

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Institutsdirektor
Prof. Dr. rer. nat. Aymelt Itzen

Charakterisierung von FicD in Tumorzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lucas Simon Erich Turnbull
aus Hamburg

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.07.2025**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Leticia Oliveia-Ferrer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Sabine Windhorst

I Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung – Hintergrund	4
1.1. Überblick Triple-Negativer-Brustkrebs und Unfolded-Protein-Response	4
1.2. ER und ER-Stress	5
1.3. ER-Stressoren in Tumorzellen	6
1.4. UPR-Signalkaskade	7
1.4.1. BiP und FicD	9
1.4.2. BiP als ER-Chaperon	10
1.4.3. FicD als AMP-Transferase	12
2. Zielsetzung	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Material	15
3.1.1. Plasmide	15
3.1.2. Primer und RNAs	16
3.1.3. Antikörper	18
3.1.4. Puffer und Lösungen	18
3.2. Molekularbiologische Methoden	20
3.2.1. SLIC-Klonierung pEGFP-N1 + FicD	20
3.2.2. Klonierung LeGO iB2 Neo + FicD –	21
3.2.3. Planung und Vektor-Klonierung für FicD Knockout mit CRISPR/Cas	22
3.2.4. Etablierung einer FicD-Knockout Zelllinie durch Crispr/Cas	24
3.2.5. Isolation genomischer DNA der CRISPR/Cas-Klone	25
3.2.6. Validierung des FicD Knockouts durch Sequenzierung	25
3.2.7. Transduktion FicD Überexpression in LeGo	26
3.2.8. FicD sh-RNA Knockdown	27
3.2.9. Gelaufftrennung und PCR-Clean-up	28
3.2.10. Transformation und Mini-Plasmidpreparation	29
3.2.11. RNA Isolation und cDNA Synthese	29
3.2.12. Quantitative RT-PCR (qPCR)	30
3.2.13. UPR Effekte auf Viabilität und AMPylierung Status	30
3.3. Zellbiologische Methoden	31
3.3.1. Zellkultur und Herstellung von Zellpellets im Screening	31
3.3.2. Bestimmung der Zellzahl	32
3.3.3. Transfektion	32
3.3.4. MTS Viabilitäts Assay	32

3.3.5.	Spheroidassay	33
3.3.6.	Live Cell Imaging FicD und CEPIA ER Marker	34
3.3.7.	Sequenzierung.....	34
3.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	35
3.4.1.	Herstellung von Zelllysaten und Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
3.4.2.	SDS-Polyacrylamid Elektrophorese und Western Blot.....	35
3.5.	Strukturvorhersagen und Statistik.....	36
3.5.1.	AlphaFold Strukturvorhersagen.....	36
3.5.2.	Particle Analysis mit Fiji.....	36
3.5.3.	Statistik.....	36
4.	Ergebnisse	37
4.1.	FicD Screening in Tumorzelllinien	37
4.2.	shRNA-Knockdown von FicD in MDA-MB-231 zeigt keinen Einfluss auf die Zellviabilität.....	38
4.3.	FicD-GFP Überexpression in MDA-MB-231 Mammakarzinom Zellen.....	39
4.4.	FicD Knockout in HEK-293 Zellen etablierbar	40
4.5.	Viabilität und Expressionsunterschiede der HEK-293 FicD KO Klone	42
4.6.	Der FicD KO in HEK-293 zeigt keinen Einfluss auf die Proliferation in Spheroïden	44
4.7.	Lokalisation von FicD im ER und NR	45
4.8.	Die Rolle von FicD in der Unfolded Protein Response.....	48
4.8.1.	Proliferation und FicD nach Inkubation mit Thapsigargin.....	48
4.8.2.	FicD hat Einfluss auf UPR Response Elemente.....	50
4.8.3.	Die AMPylierungs- und deAMPylierungsaktivität von FicD ist abhängig von ER Stress .	52
5.	Diskussion.....	53
5.1.	FicD wird stark von Triple-Negativer Brustkrebszelle MDA-MB-231 exprimiert	55
5.2.	FicD lokalisiert in das ER und NR.....	55
5.3.	FicD Knockout in MDA-MB-231 nicht etablierbar.....	57
5.4.	FicD Knockout hat keinen Einfluss auf Spheroidwachstum	57
5.5.	FicD wirkt positiv auf Proliferation bei induziertem ER-Stress	58
5.6.	FicD Überexpression hat Einfluss auf AMPylierungs Verhalten	59
5.7.	FicD-KO aktiviert vermehrt IRE1-Kaskade der UPR	60
6.	Ausblick und Fazit.....	61
7.	Zusammenfassung	62

8. Abstract.....	63
9. Abkürzungsverzeichnis	64
10. Tabellenverzeichnis	68
11. Abbildungsverzeichnis	69
12. Literaturverzeichnis	70
13. Anlagen	76
13.1. Verwendete Gefahrstoffe	76
13.2. FicD Knockout in MDA-MB-231	81
13.3. Vektorkarten	83
14. Danksagung	90
15. Eidesstattliche Versicherung	91

1. Einleitung – Hintergrund

1.1. Überblick Triple-Negativer-Brustkrebs und Unfolded-Protein-Response

Im letzten Jahrzehnt wurden als häufigste Todesursache in Hochlohnländern kardiovaskulär assoziierte Erkrankungen durch Krebs abgelöst. (Dagenais et al. 2020). Dabei gehören Lungen-, Mammakarzinome und gastrointestinale Tumore zu den häufigsten Todesursachen (IHME, 2024). Bei Frauen stellt das Mammakarzinom die häufigste maligne Erkrankung und Krebstodesursache dar. Weltweit war Brustkrebs 2018 mit insgesamt ca. 2,1 Mio. Neuerkrankungen und 626.679 Todesfällen die fünfthäufigste Krebstodesursache (Bray et al. 2018). Der in den letzten Jahren verstärkte multimodale Therapieansatz von operativer, systemischer und Strahlentherapie hat zu einer Steigerung der mittleren Heilungsrate von ca. 70-80% beigetragen. Jedoch gilt der fortgeschrittene metastasierte Brustkrebs weiterhin als unheilbar, sodass bei diesem das Hauptaugenmerk auf eine Lebenszeitverlängerung unter Geringhaltung von Symptomen und therapieassoziierten Nebenwirkungen liegt (Harbeck et al. 2019). Im Allgemeinen wird basierend auf die von Perou et al. 2000 eingeführte molekulare Subtypisierung und histologischer Merkmale zwischen vier Subtypen unterschieden. Dabei erfolgt die Einteilung anhand des Expressionsstatus des Tumors, insbesondere der Hormon- (Östrogen und Progesteron) sowie HER2/neu- (Human epidermal growth factor receptor 2) Rezeptoren und der Proliferationsrate anhand des Antigen Kiel 67 (Ki-67). Exprimiert der Tumor keinen der drei Rezeptoren, wird dies als TNBC (Triple Negative Breast Cancer) klassifiziert (Harbeck et al. 2019).

Zwei der größten Herausforderungen bei der Behandlung von Brustkrebs sind TNBC, ein aggressiver Subtyp mit generell schlechterer Prognose. Etwa 10-15% aller Brustkrebsdiagnosen werden als TNBC klassifiziert (Won und Spruck 2020). Aufgrund ihrer niedrigen HER2, Östrogen- und Progesteronrezeptor Expression ist TNBC resistent gegen Hormon- oder anti-HER2 Therapien. TNBC ist zwar sensitiv für Chemotherapie, z.B. Anthrazykline oder Taxane, jedoch mit nur geringer Wirkung (Won und Spruck 2020). In ca. 40% der Fälle kommt es bei initial lokal begrenztem TNBC zum Rezidiv mit Auftreten von Metastasen, welche sich meist biologisch vom initialem Tumor unterscheiden und häufig deutlich aggressiver und therapieresistenter sind (Harbeck et al. 2019).

In viele Tumoren konnten eine Umprogrammierung zelleigener Kompensationsmechanismen, wie der Unfolded-Protein-Response (UPR), als Förderer von Tumorwachstum, Metastasierung und Therapieresistenz identifiziert werden (Chen und Cubillos-Ruiz 2021). Auch bei TNBC wurde bereits ein Zusammenhang zwischen einer spezifischen UPR-Veränderung und

prognostisch relevanten Onkogen Signaturen festgestellt (Chen et al. 2014). Auslöser der UPR ist die Störung der Homöostase des endoplasmatischen Retikulums (ER), z.B. durch die Anhäufung fehl- oder ungefalteter Proteine. Während die kurzfristige UPR-Aktivierung den Stresszustand kompensiert und das Zellüberleben fördert, führt die langfristige und starke Aktivierung in der Regel zum Zelltod. Krebszellen umgehen diesen Mechanismus mit Veränderungen der UPR, sodass langfristige ER-Stresszustände toleriert werden und darüber hinaus die Anpassungsfähigkeit der Tumorzelle an zellfeindliche Umgebungen erhöht wird (Chen und Cubillos-Ruiz 2021).

1.2. ER und ER-Stress

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein essenzielles Zellorganell, da es vielzählige Funktionen wie Proteinfaltung und -modifikation, Calciumspeicherung und Lipidsynthese übernimmt. Etwa ein Drittel aller zellulären Proteine werden über das ER an ihren vorbestimmten Ort transportiert. Durch die entscheidende Rolle, die das ER im Proteinfaltungssystem einnimmt, ist dieses außerdem zentraler Bestandteil bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase (Wang und Kaufman 2014).

Das ER besteht aus netzartig angeordneten Membranen, die ein abgeschlossenes Kompartiment mit ausladenden Zisternen bilden. Es wird zwischen rauem mit Ribosomen besetztem ER und glattem Ribosom-freiem ER unterschieden. Die membranständigen Ribosomen führen die Peptidsynthese durch und geben diese für weitere Modifikation und Weitertransport in die Zisternen ab. Für den Transport werden diese in, aus ER-Membran bestehenden, Transportvesikeln direkt zum Zellorganell oder über den Golgi-Apparat geleitet. Die durch Lipidbiosynthese produzierten Proteine im glatten ER, werden direkt in das Zytosol sezerniert. Der schmale Spaltraum des ERs bildet ein Protein-Transportnetzwerk, welches einen kontinuierlichen Übergang zur äußeren Kernmembran besitzt (Bubendorf et al. 2011). Der Aufbau des ERs ist je nach Zellfunktion und Stoffwechszustand der Zelle stark variabel. Dabei erscheinen Zellen mit stark aktiver Proteinbiosynthese durch die vermehrt vorhanden Ribosomen lichtmikroskopisch dichter (Bubendorf et al. 2011).

Die Proteinfaltung ist fehleranfällig, sodass der Qualitätskontrolle und dem Proteom-Management auf ER-Ebene eine besondere Bedeutung zukommt. Dabei ist die ER-Homöostase konstant Schwankungen durch veränderten Proteinbedarf oder auch pathologischen Zuständen ausgesetzt. Durch vermehrte Proteinsekretion oder fehlerhafte Proteinfaltung kann es zu einer Ansammlung von un- oder fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen kommen. Dieser Zustand wird als ER-Stress bezeichnet (Hetz et al. 2020).

1.3. ER-Stressoren in Tumorzellen

In Tumorzellen sorgen eine Vielzahl von Stressoren für einen anhaltenden Stresszustand des ERs (Abb. 1). Dazu gehören Teile der Tumor-Mikroumgebung, intrinsische metabolische bzw. onkogene Stressfaktoren sowie der therapieassoziierte Zellstress. Typische Merkmale der Tumor-Mikroumgebung sind u.a. Hypoxie, ein niedriger pH-Wert und Nährstoffmangel. Dabei führen wechselnde Sauerstoff-Level in den Tumorregionen zur Aktivierung eines Stress-Response Signalwegs, der das Zellüberleben sichert, die Hypoxie Resistenz steigert und das Tumorwachstum fördert (Koumenis 2006). Auch andere Stoffwechselforgänge in Tumorzellen, wie die vermehrte aerobe Glycolyse, führen über Laktat Produktion zu einem niedrigerem pH Milieu, welches direkt aktivierend auf die UPR wirkt (Dong et al. 2017).

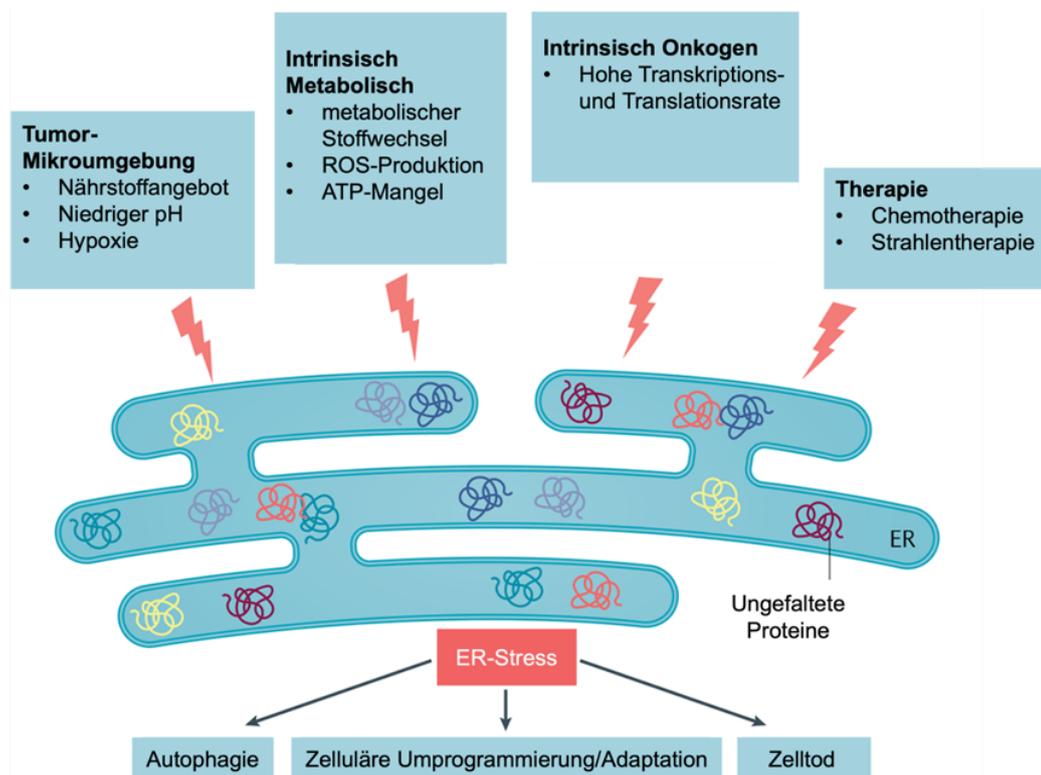


Abb. 1 ER-Stressoren in Tumorzellen Erhöhte Proliferation in Tumorzellen verändert die Zell-Mikroumgebung. Diese ist geprägt durch hohen Metabolismus, Hypoxie, Azidose und Nährstoffmangel, welche auf die ER-Homöostase einwirken. Es kommt zur Ansammlung ungefalteter Proteine und Aktivierung von ER-Stress Signalwegen. Ebenso führen durch Onkogene gesteigerte Translationsraten zu einem erhöhtem Proteinumsatz sowie zytotoxische Effekte von Strahlen- und Chemotherapie zu zusätzlicher ER-Belastung. Unterschiedlich starker ER-Stress hat je nach Zelltyp und Zellumgebung Einfluss auf Autophagie über Adaptation von z.B. Zellzyklus bis zum Zelltod. (Angepasst aus Chen und Cubillos-Ruiz 2021)

Ein weiterer Stressor ist metabolischen Ursprungs, der durch zu niedriges oder übermäßiges Nährstoffangebot definiert wird und bei stark wechselnden Vaskularisations-, Stoffwechsel- und Wachstumsbedingungen in Tumoren vorkommt (Chen und Cubillos-Ruiz 2021). Dabei spielen

Glucose- und Glutamin-Mangel eine besondere Rolle, da beide im Hexosamin-Biosynthetic-Pathway (HBP) benötigt werden, welcher elementar für die N-Glykosylierung und Faltung von Proteinen ist (Denzel und Antebi 2015). Zusätzlich führen niedrige Glucose-Spiegel durch damit einhergehendes niedriges ATP-Angebot in der Zelle zu einem niedrige Ca^{2+} -Strom durch den sarko- und endoplasmatischen Calcium transportierenden ATPase Uniporter (SERCA) in das ER und damit zu einer Störung des Calcium-Signaling (Moore et al. 2011).

