von 16-30 Aminosäuren und bilden amphipatische α -Helices (O’Neil und DeGrado, 1990), die an konservierten Positionen hydrophobe Seitenketten enthalten, auf Grund derer eine Einteilung in mehrere Klassen erfolgt (Rhoads und Friedberg, 1997). Als Konsensussequenzen für die Calcium-abhängige Interaktion mit Calmodulin wurden das 1-8-14-, 1-5-8-14-, 1-14-, 1-5-10- sowie das 1-16-Motiv beschrieben (Yamniuk und Vogel, 2004). Eine Interaktion von Proteinen mit Calcium-freiem ApoCalmodulin wird häufig durch das Isoleucin-Glutamin-Motiv (IQ-Motiv) vermittelt (Rhoads und Friedberg, 1997; Bähler und Rhoads, 2002; Yamniuk und Vogel, 2004). Für MyosinV, Neurograngin, Neuromodulin und weitere Proteine wurde eine Konsensussequenz in der Form [IVL]QXXXRXXXX[RK]XX[FILVWY] abgeleitet. Es wurde postuliert, dass eine Präassoziation des ApoCalmodulins mit dem Interaktionspartner eine sensitivere Regulation in Abhängigkeit von lokalen Calcium-

1 Einleitung

konzentrationen ermöglicht (Zühlke et al., 1999; DeMaria et al., 2001).

Neben einer Vielzahl cytosolischer Proteine werden auch Ionenkanäle durch Calmodulin reguliert. Dabei kann sowohl eine Aktivierung der Kanalaktivität, gezeigt z.B. für Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (Xia et al., 1998), TRPM2-Kanäle (Tong et al., 2006) und $\text{Na}_v1.4/1.6$ -Kanäle (Herzog et al., 2003), als auch ein Schließen der Pore, z.B. bei spannungsaktivierten L-Typ $\text{Ca}_v1.2$ Calciumkanälen (Peterson et al., 1999) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren (Adkins et al., 2000) erfolgen. Daneben wird die Aktivität vieler Kanäle deutlich differenzierter von Calmodulin beeinflusst. So kann CaM sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Ionenpermeation wirken, beispielsweise beim Ryanodin-Rezeptor der Skelettmuskulatur RyR1 (Tripathy et al., 1995), bei spannungsaktivierten L-Typ $\text{Ca}_v2.1$ Calciumkanälen (Dunlap, 2007), P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanälen (DeMaria et al., 2001) und Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanälen (Kaneko et al., 2006). Einen Überblick über die Calmodulin-Regulierung von Ionenkanälen bieten Saimi und Kung (2002) und Pitt (2007). Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch die Protein-Translokase Tic110 aus der inneren Hüllmembran von Chloroplasten Calcium-abhängig und Calmodulin-vermittelt in ihrer Aktivität reguliert wird (Chigri et al., 2006).

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Einige grundlegende Eigenschaften der Pore des Sec61-Komplexes wurden bereits in früheren elektrophysiologischen Studien unter co- und posttranslationalen Bedingungen charakterisiert (Wirth, 2003; Erdmann, 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die vorhandenen Ergebnisse verifiziert und erweitert werden.

In verschiedenen Publikationen der vergangenen Jahre wurde vorgeschlagen, dass der Translokationskanal in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums an der Vermittlung eines passiven Calcium-Ausstromes aus dem ER-Lumen beteiligt ist (siehe 1.3.1). Dieser Vorgang steht im Widerspruch zur strikt regulierten Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen durch IP3- und Ryanodin-Rezeptoren in der ER-Membran, ein essenzieller Prozess für das intrazelluläre Calcium-Signalling. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Beteiligung des Sec61-Kanals an diesen Vorgängen untersucht werden.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Welche elektrophysiologischen Grundcharakteristika zeigt der Sec61-Kanal in CaCl_2 -Elektrolytlösungen, auch im Vergleich zu Experimenten mit KCl-Lösungen? Welchen Einfluss haben die intrinsischen Kanaleigenschaften auf einen putativen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER-Lumen?
- Wie verändern sich die Kanaleigenschaften in Anwesenheit eines Calcium-Analogons

wie Lanthan?

- Wird die Ionen-Leitfähigkeit des Sec61-Komplexes von Effektoren reguliert und wie funktionieren diese Mechanismen im Detail?
- Welchen Effekt hat die Interaktion mit Ribosomen ohne naszierende Polypeptidketten auf die Eigenschaften des Kanals?
- Zeigen rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae* eine Kanalaktivität und welche grundlegenden Eigenschaften sind im Vergleich mit dem Sec61-Komplex aus *C. familiaris* zu beobachten?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Proben

Ein Großteil der verwendeten Proben wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard Zimmerman von Dr. Martin Jung (Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg) biochemisch charakterisiert, aufgereinigt oder synthetisiert und freundlicherweise für die durchgeführten Experimente zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Proben des Translokon-Komplexes aus *Canis familiaris*

2.1.1.1 Raue Mikrosomen, RM

Die Präparation der rauen Mikrosomen geschah nach Watts et al. (1983) aus Hunde-Pankreas (*Canis familiaris*). Das Ergebnis dieser Arbeiten waren Vesikel, die den Sec61-Komplex sowie alle weiteren am Translokon beteiligten Membranproteine des Endoplasmatischen Retikulums (Sec62, Sec63, signal recognition particle receptor SRP-R, signal peptidase complex SPC, translocating chain-associating membrane Protein TRAM, translocon-associated protein complex TRAP, oligosaccharyl transferase OST) sowie lösliche Proteine des ER-Lumens und des Cytosols (signal recognition particle SRP) enthielten. Auf der cytosolischen Seite war das Translokon in diesen Präparationen mit Ribosomen mit undefinierten naszierenden Polypeptidketten assoziiert. Die Proben lagen in einer Konzentration von ca. 10 mg/ml in Saccharose-Puffer (200 mM Saccharose, 20 mM Hepes/KOH, pH 7.5, 20 mM KCl und 2 mM Mg(Ac)₂) vor.

2.1.1.2 Puromycin-Kalium gewaschene raue Mikrosomen, PKRM

Die PKRM-Proben wurden aus RM-Präparationen gewonnen. Um die Ribosomen zu entfernen wurden diese durch Inkubation in 1 mM Puromycin, 500 mM KCl abgelöst und anschließend durch Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert (Görlich und Rapoport, 1993). In der Zusammensetzung der Membranproteine entsprechen diese Liposomen den RM Präparationen. Die Proben lagen in einer Konzentration von ca. 10 mg/ml in Saccharose-Puffer (200 mM Saccharose, 20 mM Hepes/KOH, pH 7.5, 20 mM KCl und 2 mM Mg(Ac)₂) vor.

2.1.1.3 Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex

Die Isolierung des Sec61-Komplexes geschah nach Görlich und Rapoport (1993) aus rauen Mikrosomen. Nach der Aufreinigung wurden die Proteine detergensvermittelt in Liposomen mit definierter Lipidzusammensetzung rekonstituiert. Dazu wurde das ge-

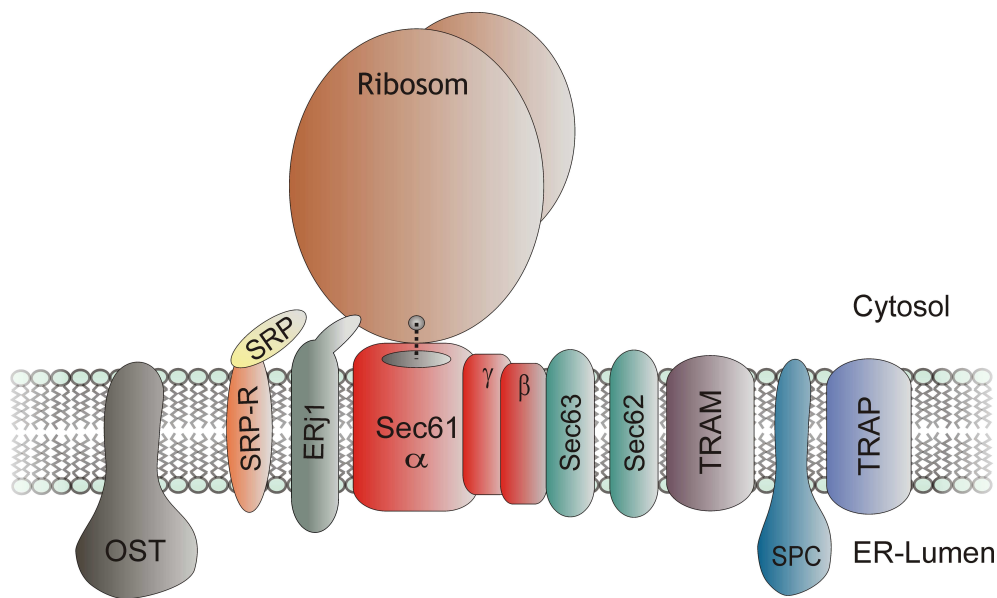


Abbildung 2.1: Membrankomponenten der rauen Mikrosomen aus *C. familiaris*

reinigte Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimer für 10 Minuten mit einer Liposomensuspension aus L- α -Phosphatidylcholin aus Eigelb (Larodan Fine Chemicals, Schweden, Lipidzusammensetzung laut Hersteller: 71 % Phosphatidylcholin (PC), 18 % Phosphatidylethanolamin (PE), 9 % Phosphatidylinositol (PI) sowie 2 % Phosphatidylserin (PS), 20 mg/ml final) oder aus einem Lipidgemisch aus Rinderhirn/Rinderleber (Sigma, PC:PE:PI:PS im Verhältnis 100:25:12,5:3) in Rekonstitutionspuffer (750 mM KAc, 50 mM Hepes/KOH pH 7,8, 5 mM DTT, 15 % (v/v) Glycerol, 0,3 % (w/v) DeoxyBigCHAP) inkubiert. Der entstandenen Mischmicellensuspension wurden SM2-Biobeads (Biorad) zugegeben und die Probe über Nacht in einem Overheadroller bei 4°C rotiert. Biobeads binden Detergenzmoleküle selektiv durch Adsorption. Somit können Detergenzien mit ihrer Hilfe effektiv aus einer Lösung entfernt werden und die Membranproteine rekonstituieren in die Liposomen (Rigaud et al., 1998). Die entstandene Proteoliposomenlösung wurde mit dem 5-fachen Volumen an Reinstwasser (4°C) versetzt und bei 100000 g für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer (250 mM Saccharose, 100 mM KAc, 50 mM Hepes/KOH pH 7,8, 5 mM DTT, 1 mM GTP) resuspendiert. Ergebnis dieser Arbeiten waren Proteoliposomen, die den funktionell rekonstituierten Sec61-Komplex (α -, β -, und γ -Untereinheit) enthielten.

2 Material und Methoden

2.1.2 Proben des Translokon-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.2.1 Raue Mikrosomen

Die Präparation der rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae* geschah nach Panzner et al. (1995). Die Liposomen enthielten alle an der Proteintranslokation der Hefe beteiligten und translokonassoziierten Proteinkomponenten, den Sec61p-Komplex (Sec61p, Sbh1p und Sss1p), den Ssh1p-Komplex (Ssh1p, Sbh2p und Sss1p), Sec62p, Sec63p, Sec71p, Sec72p, SRP und SRP-R sowie den TRAP-Komplex und die OST. Sowohl der Sec61p-Komplex als auch der Ssh1p-Komplex waren in diesen Präparationen mit cytosolischen Ribosomen mit undefinierten naszierenden Polypeptidketten assoziiert. Die Proben lagen in Saccharose-Puffer (250 mM Saccharose, 20 mM Hepes/KOH, pH 7,4, 50 mM KAc und 1 mM DTT) vor.

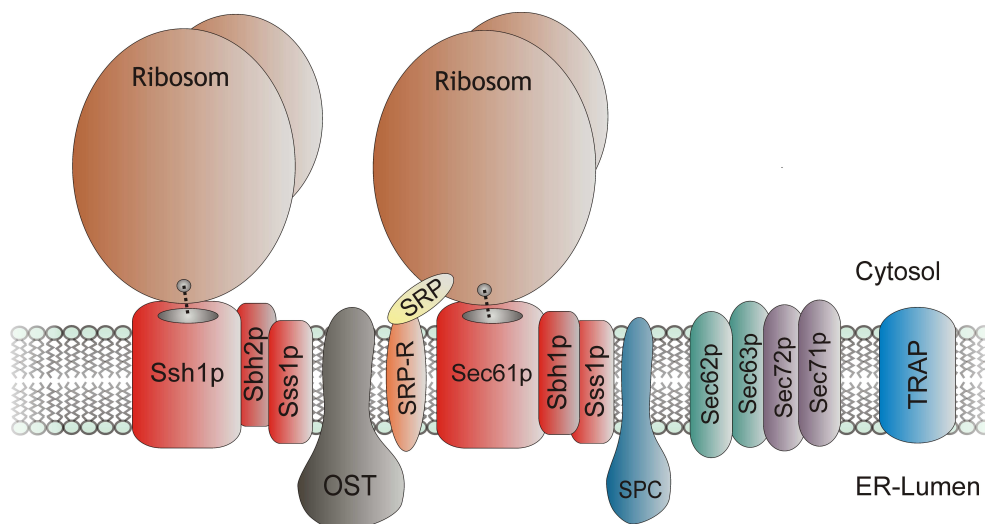


Abbildung 2.2: Am Proteintransport beteiligte Membrankomponenten der rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae*

2.1.3 Weitere Proben

2.1.3.1 Ubiquitin conjugating enzyme 6, Ubc6

Die Synthese des Tail-Anchor-Proteins Ubc6 erfolgte mit dem Rapid Translation System 100 der Firma Roche. Der Syntheseansatz (12 µl *E. coli*-Lysat, 10 µl Reaktionslösung*, 12 µl Aminosäurelösung ohne Methionin*, 6,5 µl 1 mM Methioninlösung, 5 µl Rekonstitutionspuffer*, 0,5 µl DNA (mmUbc6-cDNA von Th. Sommer (Berlin) in Vektor

*Zusammensetzung von Roche nicht angegeben

pIVEX2.3MCS), 4 μ l H₂O bidest) wurde 3 Stunden bei 30°C inkubiert und das unlösliche Ubc6 durch 10 minütiges Zentrifugieren mit einer Eppendorffzentrifuge bei 14000 g pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 μ l 8 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 7,4 resuspendiert, was eine Proteinlösung mit einer Konzentration von ca. 0,2 mg/ml ergab. Aus dieser Lösung wurde abschließend nochmals aggregiertes Ubc6 abzentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde gefriergetrocknet. Für die Versuche zur Induzierung des Sec61-Komplexes (3.1.1) wurde das Lyophilisat mit DMSO aufgenommen und zur Probenvorinkubation (1/10 v/v) eingesetzt.

2.1.3.2 Preprocecropin A, PPcecA

PPcecA wurde in einer Solid-Phase Peptid-Synthese nach Merrifield (1963) hergestellt und anschließend gefriergetrocknet. Für die Versuche zur Induzierung des Sec61-Komplexes (3.1.1) wurde das Lyophilisat mit DMSO aufgenommen und zur Probenvorinkubation (1/10 v/v) eingesetzt.

2.1.3.3 Calmodulin

Calmodulin (CaM, MW: 16,7 kDa) wurde aus Rinderhirn isoliert bei der Firma Calbiochem gefriergetrocknet erworben. Für die Experimente wurde es in 10 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 gelöst, so dass es in einer Endkonzentration von 1 mg/ml vorlag. Diese Stammlösung wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Das Rhodamin-6-G gelabelte CaM stammt ebenfalls aus Rinderhirn (Calbiochem). Es wurde in 10 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 gelöst und als Stammlösung (10 μ M) lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

Das Glutathion-S-Transferase-gekoppelte Calmodulin (GST-CaM) wurde als Fusionsprotein aus CaM (*Rattus norvegicus*) und GST (*Schistosoma japonicum*) in *Escherichia coli* exprimiert und aufgereinigt (Smith und Johnson, 1988). Für die Messungen wurde eine Stammlösung von 3,35 mg/ml in 10 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 verwendet. Diese wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.1.3.4 Ribosomen

Bei den für die Rückbindungsexperimente mit PKRM (3.1.11) verwendeten Ribosomen handelte es sich um cytosolische Ribosomen, die während der Präparation der RM aus Hundepankreas durch Zentrifugation über einen Saccharosegradienten gewonnen wurden. Anschließend wurde die Ribosomenfraktion durch ein Hochsalzsaccharosekissen pelletiert um naszierende Polypeptidketten abzutrennen. Die Ribosomen lagen in Konzentrationen von 3,3 mg/ml und 12,3 mg/ml in Puffer (200 M Saccharose, 50 mM KCl, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4, 2 mM MgCl₂) vor.

2 Material und Methoden

2.1.3.5 Tom40

Tom40 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nikolaus Pfanner (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg) heterolog in *Escherichia coli*-Zellen exprimiert, aus *inclusion bodies* naturiert und aufgereinigt. Anschließend wurde das Protein detergensvermittelt in Liposomen (L- α -PC-Typ IV-S, Sigma) rekonstituiert (Becker, 2008).

2.1.3.6 SecYEG-Komplex

Der SecYEG-Komplex aus *E. coli* wurde im Labor von Dr. Ian Collinson (Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bistol) nach Collinson et al. (2001) überexprimiert, aufgereinigt und in Liposomen (L- α -PC, Larodan Fine Chemicals, Schweden) rekonstituiert.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Flotation im Dichtegradienten

Die Trennung von Proteoliposomen und löslichen, nicht mit den Proteoliposomen assoziierten Proteinen erfolgte mit Hilfe eines diskontinuierlichen Nycodenz-Dichtegradienten (Firma Axis-Shield, Norwegen). Dieser hat gegenüber einem herkömmlichen Saccharosegradienten den Vorteil, dass das Nycodenz osmotisch inaktiv ist. Des Weiteren stellt sich ein Gleichgewichtszustand während der Zentrifugation im Nycodenzgradienten deutlich schneller ein als bei der Verwendung von Saccharose. 50 μ l Proteoliposomensuspension wurden in ein 4 ml Zentrifugenrohr (Beckmann) gegeben, mit dem Stufengradienten (siehe Tabelle 2.1) überschichtet und für 90 Minuten in einem MLS-50 Rotor (Beckman) bei 100000 g und 4°C in einer Optima Max Ultrazentrifuge (Beckman-Coulter) zentrifugiert. Im Anschluss wurden die einzelnen Fraktionen des Gradienten mit einer Pipette abgenommen.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Nycodenz-Dichtegradienten

Nycodenz [%] (w/v)	Volumen [ml]
2	0,75
5	0,75
10	1,0
20	0,5
40	0,5

Für die Coflotationsexperimente mit Rhodamin-6G-gelabeltem Calmodulin (siehe 3.1.10.1)

wurden die verwendeten Nycodenzlösungen mit 100 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM Mops/ Tris pH 7 oder 100 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM Mops/Tris pH 7 angesetzt.

2.2.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Für eine Analyse der Membranproteine aus den Liposomen sowie der assoziierten löslichen Proteine mittels SDS-Page wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Dazu wurden die Fraktionen der Nycodenzgradienten mit TCA inkubiert (10 % TCA v/v final) und die Proteine mit einer Tischzentrifuge (Hermle) bei 22000 g und 4°C für 30 Minuten pelletiert. Anschließend wurde der jeweilige Überstand verworfen, das Pellet mit 200 µl -80°C-kaltem Aceton inkubiert und bei 22000 g und -20°C für 30 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes folgte das Trocknen des Pellets in einer Speedvac (SVC-100, Savant) bei 40°C.

2.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Das Pellet wurde in 20 µl Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 18 % (v/v) Glycerin, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, bei 40°C für 5 Minuten in einem Thermomixer (Bioer) inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die SDS-Gele wurden in einem Mini-Gel System (Sigma) gegossen (Laemmli, 1970). Die Proben durchliefen zuerst ein 4 %iges Sammelgel (pH 6,8) bei einer Spannung von 80 V um eine optimale Fokussierung der Proteinbanden zu gewährleisten (Righetti et al., 1990), gefolgt von einem 12 %igen Trenngel (pH 8,8) bei 120 V. Der verwendete Elektrodenpuffer enthielt 192 mM Glycin, 25 mM Tris und 0,1 % SDS (w/v).

2.2.4 Detektion gelabelter Proteine im Polyacrylamidgel

Die Proben mit Rhodamin-6-G gelabeltem Calmodulin (3.1.10.1) wurden nach 2.2.3 elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele für 30 Minuten in Reinstwasser gespült und mit einem Versadoc 4000 Imaging System (Biorad) bei UV-Anregung digitalisiert. Danach konnten sie mittels Färbung oder Westernblot weiter analysiert werden. Eine Quantifizierung der Proteinmenge geschah mit dem quelloffenen Programm ImageJ.

2.2.5 Anfärbung der Proteine im Polyacrylamidgel

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele für 30 Minuten in Reinstwasser gespült und anschließend mittels kolloidaler Coomassiefärbung nach Kang et al. (2002)

2 Material und Methoden

angefärbt. Dazu wurden sie über Nacht in Färbelösung (10 % (v/v) Ethanol, 5 % (w/v) $\text{Al}_2\text{O}_{12}\text{S}_3$, 2 % (v/v) Phosphorsäure, 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue 250) inkubiert und danach mit Entfärbelösung (10 % (v/v) Ethanol, 2 % (v/v) Phosphorsäure) so weit wie nötig entfärbt. Abschließend folgte die Digitalisierung der Gele mit einem Durchlichtscanner (Epson 4870).

2.2.6 Westernblot

Für eine eindeutige Detektion der Proteine mittels Westernblot wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3) und das Gel danach für 30 Minuten in Transferpuffer (192 mM Glycerin, 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol) geschwenkt. Anschließend wurden die Proteine in einer semi-dry Blotkammer (Biometra) für 2 Stunden bei 250 mA auf PVDF-Membran (Amersham) transferiert (Towbin et al., 1979). Um unspezifische Wechselwirkungen mit den Antikörpern zu verringern, folgte eine einstündige Inkubation der Membran in 4 %iger Milchpulverlösung (w/v) in TBS-T Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8, 0,05 % (v/v) Tween 20) bei Raumtemperatur. Darauf folgte eine Inkubation mit primärem Antikörper in 4 %iger Milchpulverlösung (w/v) in TBS-T Puffer über Nacht bei 4°C. Nach mehrmaligem Spülen mit TBS-T Puffer wurde der sekundäre Antikörper (Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege, Sigma) für eine Stunde bei Raumtemperatur an den primären Antikörper gebunden. Nach weiteren Spülschritten und Induzierung der Chemolumineszenz durch Zugabe von Luminol (ECL Western Blot Detection Kit, Amersham) folgte die Belichtung der Membran auf einem Filmbogen (Kodak BioMax), die automatisierte Filmentwicklung (Kodak Filmentwickler) und das Digitalisieren mit einem Scanner (Epson 4870). Die Quantifizierung der Proteinmenge geschah mit dem Programm ImageJ.

2.2.7 Fluoreszenzmarkierung des Sec61 α IQ-Peptides

Für die Bindungsstudien mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurde das kommerziell synthetisierte Sec61 α IQ-Peptid aus *Canis familiaris* (Sequenz:

${}_{-16}\text{LPEIQKPERKIQFKEKVLWTAITLFI}_{41}\text{-C}$, GenScript) mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt (Atto488, Atto-Tec). Der Maleimid-gekoppelte Farbstoff wurde dabei über eine Thiolether-Bindung an ein terminal in das Peptid eingebrachte Cystein gekoppelt. Dazu wurde 1 mg Sec61 α IQ-Peptid für 2 Stunden in 1 ml 150 mM NaCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 100 mM KH_2PO_4 pH 7, 1 mM TCEP, 40 % DMSO mit einem 20-fachen molaren Überschuss an Atto488-Maleimid bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Peptid mittels Verdünnung und Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Hermle) bei 22000 g und 4°C für 30 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Peptid in 1 ml 150 mM NaCl, 100 mM Na₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄ pH 7, 1 mM TCEP, 40 % Acetonitril resuspendiert.

2.2.8 Reinigung des gelabelten Sec61 α IQ-Peptides mittels HPLC und Massenspektrometrie

Die Aufreinigung des Atto488-gelabelten IQ-Peptides (IQ₄₈₈) und die Entfernung des freien Farbstoffes geschah mittels Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (RP-HPLC) und anschließender Massenspektrometrie. Dabei wurde die Probe in einer Agilent 1100 RP-HPLC mit einer C₄-Säule nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Es wurde mit einem kontinuierlichen Gradienten von 5 % Acetonitril, 95 % H₂O, 0,03 % TFA zu 80 % Acetonitril, 20 % H₂O, 0,03 % TFA über einen Zeitraum von 23 Minuten eluiert und das Eluat im Abstand von 30 Sekunden aliquotiert. Im Anschluss wurden alle Proben mit einem Esquire HCT (Bruker Daltonics) Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-MS) untersucht. Bei dieser Technik werden die Probenmoleküle ionisiert, in die Gasphase überführt und elektrophoretisch in eine Ionenfalle geleitet, wo die Massendetektion stattfindet. Die erhaltenen Massenspektren wurden mit der Software Biotools 3.1 (Bruker Daltonics), Excel 2003 (Microsoft) und Origin 7.0 (Microcal) ausgewertet.

Die das IQ-Peptid enthaltenden Proben wurden vereinigt, lyophilisiert, in 100 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 10 mM Mops/Tris pH 7 resuspendiert und bei -80°C gelagert. Für die Experimente (2.3.17) wurden die Aliquots mit 100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 zu einer Endkonzentration von 100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7, 5 nM IQ₄₈₈, 0,005 % Triton X-100 verdünnt und für eine Stunde bei 4°C und 100000 g in einer Optima-L90k-Ultrazentrifuge (Beckman-Coulter) zentrifugiert. CaCl₂- oder EGTA wurde aus Stammlösungen zu finalen Konzentrationen von 4 mM CaCl₂ bzw. 1 mM EGTA zugegeben.

2.2.9 Modifikation der Lipidkomposition der Probenliposomen

Obwohl die zu untersuchenden Membranproteine bereits in Proteoliposomen vorlagen (siehe 2.1), erwiesen sie sich als ungeeignet für Messungen im planaren Bilayer System. Dieses konnte durch eine Solubilisierung der Proteoliposomen mit Detergens, einem Vermischen mit zusätzlichem Lipid und einer anschließenden Entfernung des Detergens mittels Dialyse deutlich verbessert werden. Für diesen Verdünnungsschritt wurde L- α -Phosphatidylcholin aus Eigelb (Larodan Fine Chemicals, Schweden) mit einer Konzentration von 50 mg/ml in Methanol-Chloroform (Verhältnis 1:1) gelöst und bei -20°C gelagert. Um eine Oxidation der Lipide zu verhindern wurde die Lösung mit Argon

2 Material und Methoden

überschichtet. Aus einem Aliquot dieser Stammlösung wurde eine Liposomensuspension hergestellt, dazu die Lösungsmittel mit einer Membranvakuumpumpe (Vaccubrand MZ2C) für 30 Minuten evaporiert und das trockene Lipid mit 50 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 zu einer Konzentration von 20 mg/ml resuspendiert. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 3:2 mit dieser Liposomensuspension sowie mit Mega 9 (Nonanoyl-N-Methylglucamid) zu einer Endkonzentration von 80 mM gemischt und die entstandenen Mischmizellen für einige Minuten inkubiert. Dabei lag die Konzentration des Mega 9 3,2-fach über der cmc (critical micellar concentration, für Mega 9: 25 mM). Um das Detergens wieder aus dem Ansatz zu entfernen, wurde dieser abschließend ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur und schließlich über Nacht bei 4°C gegen 5 l 50 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 dialysiert. Die Ausschlussgröße der verwendeten Dialysesläuche (Spectrum Laboratories) betrug 3,5 kDa. Die Liposomen wurden aliquotiert (10 µl) und nach Schockfrost in Flüssigstickstoff bei -80°C gelagert.

2.2.10 Induzieren des Sec61-Kanals in RM-Präparationen

Für eine erfolgreiche Fusion der Liposomen mit den planaren Bilayer nach herkömmlicher Methode (siehe 2.3.8) ist ein offener Kanal erforderlich. Um diese Ausgangssituation zu schaffen mussten die Ribosomen von den rauen Mikrosomen aus *C. familiaris* und *S. cerevisiae* abgelöst werden. Dazu wurden die Probenaliquots für ca. 15 Minuten mit 500 µM Puromycin (Serva), 300 mM KCl und 1 mM GTP inkubiert. Puromycin bewirkt in Anwesenheit von GTP als Analogon der Aminoacyl-tRNA einen Abbruch der Kettensynthese, gefolgt vom Freisetzen der Polypeptidkette und der Dissoziation der Untereinheiten des Ribosoms (Darken, 1964, Adelman et al., 1973). Die hohe Salzkonzentration bewirkt ein Lösen der ribosomalen Untereinheiten vom Translokon (Adelman et al., 1973). Danach konnte der Sec61-Komplex aus RM-Präparationen bei Lagerung um 4°C im Eisbad für mehrere Tage erfolgreich mit dem planaren Bilayer fusioniert werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde täglich ein neues Probenaliquot verwendet.

2.3 Elektrophysiologische und biophysikalische Methoden

2.3.1 Die planare Bilayer Technik

Bei der planaren Bilayer Technik handelt es sich um eine Abwandlung der *Patch-Clamp*-Methode, die es erlaubt, einzelne in den Bilayer fusionierte kanalbildende Membranproteine in einer definierten Lipidumgebung elektrophysiologisch zu erfassen. Dabei wird über Elektroden ein konstantes Membranpotenzial an den Bilayer angelegt (*voltage*

2.3 Elektrophysiologische und biophysikalische Methoden

clamp, Klemmspannung). Die über den Kanal fließenden Ströme werden verstärkt, digitalisiert und mit Hilfe eines Computers aufgenommen. Diese Ströme sind von der Größe, vom Offenzustand sowie von der Ionenselektivität der inserierten Kanäle abhängig. Ein großer Vorteil der Bilayer Technik im Gegensatz zum *Patch-Clamp*-Verfahren besteht in der Möglichkeit, einen biochemisch aufgereinigten Kanal mit dem planaren Bilayer zu fusionieren, die Elektrolytumgebungen beidseitig der Membran mehrfach zu modifizieren, Effektoren zuzuführen und wieder zu entfernen und die Messungen anschließend fortzusetzen.

2.3.2 Aufbau der Messkammer

Die verwendete Messkammer besteht aus zwei zylindrischen Teflonhalbkammern mit einem Füllvolumen von je 3 ml, die in ein Metallgehäuse eingespannt werden (Abbildung 2.3).

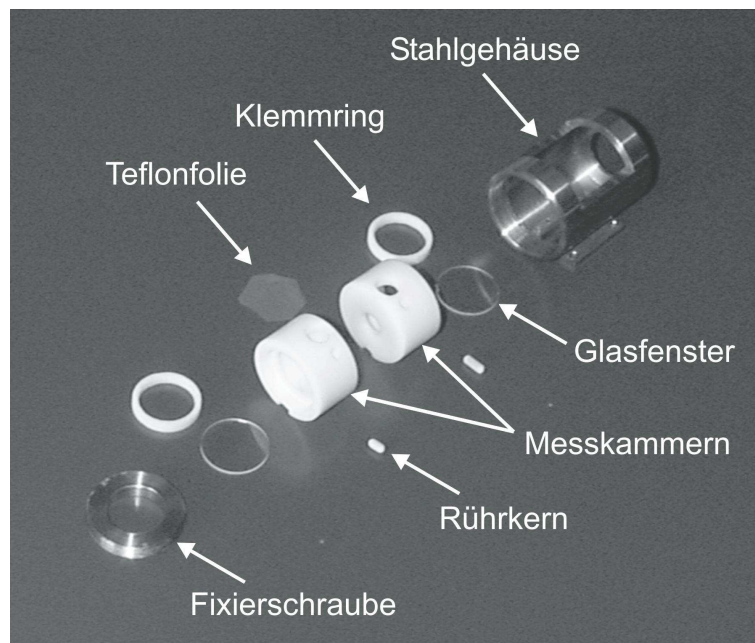


Abbildung 2.3: Komponenten der Bilayerkammer

Die dem Experimentator zugewandte Kammer wird dabei als Cis-, die abgewandte als Trans-Kammer bezeichnet. Über Bohrungen in den Kammerdecken können Elektroden eingeführt, Veränderungen am Elektrolytinhalt vorgenommen (Perfusion) sowie Effektoren zugegeben werden. Die beiden Halbkammern werden von einer 25 μm dicken Teflonfolie (Septum) mit einem runden Loch von ca. 100 μm im Durchmesser getrennt. Für dieses Loch, auf das bei den Messungen der Bilayer appliziert wird, wird die Folie mit

2 Material und Methoden

einer Nadel vorperforiert und die Fehlstelle anschließend mit einer Funkenstrecke (Umbau einer PKW-Zündspule durch die Elektronikwerkstatt des Fachbereiches Biologie der Universität Osnabrück) aufgeschmolzen. Da die außenliegenden Seiten der Messkammer mit Glasscheiben verschlossen werden, ist eine optische Kontrolle der Experimente möglich.

2.3.3 Der Messstand

Die mit Hilfe der Bilayer Technik aufgenommenen Einzelkanalströme bewegen sich im Bereich von wenigen pA. Der Messstand dient daher vornehmlich der Abschirmung des Versuchsaufbaus gegen elektrische und mechanische Störungen. Dazu ist um den Experimentiertisch ein nach allen Seiten verschließbarer Faradaykäfig aus verzinktem Maschendraht aufgebaut (Abbildung 2.4). Der Experimentiertisch ist auf vier pneumatischen Schwingungsdämpfern (Luigs und Neumann) gelagert, um das Messsystem vom Boden zu entkoppeln. Sowohl der Tisch als auch der umgebende Käfig sind gegen das Stromnetz geerdet.

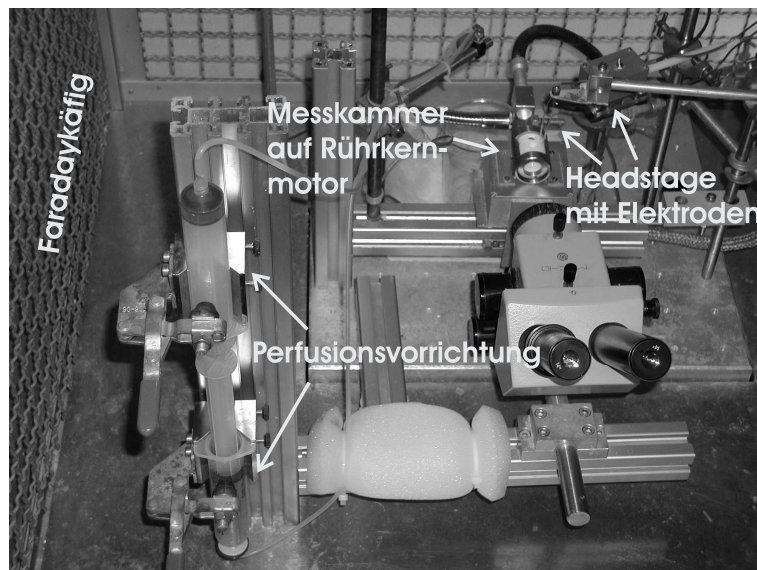


Abbildung 2.4: Aufbau des Messstandes

Über ein Binokular und einen Lichtleiter, in dessen Strahlengang die Bilayerkammer steht, kann der Experimentator während der Messungen den Zustand des Bilayers, die Zugabe von Effektoren und den Fortschritt der Perfusion überwachen. Die Kammer steht auf einem abgeschirmten Magnetmotor, der die Durchmischung der Lösungen in den Halbkammern mit Hilfe von Rührkernen ermöglicht.

Die Perfusionseinrichtung dient dem Austausch der cis- und transseitig eingesetzten Lösungen ohne den Bilayer zu zerstören und ermöglicht damit die Vermessung eines einzelnen Kanals unter verschiedenen Bedingungen. Sie besteht aus zwei 60 ml Plastikspritzen, die über Silikonschläuche mit dünnen Glaskapillaren verbunden sind. Diese Kapillaren werden gleichzeitig in eine der Lösungen abgesenkt. Beim Perfusionsvorgang wird mit einer der Spritzen das gleiche Volumen an Elektrolyt aus der Kammer abgesaugt wie simultan über die andere Spritze an neuer Lösung zugeführt wird. Dabei kann bei einem 20-fachen Volumenverhältnis (60 ml Spritzeninhalt zu 3 ml Kammerinhalt) von einem völligen Austausch der Elektrolytlösungen ausgegangen werden.

2.3.4 Elektrischer Aufbau

Die elektrophysiologische Vermessung eines Ionenkanals wird erst durch einen geschlossenen Stromkreis über die Spannungsquelle, die Elektroden, die Elektrolytlösungen sowie die Membran mit fusioniertem Kanal möglich.

Dieses kann durch ein Ersatzschaltbild (Abbildung 2.5) verdeutlicht werden. Dabei entsprechen die Elektrolytlösungen in den Halbkammern den Platten eines Plattenkondensators, die Membran kann mit dem Dielektrikum zwischen den Platten gleichgesetzt werden. Die entsprechende spezifische Membrankapazität C_M ergibt sich aus Dicke und Dielektrizitätskonstante des Bilayers und ist bei biologischen Membranen weitestgehend konstant ($C_M \cong 1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$). Fusioniert ein Ionenkanal in die Membran, so kann er näherungsweise als ein der Membrankapazität parallel geschalteter Widerstand R_M betrachtet werden. Der Kehrwert dieses Widerstandes wird als Leitwert gemessen. Dem gegenüber ist der in Serie geschaltete Widerstand der Elektroden und Elektrolyte R_{EI} vernachlässigbar.

Die verwendeten Ag/AgCl-Elektroden bestehen aus einem Silberdraht (0,5 mm \varnothing , Roth), der in 1 M KCl für ca. 15 Minuten bei 5 V chloriert wird. Um Grenzflächenpotenziale an den entstandenen Silberchloridschichten zu minimieren, werden die Elektroden in einer Glaskapillare (1,5 mm \varnothing) mit agarosehaltiger Kaliumchloridlösung (2 % (v/v) Agarose, 2 M KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7) umhüllt.

Die Elektroden bilden über die Elektrolytlösungen und den Kanal einen Stromkreis mit dem Operationsverstärker (Headstage, CV-5-1GU, Axon Instruments), mit dem zum Einen konstante Klemmspannungen an den Bilayer angelegt als auch die fließenden Ströme detektiert, transformiert und zum Hauptverstärker (Gene Clamp 500b, Axon Instruments) weitergeleitet werden. Von dort werden die Signale über einen Analog/Digital-Wandler (Digidata 1200, Axon Instruments) an die PCI-Karte des Messrechners übergeben. Die Elektrode der transseitigen Messkammer ist mit dem Eingang der Headstage

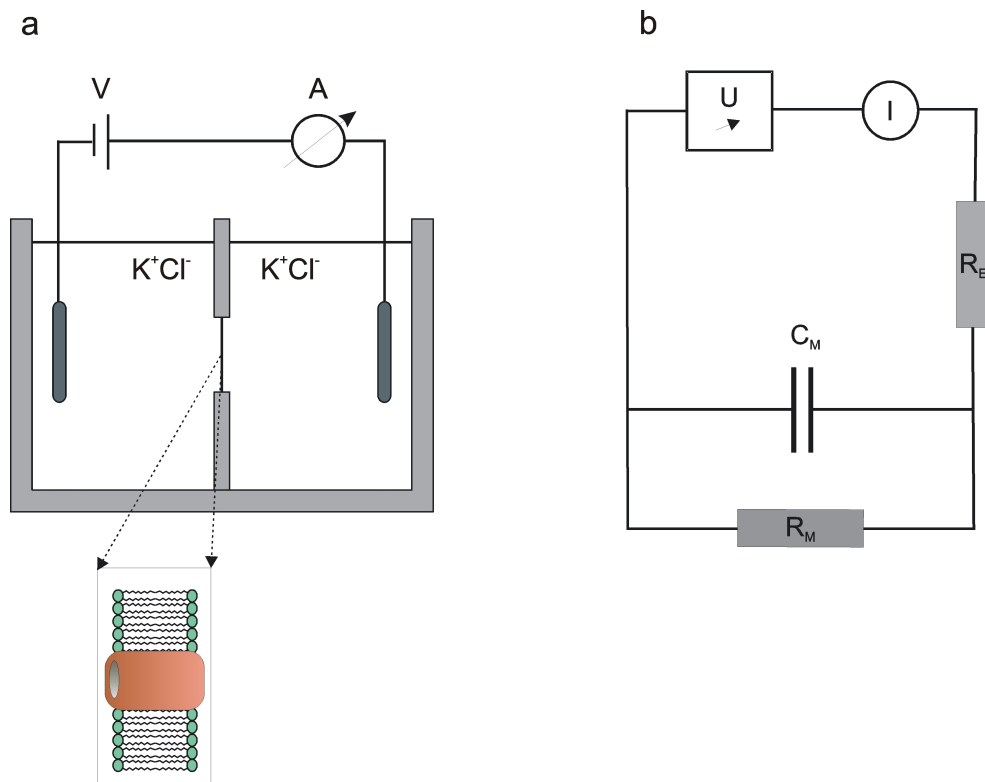


Abbildung 2.5: Versuchsaufbau und Ersatzschaltbild des Bilayersystems

a: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit inkorporiertem Kanal, Elektrolytlösungen, Elektroden, Spannungsquelle (V) und Amperemeter (A). **b:** Ersatzschaltbild zu **a**. Der Kanal ist durch den Widerstand R_M , Elektroden und Elektrolytlösungen durch den Widerstand R_{EI} und die Membrankapazität durch den Kondensator C_M mit Spannungsquelle (U) und Amperemeter (I) dargestellt.

verbunden, die Elektrode der Cis-Kammer liegt an der Masse der Headstage und dient somit als Referenzelektrode. Bei der hier beschriebenen Anordnung wird ein Fluss von Kationen von trans nach cis bzw. ein Fluss von Anionen in die Gegenrichtung als positiver Strom aufgezeichnet.

Die softwaregestützte Datenaufnahme bei konstanten Klemmspannungen erfolgte mit dem Programm Axoscope 9.0 (Axon Instruments) bei einer Samplingfrequenz von 5-10 kHz. Für das kontinuierliche Abtasten eines Spannungsbereiches (Strom-Spannungsrampe) wurde das Programm Clampex (Dr. Alexander Merle) bei einer Samplingrate von 2 kHz verwendet.

2.3.5 *Liquid junction* Potenziale

An Grenzflächen zwischen Lösungen mit deutlich unterschiedlichen Konzentrationen zweier Ionensorten kann es zum Auftreten von Diffusionspotenzialen kommen, wenn eine der Ionensorten eine erhöhte Mobilität aufweist und demzufolge schneller über den Konzentrationsgradienten an der Grenzfläche diffundiert (*Liquid junction* Potenzial). Im beschriebenen Versuchsaufbau (2.3.4) kann dieser Effekt an der Grenzfläche zwischen der Elektrolytlösung in der Messkammer und der KCl-Agaroselösung der Elektroden auftreten. In Abhängigkeit vom verwendeten Elektrolyten kann es, besonders bei der Bestimmung von Umkehrpotenzialen nach 2.3.13 zu einer Verfälschung der Ergebnisse von -5 bis +12 mV kommen (Neher, 1992).