Durch vermehrtes Auftreten Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kann es zur Oxidation von DNA, Proteinen oder Lipiden kommen (Liou und Storz 2010). Diese können auch mit der Funktion des ERs interferieren, da oxidierte Aminosäure-Seitenketten die Faltung von Proteine beeinträchtigen können (Mythri et al. 2013). In Krebszellen führen u.a. erhöhter metabolischer Umsatz, Durchlässigkeit von Mitochondrienmembranen und Peroxisomen Aktivität zu vermehrter ROS-Produktion (Storz 2005).

Auch intrinsische Ursachen, wie z.B. Mutationen des Protoonkogens Epidermal-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) führen zu einem übermäßigem Proliferationsstimulus und damit zu hohen Transkriptions- und Translationsraten (Zandi et al. 2007). Ungefähr ein Drittel aller Proteine werden für Modifikation, Faltung und Weitertransport über das ER geschleust. Ein insgesamt erhöhter Proteinumsatz belastet die ER-Proteostase und aktiviert ebenso die UPR (Hetz et al. 2020).

Zusätzlich sorgen Chemo- und Strahlentherapie durch zytotoxische Effekte für ER Stress. Jedoch entwickeln Krebszellen im Falle von Chemotherapien häufig mithilfe unterschiedlicher Mechanismen eine Chemoresistenz (Madden et al. 2019). Einer der Mechanismen, der die Entstehung von Chemoresistenzen fördert, konnte mit Hilfe von Knockdown Versuchen als UPR identifiziert werden (Chen et al. 2014).

1.4. UPR-Signalkaskade

Ein Mechanismus mit der das ER auf Stress reagiert ist die UPR. Dabei konnte für die UPR-Aktivierung in zahlreichen Studien eine hohe Relevanz für die onkogenetische Transformation und Chemoresistenz in der Krebsentwicklung nachgewiesen werden (Wang und Kaufman 2014).

Kommt es zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER, dissoziiert das ER-Chaperon BiP von drei ER-Transmembran Proteinen (Abb. 2), die dadurch je selbst eine UPR-Signalkaskade aktivieren. Dabei handelt es sich um Inositol Requiring Enzyme 1 (IRE1), Protein Kinase RNA

like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) und Activating Transcription Factor 6 (ATF6) (Madden et al. 2019).

ATF6 löst sich nach BiP Dissoziation aus der ER-Membran und wird im Golgi-Apparat von zwei Proteasen geschnitten, sodass ein aktiver TF entsteht, der im Zellkern an ER Stress Response Elementen (ERSE) und UPR Response Elementen bindet. Ebenso sorgt dieser für die mRNA-Induktion eines weiteren TF X-Box-like-Protein 1 (XBP1), welcher eine Schnittstelle

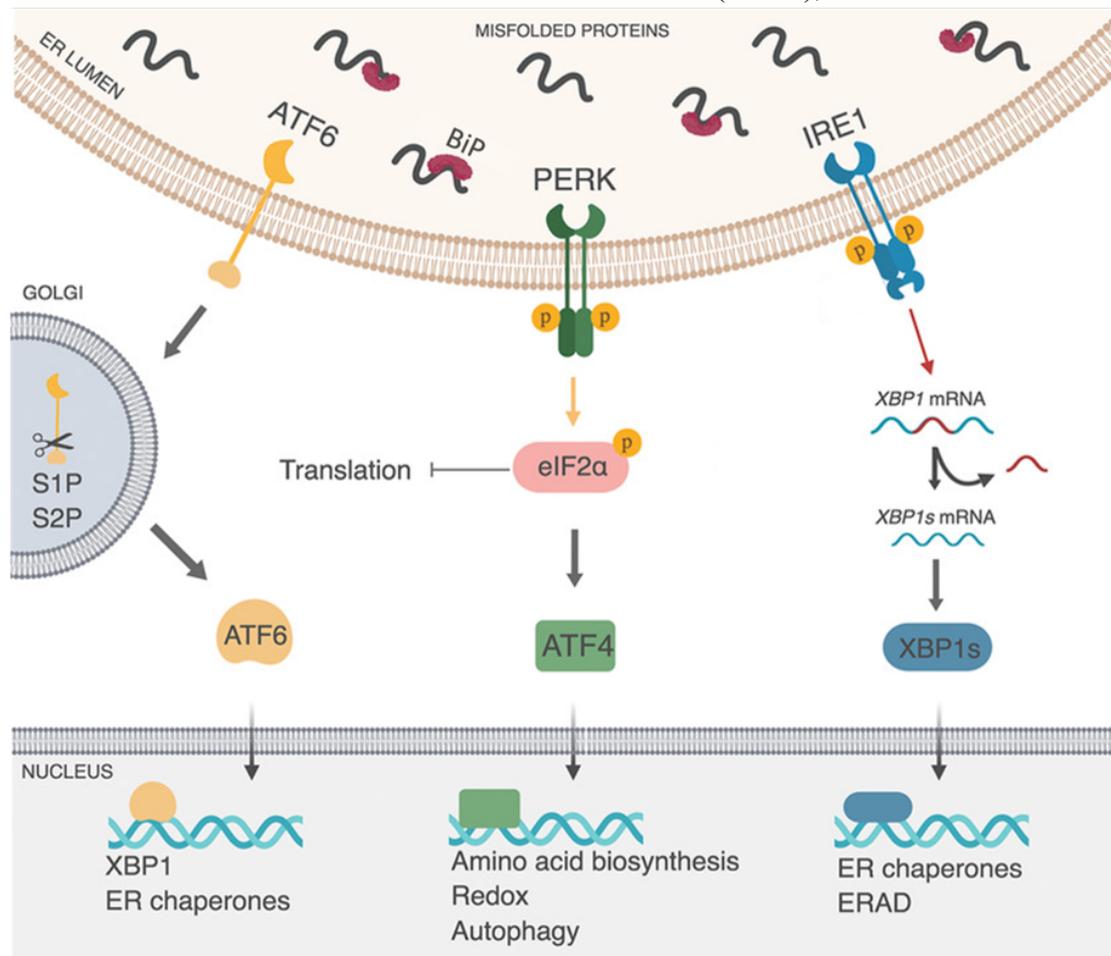


Abb. 2 UPR-Signalkaskade Das ER-Chaperon BiP dissoziiert bei Ansammlung ungefalteter Proteine von den drei UPR-Signalmolekülen ATF6, PERK und IRE1. ATF6 wird im Golgi-Apparat durch die zwei Proteasen Site Protease 1/2 (S1P/S2P) zu einem aktiven Transkriptionsfaktor (TF) modifiziert. Dieser führt im Zellkern zur Transkription von XBP1 und ER-Chaperonen. PERK und IRE1 werden durch Dimerisation und Autophosphorylierung aktiviert, die nach BiP Dissoziation erfolgt. Die IRE1 Kinase aktivierte RNase spleißt XBP1 mRNA und aktiviert diesen als TF. XBP1 sorgt für die Entlastung des ERs durch Förderung von ER-Chaperonen und ER-assoziiertem Protein Abbau (ERAD). Die PERK-Kinase phosphoryliert eIF2a, welche die 5'Cap abhängige Translation hemmt. Eine Ausnahme bildet die ATF4 mRNA, welche verstärkt translatiert wird und bei langfristiger PERK-Aktivierung die Autophagie bis hin zur Apoptose fördert. (Modifiziert nach Madden et al. 2019)

zu dem UPR Signalweg IRE1 darstellt (Yoshida et al. 2001).

Bei IRE1 handelt es sich um ein Transmembran Protein, welches nach BiP Dissoziation oligomerisiert und sich durch seine zytosolische Serin/Threonin-Kinase-Domäne

autophosphoryliert, welches wiederum eine Endoribonuklease-Domäne aktiviert (Han et al. 2009). Auf der anderen Seite wurde beim Ausschalten der BiP-Bindungsstelle die ER-Stress Reaktion nicht beeinträchtigt, sodass die Relevanz der BiP-Sensoreigenschaft für IRE1 infrage gestellt werden muss (Kimata et al. 2004). Bei Aktivierung schneidet die Endoribonuklease-Domäne ein 26 Basen langes Intron aus der XBP1 mRNA, was zu einem *frameshift* und zur transkriptionell aktiven Variante XBP1s führt. Diese reguliert im Zellkern verschiedene Gene, die die ER Kapazität und ER- assoziierte Protein Degradation (ERAD) fördern (Han et al. 2009). Dabei werden fehlgefaltete Proteine durch Chaperon-Systeme zurück in das Zytoplasma transloziert, wo diese durch Ubiquitinierung markiert und von Proteosomen abgebaut werden (Römisch 2005). Eine chronische Aktivierung des IRE1 α Signalwegs zeigte proapoptische Effekte, indem es u.a. zum vermehrtem XBP1-mRNA Abbau kommt (Hollien und Weissman 2006).

Der dritte UPR Signalweg wird durch PERK vermittelt. PERK homodimerisiert nach BiP Dissoziation und wird durch Autophosphorylierung aktiviert. Diese führt zur Phosphorylierung von eIF2 α , einem Initiationsfaktor der Translation. Die Modifikation führt zum kurzfristigen Translationsstopp und zur Entlastung des ERs (Bertolotti et al. 2000). Auf der anderen Seite wird die Translation zweier mRNAs für ATF4 und ATF5 verstärkt. ATF4 aktiviert wiederum die Transkription von CHOP, welches ER-Stress vermittelte Apoptose auslöst. Die mRNAs von ATF4 und CHOP haben eine kurze Halbwertszeit, sodass es nur bei langfristiger PERK Aktivierung zu proapoptischer Wirkung kommen sollte (Rutkowski et al. 2006).

1.4.1. BiP und FicD

Protein-Prozessierung, wie Translokation, Faltung und Degradation, sind für das Zellüberleben essenziell. Alle drei Schritte werden von einer molekularen Gruppe, den Chaperonen, ermöglicht (Buck et al. 2007). Eine Untergruppe ist die der Hitzeschockproteine 70 kDa (Hsp70), zu der BiP gehört (Munro und Pelham 1986). BiP ist eines der am häufigsten vorkommenden Chaperone der Hsp70-Familie im ER-Lumen (Guth et al. 2004). Neben der elementaren Funktion bei der Protein-Prozessierung spielt BiP auch als Sensor- und Effektorprotein in der UPR-Signalkaskade eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus ist BiP auch an der Regulation der Calcium Homöostase beteiligt (Hamman et al. 1998).

Da BiP nicht nur Effektor- sondern auch Sensoreigenschaften besitzt, kommt der Regulation von BiP besondere Bedeutung zu. Ein Mechanismus mit direktem Einfluss auf die Chaperon-Aktivität BiPs ist die posttranslationale Modifikation von Seitenketten mit Adenosinmonophosphat (AMP), auch AMPylierung genannt (Woolery et al. 2010). Diese AMPylierung wird durch das Fic-Enzym FicD katalysiert und ist reversibel, d.h. FicD besitzt

sowohl AMPyliernde als auch deAMPylierende Eigenschaften (Worby et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass der AMPylierungs-Status BiPs mit dem Stresszustand des ERs korreliert, sodass eine Teilhabe an der UPR-Kaskade nicht auszuschließen ist (Ham et al. 2014). In welcher Kapazität und Form FicD Einfluss auf die ER-Stressantwort und das Zellüberleben ausübt, ist noch weitgehend unklar.

1.4.2. BiP als ER-Chaperon

Die Struktur eines gefalteten Proteins wird wesentlich über die Anordnung hydrophiler und hydrophober Seitenketten der Peptidkette bestimmt. BiP verhindert die vorzeitige Faltung oder Aggregation noch unfertig translaterter Proteine durch Bindung der Substrat-bindenden Domäne (SBD) mit außenstehenden hydrophoben Seitenketten (Flynn et al. 1991). Diese Form von Bindung stabilisiert das Protein und ermöglicht die Bindung weiterer Co-Chaperone (Pobre et al. 2019).

BiP besteht aus einer Nucleotid-bindenden Domäne (NBD), einer aus acht β -Faltblättern bestehenden SBD, einer Deckeldomäne (Lid) und einem hydrophoben Linker zwischen den Domänen (Abb. 3) (Yang et al. 2015). Die Linker-Domäne zwischen den Domänen kontrolliert die allosterische Funktion zwischen NBD und SBD (Pobre et al. 2019). Dabei kontrolliert die Nukleotid-Bindung in der NBD die Interaktion mit ungefalteten Proteinen. In der ATP-gebundenen Form (BiP-ATP1) ist die Lid-Domäne offen und die Linker-Domäne ermöglicht SBD-NBD Interaktionen. In dieser Konformation ist die Affinität der SBD für Substrate gering, die Kinetik jedoch hoch, sodass ein hoher Proteindurchsatz ermöglicht wird (Yang et al. 2017). Binden hydrophobe Seitenketten in der SBD, wird die ATP-Hydrolyse katalysiert, die Linker-Domäne trennt die NBD und SBD und die Lid-Domäne schließt sich. Die Affinität für das gebundene Substrat ist in dieser Konformation hoch und die Substratkinetik niedrig (Pobre et al. 2019). Da die endogene ATPase-Aktivität von BiP minimal ist, unterstützen J-Protein Co-Chaperone (ERdj) neben der Substratrekrutierung auch die ATPase-Aktivität BiPs (Kampinga und Craig 2010). So schützt BiP das prämaturre Protein vor Aggregation, indem die Interaktion hydrophober Seitenketten untereinander verhindert wird und Co-Chaperone binden können (Pobre et al. 2019).

Nach der ATP-Hydrolyse wird das ADP mithilfe des Nukleotid-Austausch-Faktors (NEF) aus der NBD entlassen. Die erneute ATP-Bindung in der NBD-Bindungstasche führt zu einer Konformationsänderung, bei welcher die Linker-Domäne die NBD und SBD wieder andockt,

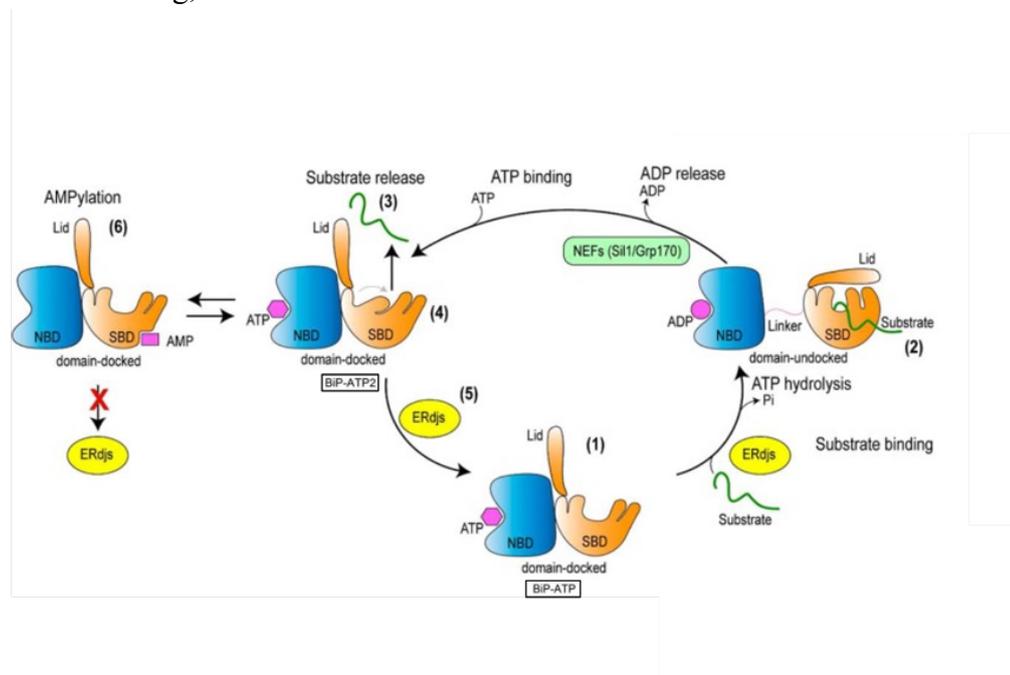


Abb. 3 BiP Chaperon-Zyklus: Gezeigt werden die unterschiedlichen Aktivierungsstadien BiPs mit der NBD (blau) und SBD (orange). (1) Das ATP gebundene BiP (BiP-ATP) befindet sich im „domain-docked“ Zustand mit der Lid-Domäne offen. Dadurch wird den ERdjs-Co-Chaperonen ermöglicht, Substrate zur SBD zu rekrutieren und die ATPase-Aktivität BiPs zu katalysieren. (2) Im ADP gebundenem Zustand (BiP-ADP) werden die NBD und SBD vom Linker getrennt, die Lid-Domäne ist geschlossen und das Substrat an der SBD gebunden. An der NBD helfen NEFs bei der ADP-Entfernung. (3) Nach ATP-Bindung docken die NBD/SBD Domänen erneut und die Lid-Domäne ist offen, sodass die Substrataffinität sinkt. Diese Konfirmation (BiP-ATP2) besitzt jedoch eine leicht veränderte Bindungstasche in der SBD, die vor erneuter Substratbindung von ERdjs wieder in den Ursprungszustand (BiP-ATP1) wiederhergestellt wird. (6) Im AMPyliertem Zustand wird die Bindung von ERdjs gehemmt und der Zyklus damit unterbrochen. (Modifiziert nach Pobre et al. 2019)

die Lid-Domäne öffnet und die Bindungstasche der SBD sich verengt (BiP-ATP2), sodass das Substrat herausbefördert wird. Die erneute Substratbindung ist in diesem Zustand erschwert. Durch ein ERdj-Co-Chaperon wird die Bindungstasche wieder in den Ausgangszustand hergestellt (BiP-ATP1) (Yang et al. 2017).