Die bei der Verwendung von KCl-Lösungen auftretenden *Liquid junction* Potenziale betragen ca. 1 mV und sind vernachlässigbar. Für Experimente mit asymmetrischen CaCl₂- und MgCl₂-Puffern (siehe 3.1.5) wurde das *Liquid junction* Potenzial mit dem Programm Clampex (Axon Instruments) nach Barry und Lynch (1991) mit 3,8 mV bzw. 4,1 mV berechnet und die Ergebnisse entsprechend korrigiert. Bei Messungen mit CaCl₂- und MgCl₂-Puffern unter symmetrischen Bedingungen wurde das Nullstrompotenzial (*zero current* Potenzial) nach erfolgter Perfusion auf 0 mV festgesetzt.

2.3.6 Aufbereiten des Bilayerlipides

Das Lipid (L- α -PC Type IV-S, Sigma) wurde mit einer Konzentration von 100 mg/ml in Methanol-Chloroform (Verhältnis 1:1) gelöst und bei -20°C gelagert. Zur Herstellung des Bilayers wurden 55 μ l der Lösung entnommen und die Lösungsmittel für ca. 30 Minuten mit Hilfe einer Membranvakuumpumpe (Vakuubrand, MZ2C) evaporiert. Anschließend wurde das Lipid in 100 μ l n-Decan (Sigma) aufgenommen und je nach Viskosität (optische Kontrolle) nachverdünnt, bis die Proben mit dem Bilayer fusioniert werden konnten.

2.3.7 Herstellung des Bilayers

Zur Herstellung des Bilayers nach der *painting technique* wurde mit einer um 90° gebogenen 50 μ l Hamilton-Spritze ein Tropfen Lipid auf das Loch im Septum (siehe 2.3.2) appliziert (Abbildung 2.6 a). Danach konnte durch wiederholtes Absenken des Flüssigkeitsspiegels in der Trans-Kammer die Lipidmenge auf dem Loch soweit reduziert werden, dass sich eine unilamellare Lipiddoppelschicht ausbildete (Abbildung 2.6 b). Der Bilayer erschien hier als durchsichtige Fläche, umgeben von einem ringförmigen Annullus. Durch weitergehendes Reduzieren der aufgetragenen Lipidmenge konnte schließlich

ein voll ausgebildeter Bilayer mit deutlich zurückgegangenem Annulus (Abbildung 2.6 c) hergestellt werden (Müller et al., 1963). Dieser blieb über mehrere Stunden stabil.



Abbildung 2.6: Herstellung des planaren Bilayers

2.3.8 Fusion der Probenliposomen mit dem planaren Bilayer

Für die erfolgreiche Fusion von Ionenkanälen in den planaren Bilayer sind sowohl geöffnete Kanäle in den Membranen der Liposomen (siehe 2.2.10), als auch ein osmotischer Gradient über dem Bilayer essenziell (Cohen et al., 1980, Niles und Cohen, 1987). Blobel und Dobberstein (1975), Simon und Blobel (1991) sowie Wirth et al. (2003) beobachteten, dass der Sec61-Komplex bei höheren Salzkonzentrationen in geschlossenem Zustand vorliegt bzw. nicht in den planaren Bilayer inkorporiert. Deshalb wurde für die Fusionen ein Verhältnis von 100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis zu 10 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 trans gewählt (Wirth, 2003). Es hat sich herausgestellt, dass eine Erhöhung des osmotischen Gradienten über der Membran (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis zu 10 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 trans) entgegen früheren Beobachtungen die Fusionsrate positiv beeinflusst hat. Um Fusionen zusätzlich zu fördern wurden 15 μ l 2 M CaCl_2 in die Cis-Kammer pipettiert. Die Ca^{2+} -Ionen sollen nach Cohen et al. (1980) und Niles und Cohen (1987) eine Adhäsion der polaren Kopfgruppen der Liposomenlipide an den Bilayer erleichtern.

Weiterhin förderlich für die Fusionsraten hat sich das Beschallen der Proben mit Ultraschall gezeigt. Da der Durchmesser des Bilayers quadratisch in die Fusionswahrscheinlichkeit eingeht hat sich auch eine Vergrößerung des Loches im Septum als hilfreich erwiesen, was allerdings eine verminderte Stabilität der Membran zur Folge hatte.

1-2 μ l Probe wurden mit einer um 45° gebogenen 10 μ l Hamilton-Spritze in der Cis-Halbkammer über (wenn Dichte der Probe höher war als Dichte des Elektrolytes) oder unter (wenn Dichte der Probe geringer war als Dichte des Elektrolytes) dem Bilayer abgesetzt, so dass die Liposomen in unmittelbare Nähe der Membranoberfläche gelangten.

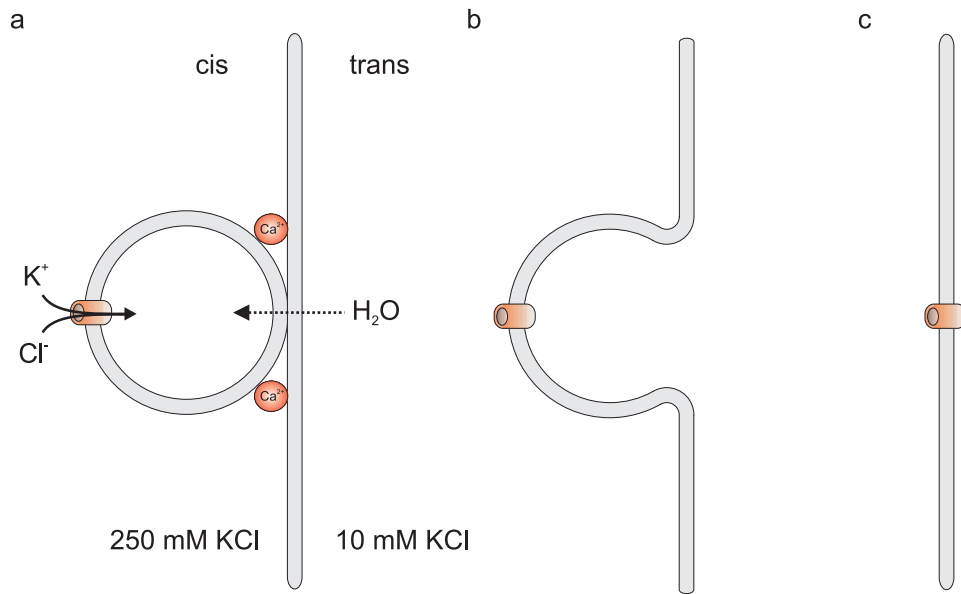


Abbildung 2.7: Osmotische Fusion eines Proteoliposoms mit dem planaren Bilayer

Nach erfolgter Adsorption der Liposomen an den Bilayer unter Ca^{2+} -Einfluss (Abbildung 2.7), strömte Wasser aus der Trans-Kammer über die Membran ein. Das Liposom schwoll bis zur Fusion an, während über den offenen Kanal das osmotische Gleichgewicht zum Elektrolyten der Cis-Kammer aufrechterhalten wurde. Mit erfolgter Fusion war der zu untersuchende Ionenkanal in den planaren Bilayer inseriert. Im Anschluss wurden beide Kammern perfundiert um vorhandene Vesikel zu entfernen und definierte Versuchsbedingungen einzustellen.

2.3.9 Leitwertbestimmung

Ein wichtiges Kriterium zur grundlegenden Charakterisierung eines Ionenkanals ist der Leitwert. Dieser ergibt sich als Quotient aus dem durch den Ionenfluss über den Kanal entwickelten Strom und der angelegten Klemmspannung. Der Leitwert kann somit auch als Kehrwert des Kanalwiderstandes beschrieben werden. Dabei ist zwischen absolutem und relativem Leitwert zu unterscheiden. Der absolute Leitwert berücksichtigt den insgesamt über der Membran messbaren Strom und beinhaltet die Leckleitfähigkeiten von Bilayer und Kanal. Dem gegenüber errechnet sich der Relativleitwert aus der Differenz des Stromes vor und nach einem Schaltereignis des Kanals.

Absoluter und relativer Leitwert ergeben sich nach dem Ohmschen Gesetz :

2 Material und Methoden

$$G_{abs} = \frac{I}{U} \quad (1)$$

$$G_{rel} = \frac{|dI|}{U} \quad (2)$$

I	=	Strom
U	=	Klemmspannung
G_{abs}	=	Absoluter Leitwert
G_{rel}	=	Relativer Leitwert

Im Folgenden ist, soweit nicht gesondert erwähnt, mit Leitwert immer der relative Leitwert bezeichnet.

Der Leitwert eines Kanals ist abhängig von seinen strukturellen Eigenschaften wie dem Durchmesser der Vestibüle und der Verengungszone (siehe 2.3.14) oder den geladenen oder polaren Aminosäureresten in der Porenregion. Er variiert mit dem Offenzustand des Kanals, aber im Fall von Translokasen eventuell auch mit der Struktur des in Verengungszone oder Vestibül befindlichen Translokationssubstrates.

Die Datenaufnahme zur Auswertung des Leitwertes erfolgte unter symmetrischen Bedingungen, um einen linearen Zusammenhang zwischen Strom und angelegter Klemmspannung zu gewährleisten. Dafür wurden nach erfolgreicher Fusion eines Probenliposoms (siehe 2.3.8) mit dem planaren Bilayer beide Messkammern perfundiert. Anschließend wurden mit dem Programm Axoscope 9.0 (Axon Instruments) verschiedene Klemmspannungen angelegt und die Stromdaten mit einer Samplingfrequenz von 5 kHz gespeichert. Die Stromspuren wurden über einen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV mit einer Inkrementierung von 5 mV aufgenommen. Dabei wurden abwechselnd konstante positive und negative Klemmspannungen ansteigend für einen Zeitraum von 60 Sekunden angelegt, getrennt von einer Pause von 30 Sekunden. Da der Sec61-Komplex bereits bei Klemmspannungen ab ± 55 mV ein gestörtes Schaltverhalten zeigte, erfolgte eine Datenaufnahme bei höheren Membranpotenzialen nur in Ausnahmefällen.

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Ephys5 (Dr. Thomas Steinkamp, Fachbereich Biologie, Universität Osnabrück). Dabei hat es sich als sinnvoll erwiesen zur eindeutigen Identifizierung von Schaltereignissen ein Histogramm über die Stromdaten zu erstellen, mit dessen Hilfe eine klare Trennung der unterschiedlichen Stromniveaus auch bei niedrigen Klemmspannungen (kleinem dI) möglich war.

Aus den mit Ephys5 erhaltenen Stromdaten wurden mit dem Programm Excel 2003 die jeweiligen Leitwerte errechnet. Diese Daten konnten anschließend mit dem Programm

Origin 7.0 weiterverarbeitet werden. Dazu wurden die Leitwerte aller untersuchten Klemmspannungen in Klassen zusammengefasst und gegen ihre Häufigkeit als Histogramm aufgetragen. Häufungen innerhalb der so erhaltenen Leitwertverteilung konnten mit Gaußfunktionen angepasst werden. Anhand der Maxima der Anpassungen erfolgte die Bestimmung von Haupt- und Unterleitwert. Im Folgenden bezieht sich der Begriff Hauptleitwert auf die am häufigsten auftretende Stromänderung.

2.3.10 Leitwertsättigung

Mit zunehmender Ionenkonzentration der eingesetzten Elektrolytlösungen nimmt der Leitwert eines Kanals kontinuierlich zu. Dieser Zusammenhang ist dabei nur bis zu einer bestimmten Salzkonzentration annähernd linear. Trägt man die Aktivitäten (siehe 2.3.11) der Elektrolytlösungen gegen die zugehörigen Leitwerte auf, so nähert sich die Funktion asymptotisch einem Maximalleitwert (G_{Max}) an. Stellt man sich die Pore eines *single-file*-Ionenkanals als eine Reihe von Ionenbindungsstellen vor, so sind bei der Elektrolytaktivität, bei der der halbmaximale Leitwert erreicht ist (K_M), die Hälfte dieser Bindungsstellen besetzt, während beim Erreichen des Maximalleitwertes alle Stellen besetzt sind.

Nach Hille (2001), Seite 472 kann dieser Zusammenhang analog zur Enzymkinetik beschrieben werden:

$$G = G_{Max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (3)$$

G	=	Leitwert
G_{Max}	=	Maximalleitwert
$[S]$	=	Aktivität des Ions S
K_M	=	Aktivität des Ions S, bei dem ein halbmaximaler Leitwert erreicht ist

2.3.11 Aktivitäten der Elektrolytlösungen

Die vereinfachende Annahme, dass sich die Ionen einer Elektrolytlösung nicht gegenseitig beeinflussen, ist nur bei niedrigen Salzkonzentrationen zulässig. Bei höheren Konzentrationen nehmen die Interaktionen der Ionen zu, während ihr chemisches Potenzial abnimmt. Deshalb verwendet man bei entsprechenden Experimenten statt der Konzentration einer Lösung deren Aktivität, die sich aus der Multiplikation der Konzentration mit dem Aktivitätskoeffizienten ergibt.

Dieser Effekt ist bei identischer Molarität verschiedener Salzlösungen unterschiedlich stark ausgeprägt. Daher ist es für die Vergleichbarkeit elektrophysiologischer Ergeb-

2 Material und Methoden

nisse aus Experimenten mit verschiedenen Elektrolyten und besonders bei biionischen Messungen wichtig, die einzusetzenden Salzkonzentrationen so zu wählen, dass die Elektrolytlösungen die gleiche Aktivität (Effektivkonzentration) besitzen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden die Konzentrationen von KCl, CaCl₂ und MgCl₂ in den verwendeten Lösungen entsprechend angepasst (250 mM KCl \cong 184 mM CaCl₂ \cong 176 mM MgCl₂ und 20 mM KCl \cong 10,7 mM CaCl₂ \cong 10,4 mM MgCl₂). Die Aktivitätskoeffizienten wurden Weast (1987) entnommen.

2.3.12 Biionische Messungen

Biionischen Messungen erlauben den direkten Vergleich elektrophysiologischer Kanaleigenschaften unter verschiedenen Elektrolytbedingungen. Außerdem ermöglichen sie die Bestimmung von Permeabilitätsverhältnissen von verschiedenen Anionen oder Kationen untereinander. Dabei werden auf beiden Seiten der Membran Elektrolytlösungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung, aber gleicher Aktivität eingesetzt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden 184 mM CaCl₂, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis- und 250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 transseitig und umgekehrt eingesetzt. Bei der beschriebenen Anordnung entspricht ein positiver gemessener Strom einem Fluss von K⁺-Ionen als Träger der positiven Ladung und ein negativer gemessener Strom einem Fluss von Ca²⁺-Ionen als Träger der positiven Ladung.

2.3.13 Umkehrpotenzial und Selektivität

Ein Großteil der bekannten Ionenkanäle besitzt für verschiedene Ionen unterschiedliche Permeabilitäten und damit eine Selektivität. Diese ist in der Struktur der Kanäle begründet und hauptsächlich auf die exponierten Ladungen an der Proteinoberfläche in Vestibül und Verengungszone zurückzuführen. Dabei wird die Selektivität für Kationen durch negative Ladungen erhöht, die für Anionen aufgrund der Abstoßung der gleichen Ladungen vermindert. Hier muss wiederum die Ladung eines zu transportierenden Makromoleküls im Kanal oder eines im Bereich der Pore gebundenen Effektors analog dazu betrachtet werden.

Experimentell ist die Selektivität als Umkehrpotential (U_{rev}) unter asymmetrischen Bedingungen messbar. Dabei werden die Halbkammern beidseitig der Membran mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Elektrolyten perfundiert. Es entsteht, falls der Kanal verschiedene Permeabilitäten für die beiden Ionensorten des Elektrolyten aufweist, ein elektrochemisches Potenzial über der Membran. Als Umkehrpotenzial wird die Klemmspannung bezeichnet, welche dem elektrochemischen Potenzial so entgegenwirkt, dass kein Nettostrom mehr über den Kanal fließt.

2.3 Elektrophysiologische und biophysikalische Methoden

Bei der Betrachtung eines Kanals der nur für eine Ionensorte permeabel ist, ergibt sich das Umkehrpotenzial aus der Nernst-Gleichung:

$$U_{rev} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{c_{trans}}{c_{cis}} \quad (4)$$

U_{rev}	=	Umkehrpotenzial	R	=	allgemeine Gaskonstante
z	=	Wertigkeit des Ions	F	=	Faradaykonstante
T	=	Temperatur	c_1/c_2	=	Konzentration des Ions beidseitig der Membran

Da der Großteil der bekannten Membrankanäle für mehrere Ionen permeabel ist, muss die Nernst-Gleichung zur Goldman-Hodkin-Katz-Spannungsgleichung (GHK-Gleichung) erweitert werden. Dabei werden Ionen betrachtet, die sich unabhängig voneinander durch einen idealisiert homogenen Kanal bewegen.

$$U_{rev} = \frac{RT}{F} \cdot \frac{\sum P_K \cdot [K]^{cis} + \sum P_A \cdot [A]^{trans}}{\sum P_K \cdot [K]^{trans} + \sum P_A \cdot [A]^{cis}} \quad (5)$$

$P_{K/A}$	=	Permeabilitätskoeffizienten von Kation und Anion
$[K/A]^{cis/trans}$	=	Konzentrationen von Kation und Anion in den Halbkammern

Stellt man Gleichung (5) um, so kann bei bekanntem Umkehrpotenzial das Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten von Kation und Anion bestimmt werden (6). Die Permeabilitäten der verwendeten Puffersubstanzen Mops und Tris werden vernachlässigt.

$$\frac{P_K}{P_A} = \frac{[A]_{trans} - e^{\frac{U_{rev}F}{RT}} \cdot [A]_{cis}}{e^{\frac{U_{rev}F}{RT}} \cdot [K]_{trans} - [K]_{cis}} \quad (6)$$

Die Datenaufnahme erfolgte mit dem Programm Clampex unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen. Im Gegensatz zu den Messungen der Leitwertbestimmung wurden hier keine konstanten Klemmspannungen angelegt, sondern ein Spannungsbereich von -55 mV bis +55 mV kontinuierlich über einen Zeitraum von 15 s als Spannungsrampe abgetastet und die entsprechenden Stromwerte mit einer Samplingrate von 2 kHz gespeichert. Um kapazitive Effekte auszuschließen, wurden die Richtungen der so aufgenommenen Rampen (vom negativen zum positiven Spannungsbereich oder umgekehrt) abgewechselt.

Zur Datenauswertung wurden die Messwerte in das Programm Origin 7.0 importiert und graphisch als Strom-Spannungsdiagramm dargestellt. Mit Hilfe von Ausgleichsgeraden konnte das Umkehrpotenzial als Schnittpunkt mit der x-Achse bestimmt werden.

2 Material und Methoden

Aus den so erhaltenen Umkehrpotenzialen wurden mit dem Programm Mathcad 2001 (Mathsoft) nach Gleichung (6) die relativen Selektivitäten bestimmt.

Diese Methode zur Bestimmung des Umkehrpotenziales hat den Nachteil dass Leckleitfähigkeiten von Kanal und Membran mit einfließen. Daher wurde U_{rev} zusätzlich aus der Stromdifferenz vor und nach einem Schaltereignis ermittelt. Dazu wurde ein wie unter 2.3.9 beschriebenes Messprotokoll unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen aufgenommen und die durch Schaltereignisse des Kanals verursachten Stromänderungen (dI) ausgewertet. Anschließend wurden mit der Software Origin 7.0 Häufigkeitshistogramme für die Stromänderungen erstellt und dabei die angelegten Klemmspannungen getrennt voneinander betrachtet. Häufungen in den Histogrammen wurden mit Gaußfunktionen angepasst und die zugehörigen Maxima gegen die entsprechenden Klemmspannungen zu einer Strom-Spannungskennlinie aufgetragen. Haupt- und Unterleitwert wurden mit Ausgleichsfunktionen angepasst und die Umkehrpotenziale als Schnittpunkte mit der x-Achse abgelesen.

2.3.14 Abschätzung des Porendurchmessers aus dem Leitwert

Nach Hille (2001), Seite 352 kann der Durchmesser eines Kanals abgeschätzt werden wenn sein Leitwert bekannt ist. Dabei wird der Kanal als ein idealisierter Zylinder mit Verengungszone und beidseitig vorgelagerten Vestibülen angenommen. Ist dieser Kanal mit einer Lösung mit spezifischem Widerstand ρ gefüllt, so ergibt sich sein Gesamtwiderstand aus Radius, Länge und Widerstand der Restriktionszone sowie dem Zugangswiderstand für die Ionen (R_{access}), d.h. dem Widerstand der Vestibüle.

$$R_K = R_R + R_{access} = \left(l + \frac{\pi r}{2} \right) \frac{\rho}{\pi r^2} \quad (7)$$

R_K	=	Widerstand des Kanals	l	=	Länge der Restriktionszone
R_R	=	Widerstand der Restriktionszone	r	=	Radius der Restriktionszone
R_{access}	=	Widerstand der Vestibüle	ρ	=	spez. Widerstand der Lösung

Setzt man für den Widerstand R_K den reziproken Leitwert ein und löst Gleichung (7) nach r auf, so kann der Porendurchmesser abgeschätzt werden:

$$d = \frac{\rho G}{\pi} \left(\frac{\pi}{2} + \sqrt{\left(\frac{\pi}{2} \right)^2 + \frac{4\pi l}{\rho G}} \right) \quad (8)$$

d	=	Durchmesser des Kanals
G	=	Leitwert des Kanals

2.3 Elektrophysiologische und biophysikalische Methoden

Da über die Länge der Verengungszone im Fall des Sec61-Kanals keine Informationen vorlagen, wurden verschiedene Werte zwischen 5 Å und 50 Å bei vollständiger Durchspannung der Membran berücksichtigt. Die spezifische Leitfähigkeit des verwendeten Puffers (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7) wurde mit einem Konduktometer (WTW LF3000) mit $31,5 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt, was einem spezifischen Widerstand von $31,7 \Omega \cdot \text{cm}$ entspricht. Smart et al. (1997) konnten zeigen, dass der spezifische Widerstand einer Lösung in den Porenregionen von Kanälen mit bekannter Kristallstruktur deutlich höher ist als im sie umgebenden Medium. Entsprechend wurde der Messwert um den von Smart et al. (1997) vorgeschlagenen Faktor von 5 auf $158,5 \Omega \cdot \text{cm}$ korrigiert. Die Berechnung der Porengröße erfolgte mit dem Programm Mathcad 2001.

2.3.15 Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit

Den Schaltereignissen eines Kanals liegen Veränderungen der Proteinkonformation zugrunde. Dabei entspricht jeder stabile Zustand (im idealisierten Fall nur zwei: offener und geschlossener Kanal) einem Energieminimum. Für die Überwindung der Energiebarriere zum nächsten Offenzustand reicht im Allgemeinen die thermische Energie des Systems aus. Der Offenzustand eines Kanals kann von der angelegten Spannung abhängig sein, wenn Ladungen im Protein auf das angelegte elektrische Feld reagieren (*gating charges*; Hille, 2001, Seite 56ff., 603ff.) und damit die Energiebarriere zwischen zwei stabilen Offenzuständen herabgesetzt wird.

Um die Offenwahrscheinlichkeiten zu bestimmen, wurden die Halbkammern symmetrisch perfundiert, die Klemmspannungen wie unter 2.3.9 geschildert für eine Minute angelegt und die resultierende Stromantwort kontinuierlich aufgezeichnet. Zur Auswertung wurde jeweils der mittlere Strom des maximalen Offenzustandes zum Mittel über die gesamte Minute ins Verhältnis gesetzt und die so erhaltenen Offenwahrscheinlichkeiten gegen die angelegten Klemmspannungen aufgetragen. Sollte der Einfluss eines Effektors auf die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit des Kanals untersucht werden, so wurde erst ein Referenzprotokoll ohne Effektor aufgenommen. Die Offenwahrscheinlichkeit wurde daraufhin als Quotient aus dem mittleren Strom der einminütigen Stromspur nach Zugabe des Effektors und dem mittleren Strom des maximalen Offenzustandes vor Effektorzugabe berechnet.

2.3.16 Mean-Variance Plot

Für eine Betrachtung von zeitlich sehr dicht aufeinander folgenden Schaltereignissen hat sich die Mean-Variance Darstellung der Stromdaten als sehr hilfreich erwiesen. Mit der herkömmlichen Datendarstellung als Stromspur oder Stromhistogramm lassen sich

2 Material und Methoden

die Übergänge zwischen drei Offenzuständen in einem solchen Fall u.U. nicht von einem einzelnen großen Schalten differenzieren, so dass Unterleitwerte hier nur schwer zu erfassen sind. Bei einer Samplingfrequenz von 5 kHz lassen sich über die mittlere Varianz jedoch noch Schaltereignisse auflösen, die zeitlich nur 2,2 ms auseinander liegen.

Für den Mean-Variance Plot wurden arithmetisches Mittel und Varianz über ein Fenster von 10 Datenpunkten aus den Stromdaten berechnet. Dann wurde das Fenster um einen Datenpunkt verschoben und erneut Mittelwert und Varianz gebildet. Die berechneten Werte wurden gegeneinander dargestellt. Schaltereignisse sind mit einer Parabel anpassbar (Patlack, 1993). Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Excel 2003 und Origin 7.0.

2.3.17 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) beruht auf der Fluktuation der Fluoreszenzintensität farbstoffmarkierter Moleküle in einer Lösung im thermodynamischen Gleichgewicht. Werden sowohl das Beobachtungsvolumen als auch die Konzentration der beobachteten Moleküle hinreichend gering gewählt, so führt die Diffusion der angeregten Farbstoffe durch den Detektionsbereich zu einer hohen Fluktuation des Fluoreszenzsignals. Bei der Auswertung der FCS-Daten werden die Intensitätswerte mit sich selber zeitversetzt korreliert (Autokorrelation). Betrachtet man dabei den Zeitbereich von Mikro-bis Millisekunden, so kann aus der Abnahme der Korrelation die translatorische Diffusionszeit der beobachteten Moleküle durch das Fokusbereich abgeleitet werden.

Die FCS-Experimente mit dem Atto488-gelabelten Sec61 α IQ-Peptid (2.2.7) wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Spektrometer (Insight Cell 3D, Evotech Technologies) durchgeführt. Für die Anregung des Atto488-Farbstoffes wurde ein Ar⁺-Laser genutzt und die 488 nm Linie über einen dichroitischen Filter gewählt. Die Leistung des Lasers betrug für alle Versuche 38 μ W. Die Fokusebene wurde mit einem Pinhole (40 μ m Durchmesser) begrenzt. Die Photonen der Fluoreszenzemission wurden mit Avalanche-Photodioden (Perkin Elmer) aufgenommen und die Autokorrelationsfunktionen von einem Hardware-Korrelator (Evotech Technologies) berechnet. Die Messungen wurden in 96-Well-Platten mit Kammervolumen von je 25 μ l durchgeführt. Dabei war der Fokus 100 μ l über dem Kammerboden positioniert. Zur Kalibrierung wurde eine 1 nM Fluorescein-Lösung (Sigma) verwendet. Mit einer Diffusionszeit für Fluorescein von $\tau_D=65 \pm 2 \mu$ s und einem Diffusionskoeffizienten $D=436 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Petrasek und Schwille, 2008) ergibt sich nach

$$\omega_1 = \sqrt{\frac{4D\tau_D}{\pi}} \quad (9)$$

- ω_1 = Fokusradius
 D = Diffusionskoeffizient Fluorescein
 τ_D = Diffusionszeit Fluorescein

ein Fokusradius von $\omega_1=190$ nm. Der Strukturparameter κ betrug 4,5 für alle durchgeführten Experimente. Mit

$$V = 2\pi \cdot \omega_1^2 \cdot \kappa \omega_1 \quad (10)$$

- V = Fokusvolumen
 ω_1 = Fokusradius
 κ = Strukturparameter

ergibt sich ein Fokusvolumen von 0,194 fl.

Alle Messungen wurden in 100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7, 0,005 % Triton X-100 und 4 mM CaCl₂ bzw. 1 mM EGTA durchgeführt (siehe 2.2.7). Die Konzentration des IQ₄₈₈-Peptides in den Probenansätzen lag für alle durchgeführten Versuche bei 5 nM (≈ 5 Moleküle im Fokusvolumen). Für die Bindungsstudien wurden die Diffusionszeiten für das IQ₄₈₈-Peptid und den gesättigten IQ₄₈₈-CaM-Komplex (bei 11,2 μ M CaM) sowie den gesättigten IQ₄₈₈-GST-CaM-Komplex (bei 7,4 μ M GST-CaM) über ein Ein-Komponenten-Modell der Autokorrelationsfunktion nach

$$G(\tau) = 1 + \left(1 + \frac{T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}}{1 - T}\right) \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D \kappa^2}}} \quad (11)$$

- T = Triplettfraktion τ_T = Triplettzeit
 N = Anzahl der Partikel im Fokus τ = Korrelationszeit
 τ_D = Diffusionszeit κ = Strukturparameter

bestimmt. Um den Sättigungsgrad des IQ₄₈₈-CaM-Komplexes für CaM-Konzentrationen zwischen 1 nM und 5,6 μ M und den des IQ₄₈₈-GST-CaM-Komplexes für GST-CaM-Konzentrationen zwischen 0,7 nM und 3,7 μ M zu bestimmen, wurden die Autokorrelationsfunktionen mit einem Zwei-Komponenten-Modell angepasst:

2 Material und Methoden

$$G(\tau) = 1 + \left(1 + \frac{T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}}{1 - T}\right) \frac{f_1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D1}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{D1}\kappa^2}}} + \frac{1 - f_1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D2}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{D2}\kappa^2}}} \quad (12)$$

T	=	Triplettfraction	τ_T	=	Tripletzeit
f_1	=	Fraktion Komponente 1	N	=	Anzahl der Partikel im Fokus
τ	=	Korrelationszeit	τ_{D1}	=	Diffusionszeit Komponente 1
τ_{D2}	=	Diffusionszeit Komponente 2	κ	=	Strukturparameter

Dabei wurden die zuvor bestimmten Diffusionszeiten des freien IQ₄₈₈-Peptides als τ_{D1} und des gesättigten IQ₄₈₈-CaM-Komplexes bzw. des gesättigten IQ₄₈₈-GST-CaM-Komplexes als τ_{D2} festgesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen FCS4 (Alf Honigmann, Universität Osnabrück), Excel 2003 und Origin 7.0.

Um die Dissoziationskonstante K_D für die Interaktion des IQ₄₈₈-Peptides mit CaM bzw. GST-CaM zu erhalten wurde der prozentuale Anteil an gebundenem IQ₄₈₈-Peptid gegen die CaM- bzw. GST-CaM-Konzentration aufgetragen mit einem Ein-Bindungsstellen-Modell angepasst:

$$IQ_{488} - CaM = IQ_{488} - CaM_{Max} \frac{[CaM]}{[CaM] + K_D} \quad (13)$$

IQ ₄₈₈ -CaM	=	prozentualer Anteil IQ ₄₈₈ im IQ ₄₈₈ -CaM-Komplex
IQ ₄₈₈ -CaM _{Max}	=	Maximale Sättigung des IQ ₄₈₈ mit CaM
[CaM]	=	Konzentration an Calmodulin
K_D	=	Dissoziationskonstante des IQ ₄₈₈ -CaM-Komplexes

2.4 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden aus den angegebenen oder anderen handelsüblichen Quellen bezogen und entsprachen den analytischen Reinheitsanforderungen. Pufferlösungen wurden mit H₂O bidest aus einer Astacus-Filteranlage (Membrapure) angesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

3.1.1 Fusion der Proben mit dem planaren Bilayer

Alle untersuchten Proben des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris* konnten erst nach Modifikation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran nach 2.2.9 in den Bilayer inkorporiert werden. Eine einfache Vermischung der Lipide durch Beschallen der Proben mit Ultraschall mit anschließenden Gefriertau-Zyklen hat sich dabei als nicht ausreichend erwiesen, ein Mega 9-vermitteltes Solubilisieren der Proteoliposomen war zwingend erforderlich. Biochemische Experimente haben gezeigt, dass die für die elektrophysiologischen Versuche verwendeten Translokon-Präparationen nach Modifikation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran in Anwesenheit von Mega 9 in Bezug auf die Proteintranslokation funktionell waren (persönliche Kommunikation mit Dr. Martin Jung, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg).

Eine essenzielle Voraussetzung für die Fusion eines Proteoliposoms mit dem planaren Bilayer ist das Vorhandensein eines offenen, ionenleitenden Kanals in der Liposomenmembran (2.3.8). Eine Aktivierung der Kanalaktivität kann über einen Vergleich der Fusionsraten vor und nach der entsprechenden Probenbehandlung gezeigt werden. Die cotranslationalen Translokonpräparationen (RM) fusionierten mit cytosolseitig gebundenen Ribosomen schlecht mit dem planaren Bilayer. Wurden diese durch Inkubation der Proben mit Puromycin, KCl und GTP abgelöst (2.2.10), so war eine deutliche Zunahme der Fusionsereignisse zu beobachten. Damit kann von einem Induzieren des Kanals durch Lösen der Ribosomen ausgegangen werden. Da die untersuchten Kanäle vor und nach Lösen der Ribosomen aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften nicht voneinander zu unterscheiden waren, ist eine Kontamination der rauen Mikrosomen mit anderen kanalbildenden Proteinen als Ursache für die beobachtete Aktivität vor Inkubation mit Puromycin, KCl und GTP unwahrscheinlich. Des Weiteren waren die elektrophysiologischen Grundcharakteristika der untersuchten Kanäle aus rauen Mikrosomen vor Ribosomen-Depletion mit denen der posttranslationalen Präparationen identisch. Damit liegt nahe, dass in den RM-Proben eine geringe Anzahl nicht-ribosomenassoziierter Sec61-Kanäle vorhanden war und die entsprechenden Mikrosomen spontan mit dem planaren Bilayer fusionierten.

Die posttranslationalen Präparationen (PKRM) sowie Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex fusionierten gut mit dem planaren Bilayer. Eine Vorinkubation dieser Proben mit einem transportkompetenten Vorstufenprotein wie PPcecA (preprocecropin A, Wirth, 2003) oder Ubc6 (ubiquitin conjugating enzyme 6, Erdmann, 2004)

3 Ergebnisse

war nicht erforderlich, im Vergleich der Fusionsraten mit und ohne Vorinkubation mit Präpeptid konnte keine Zunahme festgestellt werden.

In Kontrollexperimenten wurde untersucht, ob Puromycin in Anwesenheit von GTP einen aktiven Kanal in Liposomen aus dem für die Probenverdünnung verwendeten Lipid (L- α -PC, Larodan Fine Chemicals) konstituieren oder induzieren konnte. Die Liposomensuspension wurde mit Mega 9 versetzt, das Detergens mittels Dialyse entfernt, die Probe anschließend mit Puromycin und GTP vorinkubiert und im planaren Bilayer System untersucht. Es konnten keine Fusionsereignisse beobachtet werden. Der Versuch wurde mit jeder verwendeten Charge L- α -PC wiederholt. Dieser Ansatz zeigt, dass weder das L- α -PC (Larodan Fine Chemicals) noch das für die Herstellung des Bilayers verwendete L- α -PC Type IV-S (Sigma) mit kanalbildenden Proteinen kontaminiert waren. Des Weiteren wurden 500 μ l Liposomenlösung des Larodan Lipides mit einer Lipidkonzentration von 20 mg/ml mit TCA behandelt um eventuelle Proteine auszufällen (2.2.2) und die Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es konnten auch mittels Silberfärbung keinerlei Proteinverunreinigungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Schaltverhalten des Sec61-Komplexes

Stromspuren des Sec61-Kanals aus RM- und PKRM- Präparationen sowie aus Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex zeigen identische Charakteristika. Für alle untersuchten Proben ist ein komplexes Schaltverhalten mit variablen Stromsprüngen auf eine Vielzahl von Unterniveaus zu beobachten (Abbildung 3.1). Entsprechend kann kein energetisch stabiler Hauptoffenzustand bestimmt werden. Kennzeichnend ist eine hohe Varianz bezüglich der Schaltfrequenzen und damit der *dwelltime*, der Verweildauer in einem Offenzustand (siehe Wirth, 2003; Erdmann, 2004). Des Weiteren ist ohne Zugabe von Effektoren kein vollständiges Verschließen des Sec61-Kanals zu beobachten. Auch bei maximal geschlossenem Zustand der Pore bleibt für alle untersuchten Proben ein Stromfluss als Leckstrom detektierbar. Bei Klemmspannungen ab ± 55 mV konnte für alle untersuchten Proben eine zunehmende Instabilität von Kanal und Bilayer beobachtet werden. Deshalb wurden nur in Ausnahmefällen Spannungen bis ± 70 mV für einen längeren Zeitraum angelegt.

Für eine detaillierte Betrachtung der Schaltcharakteristika werden die Daten einer repräsentativen Stromableitung als Mean-Variance Plot (2.3.16) dargestellt (Abbildung 3.2). Es zeigt sich, dass Übergänge zwischen allen Offenzuständen des Kanals auftreten, sowohl vom geschlossenen Zustand g zum Unterniveau o_1 als auch vom Zustand o_1 zum maximal geöffneten Zustand o_2 . Dabei treten, sowohl für öffnende als auch für schließende Schaltereignisse, zwei unterschiedliche Leitwerte auf (Λ_1, Λ_2). Des Weiteren

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

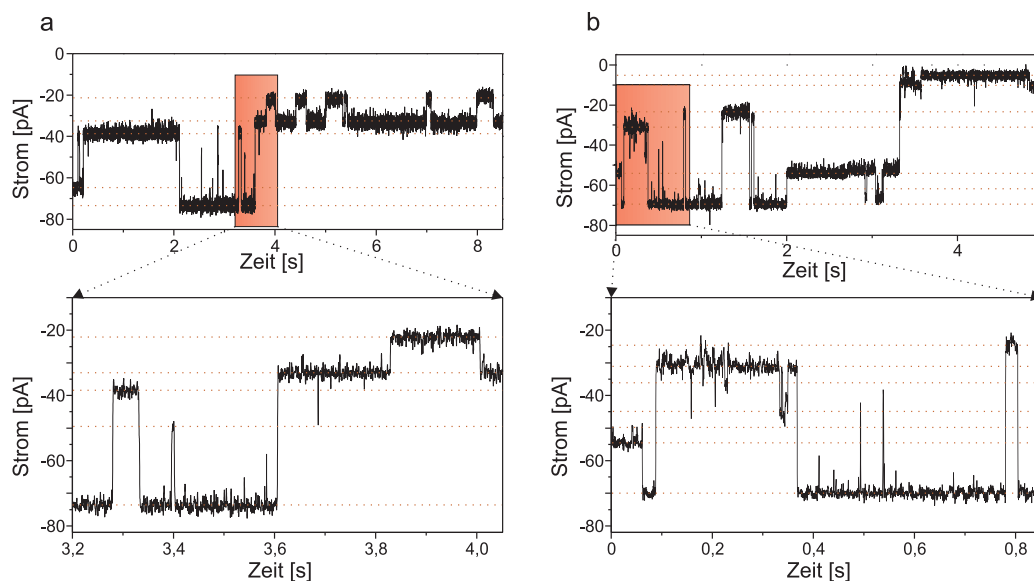


Abbildung 3.1: Schaltverhalten des Sec61-Komplexes aus *C. familiaris* unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7)
a: Stromspur eines Einzelkanals der induzierten RM-Probe bei einer Klemmspannung von -50 mV. **b:** Stromspur des aufgereinigten Sec61-Komplexes (-70 mV).

ist ebenfalls ein Durchschalten über das Unterniveau hinweg, also von g nach o_2 und umgekehrt, zu beobachten.

Es stellt sich die Frage, ob die beiden Leitwertklassen auf zwei unabhängigen Kanalaktivitäten in der Membran des planaren Bilayers beruhen, oder ob sie auf kooperatives Schalten zweier Kanäle bzw. auf einen Einzelkanal mit mehreren Unterleitwerten zurückzuführen sind. Dieses kann nach Laver und Gage (1997) über die Schaltfrequenzen beantwortet werden. Ein Durchschalten über die Unterniveaus hinweg wäre für unabhängige Leitwerte zu beobachten, wenn beide in einem Zeitraum von 200 μs (bei 5 kHz Samplingfrequenz) auftreten würden. Aus der Häufigkeit der Leitwerte Λ_1 und Λ_2 (Tabelle 3.1, Abbildung 3.2 a) wird die Wahrscheinlichkeit für ein Durchschalten des Kanals über die zugehörigen Stromniveaus hinweg (Λ_3) für ein Zeitfenster von 200 μs errechnet (ρ_{200} erwartet) und mit der tatsächlich beobachteten Wahrscheinlichkeit (ρ_{200} beobachtet) verglichen. Dabei wird eine exemplarische Einzelkanalstromspur von 60 Sekunden bei einer Klemmspannung von +50 mV betrachtet.

Für den untersuchten Zeitraum ist die tatsächliche Wahrscheinlichkeit für ein Durchschalten über die Unterniveaus hinweg und damit für das Auftreten des Leitwertes Λ_3 in einem Zeitfenster von 200 μs 72-mal höher als aufgrund der Schalthäufigkeiten der Leitwerte Λ_1 und Λ_2 für unabhängige Kanäle zu erwarten ist. Folglich sind die in den

3 Ergebnisse

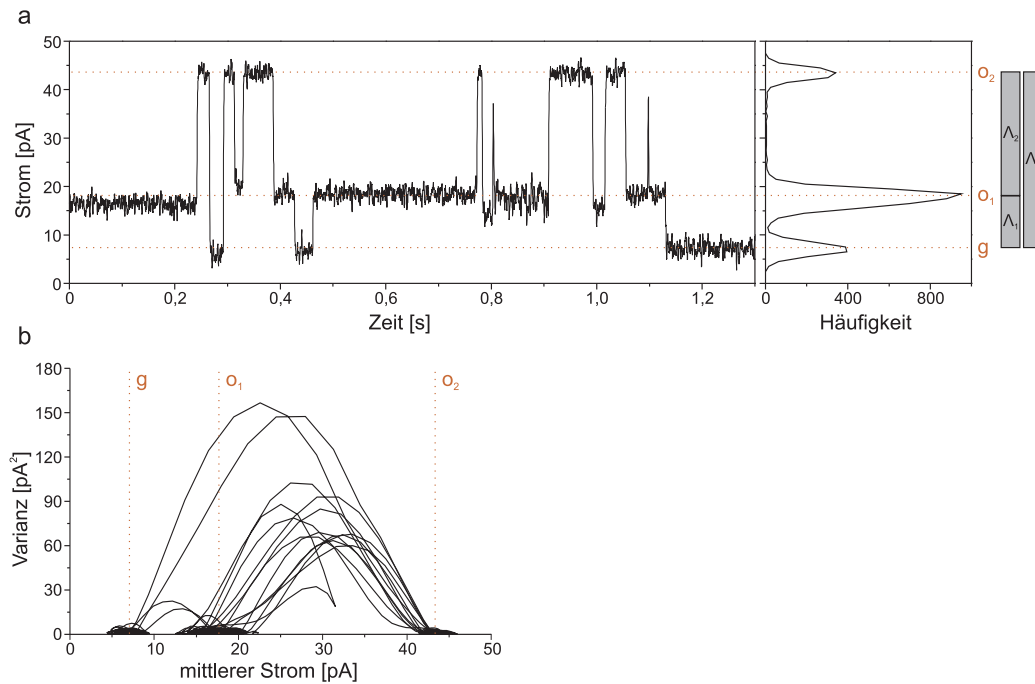


Abbildung 3.2: Stromspur und Mean-Variance Plot eines einzelnen Sec61-Kanals aus RM Präparationen

a: Stromspur mit Häufigkeitshistogramm der Stromwerte bei einem Membranpotential von +45 mV (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7). **b:** Mean-Variance Darstellung der Daten aus Abbildung a.

Tabelle 3.1: Häufigkeiten der für die RM-Probe beobachteten Leitwerte

Leitwert	Häufigkeit	Schaltfrequenz [Hz]	ρ_{200} beobachtet	ρ_{200} erwartet
Λ_1	113	1,88	$3,76 \cdot 10^{-4}$	-
Λ_2	74	1,23	$2,46 \cdot 10^{-4}$	-
Λ_3	2	0,03	$6,66 \cdot 10^{-6}$	$9,25 \cdot 10^{-8}$

Stromspuren des Sec61-Kanals beobachteten Stromniveaus auf ein kooperatives Schalten mehrerer Poren oder eine einzelne Pore mit variablen Leitwerten zurückzuführen. Ein Vorhandensein mehrerer unabhängig schaltender Kanäle kann für die untersuchten Proben ausgeschlossen werden.

3.1.3 Leitwerte

Der Leitwert ist, neben der Selektivität, das wichtigste Grundcharakteristikum eines Ionenleitenden Kanals. Für die Leitwertbestimmung werden die Stromdaten für Klemm-

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

spannungen von -55 mV bis +55 mV mit Ephys5 dargestellt und die durch Schaltereignisse verursachten Stromänderungen mit den angelegten Membranpotenzialen verrechnet (2.3.9). Die erhaltenen Werte werden in Klassen eingeteilt und gegen ihre Häufigkeit aufgetragen. Häufungen werden mit Gaußfunktionen angepasst und ermöglichen eine Einteilung in Haupt- und Unterleitwert. Die zugrundeliegenden Daten wurden unter symmetrischen Bedingungen in 250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 aufgenommen. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Eigenschaften des Sec61-Komplexes in Anwesenheit von Calcium untersucht werden sollten, wurden die Versuche zusätzlich in 184 mM CaCl₂, 10 mM Mops/Tris pH7 durchgeführt.

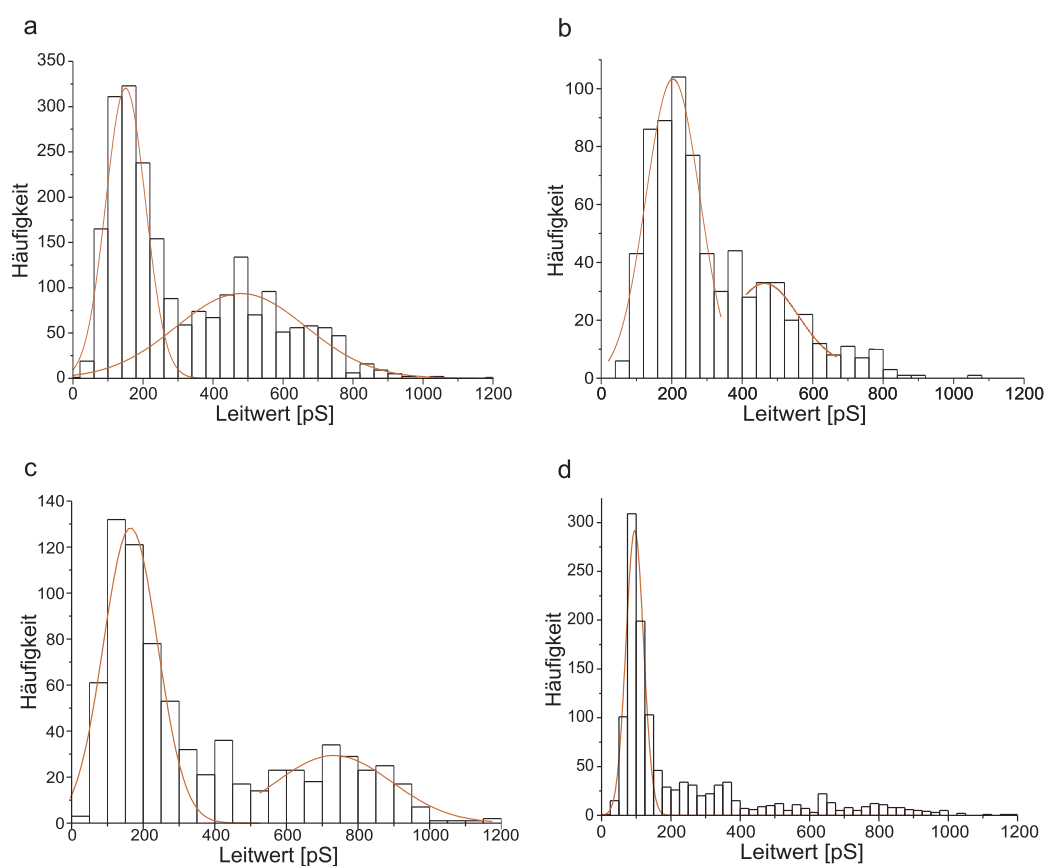


Abbildung 3.3: Leitwertverteilungen des Sec61-Kanals unter symmetrischen Elektrolytbedingungen

a: Häufigkeitshistogramm der Leitwerte der RM-Probe unter Verwendung von KCl-Elektrolyten (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7). **b:** Histogramm des aufgereinigten Sec61-Komplexes unter Bedingungen wie in a. **c:** Leitwerte der rauen Mikrosomen in CaCl₂-Puffer (184 mM CaCl₂, 10 mM Mops/Tris pH 7). **d:** Leitwerte des aufgereinigten Sec61-Komplexes für Bedingungen wie in c.

Die Leitwerte des Sec61-Kanals sind hochvariabel und nehmen Werte zwischen 50 pS

3 Ergebnisse

und 1,6 nS an. Unter Verwendung von KCl-Lösungen dominieren sowohl für RM-Präparationen als auch für Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex zwei voneinander differenzierbare Leitwertklassen (Abbildung 3.3 a,b). Für raue Mikrosomen ergibt sich ein prominenter Hauptleitwert von $151 \text{ pS} \pm 2 \text{ pS}$ mit einem deutlich seltener auftretenden Unterleitwert von $480 \text{ pS} \pm 19 \text{ pS}$ aus 2203 ausgewerteten Schaltereignissen. Der Hauptleitwert des aufgereinigten Sec61-Komplexes liegt bei $206 \text{ pS} \pm 8 \text{ pS}$ mit einem Unterleitwert von $468 \text{ pS} \pm 18 \text{ pS}$ ($n=712$ Schaltereignisse). In Experimenten mit CaCl_2 -Elektrolyten zeigen die Leitwerte des Sec61-Kanals vergleichbare Variabilitäten (Abbildung 3.3 c,d). Der Hauptleitwert der RM-Probe kann mit $165 \text{ pS} \pm 10 \text{ pS}$ bestimmt werden, der Unterleitwert von $733 \text{ pS} \pm 16 \text{ pS}$ tritt im Vergleich zu den Ergebnissen mit KCl-Lösungen seltener auf ($n=738$ Schaltereignisse). Dieser Effekt lässt sich über eine Normierung der Gaußanpassungen erfassen. Danach liegen 48 % der auftretenden Schaltereignisse des Sec61-Kanals aus rauen Mikrosomen in 250 mM KCl im Bereich des Unterleitwertes, während in Experimenten mit 184 mM CaCl_2 33 % der Schaltereignisse dem Unterleitwert zuzuordnen sind. Für den aufgereinigten Sec61-Komplex liegt der Hauptleitwert bei $94 \text{ pS} \pm 2 \text{ pS}$. Ein Unterleitwert ist nicht zu bestimmen, da das Auftreten von Schaltereignissen mit Leitwerten über 190 pS kaum zu beobachten ist ($n=1216$).

3.1.4 Konzentrationsabhängigkeit der Leitwerte

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Leitwerte des Sec61-Komplexes aus rauen Mikrosomen zu untersuchen, wurden Haupt- und Unterleitwert für Lösungen mit zunehmenden KCl-Konzentrationen bestimmt (Tabelle 3.2). Die Ergebnisse werden gegen die Aktivitäten der Lösungen aufgetragen und der Werteverlauf nach Gleichung 3 angepasst (Abbildung 3.4). Es hat sich herausgestellt, dass bei KCl-Konzentrationen über 2 M sowie bei CaCl_2 -Konzentrationen über 500 mM keine Einzelschaltereignisse mehr aufgelöst werden konnten, da der Kanal instabil wurde. Die Konzentrationsabhängigkeit der Leitwerte kann entsprechend nur für KCl-Elektrolytlösungen mit Konzentrationen bis 2 M untersucht werden.

Die Leitwerte des Sec61-Komplexes zeigen unterschiedliche Abhängigkeiten von den Ionenkonzentrationen der verwendeten Elektrolytlösungen. Der Werteverlauf für den Hauptleitwert kann mit einer Sättigungsfunktion angepasst werden, auch wenn für die untersuchten Elektrolytlösungen noch keine vollständige Sättigung zu beobachten ist. Es ergibt sich ein Sättigungsleitwert G_{Max} von $720 \text{ pS} \pm 49 \text{ pS}$. Die Aktivität, bei der der halbmaximale Leitwert erreicht ist (K_M) beträgt $665 \text{ mM} \pm 91 \text{ mM}$.

Für die Wertepunkte des Unterleitwertes zeigt sich ein linearer Zusammenhang. G_{Max}

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

Tabelle 3.2: Konzentrationsabhängigkeit des Haupt- (Λ_1) und Unterleitwertes (Λ_2)

Konzentration KCl [mM]	Aktivität KCl [mM]	Λ_1 [pS]	Λ_2 [pS]	n
100	77	85 ± 4	297 ± 9	412
250	175	151 ± 2	480 ± 19	2203
500	324	219 ± 11	1049 ± 15	841
1000	604	357 ± 7	2210 ± 48	1520
2000	1146	452 ± 16	4492 ± 56	414

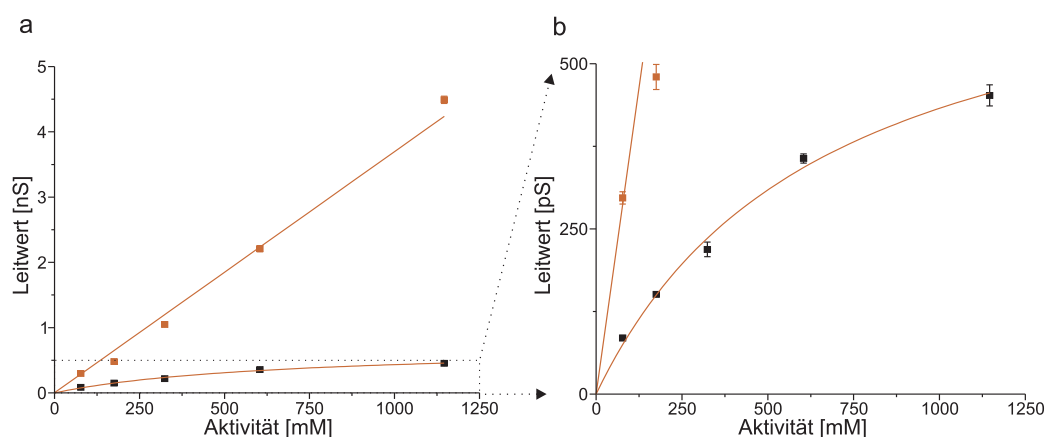


Abbildung 3.4: Leitwertsättigung des Sec61-Komplexes aus rauen Mikrosomen unter Verwendung von KCl-Lösungen

a: Sättigungsverlauf des Haupt- (schwarz) und Unterleitwertes (rot). **b:** Ausschnittsvergrößerung aus a.

und K_M lassen sich nicht ermitteln. Es ist anzunehmen, dass eine Sättigung hier erst bei wesentlich höheren Aktivitäten eintritt.

3.1.5 Umkehrpotenzial und Selektivität

Um das Umkehrpotenzial des Sec61-Kanals zu bestimmen wurden Messungen unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Stromwerte werden gegen die angelegten Klemmspannungen aufgetragen (2.3.13). Das Umkehrpotenzial ist als Schnittpunkt mit der x-Achse zu bestimmen. Anschließend kann das Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten für Anionen und Kationen über die Umformung der GHK-Spannungsgleichung (Gleichung 6) bestimmt werden.

Alle untersuchten Proben des Sec61-Komplexes zeigen eine Präferenz für die Permeation von Anionen. Die Bestimmung des Umkehrpotenziales aus den durch Einzelkanal-

3 Ergebnisse

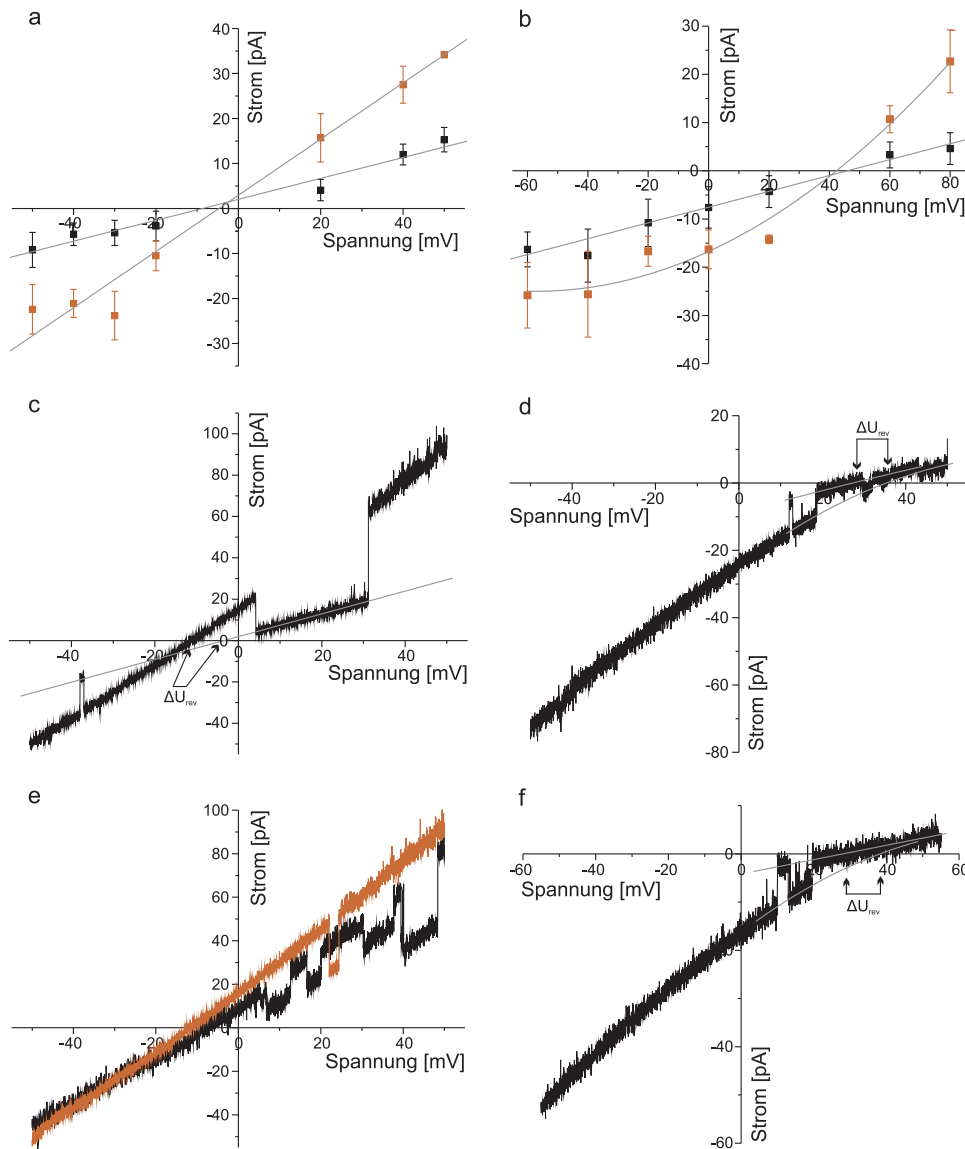


Abbildung 3.5: Strom-Spannungsdiagramme für Messungen mit rauen Mikrosomen unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen

a: Strom-Spannungskennlinie für Haupt- (schwarz) und Unterleitwert (rot) (250 mM KCl cis, 20 mM KCl trans, $n=1468$ Schaltereignisse). **b:** Strom-Spannungskennlinie für Haupt- und Unterleitwert (10,7 mM CaCl_2 cis, 184 mM CaCl_2 trans, $n=2073$ Schaltereignisse). **c:** Strom-Spannungsdiagramm aus Spannungsrampen eines Einzelkanals für Elektrolytbedingungen wie in a. **d:** Strom-Spannungsdiagramm eines Einzelkanals für Elektrolytbedingungen wie in b. **e:** Strom-Spannungsdiagramm eines Einzelkanals für Elektrolytbedingungen wie in a vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 90 mM CaCl_2 cis/trans. **f:** Strom-Spannungsdiagramm eines Einzelkanals (10,4 mM MgCl_2 cis, 176 mM MgCl_2 trans). Alle Puffer mit 10 mM Mops/Tris pH 7.

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

schalttereignisse verursachten Stromänderungen ergibt Mittelwerte von -8,7 mV für den Hauptleitwert und -4,7 mV für den Unterleitwert des Kanals aus RM-Präparationen in KCl-Lösungen (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis, 20 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 trans, Abbildung 3.5 a). Daraus ergeben sich Permeabilitätsverhältnisse von Chlorid- zu Kaliumionen von $P_{Cl^-}/P_{K^+} = 1,5$ und $P_{Cl^-}/P_{K^+} = 1,24$. Unter Verwendung von $CaCl_2$ -Puffern (10,7 mM $CaCl_2$, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis, 184 mM $CaCl_2$, 10 mM Mops/Tris pH 7 trans, Abbildung 3.5 b) liegen die Umkehrpotenziale nach Korrektur des *Liquid junction* Potentials (2.3.5; Barry und Lynch, 1991) bei 42,1 mV und 38,6 mV für Haupt- und Unterleitwert. Diese Werte entsprechen Permeabilitätsverhältnissen von $P_{Cl^-}/P_{Ca^{2+}} = 12,4$ und $P_{Cl^-}/P_{Ca^{2+}} = 10,0$.

Wird das Umkehrpotential über Spannungsrampen aus den absoluten Strömen bestimmt, so kann ebenfalls eine Abhängigkeit der Werte vom Offenstand des Kanals beobachtet werden (Abbildung 3.5 c,d,f), die für alle untersuchten Präparationen des Sec61-Komplexes charakteristisch ist. Dieses Ergebnis ist mit einer früheren elektrophysiologischen Untersuchung am Translokon konsistent (Erdmann, 2004). Die mittleren Umkehrpotenziale und entsprechenden Permeabilitätsverhältnisse für raue Mikrosomen und den aufgereinigten Sec61-Komplex sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Umkehrpotenziale und Selektivitäten der verschiedenen Proben des Sec61-Komplexes

Auswertung der Daten aus Strom-Spannungsrampen. n = Anzahl vermessener Bilayer.

Probe	Elektrolytbedingungen	U_{rev} [mV]*	P_A/P_K	n
RM	250 mM KCl zu 20 mM KCl	$-8,5 \pm 7,8$	1,5	10
Sec61-Komplex	250 mM KCl zu 20 mM KCl	$-10,7 \pm 10,1$	1,6	5
RM	184 mM $CaCl_2$ zu 10,7 mM $CaCl_2$	$-32,1 \pm 9,3$	6,8	8
Sec61-Komplex	184 mM $CaCl_2$ zu 10,7 mM $CaCl_2$	$-36,4 \pm 5$	8,7	5
RM	176 mM $MgCl_2$ zu 10,4 mM $MgCl_2$	$-31,4 \pm 5,8$	6,5	5

Eine Ermittlung des Umkehrpotentials nach dieser Methode hat im Fall des Sec61-Kanals den Nachteil, dass die Leckleitfähigkeiten der Pore (3.1.2) mit in die erhaltenen Werte einfließen. Umkehrpotenziale und Permeabilitätsverhältnisse sind im Vergleich zur Auswertung aus Einzelkanalschalttereignissen reduziert.

Der Kanal des Translokons zeigt in allen untersuchten Proben unter asymmetrischen $CaCl_2$ - und $MgCl_2$ -Elektrolytbedingungen eine deutlich erhöhte Anionenselektivität im Vergleich zu Experimenten mit asymmetrischen KCl-Lösungen. Es sollte untersucht werden, ob die im Vergleich geringere Kationenpermeation auf die bivalenten Ionen be-

*nach Korrektur des *Liquid junction* Potentials bei Verwendung von $CaCl_2$ - und $MgCl_2$ -Elektrolyten

3 Ergebnisse

grenzt ist, oder ob Kaliumionen den Kanal in Anwesenheit von Ca^{2+} ebenfalls schlechter durchqueren können. Dazu wurden Spannungsrampen unter asymmetrischen KCl-Bedingungen aufgenommen und CaCl_2 in zunehmenden Konzentrationen symmetrisch zugegeben. Bis zu einer Konzentration von 90 mM CaCl_2 in den cis- und transseitigen Messkammern kann keine nennenswerte Veränderung der Permeabilitätsverhältnisse für K^+ - und Cl^- -Ionen beobachtet werden (Abbildung 3.5 e). Die Permeabilität des Kanals für Kaliumionen wird durch die Anwesenheit von Ca^{2+} in der Porenregion auch bei hohen Konzentrationen des bivalenten Ions nicht maßgeblich herabgesetzt.

3.1.6 Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit

Um die Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Komplexes zu untersuchen wurden Stromspuren unter symmetrischen Pufferbedingungen aufgenommen. Klemmspannungen wurden dabei für eine Minute angelegt. Aus den erhaltenen Daten werden die Offenwahrscheinlichkeiten nach 2.3.15 ausgewertet und die arithmetischen Mittelwerte für mehrere Bilayer gegen die zugehörigen Klemmspannungen aufgetragen.

Alle untersuchten Proben des Sec61-Komplexes zeigen eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit mit zunehmendem Membranpotenzial (Abbildung 3.6). Für den Kanal aus RM-Proben liegt die maximale Offenwahrscheinlichkeit bei Spannungen um 0 mV bei ca. 90 % (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7). Der Werteverlauf nimmt für steigende positive und negative Haltepotenziale symmetrisch bis auf 40-55 % bei Spannungen von -50 mV und +50 mV ab (Abbildung 3.6 a). Versuche mit dem aufgereinigten Sec61-Komplex zeigen ein vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt). In Experimenten mit CaCl_2 -Elektrolyten (184 mM CaCl_2 , 10 mM Mops/Tris pH 7) ist für raue Mikrosomen eine Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit zu beobachten. Der Maximalwert von 60 % nimmt symmetrisch bis auf 30-40 % ab (Abbildung 3.6 b). Des Weiteren ist die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit unter Verwendung von CaCl_2 -Lösungen deutlich reduziert. In Experimenten mit dem aufgereinigten Sec61-Komplex kann weder die Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit, noch die verminderte Spannungsabhängigkeit festgestellt werden (Abbildung 3.6 c).

Um zu untersuchen, ob die Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals aus RM-Proben spezifisch auf Ca^{2+} -Ionen zurückzuführen ist oder auch von anderen zweiwertigen Kationen hervorgerufen wird, wurde das Experiment mit MgCl_2 -Elektrolytlösungen wiederholt (176 mM MgCl_2 , 10 mM Mops/Tris pH 7). Die Datenauswertung zeigt keine Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit im Vergleich zu den Experimenten mit KCl-Puffer (Abbildung 3.6 d).

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

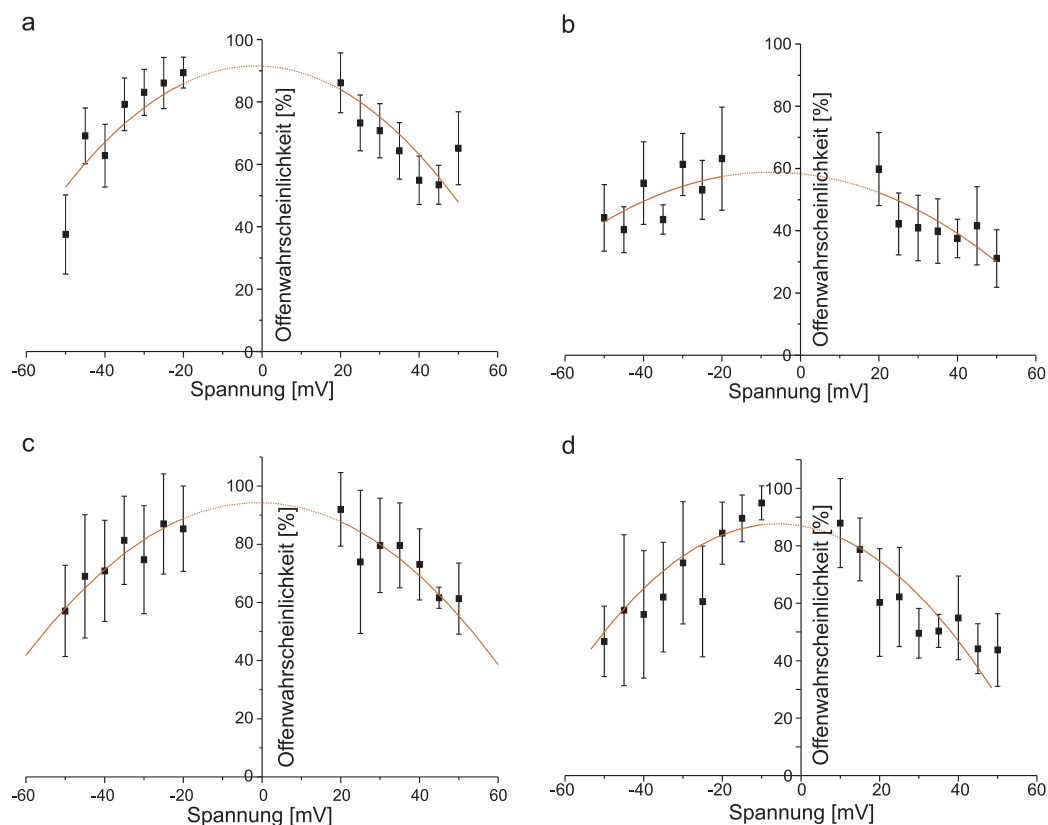


Abbildung 3.6: Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Komplexes
a: Offenwahrscheinlichkeit der RM-Probe unter symmetrischen KCl-Bedingungen (250 mM KCl, n=8 Bilayer). **b:** Offenwahrscheinlichkeit der RM-Probe unter symmetrischen CaCl₂-Bedingungen (184 mM CaCl₂, n=8 Bilayer). **c:** Offenwahrscheinlichkeit des aufgereinigten Sec61-Komplexes unter Bedingungen wie in b, n=5 Bilayer. **d:** Offenwahrscheinlichkeit der rauen Mikrosomen unter Verwendung von symmetrischen MgCl₂-Elektrolyten (176 mM MgCl₂, n=6 Bilayer). Alle Elektrolytlösungen mit 10 mM Mops/Tris pH 7.

3.1.7 Biionische Messungen

Um die beobachteten Charakteristika des Sec61-Kanals in Bezug auf Leitwertverteilung und Offenwahrscheinlichkeit unter Verwendung von CaCl₂- und KCl-Elektrolyten zu verifizieren wurden biionische Messungen durchgeführt (2.3.12). Dazu wurden die Messkammern mit KCl- und CaCl₂-Lösungen gleicher Aktivität befüllt (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis und 184 mM CaCl₂, 10 mM Mops/Tris pH 7 trans oder umgekehrt) und Stromableitungen über einen Zeitraum von einer Minute bei unterschiedlichen Klemmspannungen aufgenommen. Leitwerte und Offenwahrscheinlichkeiten werden wie beschrieben ausgewertet und dargestellt (2.3.9, 2.3.15).

Abbildung 3.7 a zeigt eine repräsentative Stromspur des Sec61-Kanals aus RM Prä-

3 Ergebnisse

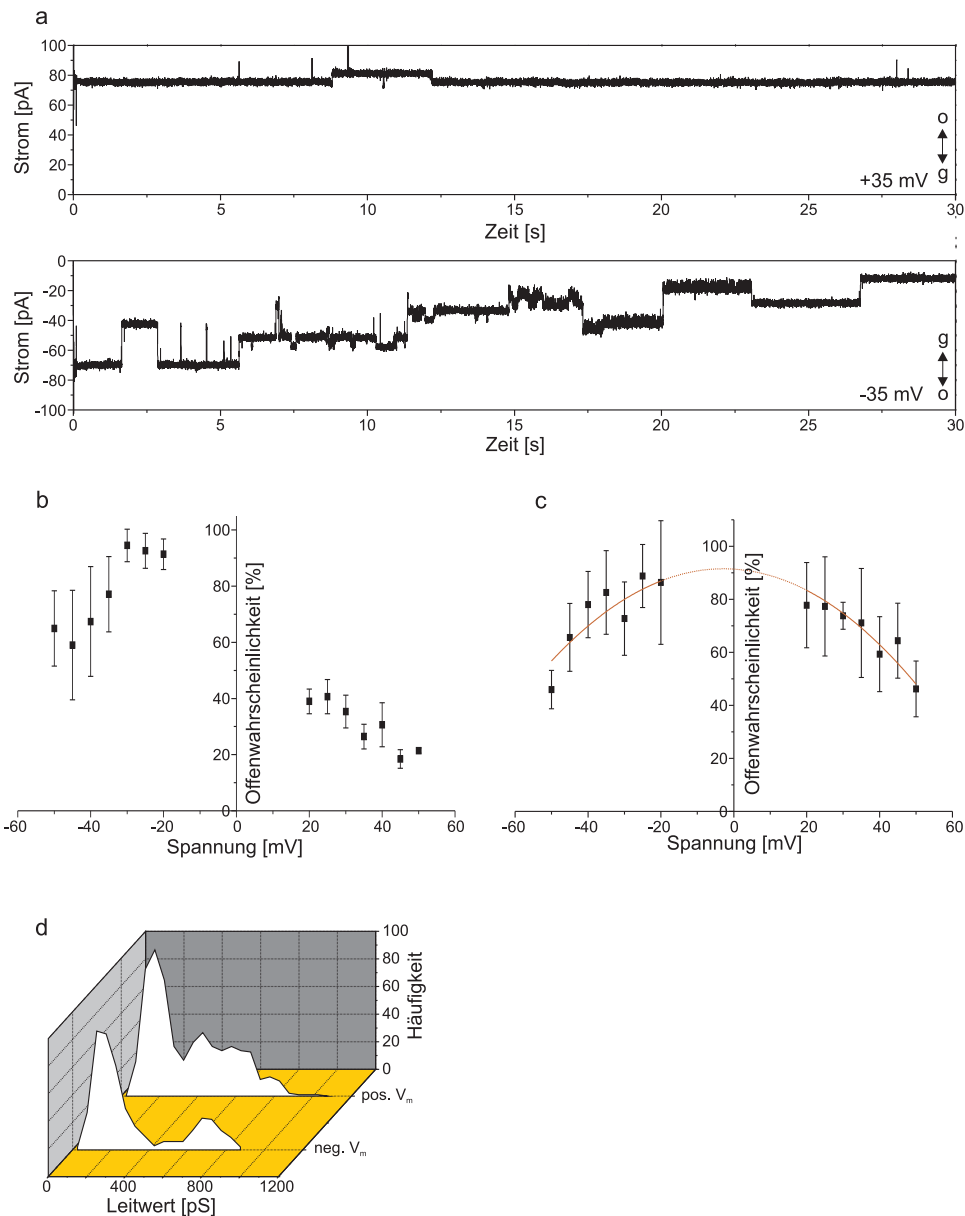


Abbildung 3.7: Eigenschaften des Sec61-Kanals unter biionischen Bedingungen
a: Stromspur eines RM-Kanals (184 mM CaCl_2 cis, 250 mM KCl trans). **b:** Offenwahrscheinlichkeit der RM-Probe (250 mM KCl cis, 184 mM CaCl_2 trans, $n=6$ Bilayer). **c:** Offenwahrscheinlichkeit des aufgereinigten Sec61-Komplexes für Elektrolytbedingungen wie in b ($n=5$ Bilayer). **d:** Leitwertverteilung der RM-Probe für positive (pos V_m) und negative (neg V_m) Klemmspannungen ($n=1088$ Schaltereignisse). Elektrolytbedingungen wie in a. Alle Puffer mit 10 mM Mops/Tris pH 7.

parationen unter biionischen Elektrolytbedingungen. Bei einem Membranpotenzial von -35 mV (Ca^{2+} trägt positive Ladung im verwendeten Versuchsaufbau) ist ein sukzessives Schließen des Kanals mit zunehmender Wirkdauer der angelegten Spannung zu beob-

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

achten, bei einem Potenzial von +35 mV (K^+ trägt positive Ladung) verweilt der Kanal in einer fast vollständig geöffnet Konformation.

Eine Darstellung der Daten als Offenwahrscheinlichkeit bestätigt diese Beobachtung (Abbildung 3.7 b). Bei positiven Haltepotenzialen (Ca^{2+} trägt positive Ladung) ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich der RM-Kanal in einem offenen Zustand befindet im Vergleich zu den entsprechenden negativen Klemmspannungen (K^+ trägt positive Ladung) deutlich verringert. In Kontrollexperimenten mit umgekehrter Elektrolytbefüllung der Messkammern ist ein spiegelbildlicher Verlauf der Offenwahrscheinlichkeit mit niedrigeren Werten bei negativen Spannungen zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigt die Offenwahrscheinlichkeit des aufgereinigten Sec61-Komplexes unter biionischen Bedingungen keine Abhängigkeit von der Membranpolarisation, sondern einen symmetrischen Verlauf für positive (Ca^{2+} trägt positive Ladung) und negative (K^+ trägt positive Ladung) Haltepotenziale (Abbildung 3.7 c).

In Abbildung 3.7 d werden die Leitwerte des Kanals aus RM-Proben unter biionischen Bedingungen als Häufigkeitshistogramm für positive und negative Membranpotenziale getrennt voneinander dargestellt. Es zeigen sich ähnliche Verteilungen wie unter symmetrischen KCl- und $CaCl_2$ -Elektrolytbedingungen (Abbildung 3.3 a,c). Der Hauptleitwert bei positiven Haltepotenzialen (K^+ trägt positive Ladung) beträgt $168 \text{ pS} \pm 3 \text{ pS}$, der Unterleitwert liegt bei $487 \text{ pS} \pm 21 \text{ pS}$. Bei negativen Klemmspannungen (Ca^{2+} trägt positive Ladung) ergibt sich ein Hauptleitwert von $169 \text{ pS} \pm 5 \text{ pS}$ und ein in seinem Auftreten deutlich reduzierter Unterleitwert von $699 \text{ pS} \pm 23 \text{ pS}$ ($n=1088$ Schaltereignisse).

Zusammenfassend bestätigen die Experimente unter biionischen Bedingungen die Ergebnisse der Versuche mit symmetrischen KCl- und $CaCl_2$ -Elektrolytlösungen in Bezug auf Leitwertverteilungen (3.1.3) und Offenwahrscheinlichkeiten (3.1.6).

3.1.8 Interaktion mit Lanthan- und Aluminiumionen

Lanthanionen sind als hochaffine Effektoren von Calciumkanälen bekannt und blockieren deren Ionenpermeation mit hoher Effizienz (Hille, 2001, Seite 123). Dabei interagieren sie mit Ca^{2+} -Bindestellen in der Porenregion, wodurch Ca^{2+} -Ionen sowohl sterisch als auch elektrostatisch in ihrer Permeation behindert werden (Lansman, 1990). Es sollte untersucht werden, wie sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Sec61-Kanals nach Zugabe von $LaCl_3$, auch im Vergleich zu Messungen mit $CaCl_2$ -Elektrolytlösungen, verändern.

Abbildung 3.8 zeigt die entsprechenden Ergebnisse in Bezug auf Leitwerte und Umkehrpotenziale. Für den Sec61-Kanal aus rauen Mikrosomen können in Anwesenheit von

3 Ergebnisse

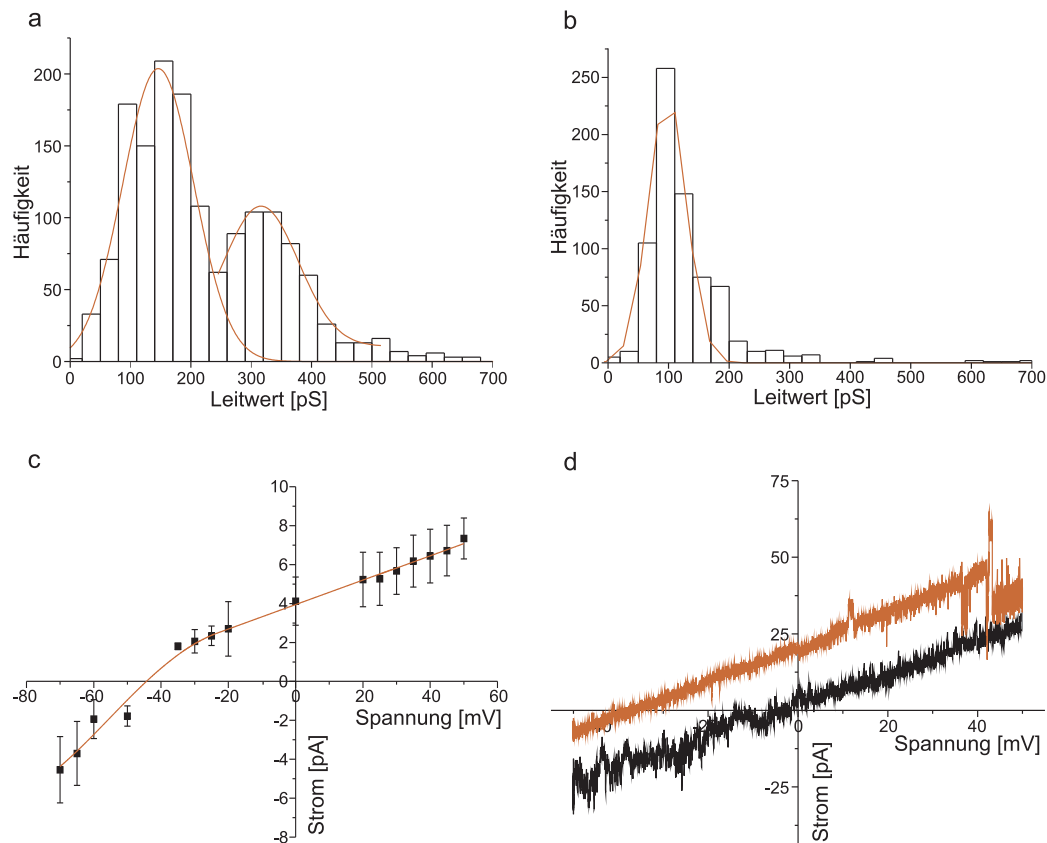


Abbildung 3.8: Leitwerte und Umkehrpotenziale des Translokonkanals in Anwesenheit von Lanthanionen

a: Leitwertverteilung des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen nach Zugabe von LaCl_3 unter symmetrischen Bedingungen (250 mM KCl, 1 mM LaCl_3 , 10 mM Mops/Tris pH 7). **b:** Leitwerthistogramm des aufgereinigten Sec61-Komplexes für experimentelle Bedingungen wie in a. **c:** Umkehrpotenzial aus Einzelschalttereignissen des großen Leitwertes der RM-Probe unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen (250 mM KCl, 1 mM LaCl_3 10 mM Mops/Tris pH 7 cis, 20 mM KCl, 1 mM LaCl_3 10 mM Mops/Tris pH 7 trans, $n=1381$ Schaltereignisse). **d:** Strom-Spannungsrampe des aufgereinigten Sec61-Komplexes unter KCl-Bedingungen wie in c in Abwesenheit (schwarz) und nach Zugabe (rot) von 1 mM LaCl_3 cis und trans.

1 mM LaCl_3 beidseitig der Membran (250 mM KCl, 1 mM LaCl_3 10 mM Mops/Tris pH 7) zwei differenzierte Leitwertklassen im Häufigkeitshistogramm mit Gaußfunktionen angepasst werden (Abbildung 3.8 a). Dabei ergibt sich für den Hauptleitwert ein Mittelwert von $146 \text{ pS} \pm 3 \text{ pS}$. Der Unterleitwert liegt bei $316 \text{ pS} \pm 2 \text{ pS}$ ($n=1526$ Einzelereignisse). Der aufgereinigte Sec61-Komplex zeigt nach Zugabe von 1 mM LaCl_3 eine dem Ergebnis der Experimente mit CaCl_2 -Elektrolyten sehr ähnliche Häufigkeitsverteilung der Schaltereignisse. Hier beträgt der Hauptleitwert $103 \text{ pS} \pm 2 \text{ pS}$ ($n=767$).

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

Konformationsveränderungen des Kanals mit Leitwerten von über 200 pS treten kaum auf (vergl. Abbildung 3.3 d).

Das Umkehrpotenzial steigt in Anwesenheit von Lanthanionen in millimolarer Konzentration deutlich an. Eine Auswertung über die Stromänderungen aus asymmetrischen Stromspuren (250 mM KCl, 1 mM LaCl₃, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis, 20 mM KCl, 1 mM LaCl₃, 10 mM Mops/Tris pH 7 trans) ergibt einen Wert von -44,3 mV. Dieser entspricht gemäß der GHK-Spannungsgleichung einem Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten von P_{Cl^-}/P_{K^+} von 10,4. Wird das Umkehrpotenzial für den aufgereinigten Sec61-Komplex mit Hilfe von Strom-Spannungsrampen bestimmt, so ergibt sich ein Mittelwert von $-41,2 \text{ mV} \pm 3,3 \text{ mV}$ ($P_{Cl^-}/P_{K^+} = 8,3$, $n=6$ Bilayer).

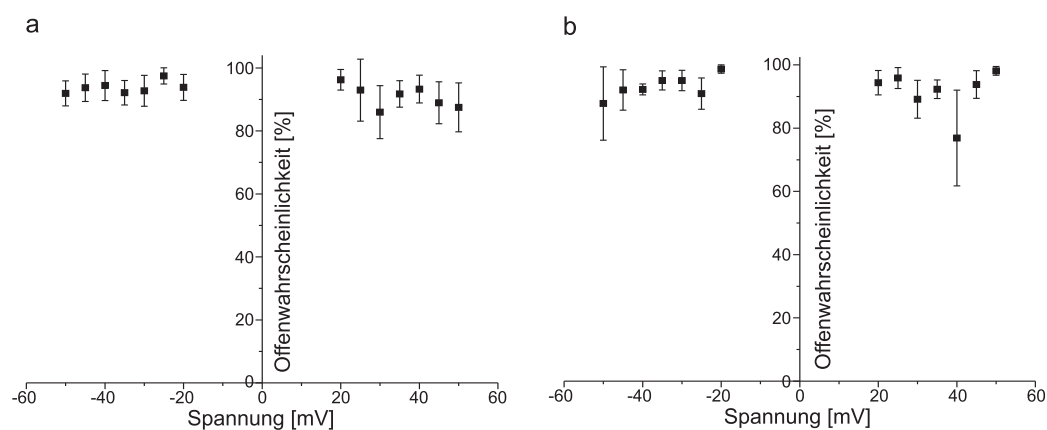


Abbildung 3.9: Offenwahrscheinlichkeit des Translokonkanals in Anwesenheit von LaCl₃ und AlCl₃

a: Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen in Anwesenheit von LaCl₃ unter symmetrischen Bedingungen (250 mM KCl, 1 mM LaCl₃, 10 mM Mops/Tris pH 7, $n=5$ Bilayer). **b:** Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Kanals der RM-Probe nach Zugabe von 1 mM AlCl₃ (250 mM KCl, 1 mM AlCl₃, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis und trans, $n=5$ Bilayer).