Zur kurzfristigen Regulation der BiP-Aktivität sind zwei Mechanismen beschrieben: Die Oligomerisierung, welche eine inaktive Reservekapazität des Chaperons bildet (Preissler et al. 2015) und die AMPylierung, welche durch die AMP-Transferase FicD vermittelt wird (Ham et al. 2014). FicD bindet BiP mit deutlich höherer Affinität, wenn dieses ATP gebunden hat (Fauser et al. 2021a). Die AMPylierung stabilisiert einen ATP-gebundenen „domain-docked“ Zustand, in dem die Lid-Domäne offen und die Substrataffinität gering ist (Wieteska et al. 2017). Die AMPylierung findet an einem Threonin (T518) in der SBD statt und führt durch

Änderung des Konformationsgleichgewichts zu einem Zustand ähnlich eines ATP-gebundenem BiPs (Abb. 3). Dabei verhindert die AMPylierung durch FicD die Stimulation der ATP-Hydrolyse BiPs durch die ERdj Co-Chaperone und die Interaktion mit Protein-Substraten (Preissler et al. 2017a; Pobre et al. 2019).

1.4.3. FicD als AMP-Transferase

FicD gehört zur Klasse der Fic-Enzyme und ist das einzige bekannte humane Fic-Enzym (Worby et al. 2009). Diese werden durch eine Fic-Domäne definiert, die initial in Bakterien beschrieben wurde und postrtranslationale AMP-Modifikationen durchführt (Yarbrough et al. 2009). FicD ist ein membrangebundenes Enzym, welches im ER und der Kernmembran lokalisiert ist (Sengupta et al. 2019). Es besteht aus einer Transmembran-Domäne, zwei N-terminalen Tetratricopeptid Wiederholungen (TPR), einer autoinhibitorischen Helix (α_{inhib}) und einer Fic-Domäne (Bunney et al. 2014). Die TPR-Region bindet an der Linker-Domäne und

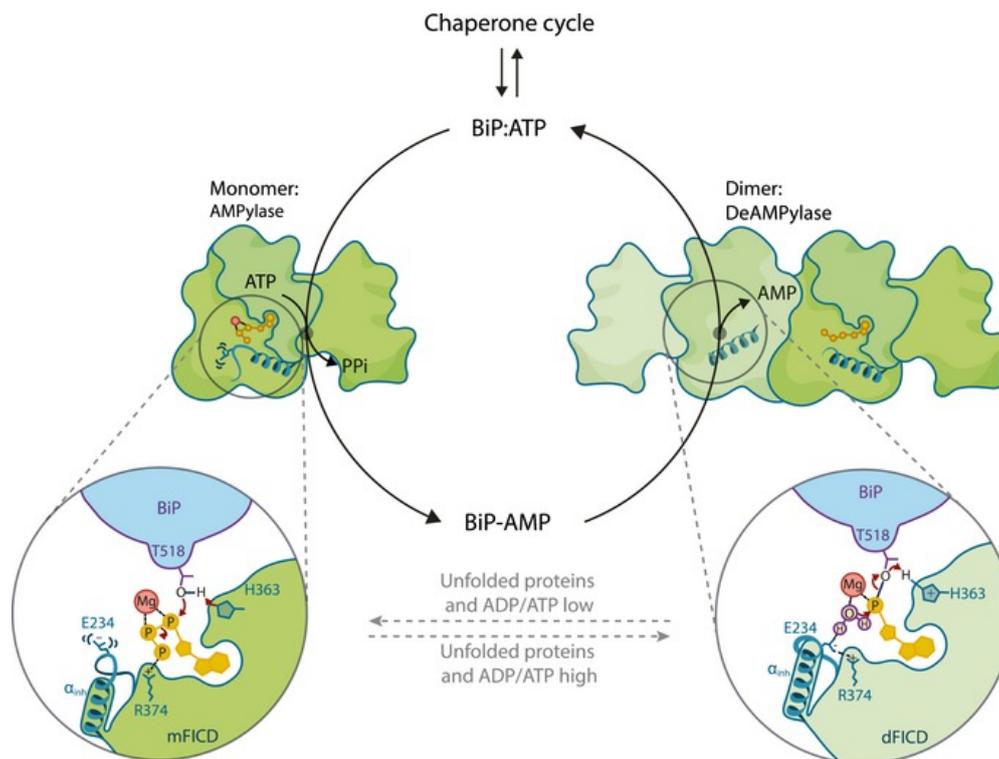


Abb. 4 Model der konfrmationsabhängigen (de)AMPylierungs Funktion FicDs. Monomeres FicD (links) AMPyliert BiP. In dieser Konfimation ermöglicht das flexible E234 der α_{inhib} -Helix eine Bindung von ATP, die eine AMP-Übertragung auf T518 von ATP katalysiert. Dimeres FicD (rechts) besitzt eine starre Position von E234 in der α_{inhib} -Helix, welche die ATP-Bindung inhibiert, dafür die Bindung des AMPs von T518A ermöglicht. E234 positioniert katalytisches Wasser in der Weise, dass es zur deAMPylierung BiPs kommt. (Modifiziert nach Perera et al. 2019)

der NBD Region BiPs mit deutlich höherer Affinität zu ATP gebundenem BiP (Fauser et al. 2021b).

Die Fic-Domäne besteht aus einem Fic-Motiv HxFxDGNGRxxR, welches die Übertragung eines AMP-Moleküls von ATP katalysiert (Hedberg und Itzen 2015). Diese bildet eine katalytische Schleife, in der ein Histidin die Deprotonierung einer Hydroxylgruppe des T518 von BiP ermöglicht und die Phosphatgruppen des ATPs für einen nucleophilen Angriff optimal positioniert (Xiao et al. 2010; Hedberg und Itzen 2015).

Zwei FicD-Moleküle können Homodimere bilden mit relevanter Bedeutung für ihre Funktion (Perera et al. 2019). Es wird davon ausgegangen, dass im FicD-Dimer eine unflexible Glutaminsäure (E234) der inhibitorischen Helix (α_{inhib}) die Phosphatbindungstasche verändert, sodass eine AMPylierungs-kompetente ATP-Bindung an FicD gehemmt wird (Abb. 4). Im Falle des FicD-Dimers katalysiert ein unflexibles E234 durch Positionierung eines katalytischen Wassermoleküls einen nukleophilen Angriff auf das α -Phosphat des T518-AMP, sodass eine deAMPylierung vorgenommen wird (Perera et al. 2021).

Die AMPylierung durch FicD stellt eine reversible Inaktiverung der Chaperon-Aktivität BiPs dar. Im Zellmodell betrachtet, führen ER-Stress Zustände mit erhöhter Konzentration ungefalteter Proteine vermehrt zu FicD-Dimeren mit deAMPylierungs-Aktivität (Chambers et al. 2012). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt, da sich *in-vitro* kein relevanter Effekt ungefalteter BiP-Substrate auf FicD zeigte (Fauser et al. 2021a). Eine Theorie ist, dass ein Rückkopplungsmechanismus über die Nukleotidbindung der NBD, den ER-Energiestatus repräsentierend, die Dimerisierung beeinflusst. Dabei konnte eine vermehrte Dimer-Dissoziation bei ATP-Bindung beobachtet werden. Umgekehrt hatte ein steigendes ADP/ATP-Verhältnis eine vermehrte Dimerisierung zur Folge. ER-Stresszustände können mit erhöhten ADP-Konzentrationen einhergehen, z.B. durch eine erhöhte Chaperon-Aktivität, sodass eine indirekte Rückkopplung FicDs über das Nukleotid-Verhältnis möglich wäre (Perera et al. 2019).

2. Zielsetzung

Die Rolle der UPR in Krebszellen wird zunehmend erforscht, jedoch ist die Rolle von FicD, insbesondere der AMPylierung, als wesentlicher Regulator BiPs in Krebszellen weitgehend unklar. Ziel dieser Arbeit war es, einen allgemeinen Überblick über die Einflüsse FicDs auf die Zellcharakteristika von Krebszellen zu erhalten. Ein Schema zur Fragestellung ist in Abb. 5 gezeigt. Dabei lag der Fokus primär auf der Proliferation, der Lokalisation FicDs sowie auf der Untersuchung möglicher Einflüsse auf die UPR-Dynamik.

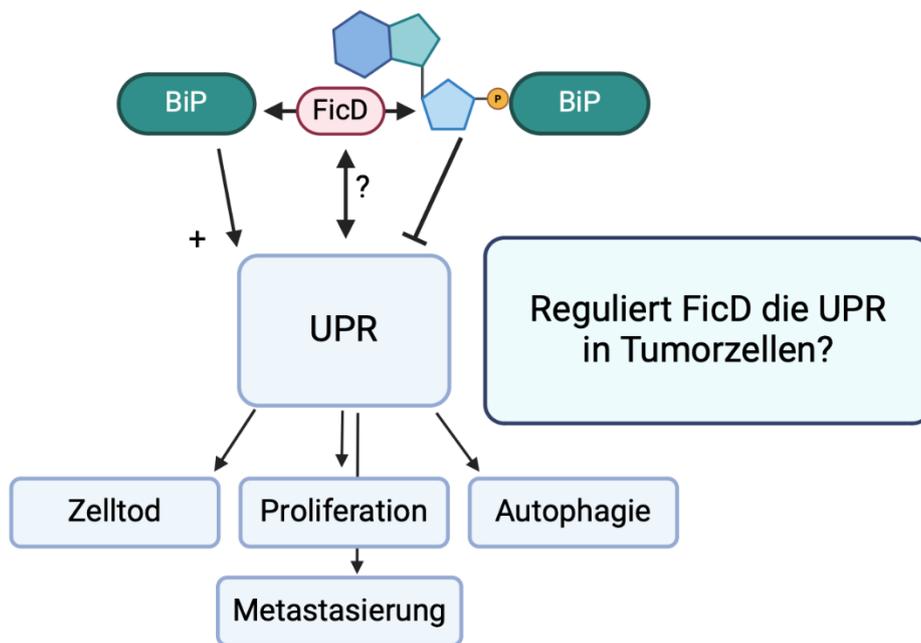


Abb. 5 Schema zum möglichen Einfluss FicDs auf Tumorzellen Gezeigt sind die vorbeschriebenen Einflüsse der UPR in Tumorzellen wie auf Zelltod, Proliferation, Autophagie und Metastasierung. Dem Chaperon BiP kommt in der UPR eine besondere Rolle zu, da es direkt an der Faltung von Proteinen im ER beteiligt ist und ebenso als Sensor dient (Wang und Kaufman 2014). FicD besitzt durch die AMPylierung BiPs möglicherweise ebenso Einfluss auf das Überleben und Verhalten von Tumorzellen, in dem es BIP aktiviert oder inaktiviert. Die Grafik wurde mit Biorender 2024 erstellt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Tabelle 1 Zelllinien mit Kulturmedien und Zusätzen

Zelllinie	Medium	Antibiotika	% FCS	Weitere Zusätze
H1299	DMEM (41965-039, Gibco)	Penicillin (100 units/ml) Streptomycin (100 µg/ml) (15070063, Gibco)	10% FCS (10270, Gibco)	-
A549				
HT-29				
MDA-MB-231				
MDA-MB-468				
HeLa				
HEK-293				
HCT-116				
HROC24	DMEM (41965-039, Gibco) : Ham's F-12 (11765054, Gibco)			2mM L-Glutamin
LAN-1 PT	RPMI 1640 (11875093)			-
LAN-1 BM				
MCF-7				
OVCAR-8				
CaCo2	MEM (11058021, Gibco)		20% FCS (10270, Gibco)	1% NEAA (11140050, Gibco)
MDA-MB-231 Knockdown (sramble, FicD sh1-5)	DMEM (41965-039, Gibco)		10% FCS (10270, Gibco)	3 µg/ml Puromycin (10131027, Gibco)
MDA-MB-231 FicD Knockout				-
HEK-293 FicD Knockout				-
MDA-MB-231 Überexpression (LeGO FicD (+GFP))				-

3.1.1. Plasmide

In diesem Abschnitt sind die verwendeten Plasmide aufgelistet. Der LeGO-iB₂ Neo+ Leervektor wurde freundlicherweise von PD Dr. Kristoffer Riecken (UKE) zur Verfügung gestellt. Der pSpCas9-2A-GFP Leervektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer (UKE) zur Verfügung gestellt. Für die Selektion in Bakterien wurde Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin (Amp) und 50 µg/ml Kanamycin (Kan) verwendet.

Tabelle 2 Plasmide zur Expression mit Resistenzangaben

Plasmid	Resistenz in Bakterien	Resistenz in Humanzellen
pEGFP N1	Kan	-
pEGFP N1 + FicD	Kan	-
LeGO iB ₂ Neo	Amp	G418
LeGO iB ₂ Neo + GFP	Amp	G418
LeGO iB ₂ Neo + FicD-GFP	Amp	G418
pSpCas9-2A-GFP	Amp	-
pSpCas9-2A-GFP + FicD-KO	Amp	-

3.1.2. Primer und RNAs

Nachfolgend stehen die Primer für die qPCR-Versuche. Für diese wurden Primerpaare mit Annealing-Temperaturen zwischen 59-60 °C ausgewählt.