Die Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Kanals ändert sich sowohl für das vollständige Translokon als auch für den aufgereinigten Sec61-Komplex unter dem Einfluss von LaCl₃ dahingehend, dass kein spannungsabhängiges Schließen bei höheren Klemmspannungen beobachtet werden kann (Abbildung 3.9 a). Entsprechend verweilt der Kanal nach Schalt ereignissen nur kurz auf einem konstanten Stromniveau, bevor er wieder die vollständig geöffnete Konformation annimmt. Ausschließlich cis- oder transseitig zupipetiertes LaCl₃ führt elektrophoretisch für das entsprechende Spannungsvorzeichen zum Verlust des *voltage gatings*. Anschließende Zugabe zur anderen Messkammer weitet den Effekt bei Messungen mit einem einzelnen Sec61-Kanal auf beide Spannungsvorzeichen

3 Ergebnisse

aus. Der Lanthan-Effekt ist somit nicht seitenspezifisch.

Um die Spezifität der Lanthan-Effekte auf das Umkehrpotenzial sowie das spannungsabhängige Schaltverhalten zu untersuchen, wurden die Experimente mit identischen Konzentrationen an AlCl_3 wiederholt. Die beobachteten Kanaleigenschaften in Bezug auf Umkehrpotenzial (Daten nicht gezeigt) und Offenwahrscheinlichkeit (Abbildung 3.9 b) sind nicht von den Ergebnissen mit LaCl_3 unterscheidbar.

3.1.9 Abschätzung der Porengröße aus den Leitwerten

Die unter 3.1.3 bestimmten Leitwerte des Sec61-Kanals aus Messungen mit rauen Mikrosomen in KCl-Elektrolyten werden zur Abschätzung des Porendurchmessers nach Hille (2001) herangezogen. Dabei werden sowohl der Hauptleitwert von 151 pS als auch der Unterleitwert von 480 pS sowie der maximal gemessene Leitwert von 1,577 nS berücksichtigt. Dieser wird als Übergang vom maximal geschlossenen zum maximal geöffneten Zustand des Kanals betrachtet. Leckleitfähigkeiten werden aufgrund ihrer hohen Variabilität nicht berücksichtigt. Die Berechnung erfolgt nach Gleichung 8. Der spezifische Widerstand der verwendeten KCl-Lösung (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7) wurde mit Hilfe eines Konduktometers mit $31,7 \Omega \cdot \text{cm}$ bestimmt und nach Smart et al. (1997) um einen Faktor von 5 auf $158,5 \Omega \cdot \text{cm}$ korrigiert (2.3.14). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Porendurchmesser des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen nach Hille (2001) für Haupt- (Λ_1) und Unterleitwert (Λ_2) sowie Maximalleitwert (Λ_{\max})

Länge der Verengungszone [\AA]	\varnothing [\AA]		
	Leitwert		
	Λ_1	Λ_2	Λ_{\max}
5	5,3	11,8	30,3
10	6,8	14,3	34,4
20	9,1	18,3	40,7
30	10,8	21,3	45,9
40	12,3	23,9	50,4
50	13,6	26,2	54,4

Da die Struktur des Sec61-Kanals nicht bekannt ist, werden für die Restriktionszone Längen von 5 \AA für einen sehr kurzen Bereich bis zu 50 \AA bei vollständiger Durchspannung der Membran angenommen. Legt man die Kristallstruktur des Sec61-homologen SecY-Komplexes aus *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg et al., 2004) zugrunde, dessen postulierte Restriktionszone von einem einzelnen Isoleucin-Ring gebildet wird,

so kann man anhand der Leitwerte von einer Veränderung des Porendurchmessers von 5-7 Å für den Hauptleitwert und von 12-14 Å für den Unterleitwert ausgehen. Der maximale Porendurchmesser liegt im Bereich von 30-34 Å.

3.1.10 Regulation des Sec61-Komplexes durch Calmodulin

3.1.10.1 Biochemische Ergebnisse

Es ist bekannt, dass das cytosolische Protein Calmodulin (CaM) viele Ionenkanäle Calciumabhängig reguliert (siehe 1.4). Um zu untersuchen ob CaM mit dem Sec61-Komplex interagiert wurden Coflotationsexperimente durchgeführt. 50 µl Proteoliposomen mit aufgereinigtem, rekonstituierten Sec61-Komplex wurden in An- und Abwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen mit 800 ng Rhodamin-6G-gelabeltem Calmodulin (CaM-R6G) inkubiert und über einen diskontinuierlichen Nycodenzgradienten flotiert (2.2.1). In Kontrollexperimenten wurden die für die Rekonstitution des gereinigten Sec61-Komplexes verwendeten, Protein-freien L- α -PC Liposomen sowie Proteoliposomen mit der aufgereinigten Proteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran Tom40 aus *S. cerevisiae* und dem aufgereinigten Sec61-homologen SecYEG-Komplex aus der Plasmamembran von *E. coli* auf Interaktionen mit CaM untersucht. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

Da Proteoliposomen eine geringere Dichte als lösliche oder denaturierte Proteine besitzen, wandern sie im Gradienten in entsprechende Fraktionen und es kommt zu einer Auftrennung der Probe. Findet eine Bindung der löslichen Proteine an die rekonstituierten Membranproteine statt, so kann eine Colokalisation im Gradienten beobachtet werden, während freie lösliche Proteine in den dichten Fraktionen des Gradienten verbleiben.

Calmodulin flotiert in Anwesenheit von freiem Calcium mit den Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex aus den hohen Nycodenzdichten in die Fraktionen mit niedrigen Dichten (Abbildung 3.10 a). Wird Ca^{2+} im verwendeten KCl-Puffer (100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7) mit 10 mM EGTA zu einer Konzentration von ca. 40 pM chelatiert (Portzehl et al., 1964, <http://www.entropy.brneurosci.org/egta.html>), so kann ebenfalls eine Colokalisation des Calmodulins mit Sec61 α im Gradienten beobachtet werden (Abbildung 3.10 b). Dabei befinden sich in Anwesenheit von Ca^{2+} 74 % des eingesetzten Calmodulins und 98 % des eingesetzten Sec61 α in den Nycodenzdichten 2 %, 5 % und 10 %, in Abwesenheit von Calcium lokalisieren 58 % des CaM und 94 % des Sec61 α in diesen Fraktionen.

In Kontrollexperimenten kann weder eine Coflotation von CaM mit Proteoliposomen mit aufgereinigtem, rekonstituierten Tom40, noch mit aufgereinigtem, rekonstituierten

3 Ergebnisse

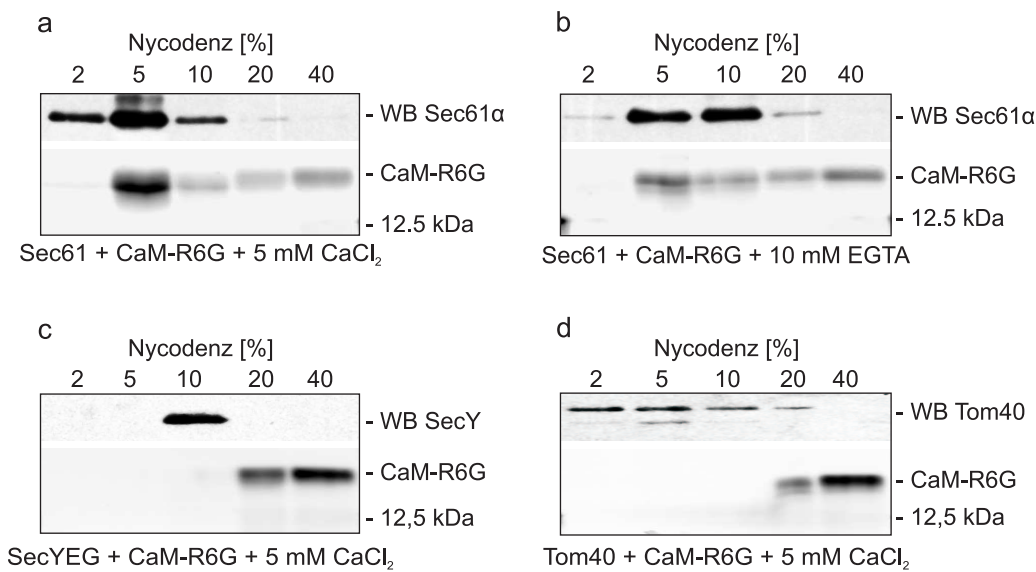


Abbildung 3.10: Ergebnisse der Coflotationsexperimente mit Calmodulin

a: Flotation mit aufgereinigtem Sec61-Komplex in Anwesenheit von freiem Calcium.

b: Flotation mit aufgereinigtem Sec61-Komplex, freies Ca²⁺ mit EGTA komplexiert.

c: Kontrollexperiment mit aufgereinigtem SecYEG-Komplex aus *E. coli*.

d: Kontrollexperiment mit aufgereinigtem Tom40 aus *S. cerevisiae*.

WB = Westernblot.

SecYEG-Komplex (Abbildung 3.10 c,d) oder mit Protein-freien Liposomen (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden. Das lösliche Protein verbleibt in den Gradientenfraktionen mit hoher Dichte.

3.1.10.2 Elektrophysiologische Ergebnisse

Es sollte untersucht werden, ob und wie Calmodulin die elektrophysiologischen Charakteristika des Sec61-Kanals beeinflusst. Dazu werden Messergebnisse vor und nach Zugabe von Calmodulin miteinander verglichen.

Abbildung 3.11 a zeigt die typische Stromableitung eines Sec61-Einzelkanals aus RM-Präparationen in Anwesenheit von freiem Calcium unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (100 mM KCl, 13 mM CaCl₂, 10 mM Mops/Tris pH 7) vor und nach Zugabe von 500 nM Calmodulin beidseitig des Bilayers. Nach CaM-Zugabe nehmen die Einzelkanalströme deutlich ab, es ist ein fast vollständiges Schließen des Kanals zu beobachten (Abbildung 3.11 b). Besonders zu erwähnen ist, dass der für alle Proben des Translokons charakteristische Leckstrom in Anwesenheit von CaM nicht mehr auftritt. Das Schaltverhalten ist durch kurze *dwelltimes* gekennzeichnet, die auftretenden Schaltereignisse zeigen fast ausschließlich Leitwerte von unter 200 pS und können bei einer Sampling-

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

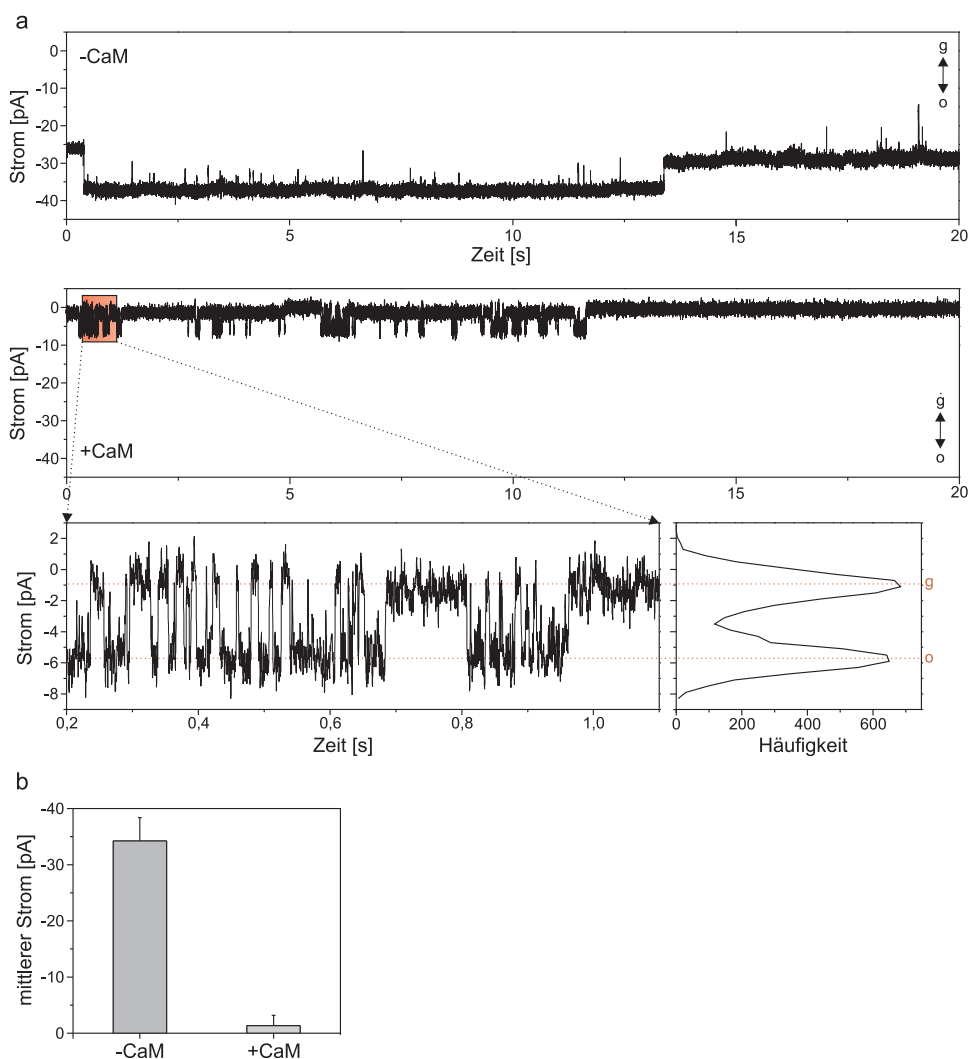


Abbildung 3.11: Schaltverhalten des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen in Anwesenheit von Calmodulin

a: Stromspur eines einzelnen Sec61-Kanals vor und nach Zugabe von 500 nM Calmodulin cis und trans unter symmetrischen Pufferbedingungen (100 mM KCl, 13 mM CaCl_2 , 10 mM Mops/Tris pH 7) bei einer Klemmspannung von -30 mV. **b:** Vergleich der mittleren Ströme der Stromspuren aus a vor und nach CaM-Zugabe.

frequenz von 5 kHz noch gut voneinander differenziert werden. Wird das freie Calcium mit Hilfe von EGTA zu einer Endkonzentration von ca. 40 pM gebunden, so kann in Stromspuren nach Zugabe von Calmodulin keine Veränderung des Schaltverhaltens beobachtet werden.

Diese Ergebnisse bestätigen sich nach Auswertung der Leitwerte (Abbildung 3.12 a,b). In Anwesenheit von CaM und Ca^{2+} beträgt der Hauptleitwert des Sec61-Kanals aus rauhen Mikrosomen $129 \text{ pS} \pm 8 \text{ pS}$, der Unterleitwert liegt bei $395 \text{ pS} \pm 7 \text{ pS}$ (100 mM

3 Ergebnisse

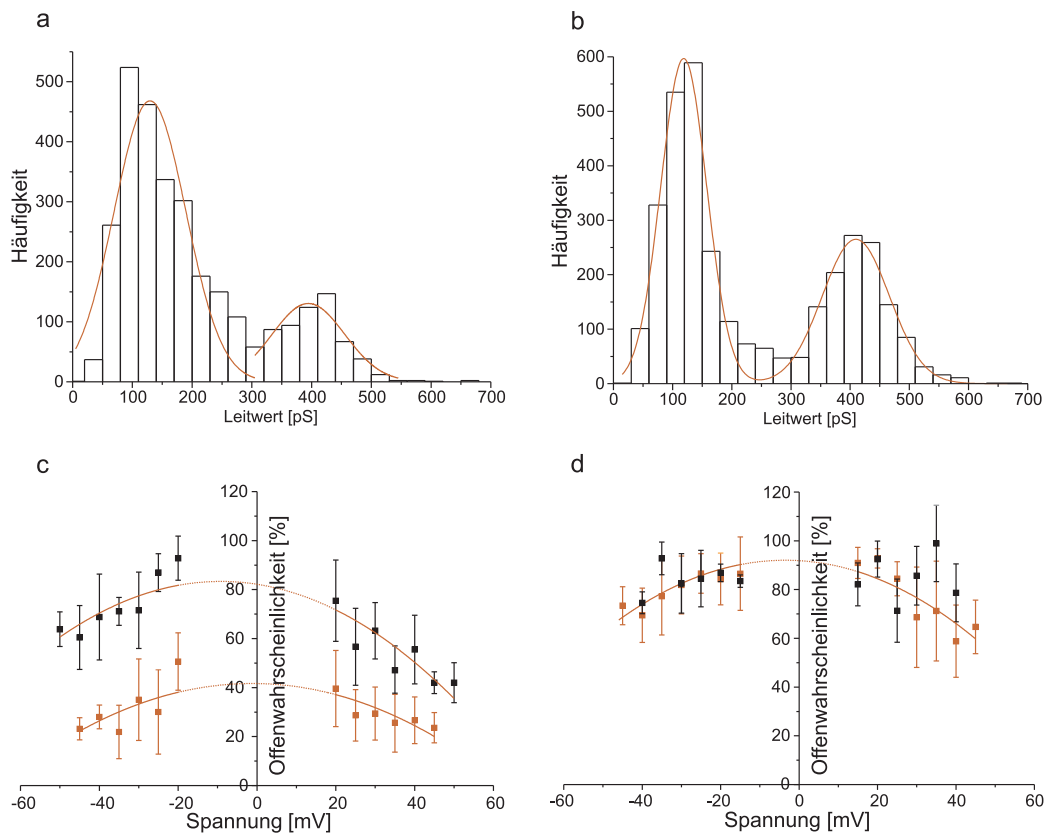


Abbildung 3.12: Leitwerte und Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen in Anwesenheit von Calmodulin

a: Leitwertverteilung der RM-Probe in Anwesenheit von 500 nM CaM und 13 mM Ca^{2+} cis und trans (100 mM KCl, 13 mM CaCl_2 , 10 mM Mops/Tris pH 7). **b:** Leitwerthistogramm der RM-Probe unter Elektrolytbedingungen wie in a, ohne CaM-Zugabe. **c:** Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 500 nM Calmodulin cis und trans unter experimentellen Bedingungen wie in a. **d:** Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 500 nM Calmodulin cis und trans. Freies Ca^{2+} wurde mit EGTA chelatiert (100 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis und trans).

KCl, 13 mM CaCl_2 , 500 nM CaM, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis und trans, $n=2994$ Einzelschalttereignisse). Aus Experimenten unter identischen Elektrolytbedingungen in Abwesenheit von CaM ergeben sich aus den Gaußanpassungen Werte von $119 \text{ pS} \pm 2 \text{ pS}$ für den Haupt- und $410 \text{ pS} \pm 4 \text{ pS}$ für den Unterleitwert ($n=3312$ Schalttereignisse). Eine signifikante Veränderung der Leitwerte nach CaM-Zugabe ist damit nicht festzustellen. Über eine Normierung der Gaußanpassungen kann abgeschätzt werden, mit welchem Verhältnis auftretende Schalttereignisse dem Haupt- oder Unterleitwert zuzuordnen sind. Unter Einfluss von Calmodulin liegen 81 % der beobachteten Schalttereignisse des Kanals

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

im Bereich des Haupt- und 19 % im Bereich des Unterleitwertes. Aus den Kontrollexperimenten ergibt sich ein Verhältnis von 57 % zu 43 %. Der Anteil von Konformationsänderungen des Kanals die große Stromänderungen hervorrufen ist somit durch die Interaktion mit CaM deutlich herabgesetzt.

Das beobachtete Schließen des Kanals nach CaM-Zugabe in Anwesenheit von Ca^{2+} kann über die spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeiten (Abbildung 3.12 c,d) differenzierter untersucht werden. Dabei werden die Offenwahrscheinlichkeitswerte nach Zugabe von CaM immer im Bezug auf eine vorangegangene Messung am gleichen Kanal ohne den Effektor berechnet (2.3.15). Die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ist nach symmetrischer Zugabe von 500 nM CaM in Anwesenheit von Ca^{2+} in der verwendeten Elektrolytlösung für alle untersuchten Klemmspannungen deutlich reduziert (Abbildung 3.12 c, Mittelwerte aus 6 unabhängigen Messungen). Die Datenauswertung von Experimenten bei denen das freie Calcium mit EGTA gebunden wurde zeigt nach Zugabe von Calmodulin in gleicher Konzentration keine Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit (Abbildung 3.12 d, Mittelwerte aus 9 Messungen). Der Effekt von Calmodulin auf den Offenzustand des Sec61-Kanals ist damit strikt abhängig von der Anwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen.

Um die Konzentrationsabhängigkeit und Seitenspezifität des Calmodulin-Effektes zu untersuchen, wurden Strom-Spannungsrampen unter symmetrischen Elektrolytbedingungen aufgenommen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

Das durch Calmodulin induzierte Schließen des Kanals in Anwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen tritt ab einer Konzentration von 150 nM - 200 nM nach Zugabe in nur eine der beiden Messkammern auf (Abbildung 3.13 a, b). Dabei ist ein Block der Pore nach Bindung des Calmodulins von einem elektrophoretischen Effekt zu unterscheiden. Nach Zugabe von CaM auf die bindende Seite des Kanals ist das Schließen unabhängig vom Vorzeichen des angelegten Membranpotenziales. Calmodulin wirkt sowohl wenn es aufgrund seiner Ladung elektrophoretisch an den Kanal geführt wird als auch wenn es bei umgekehrtem Spannungsvorzeichen vom Kanal entfernt werden müsste. Ein entsprechendes Öffnen des Kanals ist jedoch auch bei hohen Membranpotenzialen und in ausschließlicher Anwesenheit von CaM auf der bindenden Seite nicht zu beobachten (Abbildung 3.13 a). Auftretende Schaltereignisse in den entsprechenden Spannungsrampen können in Übereinstimmung mit Stromspuren aus Experimenten in denen CaM auf beiden Seiten des Bilayers zupipettiert wurde, fast ausnahmslos dem kleinen Leitwert zugeordnet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Calmodulin stabil und mit hoher Affinität mit der bindenden Seite des Sec61-Kanals interagiert. Demgegenüber ist der nach einer Zugabe des Calmodulins auf die nicht-bindende Seite des Kanals zu beobachtende Effekt abhängig von der Richtung des elektrischen Feldes. Hier wirkt Calmodulin nur, wenn es

3 Ergebnisse

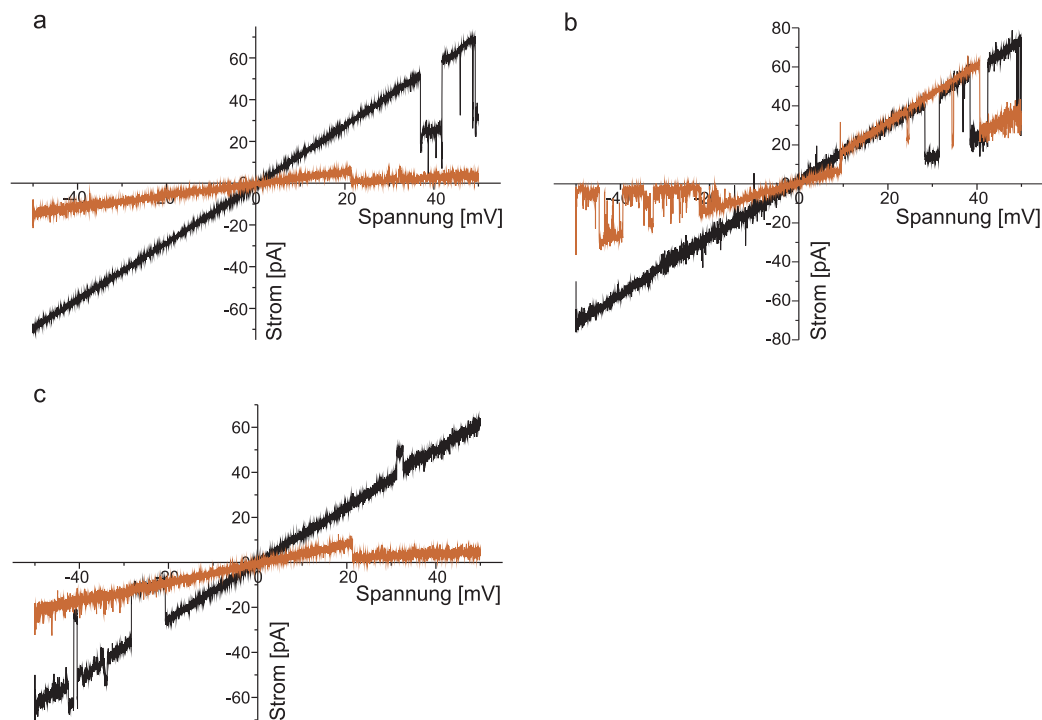


Abbildung 3.13: Strom-Spannungsrampen des Sec61-Kanals in Anwesenheit von Calmodulin

a: Strom-Spannungsrampen eines Sec61-Kanals der RM-Probe vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 200 nM Calmodulin in die trans-Kammer (184 mM CaCl_2 , 10 mM Mops/Tris pH 7). **b:** Strom-Spannungsrampen eines Sec61-Kanals der RM-Probe vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 200 nM CaM in die trans-Kammer. Elektrolytbedingungen wie in a. **c:** Strom-Spannungsrampen des aufgereinigten Sec61-Komplexes vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 500 nM Calmodulin cis und trans für Elektrolytbedingungen wie in a.

aufgrund seiner Ladung elektrophoretisch an den Kanal geführt wird. Bei umgekehrten Spannungsvorzeichen kann keine Veränderung des detektierten Stromes im Vergleich zu Kontrollmessungen ohne den Effektor beobachtet werden. Schaltereignisse mit Stromänderungen im Bereich des großen Leitwertes treten häufig auf (Abbildung 3.13 b). Der Ausgangsstrom konnte auch durch mehrfaches Perfundieren der Messkammern mit 100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 nicht wieder hergestellt werden. Eine Zugabe von EGTA oder eine Perfusion mit 100 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM Mops/Tris pH 7 nach vorheriger Anwesenheit von Calcium in den Messkammern führte zu einem Reißen des Bilayers.

Da die bindende Seite der Pore nicht konsistent der Cis- oder Transkammer zugeordnet werden kann, muss von einer nicht-unidirektionalen Integration der Sec61-Kanäle in

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

den planaren Bilayer ausgegangen werden. Der Effekt ist nach vorheriger Zugabe auf der nicht-bindenden Seite erst nach Zupipettieren in das andere Messkompartiment für beide Spannungsvorzeichen nachweisbar. Eine Seitenspezifität für die Bindung von Calmodulin an den Sec61-Komplex kann somit postuliert werden.

Um die Bindungsstelle am Translokon einzugrenzen wurde der Versuch mit dem aufgereinigten Sec61-Komplex wiederholt (Abbildung 3.13 c). Die Ergebnisse sind nicht von denen aus Experimenten mit rauen Mikrosomen zu unterscheiden. Die Bindestelle für CaM ist damit auf der α -, β - oder γ -Untereinheit des Sec61 lokalisiert.

Kontrollexperimente mit Strom-Spannungsrampen bestätigen, dass eine symmetrische Zugabe von Calmodulin in Abwesenheit von freiem Calcium keinen Einfluss auf den Offenzustand des Sec61-Kanals hat (Abbildung 3.14 a). Wird in Anwesenheit von CaM und EGTA allerdings CaCl_2 in einer Konzentration zugegeben, die die Bindekapazität des EGTA für Ca^{2+} -Ionen übersteigt, so kommt es zu einem Schließen des Kanals (Abbildung 3.14 b). Dieses verifiziert nochmals die strikte Abhängigkeit des Calmodulin-Effektes von der Anwesenheit freier Calciumionen.

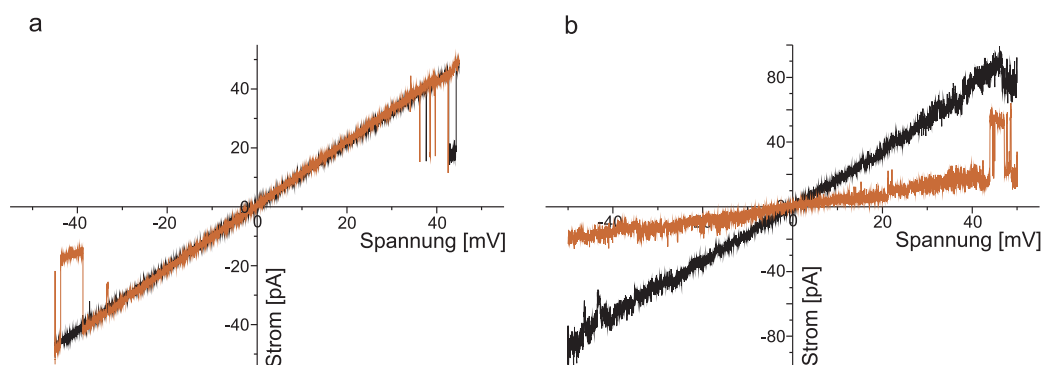


Abbildung 3.14: Strom-Spannungsrampen des Sec61-Kanals in Anwesenheit von Calmodulin

a: Strom-Spannungsrampen eines RM-Kanals vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 500 nM CaM cis und trans in 100 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM Mops/Tris pH 7.
b: Strom-Spannungsrampen des RM-Kanals in 100 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM Mops/Tris pH 7, 500 nM CaM cis und trans vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 26 mM CaCl_2 cis und trans.

Insgesamt kam es bei 51 % der im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen Strom-Spannungsrampen mit RM-Präparationen unter symmetrischen Elektrolytbedingungen in Anwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen nach Zugabe von CaM zu einem deutlichen Rückgang des detektierten Stromes. Für weitere 30 % der Ergebnisse konnte ein fast vollständiger Block der Pore für Ionen (siehe Abbildung 3.13 a) festgestellt werden.

3 Ergebnisse

Eine Veränderung des Umkehrpotenziales des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen oder im aufgereinigten Sec61-Komplex konnte bei Messungen unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen (100 mM KCl, 13 mM CaCl₂, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis, 10 mM KCl, 13 mM CaCl₂, 10 mM Mops/Tris pH7 trans) nach Zugabe von 500 nM CaM in beide Messkammern nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Selektivität der Pore wird somit nicht von CaM beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Calmodulin nach Bindung von Ca²⁺-Ionen an seine EF-Hand Motive den Sec61-Kanal seitenspezifisch reguliert und dabei die Permeation von Ionen durch die Pore maßgeblich herabgesetzt wird. Dieses ist für CaM-Konzentrationen ab 150-200 nM zu beobachten. Des Weiteren kann die Bindestelle des Calmodulins auf den aufgereinigten Sec61-Komplex eingegrenzt werden. Calcium-freies ApoCalmodulin verändert die Charakteristika des Kanals nicht, es liegt also eine strikte Calcium-Abhängigkeit vor.

3.1.10.3 Putative Calmodulin-Bindestellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Interaktion von Calmodulin mit dem aufgereinigten Sec61-Komplex gezeigt werden. Außerdem haben elektrophysiologische Experimente ergeben, dass die Regulation der Kanalaktivität ebenfalls am Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Komplex vermittelt wird. Um putative Bindestellen im Protein mit Hilfe computergestützter Methoden zu identifizieren und zu lokalisieren, wurden die Aminosäuresequenzen der Sec61 α -, β - und γ -Untereinheiten mit der Calmodulin-Datenbank (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca>, Yap et al., 2000) und dem Eukaryotic Linear Motif Server (www.elm.eu.org, Puntervoll et al., 2003) abgeglichen. Dabei wurde die Abfolge der Aminosäuren sowohl nach homologen Bereichen zu anderen Calmodulin-bindenden Proteinen, als auch im Hinblick auf ihre chemischen Eigenschaften untersucht.

Mit Hilfe der Calmodulin-Datenbank können zwei putative Calmodulin-Bindestellen auf der α -Untereinheit und eine weitere auf der γ -Untereinheit des Sec61 lokalisiert werden. Mit den Algorithmen des ELM-Servers wird hingegen nur eine Bindestelle auf der α -Untereinheit vorhergesagt. Um die Lage der möglichen Bindestellen im Protein zu veranschaulichen, werden die zu den entsprechenden Sequenzabschnitten der Sec61 α - oder γ -Untereinheit homologen Bereiche in der Kristallstruktur des SecYE β -Komplexes aus *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg et al., 2004, supplementary data) farblich markiert (Abbildung 3.15 a).

Dabei stimmt die Lage der putativen Bindestellen α_1 und α_2 in der Kristallstruktur des SecYE β -Komplexes ebenfalls mit der Positionierung im Topologiemodell des Sec61p aus *S. cerevisiae* (Wilkinson et al., 1996) überein. Der als α_1 bezeichnete Sequenzabschnitt liegt am N-Terminus der Sec61 α -Untereinheit und ist damit zum Cytosol expo-

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

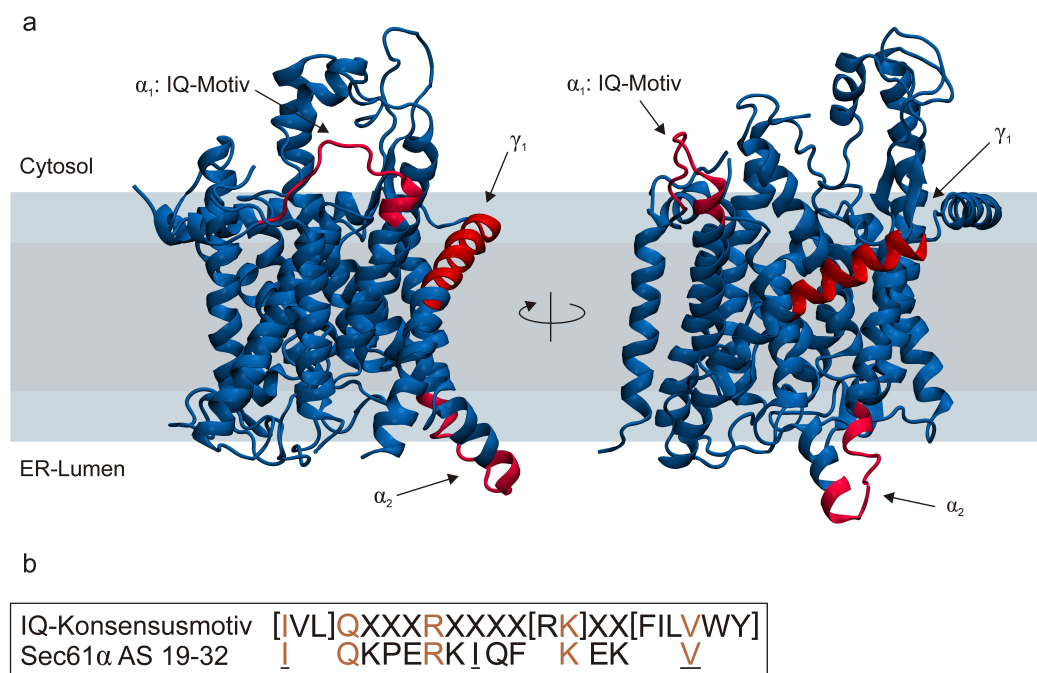


Abbildung 3.15: Putative Calmodulin-Bindestellen im Sec61-Komplex

a: Die Kristallstruktur des SecYE β -Komplexes aus *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg et al., 2004, Proteindatenbank Datei 1RHZ.pdb) wurde mit dem Programm VMD (Humphrey et al., 1996) dargestellt und mit dem Programm Povray (www.povray.org) gerendert. Homologe Bereiche zu den putativen Calmodulin-Bindestellen im Sec61-Komplex sind rot eingefärbt. **b:** Das IQ-Konsensusmotiv für MyosinV nach Rhoads und Friedberg (1997) im Vergleich zur entsprechenden Aminosäuresequenz der Sec61 α -Untereinheit. Konservierte Aminosäuren sind rot eingefärbt. Aminosäuren die eine Zuordnung zum 1-8-14-Motiv (Rhoads und Friedberg, 1997) ermöglichen sind unterstrichen.

niert. Er wurde mit den verwendeten Suchalgorithmen übereinstimmend als Isoleucin-Glutamin-Motiv (IQ-Motiv) identifiziert. Nach der Aminosäureabfolge lässt er sich dem IQ-Konsensusmotiv von MyosinV, Neurograngin, Neuromodulin und weiterer Proteine sowie auch dem 1-8-14-Motiv zuordnen (Rhoads und Friedberg, 1997, Abbildung 3.15 b). Die Bindestelle α_2 ist zum ER-Lumen exponiert und liegt im Loopbereich zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6. Da Calmodulin im Cytosol und Nukleus der Zelle lokalisiert ist, kann eine physiologisch relevante Bindung an diese Stelle ausgeschlossen werden. Die Bindestelle γ_1 ist in der Membranebene lokalisiert und weder luminal noch cytosolseitig oder zur wassergefüllten Pore exponiert. Eine physiologische Interaktion mit diesem Motiv ist ebenfalls auszuschließen.

3.1.10.4 Bindungsstudien mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Mit Hilfe computergestützter Methoden wurde ein putatives Calmodulin-Bindemotiv im cytosolischen N-Terminus der Sec61 α -Untereinheit identifiziert, das sowohl der Konsensussequenz des MyosinV IQ-Motives als auch der des 1-8-14-Motives zuzuordnen ist. Um zu untersuchen, ob dieser Sequenzabschnitt eine Bindung von Calmodulin an Sec61 α vermitteln kann, wurde das Peptid synthetisiert, dabei mit einem terminalen Cystein versehen (Sequenz: ${}_{-16}$ LPEIQKPERKIQFKEKVLWTAITLFI ${}_{41}$ -C) und dieses mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Atto488) markiert (2.2.7). Die Reinigung des gelabelten Peptides (IQ ${}_{488}$) geschah mittels HPLC und Massenspektrometrie (2.2.8). Über eine Normierung der Peaks im Massenspektrum lässt sich der Anteil an gelabeltem Peptid abschätzen (Daten nicht gezeigt). Demnach lagen in der Stammlösung 50,5 % des Peptides als Atto488-Konjugat vor.

Die Bindung von Calmodulin an das IQ ${}_{488}$ -Peptid wurde über Veränderungen in dessen Mobilität verfolgt. Dazu wurden die translatorischen Diffusionszeiten des Peptides durch das konfokale Volumen eines Laser-Scanning-Spektrometers mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bestimmt (2.3.17). Die Konzentration des IQ ${}_{488}$ -Peptides in den Probenansätzen lag für alle durchgeführten Versuche bei 5 nM (\approx 5 Moleküle im Fokusbereich).

Abbildung 3.16 a zeigt die Autokorrelationsfunktionen des IQ ${}_{488}$ -Peptides vor und nach Zugabe von 11 μ M CaM oder 7,4 μ M GST-CaM in Anwesenheit von 4 mM CaCl ${}_2$. Die Diffusionszeit des freien IQ ${}_{488}$ -Peptides in Lösung liegt bei $147 \mu\text{s} \pm 5 \mu\text{s}$. Dieser Wert erhöht sich nach Zugabe von CaM auf $214 \mu\text{s} \pm 7 \mu\text{s}$, was eine Komplexierung beider Moleküle nahelegt. Nach Zugabe von 7,4 μ M GST-CaM kann aufgrund der zusätzlichen Masse des GST im IQ ${}_{488}$ -GST-CaM-Komplex eine weitere Zunahme auf $359 \mu\text{s} \pm 7 \mu\text{s}$ beobachtet werden. Höhere Konzentrationen von CaM bzw. GST-CaM haben keinen weiteren Anstieg der Diffusionszeiten zur Folge. Der IQ ${}_{488}$ -CaM- bzw. IQ ${}_{488}$ -GST-CaM-Komplex liegt somit in Anwesenheit von 11 μ M CaM bzw. 7,4 μ M GST-CaM im gesättigten Zustand vor. Die Differenzen zwischen den Anpassungen und den Autokorrelationsfunktionen (in Abbildung 3.16 a als Residuen aufgetragen) zeigen, dass sich die experimentellen Daten gut durch ein Modell für eine monomolekulare Lösung beschreiben lassen.

In Abbildung 3.16 b sind die Autokorrelationsfunktionen für das IQ ${}_{488}$ -Peptid in Anwesenheit von 4 mM CaCl ${}_2$ mit ansteigenden Konzentrationen an GST-CaM dargestellt. Ab einer GST-CaM-Konzentration von 33 nM in der Probenlösung kann eine schrittweise Abnahme der Mobilität des IQ ${}_{488}$ beobachtet werden. Die einzelnen Autokorrelationsfunktionen lassen dabei sich gut voneinander diskriminieren.

Um die Dissoziationskonstanten für den IQ ${}_{488}$ -CaM- und den IQ ${}_{488}$ -GST-CaM-Kom-

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

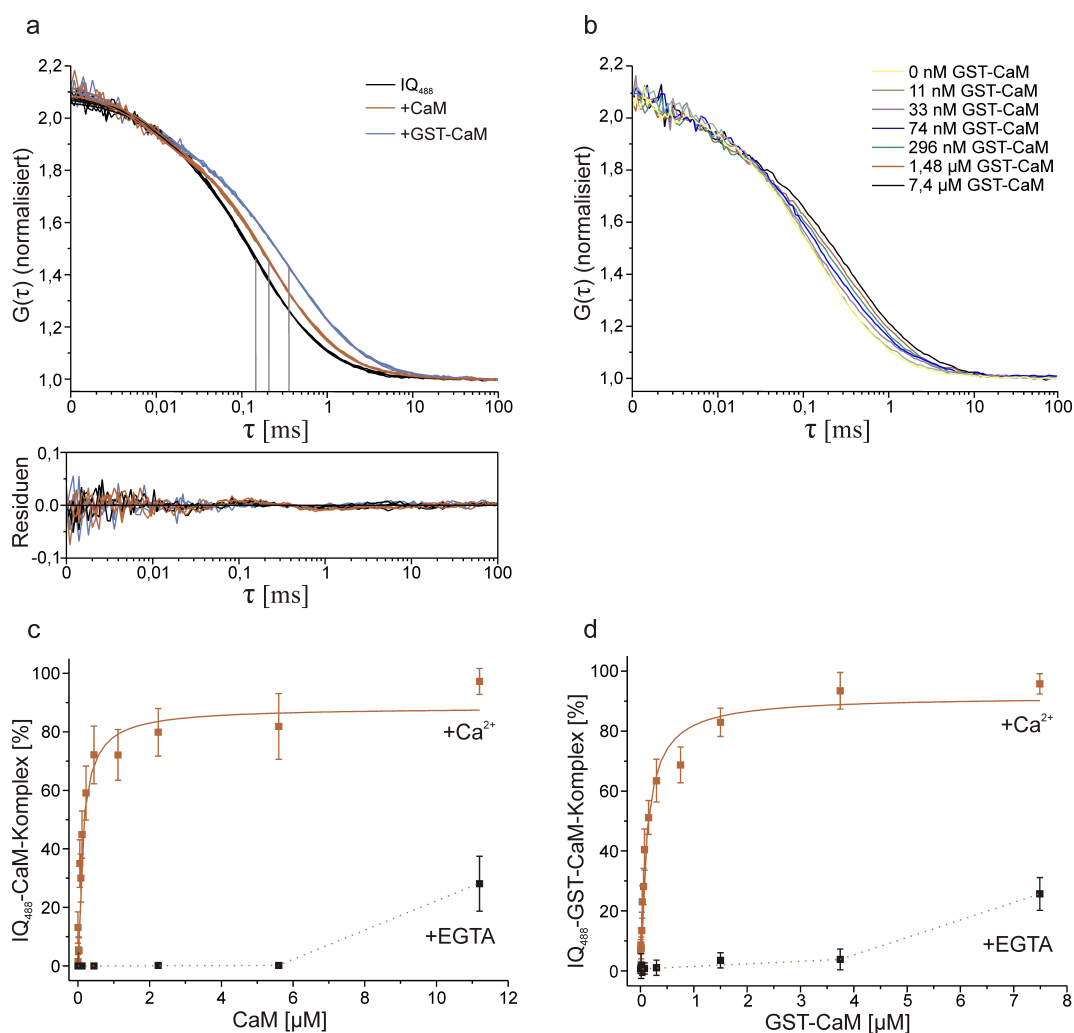


Abbildung 3.16: Bindung von Calmodulin an das Sec61 α -IQ-Peptid

a: Autokorrelationsfunktionen und zugehörige Ein-Komponenten-Fits für das IQ₄₈₈-Peptid in Anwesenheit von 4 mM CaCl₂ und nach Zugabe von 11 μ M CaM oder 7,4 μ M GST-CaM. Die Residuen (unterer Graph) geben die Differenzen der Daten zu den Anpassungen an. **b:** Autokorrelationsfunktionen für das IQ₄₈₈-Peptid in Anwesenheit von 4 mM CaCl₂ mit steigenden Konzentrationen an GST-CaM. **c:** Bildung des IQ₄₈₈-CaM-Komplexes in Anwesenheit von 4 mM CaCl₂ oder 10 mM EGTA. **d:** Bildung des IQ₄₈₈-GST-CaM-Komplexes in Anwesenheit von 4 mM CaCl₂ oder 10 mM EGTA. Alle Messungen wurden in 100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7, 0,005 % Triton X-100 durchgeführt. Die Konzentration des IQ₄₈₈-Peptides lag für alle Experimente bei 5 nM.

plex zu bestimmen, werden die Autokorrelationsfunktionen für das IQ₄₈₈-Peptid in Anwesenheit zunehmender Konzentrationen an CaM bzw. GST-CaM mit einem Zwei-Komponenten-Modell (Gleichung 12) angepasst. Der prozentuale Anteil an komplexiertem IQ₄₈₈-Peptid wird gegen die zugehörigen Konzentrationen an CaM bzw. GST-CaM aufgetragen und der Werteverlauf mit einem Ein-Bindestellen-Modell gefittet (Glei-

3 Ergebnisse

chung 13).

Für die Bindung von Calmodulin an das Sec61 α -IQ-Motiv ergibt sich in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen eine K_D von 130 nM \pm 27 nM (Abbildung 3.16 c). Die Anpassung der Werte ergibt eine maximale Sättigung des IQ₄₈₈ mit CaM von 88 % \pm 4 %. Wird freies Calcium in der Probenlösung mit Hilfe von 10 mM EGTA chelatiert, so kann erst ab einer CaM-Konzentration von 11 μ M eine Interaktion mit dem IQ₄₈₈-Peptid beobachtet werden.

Für die Assoziation von GST-CaM mit dem IQ₄₈₈-Peptid ergibt sich in Anwesenheit von Ca²⁺ eine K_D von 119 nM \pm 15 nM aus dem Werteverlauf (Abbildung 3.16 d). Die maximale Sättigung des IQ₄₈₈ mit GST-CaM liegt bei 92 % \pm 3 %. In Abwesenheit freier Calciumionen interagiert auch GST-CaM erst in höheren Konzentrationen mit dem IQ-Motiv.

Zusammenfassend zeigt CaM bzw. GST-CaM eine Calcium-abhängige Bindung mit hoher Affinität an das Sec61 α -IQ-Motiv. Dieses Ergebnis ist mit den Beobachtungen aus elektrophysiologischen Experimenten am aufgereinigten Sec61-Komplex konsistent.

3.1.11 Veränderungen durch Ribosomen

Cytosolische Ribosomen mit naszierenden Polypeptidketten werden *in vivo* zu Beginn der cotranslationalen Translokation SRP-vermittelt an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums geführt und binden dort an das Translokon (1.2.2). Es sollte untersucht werden, ob und wie Ribosomen die elektrophysiologischen Eigenschaften des Sec61-Kanals verändern.

Abbildung 3.17 a zeigt eine typische Stromspur des Sec61-Kanals der PKRM-Probe in Anwesenheit von 15 nM Ribosomen beidseitig der Membran unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (100 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Mops/Tris pH 7). Das Schaltverhalten ist durch schnelle Übergänge gekennzeichnet, auftretende Schaltereignisse entsprechen größtenteils Leitwerten von 280-350 pS und können damit dem großen Leitwert des Kanals zugeordnet werden. Schaltereignisse im Bereich des kleinen Leitwertes sind nach Ribosomenzugabe kaum zu beobachten. Diese Charakteristik im Schaltverhalten des Sec61-Kanals zeigt sich bereits ab einer Ribosomenkonzentration von 7,5 nM in den Messkammern. Eine Erhöhung der Effektorkonzentration bis auf 221 nM hat keine weitere Veränderung zur Folge.

Um die Leitwerte des Kanals zu erfassen, werden unter symmetrischen Bedingungen und in An- und Abwesenheit von Ribosomen aufgenommene Stromspuren nach 2.3.9 ausgewertet und die Ergebnisse in Form von Leitwerthistogrammen dargestellt (Abbildung 3.18).

3.1 Charakterisierung des Sec61-Komplexes aus *Canis familiaris*

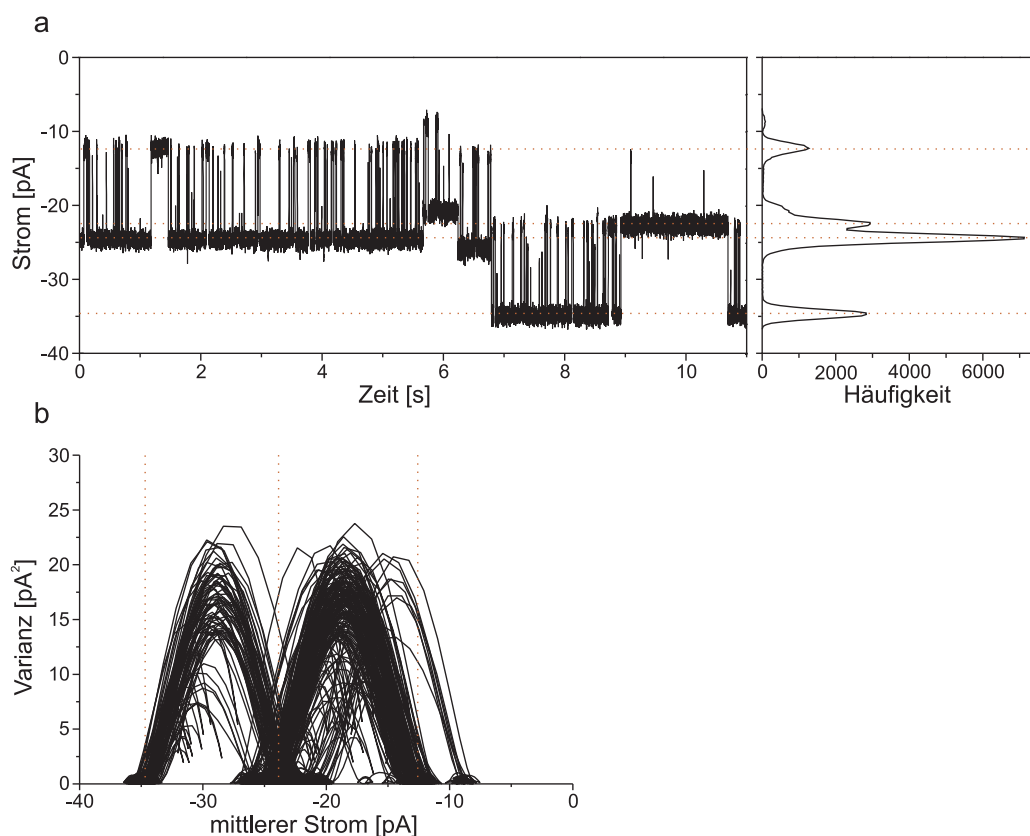


Abbildung 3.17: Schaltverhalten des Sec61-Kanals aus PKRM-Präparationen in Anwesenheit von Ribosomen

a: Stromspur des Sec61-Kanals unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (100 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Mops/Tris pH 7) nach Zugabe von 15 nM Ribosomen bei einer Klemmspannung von -35 mV. **b:** Mean-Variance Plot der Stromdaten aus a.

Beide Häufigkeitsverteilungen zeigen die für den Translokonkanal typische Einteilung in zwei Leitwertklassen (vergl. Abbildung 3.3 a). Werden die Wertehäufungen mit Gaußfunktionen angepasst, so ergibt sich ein kleiner Leitwert von $99 \text{ pS} \pm 4 \text{ pS}$ und ein großer Leitwert von $287 \text{ pS} \pm 3 \text{ pS}$ für die PKRM-Probe nach Zugabe von 15 nM Ribosomen ($n=3351$ Einzelschaltereignisse). In Abwesenheit von Ribosomen beträgt der kleine Leitwert $112 \pm 3 \text{ pS}$, während der große Leitwert mit $275 \pm 13 \text{ pS}$ zu bestimmen ist ($n=2497$ Schaltereignisse).

Es fällt auf, dass sich die Häufigkeit des Auftretens von Stromänderungen die dem großen Leitwert entsprechen nach Zugabe von Ribosomen deutlich erhöht. Dieser Effekt kann über eine Normierung der Gaußanpassungen erfasst werden. Danach sind in Abwesenheit von Ribosomen 53 % der auftretenden Schaltereignisse dem kleinen und 47 % der auftretenden Schaltereignisse dem großen Leitwert zuzuordnen. Nach Zugabe von

3 Ergebnisse

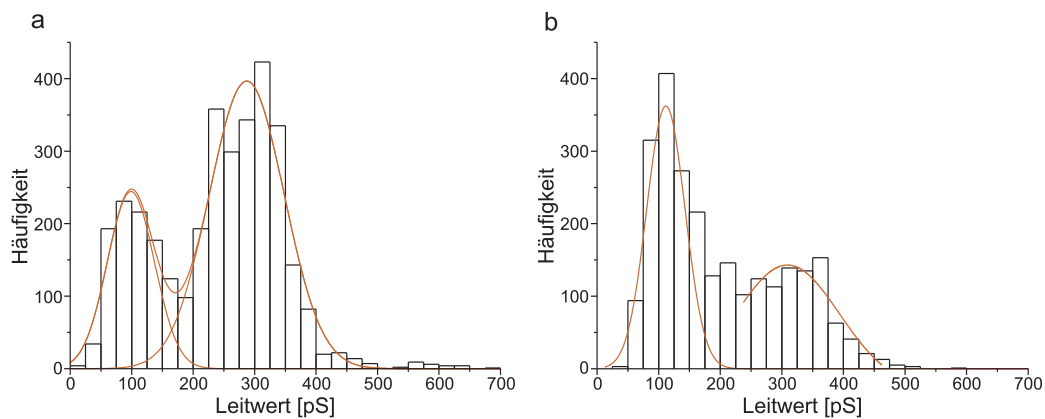


Abbildung 3.18: Leitwerte des Sec61-Komplexes in Anwesenheit von Ribosomen
a: Leitwertverteilung des Sec61-Kanals aus PKRM-Präparationen unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (100 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Mops/Tris pH 7) in Anwesenheit von 15 nM Ribosomen cis und trans. **b:** Leitwertverteilung des Sec61-Kanals aus PKRM-Präparationen unter Elektrolytbedingungen wie in a. Keine Ribosomenzugabe.

15 nM Ribosomen beidseitig des Bilayers liegen 28 % der Stromänderungen im Wertebereich des kleinen Leitwertes und 72 % der errechneten Leitwerte im Bereich des großen Leitwertes. Das Auftreten des großen Leitwertes ist in Anwesenheit von Ribosomen deutlich begünstigt.

Eine Veränderung der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit oder des Umkehrpotenziales und damit der Selektivität des Sec61-Kanals aus PKRM-Präparationen nach Ribosomenzugabe konnte in entsprechenden Experimenten nicht beobachtet werden.

Der Sec61-Komplex zeigt ohne Ribosomen-Zugabe eine hohe Variabilität der auftretenden Schaltfrequenzen. Für schnelle Kinetiken liegen die Verweildauern in einem stabilen Offenzustand teilweise unter einer Millisekunde (siehe Wirth, 2003; Erdmann, 2004). Es hat sich herausgestellt, dass dadurch die Ribosomen-induzierten Veränderungen im Schaltverhalten des Sec61-Komplexes in Strom-Spannungsrampen nicht eindeutig identifiziert werden können. Zur Seitenspezifität des Ribosomen-Effektes kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine abschließende Aussage gemacht werden.

3.2 Charakterisierung der rauen Mikrosomen aus *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1 Fusion der Proben mit dem planaren Bilayer

In Übereinstimmung mit den Fusionsexperimenten mit Translokonpräparationen aus *C. familiaris* (3.1.1) hat sich auch für die RM-Probe aus *S. cerevisiae* eine Modifikation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran in Anwesenheit von Detergens (2.2.9) als essenzielle Voraussetzung für die Probenfusion gezeigt. Des Weiteren konnte der Kanal aus *S. cerevisiae* (Stamm 541) nur nach Ablösen der Ribosomen durch Inkubation der Proben mit Puromycin, KCl und GTP (2.2.10) in den planaren Bilayer inkorporiert werden. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass der SEC-Komplex (posttranslationale Translokation, siehe 1.2.3) in den Membranen der untersuchten Liposomen nicht vorhanden war oder stets in geschlossenem Zustand vorlag. Da ohne Ribosomen-Depletion keinerlei Kanalaktivität zu beobachten war, kann eine Kontamination der Proben mit anderen kanalbildenden Proteinen ausgeschlossen werden. Kontrollexperimente haben gezeigt, dass das für die Herstellung des Bilayers und die Modifikation der Lipidkomposition verwendete Lipid frei von Kontaminationen war und zudem keine Verunreinigungen über KCl, GTP, Mega 9 oder Puromycin eingebracht worden sind (siehe 3.1.1).

Die auftretende Kanalaktivität nach Ribosomen-Depletion ist damit einer cotranslationalen Translokonassemblierung, dem Sec61p-Komplex, dem SEC'-Komplex oder dem homologen Ssh1p-Komplex zuzuordnen. Die im Einzelnen untersuchten Kanäle aus rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae* sind in ihren elektrophysiologischen Grundcharakteristika nicht voneinander zu unterscheiden. Eine Differenzierung der Ergebnisse in Sec61p-Komplex, SEC'-Komplex und Ssh1p-Komplex ist deshalb mit den verwendeten Proben nicht möglich.

3.2.2 Experimente mit Sec61p-Mutanten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Experimente mit verschiedenen Sec61p-Mutanten aus *S. cerevisiae* durchgeführt. Die Ergebnisse der Fusionsexperimente mit RM-Proben der untersuchten Stämme sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Es hat sich herausgestellt, dass ein Großteil der Proben auch nach Lipidverdünnung und Ablösen der Ribosomen nicht oder sehr schlecht mit dem planaren Bilayer fusionierten. Eine anschließende Inkubation der Proben mit PPcecA (Preprocecropin A, Wirth, 2003) führte nur für die Stämme YBR238C und YER019C-A zu einem Anstieg der Fusionsrate, was auf eine mögliche Induzierung des posttranslationalen SEC-Komplexes in die-

3 Ergebnisse

Tabelle 3.5: Fusionen der RM-Präparationen aus unterschiedlichen Stämmen von *S. cerevisiae*

+ = osmotische Fusion erfolgreich, (+) = osmotische Fusion vereinzelt erfolgreich,
* = nach zusätzlicher Inkubation mit PPcecA, - = osmotische Fusion nicht erfolgreich,
WT= Wildtyp.

Stamm	Fusion nach Puromycin-Behandlung
491 (RSY524)	-
492 (RSY255, WT)	-
541 (RSY2022, WT)	+
542 (RSY2024)	-
543 (RSY2025)	-
544 (RSY2026)	(+)
545 (RSY2027)	-
536 (BY4741, WT)	-
YBR238C	(+)*
YER019C-A	(+)*

sen Proben hindeutet. Generell inkorporierten nur die Präparationen des Stammes 541 (RSY2022) in ausreichendem Maße für eine grundsätzliche elektrophysiologische Charakterisierung in den planaren Bilayer. Die im Folgenden beschriebenen Kanaleigenschaften beziehen sich ausschließlich auf Messungen mit Proben des Stammes 541 (RSY2022). Ein elektrophysiologischer Vergleich der unterschiedlichen Sec61p-Mutanten ist mit den verwendeten Proben nicht möglich.

3.2.3 Schaltverhalten

Das Schaltverhalten des Kanals aus rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae* unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (Abbildung 3.19 a) ist, wie das des Sec61-Komplexes aus *C. familiaris*, durch eine hohe Variabilität der auftretenden Stromamplituden gekennzeichnet.

Ein bevorzugtes Stromniveau und damit eine energetisch begünstigte Kanalkonformation kann in den Stromableitungen nicht zugeordnet werden. Der Kanal zeigt deutliche Unterschiede in den Verweildauern in einem Offenzustand. Neben hochfrequentem Schalten tritt auch eine deutlich langsamere Kinetik mit *dwelltimes* von mehreren hundert ms auf. Ein vollständiges Schließen des Kanals ist hingegen nicht zu beobachten. Der für alle untersuchten Proben des Sec61-Komplexes aus *C. familiaris* typische Leckstrom ist somit auch für den Kanal aus rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae* charakteristisch. Für eine genauere Betrachtung der Schaltcharakteristika wird der mittlere Strom über

3.2 Charakterisierung der rauen Mikrosomen aus *Saccharomyces cerevisiae*

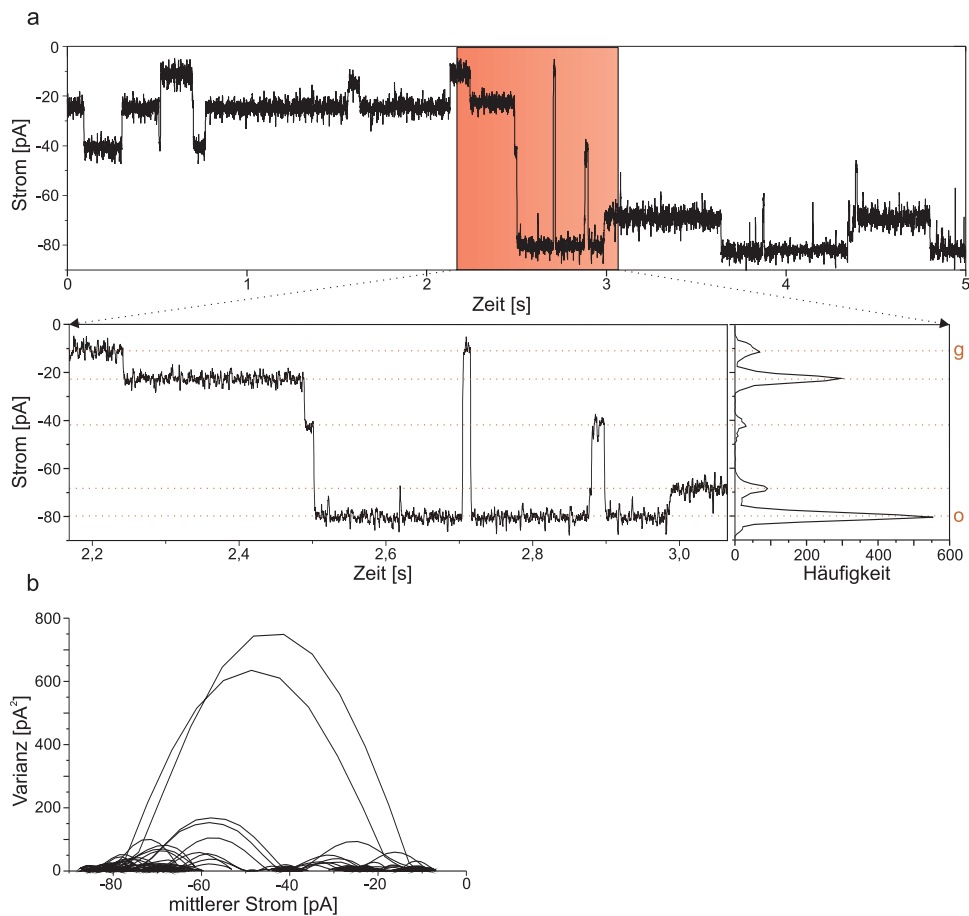


Abbildung 3.19: Stromableitung und Mean-Variance Darstellung eines Einzelkanals der cotranslational induzierten RM-Probe aus *S. cerevisiae*

a: Stromspur mit Häufigkeitshistogramm unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7) bei einer angelegten Klemmspannung von -55 mV.
b: Mean-Variance Darstellung der Daten aus dem Zoom-Plot in a.

ein Datenfenster von zehn Datenpunkten gegen die zugehörige Varianz aufgetragen (2.3.16, Abbildung 3.19 b). Es wird deutlich, dass Übergänge zwischen allen Offenzuständen des Kanals auftreten. Der geöffnete Zustand o kann damit sowohl über sukzessives Schalten aus den einzelnen Unterniveaus als auch durch kooperatives Schalten über alle Unterniveaus hinweg vom maximal geschlossenen Zustand g erreicht werden. Haupt- und Unterleitwert sind, wie auch beim Sec61-Kanal aus *C. familiaris* (3.1.2), entweder auf einen Einzelkanal oder auf mehrere gekoppelt schaltende Kanäle zurückzuführen.

3.2.4 Leitwerte

Die Kanalaktivität aus rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae* wurde bei Haltepotenzialen von über ± 60 mV zunehmend instabil. Da in diesem Zustand keine Einzelschaltereignisse mehr aufgelöst werden konnten, wurden bei der Datenaufnahme für die Leitwertbestimmung nur Membranspannungen von bis zu ± 55 mV an den planaren Bilayer angelegt.

Zur Analyse der Leitwerte werden unter symmetrischen Elektrolytbedingungen aufgenommene Stromspuren ausgewertet (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7) und die Leitwerte nach 2.3.9 ermittelt. Die Ergebnisse werden in Klassen von 40 pS zusammengefasst und gegen die Häufigkeit ihres Auftretens aufgetragen.

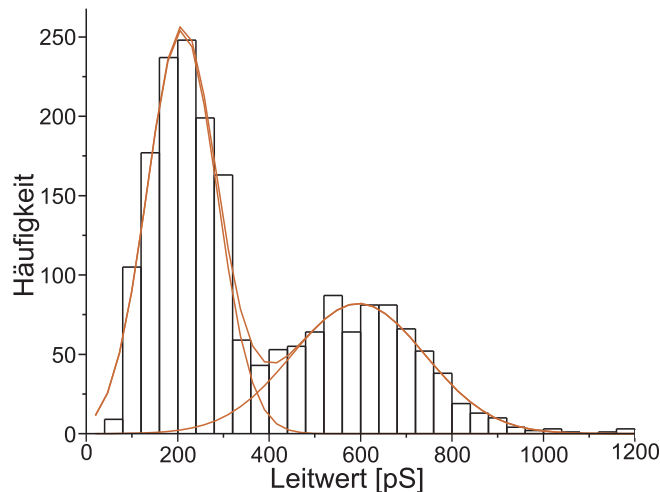


Abbildung 3.20: Leitwertverteilung der cotranslational induzierten RM-Probe aus *S. cerevisiae* unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7)

Das Ergebnis der Auswertung ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Wie bei allen untersuchten Proben aus *C. familiaris* sind die Leitwerte hochvariabel und können aufgrund der Häufigkeit ihres Auftretens in zwei differenzierte Klassen eingeteilt werden. Die Wertehäufungen sind mit Gaußfunktionen anpassbar. Danach ergibt sich für den Kanal aus der RM-Probe aus *S. cerevisiae* ein prominenter Hauptleitwert von $209 \text{ pS} \pm 2 \text{ pS}$ mit einem deutlich seltener auftretenden Unterleitwert von $596 \text{ pS} \pm 10 \text{ pS}$ aus $n=1943$ Einzelschaltereignissen. Die größten beobachteten Stromsprünge entsprechen Leitwerten von 1,6 nS.

3.2.5 Umkehrpotenzial

Unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen zeigt der Kanal aus *S. cerevisiae* eine deutliche Abhängigkeit des Umkehrpotenziales vom Offenzustand der Pore. Die entsprechenden Werte sind hochvariabel und liegen für Elektrolytbedingungen von 100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis und 10 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 trans zwischen -35 mV und +5 mV. Der Kanal ist damit überwiegend Anionenselektiv. Eine Bestimmung des mittleren Umkehrpotenziales und damit der Selektivität über Strom-Spannungsrampen ist für die verwendeten Proben aufgrund der Wertestreuung nicht sinnvoll. Für eine direkte Zuordnung von Umkehrpotenzial zu Offenzustand aus Schaltereignissen unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen (2.3.13) konnten, bedingt durch die niedrigen Fusionsraten der Proben, keine ausreichenden Daten erhoben werden.

3.2.6 Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit

Um die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit des Kanals aus rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae* zu untersuchen wurden Stromspuren unter symmetrischen Elektrolytbedingungen aufgenommen (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7 cis und trans). Haltepotenziale wurden dabei für jeweils eine Minute angelegt. Die Offenwahrscheinlichkeit wird nach 2.3.15 ausgewertet und gegen die zugehörigen Klemmspannungen aufgetragen (Abbildung 3.21).

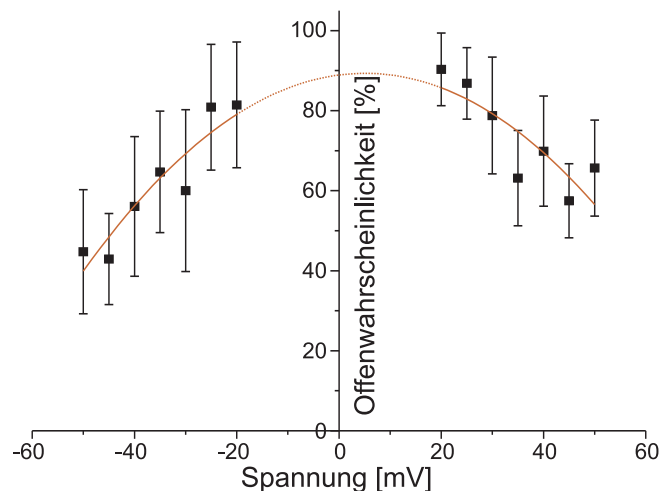


Abbildung 3.21: Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit der cotranslational induzierten RM-Probe aus *S. cerevisiae* unter symmetrischen Elektrolytbedingungen (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7)

Die Offenwahrscheinlichkeit der RM-Probe aus *S. cerevisiae* zeigt eine deutliche Ab-

3 Ergebnisse

hängigkeit vom Membranpotenzial. Die maximale Offenwahrscheinlichkeit von 80-90 % kann für Membranspannungen zwischen -25 mV und +25 mV beobachtet werden. Mit zunehmenden Haltepotenzialen nimmt sie bis auf ca. 45 % bei -50 mV und ca. 55 % bei +50 mV ab. Der Werteverlauf stimmt mit dem der RM-Probe aus *C. familiaris* überein.

3.2.7 Abschätzung der Porendurchmessers aus den Leitwerten

Die Porengröße für den Kanal der RM-Probe aus *S. cerevisiae* wird nach Hille (2001) aus den Leitwerten abgeschätzt (2.3.14). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Porendurchmesser des Kanals aus RM-Präparationen aus *S. cerevisiae* nach Hille (2001) für Haupt- (Λ_1) und Unterleitwert (Λ_2) sowie Maximalleitwert (Λ_{\max})

Länge der Verengungszone [\AA]	\varnothing [\AA]		
	Leitwert		
	Λ_1	Λ_2	Λ_{\max}
5	6,5	13,8	30,2
10	8,3	16,6	34,3
20	11	20,9	40,6
30	13	24,3	45,8
40	14,7	27,1	50,3
50	16,2	29,6	54,2

Dabei werden sowohl die Veränderung des Porendurchmessers bei Schaltereignissen die dem Haupt- und Unterleitwert zuzuordnen sind als auch der maximal beobachtete Leitwert von 1581 pS berücksichtigt. Für den spezifischen Widerstand der verwendeten Elektrolytlösung (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7) im Kanal wird der mit einem Konduktometer bestimmte Wert von $31,7 \Omega \cdot \text{cm}$ um den Faktor 5 auf $158,5 \Omega \cdot \text{cm}$ korrigiert (2.3.14; Smart et al., 1997).

Legt man die kurze Restriktionszone aus der Kristallstruktur des Sec61p-homologen SecY-Komplexes aus *M. jannaschii* zugrunde (Van den Berg et al., 2004), so liegt die Veränderung im Porendurchmesser bei Schaltereignissen, die dem kleinen Leitwert zuzuordnen sind bei 7-8 \AA . Demgegenüber ist der große Leitwert auf Änderungen von 14-17 \AA im Kanaldurchmesser zurückzuführen. Die maximal für den Kanal aus der RM-Probe aus *S. cerevisiae* beobachteten Leitwerte entsprechen Änderungen von 30-34 \AA .

4 Diskussion

4.1 Fusion der Proben mit dem planaren Bilayer

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl co- als auch posttranslationale Präparationen des Translokons sowie der aufgereinigte Sec61-Komplex aus *Canis familiaris* elektrophysiologisch charakterisiert. Raue Mikrosomen (RM), Puromycin-Kalium gewaschene raue Mikrosomen (PKRM) und Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex konnten erst nach Detergens-vermittelter Veränderung der Lipidkomposition der Liposomenmembranen mit dem planaren Bilayer fusioniert werden (3.1.1). Die Präsenz eines ionenleitenden Kanals in der Membran der Probenliposomen ist eine essenzielle Voraussetzung für diesen Vorgang (siehe 2.3.8). Der Sec61-Kanal lag in den Ausgangspräparationen somit wahrscheinlich in einem geschlossenen, für Ionen impermeablen Zustand vor. Verschiedene Arbeiten haben einen Einfluss der Lipidumgebung auf die Proteintranslokation des Sec61- sowie des homologen SecYEG-Translokons beschrieben (van Voorst und de Kruijff, 2000; van Dalen und de Kruijff, 2004), während in elektrophysiologischen Experimenten keine Veränderungen der Kanaleigenschaften in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung festgestellt werden konnte (Simon und Blobel, 1991). Es hat sich herausgestellt, dass eine einfache Vermischung der Lipide in den Membranen der Probenliposomen mit L- α -PC mittels Beschallung mit Ultraschall und anschließenden Gefriertau-Zyklen nicht ausreichend für eine erfolgreiche Inkorporation der Proben in den planaren Bilayer war. Für die Ionenkanalaktivität der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proben war somit nicht alleine die Lipidzusammensetzung (Wirth, 2003), sondern die Anwesenheit von Detergens während der Lipidmodifikation entscheidend. Auch der aufgereinigte, in Anwesenheit von DeoxyBigCHAP in L- α -PC-Liposomen rekonstituierte Sec61-Komplex konnte erst nach Solubilisieren der Proteoliposomen mit Mega 9 und anschließendem Entfernen des Detergens mittels Dialyse in den Bilayer eingebracht werden. Somit liegt nahe, dass die Ionenkanalaktivität durch Mega 9-vermittelte Veränderungen am Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Komplex induziert wurde. Biochemische Experimente haben ergeben, dass die Funktionalität des Translokon-Komplexes in Bezug auf die Proteintranslokation auch nach Mega 9-Behandlung erhalten bleibt (persönliche Kommunikation mit Dr. Martin Jung, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg).

Die Fusionsrate der rauen Mikrosomen nahm nach Depletion der Ribosomen durch Behandlung der Probe mit Puromycin, KCl und GTP deutlich zu (3.1.1). Entsprechend weist der Kanal im Komplex mit einem Ribosom und naszierender Polypeptidkette keine nennenswerte Ionenpermeabilität auf. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergeb-

4 Diskussion

nissen von Crowley et al. (1994) und Hamman et al. (1997), die einen für Ionen impermeablen Kanal im aktiven Ribosom-Translokation-Komplex vorgeschlagen haben. Frühere elektrophysiologische Studien mit rauen Mikrosomen haben ebenfalls gezeigt, dass eine Ionenkanalaktivität erst nach Depletion der Ribosomen durch Behandlung der Proben mit Puromycin auftrat (Simon und Blobel, 1991; Wirth et al., 2003). Des Weiteren legen die Ergebnisse der Fusionsexperimente nahe, dass der Großteil der Translokation-Komplexe auch nach Modifikation der Lipidzusammensetzung der Mikrosomenmembran in Anwesenheit von Mega 9 noch mit Ribosomen assoziiert war.

PKRM-Präparationen und Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex fusionierten gut mit dem planaren Bilayer. Eine Steigerung der Fusionsrate nach Vorinkubation mit einem Vorstufenprotein wie PPcecA oder Ubc6 konnte nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist mit denen aus neueren elektrophysiologischen Experimenten konsistent. So hat Wonderlin (2009) gezeigt, dass der Sec61-Komplex auch in Abwesenheit von Ribosomen oder einem Translokationssubstrat in einem aktiven Zustand vorlag. Im Gegensatz dazu wurde in vorangegangenen elektrophysiologischen Studien eine Induzierung der Ionenkanalaktivität in PKRM-Proben durch Inkubation mit den Präpeptiden beobachtet (Wirth et al., 2003; Erdmann, 2004). Untersuchungen am SecYEG-Komplex aus *E. coli* haben ebenfalls eine Aktivierung der Kanalaktivität durch das Signalpeptid von LamB ergeben (Simon und Blobel, 1992).

In Kontrollversuchen wurden Liposomen aus L- α -PC mit Mega 9 versetzt, das Detergens mittels Dialyse wieder entfernt, die Probe anschließend mit Puromycin und GTP vorinkubiert und im planaren Bilayer System elektrophysiologisch untersucht. Es konnte keine Ionenkanalaktivität beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl das für die Modifikation der Lipidzusammensetzung der Proteoliposomen verwendete L- α -PC, als auch das für den Bilayer verwendete L- α -PC Typ IV-S frei von Kontaminationen mit porenbildenden Proteinen waren. Auch über das verwendete Mega 9 wurde keine Verunreinigung in die Proben eingebracht. Des Weiteren kann in Übereinstimmung mit vorangegangenen elektrophysiologischen Studien (Simon und Blobel, 1991; Wirth, 2003) ausgeschlossen werden, dass Puromycin als Ionophor fungiert. Entsprechend sind die in den untersuchten Proben beobachteten Ionenkanalaktivitäten auf die verschiedenen Sec61-Ausgangspräparationen zurückzuführen.

Da Antikörper gegen den N- oder C-Terminus der Sec61 α - sowie gegen die Sec61 β -Untereinheit keinen Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der untersuchten Kanalaktivitäten hatten, war eine immunologische Identifizierung der beteiligten Proteinkomponenten nicht möglich. Dennoch legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, dass der untersuchte Kanal vom Sec61-Komplex konstituiert wird:

4.2 Schaltverhalten und Leitwerte des Sec61-Komplexes

- Die beobachtete Ionenkanalaktivität in rauen Mikrosomen ist durch Depletion der Ribosomen mit Puromycin, KCl und GTP induzierbar.
- RM-Präparationen und Proteoliposomen die ausschließlich die α -, β - und γ -Untereinheit des Sec61 als Proteinkomponenten enthalten zeigen nahezu identische elektrophysiologische Grundcharakteristika im Bezug auf das Schaltverhalten (3.1.2), die Leitwertverteilung in KCl-Elektrolyten (3.1.3), die Selektivität (3.1.5) und die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit (3.1.6). Lanthanionen haben einen übereinstimmenden Effekt auf das Gating des Kanals aus rauen Mikrosomen und den aufgereinigten Sec61-Komplex (3.1.8). Ebenso kann das Calmodulinvermittelte, Calcium-abhängige Schließen für beide Präparationen beobachtet werden (3.1.10.2).
- Die elektrophysiologischen Eigenschaften der verschiedenen Translokonpräparationen zeigen nicht nur über den Zeitraum der vorliegenden Arbeit Kontinuität, sondern sind auch mit den Ergebnissen vorangegangener elektrophysiologischer Studien konsistent, in denen Effekte von bekannten Liganden des Sec61-Komplexes auf dessen elektrophysiologische Eigenschaften gezeigt werden konnten (BiP und Cholera toxin Untereinheit A aus *Vibrio cholerae* (Wirth, 2003) und Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* (Wirth, 2003; Erdmann, 2004)).
- Die Puromycin-induzierten Kanäle in rauen Mikrosomen aus *C. familiaris* und *S. cerevisiae* sind in ihren Grundcharakteristika nicht voneinander zu unterscheiden (siehe 4.10). Das Auftreten elektrophysiologisch identischer Kontaminationen in Proben aus zwei verschiedenen Organismen die nach unterschiedlichen Protokollen präpariert wurden ist unwahrscheinlich.

4.2 Schaltverhalten und Leitwerte des Sec61-Komplexes

Stromspuren des Sec61-Kanals aus RM- und PKRM-Präparationen sowie aus Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex zeigen für alle untersuchten Elektrolytbedingungen eine hohe Variabilität der auftretenden Stromniveaus. Die Auswertung der Stromänderungen bei Schaltereignissen ergibt Leitwerte zwischen 50 pS und 1,6 nS. Im Häufigkeitshistogramm zeigt sich eine Vielzahl von Unterleitwerten die in zwei Wertefraktionen zusammengefasst werden können. Aus den Gaußanpassungen resultieren Werte von 151 pS und 480 pS für Haupt- und Unterleitwert des Kanals aus rauen Mikrosomen bzw. 206 pS und 468 pS für den aufgereinigten Sec61-Komplex in 250 mM KCl-Puffer. In CaCl₂-Elektrolyten (184 mM) beträgt der für die RM-Probe bestimm-

4 Diskussion

te Hauptleitwert 165 pS, der Unterleitwert liegt bei 733 pS. Der aufgereinigte Sec61-Komplex zeigt nur eine einzelne Leitwertklasse von 94 pS.

Das Auftreten zweier Leitwertklassen ist auf mehrere Kanäle mit einem übergeordneten Gatingmechanismus oder auf einen Einzelkanal mit verschiedenen Unterleitwerten zurückzuführen, wenn kooperative Schaltereignisse über alle Unterniveaus hinweg auftreten (Laver und Gage, 1997). Für den Sec61-Komplex aus RM-Präparationen ergibt sich aus den Schaltfrequenzen des großen und kleinen Leitwertes eine Wahrscheinlichkeit von $9,29 \cdot 10^{-8}$ für deren unabhängiges Schalten innerhalb eines Samplingintervalls von 200 μ s (Tabelle 3.1). Ein Schalten über die Unterniveaus hinweg würde damit für unabhängig auftretende Leitwerte lediglich 1,7-mal pro Stunde detektiert werden. Tatsächlich lässt sich eine entsprechende Stromänderung in einer exemplarischen Stromspur von 60 Sekunden zwei Mal beobachten und tritt damit 72-mal häufiger auf als erwartet (3.1.2). Die verschiedenen Leitwerte sind damit nicht auf mehrere unabhängige Ionenkanalaktivitäten im Translokon-Komplex, sondern auf einen hochdynamischen Einzelkanal mit Unterleitwerten (*Unipore*-Modell) oder auf gekoppeltes Schalten mehrerer Kanäle (*Multipore*-Modell) zurückzuführen (Laver und Gage, 1997). In keiner der unter Verwendung von KCl-Elektrolyten untersuchten Proben wurde nur eine der beiden Leitwertklassen oder eine reduzierte Dynamik im Schaltverhalten beobachtet. Außerdem zeigen die elektrophysiologischen Grundcharakteristika des Kanals aus RM-Proben in KCl-Puffer keine Unterschiede im Vergleich mit dem aufgereinigten Sec61-Komplex. Damit kann die Präsenz eines weiteren ionenleitenden Kanals neben Sec61 in den untersuchten Translokon-Präparationen ausgeschlossen werden. Für das *Multipore*-Modell ist somit eine Oligomerisierung mehrerer Sec61-Komplexe zu postulieren.

Die Stöchiometrie des Translokons ist wissenschaftlich umstritten. Verschiedene Studien der letzte Jahre haben einen monomeren Sec61/SecY-Komplex im Translokon vorgeschlagen (Van den Berg et al., 2004; Menetret et al., 2007; Kalies et al., 2008; Menetret et al., 2008). Andere Ergebnisse deuten auf eine Oligomerisierung als Dimer, Trimer oder Tetramer hin, jedoch soll auch in oligomerer Assemblierung nur ein Sec61-Komplex die aktive Translokationspore konstituieren (Menetret et al., 2000; Beckmann et al., 2001; Breyton et al., 2002; Mori et al., 2003; Snapp et al., 2004; Menetret et al., 2005; Osborne und Rapoport, 2007). Daneben wurde ein weiteres Modell entwickelt, nach dem zwei SecY-Komplexe über einen lateralen Gatingmechanismus einen konsolidierten Kanal bilden (Mitra et al., 2005; Mitra und Frank, 2006).

Der Radius der Sec61-Pore wurde in früheren Experimenten mit unterschiedlich großen Nichtelektrolyten (Polyethylenglycole, PEGs) bestimmt (Wirth, 2003). Wird die Größe der PEGs bei dieser Methode so gewählt, dass die Moleküle die Pore permeieren können, so wird ein Teil des Volumens im Kanal von PEGs eingenommen und damit

4.2 Schaltverhalten und Leitwerte des Sec61-Komplexes

sowohl die effektive Ionenstärke der Elektrolytlösung als auch die Mobilität der Ionen in der Pore herabgesetzt. Entsprechend ist eine Abnahme des Leitwertes im Vergleich zu Experimenten ohne PEGs zu beobachten. Können die verwendeten PEGs aufgrund ihrer Größe nicht in die Pore eindringen, so ist keine nennenswerte Veränderung des Leitwertes zu erwarten. Die Ergebnisse der Experimente haben gezeigt, dass der kleine Leitwert für PEG-Radien $\leq 13 \text{ \AA}$ deutlich herabgesetzt war. Für den großen Leitwert war für PEG-Radien von $\leq 31 \text{ \AA}$ eine Reduzierung zu beobachten (Wirth, 2003). Diese Daten zeigen, dass für den großen Leitwert auch tatsächlich deutlich größere PEG-Moleküle den Kanal permeieren können als für den kleinen Leitwert. Damit ist ausgeschlossen, dass der große Leitwert durch das kooperative Schalten mehrerer nicht-konsolidierter Sec61-Poren im kleinen Leitwert verursacht wird. Stattdessen ist der große Leitwert für eine dem *Multipore*-Modell entsprechende Kanalassemblierung nur durch eine von mehreren Sec61-Komplexen konstituierte, konsolidierte Pore nach dem Modell von Mitra et al. (2005) und Mitra und Frank (2006) zu erklären.