Tabelle 3 Primer für qPCR von FicD und UPR Response Elementen

Primer	Sequenz (5'-3')	Ziel mRNA
FICD_1_RV_qPCR	CTTCCAACCTACCCGCTGGAG	FicD
FICD_1_FW_qPCR	CCTGCTCAGGAGCAAACCG	
uXBP1qPCR_fwd	CAGACTACGTGCACCTCTGC	XBP1u
uXBP1qPCR_RV	CTGGGTCCAAGTTGTCCAGAAT	
sXBP1qPCR_fwd	GCTGAGTCCGCAGCAGGT	XBP1s
sXBP1qPCR_RV	CTGGGTCCAAGTTGTCCAGAAT	
tXBP1qPCR_Wwd	TGAAAACAGAGTAGCAGCTCAGA	XBP1
tXBP1qPCR_RV	CCCAAGCGCTGTCTTAACTC	
CHOPqPCR_fwd	AGAACCAGGAAACGGAAACAGA	CHOP
CHOPqPCR_rv	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT	
BiP_FW	GACAAGAAGGAGGACGTGGG	BiP
BiP_RV	GACAGAGGGACATCAGCACC	
GAPDH FW	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	GAPDH
GAPDH RV	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	

Tabelle 4 Primer für die Klonierung des pEGFP N1 + FicD Plasmids

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur	Verwendung
pEGFP-N1 lin FW	CGGGATCCACCGGTC	56 °C	Linearisierung des pEGFP-N1
pEGFP-N1 lin RV	GAATTCGAAGCTTGAGCTCGAG	56°C	
Primer 3683	ATGATGCTCATAACCAATGGCTTC	57°C	Amplifikation des FicD Insert
Primer 3681	GCTTCCTCCTCCGCTGCTTCCTCCTCCGCTGGGCTTCA CAGGAAGCGTCTC	78°C	

HYPE to pEGFP-N1 FW	GGA ^{CT} CAGATCTCGAGCT CAAGCTT ^{CGAAT} TCATGATGCTCATA ^{CCAA} TGG	68 °C	Anpassung des Inserts
HYPE to pEGFP-N1 RV	CTCACCATGGTGGCGACC GGTGGATCCC ^{GGGGCTTC} ACAGGAAG	74 °C	
FicD Insert seq FW	ATGATGCTCATA ^{CCAATG} GCTTC	58 °C	Sequenzierung des FicD Inserts

Tabelle 5 Primer für die Klonierung des LeGO iB₂ Neo + FicD-GFP Plasmids

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur	Verwendung
HYPE-GFP to LeGo iB2 Neo+ _FW	GTC CTC CGA TTG ACT GAG TCG CCC GGA TCC ATG ATG CTC ATA CCA ATG G	70 °C	Linearisierung des LeGO-Plasmids
HYPE-GFP to LeGo iB2 Neo+ _RV	CCT CGT CGA GGC CTG CAG GAA TTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C	69°C	
HYPE to pEGFP-N1 FW	GGA ^{CT} CAGATCTCGAGCT CAAGCTT ^{CGAAT} TCATGATGCTCATA ^{CCAA} TGG	68 °C	Amplifikation des Inserts
HYPE to pEGFP-N1 RV	CTCACCATGGTGGCGACC GGTGGATCCC ^{GGGGCTTC} ACAGGAAG	74 °C	
IRES-Rev seq	CCTCACATTGCCAAAAGA CG	57 °C	Sequenzierung des Plasmids

Tabelle 6 sgRNAs für die Klonierung des pSpCas9-2A-GFP FicD-KO Plasmids und Sequenzierprimer für die KO-Klone

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur	Verwendung
FICD genomic FW	GIT GAG TAC ACA CGA TGC GG	56 °C	Primer für nested-PCR der genom. DNA
FICD genomic RV	ACC TCA GGA CAG CCT TTG TC	57 °C	
FICD genomic_seq_FW	CGG AAG AAG ACA AGG ACA TCA	55 °C	Sequenzierung der genom. DNA
FicD_sg1 FW	CACCGTCCGACTACTACC ACGTGT	68 °C	FicD guide RNAs für Cas-Kassette
FicD_sg1 RV	AAACACACGTGGTAGTAG TCGGAC	72 °C	

FicD_sg4 FW	CACCCAAGATGGACCCGG ACTTCG	74 °C	
FicD_sg4 RV	AAACCGAAGTCCGGGTCC ATCTTG	71 °C	
U6 seq FW	GAGGGCCTATTTCCCATG ATT	57 °C	Sequenzierung des Plasmids

Tabelle 7 shRNAs für FicD Knockdown

shRNA	TRC-Nummer
sh1	TRCN0000118932
sh2	TRCN0000118933
sh3	TRCN0000118934
sh4	TRCN0000118935
sh5	TRCN0000122536

3.1.3. Antikörper

Tabelle 8 Verwendete Antikörper für Western-Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Nummer, Hersteller
HRP Goat Anti-Rabbit	Kaninchen	1:20000	ab205718, Abcam
HRP Goat Anti-Mouse	Maus	1:20000	ab97040, Abcam
HRP Rabbit Anti-Goat	Ziege	1:20000	ab6741, Abcam
Anti-BiP	Kaninchen	1:5000	PAS-29705, Invitrogen
Anti-AMP	Maus	1:1000	17G6, Höpfer D. UKE
Anti-GAPDH	Ziege	1:1000	ab9483, Abcam
Anti-GFP	Maus	1:1000	11814460001, Roche

3.1.4. Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser (A. dest) angesetzt. Zur Einstellung der pH-Werte wurden 1 M NaOH oder 1 M HCL verwendet. Wenn notwendig wurden die Puffer sterilfiltriert und 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

Tabelle 9 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
4x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris pH 6,8 4% SDS 30% Glycerol 1,3% Bromphenolblau 20% Mercaptoethanol
Trenngel 10%	375 mM Tris pH 8,8 0,1% SDS 10% Acrylamid 10 µl/ml 10% APS 1 µl/ml TEMED
Sammelgel	125 mM Tris pH 6,8 0,1% SDS 4% Acrylamid 10 µl/ml 10% APS 1 µl/ml TEMED
PBS Puffer	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 10 mM Na ₂ KHPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
SDS Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
TBS-T	20 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% Tween 20
Western-Blot-Puffer	2,5 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol
Lysepuffer	20 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,5 mM Benzamidin
Waschpuffer	Lysepuffer 1 mM PMSF

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. SLIC-Klonierung pEGFP-N1 + FicD

Zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung von FicD in Zellen wurde ein pEGFP-N1 Backbone mit der FicD Sequenz mittels sequence and ligase independent cloning (SLIC) versehen. Die Primer sind in Tabelle 4, die Vektorkarte in Abb. 24 aufgelistet.

Der SLIC Prozess kommt initial ohne kohärente Überhänge des Backbones und Inserts aus, da es die Exonuklease Aktivität der T4 PNK nutzt, um Einzelstrangüberhänge zu erzeugen (Li und Elledge 2007).

Zunächst wurden per PCR mit Q5 Polymerase das FicD Insert aus einem vorklonierten Plasmid amplifiziert (Tabelle 10). Die Plasmidkarte des Insert-Donors ist in Abb. 29 aufgezeigt. Bei einer zweiten PCR wurden Primerpaare verwendet, die das Insert um ca. 30 bp Überhänge, der Vektorsequenz entsprechend, erweiterten. In einer dritten PCR wurde das pEGFP-N1-Backbone linearisiert. Die verwendeten Primerpaare mit entsprechenden Annealing Temperaturen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Zur Berechnung der Annealing-Temperaturen wurden nur die tatsächlich bindenden Primerbasen einbezogen und mit tmcalculator.neb.com berechnet. Die PCR-Produkte auf ein 1% Agarose Gel aufgetragen und nach Auftrennung aufgereinigt (siehe 5.2.9).

Tabelle 10 Zusammensetzung der Q5 PCR Reaktion

Volumen	Bestandteil
10 µl	5x Q5 Reaktionspuffer
10 µl	5x GC Enhancer
2,5 µl	Fwd Primer (10 µM)
2,5 µl	Rv Primer (10 µM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Template DNA (10 ng/µl)
22,5 µl	Nuclease freies H ₂ O
0,5 µl	Q5 HF DNA Polymerase

Für die SLIC Reaktion wurde ein Reaktionsmix (siehe Tab. 11) mit einem 1:10 Vektor/Insert Verhältnis ohne T4 Enzym angesetzt (Tabelle 11), gevortext und kurz abzentrifugiert. Das nötige Konzentrationsverhältnis der beiden Produkte wurde aus dem jeweiligen Molekulargewicht dieser Teilstücke mithilfe des NEB Ligation Calculator (nebiocalculator.neb.com), berechnet. Nach Zugabe der T4 Polymerase wurde der Mix für genau 2,5 min bei Raumtemperatur (RT), danach für 10 min auf Eis inkubiert, um die Reaktion

zu beenden. Es folgte die Transformation in *E.coli* XL1 Blue Bakterien (5.2.10) unter Kanamycin Selektion und folgende Sequenzierung (5.3.7). Reparaturmechanismen in den Bakterien sorgen dafür, dass entstandene Einzelstranglücken nach Ligation im Rahmen der Transformation geschlossen werden. Zur Validierung wurde die Plasmid DNA per Sanger Sequenzierung überprüft.

Tabelle 11 Zusammensetzung der SLIC Reaktion

Volumen/Menge	Bestandteil
X μ l	Insert
45 ng	Backbone
1 μ l	2.1 buffer NEB
Rest auf 10 μ l	ddH ₂ O
0,5 μ l	T4 DNA Polymerase

3.2.2. Klonierung LeGO iB2 Neo + FicD –

Ähnlich wie in 5.2.1 wurde ein Lentiviral Gene Ontology Vector (Legovektor) mit der FicD-GFP Sequenz versehen, um eine stabile Überexpression in Zellen zu etablieren. Die Expression des Zielgens wird durch die Verwendung von Lentiviren erreicht. Diese Transduktion führt zur Integration eines Promotor-Insert Komplexes, der zu einer dauerhaften Expression des Zielgens in der Zelle führt (Weber et al. 2008).

Für die Überexpression wurde ein für FicD-GFP, für die Kontrolle ein ausschließlich für GFP codierendes Insert verwendet. Die Vektorkarten, verwendeten Primerpaare und Annealing Temperaturen lassen sich der Tabelle 5 entnehmen. Es wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen BamH1 und EcoR1 vorgenommen. Dazu wurde ein Reaktionsmix (Tabelle 12) erstellt und dieser 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Gelauf trennung und Reinigung des linearisierten Vektorprodukts (5.2.9).

Tabelle 12 Zusammensetzung des Reaktionsmix zur Plasmidlinearisierung

Volumen/Menge	Bestandteil
1 μ g	Plasmid DNA
2 μ l	CutSmart Buffer (NEB #B6004))
1 μ l	BamI HI (NEB #R3136)
1 μ l	EcoRI HI (EB #R3101)
Rest auf 20 μ l	ddH ₂ O

Das FicD-GFP Insert wurde, analog zum Abschnitt 5.2.1, mit der Q5 PCR, aus dem bereits vorkloniertem pEGFP-FicD Vektor amplifiziert. Die verwendeten Primer bildeten 30 bp Überhänge zum LeGo iB2 Neo+ Vektor (Tabelle 5). Wie in Abschnitt 5.2.1 folgte eine Q5 PCR und T4 Reaktion mit abschließender Transformation und Sequenzierung. Zur Transformation wurde Ampicillin als Selektionsantibiotikum eingesetzt.

3.2.3. Planung und Vektor-Klonierung für FicD Knockout mit CRISPR/Cas

Beim CRISPR/Cas-System wird die Cas9-Endonuklease mit einer Führungssequenz (single guide RNA) an die Ziel-DNA geführt, an welcher Cas9 einen Doppelstrangbruch erzeugt. Zelleigene Reparaturmechanismen führen darauf zu gezielten Genveränderungen an der Schnittstelle (Jinek et al. 2012). Dieser Versuch basiert auf einem in Nature publizierten Protokoll und beinhaltet ein Cas9-Plasmid mit GFP-Fluoreszenz zur Fluorescence Cell Sorting (FACS) Selektion (Ran et al. 2013).

Für das Erstellen eines CRISPR/Cas Knockouts wurden in silico für das FicD Gen passende single guide RNAs (sgRNAs) mit der Suchmaschine chopchop.cbu.uib.no ausgewählt. Die Schnittstelle wurde für ein vollständiges Ausschalten FicDs vor der Fic-Domäne gesetzt. In dieser Weise wurden vier sgRNA Paare (Tabelle 6) ausgewählt und von idtdna.com bezogen.

Tabelle 13 Reaktionsansatz 1 für sgRNA Phosphorylierung

Volumen	Bestandteil
1 µl	sgRNA FW (100µM)
1 µl	sgRNA RV (100µM)
1 µl	T4 Ligation Buffer
1 µl	T4 PNK
6 µl	ddH ₂ O

Tabelle 14 Thermozykler Programm zur Phosphorylierung und Primeranlagerung der sgRNA

Schritt	Temperatur	Dauer
Phosphorylation und Primeranlagerung	37 °C	30 min
Temp. Absenkung	95 °C	5 min
	25 °C	5°C/5 min

Für die Klonierung eines CRISPR/Cas-Vektors wurden die Primerpaare am 5' Ende mit der T4 Polynukleotid Kinase (PNK) phosphoryliert (Tabelle 13 und Tabelle 14). Jeder sgRNA Primer-Ansatz wurde 1:200 mit ddH₂O verdünnt und anschließend gemeinsam mit dem CSpCas-Plasmid mit dem Bpil Restriktionsenzym verdaut und mit der T4 Ligase ligiert. Das Enzym Bpil schneidet die 5'GAAGAC(2/6) Schnittstelle im CRISPR/Cas Plasmid pSpCas9-2A-GFP

(freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Leticia Oliveira-Ferrer (UKE) zur Verfügung gestellt) und die T4 Ligase ligiert die sgRNA in das Plasmid. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne sgRNA-Paar. Hierauf erfolgte eine Exonlease-Behandlung mit PlasmidSafe Exonuclease, die die Plasmidpreparation von kontaminierender chromosomaler DNA bereinigte.

Tabelle 15 Reaktionsansatz 2 zur pSpCas9-2A-GFP FicD KO Plasmid Klonierung

Volumen	Bestandteil
(100 ng)	pSpCas(BB)
2 µl	1:200 PNK Ansatz
2 µl	Tango Buffer, 10x
1 µl	DTT, 10 mM
1 µl	ATP, 10 mM
1 µl	Bpil
0,5 µl	T4 Ligase
Rest auf 20 µl	ddH ₂ O

Tabelle 16 Thermozykler Programm Verdau und Ligation des pSpCas9-2A-GFP FicD KO Plasmids

Schritt	Temperatur	Dauer	
Verdau und	37 °C	5 min	6
Ligation	21 °C	5 min	Zyklen

Tabelle 17 Reaktionsansatz 3 Exonuklease Behandlung des pSpCas9-2A-GFP FicD KO Plasmids

Volumen	Bestandteil
11 µl	Ansatz Nr. 2
1,5 µl	PlasmidSafe Buffer, 10x
1,5 µl	ATP, 10 mM
1 µl	PlasmidSafe
	Exonuclease

Tabelle 18 Thermozykler Programm Exonuklease Behandlung des pSpCas9-2A-GFP FicD KO Plasmids

Schritt	Temperatur	Dauer
Inkubation	37 °C	30 min
Exonuklease	70°C	30 min
Deaktivierung		

Die fertig ligierten CRISPR Plasmide wurde darauf in *E.coli* XL1 Blue transformiert (siehe 5.2.10). Zur Selektion des pSpCas9-2A-GFP-Plasmids wurden Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin genutzt. Als Positivkontrolle diente ein CRISPR/Cas Leervektor pSpCas9-2A-GFP.

Am darauffolgenden Tag wurden jeweils drei Kolonien pro Platte gepickt und per Mini-Plasmidpreparation gereinigt. Zur Validierung der korrekten Sequenz erfolgte die Sanger-Sequenzierung vom U6 Promoter mit dem U6-Fwd Primer durch microsynth.com. Etablierung einer FicD-Knockout Zelllinie durch CRISPR/Cas

3.2.4. Etablierung einer FicD-Knockout Zelllinie durch Crispr/Cas

Zur Transfektion des CRISPR/Cas-Vektors wurden analog zu Abschnitt 3.4 „Transfektion“ in 6-Well Platten je Well 9×10^5 MDA-MB-231 bzw. 9×10^5 HEK-293 Zellen ausgesät, über Nacht inkubiert und am darauffolgenden Tag transfiziert. Der pSpCas9-2A-GFP Leervektor wurde ebenso transfiziert und diente als Transfektionskontrolle. Die verwendeten Reagenzien und Konzentrationen je transfiziertes Well lassen sich den Tabelle 19 und Tabelle 20 entnehmen.