Auch wenn der Translokationskanal mit den vorliegenden Daten und ohne weitere Evidenz nicht zweifelsfrei dem Unipore- oder Multipore-Modell zugeordnet werden kann, so lassen sich die Ergebnisse der Leitwertsättigung (4.3) und die mit verschiedenen elektrophysiologischen und biophysikalischen Methoden bestimmten Porendimensionen des Sec61-Kanals gut über das *Multipore*-Modell erklären (siehe auch 4.7).

Es stellt sich die Frage, wie die außerordentlich hohe Dynamik im Gating des Sec61-Komplexes zustande kommt. Als generelle Ursache für das Auftreten unterschiedlicher Leitwerte eines Ionenkanals gelten verschiedene, langlebige und energetisch stabile Offenzustände der Pore. Konformationswechsel des Proteins bestimmen dabei sowohl die Porendimensionen als auch die Ladungsverteilung in der Restriktionszone und in den Vestibülen und können durch leichte Schwankungen in der Stärke des elektrischen Feldes verursacht werden (Laver und Gage, 1997). Bei weiten Kanälen mit entsprechend hohen Leitwerten permeieren mehrere Ionen gleichzeitig die Pore. Computergestützte Simulationen von Porinen mit bekannter 3-D-Struktur (OmpF, PhoE und OmpK36 aus *E. coli*) haben gezeigt, dass die Ionen elektrostatisch mit polaren und geladenen Aminosäureresten im Kanal interagieren und sich auf differenzierten Bahnen (Trajektorien) durch die Pore bewegen. Veränderungen in der Kanalkonformation beeinflussen die Besetzungshäufigkeit dieser Trajektorien und führen so zu Veränderungen der Ionenpermeabilität (Schirmer und Phale, 1999; Im und Roux, 2002a; Im und Roux, 2002b). Neben den intrinsischen Eigenschaften der Pore beeinflusst im Fall von Proteintranslokasen eventuell auch ein im Translokationskanal vorhandenes Substrat die Ionenpermeation.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Ionenkanalaktivität in RM-Präparationen durch Vorinkubation mit Puromycin, KCl und GTP induziert. Puromycin bewirkt

4 Diskussion

einen vorzeitigen Abbruch der Kettensynthese im Ribosom und das Freisetzen der Polypeptidkette (Darken, 1964), KCl bewirkt in höheren Konzentrationen eine Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten vom Translokton (Adelman et al., 1973). Es kann davon ausgegangen werden, dass der Sec61-Kanal aus RM-Präparationen zumindest bei einem Teil der durchgeführten Experimente in Assoziation mit einem undefinierten Translokationssubstrat vorlag. Im Gegensatz dazu wurden eventuelle Polypeptidketten im aufgereinigten Sec61-Komplex während der Präparation mittels Zentrifugation durch ein Saccharosekissen entfernt, entsprechend war diese Probe bei den Messungen größtenteils frei von Substrat. Die elektrophysiologischen Grundcharakteristika der RM-Präparationen im Hinblick auf die Dynamik des Schaltverhaltens und die Leitwertverteilung in KCl-Elektrolyten zeigen im Vergleich zu Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex nur geringe Unterschiede. Ein maßgeblicher Einfluss von Translokationssubstraten auf die Kanaleigenschaften ist somit für die verwendeten Präparationen des Sec61-Komplexes nicht festzustellen. Die beobachtete Dynamik ist stattdessen eine intrinsische Eigenschaft des Sec61-Kanals.

Auch im maximal geschlossenen Zustand zeigt der Sec61-Kanal ohne Effektorzugabe stets einen geringen Leckstrom. Diese Beobachtung ist mit früheren Studien konsistent (Wirth, 2003; Erdmann, 2004). Der Leckleitwert ist auch in Experimenten mit Proteoliposomen zu beobachten, die ausschließlich die α -, β - und γ -Untereinheit des Sec61 enthalten. Es handelt sich somit um eine kanalintrinsische Eigenschaft, die Beteiligung einer weiteren Proteinkomponente kann ausgeschlossen werden. Ohne vorheriges Ablösen der Ribosomen fusionierten raue Mikrosomen kaum mit dem planaren Bilayer. Es ist davon auszugehen, dass der Leckstrom im Ribosom-Translokton-Komplex entweder zu gering ist um die osmotische Fusion der rauen Mikrosomen mit dem planaren Bilayer zu vermitteln, oder dass der Ribosomen-assoziierte Kanal keinen Leckleitwert aufweist. In Übereinstimmung damit haben Crowley et al. (1994) und Hamman et al. (1997) aus Quenching-Experimenten mit fluoreszenzmarkierten naszierenden Polypeptidketten und Iodionen geschlossen, dass der Ribosom-Translokton-Komplex impermeabel für Ionen ist. In den letzten Jahren ist ein Modell für das Gating des SecY-Kanals entwickelt worden. Die Kristallstrukturen des SecYE β -Komplexes aus *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg et al., 2004), des SecYEG-Komplexes aus *Thermotoga maritima* (Zimmer et al., 2008) sowie des SecYE-Komplexes aus *Thermus thermophilus* (Tsukazaki et al., 2008) zeigen übereinstimmend, dass die kurze Transmembranhelix 2a des SecY in das periplasmatische Vestibül des Kanals hineinragt. Es wurde postuliert, dass diese Plug-Domäne in einer Konformationsveränderung nach außen schwingt, dadurch das Vestibül freigibt und so das Gating des Kanals vermittelt wird. Biochemische Ergebnisse (Tam et al., 2005) und *Molecular dynamics* Simulationen (Gumbart und Schulten, 2006; Tian

4.2 Schaltverhalten und Leitwerte des Sec61-Komplexes

und Andricioaei, 2006) haben die Konformationsänderung der Plug-Domäne bestätigt. Elektrophysiologische Studien haben ergeben, dass SecYEG aus *E. coli* nur aus Plug-Deletions-Mutanten oder mit über prl-Mutationen oder Disulfid-Crosslinking im Offenzustand fixierter Plug-Domäne eine Ionenkanalaktivität zeigt (Saparov et al., 2007). Strukturelle Untersuchungen von SecY Plug-Deletions-Mutanten legen ebenfalls nahe, dass die Plug-Domäne für die Aufrechterhaltung der Membran-Barriere von entscheidender Bedeutung ist (Li et al., 2007). Im Gegensatz dazu schlagen Junne et al. (2006) nach Experimenten mit Sec61-Mutanten vor, dass die Plug-Domäne keinen Einfluss auf die Membran-Barriere in Hefe hat. Des Weiteren wird der von einem Isoleucinring gebildeten Restriktionszone des SecY-Kanals ebenfalls eine entscheidende Rolle für dessen Ionenpermeabilität zugeschrieben (Van den Berg et al., 2004; Haider et al., 2006; Gumbart und Schulten, 2006; Gumbart und Schulten, 2008).

In vorangegangenen Studien am Sec61-Translokon aus *C. familiaris* wurden Leitwerte von 220 pS und 550 pS für raue Mikrosomen bzw. 140 pS und 480 pS für den aufgereinigten Sec61-Komplex in 250 mM KCl ermittelt (Wirth et al., 2003). Diese stimmen sowohl im Hinblick auf die eigentlichen Werte, als auch im Bezug auf die Leitwertverteilung im Häufigkeitshistogramm gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Weitere elektrophysiologische Untersuchungen haben sich mit den Eigenschaften des Sec61-/SecY-Translokons beschäftigt. So wurden in Bilayer-Experimenten mit rauen Mikrosomen aus *C. familiaris* Leitwerte von 20, 55, 80 und 115 pS in 45 mM K-Glutamat (Simon et al., 1989) und 220 pS in 50 mM KCl ermittelt (Simon und Blobel, 1991). Weitere Studien mit rauen Mikrosomen aus *Sus scrofa* und ER-Mikrosomen aus CHO-Zellen ergaben Leitwerte von 35 pS bis 110 pS in 100 mM NMG (N-Methyl-D-glucamin), 60 mM PIPES sowie von 260 pS bis 500 pS in 90 mM K-Glutamat, 10 mM KCl (Wunderlin, 2009). Für Plasmamembran-Vesikel aus *E. coli* wurden Leitwerte von 115 pS in 45 mM K-Glutamat (Simon et al., 1989) und 220 pA in 50 mM KCl bestimmt (Simon und Blobel, 1992). SecY-Mutanten aus *E. coli*, in denen die Plug-Domäne deletiert oder in einem offenen Zustand fixiert wurde, zeigten Leitwerte von 202 pS und 944 pS in 150 mM KCl (Saparov et al., 2007). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die genannten Publikationen dem Sec61/SecY-Translokon eine Ionenkanalaktivität mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Leitwerten zuschreiben. Die Ergebnisse sind jedoch aufgrund der verschiedenen Elektrolytbedingungen (K-Glutamat, NMG oder KCl in variierenden Konzentrationen), der verwendeten elektrophysiologischen Methoden (*Patch-Clamp*- oder Bilayer-Technik, Bilayer mit oder ohne organischem Lösungsmittel) sowie der unterschiedlichen Probenpräparationen (Mikrosomen/Membranvesikel, aufgereinigte, rekonstituiert Proteine und Riesenliposomen) und Auswertemethoden (Leitwert aus absoluten Strömen oder aus Stromdifferenzen bei Schaltereignissen) nicht untereinander

oder mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen.

4.3 Konzentrationsabhängigkeit des Leitwertes

Die Leitwerte des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen zeigen eine Zunahme mit ansteigender KCl-Elektrolytkonzentration (3.1.4). Für den großen Leitwert kann dabei bis zu einer KCl-Aktivität von 1146 mM ein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Der zugehörige Leitwert wurde mit $4492 \text{ pS} \pm 56 \text{ pS}$ ermittelt. Dieses deutet auf einen wassergefüllten Kanal mit großem Porendurchmesser hin, den K^+ - und Cl^- -Ionen bis zu einer Elektrolytkonzentration von mindestens 2 M ungehindert permeieren können. Die Daten für den kleinen Leitwert können mit einer Sättigungsfunktion angepasst werden, es ergibt sich ein Sättigungsleitwert G_{Max} von $720 \text{ pS} \pm 49 \text{ pS}$. Der Unterschied in den Werteverläufen legt nahe, dass Stromänderungen im Bereich des kleinen Leitwertes im Vergleich zum großen Leitwert durch einen Kanal mit deutlich kleinerer Porendimension hervorgerufen werden, anstatt auf einem teilweisen Schließen einer großen Pore zu beruhen. Dieses lässt sich gut durch ein Multipore-Modell erklären, bei dem zwei Sec61-Komplexe sowohl jeweils einen niedrigen Sättigungsleitwert zeigen, als auch eine konsolidierte Pore mit deutlich höherem Sättigungsleitwert konstituieren können.

Computergestützte Simulationen der Ionenpermeation durch weite Kanäle wie OmpF aus *E. coli* haben ergeben, dass sich die Ionen auf differenzierten Trajektorien durch die wassergefüllte Pore bewegen (Schirmer und Phale, 1999; Im und Roux, 2002a; Im und Roux, 2002b). Anionen und Kationen befinden sich dabei vor allem in der Restriktionszone in räumlicher Nähe zueinander, so dass es zur Ionenpaarbildung kommen kann. Auch unter nicht-sättigenden Elektrolytbedingungen permeiert ein Teil der K^+ - und Cl^- -Ionen den Kanal als Ionenpaar (Im und Roux, 2002b), eine Unabhängigkeit der Ionenpermeation liegt also auch für einen linearen Werteverlauf der Sättigungsfunktion nicht vor. Mit steigender Ionenkonzentration sind die möglichen Wege durch die Pore zunehmend mit Ionen besetzt, so dass es mehr und mehr zu elektrostatischer Abstoßung zwischen gleichgeladenen Ionen kommt und letztendlich keine zusätzliche Besetzung der Trajektorien mehr möglich ist. Ist die Energiebarriere für die Besetzung weiterer, energetisch ungünstiger Bahnen im Kanal zu hoch, so kommt es zu einer Sättigung des Leitwertes.

4.4 Umkehrpotenzial und Selektivität

Das Umkehrpotenzial des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen sowie aus Proteoliposomen mit aufgereinigtem Sec61-Komplex wurde aus unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen aufgenommenen Stromspuren und Spannungsrampen ermittelt. Aus den

erhaltenen Werten wurde mit Hilfe der GHK-Spannungsgleichung die Selektivität des Kanals als Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten der beteiligten Ionen bestimmt (3.1.5). Die ermittelten Werte für die verwendeten Proben sind in Tabelle (4.1) zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten für Anionen und Kationen für die verschiedenen Proben des Sec61-Komplexes
 Λ_1 und Λ_2 bezeichnen Haupt- und Unterleitwert bei der Auswertung über Einzelkanalschaltereignisse.

Probe	Elektrolytbedingungen	P_A/P_K
RM Λ_1	250 mM KCl cis, 20 mM KCl trans	1,5
RM Λ_2	250 mM KCl cis, 20 mM KCl trans	1,24
RM	250 mM KCl cis, 20 mM KCl trans	1,5
Sec61-Komplex	250 mM KCl cis, 20 mM KCl trans	1,6
RM Λ_1	10,7 mM CaCl ₂ cis, 184 mM CaCl ₂ trans	12,4
RM Λ_2	10,7 mM CaCl ₂ cis, 184 mM CaCl ₂ trans	10
RM	184 mM CaCl ₂ cis, 10,7 mM CaCl ₂ trans	6,8
Sec61-Komplex	184 mM CaCl ₂ cis, 10,7 mM CaCl ₂ trans	8,7
RM	176 mM MgCl ₂ cis, 10,4 mM MgCl ₂ trans	6,5

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben zeigen einen anionen-selektiven Kanal. Dabei können für Experimente mit KCl-Lösungen Permeabilitätsverhältnisse zwischen $P_{Cl^-}/P_{K^+}=1,24$ und $P_{Cl^-}/P_{K^+}=1,6$ festgestellt werden. Sowohl bei der Ermittlung des Umkehrpotenziales aus Einzelkanalschaltereignissen wie auch bei der Datenerhebung mittels Strom-Spannungsrampen zeigt sich eine Abhängigkeit der Werte vom Offenzustand des Kanals. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer früheren Studie am Sec61-Komplex (Erdmann, 2004). In planar Bilayer- und *Patch-Clamp*-Experimenten mit dem Metabolit-Transporter der äußeren Mitochondrienmembran VDAC aus *Neurospora crassa* wurde eine Abhängigkeit der Selektivität vom Offenzustand mit anionen- und kationenselektiven Kanalkonformationen beobachtet (Hodge und Colombini, 1997; Pavlov et al., 2005). Die Proteintranslokase der inneren Chloroplastenmembran Tic110 aus *Pisum sativum* zeigt ebenfalls eine Veränderung der Selektivität mit dem Offenzustand des Kanals (Götze, 2009).

Die Untersuchungen der Translokonpräparationen in asymmetrischen CaCl₂-Elektrolyten haben im Vergleich zu den Experimenten mit KCl-Lösungen eine deutliche Zunahme der Anionenselektivitäten mit Werten zwischen $P_{Cl^-}/P_{Ca^{2+}}=6,8$ und $P_{Cl^-}/P_{Ca^{2+}}=12,4$ ergeben. Die Auswertung der Daten über Einzelkanalschaltereignisse zeigt dabei für raue Mikrosomen höhere Selektivitäten als eine Bestimmung der Werte aus Strom-

4 Diskussion

Spannungsrampen. Da bei letztgenannter Methode der absolute Strom betrachtet wird, fließt der für den Sec61-Komplex charakteristische Leckstrom hier mit in die Auswertung ein (siehe 2.3.13). Die Daten deuten darauf hin, dass die Selektivität des Sec61-Komplexes durch den Leckstrom maßgeblich herabgesetzt wird.

Weitere Untersuchungen mit asymmetrischen MgCl_2 -Lösungen haben ein Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten von $P_{\text{Cl}^-}/P_{\text{Mg}^{2+}}=6,5$ für die RM-Probe aus Strom-Spannungsrampen ergeben. Ein Vergleich mit dem entsprechenden Wert für CaCl_2 ($P_{\text{Cl}^-}/P_{\text{Ca}^{2+}}=6,8$) zeigt, dass der Kanal nicht zwischen den bivalenten Kationen diskriminieren kann.

Die Selektivität eines weiten Ionenkanals wird maßgeblich durch elektrostatische Wechselwirkungen der permeierenden Ionen mit polaren oder geladenen Aminosäureresten in der Porenregion bestimmt (Aguilella-Arzo et al., 2007). Dabei wird die Permeabilität für Kationen durch negative Ladungen in der Pore erhöht und durch positive Ladungen verringert. Versuche mit Mutanten von bakteriellen β -Barrel Porinen mit bekannter 3D-Struktur haben gezeigt, dass sich die Selektivität durch einen Austausch der geladenen Aminosäuren in der Porenregion in der zu erwartenden Weise verändern lässt (Phale et al., 2001; Miedema et al., 2004). Die Nettopermeation von Anionen und Kationen durch einen weiten Kanal wird letztlich durch die Anzahl der energetisch günstigen Trajektorien auf denen Anionen und Kationen eine Pore durchqueren können sowie deren Besetzungshäufigkeit festgelegt (Schirmer und Phale, 1999; Im und Roux, 2002a).

Es ergibt sich die Frage, wie das für den Durchmesser der Sec61-Pore relativ hohe Umkehrpotenzial in asymmetrischen CaCl_2 - oder MgCl_2 -Elektrolytlösungen im Vergleich zu KCl -Lösungen verursacht wird. Nach Eisenman und Horn (1983) wird die Selektivität eines *single-file*-Ionenkanals von dem Energieaufwand für die Entfernung der Hydrathülle eines beteiligten Ions und dem Energiegewinn aus dessen elektrostatischer Interaktion mit geladenen Aminosäureresten in der Pore bestimmt. Die freiwerdenden Koordinationsstellen des Ions werden dabei durch die geladenen Gruppen in der Pore ersetzt. Computergestützte Simulationen haben gezeigt, dass K^+ - und Cl^- -Ionen auch während der Permeation durch die Restriktionszone eines weiten Kanals wie OmpF einen Teil der koordinierten Wassermoleküle verlieren (Im und Roux, 2002b). Auch für den Sec61-Kanal wäre demnach eine teilweise Dehydrierung der permeierenden Ionen denkbar. Die Hydrationsenergie für Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen ist um ein Mehrfaches höher als für K^+ - und Cl^- -Ionen (Hille, 2001, Seite 329), so dass die Permeation von Ca^{2+} und Mg^{2+} durch den Sec61-Kanal energetisch deutlich ungünstiger ist als die Permeation von K^+ - und Cl^- . Die beobachteten Selektivitäten lassen sich gut über die Energiedifferenzen für die Dehydrierung der beteiligten Ionen erklären.

Eine symmetrische Zugabe von CaCl_2 bis zu Konzentrationen von 90 mM zu asymmetri-

schen KCl-Elektrolytlösungen verändert das Umkehrpotenzial des Kanals nur minimal. Dieses Ergebnis zeigt, dass die unterschiedlichen Umkehrpotenziale und Selektivitäten des Sec61-Kanals in KCl- oder CaCl₂-Puffer nicht auf einer Ca²⁺-induzierten Konformationsveränderung in einen Offenzustand mit generell höherer Kationenselektivität beruht. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass nicht die Einbringung zusätzlicher positiver Ladungen in Form von Ca²⁺ oder Mg²⁺ die Permeabilitäten des Kanals bestimmt, sondern die kanalintrinsische Ladungsverteilung ausschlaggebend für die Selektivitäten für monovalente oder bivalente Kationen ist. Ob überdies auch ein in der Porenregion befindliches Translokationssubstrat bei Messungen mit Sec61-Kanälen aus RM-Präparationen einen Einfluss auf das Umkehrpotenzial hat, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Über die physiologische Bedeutung der ermittelten Selektivitäten kann nur spekuliert werden. Die Konzentration freier Calciumionen im Cytosol der Zelle reguliert eine Vielzahl biochemischer und physiologischer Prozesse. Das ER-Lumen dient dabei als intrazellulärer Calciumspeicher, aus dem Ca²⁺-Ionen strikt reguliert freigesetzt werden (siehe 1.3). Über der ER-Membran liegt im Ruhezustand ein Calcium-Gradient von 3-4 Größenordnungen (Yu und Hinkle, 2000; Smith et al., 2001; Alvarez und Montero, 2002), für dessen Aufrechterhaltung Energie in Form von ATP bereitgestellt werden muss. Die Ergebnisse der Experimente unter asymmetrischen CaCl₂-Bedingungen zeigen, dass Ca²⁺-Ionen die Sec61-Pore deutlich schlechter permeieren können als Cl⁻-Ionen. Nach Alcaraz et al. (2004) nimmt die Selektivität einer weiten Pore mit abnehmender Elektrolytkonzentration zu, weil Ladungen in der Porenregion bei niedriger Ionenstärke der Pufferlösung weniger stark abgeschirmt und die effektiven Ladungen in der Pore dadurch erhöht werden. Untersuchungen an chloroplastidären PRAT-Proteinen haben diese Beobachtung bestätigt (Götze, 2009). Für die *in vivo* vorliegenden Konzentrationsbedingungen von $[Ca^{2+}]_{cyt} \approx 50 \text{ nM} - 100 \text{ nM}$ (Yu und Hinkle, 2000; Smith et al., 2001) und $[Ca^{2+}]_{lum} \approx 500 \text{ } \mu\text{M}$ (Yu und Hinkle, 2000; Alvarez und Montero, 2002) wäre demnach eine deutlich höhere Selektivität des Sec61-Kanals gegenüber Calciumionen zu erwarten, als in den elektrophysiologischen Experimenten beobachtet wurde. Es ist denkbar, dass die Selektivitätseigenschaften zur Limitierung des passiven Calcium-Ausstromes aus dem ER-Lumen beitragen und somit sowohl für die Regulation der Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER-Lumen als auch für den Energiehaushalt der Zelle von Bedeutung sind.

Da die tatsächlichen Ladungs- und Ionenverhältnisse an der ER-Membran aufgrund der Vielzahl der vorhandenen Ionen und weiterer geladener Moleküle überaus komplex sind, wird hier auf eine abschließende Aussage über die physiologische Bedeutung der Selektivität des Sec61-Kanals *in vivo* verzichtet.

4.5 Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit und *voltage gating*

Sowohl für die RM-Probe als auch für den aufgereinigten Sec61-Komplex ergibt sich aus Experimenten mit KCl-Elektrolyten eine maximale Offenwahrscheinlichkeit von 90 % bei einem Haltepotenzial von 0 mV, die symmetrisch für positive und negative Spannungen auf 40-50 % bei ± 50 mV abnimmt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus anderen Studien am Sec61-Komplex überein (Wirth et al., 2003; Wonderlin, 2009). Unter Verwendung von CaCl_2 -Lösungen zeigen sich unterschiedliche Werteverläufe für beide Proben. Hier kann für raue Mikrosomen eine Verringerung der maximalen Offenwahrscheinlichkeit um 20-30 % im Vergleich zu den Experimenten mit KCl-Puffer beobachtet werden. Des Weiteren nehmen die Offenwahrscheinlichkeiten für ansteigende Klemmspannungen weniger stark ab als unter KCl-Bedingungen beobachtet, so dass auch eine verringerte Spannungssensitivität im Gating des Kanals auftritt. Im Gegensatz dazu sind für den aufgereinigten Sec61-Komplex nahezu identische Offenwahrscheinlichkeiten in KCl- und CaCl_2 -Lösungen zu beobachten. Die Calcium-abhängige Veränderung des *voltage gating*s wird somit vermutlich von einer peripheren Translokonzonkomponente vermittelt. Ein möglicher Kandidat dafür ist Sec62, für das computergestützte Analysen (www.bioinformatics.org/calpred/index.html) ein charakteristisches Ca^{2+} -Bindemotiv (EF-Hand-Motiv) vorhersagen.

In Experimenten mit MgCl_2 -Elektrolytlösungen kann keine Herabsetzung der Offenwahrscheinlichkeit des RM-Kanals im Vergleich zu Experimenten mit KCl-Lösungen beobachtet werden, so dass eine Calcium-spezifische Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit postuliert werden muss. Es ergibt sich die Frage, ob dieser Effekt physiologisch von Bedeutung ist. *In vivo* liegen die maximalen intrazellulären Konzentrationen an freiem Ca^{2+} deutlich unter 1 mM, während die Konzentrationen an K^+ (≈ 140 mM), Na^+ (≈ 12 mM), und Cl^- (≈ 4 mM) (Lodish et al., 2004) wesentlich höher sind. Experimente mit RM-Präparationen unter symmetrischen Bedingungen von 100 mM KCl, 13 mM CaCl_2 haben keine reduzierte Offenwahrscheinlichkeit gezeigt (vergl. Abbildung 3.12 c). Diese Elektrolytbedingungen kommen den tatsächlichen Ionenkonzentrationen *in vivo* näher als die im Übrigen verwendeten CaCl_2 -Lösungen. Entsprechend ist mit den vorliegenden Daten keine abschließende Aussage zur physiologischen Relevanz der Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit möglich.

4.6 Interaktion mit Lanthan- und Aluminiumionen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Lanthan- und Aluminiumionen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Translokonzon-Kanals untersucht. Es

4.6 Interaktion mit Lanthan- und Aluminiumionen

hat sich gezeigt, dass Schaltereignisse die dem großen Leitwert zuzuordnen sind beim aufgereinigten Sec61-Komplex in Anwesenheit von 1 mM LaCl_3 inhibiert werden. In Experimenten unter asymmetrischen KCl-Elektrolytbedingungen ist für alle untersuchten Proben des Sec61-Kanals nach symmetrischer Zugabe von 1 mM LaCl_3 eine drastische Zunahme der Anionenselektivität zu beobachten. Das Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten kann für RM-Präparationen aus Stromspuren mit $P_{\text{Cl}^-}/P_{\text{K}^+}=10,4$ bestimmt werden, aus Strom-Spannungsrampen ergibt sich ein Wert von $P_{\text{Cl}^-}/P_{\text{K}^+}=8,2$ für den aufgereinigten Sec61-Komplex. Des Weiteren ist nach Zugabe von 1 mM LaCl_3 zu symmetrischen KCl-Lösungen ein Verlust des *voltage gating* zu beobachten, sowohl der Kanal aus RM-Präparationen als auch der aufgereinigte Sec61-Komplex zeigt für alle untersuchten Klemmspannungen Offenwahrscheinlichkeiten zwischen 80 % und 100 %. Dieser Effekt ist nicht seitenspezifisch und bei Zugabe von La^{3+} auf nur eine Seite des Bilayers abhängig von dessen Polarisierung. Außerdem hat sich gezeigt, dass AlCl_3 einen vergleichbaren Einfluss auf das spannungsabhängige Schaltverhalten des Komplexes hat. Lanthanionen sind hochaffine Effektoren für Calciumkanäle und blockieren deren Ionenpermeabilität effizient (Hille, 2001, Seite 123). Die trivalenten Kationen der Elementfamilie der Lanthanoide gleichen in ihren chemischen Eigenschaften, ihrer Koordinationszahl und ihrem Atomradius dem Calcium und interagieren entsprechend mit Calcium-Bindestellen in Proteinen (Nieboer, 1975). Dabei ist der Block der Ionenpermeation im Fall von Calciumkanälen sowohl auf eine sterische als auch auf eine elektrostatische Behinderung der Ca^{2+} -Ionen zurückzuführen (Lansman, 1990). Auch Aluminiumionen sind als nichtselektive Effektoren von Calciumkanälen beschrieben worden (Platt und Busselberg, 1994).

Alcaraz et al. (2009) haben beobachtet, dass das bakterielle Porin OmpF in KCl-Elektrolyten eine Kationenselektivität, in CaCl_2 -Lösungen jedoch eine Präferenz für Anionen zeigt. Diese Veränderung wurde mit einer Bindung von Ca^{2+} -Ionen in der Pore erklärt, die die negativen kanalintrinsischen Ladungen überkompensieren, was entsprechend zu einer Inversion der Selektivitätseigenschaften führt.

Die beobachtete Zunahme in der Selektivität des Sec61-Kanals nach Zugabe von La^{3+} kann mit einem ähnlichen Mechanismus erklärt werden. Unter asymmetrischen KCl-Elektrolytbedingungen ist die Sec61-Pore leicht anionenselektiv, was auf eine geringe positive Nettoladung der Porenregion hindeutet. Bindet La^{3+} als trivalentes Kation an negative Ladungen in der Restriktionszone oder in den Vestibülen, so führt dieses zu einer erhöhten positiven Nettoladung der Porenregion und die Anionenselektivität nimmt zu.

Spannungsabhängiges Schaltverhalten eines Ionenkanals wird zumeist über geladene oder polare Gruppen (*gating charges*) in der Pore vermittelt, die sich in Abhängigkeit

vom elektrischen Feld in der Membranebene bewegen und so die stabilen Konformationen des Kanals bestimmen (Hille, 2001, Seite 56ff., 603ff.). Der beobachtete Verlust des spannungsabhängigen Schließens des Sec61-Kanals in Anwesenheit von LaCl_3 und AlCl_3 legt nahe, dass es nach Zugabe der trivalenten Kationen zu einer Abschirmung der *gating charges* in der Sec61-Pore kommt. Da dieser Effekt bei ausschließlicher Zugabe von La^{3+} bzw. Al^{3+} in eine der beiden Messkammern nur auftrat, wenn das Ion aufgrund seiner Ladung bei der angelegten Klemmspannung in die Pore getrieben wurde, handelt es sich um eine elektrophoretische Interaktion der Kationen mit dem Kanal.

4.7 Abschätzung des Porendurchmessers aus den Leitwerten

Der Porendurchmesser des Sec61-Kanals wurde nach Hille (2001) aus den ermittelten Leitwerten abgeschätzt. Diese Methode kann nur als grobe Näherung gesehen werden, da das zugrundeliegende Modell von einem idealisiert zylinderförmigen Kanal ausgeht, durch den die Ionen unabhängig voneinander und ohne Wechselwirkung mit intrinsischen geladenen oder polaren Gruppen permeieren.

Es hat sich gezeigt, dass der spezifische Widerstand einer Elektrolytlösung in einer Pore deutlich vom spezifischen Widerstand der umgebenden Lösung abweicht. Diesbezüglich haben Smart et al. (1997) aus Vergleichen von experimentell ermittelten Leitwertdaten mit Kristallstrukturen von bekannten Kanälen einen Korrekturfaktor von 5 abgeleitet. Eine hochaufgelöste Struktur des Sec61-Komplexes konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Legt man die Kristallstruktur des Sec61-homologen SecY-Komplexes aus *M. jannaschii* zugrunde, so ist von einer kurzen Restriktionszone im Sec61-Kanal auszugehen (Van den Berg et al., 2004). Menetret et al. (2008) haben gezeigt, dass die SecYE β -Kristallstruktur ohne große Veränderungen in die mittels Cryo-Elektronenmikroskopie gewonnene Elektronendichtekarte des Sec61-Komplexes aus *C. familiaris* eingepasst werden kann. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass der Sec61- und der SecY-Komplex eine übereinstimmende 3-D-Struktur aufweisen könnten. Ausgehend von einer Länge der Restriktionszone von 5-10 Å ergeben sich Änderungen im Porendurchmesser von 5-7 Å für den Hauptleitwert und von 12-14 Å für den Unterleitwert des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen (3.1.9). Der maximale Porendurchmesser liegt im Bereich von 30-34 Å. Diese Werte stimmen gut mit Abschätzungen des Porendurchmessers aus den Leitwerten des Sec61-Kanals in früheren Studien überein (Wirth, 2003; Erdmann, 2004). Saparov et al. (2007) haben aus elektrophysiologischen Experimenten mit dem über Disulfidbrücken im Offenzustand fixierten SecY-Komplex aus *E. coli* Durchmesser von 7,4 Å und 14,6 Å für Leitwerte von 202 pS und 940 pS in 150 mM KCl bei einer Länge der Restriktionszone von 30 Å approximiert. Unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors

4.8 Regulation des Sec61-Komplexes durch Calmodulin

nach Smart et al. (1997) erhöhen sich diese Werte auf 17 Å und 44 Å. Ausgehend von einem einheitlichen Modell ergeben die Abschätzungen der Kanaldurchmesser des Sec61-Komplexes aus *C. familiaris* und des SecY-Komplexes aus *E. coli* nach Hille somit vergleichbare Werte.

Eine weitere elektrophysiologische Untersuchung der Porengröße des Sec61-Kanals mittels Polymerausschlussmethode hat Porendurchmesser von 26 Å für den kleinen und von 60 Å für den großen Leitwert ergeben (Wirth et al., 2003), aus Fluoreszenz-Quenching-Experimenten mit NAD⁺ und Antikörper Fab-Fragmenten wurde ein maximaler Durchmesser von 40-60 Å abgeleitet (Hamman et al., 1997). Im Gegensatz dazu weisen die Kristallstrukturen des inaktiven, geschlossenen SecYE β -Komplexes aus *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg et al., 2004) und des SecYE-Komplexes aus *Thermus thermophilus* (Tsukazaki et al., 2008) Durchmesser von 5-8 Å bzw. 5-10 Å auf. Aus der Kristallstruktur des SecYEG-Komplexes aus *Thermotoga maritima* (Zimmer et al., 2008) kann ein Durchmesser 7-12 Å ermittelt werden. *Molecular dynamics* Simulationen der Translokation von Modellsubstraten durch den SecYE β -Kanal deuten auf maximale Porendurchmesser von 7-12 Å und 6-10,5 Å (Gumbart und Schulten, 2006) sowie 16 Å (Tian und Andricioaei, 2006) hin.

Im Vergleich zeigt sich, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie auch die von Wirth (2003) und Hamman et al. (1997) ermittelten Porendurchmesser nicht mit den Kristallstrukturen des SecYE β - bzw. SecYEG-/SecYE-Monomers konsistent sind. Stattdessen ist ein Kanal mit den entsprechenden Porendimensionen im aktiven Sec61-Translokon gut über eine Oligomerisierung nach dem front-to-front-Modell von Mitra et al. (2005) und Mitra und Frank (2006) zu erklären, nachdem zwei Sec61-Komplexe eine konsolidierte Pore bilden.

4.8 Regulation des Sec61-Komplexes durch Calmodulin

Für eine Vielzahl von Ionenkanälen ist eine Calcium-abhängige, Calmodulin-vermittelte Regulation bekannt (siehe 1.4). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch das Sec61-Translokon mit Calmodulin interagiert und wie sich seine elektrophysiologischen Eigenschaften in Anwesenheit von Ca²⁺-Calmodulin oder Calcium-freiem ApoCalmodulin verändern.

Coflotationsexperimente mit Proteoliposomen mit aufgereinigtem, rekonstituierten Sec61-Komplex und Rhodamin-6G-markiertem Calmodulin zeigen sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit freier Ca²⁺-Ionen eine Colokalisation von CaM mit der Sec61 α -Untereinheit (3.1.10.1). In Kontrollexperimenten mit Proteoliposomen mit dem aufgereinigten, rekonstituierten SecYEG-Komplex aus *E. coli*, dem aufgereinigten, rekonsti-

4 Diskussion

tuierten Tom 40 aus *S. cerevisiae* und Protein-freien Liposomen kann hingegen keine Flotation von Calmodulin beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Calmodulin spezifisch mit der α , β - oder γ -Untereinheit des Sec61 interagiert und dass die Bindestelle von cytosolischer oder luminaler Seite zugänglich sein muss. Des Weiteren assoziiert Calmodulin in diesen Experimenten nicht nur in Anwesenheit von freiem Ca^{2+} , sondern ebenfalls als Calcium-freies ApoCalmodulin mit dem Sec61-Komplex. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der elektrophysiologischen Versuche und FCS-Experimente, die eine strikt Calcium-abhängige Interaktion von CaM mit dem Sec61-Komplex bzw. dem isolierten Sec61 α IQ-Peptid zeigen. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass CaM auch an eine Bindestelle für ER-luminale EF-Hand-Proteine am Sec61-Komplex binden kann. Computergestützte Analysen haben in diesem Zusammenhang eine luminalen CaM-Bindestelle auf der Sec61 α -Untereinheit vorhergesagt (3.1.10.3). Biochemische Untersuchungen haben ergeben, dass die luminalen EF-Hand-Proteine Reticulocalbin und Calumenin über Sec63 mit dem Translokator interagieren (Tyedmers et al., 2005).

In Stromspuren aus Einzelkanalexperimenten lässt sich beobachten, dass der Sec61-Kanal aus RM-Präparationen in Anwesenheit freier Calciumionen nach symmetrischer Zugabe von 500 nM CaM fast vollständig schließt (3.1.10.2). Der für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben charakteristische Leckstrom tritt nach Calmodulin-Zugabe nicht mehr auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der entsprechende Ionenfluss über einen Effektor-induzierbaren Gating-Mechanismus reguliert werden kann. Ob die verbleibende Kanalaktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} -CaM einem Schalten im Leckleitwert oder im Hauptleitwert zuzuordnen ist, kann jedoch nicht zweifelsfrei geklärt werden. Wird freies Ca^{2+} in der verwendeten KCl-Elektrolytlösung mit Hilfe von EGTA chelatiert, so ist keine Veränderung im Offenzustand des Kanals nach CaM-Zugabe zu beobachten. Der Calmodulin-Effekt zeigt sich damit als strikt Calcium-abhängig.

In Anwesenheit freien Calciums kann eine deutliche Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Kanals aus rauen Mikrosomen nach CaM-Zugabe festgestellt werden. In Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen tritt keine Veränderungen nach CaM-Zugabe auf. Des Weiteren ist in Kontrollexperimenten mit Strom-Spannungsrampen in Anwesenheit von Calmodulin ein Schließen des Kanals erst nach Zugabe freier Ca^{2+} -Ionen zu beobachten. Diese Ergebnisse bestätigen, dass nicht nur die Bindung von Calmodulin an das Translokator, sondern auch die Bindung von Ca^{2+} an CaM und damit dessen Aktivierung essenziell für die Regulation des Offenzustandes und der Ionenleitfähigkeit des Kanals ist.

Untersuchungen mit Strom-Spannungsrampen zeigen, dass 150-200 nM CaM ausreichen,

4.8 Regulation des Sec61-Komplexes durch Calmodulin

um das Schließen des Kanals aus RM-Präparationen zu induzieren. Somit bindet CaM mit hoher Affinität an die Bindungsstelle im Translokon-Komplex. Außerdem wirkt Calmodulin auch auf den aufgereinigten Sec61-Komplex, der beobachtete Effekt stimmt mit dem aus Messungen mit rauen Mikrosomen überein. Dieses Ergebnis ist mit den Beobachtungen der Coiflotationsexperimente konsistent, die CaM-Bindestelle ist demnach auf der α -, β - oder γ -Untereinheit des Sec61 lokalisiert.

Mit Hilfe computergestützter Methoden wurde ein IQ-Motiv als putative Calmodulin-Bindestelle im cytosolischen N-Terminus der Sec61 α -Untereinheit identifiziert (3.1.10.3). Der entsprechende Sequenzabschnitt wurde synthetisiert, fluoreszenzmarkiert und die Interaktion mit Calmodulin mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie untersucht (3.1.10.4). In Anwesenheit freier Ca²⁺-Ionen kann eine Bindung von CaM und GST-CaM an das Sec61 α IQ-Peptid beobachtet werden. Die Dissoziationskonstanten liegen bei 130 nM und 119 nM. Wird Calcium im verwendeten Puffer mit Hilfe von EGTA chelatiert, so findet eine Bindung von CaM und GST-CaM an das Sec61 α IQ-Peptid erst bei deutlich höheren Konzentrationen statt. Die FCS-Experimente zeigen, dass das Sec61 α IQ-Motiv eine Calcium-abhängige Bindung von Calmodulin an das Translokon vermittelt. Die Affinitäten liegen dabei im Bereich der für ein Schließen eines einzelnen Sec61-Kanals im elektrophysiologischen Experiment notwendigen CaM-Konzentration. Des Weiteren zeigen die FCS-Experimente in Übereinstimmung mit den elektrophysiologischen Ergebnissen, dass nur Ca²⁺-CaM, nicht aber Ca²⁺-freies ApoCaM auf das Translokon wirkt und dabei am Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Komplex angreift.

IQ-Motive vermitteln im Allgemeinen eine Calcium-unabhängige Bindung von Calmodulin an das Zielprotein (Rhoads und Friedberg, 1997; Bähler und Rhoads, 2002; Yamniuk und Vogel, 2004), während für eine Calcium-abhängige Interaktion mit CaM unter anderem das 1-8-14-, 1-5-8-14- und das 1-5-10-Motiv als Konsensussequenzen beschrieben wurden (Rhoads und Friedberg, 1997; Yamniuk und Vogel, 2004). Es stellt sich die Frage, warum das Sec61 α IQ-Motiv eine Ca²⁺-abhängige Bindung von CaM zeigt. Das Peptid kann aufgrund seiner Aminosäuresequenz nicht nur dem IQ-Konsensusmotiv von MyosinV, Neurograngin und Neuromodulin, sondern ebenfalls dem 1-8-14-Motiv zugeordnet werden (Rhoads und Friedberg, 1997, siehe 3.1.10.3). Die beobachtete Ca²⁺-abhängige Bindung von CaM stimmt mit den Ergebnissen aus Untersuchungen an anderen Proteinen überein, deren IQ-Motive die Charakteristika des 1-5-8-14-Motives tragen. So wurde für Nina-C-Myosin aus *Drosophila melanogaster* (Porter et al., 1995) und den RasGRF-1 Austauschfaktor (Farnsworth et al., 1995) ebenfalls eine Calcium-abhängige Bindung von CaM an das jeweilige IQ-Motiv gezeigt. Typ M K⁺-Kanäle tragen ein IQ-Motiv, das auch dem 1-5-10-Motiv zugeordnet werden kann und das ebenfalls eine Calcium-abhängige Bindung von Calmodulin vermittelt (Gamper und Shapiro, 2003).