Tabelle 19 Transfektionsansatz für HEK-293 Zellen

Zellreihe	Reagenz	Volumen /Menge
HEK-293	K2® Multiplier	20 µl
	DNA-Menge	2,4 µg
	K2® Transfection Reagent	9,6 µl
	Serumfreies Medium zur Verdünnung	260 µl

Tabelle 20 Transfektionsansatz für MDA MB 231 Zellen

Zellreihe	Reagenz	Volumen /Menge
MDA MB 231	K2® Multiplier	20 µl
	DNA-Menge	2,5 µg
	ATCC TransfeX™	5 µl
	Serumfreies Medium zur Verdünnung	250 µl

Nach 24 h erfolgte die Transfektionskontrolle mittels Fluoreszenzmikroskopie (siehe 5.3.6). Um nur erfolgreich transfizierte Zellen zu isolieren, wurde eine FACS durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst aus den 6-Well Platten abgelöst, das Medium abgenommen, 500 µl 0,05% Trypsin/EDTA-Film auf die Zellschicht pipettiert und mit 5 ml warmen Zellkulturmedium wieder suspendiert.

Die Zellsuspension wurde bei $200 \times g$ für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, mit 200 µl PBS resuspendiert, durch ein 40 µm Zellsieb in FACS-Röhrchen gefiltert und bis zum FACS auf Eis gestellt. Darauf erfolgte die Isolation klonaler Zelllinien per BD FACSAria™ Fusion

Flow Cytometer in mit Zellkulturmedium vorgelegten 96-Well Platten (100 µl je Well) per Einzelzellsortierung. Je sgRNA bzw. Leervektor wurden zwei Platten vorgesehen. Die Anregung erfolgte per 488 nm Laser mit Fluoreszenzaufnahme durch einen 530/30 Filter. Nach dem FACS wurde mittels Lichtmikroskop kurz kontrolliert, ob Einzelklone in der Mehrheit der Wells vorhanden waren. Darauf erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂. Die FACS Arbeiten wurden in der UKE Cytometry und Sorting Core Facility durchgeführt.

Die Expansion der Klone dauerte in der Regel 3-4 Wochen. In der ersten Woche wurden 100 µl warmes Zellkulturmedium (Tabelle 1) zu den Zellen hinzugegeben. Im Nachhinein erfolgte der Mediumwechsel von 100 µl alle fünf Tage. In der zweiten Woche erfolgte eine Kontrolle durch Lichtmikroskopie einzelne Wells zur Markierung einzelner Rundkolonien.

Bei mehr als 60% Konfluenz eines Wells fand die Passagierung und Expansion in 48 Well Platten statt. Bei mehr als 80% Konfluenz in der 48 Well Platte wurde erneut passagiert, wobei 80% der Zellsuspension für genomische Sequenzierung und die restlichen Zellen für weitere Expansion verwendet wurden.

3.2.5. Isolation genomischer DNA der CRISPR/Cas-Klone

Aus der Zellpassagierung übrig gebliebenen Zellsuspension erfolgte daraufhin die Isolation genomischer DNA. Hierzu wurde diese bei 1000 x g abzentrifugiert und mit 100 µl kaltem PBS suspendiert. Zur Zelllyse, Proteolyse und RNA-Abbau wurden 1 µl Proteinkinase K und 3 µl RNase A hinzugegeben, kurz gevortext und 100 µl Lysis Puffer dazu pipettiert. Nach erneutem vortexen wurde die Suspension für 5 min bei 56 °C und 1400 rpm inkubiert.

Zur Bindung der genomischen DNA wurden 400 µl gDNA Binding Puffer zum Lysat hinzugegeben und für 5-10 min mehrfach gevortext. Dieser Mix wurde auf eine Reinigungssäule mit Sammelröhrchen überführt und für 3 min bei 1000 x g und 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Nach dem Wechsel des Sammelröhrchens wurden 500 µl gDNA Waschpuffer auf die Säule gegeben und direkt für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nach Leerung des Sammelröhrchens wiederholt. Die zweifach gewaschene Säule wird hierauf in ein 1,5 ml DNase-freies Reaktionsgefäß gesteckt, 40 µl DNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde darauf auf Eis gestellt.

3.2.6. Validierung des FicD Knockouts durch Sequenzierung

Zur Validierung des Knockouts, wurde die genomische Schnittstelle mithilfe einer Nested-PCR amplifiziert. Die erstellten Primer schlossen die sgRNA analoge Stelle mit mindestens 200 bp Abstand ein. Dabei werden zwei qPCRs (siehe Tabelle 10) hintereinandergeschaltet. Nach

Abschluss des ersten PCR-Programms wurde ein zweiter identischer PCR-Mix mit 1 µl des ersten PCR-Produkts als Template DNA verwendet.

Die amplifizierte DNA wurde mit Probenpuffer auf ein 1% Agarose Gel aufgetragen und für 30 min bei 120 mV laufen gelassen. Die Bandenhöhe wurde mit der übereinstimmenden kb Markerhöhe abgeglichen. Die Bande wurde daraufhin herausgeschnitten und aufgereinigt (5.2.9). Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit einem Fwd Sequenzierprimer, der ca. 20 bp Abstand zum 3' Ende des Fwd PCR Primers besaß, zur Sequenzierung bei microsynth.com eingeschickt. Die verwendeten Primer lassen sich Tabelle 6 entnehmen.

3.2.7. Transduktion FicD Überexpression in LeGo

Die stabile Überexpression eines FicD-GFP Fusionsproteins in MDA-MB-231 Zellen wurde mithilfe einer lentiviralen Transduktion mit dem LeGO iB2 Neo+ Vektor durchgeführt. Als scramble Kontrollzelle wurde ein leeres LeGO-Vektorkonstrukt transduziert. Die lentiviralen Arbeiten wurden freundlicherweise von Dr. Stefanie Muhs durchgeführt.

Zur Produktion der Lentiviren wurden zusätzlich zum Zielplasmid drei weitere Plasmide verwendet. Das pMDLg/PRRE Gag-Pol Plasmid (#12251 Addgene, HIV-1 GAG/POL Insert), welches für Zusammenbau und Replikation des Virus notwendig ist; das pRSV-Rev-Plasmid (#122253 Addgene, Rev Insert), welches das Rev-Protein exprimiert und für den Export viraler RNA aus dem Zellkern zuständig ist, und das VSV-G-pCMV-Plasmid (#8454, Addgene), welches für das vesikuläre Stomatitis-Virus-Glycoprotein (VSV-G) codiert und das Hüllprotein für das Lentivirus stellt. Das Zielplasmid wurde mit den genannten Plasmiden in HEK-293T, eine zur Virusproduktion geeignete Zellreihe, transfiziert. Die Transduktion der Viren in die Zielzellen führt zur stabilen Zielgenexpression (Weber et al. 2008).

Ein Tag vor der Transfektion wurden 10 ml Zellmedium mit 5×10^6 HEK-293T Zellen in 10 ml Medium in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden zwei Lösungen der Tabelle 21 entsprechend vorbereitet. Die Ansätze wurden für 5 min bei RT inkubiert, zusammengemischt und erneut für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der HEK-Zellen abgenommen, mit PBS gewaschen und mit 5 ml frischem Vollmedium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Lipofectamine/DNA Mix vorsichtig zu den Zellen gegeben, diese 3 h in den Inkubator gestellt und danach 5 ml Vollmedium hinzugegeben. Am Vortag der ersten Transduktion wurden 3×10^5 der MDA-MB-231 Zielzellen in 2 ml Vollmedium je Well in 6-Well Platten ausgesät.

Tabelle 21 Transfektionsansätze zur Produktion lentiviraler Viren mit LeGO iB2 Neo+ GFP FicD OE

Lösung	Menge/Volumen	Bestandteil	
A	10 µg 10 µg 5 µg 2 µg 750 µl	LeGO iB2 Neo+ pMDLg/PRRE Gag-Pol P_RSV_Rev VSV-G pCMV OptiMEM™ (Thermofischer, 31985062)	Zielvektor HIV-1 GAG/POL Insert Rev Insert VSV-G Protein Minimalmedium
B	40 µl 750 µl	Lipofectamine™ 2000 (Thermofischer, 11668019) OptiMEM™ (Thermofischer, 31985062)	Transfektionsreagenz Minimalmedium

Am Folgetag wurde vor Zugabe der Virusüberstände das Medium der MDA-Zellen abgenommen und mit 1 ml Vollmedium ersetzt. Der Virusüberstand der HEK-293T Zellen wurde abgenommen und durch einen Spritzenvorsatzfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Der Überstand wurde vorsichtig durch frisches Vollmedium ersetzt. Je Well wurden 2 ml des filtrierten Virusüberstandes auf die MDA-Zielzellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen weiter im Inkubator kultiviert. Dieses Vorgehen wurde nach 48 und 72 h wiederholt. Die Selektion der Zielzellen erfolgte 72 h nach der letzten Transduktion mit 700 µg/ml G418 (Geneticin). Zur Validierung der erfolgten Überexpression wurden Western-Blots (5.4.2) angefertigt.

3.2.8. FicD sh-RNA Knockdown

Zur Etablierung eines FicD Knockdowns mithilfe von small hairpin RNAs (shRNAs), wurde eine lentivirale Transduktion in MDA-MB-231 Zellen von fünf MISSION® shRNA Klonen auf Basis des pLKO.1 Plasmids (Abb. 23) durchgeführt (Moffat et al. 2006). Diese wurden freundlicherweise von Dr. Stefanie Muhs aus der AG Itzen durchgeführt. Die shRNAs stammen von „The RNAi Consortium“ (TRC) und wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Als Kontrolle wurde eine scramble-shRNA verwendet, die keine Knockdown Effekt-Eigenschaften besitzt. Die Transduktion erfolgte analog wie in Windhorst 2010 beschrieben (Windhorst et al. 2010). Eine Auflistung der TRC-Nummern befindet sich in Tabelle 7.

Zur Virusproduktion wurden je shRNA 10 ml Zellmedium mit 5×10^6 HEK-293T Zellen in 10 ml Medium in 10 cm Petrischalen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, vorsichtig mit 5 ml frischem Vollmedium ersetzt und die Zellen wieder in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde je shRNA ein Transfektionsmix der Tabelle 22 entsprechend

angesetzt und für 5 min bei RT inkubiert und vorsichtig zu den HEK-Zellen gegeben. Nach 4-6 h im Inkubator wurden vorsichtig 5 ml Vollmedium zu den Zellen gegeben und diese in den Inkubator gestellt.

Tabelle 22 Transfektionsansatz zur Produktion lentiviraler Viren mit shRNA zum FicD KO

Menge/Volumen	Bestandteil	
200 µl	Opti-MEM™ (31985-06, Gibco)	Minimalmedium
1 µg	shRNA Plasmid	pLKO.1 mit shRNA gegen FicD
750 ng	psPAX2	(12260, Addgene) HIV-1 GAG, POL, Rev und tat Insert
250 ng	pMD2.G	(12259, Addgene) VSV-G Protein
6 µl	FuGENE (E2311, Promega)	Transfektionsreagenz

Am selben Tag wurden MDA-MB-231 Zielzellen mit 2×10^5 Zellen in 2 ml Vollmedium je Well in 6 Well Platten ausgesät. Für jede shRNA wurde ein Well ausgesät. Ein zusätzliches Well wurde ohne spätere Virustransduktion als Selektions-Kontrolle ausgesät. Die Abnahme, Filtrierung und Überführung des Virusüberstandes erfolgte 24 h und 48 h nach der Transfektion analog zu 5.2.7. Zusätzlich wurden 8 µg/ml Sequabrene (S2667, Sigma-Aldrich) zu den Zellen gegeben. Es handelt sich hierbei um ein positiv geladenes Polycation, dass zu verminderter elektrostatischer Abstoßung zwischen Lentivirus und Zielzelle führen soll und so die Transduktionseffizienz erhöht (Denning et al. 2013).

Nach 72 h wurden das Medium der virusbehandelten MDA-MB-231-Zielzellen und der Kontrollzellen mit 3 µg/ml Puromycin versetztem Medium ersetzt. Da sich innerhalb von drei Tagen nach Mediumwechsel nur geringer Zelltod im Kontrollwell zeigte, wurde die Puromycin Konzentration auf 4 µg/ml erhöht. Nach fünf Tagen waren alle Zellen im Kontrollwell gestorben. Die Validierung des shRNA Knockdown erfolgte nach vier Wochen mittels qPCR mit den in Tabelle 3 genannten Primern für die FicD mRNA Expression.

3.2.9. Gelaufftrennung und PCR-Clean-up

Die PCR-Produkte wurden in DNA-Ladepuffer (NEB# B7025S) aufgenommen und neben einer 1 kb DNA Ladder (NEB# B7025S) auf ein 1% Agarose Gel (Roth, 9012-36-6) mit DNA Stain G (39803, SERVA) aufgetragen und 30 min unter 120 mV Spannung in 1x TEA Puffer (42553, SERVA) laufen gelassen. Die Einzelbanden wurden aus dem Gel herausgetrennt und mit dem NucleoSpin Gel Clean-Up Kit (740609.50, Macherey-Nagel) aufgereinigt. Die Reinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 25 µl Nuklease freiem Wasser.

3.2.10. Transformation und Mini-Plasmidpreparation

Zur Amplifikation des Plasmidprodukts wurde eine Transformation mit *E.coli* XL1 Blue Bakterien mit anschließender Mini-Plasmidpreparation durchgeführt.

Die Transformation erfolgte durch Inkubation von ca. 100 ng Plasmid DNA mit XL1 Blue *E.coli* Bakterien auf Eis. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und zweistündiger Inkubation bei 37 °C in LB-Medium (X968.4 Roth) wurden die Bakterien bei 300 x g zentrifugiert und auf eine Agar Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (z.B. 100 µg/ml Ampicillin) ausgebracht. Nach Inkubation ÜN bei 37 °C wurden pro Konstrukt je 3 Kolonien für die Plasmidpräparation ausgewählt. Hierfür wurde die Kolonien in 6 ml LB-Medium mit AB aufgenommen und ÜN bei 37 °C und 180 rpm kultiviert

Die Plasmidpreparation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der Plasmid DNA erfolgte mit RNase freiem Wasser mit anschließender Konzentrations- und Reinheitsprüfung am NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific, ND-2000).

3.2.11. RNA Isolation und cDNA Synthese

Für die RNA-Isolation wurde nach Versorgung der Zellen die abgenommene Zellsuspension mit ca. 1×10^6 Zellen in der Zentrifuge bei 500 x g für 5 min pelletiert, mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das gewaschene Zellpellet wurde mit einem NucleoSpin RNA Mini Kit (Machery-Nagel, 740955.50) nach Herstellerangaben lysiert und die RNA isoliert. Die Elution erfolgte mit 60 µl RNase freiem Wasser bei 11.000 x g für 1 min. Die anschließende Messung der RNA-Konzentration erfolgte per Nano-Drop.

Vor der cDNA Synthese wurde die RNA Probe zunächst auf eine Konzentration von 1 µg/µl normiert. Der 10 µl Ansatz für den DNA Verdau setzte sich aus 7 µl RNase freiem Wasser und je 1 µl von der Verdünnung, des ezDNase Reaktionspuffers und des ezDNase Enzyms zusammen. Dieser wurde zum Verdau genomischer DNA im Thermomixer für 2 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und darauf auf Eis mit 6 µl RNase freiem Wasser und 4 µl SuperScript™ IV VILO™ Master Mix erweitert. Dieser Ansatz wurde nach Schema (Tabelle 23) im Thermomixer erhitzt.