4 Diskussion

Es wird angenommen, dass der Translokonkanal während der cotranslationalen Translokation impermeabel für Ionen ist (Simon und Blobel, 1991; Crowley et al., 1994; Hamman et al., 1997; Roy und Wonderlin, 2003; Wirth et al., 2003). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Aktivierung des Sec61-Kanals durch Ribosomen-Depletion gezeigt werden (3.1.1). Wird die naszierende Polypeptidkette durch Behandlung mit Puromycin oder Pactamycin entfernt, so ist für den Ribosom-Translokon-Komplex eine Permeation kleiner Moleküle und Ionen zu beobachten (Simon und Blobel, 1991; Heritage und Wonderlin, 2001; Lomax et al., 2002; Roy und Wonderlin, 2003; Van Coppenolle et al., 2004; Flourakis et al., 2006; Lizak et al., 2006; Giunti et al., 2007; Ong et al., 2007; Amer et al., 2009). Mehrere Studien legen nahe, dass Ribosomen auch nach nativer Beendigung der Translokation teilweise in einer stabilen Assoziation mit dem Translokon verbleiben (Borgese et al., 1973; Seiser und Nicchitta, 2000; Potter und Nicchitta, 2002; Schaletzky und Rapoport, 2006). Neben der vorliegenden Arbeit haben weitere elektrophysiologische Untersuchungen ebenfalls hohe Ionenleitfähigkeiten für den Ribosomen-depletierten Sec61-Komplex gezeigt (Wirth et al., 2003; Wonderlin, 2009). Verschiedene Autoren haben vorgeschlagen, dass das ER-luminale Chaperon BiP die wassergefüllte Pore des Sec61-Kanals verschließt (Hamman et al., 1998; Haigh und Johnson, 2002; Wirth et al., 2003; Alder et al., 2005), während Untersuchungen am intakten ER und damit in Anwesenheit von BiP eine Permeation kleiner Moleküle und Ca^{2+} -Ionen durch den Sec61-Kanal gezeigt haben (Heritage und Wonderlin, 2001; Lomax et al., 2002; Roy und Wonderlin, 2003; Van Coppenolle et al., 2004; Flourakis et al., 2006; Ong et al., 2007). Ein stimmiges Bild der Regulation des Translokon-vermittelten basalen Calcium-Leckstromes aus dem ER ergibt sich somit bisher nicht.

Unter Einbeziehung der beobachteten Regulation des Sec61-Komplexes durch Calmodulin stellt sich die Frage, warum in den Experimenten am intakten ER ein Translokon-vermittelter Ca^{2+} -Ausstrom beobachtet werden konnte. Bei Lomax et al. (2002) wurden die verwendeten Pankreas-Zellen aus *Mus musculus* perfundiert und die Konzentration an cytosolischem Ca^{2+} mit 10 mM BAPTA auf 90 nM eingestellt, bei Van Coppenolle et al. (2004) und Flourakis et al. (2006) wurden LNCaP-Zellen mit Digitonin permeabilisiert, kontinuierlich perfundiert und die Konzentration an cytosolischem Ca^{2+} mit EGTA auf 170 nM eingestellt. Es liegt nahe, dass durch die Perfusion der Zellen ein Großteil des cytosolischen Calmodulins entfernt wurde. Freies Ca^{2+} wurde zudem nicht nur durch BAPTA oder EGTA, sondern auch durch die verwendeten Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffe chelatiert. Es ist davon auszugehen, dass die Konzentrationen an cytosolischem Ca^{2+} deutlich unter den Affinitäten der N- und C-terminalen Domäne von CaM für Ca^{2+} -Ionen lagen ($K_D \approx 2 \mu\text{M}$ bzw. $0,2 \mu\text{M}$, Potter et al., 1983; Ogawa und Tanoku-

ra, 1984). Somit wurden die Bedingungen in den genannten Experimenten so gewählt, dass das cytosolische Calmodulin als Calcium-freies ApoCalmodulin vorlag. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war die CaM-Regulation des Sec61-Kanals damit nicht wirksam.

Physiologische Bedeutung der Regulation des Sec61-Komplexes durch CaM

Die kontrollierte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER in das Cytosol der Zelle reguliert eine Vielzahl physiologischer und biochemischer Prozesse wie Muskelkontraktion, Exocytose und Apoptose (Berridge et al., 2000). Der Kontrollmechanismus für diesen Vorgang wird als *Ca²⁺-induced Ca²⁺-release* (CICR) bezeichnet. Dabei werden Inositol-1,4,5-Trisphosphat- und Ryanodin-Rezeptoren (IP3-R/RyR) in der ER-Membran durch Calcium aktiviert. Beide Kanäle vermitteln daraufhin eine zusätzliche Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER. Die so entstehenden lokal erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen (Calcium-Puffs oder -Sparks) an der ER-Membran können örtlich abgegrenzt biochemische Vorgänge regulieren sowie weitere IP3-R und RyR aktivieren und damit zellweite Ca^{2+} -Signale auslösen (Berridge et al., 2003; Berridge, 2006). Ein unkontrollierter Calcium-Leckstrom durch den weiten Sec61-Kanal würde die zeitlich und räumlich strikt koordinierte Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen auf der cytosolischen Seite der ER-Membran in erheblichem Maße stören. Elektrophysiologische Untersuchungen haben ergeben, dass Ca^{2+} -Konzentrationen $\leq 1 \mu\text{M}$ für die Aktivierung des IP3-R (Boehning et al., 2001; Foskett et al., 2007) sowie von 1-10 μM für die Aktivierung des RyR (Xu et al., 1996) ausreichend sind. Es wird davon ausgegangen, dass der von einem einzelnen IP3-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Strom weitere IP3-R oder RyR aktivieren und so einen *saltatorischen* Mechanismus auslösen kann (Berridge, 2006; Foskett et al., 2007). Es ist anzunehmen, dass ein unkontrollierter Calcium-Leckstrom durch den weiten Sec61-Kanal bei hinreichender räumlicher Nähe ebenfalls IP3- bzw. Ryanodin-Rezeptoren aktivieren und damit die Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung auslösen könnte.

Über der Membran des ER besteht im Ruhezustand der Zelle ein Calcium-Gradient von 3-4 Größenordnungen (Yu und Hinkle, 2000; Smith et al., 2001; Alvarez und Montero, 2002). Calcium-Leckströme werden über einen aktiven Uptake-Mechanismus durch SERCA-ATPasen kompensiert. Dabei wird für zwei transportierte Ca^{2+} -Ionen ein ATP hydrolysiert (Wuytack et al., 2002). Es ist somit nicht nur für die Kontrolle der Calcium-Homeostase an der ER-Membran, sondern auch für die Effizienz des cytosolischen Energiemetabolismus unabdingbar, einen Ca^{2+} -Leckstrom durch den Sec61-Kanal zu regulieren.

Für verschiedene Ionenkanäle wurde eine Ca^{2+} -abhängige, negative Feedback-Regulation über Calmodulin gezeigt, die allgemein als *calcium-dependent inactivation* (CDI) be-

zeichnet wird. So führt ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch neuronale NMDA-Rezeptoren zu einer Bindung von CaM an die cytosolischen C-Termini der NR1-Untereinheiten, was eine reversible Dimerisierung und ein Schließen des Kanals zur Folge hat (Wang et al., 2008). Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich dabei die Leitwerte des Kanals kaum verändern, die Offenwahrscheinlichkeit aber deutlich reduziert wird (Rycroft und Gibb, 2004). Bei Ca_v1 und Ca_v2 Ca^{2+} -Kanälen wird eine calciumabhängige Inaktivierung über eine permanente Interaktion von CaM/ApoCaM mit einem IQ-Motiv am cytosolischen C-Terminus der α_{1C} -Untereinheit reguliert. Die Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand-Motive EF_1 und EF_2 im N-Terminus oder EF_3 und EF_4 im C-Terminus des CaM induziert dabei ein Schließen des Kanals als Antwort auf eine lokal erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in unmittelbarer Nähe der Pore oder auf einen zellweiten Anstieg des cytosolischen Calciumlevels (Dunlap, 2007; Dick et al., 2008; Tadross et al., 2008). Auch für den TRPV6- Ca^{2+} -Kanal ist eine CaM-vermittelte negative Feedback-Regulation durch Ca^{2+} gezeigt worden. Hier bindet Ca^{2+} -CaM reversibel an ein C-terminales 1-5-10-Motiv und führt zu einer deutlichen Verringerung des elektrophysiologisch messbaren Stromes (Derler et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen einen CDI-Mechanismus für die Regulation der Ionenkanalaktivität des Sec61-Komplexes nahe. Ob dieser *in vivo* durch die Ca^{2+} -Permeation durch den Kanal selber oder auch durch einen generellen Anstieg der Calciumkonzentration an der ER-Membran induziert wird, kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Des Weiteren bleibt zu untersuchen, ob alle vier EF-Hand-Motive des Calmodulins mit Ca^{2+} -Ionen besetzt sein müssen, oder ob eine Sättigung der N- oder C-terminalen Domäne ausreicht, um das Schließen des Kanals zu vermitteln.

4.9 Veränderungen durch Ribosomen

Zu Beginn der cotranslationalen Translokation werden Ribosomen mit naszierender Polypeptidkette im Cytosol der Zelle SRP-vermittelt an die ER-Membran geführt, wo sie an das Translokon binden und im Folgenden die Vorstufenproteine direkt in den wassergefüllten Sec61-Kanal synthetisieren (siehe 1.2.2).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Sec61-Komplexes aus PKRM-Präparationen in Anwesenheit von Ribosomen verändern (3.1.11). Der Kanal zeigt nach Zugabe von Ribosomen vermehrt Konformationsänderungen im Bereich des großen Leitwertes. Ein Vergleich der Leitwerthistogramme verdeutlicht, dass sich die Maxima der Gaußanpassungen für Haupt- und Unterleitwert durch Ribosomenzugabe nicht signifikant verändern.

Es ist bekannt, dass die Bindung des Ribosoms an das Translokon maßgeblich vom

Sec61-Komplex vermittelt wird (Kalies et al., 1994). Eine Proteolyse der cytosolischen Loops L6 und L8 der Sec61 α -Untereinheit inhibiert die Interaktion (Raden et al., 2000), deren Affinität von der Aminosäureabfolge im Loop L8 bestimmt wird (Cheng et al., 2005). Die entsprechenden Dissoziationskonstanten wurden mit 18 nM für die Interaktion von Ribosomen mit PKRM-Präparationen aus *C. familiaris* (Raden et al., 2000) und 4-14 nM für die Bindung an den Sec61-Komplex aus *C. familiaris* und den Sec61p- sowie den homologen Ssh1p-Komplex aus *S. cerevisiae* (Prinz et al., 2000a) ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass bereits eine Ribosomenkonzentration von 7,5 nM beidseitig der Membran zu Veränderungen in den elektrophysiologischen Eigenschaften des PKRM-Kanals führt. Dieser Wert deutet auf eine hochaffine Interaktion hin und liegt im Bereich der publizierten Dissoziationskonstanten.

Wonderlin (2009) hat in *Patch-Clamp*-Experimenten mit ER-Mikrosomen aus dem Pankreas von *Sus scrofa* und aus CHO-Zellen beobachtet, dass nach Zugabe der aufgereinigten ribosomalen 60S-Untereinheit die Spannungsabhängigkeit im *voltage gating* des Sec61-Kanals verringert und die Offenwahrscheinlichkeit bei Membranpotenzialen über ± 10 mV erhöht war. Außerdem konnte eine Zunahme des absoluten Leitwertes festgestellt werden während der Einzelkanalleitwert sich nicht maßgeblich veränderte. Es wurde geschlussfolgert, dass es in Anwesenheit der 60S-Untereinheit zu einer Aktivierung weiterer Sec61-Kanäle im Translokation-Komplex kommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit denen von Wonderlin (2009) überwiegend nicht konsistent. So kann nach Zugabe von Ribosomen weder eine Veränderung der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit noch eine Zunahme des Gesamtstromes beobachtet werden. Eine Ribosomen-vermittelte Induzierung weiterer Sec61-Kanäle im Translokation ist damit nicht zu bestätigen.

Crowley et al. (1994) und Hamman et al. (1997) haben aus Quenching-Experimenten mit fluoreszenzmarkierten naszierenden Polypeptidketten und Iodionen geschlossen, dass die Verbindung zwischen Ribosom und Translokationskanal nicht von Ionen passiert werden kann. Im Gegensatz dazu zeigt die mittels Cryo-Elektronenmikroskopie gewonnene Struktur des Ribosom-Translokation-Komplexes einen Abstand von ca. 15 Å zwischen den beiden Interaktionspartnern (Beckmann et al., 2001; Morgan et al., 2002). Außerdem haben verschiedene Studien belegt, dass der Substrat-freie Ribosom-Translokation-Komplex eine Permeation kleiner Moleküle und Ionen erlaubt (Simon und Blobel, 1991; Heritage und Wonderlin, 2001; Lomax et al., 2002; Roy und Wonderlin, 2003; Van Coppenolle et al., 2004; Flourakis et al., 2006; Lizak et al., 2006; Giunti et al., 2007; Ong et al., 2007; Amer et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit dieser Beobachtung überein. Ein Schließen des Sec61-Kanals oder ein Rückgang des Gesamtstromes tritt nach Ribosomen-Zugabe, auch in Übereinstimmung mit Wonderlin (2009), nicht

auf.

4.10 Elektrophysiologische Eigenschaften der rauen Mikrosomen aus *Canis familiaris* und *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Sec61-Kanal der RM-Präparationen aus *C. familiaris* auch die Kanalaktivität aus rauen Mikrosomen aus *S. cerevisiae* in ihren grundsätzlichen elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisiert.

Übereinstimmend konnten beide Proben erst nach Mega 9-vermittelter Veränderung der Lipidkomposition der Mikrosomenmembran und nachfolgender Depletion der Ribosomen mit Puromycin, GTP und KCl mit dem planaren Bilayer fusioniert werden (3.1.1; 3.2.1). Kontrollexperimente haben gezeigt, dass weder das für die Herstellung des planaren Bilayers verwendete L- α -PC Typ IV-S noch das für die Modifikation der Lipidzusammensetzung verwendete L- α -PC oder das dabei eingesetzte Mega 9 mit porenbildenden Proteinen kontaminiert waren. Des Weiteren fungiert Puromycin auch in Anwesenheit von GTP nicht als Ionophor (3.1.1). Entsprechend kann die beobachtete Kanalaktivität in den Hefe-Mikrosomen einer cotranslationalen, Ribosomen-assoziierten Translokationkonfiguration, dem Sec61p-, dem homologen Ssh1p- oder dem SEC'-Komplex zugeordnet werden (siehe 1.2.2). Der posttranslationale SEC-Komplex war in den untersuchten Proben nicht vorhanden oder lag ausschließlich im geschlossenen Zustand vor.

Das Schaltverhalten der Kanalaktivität aus *S. cerevisiae* ist nicht von dem des Sec61-Kanals aus *C. familiaris* zu unterscheiden. Beide zeigen eine Vielzahl an unterschiedlichen Stromniveaus und eine hohe Variabilität der entsprechenden Schaltfrequenzen, ein energetisch bevorzugter Hauptoffenzustand kann nicht identifiziert werden. Koooperative Schaltereignisse über alle Unterniveaus hinweg vom vollständig geöffneten zum geschlossenen Zustand sind hingegen häufig zu beobachten. Übereinstimmend lassen sich die Leitwerte im jeweiligen Häufigkeitshistogramm in zwei Klassen einteilen. Die Hauptleitwerte ergeben sich aus den Maxima der Gaußanpassungen mit $151 \text{ pS} \pm 2 \text{ pS}$ (*C. f.*) und $209 \text{ pS} \pm 2 \text{ pS}$ (*S. c.*), während die Unterleitwerte bei $480 \text{ pS} \pm 19 \text{ pS}$ (*C. f.*) und $596 \text{ pS} \pm 10 \text{ pS}$ (*S. c.*) liegen (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7). Die mittleren Leitwerte sind somit für den Kanal aus *S. cerevisiae* im Vergleich mit dem Sec61-Komplex aus *C. familiaris* um 20-30 % erhöht. Weiterhin ist für beide Kanalaktivitäten ein Leckstrom charakteristisch, ein vollständiges Schließen der Kanäle bis auf 0 pA tritt nicht auf.

Aus den Leitwerten ergeben sich für die Abschätzung des Porendurchmessers nach Hille

4.10 Eigenschaften der rauen Mikrosomen aus *C. familiaris* und *S. cerevisiae*

leicht abweichende Werte. Geht man von einer kurzen Restriktionszone aus, so liegt die Änderung im Porendurchmesser für den kleinen Leitwert bei 5 Å bis 7 Å (*C. f.*) und 7 Å bis 8 Å (*S. c.*), während sich für den großen Leitwert Änderungen von 12 Å bis 14 Å (*C. f.*) bzw. 14 Å bis 17 Å (*S. c.*) ergeben. Der maximale Porendurchmesser liegt übereinstimmend im Bereich von 30 Å bis 34 Å.

Die Kanalaktivität der RM-Probe aus *S. cerevisiae* zeigt, wie auch der Sec61-Komplex aus *C. familiaris* eine überwiegend anionenselektive Pore. Des Weiteren kann in Messungen unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen für beide Mikrosomenpräparationen eine Abhängigkeit des Umkehrpotenziales vom Offenzustand des Kanals beobachtet werden. Aufgrund der niedrigen Fusionsraten der Probe aus *S. cerevisiae* und der Wertestreuung ist kein arithmetisches Mittel für das Umkehrpotenzial aus Strom-Spannungsrampen zu bestimmen. Für eine Untersuchung des Umkehrpotenziales über eine Strom-Spannungskennlinie aus Einzelkanalschaltereignissen konnten ebenfalls nicht genügend Daten aufgenommen werden.

Im Bezug auf die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit zeigen die RM-Kanäle aus *C. familiaris* und *S. cerevisiae* identische Charakteristika in KCl-Elektrolytlösungen. Beide Kanalaktivitäten zeigen eine maximale Offenwahrscheinlichkeit von ca. 90 % bei Haltepotenzialen zwischen +20 mV und -20 mV. Mit steigenden Spannungen nimmt die Offenwahrscheinlichkeit symmetrisch für positive und negative Potenziale bis auf ca. 40-60 % ab.

Zusammenfassend können in den grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanalaktivität aus *S. cerevisiae* im Vergleich zum Sec61-Kanal der RM-Probe aus *C. familiaris* kaum Unterschiede festgestellt werden. Aufgrund der niedrigen Erfolgsrate bei der Fusion der Proben mit dem planaren Bilayer (siehe 3.2.1), der daraus resultierenden Datenlage und der redundanten Schlussfolgerungen wird auf eine nochmalige Diskussion der im Einzelnen erbrachten Ergebnisse verzichtet.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Der Sec61-Komplex konstituiert eine ionenpermeable Pore im Translokon des Endoplasmatischen Retikulums. In rauen Mikrosomen liegt diese in einem geschlossenen Zustand vor, die Kanalaktivität wird durch Ribosomen-Depletion induziert. In posttranslationalen Präparationen (PKRM) wie auch im aufgereinigten Sec61-Komplex liegt der Kanal nach Detergens-vermittelter Modifikation der Lipidkomposition der Proteoliposomenmembran in einem aktiven Zustand vor.
- Der Kanal aus RM-Präparationen und im aufgereinigten Sec61-Komplex zeigt eine hohe Dynamik im Schaltverhalten mit einer Vielzahl von Unterleitwerten. In KCl-Lösungen ergeben sich Leitwertverteilungen mit zwei differenzierten Wertefraktionen die gut mit publizierten Daten übereinstimmen. In CaCl_2 -Elektrolyten ist für den Kanal der RM-Probe ein erhöhter Unterleitwert zu beobachten, dessen Häufigkeit im aufgereinigten Sec61-Komplex stark verringert ist.
- Der Kanal zeigt sowohl im vollständigen Translokon als auch im aufgereinigten Sec61-Komplex eine geringe Anionenselektivität in Experimenten mit KCl-Lösungen. Unter Verwendung von CaCl_2 - und MgCl_2 -Elektrolyten steigt diese deutlich an, was *in vivo* den Sec61-vermittelten, passiven Calcium-Ausstrom aus dem ER limitieren könnte.
- Die Anwesenheit von Lanthan- und Aluminiumionen bewirkt ebenfalls einen drastischen Anstieg der Anionenselektivität und überdies einen Verlust der Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit. Der Kanal liegt überwiegend in der vollständig geöffneten Konformation vor.
- Calmodulin vermittelt ein Calcium-abhängiges, nahezu vollständiges Schließen des Kanals aus RM-Präparationen und im aufgereinigten Sec61 $\alpha\beta\gamma$ -Komplex. Calcium-freies ApoCalmodulin hat keinerlei Effekt auf den Offenzustand. Die putative Calmodulin-Bindestelle im cytosolischen N-Terminus der Sec61 α -Untereinheit bindet Ca^{2+} -CaM mit nanomolarer Affinität, eine Interaktion mit ApoCaM ist erst bei deutlich höheren Konzentrationen zu beobachten. Die CaM-vermittelte, negative Feedback-Regulation des Sec61-Komplexes durch Calcium legt einen CDI-Mechanismus nahe, der die Membranbarriere des Endoplasmatischen Retikulums auch in Anwesenheit des weiten Translokonkanals aufrecht erhält.

- Ribosomen führen in nanomolaren Konzentrationen zu einem vermehrten Auftreten des großen Leitwertes des Sec61-Kanals. Damit erlaubt dieser auch in Anwesenheit von Substrat-freien Ribosomen die Permeation von Ionen. Eine verringerte Variabilität im Schaltverhalten, ein Rückgang des Gesamtstromes oder ein Schließen der Pore tritt hingegen nicht auf.
- Die Kanalaktivität aus RM-Präparationen aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigt im Hinblick auf das Schaltverhalten, die Leitwertverteilung, die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit und die Porengröße nach Hille übereinstimmende Charakteristika mit dem Sec61-Komplex aus RM-Präparationen aus *Canis familiaris*.

Literatur

- Abell et al. 2003** ABELL, B.M. ; JUNG, M. ; OLIVER, J.D. ; KNIGHT, B.C. ; TYEDMERS, J. ; ZIMMERMANN, R. ; HIGH, S.: Tail-anchored and signal-anchored proteins utilize overlapping pathways during membrane insertion. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 8, S. 5669–5678
- Abell et al. 2004** ABELL, B.M. ; POOL, M.R. ; SCHLENKER, O. ; SINNING, I. ; HIGH, S.: Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. In: *EMBO J* 23 (2004), Nr. 14, S. 2755–2764
- Adelman et al. 1973** ADELMAN, M. R. ; SABATINI, D. D. ; BLOBEL, G.: Ribosome-membrane interaction. Nondestructive disassembly of rat liver rough microsomes into ribosomal and membranous components. In: *J Cell Biol* 56 (1973), Nr. 1, S. 206–229
- Adkins et al. 2000** ADKINS, C. E. ; MORRIS, S. A. ; DE SMEDT, H. ; SIENAERT, I. ; TOROK, K. ; TAYLOR, C. W.: Ca²⁺-calmodulin inhibits Ca²⁺ release mediated by type-1, -2 and -3 inositol trisphosphate receptors. In: *Biochem J* 345 Pt 2 (2000), S. 357–363
- Aguilera-Arzo et al. 2007** AGUILELLA-ARZO, M. ; GARCIA-CELMA, J. J. ; CERVERA, J. ; ALCARAZ, A. ; AGUILELLA, V. M.: Electrostatic properties and macroscopic electrodiffusion in OmpF porin and mutants. In: *Bioelectrochemistry* 70 (2007), Nr. 2, S. 320–327
- Alcaraz et al. 2004** ALCARAZ, A. ; NESTOROVICH, E. M. ; AGUILELLA-ARZO, M. ; AGUILELLA, V. M. ; BEZRUKOV, S. M.: Salting out the ionic selectivity of a wide channel: the asymmetry of OmpF. In: *Biophys J* 87 (2004), Nr. 2, S. 943–957
- Alcaraz et al. 2009** ALCARAZ, A. ; NESTOROVICH, E. M. ; LOPEZ, M. L. ; GARCIA-GIMENEZ, E. ; BEZRUKOV, S. M. ; AGUILELLA, V. M.: Diffusion, Exclusion, and Specific Binding in a Large Channel: A Study of OmpF Selectivity Inversion. In: *Biophys J* 96 (2009), Nr. 1, S. 56–66
- Alder und Johnson 2004** ALDER, N.N. ; JOHNSON, A.E.: Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 22, S. 22787–22790
- Alder et al. 2005** ALDER, N.N. ; SHEN, Y. ; BRODSKY, J.L. ; HENDERSHOT, L.M. ; JOHNSON, A.E.: The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. In: *JCB* 168 (2005), Nr. 3, S. 389–399
- Alvarez und Montero 2002** ALVAREZ, J. ; MONTERO, M.: Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin. In: *Cell Calcium* 32 (2002), Nr. 5-6, S. 251–260
- Amer et al. 2009** AMER, M. S. ; LI, J. ; O'REGAN, D. J. ; STEELE, D. S. ; PORTER, K. E. ; SIVAPRASADARAO, A. ; BEECH, D. J.: Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296 (2009), Nr. 4, S. H910–H916
- Anandatheerthavarada et al. 1999** ANANDATHEERTHAVARADA, H. K. ; BISWAS, G. ; MULLICK, J. ; SEPURI, N. B. ; OTVOS, L. ; PAIN, D. ; AVADHANI, N. G.: Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at ser128. In: *EMBO J* 18 (1999), Nr. 20, S. 5494–5504
- Antonin et al. 2000** ANTONIN, W. ; MEYER, H. A. ; HARTMANN, E.: Interactions between Spc2p and other components of the endoplasmic reticulum translocation sites of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 44, S. 34068–34072
- Bähler und Rhoads 2002** BÄHLER, M. ; RHOADS, A.: Calmodulin signaling via the IQ motif. In: *FEBS Lett* 513 (2002), Nr. 1, S. 107–113
- Barry und Lynch 1991** BARRY, P.H. ; LYNCH, J.W.: Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. In: *J Membr Biol* 121 (1991), S. 101–117

- Beauvois et al. 2004** BEAUVOIS, M. C. ; ARREDOUANI, A. ; JONAS, J. C. ; ROLLAND, J. F. ; SCHUIT, F. ; HENQUIN, J. C. ; GILON, P.: Atypical Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from a sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3-dependent Ca²⁺ pool in mouse pancreatic beta-cells. In: *J Physiol* 559 (2004), Nr. Pt 1, S. 141–156
- Becker 2008** BECKER, L.: *Elektrophysiologische Charakterisierung der Proteintranslokationsporen der Äußeren Mitochondrienmembran*, Universität Osnabrück, Dissertation, 2008
- Beckmann et al. 2001** BECKMANN, R. ; SPAHN, C.M. ; ESWAR, N. ; HELMERS, J. ; PENCZEK, P.A. ; SALI, A. ; FRANK, J. ; BLOBEL, G.: Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. In: *Cell* 107 (2001), Nr. 3, S. 361–72
- Van den Berg et al. 2004** BERG, B. Van den ; CLEMENS, W.M. ; COLLINSON, I. ; MODIS, Y. ; HARTMANN, E. ; HARRISON, S.C. ; RAPOPORT, T.A.: X-ray structure of a protein-conducting channel. In: *Nature* 427 (2004), Nr. 6969, S. 36–44
- Berridge 2006** BERRIDGE, M. J.: Calcium microdomains: organization and function. In: *Cell Calcium* 40 (2006), Nr. 5-6, S. 405–412
- Berridge et al. 2003** BERRIDGE, M. J. ; BOOTMAN, M. D. ; RODERICK, H. L.: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003), Nr. 7, S. 517–529
- Berridge et al. 2000** BERRIDGE, M. J. ; LIPP, P. ; BOOTMAN, M. D.: The versatility and universality of calcium signalling. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 (2000), Nr. 1, S. 11–21
- Blau et al. 2005** BLAU, M. ; MULLAPUDI, S. ; BECKER, T. ; DUDEK, J. ; ZIMMERMANN, R. ; PENCZEK, P. A. ; BECKMANN, R.: ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. In: *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005), Nr. 11, S. 1015–1016
- Blobel und Dobberstein 1975** BLOBEL, G. ; DOBBERSTEIN, B.: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. In: *J. Cell Biol.* 67 (1975), S. 835–851
- Boehning et al. 2001** BOEHNING, D. ; JOSEPH, S. K. ; MAK, D. O. ; FOSKETT, J. K.: Single-channel recordings of recombinant inositol triphosphate receptors in mammalian nuclear envelope. In: *Biophys J* 81 (2001), Nr. 1, S. 117–124
- Borgese et al. 1973** BORGESSE, D. ; BLOBEL, G. ; SABATINI, D. D.: In vitro exchange of ribosomal subunits between free and membrane-bound ribosomes. In: *J Mol Biol* 74 (1973), Nr. 4, S. 415–438
- Borgese et al. 2007** BORGESSE, N. ; BRAMBILLASCA, S. ; COLOMBO, S.: How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. In: *Curr Opin Cell Biol* 19 (2007), Nr. 4, S. 368–375
- Borgese et al. 2003** BORGESSE, N. ; COLOMBO, S. ; PEDRAZZINI, E.: The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. In: *J Cell Biol* 161 (2003), Nr. 6, S. 1013–1019
- Borgese et al. 2006** BORGESSE, N. ; FRANCOLINI, M. ; SNAPP, E.: Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. In: *Curr Opin Cell Biol* 18 (2006), Nr. 4, S. 358–364
- Breyton et al. 2002** BREYTON, C. ; HAASE, W. ; RAPOPORT, T. A. ; KUHLEBRANDT, W. ; COLLINSON, I.: Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. In: *Nature* 418 (2002), Nr. 6898, S. 662–665
- Brundage et al. 1990** BRUNDAGE, L. ; HENDRICK, J. P. ; SCHIEBEL, E. ; DRIESSEN, A. J. ; WICKNER, W.: The purified E. coli integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. In: *Cell* 62 (1990), Nr. 4, S. 649–657

Literatur

- Camello et al. 2002** CAMELLO, C. ; LOMAX, R. ; PETERSEN, O. H. ; TEPIKIN, A. V.: Calcium leak from intracellular stores—the enigma of calcium signalling. In: *Cell Calcium* 32 (2002), Nr. 5-6, S. 355–361
- Cannon et al. 2005** CANNON, K. S. ; OR, E. ; CLEMONS, W. M. ; SHIBATA, Y. ; RAPOPORT, T. A.: Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. In: *J Cell Biol* 169 (2005), Nr. 2, S. 219–225
- Chami et al. 2008** CHAMI, M. ; OULES, B. ; SZABADKAI, G. ; TACINE, R. ; RIZZUTO, R. ; PATERLINI-BRECHOT, P.: Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. In: *Mol Cell* 32 (2008), Nr. 5, S. 641–651
- Chattopadhyaya et al. 1992** CHATTOPADHYAYA, R. ; MEADOR, W. E. ; MEANS, A. R. ; QUIOCHO, F. A.: Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. In: *J Mol Biol* 228 (1992), Nr. 4, S. 1177–1192
- Chen et al. 2001** CHEN, X. ; VANVALKENBURGH, C. ; LIANG, H. ; FANG, H. ; GREEN, N.: Signal peptidase and oligosaccharyltransferase interact in a sequential and dependent manner within the endoplasmic reticulum. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 4, S. 2411–2416
- Cheng und Lederer 2008** CHENG, H. ; LEDERER, W. J.: Calcium sparks. In: *Physiol Rev* 88 (2008), Nr. 4, S. 1491–1545
- Cheng et al. 2005** CHENG, Z. ; JIANG, Y. ; MANDON, E. C. ; GILMORE, R.: Identification of cytoplasmic residues of Sec61p involved in ribosome binding and cotranslational translocation. In: *J Cell Biol* 168 (2005), Nr. 1, S. 67–77
- Chigri et al. 2006** CHIGRI, F. ; HORMANN, F. ; STAMP, A. ; STAMMERS, D. K. ; BOLTER, B. ; SOLL, J. ; VOTHKNECHT, U. C.: Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), Nr. 43, S. 16051–16056
- Chirico et al. 1988** CHIRICO, W. J. ; WATERS, M. G. ; BLOBEL, G.: 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. In: *Nature* 332 (1988), Nr. 6167, S. 805–810
- Christis et al. 2008** CHRISTIS, C. ; LUBSEN, N. H. ; BRAAKMAN, I.: Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. In: *FEBS J* 275 (2008), Nr. 19, S. 4700–4727
- Chung et al. 2002** CHUNG, K. T. ; SHEN, Y. ; HENDERSHOT, L. M.: BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 49, S. 47557–47563
- Clapham 2007** CLAPHAM, D. E.: Calcium signaling. In: *Cell* 131 (2007), Nr. 6, S. 1047–1058
- Clemons et al. 1999** CLEMONS, W. M. ; GOWDA, K. ; BLACK, S. D. ; ZWIEB, C. ; RAMAKRISHNAN, V.: Crystal structure of the conserved subdomain of human protein SRP54M at 2.1 Å resolution: evidence for the mechanism of signal peptide binding. In: *J Mol Biol* 292 (1999), Nr. 3, S. 697–705
- Cohen et al. 1980** COHEN, F.S. ; ZIMMERBERG, J. ; FINKELSTEIN, A.: Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. II. Incorporation of a vesicular membrane marker into the planar membrane. In: *J Gen Physiol* 75 (1980), Nr. 3, S. 251–270
- Collinson et al. 2001** COLLINSON, I. ; BREYTON, C. ; DUONG, F. ; TZIATZIOS, C. ; SCHUBERT, D. ; OR, E. ; RAPOPORT, T. ; KUHLEBRANDT, W.: Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. In: *EMBO J* 20 (2001), Nr. 10, S. 2462–2471. – Rekonstitution von SecY

- Colombo et al. 2005** COLOMBO, S. ; LONGHI, R. ; ALCARO, S. ; ORTUSO, F. ; SPROCATI, T. ; FLORA, A. ; BORGESSE, N.: N-myristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b5 reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning. In: *J Cell Biol* 168 (2005), Nr. 5, S. 735–745
- Connolly et al. 1991** CONNOLLY, T. ; RAPIEJKO, P. ; GILMORE, R.: Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. In: *Science* 252 (1991), Nr. 5009, S. 1171–1173
- Copley et al. 1999** COPLEY, R. R. ; SCHULTZ, J. ; PONTING, C. P. ; BORK, P.: Protein families in multicellular organisms. In: *Curr Opin Struct Biol* 9 (1999), Nr. 3, S. 408–415
- Crouch und Klee 1980** CROUCH, T. H. ; KLEE, C. B.: Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. In: *Biochemistry* 19 (1980), Nr. 16, S. 3692–3698
- Crowley et al. 1994** CROWLEY, K. S. ; LIAO, S. ; WORRELL, V. E. ; REINHART, G. D. ; JOHNSON, A. E.: Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. In: *Cell* 78 (1994), Nr. 3, S. 461–471
- van Dalen und de Kruijff 2004** DALEN, A. van ; KRUIJFF, B. de: The role of lipids in membrane insertion and translocation of bacterial proteins. In: *Biochim Biophys Acta* 1694 (2004), Nr. 1-3, S. 97–109
- Darken 1964** DARKEN, M.A.: Puromycin Inhibition of Protein Synthesis. In: *Pharmacol Rev* (1964), Nr. 16, S. 223–243
- DeMaria et al. 2001** DEMARIA, C. D. ; SOONG, T. W. ; ALSEIKHAN, B. A. ; ALVANIA, R. S. ; YUE, D. T.: Calmodulin bifurcates the local Ca²⁺ signal that modulates P/Q-type Ca²⁺ channels. In: *Nature* 411 (2001), Nr. 6836, S. 484–489
- Derler et al. 2006** DERLER, I. ; HOFBAUER, M. ; KAHR, H. ; FRITSCH, R. ; MUIK, M. ; KESSLINGER, K. ; HACK, M. E. ; MORITZ, S. ; SCHINDL, R. ; GROSCHNER, K. ; ROMANIN, C.: Dynamic but not constitutive association of calmodulin with rat TRPV6 channels enables fine tuning of Ca²⁺-dependent inactivation. In: *J Physiol* 577 (2006), Nr. 1, S. 31–44
- Dick et al. 2008** DICK, I. E. ; TADROSS, M. R. ; LIANG, H. ; TAY, L. H. ; YANG, W. ; YUE, D. T.: A modular switch for spatial Ca²⁺ selectivity in the calmodulin regulation of Ca_v channels. In: *Nature* 451 (2008), Nr. 7180, S. 830–834
- Dudek et al. 2005** DUDEK, J. ; GREINER, M. ; MULLER, A. ; HENDERSHOT, L. M. ; KOPSCH, K. ; NASTAINCZYK, W. ; ZIMMERMANN, R.: ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. In: *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005), Nr. 11, S. 1008–1014
- Dudek et al. 2002** DUDEK, J. ; VOLKMER, J. ; BIES, C. ; GUTH, S. ; MULLER, A. ; LERNER, M. ; FEICK, P. ; SCHAFER, K. H. ; MORGENSTERN, E. ; HENNESSY, F. ; BLATCH, G. L. ; JANOSCHECK, K. ; HEIM, N. ; SCHOLTES, P. ; FRIEN, M. ; NASTAINCZYK, W. ; ZIMMERMANN, R.: A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes. In: *EMBO J.* 21 (2002), Nr. 12, S. 2958–2967
- Dunlap 2007** DUNLAP, K.: Calcium channels are models of self-control. In: *J Gen Physiol* 129 (2007), Nr. 5, S. 379–383
- Egea et al. 2004** EGEEA, P. F. ; SHAN, S. O. ; NAPETSCHNIG, J. ; SAVAGE, D. F. ; WALTER, P. ; STROUD, R. M.: Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. In: *Nature* 427 (2004), Nr. 6971, S. 215–221

Literatur

- Eisenman und Horn 1983** EISENMAN, G. ; HORN, R.: Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels. In: *J Membr Biol* 76 (1983), Nr. 3, S. 197–225
- Erdmann 2004** ERDMANN, F. S.: *Aktivierung des Sec61p-Komplexes durch Membranproteine sowie funktionelle Charakterisierung der inserierten Membranproteine.*, Diplomarbeit, 2004
- Farnsworth et al. 1995** FARNSWORTH, C. L. ; FRESHNEY, N. W. ; ROSEN, L. B. ; GHOSH, A. ; GREENBERG, M. E. ; FEIG, L. A.: Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. In: *Nature* 376 (1995), Nr. 6540, S. 524–527
- Finke et al. 1996** FINKE, K. ; PLATH, K. ; PANZNER, S. ; PREHN, S. ; RAPOPORT, T. A. ; HARTMANN, E. ; SOMMER, T.: A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. In: *EMBO J* 15 (1996), Nr. 7, S. 1482–1494
- Flourakis et al. 2006** FLOURAKIS, M. ; VAN COPPENOLLE, F. ; LEHEN'KYI, V. ; BECK, B. ; SKRYMA, R. ; PREVARSKAYA, N.: Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. In: *FASEB J* 20 (2006), Nr. 8, S. 1215–1217
- Focia et al. 2004** FOCIA, P. J. ; SHEPOTINOVSKAYA, I. V. ; SEIDLER, J. A. ; FREYMAN, D. M.: Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. In: *Science* 303 (2004), Nr. 5656, S. 373–377
- Foskett et al. 2007** FOSKETT, J. K. ; WHITE, C. ; CHEUNG, K. H. ; MAK, D. O.: Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. In: *Physiol Rev* 87 (2007), Nr. 2, S. 593–658
- Gamper und Shapiro 2003** GAMPER, N. ; SHAPIRO, M. S.: Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. In: *J Gen Physiol* 122 (2003), Nr. 1, S. 17–31
- Giunti et al. 2007** GIUNTI, R. ; GAMBERUCCI, A. ; FULCERI, R. ; BANHEGYI, G. ; BENEDETTI, A.: Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes. In: *Arch Biochem Biophys* 462 (2007), Nr. 1, S. 115–121
- Goder et al. 2004** GODER, V. ; JUNNE, T. ; SPIESS, M.: Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. In: *Mol Biol Cell* 15 (2004), Nr. 3, S. 1470–1478
- Goder und Spiess 2003** GODER, V. ; SPIESS, M.: Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. In: *EMBO J* 22 (2003), Nr. 14, S. 3645–3653
- Goloubinoff und De Los Rios 2007** GOLOUBINOFF, P. ; DE LOS RIOS, P.: The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. In: *Trends Biochem Sci* 32 (2007), Nr. 8, S. 372–380
- Görlich et al. 1992** GÖRLICH, D. ; PREHN, S. ; HARTMANN, E. ; KALIES, K. U. ; RAPOPORT, T. A.: A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. In: *Cell* 71 (1992), Nr. 3, S. 489–503
- Görlich und Rapoport 1993** GÖRLICH, D. ; RAPOPORT, T.A.: Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. In: *Cell* 75 (1993), S. 615–630
- Götze 2009** GÖTZE, T. A.: *Identifikation und Charakterisierung von porenbildenden Proteinen der inneren Chloroplastenmembran*, Universität Osnabrück, Dissertation, 2009
- Grabarek 2005** GRABAREK, Z.: Structure of a trapped intermediate of calmodulin: calcium regulation of EF-hand proteins from a new perspective. In: *J Mol Biol* 346 (2005), Nr. 5, S. 1351–1366

- Grabarek 2006** GRABAREK, Z.: Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. In: *J Mol Biol* 359 (2006), Nr. 3, S. 509–525
- Gumbart und Schulten 2008** GUMBART, J. ; SCHULTEN, K.: The roles of pore ring and plug in the SecY protein-conducting channel. In: *J Gen Physiol* 132 (2008), Nr. 6, S. 709–719
- Gumbart und Schulten 2006** GUMBART, J.C. ; SCHULTEN, K.: Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. In: *Biophys J* 90 (2006), S. 2356–2367
- Haider et al. 2006** HAIDER, S. ; HALL, B. A. ; SANSOM, M. S.: Simulations of a protein translocation pore: SecY. In: *Biochemistry* 45 (2006), Nr. 43, S. 13018–13024
- Haigh und Johnson 2002** HAIGH, N. G. ; JOHNSON, A. E.: A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. In: *J Cell Biol* 156 (2002), Nr. 2, S. 261–270
- Halic et al. 2004** HALIC, M. ; BECKER, T. ; POOL, M.R. ; SPAHN, C.M. ; GRASSUCCI, R.A. ; FRANK, J. ; BECKMANN, R.: Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. In: *Nature* 427 (2004), Nr. 6977, S. 808–814
- Halic et al. 2006** HALIC, M. ; GARTMANN, M. ; SCHLENKER, O. ; MIELKE, T. ; POOL, M. R. ; SINNING, I. ; BECKMANN, R.: Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. In: *Science* 312 (2006), Nr. 5774, S. 745–747
- Hamman et al. 1997** HAMMAN, B. D. ; CHEN, J. C. ; JOHNSON, E. E. ; JOHNSON, A. E.: The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. In: *Cell* 89 (1997), Nr. 4, S. 535–544
- Hamman et al. 1998** HAMMAN, B. D. ; HENDERSHOT, L. M. ; JOHNSON, A. E.: BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. In: *Cell* 92 (1998), Nr. 6, S. 747–758
- Hartmann et al. 1994** HARTMANN, E. ; SOMMER, T. ; PREHN, S. ; GORLICH, D. ; JENTSCH, S. ; RAPOPORT, T. A.: Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. In: *Nature* 367 (1994), Nr. 6464, S. 654–657
- Hatsuzawa et al. 1997** HATSUZAWA, K. ; TAGAYA, M. ; MIZUSHIMA, S.: The hydrophobic region of signal peptides is a determinant for SRP recognition and protein translocation across the ER membrane. In: *J Biochem* 121 (1997), Nr. 2, S. 270–277
- Hegde und Bernstein 2006** HEGDE, R. S. ; BERNSTEIN, H. D.: The surprising complexity of signal sequences. In: *Trends Biochem Sci* 31 (2006), Nr. 10, S. 563–571
- Helmers et al. 2003** HELMERS, J. ; SCHMIDT, D. ; GLAVY, J. S. ; BLOBEL, G. ; SCHWARTZ, T.: The beta-subunit of the protein-conducting channel of the endoplasmic reticulum functions as the guanine nucleotide exchange factor for the beta-subunit of the signal recognition particle receptor. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 26, S. 23686–23690
- Heritage und Wonderlin 2001** HERITAGE, D. ; WONDERLIN, W. F.: Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), Nr. 25, S. 22655–22662
- Herzog et al. 2003** HERZOG, R. I. ; LIU, C. ; WAXMAN, S. G. ; CUMMINS, T. R.: Calmodulin binds to the C terminus of sodium channels Nav1.4 and Nav1.6 and differentially modulates their functional properties. In: *J Neurosci* 23 (2003), Nr. 23, S. 8261–8270