Tabelle 23 Thermozykler Programm cDNA Synthese

Schritt	Temperatur	Dauer
Primerhybridisierung	25 °C	10 min (500 rpm)
Reversetranskription	50 °C	10 min
Enzymdeaktivierung	85 °C	85 min

3.2.12. Quantitative RT-PCR (qPCR)

Zur Messung der Genexpression auf RNA Ebene wurden qPCRs durchgeführt, welche die Menge an translaterter RNA ins Verhältnis zum Housekeeping-Gen GAPDH stellte. Zur Messung wurde nicht reine RNA, sondern die zuvor umgeschriebene cDNA verwendet. Hierfür wurde für das jeweilige Gen ein Primerpaar mithilfe von NCBI Primer Blast ausgewählt. Die Primer Stocks wurden zu einer Konzentration von 100 μM mit Aqua dest. verdünnt und zu 3 μM in ein Aliquot verdünnt. Jede Messung erfolgte als Triplikat. Pro Primerpaar wurde ein Mastermix (Tabelle 24) angesetzt mit 9 μl Ansatz pro Well. In jedes Well wurde 1 μl cDNA dazu pipettiert für ein Gesamtvolumen von 10 μl pro Well. Die fertig pipettierte Platte wurde mit MicroAmpTM Optical Adhesive Film verschlossen und in einer Plattenzentrifuge für 1 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Nach Einsetzen der Platte in die qPCR-Maschine und Laden des Platten Designs wurde der PCR-Lauf gestartet. Die Auswertung erfolgte mithilfe der QuantStudioTM 3 Software und Excel mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Dabei wurden die Cycle Threshold (CT) Unterschiede auf GAPDH normalisiert und in Bezug zur Ausgangsreferenzgruppe gesetzt und die relative Veränderung der Genexpression bestimmt.

Tabelle 24 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für qPCR-Messung pro Well

Volumen	Bestandteil
5 μl	Buffer PowerUp TM SYBR [®] Green Mastermix (A25742)
1,5 μl	Primer FW (3 μM)
1,5 μl	Primer RV (3 μM)
1 μl	ddH ₂ O

3.2.13. UPR Effekte auf Viabilität und AMPylierung Status

Thapsigargin (Tg) wirkt durch Blockierung der SERCA auf die Calcium-Homöostase des ERs ein, was zu Proteinfaltungsstörungen und zu Akkumulation fehlgefalteter Proteine führt. Dies führt zur Aktivierung des ER-Stress-Pathways und zu einer Unfolded Protein Response (Baumeister et al. 2005). Gegensätzlich dazu führt Cycloheximid (CHX) zum Stopp der Elongation im Translationsprozess und damit zur Hemmung der Proteinbiosynthese (Yuan et al. 2021). In den folgenden Versuchen wurden die FicD überexprimierenden MDA-MB-231 und FicD defizienten HEK293 Zellen 6 h mit Tg und CHX inkubiert. Anschließend wurden Zellviabilität, ER Stress-Indikatoren und Veränderungen des AMPylierungs Status gemessen.

Zur Viabilitätsmessung (5.3.4) wurde nach der 24-stündigen Anwachsphase das Medium vorsichtig abgenommen und mit 0,5 μM (Merck, 67526-95-8) (in DMSO (Sigma -Aldrich

D4540)) Zellmedium ersetzt. Als Kontrolle wurde Zellmedium mit derselben Menge DMSO ohne genutzt. Nach 6 h Inkubationszeit erfolgten die Messungen analog wie in Abschnitt 5.3.4. Zur Einschätzung der Unfolded Protein Response (UPR) wurden via qPCR drei ER-Stress Indikatoren, X-box binding protein 1 (XBP1), BiP und das C/EBP Homologous Protein (CHOP) gemessen. XBP1 und CHOP sind Transkriptionsfaktoren und BiP ist als Chaperon direkt an der Proteinfaltung beteiligt und hat gleichzeitig regulatorische Eigenschaften auf die UPR-Stress Sensoren. CHOP hat Einfluss auf die Apoptose und den Zellzyklus während XBP-1 eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von Genen für Faltungsprozesse und Proteinhomöostase spielt (Osowski und Urano 2011). Für BiP und CHOP wurden Primer von Primer3 und NCBI-Blast erstellt. Bei XBP1 wirkt die gespleißte Variante als aktiver Transkriptionsfaktor, während die ungespleißte Variante als Vorläufer gilt. Zur umfassenden Aufnahme der UPR Aktivität wurden Primer für beide Varianten der Literatur entnommen (Yoon et al. 2019). Die qPCRs erfolgten mit der in Tabelle 3 aufgelisteten Primerpaaren.

Der AMPylierungs-Status wurde wie in 5.4 beschrieben mit anti-AMP 17G6 AK (Höpfner et al. 2020) mittels Western-Blot untersucht. Ebenso wurde BiP bei den FicD überexprimierenden MDA Zellen mittels WB untersucht. Die verwendeten Antikörper werden in Tabelle 8 aufgelistet.

Die Zellkultur erfolgte in 6 Well Platten mit Zellpopulationen je 2×10^5 Zellen pro Well in 2 ml Vollmedium. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und vorsichtig mit 1 μ M versetztem Vollmedium ersetzt. Für die Kontrollen wurde nur mit DMSO versetztes Vollmedium verwendet. Nach 6 h Inkubation erfolgte, wie in 5.2.11 beschrieben, die RNA-Isolation und cDNA Umschreibung für anschließende qPCR Messungen, sowie die Herstellung von Zelllysaten (Abschnitt 5.4.1) für Western Blots (Abschnitt 5.4.2).

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Zellkultur und Herstellung von Zellpellets im Screening

Die für die Zellkultur notwendigen Glaswaren, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Lösungen wurden bei 121 °C und 1,2 bar für 35 min autoklaviert sowie Geräte und Arbeitsbänke mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Zellen wurden mit entsprechenden Kulturmedien und Zusätzen in Zellkulturflaschen (T75 cm² mit Filterdeckel) bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator inkubiert. Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter Werkbänken. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die jeweiligen Kulturmedien und Zusätze der Zellreihen können der Tabelle 1 entnommen werden.

Zur Passagierung der Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 0,05% Trypsin/EDTA oberflächlich benetzt. Nach 2-5 min Inkubationszeit und leichtem Klopfen konnten die abgelösten Zellen in Kulturmedium suspendiert werden. Je nach Zelldichte wurden zwischen 4/5 bis 9/10 an Zellsuspension entnommen und das entnommene Volumen wieder mit frischem Kulturmedium aufgefüllt. Die Vorarbeiten für das Zellscreening, wie das Auftauen und Passagieren der Zelllinien wurden freundlicherweise von Christine Blechner durchgeführt.

3.3.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 15-50 µl einer vorher invertierten Zellsuspension in einem 1:1 Verhältnis mit Trypanblau (T10282, Invitrogen) gemixt und auf eine Zählkammer mit Deckglas gegeben. Die Auszählung erfolgte im Zählgerät (Countes® II FL Invitrogen).

3.3.3. Transfektion

Am Vortag wurde unter Zuhilfenahme der Neubauer Zählkammer die Zellaussaat von 10^5 /ml in 250 µl Medium je 8er Slide Kammer (Ibidi µ-Slide 8 Well, 80826) durchgeführt. Am Tag der Transfektion wurden 2,5 µl Multiplier zu den Zellen gegeben. Dieser schwächt die Fähigkeit der Zellen, fremde Nukleinsäuren zu detektieren. Nach 2 h Inkubation unter RT wurden 250 ng Plasmid DNA (bei Koransfektion jeweils 150 ng) sowie die Transfektions-Reagenz (0,6 µl) in serumfreies Medium (Optimem) verdünnt und nach 20 min zu den Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgte darauf die Kontrolle der Transfektion in der Fluoreszenzmikroskopie. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25 Angepasster Transfektionsansatz für MDA-MB-231 Zellen

Reagenz	Volumen /Menge
K2® Multiplier	2,5 µl
DNA-Menge	250 ng (150 + 150 ng)
ATCC TransfeX™	0,5 µl
Serumfreies Medium zur Verdünnung	50 µl

3.3.4. MTS Viabilitäts Assay

Zur Untersuchung von Viabilität und Proliferation der unterschiedlichen Zellpopulationen unter verschiedenen Bedingungen wurde die MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium] Reagenz (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, G3580, Promega) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Tetrazoliumsalz was von metabolisch aktiven Zellen zu einem Formazanprodukt

reduziert wird (Ah et al. 1991). Dabei kommt es zu einem Farbumschlag des Mediums von gelb zu dunkelbraun. Je mehr lebende und metabolisch aktive Zellen sich im Well befinden, desto stärker fällt der Farbumschlag aus.

Zur Messung der Proliferation und Viabilität wurden 100 µl Zellesuspension mit 1×10^4 Zellen pro Well je ein Triplikat pro Messtag in ein 96 Well Plate ausgesät. Zusätzlich wurde eine Medium-Leerkontrolle in ein leeres Well pipettiert. Gemessen wurde in 24 h Abständen über einen Zeitraum von vier Tagen. Am Messtag wurden 20 µl der MTS Reagenz pro Well hinzugegeben. Darauf wurden die Zellen zwei Stunden inkubiert und nach resuspendieren des ausgefallenen Formazanprodukts die Absorption im Fluoreszenzspektrometer bei 490 nm (Tecan Spark® Mikroplatten Reader, 30086376) gemessen.

3.3.5. Spheroidassay

Zur Untersuchung möglicher Einflüsse von FicD Knockdown und Überexpression auf das Wachstum von Tumorspheroide, wurden Zellen in ein 3D Petrischalen System (Z764043 MicroTissues® 3D Petri Dish® L 9x9, Sigma Aldrich) ausgesät. Tumorspheroide sind eine Form von 3D-Kultivierungstechnik, welche als Model für Krebsmetastasen dienen und Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und ihrer Mikroumgebung geben können (Shamir und Ewald 2014).

Vor dem Beginn der Arbeiten wurden die Silikongussformen (Micro Molds) autoklaviert. In einer Mikrowelle wurde eine vorfiltrierte 2% ige Agaroselösung aufgelöst. Darauf wurden 500 µl der Agarose je MicroTissues® Gussformen pipettiert, sodass keine Luftblasen in die Lösung gelangten. Nach Auspolymerisation der Mikro-Formen (Mold), wurden diese vorsichtig aus ihrer Gussform abgelöst und in eine 12 Well Platte überführt, darauf mit 2,5 ml Vollmedium versetzt und im Inkubator äquilibriert. Nach zweimaliger Wiederholung des Äquilibrierungsprozesses und Abnahme des Mediums aus Mikro-Mold und Well, wurden 190µl Zellsuspension mit 5×10^5 Zellen pro ml in das Mold gegeben und für 10min in den Inkubator gestellt. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten, wurden vorsichtig 2,5ml Vollmedium pro Well um die Mikro-Petrischale gegeben und diese bei 37 °C kultiviert. Die Bildung der Spheroide wurde mittels Durchlichtmikroskopie kontrolliert. Die Aufnahmen erfolgten bei HEK-293 Zellen in 24 h, bei MDA-MB 231 Zellen in 72 h Abständen. Die Aufnahmen wurden mit dem Olympus Widefield Mikroskop (Olympus IX83 P2ZF, 51833) durchgeführt. Die Auswertung, wie die Größenberechnungen und Shapefaktor Analyse, erfolgten mithilfe der Fiji Particle Analyse (ImageJ2).

3.3.6. Live Cell Imaging FicD und CEPIA ER Marker

Für die Lokalisierung von FicD in lebenden Zellen in Relation zum ER, bzw. ER-Calcium, wurden Zellen mit dem pFicD-eGFP und dem pCMV R-CEPIA1er Plasmid (freundlicherweise der AG Guse, IBMZ zur Verfügung gestellt) transfiziert. CEPIAer kurz Calcium-Measuring Entrapped Protein Indicator bindet an Calcium, sobald es ER-typische Konzentrationen erreicht (Suzuki et al. 2014). Durch Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe für beide Vektoren, lassen sich bei Kotransfektion auch Überschneidung in den Lokalisationen erkennen. Die Auswertung der Kolo-kalisation erfolgte mit dem Coloc2 Plugin in Fiji.

Die Zellen wurden am Tag zuvor, dem Abschnitt 5.3.3 entsprechend, transfiziert und über Nacht inkubiert. Am Tag darauf wurde die Inkubationskammer des Olympus Widefield Mikroskops auf 37 °C erwärmt und unter 5% CO₂ Atmosphäre (95% relativer Luftfeuchtigkeit) gesetzt. Die Aufnahmen der Zellen erfolgte in Chamber Slides bei 100 x Vergrößerung mit dem GFP-Kanal (Absorption 488 nm, Emission 510 nm) zur FicD-GFP und Tetramethylrhodamine- (TRITC, Absorption 570 nm, Emission 544 nm) für CEPIAer Anregung.

Zur Untersuchung der Zelldynamik wurden Zeitrafferaufnahmen mit 20 s Intervallen und einer Gesamtlänge von 5 min aufgenommen. Zur räumlichen Analyse wurden Schichtaufnahmen in Form von z-Stacks mit Abständen von 30 nm angefertigt.

Zur räumlichen Visualisierung wurden die z-Stacks mit der Fiji Software 5.5.2 geöffnet und in 3D Projektionen dargestellt.

3.3.7. Sequenzierung

Um den Erfolg der Klonierung zu prüfen, wurden die Plasmide sequenziert. Hierzu wurde ein Ansatz mit Sequenzierprimer entsprechend angesetzt und an Microsynth Seqlab verschickt. Die Primer sind den Materialien (5.1.2) zu entnehmen.

Tabelle 26 Zusammensetzung Sequenzieransatz

Volumen	Bestandteil
12 µl	Plasmid DNA (40-100 ng/µl)
3 µl	Primer (10 µM)

3.4. Proteinbiochemische Methoden

3.4.1. Herstellung von Zellysaten und Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Untersuchung von Proteinen in Zellen wurden Zellysate hergestellt. Hierfür wurden die Zellen durch Trypsin abgelöst und anschließend bei 500 x g für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Reagenzgefäße überführt. Diese wurden bei 500 x g für 7 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl M-Per (78501, ThermoFisher) mit Protease und Phosphatase Inhibitor (04906845001, Roche) resuspendiert und für 20 min auf Eis lysiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Suspension für 20 min bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert, um die Proteine von den Zelltrümmern abzutrennen. Der Überstand stellte das Proteinlysate dar, welches abgenommen und auf Eis gestellt wurde.

Zur Konzentrationsbestimmung und Normalisierung der Proben wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Dieser basiert auf der Proteinbindung an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Bindung führt zu einem Farbumschlag, der sich spektrophotometrisch bei 595 nm messen lässt. Die Absorption verhält sich proportional zur Proteinkonzentration (Bradford 1976). Zu Beginn wurden 50 µl 1:200 Verdünnungen des Lysats gegen eine Konzentrationsreihe bovines Serumalbumins (BSA) in Doppelbestimmungen aufgetragen. Zu allen Wells wurde 200 µl 1:5 Bradford Assay Reagenz (Bio-Rad Cat, LOT 5000006) hinzugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte im Fluoreszenzspektrometer bei 595 nm. Anhand der Konzentrationen wurden die Lysate mit 4 x SDS-Probenpuffer und ddH₂O auf 1 µg/µl normalisiert und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden direkt für den Western Blot verwendet oder bei -20 °C gelagert.

3.4.2. SDS-Polyacrylamid Elektrophorese und Western Blot

Zur Auftrennung von Proteinen nach Größe wurde die Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophorese (SDS-PAGE) verwendet. SDS ist ein denaturierendes Detergens, welches nach Anlagerung eine gleichmäßige negative Ladungsverteilung innerhalb der Proteine erzeugt. Auf dem Polyacrylamidgel werden diese dann einem Ladungsgradienten ausgesetzt und aufgetrennt. Beim Western Blot (WB) werden die geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Darauf können spezifische Proteine mit Antikörpern angefärbt werden (Rehm und Letzel 2016).

Zuerst wurden 10%ige Trenngele gegossen und 30 min inkubiert. Auf diese wurden 4%ige Sammelgele mit Kamm für die Probenaschen gegossen. Nach Auspolymerisation wurden eine

Tasche mit 3 µl Proteinstandard (NEB, Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa), P7719S) und die übrigen Taschen 15 µl je Proben tasche mit in Probenpuffer gelösten Lysaten (1 µg/µl) beladen und in Laufpuffer für 20 min eine Spannung von 80 V angelegt, bis eine fokussierte Lauffront sichtbar wurde. Danach wurde die Spannung auf 120 V erhöht und das Gel 2 h laufen gelassen.