Literatur

- Hessa et al. 2007** HESSA, T. ; MEINDL-BEINKER, N. M. ; BERNSEL, A. ; KIM, H. ; SATO, Y. ; LERCH-BADER, M. ; NILSSON, I. ; WHITE, S. H. ; HEIJNE, G. von: Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. In: *Nature* 450 (2007), Nr. 7172, S. 1026–1030
- Hille 2001** HILLE, B.: *Ion channels of excitable membranes*. 3rd. Sunderland, Massachusetts, U. S. A : Sinauer Associates Inc., 2001
- Hodge und Colombini 1997** HODGE, T. ; COLOMBINI, M.: Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. In: *J Membr Biol* 157 (1997), Nr. 3, S. 271–279
- Humphrey et al. 1996** HUMPHREY, W. ; DALKE, A. ; SCHULTEN, K.: VMD: visual molecular dynamics. In: *J Mol Graph* 14 (1996), Nr. 1, S. 33–38
- Im und Roux 2002a** IM, W. ; ROUX, B.: Ion permeation and selectivity of OmpF porin: a theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. In: *J Mol Biol* 322 (2002), Nr. 4, S. 851–869
- Im und Roux 2002b** IM, W. ; ROUX, B.: Ions and counterions in a biological channel: a molecular dynamics simulation of OmpF porin from *Escherichia coli* in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt solution. In: *J Mol Biol* 319 (2002), Nr. 5, S. 1177–1197
- Jermy et al. 2006** JERMY, A. J. ; WILLER, M. ; DAVIS, E. ; WILKINSON, B. M. ; STIRLING, C. J.: The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nr. 12, S. 7899–7906
- Jiang et al. 2008** JIANG, Y. ; CHENG, Z. ; MANDON, E. C. ; GILMORE, R.: An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. In: *J Cell Biol* 180 (2008), Nr. 6, S. 1149–1161
- Junne et al. 2006** JUNNE, T. ; SCHWEDE, T. ; GODER, V. ; SPIESS, M.: The Plug Domain of Yeast Sec61p Is Important for Efficient Protein Translocation but Is Not Essential for Cell Viability. In: *Mol Biol Cell* 17 (2006), S. 4063–4068
- Kabani et al. 2000** KABANI, M. ; BECKERICH, J. M. ; GAILLARDIN, C.: Sls1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Nr. 18, S. 6923–6934
- Kalies et al. 1994** KALIES, K. U. ; GORLICH, D. ; RAPOPORT, T. A.: Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. In: *J Cell Biol* 126 (1994), Nr. 4, S. 925–934
- Kalies et al. 1998** KALIES, K. U. ; RAPOPORT, T. A. ; HARTMANN, E.: The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. In: *J Cell Biol* 141 (1998), Nr. 4, S. 887–894
- Kalies et al. 2008** KALIES, K. U. ; STOKES, V. ; HARTMANN, E.: A single Sec61-complex functions as a protein-conducting channel. In: *Biochim Biophys Acta* 1783 (2008), Nr. 12, S. 2375–2383
- Kaneko et al. 2006** KANEKO, H. ; MOHRLÉN, F. ; FRINGS, S.: Calmodulin contributes to gating control in olfactory calcium-activated chloride channels. In: *J Gen Physiol* 127 (2006), Nr. 6, S. 737–748
- Kang et al. 2002** KANG, D. ; GHO, Y.S. ; SUH, M. ; KANG, C.: Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002), Nr. 11, S. 1511–1512

- Kappen et al. 1973** KAPPEN, L. S. ; SUZUKI, H. ; GOLDBERG, I. H.: Inhibition of reticulocyte peptide-chain initiation by pactamycin: accumulation of inactive ribosomal initiation complexes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (1973), Nr. 1, S. 22–26
- Kuboniwa et al. 1995** KUBONIWA, H. ; TJANDRA, N. ; GRZESIEK, S. ; REN, H. ; KLEE, C. B. ; BAX, A.: Solution structure of calcium-free calmodulin. In: *Nat Struct Biol* 2 (1995), Nr. 9, S. 768–776
- Laemmli 1970** LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–685
- Lakkaraju et al. 2008** LAKKARAJU, A. K. ; MARY, C. ; SCHERRER, A. ; JOHNSON, A. E. ; STRUB, K.: SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites. In: *Cell* 133 (2008), Nr. 3, S. 440–451
- Lansman 1990** LANSMAN, J. B.: Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. In: *J Gen Physiol* 95 (1990), Nr. 4, S. 679–696
- Laver und Gage 1997** LAVER, D. R. ; GAGE, P. W.: Interpretation of substates in ion channels: unipores or multipores? In: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67 (1997), Nr. 2-3, S. 99–140
- Lemberg et al. 2001** LEMBERG, M. K. ; BLAND, F. A. ; WEIHOFEN, A. ; BRAUD, V. M. ; MARFOGLIO, B.: Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. In: *J Immunol* 167 (2001), Nr. 11, S. 6441–6446
- Li et al. 2007** LI, W. ; SCHULMAN, S. ; BOYD, D. ; ERLANDSON, K. ; BECKWITH, J. ; RAPOPORT, T. A.: The Plug Domain of the SecY Protein Stabilizes the Closed State of the Translocation Channel and Maintains a Membrane Seal. In: *Mol Cell* 26 (2007), Nr. 4, S. 511–521
- Liao et al. 1997** LIAO, S. ; LIN, J. ; DO, H. ; JOHNSON, A. E.: Both lumenal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. In: *Cell* 90 (1997), Nr. 1, S. 31–41
- Linse et al. 1991** LINSE, S. ; HELMERSSON, A. ; FORSEN, S.: Calcium binding to calmodulin and its globular domains. In: *J Biol Chem* 266 (1991), Nr. 13, S. 8050–8054
- Lizak et al. 2006** LIZAK, B. ; CZEGLE, I. ; CSALA, M. ; BENEDETTI, A. ; MANDL, J. ; BANHEGYI, G.: Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to small anions. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 291 (2006), Nr. 3, S. C511–C517
- Lodish et al. 2004** LODISH, H. ; BERK, A. ; MATSUDAIRA, P. ; KAISER, C. A. ; KRIEGER, M. ; SCOTT, M. P. ; BYRD, M. L. (Hrsg.): *Molecular Cell Biology*. 5th. Tenney, S., 2004
- Lomax et al. 2002** LOMAX, R. B. ; CAMELLO, C. ; VAN COPPENOLLE, F. ; PETERSEN, O. H. ; TEPIKIN, A. V.: Basal and physiological Ca(2+) leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 29, S. 26479–26485
- Lundin et al. 2008** LUNDIN, C. ; KIM, H. ; NILSSON, I. ; WHITE, S. H. ; HEIJNE, G. von: Molecular code for protein insertion in the endoplasmic reticulum membrane is similar for N(in)-C(out) and N(out)-C(in) transmembrane helices. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008), Nr. 41, S. 15702–15707
- Mason et al. 2000** MASON, N. ; CIUFO, L. F. ; BROWN, J. D.: Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. In: *EMBO J* 19 (2000), Nr. 15, S. 4164–4174

Literatur

- Matlack et al. 1999** MATLACK, K. E. ; MISSELWITZ, B. ; PLATH, K. ; RAPOPORT, T. A.: BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. In: *Cell* 97 (1999), Nr. 5, S. 553–564
- Matoba und Ogrzydziak 1998** MATOBA, S. ; OGRYDZIAK, D. M.: Another factor besides hydrophobicity can affect signal peptide interaction with signal recognition particle. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 30, S. 18841–18847
- Mayer und Bukau 2005** MAYER, M. P. ; BUKAU, B.: Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. In: *Cell Mol Life Sci* 62 (2005), Nr. 6, S. 670–684
- McClellan und Brodsky 2000** MCCLELLAN, A. J. ; BRODSKY, J. L.: Mutation of the ATP-binding pocket of SSA1 indicates that a functional interaction between Ssa1p and Ydj1p is required for post-translational translocation into the yeast endoplasmic reticulum. In: *Genetics* 156 (2000), Nr. 2, S. 501–512
- McClellan et al. 1998** MCCLELLAN, A. J. ; ENDRES, J. B. ; VOGEL, J. P. ; PALAZZI, D. ; ROSE, M. D. ; BRODSKY, J. L.: Specific molecular chaperone interactions and an ATP-dependent conformational change are required during posttranslational protein translocation into the yeast ER. In: *Mol Biol Cell* 9 (1998), Nr. 12, S. 3533–3545
- Menetret et al. 2008** MENETRET, J. F. ; HEGDE, R. S. ; AGUIAR, M. ; GYGI, S. P. ; PARK, E. ; RAPOPORT, T. A. ; AKEY, C. W.: Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. In: *Structure* 16 (2008), Nr. 7, S. 1126–1137
- Menetret et al. 2000** MENETRET, J. F. ; NEUHOF, A. ; MORGAN, D. G. ; PLATH, K. ; RADERMACHER, M. ; RAPOPORT, T. A. ; AKEY, C. W.: The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. In: *Mol Cell* 6 (2000), Nr. 5, S. 1219–1232
- Menetret et al. 2007** MENETRET, J. F. ; SCHALETZKY, J. ; CLEMONS, W. M. ; OSBORNE, A. R. ; SKANLAND, S. S. ; DENISON, C. ; GYGI, S. P. ; KIRKPATRICK, D. S. ; PARK, E. ; LUDTKE, S. J. ; RAPOPORT, T. A. ; AKEY, C. W.: Ribosome Binding of a Single Copy of the SecY Complex: Implications for Protein Translocation. In: *Mol Cell* 28 (2007), Nr. 6, S. 1083–1092
- Menetret et al. 2005** MENETRET, J.F. ; HEGDE, R.S. ; HEINRICH, S.U. ; CHANDRAMOULI, P. ; LUDTKE, S.J. ; RAPOPORT, T.A. ; AKEY, C.W.: Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. In: *J Mol Biol* 348 (2005), Nr. 2, S. 445–457
- Merrifield 1963** MERRIFIELD, R. B.: Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. In: *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963), Nr. 14, S. 2149–2154
- Meusser et al. 2005** MEUSSER, B. ; HIRSCH, C. ; JAROSCH, E. ; SOMMER, T.: ERAD: the long road to destruction. In: *Nat Cell Biol* 7 (2005), Nr. 8, S. 766–772
- Miedema et al. 2004** MIEDEMA, H. ; METER-ARKEMA, A. ; WIERENGA, J. ; TANG, J. ; EISENBERG, B. ; NONNER, W. ; HEKTOR, H. ; GILLESPIE, D. ; MEIJBERG, W.: Permeation properties of an engineered bacterial OmpF porin containing the EEEE-locus of Ca²⁺ channels. In: *Biophys J* 87 (2004), Nr. 5, S. 3137–3147
- Misselwitz et al. 1998** MISSELWITZ, B. ; STAECK, O. ; RAPOPORT, T. A.: J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. In: *Mol Cell* 2 (1998), Nr. 5, S. 593–603
- Mitra und Frank 2006** MITRA, K. ; FRANK, J.: A model for co-translational translocation: ribosome-regulated nascent polypeptide translocation at the protein-conducting channel. In: *FEBS Lett* 580 (2006), Nr. 14, S. 3353–3360

- Mitra et al. 2005** MITRA, K. ; SCHAFFITZEL, C. ; SHAIKH, T. ; TAMA, F. ; JENNI, S. ; BROOKS III, C.L. ; BAN, N. ; FRANK, J.: Structure of the E.coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. In: *Nature* 438 (2005), S. 318–324
- Morgan et al. 2002** MORGAN, D. G. ; MENETRET, J. F. ; NEUHOF, A. ; RAPOPORT, T. A. ; AKEY, C. W.: Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17Å resolution. In: *J Mol Biol* 324 (2002), Nr. 4, S. 871–886
- Mori et al. 2003** MORI, H. ; TSUKAZAKI, T. ; MASUI, R. ; KURAMITSU, S. ; YOKOYAMA, S. ; JOHNSON, A.E. ; KIMURA, Y. ; AKIYAMA, Y. ; ITO, K.: Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 16, S. 14257–14264
- Mothes et al. 1994** MOTHES, W. ; PREHN, S. ; RAPOPORT, T. A.: Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. In: *EMBO J* 13 (1994), Nr. 17, S. 3973–3982
- Müller und Zimmermann 1987** MÜLLER, G. ; ZIMMERMANN, R.: Import of honeybee preprolittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. In: *EMBO J* 6 (1987), Nr. 7, S. 2099–2107
- Müller et al. 1963** MÜLLER, P. ; RUDIN, D. ; TIEN, R. ; WESTCOTT, W.C.: Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. In: *J. Phys. Chem.* 67 (1963), S. 534–535
- Neher 1992** NEHER, E.: Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. In: *Methods Enzymol* 207 (1992), S. 123–131
- Ng et al. 1996** NG, D. T. ; BROWN, J. D. ; WALTER, P.: Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. In: *J Cell Biol* 134 (1996), Nr. 2, S. 269–278
- Ngosuwan et al. 2003** NGOSUWAN, J. ; WANG, N. M. ; FUNG, K. L. ; CHIRICO, W. J.: Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 9, S. 7034–7042
- Nieboer 1975** NIEBOER, E.: The lanthanide ions as structural probes in biological and model systems. In: *Structure and bonding* 22 (1975), S. 1–47
- Niles und Cohen 1987** NILES, W.D. ; COHEN, F.S.: Video fluorescence microscopy studies of phospholipid vesicle fusion with a planar phospholipid membrane. Nature of membrane-membrane interactions and detection of release of contents. In: *J Gen Physiol* 90 (1987), Nr. 5, S. 703–735
- Ogawa und Tanokura 1984** OGAWA, Y. ; TANOKURA, M.: Calcium binding to calmodulin: effects of ionic strength, Mg²⁺, pH and temperature. In: *J Biochem* 95 (1984), Nr. 1, S. 19–28
- Oliver et al. 1995** OLIVER, J. ; JUNGnickel, B. ; GORLICH, D. ; RAPOPORT, T. ; HIGH, S.: The Sec61 complex is essential for the insertion of proteins into the membrane of the endoplasmic reticulum. In: *FEBS Lett* 362 (1995), Nr. 2, S. 126–130
- O’Neil und DeGrado 1990** O’NEIL, K. T. ; DEGRADO, W. F.: How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. In: *Trends Biochem Sci* 15 (1990), Nr. 2, S. 59–64
- Ong et al. 2007** ONG, H. L. ; LIU, X. ; SHARMA, A. ; HEGDE, R. S. ; AMBUDKAR, I. S.: Intracellular Ca(2+) release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. In: *Pflugers Arch* 453 (2007), Nr. 6, S. 797–808

Literatur

- Osawa et al. 1999** OSAWA, M. ; TOKUMITSU, H. ; SWINDELLS, M. B. ; KURIHARA, H. ; ORITA, M. ; SHIBANUMA, T. ; FURUYA, T. ; IKURA, M.: A novel target recognition revealed by calmodulin in complex with Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase. In: *Nat Struct Biol* 6 (1999), Nr. 9, S. 819–824
- Osborne und Rapoport 2007** OSBORNE, A. R. ; RAPOPORT, T. A.: Protein Translocation Is Mediated by Oligomers of the SecY Complex with One SecY Copy Forming the Channel. In: *Cell* 129 (2007), Nr. 1, S. 97–110
- Palade und Siekevitz 1956a** PALADE, G. E. ; SIEKEVITZ, P.: Liver microsomes; an integrated morphological and biochemical study. In: *J Biophys Biochem Cytol* 2 (1956), Nr. 2, S. 171–200
- Palade und Siekevitz 1956b** PALADE, G. E. ; SIEKEVITZ, P.: Pancreatic microsomes; an integrated morphological and biochemical study. In: *J Biophys Biochem Cytol* 2 (1956), Nr. 6, S. 671–690
- Panzner et al. 1995** PANZNER, S. ; DREIER, L. ; HARTMANN, E. ; KOSTKA, S. ; RAPOPORT, T. A.: Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. In: *Cell* 81 (1995), Nr. 4, S. 561–570
- Patlack 1993** PATLACK, J. B.: Measuring Kinetics of complex single ion channel data using mean-variance histograms. In: *Biophys. J.* 65 (1993), S. 29–42
- Pavlov et al. 2005** PAVLOV, E. ; GRIGORIEV, S. M. ; DEJEAN, L. M. ; ZWEIHORN, C. L. ; MANNELLA, C. A. ; KINNALLY, K. W.: The mitochondrial channel VDAC has a cation-selective open state. In: *Biochim Biophys Acta* 1710 (2005), Nr. 2-3, S. 96–102
- Peterson et al. 1999** PETERSON, B. Z. ; DEMARIA, C. D. ; ADELMAN, J. P. ; YUE, D. T.: Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. In: *Neuron* 22 (1999), Nr. 3, S. 549–558
- Petrasek und Schwille 2008** PETRASEK, Z. ; SCHWILLE, P.: Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. In: *Biophys J* 94 (2008), Nr. 4, S. 1437–1448
- Phale et al. 2001** PHALE, P. S. ; PHILIPPSEN, A. ; WIDMER, C. ; PHALE, V. P. ; ROSENBUSCH, J. P. ; SCHIRMER, T.: Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 21, S. 6319–6325
- Pinton und Rizzuto 2006** PINTON, P. ; RIZZUTO, R.: Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. In: *Cell Death Differ* 13 (2006), Nr. 8, S. 1409–1418
- Pitt 2007** PITT, G. S.: Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. In: *Cardiovasc Res* 73 (2007), Nr. 4, S. 641–647
- Plath et al. 1998** PLATH, K. ; MOTHES, W. ; WILKINSON, B.M. ; STIRLING, C.J. ; RAPOPORT, T.A.: Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. In: *Cell* 94 (1998), Nr. 6, S. 795–807
- Plath et al. 2004** PLATH, K. ; WILKINSON, B.M. ; STIRLING, C.J. ; RAPOPORT, T.A.: Interactions between Sec complex and prepro-alpha-factor during posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. In: *Mol Biol Cell* 15 (2004), Nr. 1, S. 1–10
- Platt und Busselberg 1994** PLATT, B. ; BUSSELBERG, D.: Actions of aluminum on voltage-activated calcium channel currents. In: *Cell Mol Neurobiol* 14 (1994), Nr. 6, S. 819–829
- Porter et al. 1995** PORTER, J. A. ; MINKE, B. ; MONTELL, C.: Calmodulin binding to Drosophila NinaC required for termination of phototransduction. In: *EMBO J* 14 (1995), Nr. 18, S. 4450–4459

- Portzehl et al. 1964** PORTZEHL, H. ; CALDWELL, P.C. ; RUEGG, J.C.: The Dependence of Contraction and Relaxation of Muscle Fibres from the Cab Maia Squinado on the internal Concentration of free Calcium Ions. In: *Biochim. Biophys. Acta* 79 (1964), Nr. 3, S. 581
- Potter et al. 1983** POTTER, J. D. ; STRANG-BROWN, P. ; WALKER, P. L. ; IIDA, S.: Ca²⁺ binding to calmodulin. In: *Methods Enzymol* 102 (1983), Nr. 135-143
- Potter und Nicchitta 2002** POTTER, M. D. ; NICCHITTA, C. V.: Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 26, S. 23314–23320
- Prinz et al. 2000a** PRINZ, A. ; BEHRENS, C. ; RAPOPORT, T. A. ; HARTMANN, E. ; KALIES, K. U.: Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. In: *EMBO J.* 19 (2000), Nr. 8, S. 1900–1906
- Prinz et al. 2000b** PRINZ, A. ; HARTMANN, E. ; KALIES, K. U.: Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biol Chem* 381 (2000), Nr. 9-10, S. 1025–1029
- Puntervoll et al. 2003** PUNTERVOLL, P. ; LINDING, R. ; GEMUND, C. ; CHABANIS-DAVIDSON, S. ; MATTINGSDAL, M. ; CAMERON, S. ; MARTIN, D.M. ; AUSIELLO, G. ; BRANNETTI, B. ; COSTANTINI, A. ; FERRE, F. ; MASELLI, V. ; VIA, A. ; CESARENI, G. ; DIELLA, F. ; SUPERTI-FURGA, G. ; WYRWICZ, L. ; RAMU, C. ; MCGUIGAN, C. ; GUDAVALLI, R. ; LETUNIC, I. ; BORK, P. ; RYCHLEWSKI, L. ; KUSTER, B. ; HELMER-CITTERICH, M. ; HUNTER, W.N. ; AASLAND, R. ; ; GIBSON, T.J.: ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. In: *Nucleic Acids Res.* 31 (2003), S. 3625–3630
- Raden et al. 2000** RADEN, D. ; SONG, W. ; GILMORE, R.: Role of the cytoplasmic segments of Sec61alpha in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. In: *J Cell Biol* 150 (2000), Nr. 1, S. 53–64
- Rhoads und Friedberg 1997** RHOADS, A. R. ; FRIEDBERG, F.: Sequence motifs for calmodulin recognition. In: *FASEB J* 11 (1997), Nr. 5, S. 331–340
- Rigaud et al. 1998** RIGAUD, J. L. ; LEVY, D. ; MOSSER, G. ; LAMBERT, O.: Detergent removal by non-polar polystyrene beads. In: *Eur Biophys J* (1998), S. 305–319
- Righetti et al. 1990** RIGHETTI, P.G. ; GIANAZZA, E. ; GELFI, C. ; CHIARI, M.: *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. 2nd edition. Oxford : Oxford University Press, 1990
- Römisch 2005** RÖMISCH, K.: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 21 (2005), S. 435–456
- Roy und Wonderlin 2003** ROY, A. ; WONDERLIN, W.F.: The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 7, S. 4397–4403
- Rycroft und Gibb 2004** RYCROFT, B. K. ; GIBB, A. J.: Regulation of single NMDA receptor channel activity by alpha-actinin and calmodulin in rat hippocampal granule cells. In: *J Physiol* 557 (2004), Nr. Pt 3, S. 795–808
- Saimi und Kung 2002** SAIMI, Y. ; KUNG, C.: Calmodulin as an ion channel subunit. In: *Annu Rev Physiol* 64 (2002), S. 289–311
- Saparov et al. 2007** SAPAROV, S. M. ; ERLANDSON, K. ; CANNON, K. ; SCHALETZKY, J. ; SCHULMAN, S. ; RAPOPORT, T. A. ; POHL, P.: Determining the Conductance of the SecY Protein Translocation Channel for Small Molecules. In: *Mol Cell* 26 (2007), Nr. 4, S. 501–509

Literatur

- Schaletzky und Rapoport 2006** SCHALETZKY, J. ; RAPOPORT, T. A.: Ribosome Binding to and Dissociation from Translocation Sites of the ER Membrane. In: *Mol Biol Cell* 17 (2006), Nr. 9, S. 3860–3869
- Schirmer und Phale 1999** SCHIRMER, T. ; PHALE, P.S.: Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. In: *J Mol Biol* 294 (1999), Nr. 5, S. 1159–1167
- Schlenstedt et al. 1990** SCHLENSTEDT, G. ; GUDMUNDSSON, G. H. ; BOMAN, H. G. ; ZIMMERMANN, R.: A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. In: *J Biol Chem* 265 (1990), Nr. 23, S. 13960–13968
- Schumacher et al. 2001** SCHUMACHER, M. A. ; RIVARD, A. F. ; BACHINGER, H. P. ; ADELMAN, J. P.: Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. In: *Nature* 410 (2001), Nr. 6832, S. 1120–1124
- Seiser und Nicchitta 2000** SEISER, R. M. ; NICCHITTA, C. V.: The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 43, S. 33820–33827
- Shan et al. 2007** SHAN, S. O. ; CHANDRASEKAR, S. ; WALTER, P.: Conformational changes in the GTPase modules of the signal reception particle and its receptor drive initiation of protein translocation. In: *J Cell Biol* 178 (2007), Nr. 4, S. 611–620
- Simon und Blobel 1991** SIMON, S. M. ; BLOBEL, G.: A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. In: *Cell* 65 (1991), Nr. 3, S. 371–380
- Simon und Blobel 1992** SIMON, S. M. ; BLOBEL, G.: Signal peptides open protein-conducting channels in *E. coli*. In: *Cell* 69 (1992), Nr. 4, S. 677–684
- Simon et al. 1989** SIMON, S.M. ; BLOBEL, G. ; ZIMMERBERG, J.: Large aqueous channels in membrane vesicles derived from rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *Escherichia coli*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86 (1989), S. 6176–6180
- Simons et al. 1995** SIMONS, J. F. ; FERRO-NOVICK, S. ; ROSE, M. D. ; HELENIUS, A.: BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. In: *J Cell Biol* 130 (1995), Nr. 1, S. 41–49
- Skowronek et al. 1999** SKOWRONEK, M. H. ; ROTTER, M. ; HAAS, I. G.: Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. In: *Biol Chem* 380 (1999), Nr. 9, S. 1133–1138
- Smart et al. 1997** SMART, O. S. ; BREED, J. ; SMITH, G. R. ; SANSOM, M. S.: A novel method for structure-based prediction of ion channel conductance properties. In: *Biophys. J.* 72 (1997), S. 1109–1126
- Smith et al. 2001** SMITH, A. J. ; SURVILADZE, Z. ; GAUDET, E. A. ; BACKER, J. M. ; MITCHELL, C. A. ; WILSON, B. S.: p110beta and p110delta phosphatidylinositol 3-kinases up-regulate Fc(epsilon)RI-activated Ca²⁺ influx by enhancing inositol 1,4,5-trisphosphate production. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 20, S. 17213–17220
- Smith und Johnson 1988** SMITH, D. B. ; JOHNSON, K. S.: Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. In: *Gene* 67 (1988), Nr. 1, S. 31–40
- Snapp et al. 2004** SNAPP, E.L. ; REINHART, G.A. ; BOGERT, B.A. ; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. ; HEGDE, R.S.: The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. In: *J Cell Biol* 164 (2004), Nr. 7, S. 997–1007

- Song et al. 2000** SONG, W. ; RADEN, D. ; MANDON, E. C. ; GILMORE, R.: Role of Sec61alpha in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. In: *Cell* 100 (2000), Nr. 3, S. 333–343
- Steel et al. 2004** STEEL, G. J. ; FULLERTON, D. M. ; TYSON, J. R. ; STIRLING, C. J.: Coordinated activation of Hsp70 chaperones. In: *Science* 303 (2004), Nr. 5654, S. 98–101
- Strynadka und James 1989** STRYNADKA, N. C. ; JAMES, M. N.: Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. In: *Annu Rev Biochem* 58 (1989), S. 951–998
- Tadross et al. 2008** TADROSS, M. R. ; DICK, I. E. ; YUE, D. T.: Mechanism of local and global Ca²⁺ sensing by calmodulin in complex with a Ca²⁺ channel. In: *Cell* 133 (2008), Nr. 7, S. 1228–1240
- Tam et al. 2005** TAM, P.C. ; MAILLARD, A.P. ; CHAN, K.K. ; DUONG, F.: Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. In: *EMBO J* 24 (2005), Nr. 19, S. 3380–3388
- Tani et al. 1990** TANI, K. ; TOKUDA, H. ; MIZUSHIMA, S.: Translocation of proompa possessing an intramolecular disulfide bridge into membrane vesicles of escherichia coli. effect of membrane energization. In: *J Biol Chem* 265 (1990), Oct, Nr. 28, S. 17341–17347
- Terzi et al. 2004** TERZI, L. ; POOL, M. R. ; DOBBERSTEIN, B. ; STRUB, K.: Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition. In: *Biochemistry* 43 (2004), Nr. 1, S. 107–117
- Tian und Andricioaei 2006** TIAN, P. ; ANDRICIOAEI, I.: Size, Motion, and Function of the SecY Translocon Revealed by Molecular Dynamics Simulations with Virtual Probes. In: *Biophys J* 90 (2006), Nr. 8, S. 2718–2730
- Tirosh et al. 2003** TIROSH, B. ; FURMAN, M. H. ; TORTORELLA, D. ; PLOEGH, H. L.: Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 9, S. 6664–6672
- Tong et al. 2006** TONG, Q. ; ZHANG, W. ; CONRAD, K. ; MOSTOLLER, K. ; CHEUNG, J. Y. ; PETERSON, B. Z. ; MILLER, B. A.: Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca²⁺ sensor calmodulin. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nr. 14, S. 9076–9085
- Towbin et al. 1979** TOWBIN, H. ; STAHELIN, T. ; GORDON, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979), Nr. 9, S. 4350–4354
- Tripathy et al. 1995** TRIPATHY, A. ; XU, L. ; MANN, G. ; MEISSNER, G.: Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). In: *Biophys J* 69 (1995), Nr. 1, S. 106–119
- Tsukazaki et al. 2008** TSUKAZAKI, T. ; MORI, H. ; FUKAI, S. ; ISHITANI, R. ; MORI, T. ; DOHMAE, N. ; PEREDERINA, A. ; SUGITA, Y. ; VASSYLYEV, D. G. ; ITO, K. ; NUREKI, O.: Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. In: *Nature* 455 (2008), Nr. 7215, S. 988–991
- Tu et al. 2006** TU, H. ; NELSON, O. ; BEZPROZVANNY, A. ; WANG, Z. ; LEE, S. F. ; HAO, Y. H. ; SERNEELS, L. ; DE STROOPER, B. ; YU, G. ; BEZPROZVANNY, I.: Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. In: *Cell* 126 (2006), Nr. 5, S. 981–993
- Tyedmers et al. 2000** TYEDMERS, J. ; LERNER, M. ; BIES, C. ; DUDEK, J. ; SKOWRONEK, M. H. ; HAAS, I. G. ; HEIM, N. ; NASTAINCZYK, W. ; VOLKMER, J. ; ZIMMERMANN, R.: Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Nr. 13, S. 7214–7219

Literatur

- Tyedmers et al. 2005** TYEDMERS, J. ; LERNER, M. ; NASTAINCZYK, W. ; ZIMMERMANN, R.: Calumenin and Reticuloalbin are Associated with the Protein Translocase of the Mammalian Endoplasmic Reticulum. In: *Journal of Biological Sciences* 5 (2005), Nr. 1, S. 70–75
- Tyedmers et al. 2003** TYEDMERS, J. ; LERNER, M. ; WIEDMANN, M. ; VOLKMER, J. ; ZIMMERMANN, R.: Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. In: *EMBO Rep* 4 (2003), Nr. 5, S. 505–510
- Van Coppenolle et al. 2004** VAN COPPENOLLE, F. ; VANDEN ABEELE, F. ; SLOMIANNY, C. ; FLOURAKIS, M. ; HESKETH, J. ; DEWAILLY, E. ; PREVARSKAYA, N.: Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. In: *J Cell Sci* 117 (2004), Nr. Pt 18, S. 4135–4142
- Vanden Abeele et al. 2006** VANDEN ABEELE, F. ; BIDAUX, G. ; GORDIENKO, D. ; BECK, B. ; PANCHIN, Y. V. ; BARANOVA, A. V. ; IVANOV, D. V. ; SKRYMA, R. ; PREVARSKAYA, N.: Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. In: *J Cell Biol* 174 (2006), Nr. 4, S. 535–546
- Verbert et al. 2008** VERBERT, L. ; LEE, B. ; KOCKS, S. L. ; ASSEFA, Z. ; PARYS, J. B. ; MISSIAEN, L. ; CALLEWAERT, G. ; FISSORE, R. A. ; DE SMEDT, H. ; BULTYNCK, G.: Caspase-3-truncated type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor enhances intracellular Ca²⁺ leak and disturbs Ca²⁺ signalling. In: *Biol Cell* 100 (2008), Nr. 1, S. 39–49
- Vetter und Leclerc 2003** VETTER, S. W. ; LECLERC, E.: Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. In: *Eur J Biochem* 270 (2003), Nr. 3, S. 404–414
- van Voorst und de Kruijff 2000** VOORST, F. van ; KRUIJFF, B. de: Role of lipids in the translocation of proteins across membranes. In: *Biochem. J.* 347 Pt 3 (2000), S. 601–612
- Walter und Blobel 1981** WALTER, P. ; BLOBEL, G.: Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. In: *J Cell Biol* 91 (1981), Nr. 2 Pt 1, S. 557–561
- Wang et al. 2008** WANG, C. ; WANG, H. G. ; XIE, H. ; PITT, G. S.: Ca²⁺/CaM controls Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors by dimerizing the NR1 C termini. In: *J Neurosci* 28 (2008), Nr. 8, S. 1865–1870
- Wang und Johnsson 2005** WANG, X. ; JOHNSSON, N.: Protein kinase CK2 phosphorylates Sec63p to stimulate the assembly of the endoplasmic reticulum protein translocation apparatus. In: *J Cell Sci* 118 (2005), Nr. Pt 4, S. 723–732
- Watts et al. 1983** WATTS, C. ; WICKNER, W. ; ZIMMERMANN, R.: M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80 (1983), S. 2809–2813
- Weast 1987** WEAST, R. C. (Hrsg.): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 68th Edition. Boca Raton, Florida, USA : CRC Press, 1987
- Wegele et al. 2003** WEGELE, H. ; HASLBECK, M. ; REINSTEIN, J. ; BUCHNER, J.: Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 28, S. 25970–25976
- Weihofen et al. 2002** WEIHOFEN, A. ; BINNS, K. ; LEMBERG, M. K. ; ASHMAN, K. ; MARTOGLIO, B.: Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. In: *Science* 296 (2002), Nr. 5576, S. 2215–2218

- Weihofen et al. 2000** WEIHOFEN, A. ; LEMBERG, M. K. ; PLOEGH, H. L. ; BOGYO, M. ; MARTOGLIO, B.: Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 40, S. 30951–30956
- Weitzmann et al. 2006** WEITZMANN, A. ; VOLKMER, J. ; ZIMMERMANN, R.: The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sil1 function in man and mouse. In: *FEBS Lett* 580 (2006), Nr. 22, S. 5237–5240
- Wilkinson et al. 1996** WILKINSON, B. M. ; CRITCHLEY, A. J. ; STIRLING, C. J.: Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. In: *J. Biol. Chem.* 271 (1996), Nr. 41, S. 25590–25597
- Willer et al. 2003** WILLER, M. ; JERMY, A. J. ; YOUNG, B. P. ; STIRLING, C. J.: Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane. In: *Yeast* 20 (2003), Nr. 2, S. 133–148
- Wilson und Brunger 2000** WILSON, M. A. ; BRUNGER, A. T.: The 1.0 Å crystal structure of Ca(2+)-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. In: *J Mol Biol* 301 (2000), Nr. 5, S. 1237–1256
- Wirth 2003** WIRTH, A.: *Regulation und Dynamik des Sec61p-Translokons*, Universität Osnabrück, Dissertation, 2003
- Wirth et al. 2003** WIRTH, A. ; JUNG, M. ; BIES, C. ; FRIEN, M. ; TYEDMERS, J. ; ZIMMERMANN, R. ; WAGNER, R.: The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. In: *Mol Cell* 12 (2003), Nr. 1, S. 261–268
- Wissing et al. 2002** WISSING, F. ; NEROU, E. P. ; TAYLOR, C. W.: A novel Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism mediated by neither inositol trisphosphate nor ryanodine receptors. In: *Biochem J* 361 (2002), Nr. Pt 3, S. 605–611
- Wittke et al. 2002** WITTKKE, S. ; DUNNWALD, M. ; ALBERTSEN, M. ; JOHNSON, N.: Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mol Biol Cell* 13 (2002), Nr. 7, S. 2223–2232
- Wonderlin 2009** WONDERLIN, W. F.: Constitutive, translation-independent opening of the protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. In: *Pflugers Arch* 457 (2009), Nr. 4, S. 917–930
- Wuytack et al. 2002** WUYTACK, F. ; RAEYMAEKERS, L. ; MISSIAEN, L.: Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. In: *Cell Calcium* 32 (2002), Nr. 5-6, S. 279–305
- Xia et al. 1998** XIA, X. M. ; FAKLER, B. ; RIVARD, A. ; WAYMAN, G. ; JOHNSON-PAIS, T. ; KEEN, J. E. ; ISHII, T. ; HIRSCHBERG, B. ; BOND, C. T. ; LUTSENKO, S. ; MAYLIE, J. ; ADELMAN, J. P.: Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. In: *Nature* 395 (1998), Nr. 6701, S. 503–507
- Xu et al. 1996** XU, L. ; MANN, G. ; MEISSNER, G.: Regulation of cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺, H⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. In: *Circ Res* 79 (1996), Nr. 6, S. 1100–1109
- Yamniuk und Vogel 2004** YAMNIUK, A. P. ; VOGEL, H. J.: Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. In: *Mol Biotechnol* 27 (2004), Nr. 1, S. 33–57
- Yap et al. 2000** YAP, K. L. ; KIM, J. ; TRUONG, K. ; SHERMAN, M. ; YUAN, T. ; IKURA, M.: Calmodulin target database. In: *J Struct Funct Genomics* 1 (2000), Nr. 1, S. 8–14

Literatur

- Young et al. 2001** YOUNG, B. P. ; CRAVEN, R. A. ; REID, P. J. ; WILLER, M. ; STIRLING, C. J.: Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. In: *EMBO J* 20 (2001), Nr. 1-2, S. 262–271
- Yu und Hinkle 2000** YU, R. ; HINKLE, P. M.: Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon calcium indicators. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 31, S. 23648–23653
- Zhang et al. 2006** ZHANG, S. L. ; YEROMIN, A. V. ; ZHANG, X. H. ; YU, Y. ; SAFRINA, O. ; PENNA, A. ; ROOS, J. ; STAUDERMAN, K. A. ; CAHALAN, M. D.: Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), Nr. 24, S. 9357–9362
- Zimmer et al. 2008** ZIMMER, J. ; NAM, Y. ; RAPOPORT, T. A.: Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. In: *Nature* 455 (2008), Nr. 7215, S. 936–943
- Zimmermann et al. 2006** ZIMMERMANN, R. ; MULLER, L. ; WULLICH, B.: Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. In: *Trends Mol Med* 12 (2006), Nr. 12, S. 567–573
- Zühlke et al. 1999** ZÜHLKE, R. D. ; PITT, G. S. ; DEISSEROTH, K. ; TSIEN, R. W. ; REUTER, H.: Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. In: *Nature* 399 (1999), Nr. 6732, S. 159–162

Abbildungsverzeichnis

1.1	Ablauf der cotranslationalen Translokation	5
1.2	3D-Struktur ApoCalmodulin und Calmodulin	12
2.1	Membrankomponenten der rauen Mikrosomen aus <i>C. familiaris</i>	17
2.2	Membrankomponenten der rauen Mikrosomen aus <i>S. cerevisiae</i>	18
2.3	Komponenten der Bilayerkammer	25
2.4	Aufbau des Messstandes	26
2.5	Versuchsaufbau des Bilayersystems	28
2.6	Herstellung des planaren Bilayers	30
2.7	Osmotische Fusion eines Proteoliposoms mit dem planaren Bilayer	31
3.1	Schaltverhalten des Sec61-Komplexes aus <i>C. familiaris</i>	43
3.2	Stromspur und Mean-Variance Plot des Sec61-Kanals aus RM Präparationen	44
3.3	Leitwertverteilungen des Sec61-Kanals	45
3.4	Leitwertsättigung für raue Mikrosomen	47
3.5	Strom-Spannungsdiagramme für Messungen mit rauen Mikrosomen unter asymmetrischen Elektrolytbedingungen	48
3.6	Spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Komplexes	51
3.7	Eigenschaften des Sec61-Kanals unter biionischen Bedingungen	52
3.8	Leitwerte und Umkehrpotenziale des Translokonkanals in Anwesenheit von Lanthanionen	54
3.9	Offenwahrscheinlichkeit des Translokonkanals in Anwesenheit von LaCl_3 und AlCl_3	55
3.10	Ergebnisse der Coflotationsexperimente mit Calmodulin	58
3.11	Schaltverhalten des Sec61-Kanals in Anwesenheit von Calmodulin	59
3.12	Leitwerte und Offenwahrscheinlichkeit des Sec61-Kanals in Anwesenheit von Calmodulin	60
3.13	Strom-Spannungsrampen des Sec61-Kanals in Anwesenheit von Calmodulin	62
3.14	Strom-Spannungsrampen des Sec61-Kanals in Anwesenheit von Calmodulin	63
3.15	Putative Calmodulin-Bindestellen im Sec61-Komplex	65
3.16	Bindung von Calmodulin an das Sec61 α -IQ-Peptid	67
3.17	Schaltverhalten des Sec61-Kanals in Anwesenheit von Ribosomen	69
3.18	Leitwerte in des Sec61-Komplexes in Anwesenheit von Ribosomen	70
3.19	Stromableitung und Mean-Variance Darstellung der cotranslational induzierten RM-Probe aus <i>S. cerevisiae</i>	73

Abbildungsverzeichnis

3.20	Leitwertverteilung der cotranslational induzierten RM-Probe aus <i>S. cerevisiae</i>	74
3.21	Offenwahrscheinlichkeit der cotranslational induzierten RM-Probe aus <i>S. cerevisiae</i>	75

Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammensetzung des Nycodenz-Dichtegradienten	20
3.1	Häufigkeiten der für die RM-Probe beobachteten Leitwerte	44
3.2	Konzentrationsabhängigkeit der Leitwerte	47
3.3	Umkehrpotenziale und Selektivitäten der verschiedenen Proben des Sec61-Komplexes	49
3.4	Porendurchmesser des Sec61-Kanals aus RM-Präparationen	56
3.5	Fusionen der RM-Präparationen aus unterschiedlichen Stämmen von <i>S. cerevisiae</i>	72
3.6	Porendurchmesser des Kanals aus RM-Präparationen aus <i>S. cerevisiae</i> . .	76
4.1	Selektivitäten der verschiedenen Proben des Sec61-Komplexes	85

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein werden die Abkürzungen und Präfixe des SI-Systems sowie die Abkürzungen des Periodensystems der Elemente als bekannt vorausgesetzt.

A	Ampere
ATP	Adenosintriphosphat
Bip	immunoglobulin heavy chain binding protein
°C	Grad Celsius
cmc	critical micellar concentration
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
Da	Dalton
l	Liter
M	Molar
M/T	Mops/Tris
Mega 9	n-Nonanoyl-N-methylglucamid
min	Minuten
Mops	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mV	10 ⁻³ Volt
MV-Plot	Mean-Variance Plot
MW	Molekulargewicht
N-Terminus	Amino-Terminus
NMG	N-Methyl-D-glucamin
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
PI	Phosphatidylinositol
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PKRM	Puromycin-Kalium gewaschene raue Mikrosomen
PL	Proteoliposomen

PPcecA	Preprocecropin A
PS	Phosphatidylserin
RM	raue Mikrosomen
S	Siemens
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPC	signal peptidase complex
SRP	signal recognition particle
SRP-R	signal recognition particle Rezeptor
TCA	Trichloressigsäure
TRAM	translocating chain-associating membrane protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ubc6	ubiquitin conjugating enzyme 6
U_{rev}	Umkehrpotenzial
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Aminosäuren

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Aspartat	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutamat	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V