Für das Blotting wurde das Gel auf eine Nitrozellulose Membran zwischen zwei Whatman Papieren und zwei Schwämmen gepresst und bei 4 °C in Laufpuffer für 3,5 h und 45 V geblotet. Die Membran wurde für 30 min mit ROTI®Block (Roth, A151.1) geblockt und mit Primärantikörper inkubiert. Die Membran wurde nach der Antikörper Inkubation dreimal für 15 min mit TBS-T gewaschen und mit entsprechendem sekundärem AK (1:20.000) HRP-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Nach 1 h Inkubation wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Zur Entwicklung der WB-Membran wurde diese mit ECL Prime Western-Blotting Reagenz (RPN2232, Amersham™) für 5 min inkubiert. Im Chemilumineszenz-Imager (Intas, ECL Chemostar Touch) wurde die Chemilumineszenz der Blots aufgenommen und mit ImageJ normalisiert und quantifiziert. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper und Reagenzien befindet sich in Tabelle 8 und Tabelle 9.

3.5. Strukturvorhersagen und Statistik

3.5.1. AlphaFold Strukturvorhersagen

Die Strukturvorhersagen der Knockout Mutanten wurde mithilfe AlphaFold v2.3.2 Colab erstellt (Jumper et al. 2021). Die Visualisierung und Strukturangleichung erfolgte mit PyMol 2.5 (Schrödinger).

3.5.2. Particle Analysis mit Fiji

Die Auswertung der Spheroid-Aufnahmen aus dem Abschnitt 5.3.5 erfolgte mit Fiji. Dazu wurde ein geeignetes Threshold gewählt, bei dem eine gute Diskrimination zwischen Spheroid und Hintergrund bestand und die Particle Analysis gestartet. Diese berechnete neben der Fläche auch die Shape Faktoren Zirkularität ($4\pi * \text{Fläche} / \text{Umfang}^2$) und Solidität (Fläche / Konvexfläche).

3.5.3. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism und Microsoft Excel verwendet. Für voneinander unabhängige normalverteilte Gruppendaten wurde der ungepaarte t-test verwendet. Als signifikant galten Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05. Mit folgender Nomenklatur wurden Signifikanzen beschrieben: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, n.s. nicht signifikant.

4. Ergebnisse

4.1. FicD Screening in Tumorzelllinien

Um einen Überblick über die mRNA Level von FicD in unterschiedlichen Tumorzelllinien zu erlangen und geeignete Zelllinien für Knockdown Versuche auszuwählen, wurde ein Screening von 14 Zelllinien durchgeführt. Eine Übersicht der verwendeten Zelllinien findet sich in Tabelle

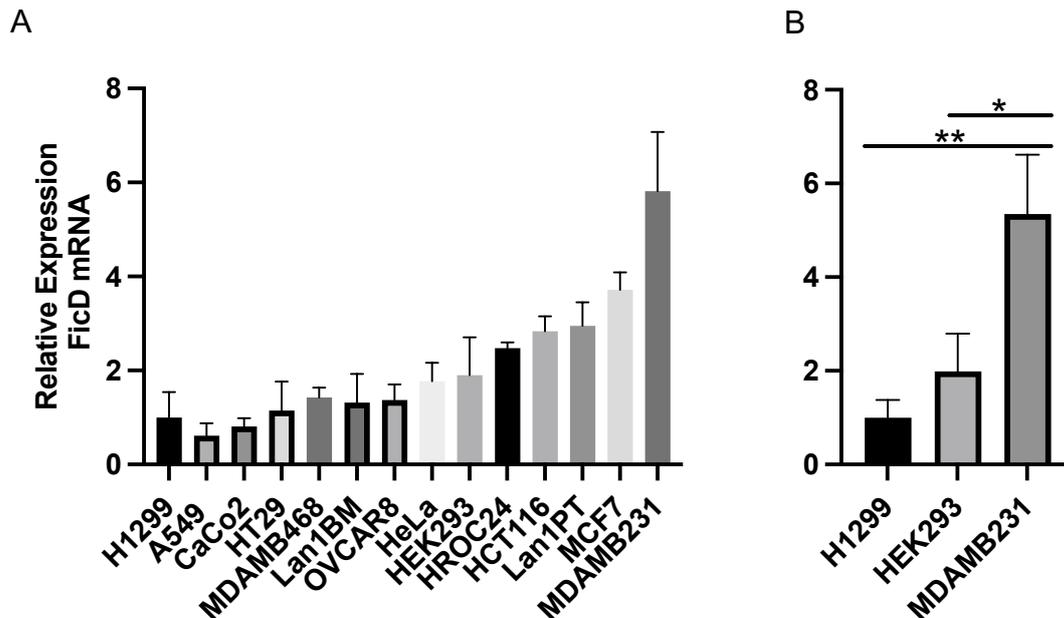


Abb. 6 PCR-Screening von Tumorzelllinien auf FicD. Zur Untersuchung der FicD Expression wurden qPCRs von isolierter RNA aus Zellpellets durchgeführt. GAPDH wurde als endogene Kontrolle und H1299 Zellen als Referenzprobe verwendet (Die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte für H1299 Zellen wurden = 1 gesetzt). Gemessen wurde in Triplikaten. Die Auswertung erfolgte mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (A) Zusammenstellung aller Tumorzellreihen aus je drei qPCR Durchläufen pro Zellreihe. Mittelwerte \pm Standardabweichung (B) Vergleich FicD mRNA Expression MDA-MB-231, HEK-293 und H1299, (H1299 vs. HEK-293 n.s.); die Signifikanzen wurden durch den ungepaarten t-test berechnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, n.s. nicht signifikant.

1. Mittels qPCR wurde die Expression FicDs untersucht. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Die Triple negative Brustkrebs Zellreihe MDA-MB-231 zeigte mit relativer 6-facher ($p < 0,01$) FicD Expression die höchste (Abb. 6), die non-small cell Lungenkrebs (NSCLC) Zellreihe A549 mit 0,5-facher ($p < 0,05$) relativer Expression, die niedrigste FicD-Expressionsrate, welche nach H1299 Zellen normiert wurde. Die in FicD-Zelluntersuchungen häufig verwendete, aus embryonalen Nierenzellgewebe stammenden, HEK-293 Zellen erreichten fast 50% ($p < 0,05$) der Expressionsrate der MDA-MB-231. Da die MDA-MB-231 Zellen die höchste FicD-Expression zeigten, wurden diese für nachfolgende Experimente mit Knockdown und Überexpression FicDs ausgewählt.

4.2. shRNA-Knockdown von FicD in MDA-MB-231 zeigt keinen Einfluss auf die Zellviabilität

Zur Untersuchung der Relevanz von FicD für die Viabilität und Zellfunktion der MDA-MB-231 wurde ein shRNA vermittelter Knockdown etabliert. Dazu wurden die in Abschnitt 5.2.8 lentiviral transfizierten Zellen mit qPCR Messungen auf die FicD Expression untersucht. Dabei zeigten initial drei von fünf shRNA Knockout-Reihen eine Reduktion von 50% (sh3 $p < 0,0001$; sh5 $p < 0,001$) der Expression FicDs von Vergleich zu den Scramble-Kontrollen (scram) (Abb. 7 A). Von den fünf shRNAs wurden sh3 und sh5 mit stabilster

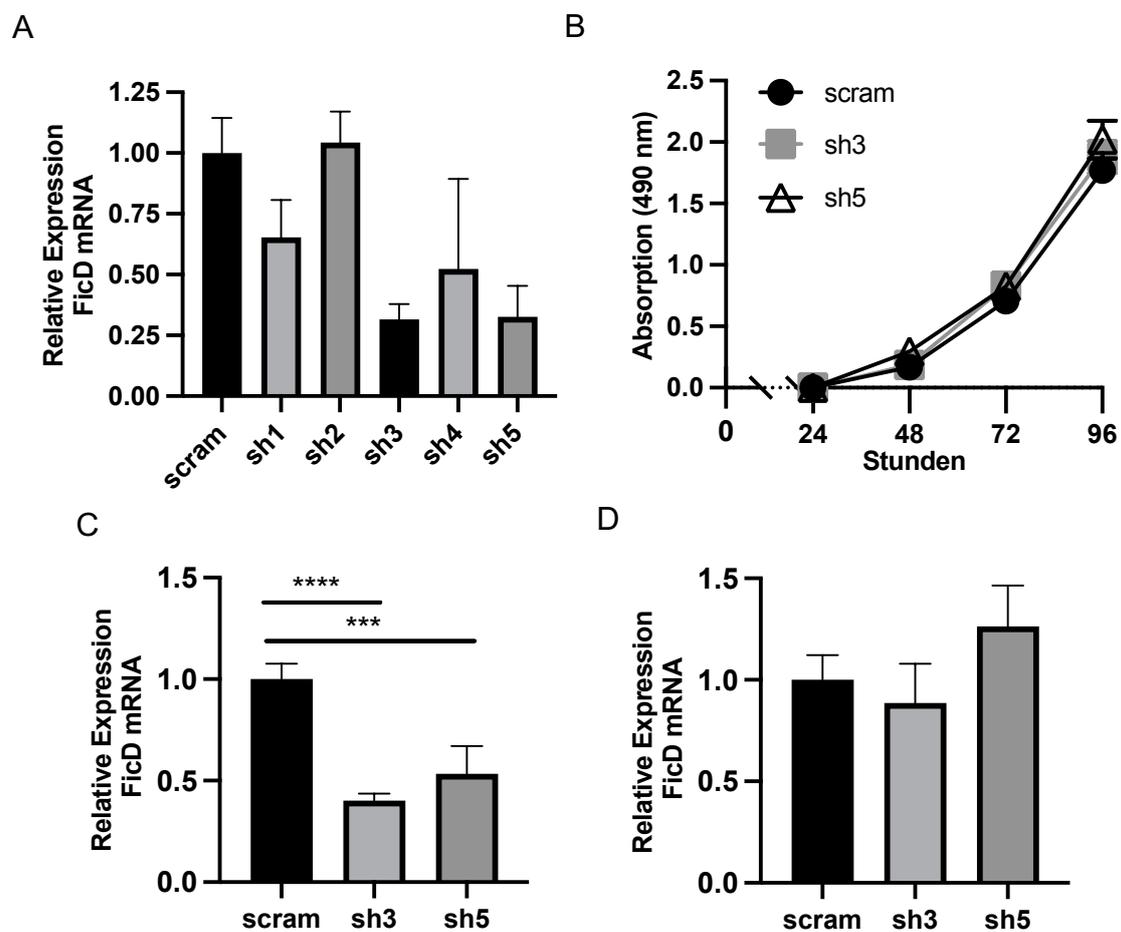


Abb. 7 FicD Knockdown hat keinen Einfluss auf die Proliferation in MDA-MB-231. (A) Initiale qPCR Messungen aller shRNA Zellen zur KD-Kontrolle. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung. (B) Viabilitätsmessung der sh3, sh5 und scramble Zellen über vier Tage durch Zugabe von MTS-Reagenz und Absorptionsmessung bei 490 nm. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung. (C) qPCR von FicD mRNA in scramble, sh3 und sh5 am 24 h Messpunkt des MTS Assays (D) 7 Tage nach MTS-Start waren Expressionsunterschiede nicht mehr n.s. Die Signifikanzen wurden durch den ungepaarten t-test berechnet. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. nicht signifikant.

Knockdown Wirkung ausgewählt und in MTS-Viabilitäts-Assays untersucht. In diesen konnten

keine signifikanten Unterschiede bzgl. Viabilität oder Proliferation festgestellt werden (Abb. 7, B). Jedoch zeigte sich eine Auffälligkeit bei der Selektionserhaltung des Knockouts, da die Expression FicDs mit der Zeit wieder zunahm. Resultierend ließ sich der Knockdown nicht stabil halten. Bereits nach Ablauf einer Woche konnte kein signifikanter Unterschied in der FicD Expression gemessen werden (Abb. 7 C [Tag 1], D [Tag 7]).

4.3. FicD-GFP Überexpression in MDA-MB-231 Mammakarzinom Zellen

Da sich gezeigt hatte, dass der Knockdown und der KO von FicD dazu führt, dass diese Zellen während der Kultur der MDA-MB-231 Zellen negativ selektiert werden, konnte angenommen werden, dass FicD einen Wachstumsvorteil bietet. Um die Auswirkungen einer Überexpression von FicD auf die MDA-MB-231 Zellen zu untersuchen, wurde eine LeGO-Vektor vermittelte Überexpression eines FicD-GFP Fusionsproteins etabliert (Abschnitt 5.2.7). Zur Validierung dieser Überexpression wurden WB mit einem anti-GFP AK angefertigt (Abb. 8). Dieser zeigte bei den Zellen mit der OE eine Bande, dem FicD-GFP Fusionsprotein entsprechend, auf Höhe 79 kDa (GFP (27 kDa) + FicD (52 kDa)). Die Kontrolle exprimierte nur GFP. In der qPCR

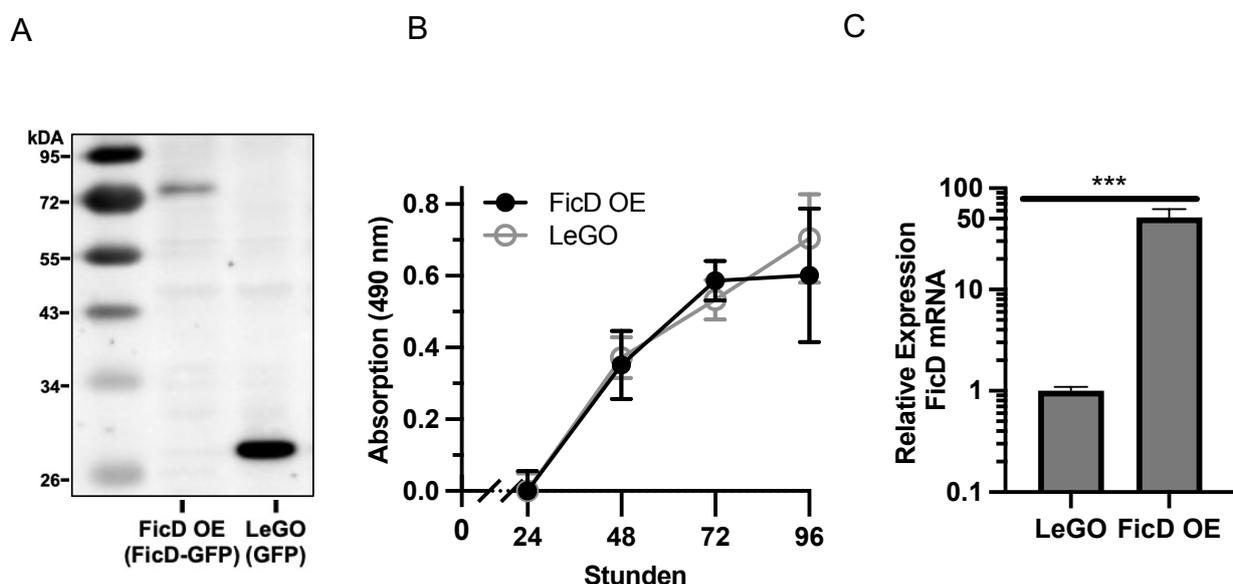


Abb. 8 FicD OE und Proliferation in MDA-MB-231. (A) WB mit Anti-GFP AK und aufgetragenen GFP-FicD OE- und GFP-LeGO Kontroll-Lysaten. (B) MTS-Assay mit Absorptionsmessung bei 490 nm in erfolgten in drei voneinander unabhängigen Versuchen. Jede Messung erfolgte in Triplikaten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Normalisierung erfolgte auf die erste Messung nach 24 h. (C) qPCR zur Messung der FicD mRNA Expression. Die qPCR wurde dreifach durchgeführt und die Messungen erfolgten in Triplikaten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Signifikanzen wurden durch ungepaarte t-tests berechnet. *** $p < 0,001$, n.s. nicht signifikant.

konnten bei der OE eine 50x ($p < 0,001$) erhöhte FicD mRNA Expression relativ zur LeGO-Kontrolle gemessen werden. Zur initialen Charakterisierung wurden MTS-Assays

durchgeführt. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zellproliferation gezeigt werden.

4.4. FicD Knockout in HEK-293 Zellen etablierbar

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Restexpression von FicD ausreichte, um dessen Funktion voll zu erfüllen, sollte wie in Abschnitt 5.2.3 erläutert mittels CRISPR/Cas9 ein Knockout (KO) durchgeführt werden. In den MDA-MB-231 ließ sich mit der gewählten Methode jedoch kein validierter KO etablieren bzw. replizieren. Ein Klon, der sich expandieren ließ, zeigte im WB mit anti-AMP AK eine Reduktion von 50% des AMPylierungs-Signals. Da sich in den folgenden Versuchen kein weiterer KO-Klon als lebensfähig erwies, ließ sich der Versuch jedoch nicht . Aufgrund der fehlenden Replizierbarkeit werden die Versuchsdaten für den einzelnen Klon im Anhang aufgeführt (Abb. 21)

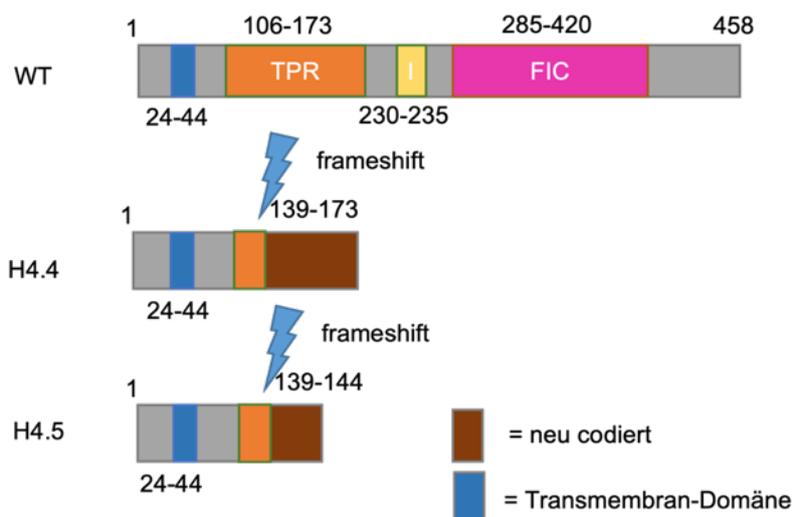


Abb. 9 Schematische Darstellung des FicD Gens in WT und FicD Mutanten. Dargestellt sind relevante Abschnitte, wie transmembran (blau), Tetratricopeptide Repeat Motiv (TPR, orange), Inhibitions- (I, gelb) und Fic-Motiv (pink). Die neu codierten Abschnitte nach den Frameshift-Mutationen sind braun hervorgehoben. In beiden FicD KO Mutanten zeigt sich der frameshift innerhalb des TPR-Motivs mit vorzeitigem Translationsstopp vor der Fic-Domäne.

Im Gegensatz zu den MDA-MB-231 konnten in den HEK-293 Zellen drei KO- und Kontrollklone expandiert werden. Zwei der KO-Klone (H4.5 & H4.6) stellten sich sequenztypisch identisch dar, sodass nur zwei Strukturanalysen mit Alpha-Fold durchgeführt wurden (Abb. 10). Bei allen KO-Klonen kam es an Aminosäure 139 zu einem Frameshift. Dieser führte zu neu codierten Bereichen und einem vorzeitige Translationsstopp vor dem Fic-Motiv. Die Strukturvorhersagen in Abb. 10 zeigen das Vorhandensein der

Transmembrandomäne, Ansätze einer TPR-Region und das vollständige Fehlen einer Fic-Domäne.

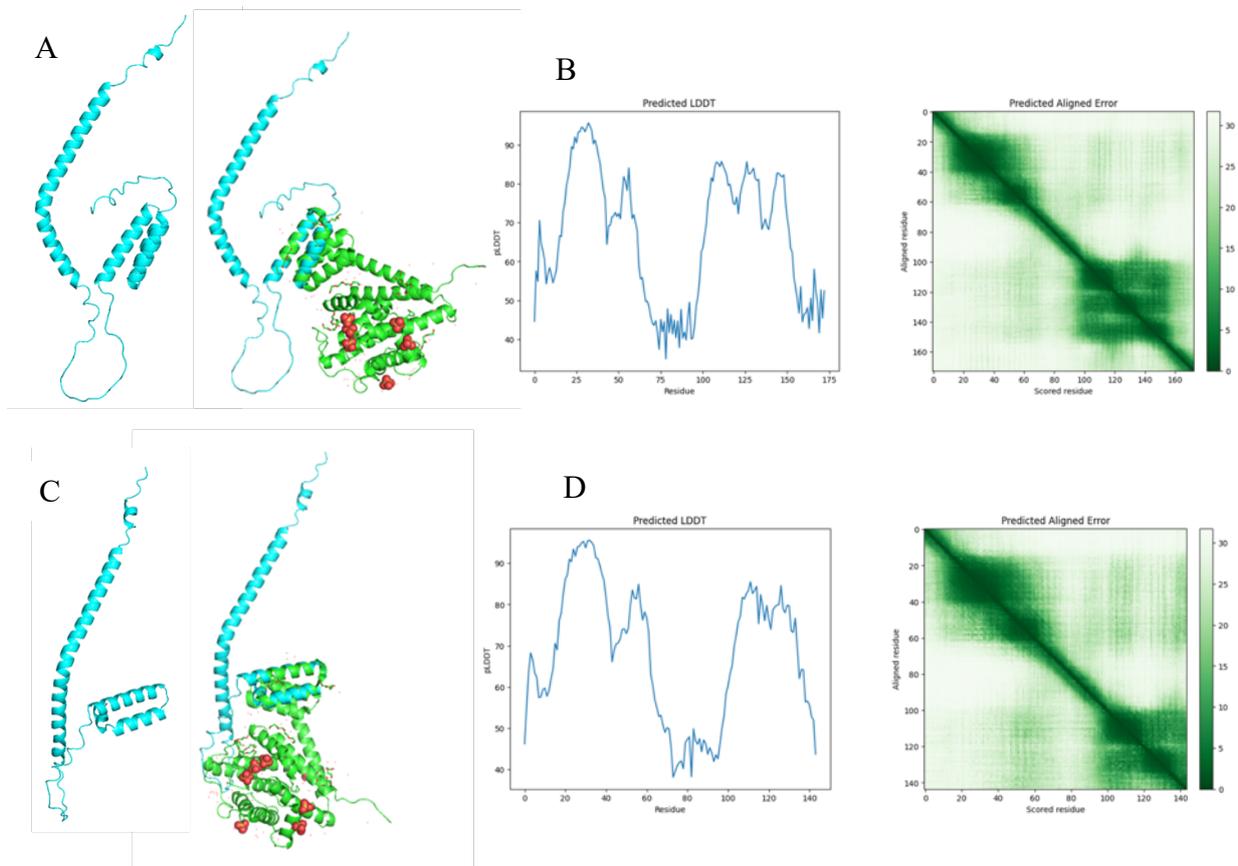


Abb. 10 Strukturvorhersagen der FicD-KO Mutanten zeigen Fehlen der Fic-Domäne. Die mit AlphaFold berechneten Strukturvorhersagen der FicD KO Mutanten (links, türkis) mit angelagerter FicD-Kristallstruktur (rechts, grün, PDB: 6i7j). **(A)** H4.4 und **(C)** H4.5 FicD KO Mutanten lassen die α -helices der transmembran-Region erkennen. In der TPR-Region kommt es zum Translationsstopp. Die angelagerte Kristallstruktur FicDs visualisiert den fehlenden Enzymteil. **(B)** und **(D)** Qualitäts- und Wahrscheinlichkeitsparameter der AlphaFold Strukturvorhersagen. Links die per-residue confidence metric (pLDDT), welcher die Konfidenz der Strukturberechnung der einzelnen AS angibt und der Predicted Alligned Error, welcher Konfidenzen der größeren Topografie und Domänen betrachtet. Regionen mit pLDDT > 70 gelten als verlässliche Vorhersage, während Regionen mit Scores zwischen 50-70 mit Vorsicht zu analysieren sind. Regionen mit pLDDTs < 50 sollten nicht interpretiert werden.

4.5. Viabilität und Expressionsunterschiede der HEK-293 FicD KO Klone

Zur Untersuchung der Proliferation, Expression und Variabilität innerhalb der KO- und Kontrollgruppen wurden MTS-Assay, qPCR und Western Blots durchgeführt. Mittels qPCR wurden die mRNA Expressionsunterschiede von FicD und BiP untersucht (Abb. 11 C und D).

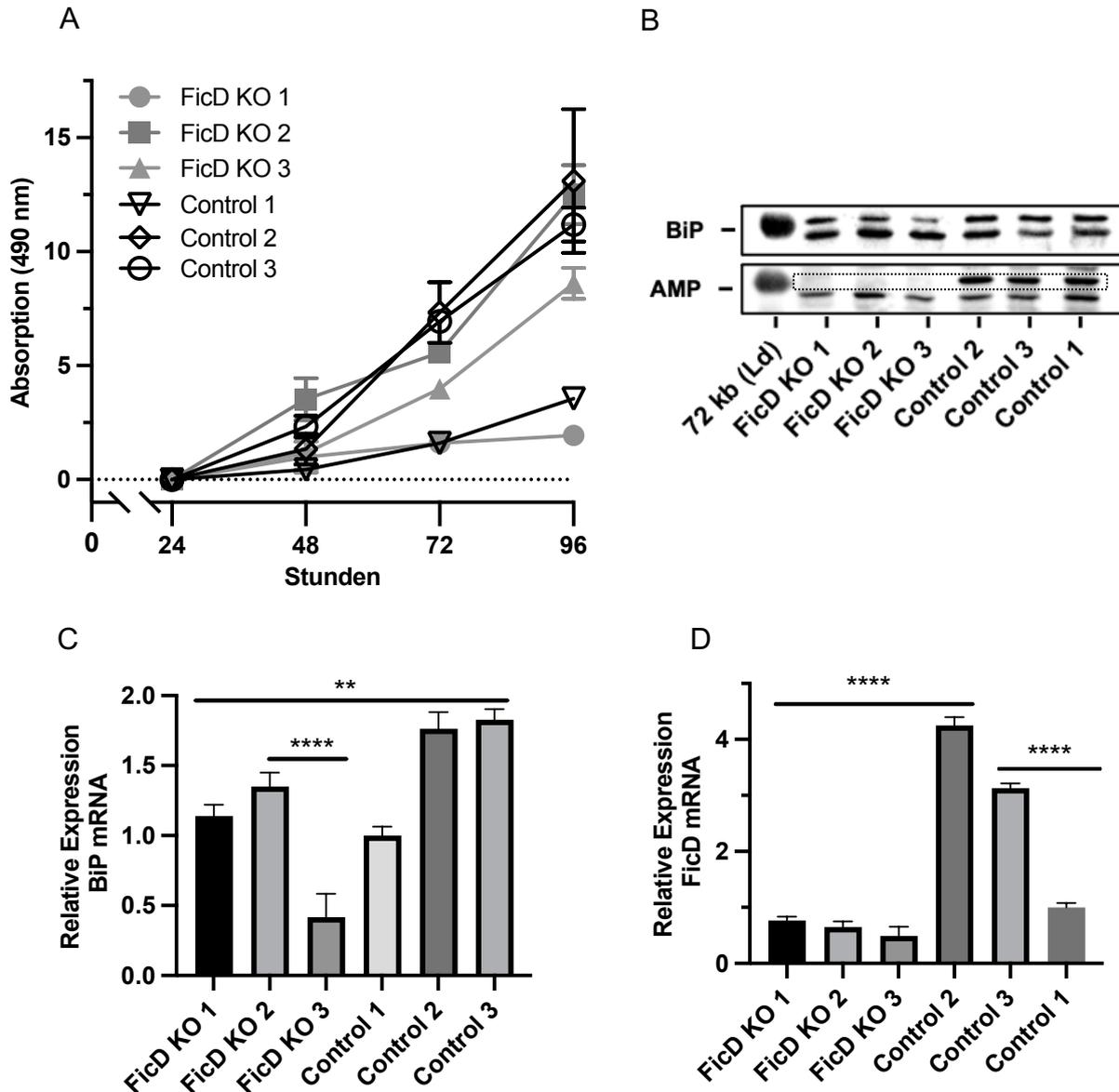


Abb. 11 HEK-293 FicD KO Klon Heterogenität in Proliferation und BiP Expression. (A) In MTS-Assays wurden drei FicD-KO Mutanten und drei Kontrollen miteinander verglichen. Kurven wurden auf die erste Messung nach 24 h normalisiert. Die Aussaat erfolgte in Triplikaten. Die Messpunkte stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar. Unterschiede waren n.s. (B) WB-Analyse mit 72 kb Markerhöhe der Protein Ladder (Ld) und aller KO- und Kontrollen mit BiP-AK und Anti-AMP -AK. AMPylierung BiPs im gestrichelten Kasten. (C) BiP mRNA und (D) FicD mRNA qPCRs wurden in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt mit Messung in Triplikaten. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar. N.a. Unterschiede waren n.s. Die Signifikanzen wurden durch ungepaarte t-tests berechnet. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. nicht signifikant.

Die WBs unterschieden sich in AMPylierung und BiP-Proteinexpression. Inkubierte WB mit einem gegen AMPylierung gerichteten AK zeigten einen klaren Signalunterschied zwischen Kontroll- und KO Zellen auf der Höhe von BiP (Abb. 11 B, gestrichelter Kasten, 72 - 78 kDa).

Bei allen FicD-KO konnte kein AMP-Signal auf BiP Höhe von 72 kDa gemessen werden. In den Kontrollzellen (Control) konnte AMPylierung auf entsprechender Höhe gemessen werden. Dies ist kongruent mit Ergebnissen aus der Literatur, in welchen FicD defiziente Zellen keine BiP AMPylierung zeigten (Preissler et al. 2017b).

Die Expression FicDs zeigte Variabilität innerhalb der KO- und Kontrollgruppen (Abb. 11 C und D). Insgesamt war die FicD mRNA-Expression bei den KO-Klonen deutlich vermindert. Innerhalb der Kontrollen gab es signifikante Unterschiede bei der mRNA-Expression von FicD und BiP. Beide zeigten sich vermindert in Control 1. Die BiP Expression des FicD KO Klon 3 war halb so hoch, wie die der anderen Knockout Klone ($p < 0,0001$). Gemittelt war die BiP mRNA Expression der FicD-KO Zellen ca. 50% niedriger, als die der Control 2 und 3 Zellen ($p < 0,01$).

Auch in den MTS-Assays waren die Populationen in sich heterogen (Abb. 11 A). Dabei zeigten sowohl Control 1 als auch der FicD KO Klon 1 ein langsames Wachstum und auch eine niedrigere Viabilität am Tag 4. Die KO-Klone 2+3 und Control 2+3 zeigten hohe Proliferationsraten, während Control 1 und KO-Klon 1 nur ca. 20% jener Viabilität nach 96 h aufwiesen. Da die niedrig proliferierenden Zellreihen gleichmäßig auf FicD-KO und Kontrollen verteilt waren, wurden die Zellen in eine KO- und eine Kontrollgruppe zusammengefasst.

4.6. Der FicD KO in HEK-293 zeigt keinen Einfluss auf die Proliferation in Spheroiden

Zur Untersuchung der Einflüsse von FicD auf das Wachstum von Zellen in 3D wurden Spheroiden kultiviert (Abschnitt 5.3.5). Für den Spheroidassay wurde mit FicD-KO und Kontrollzellen gearbeitet. Die initialen Aufnahmen erfolgten nach 48 h und anschließend alle 24 h über fünf Tage. Nach 48 h formten sich kleine Spheroiden, deren Wachstum in den folgenden Messungen überwacht wurde (Abb. 12). Die Größenauswertung erfolgte mit der Particle Analysis Funktion der Software Fiji. Zu Anfang zeigten die Aufnahmen Zellen nach

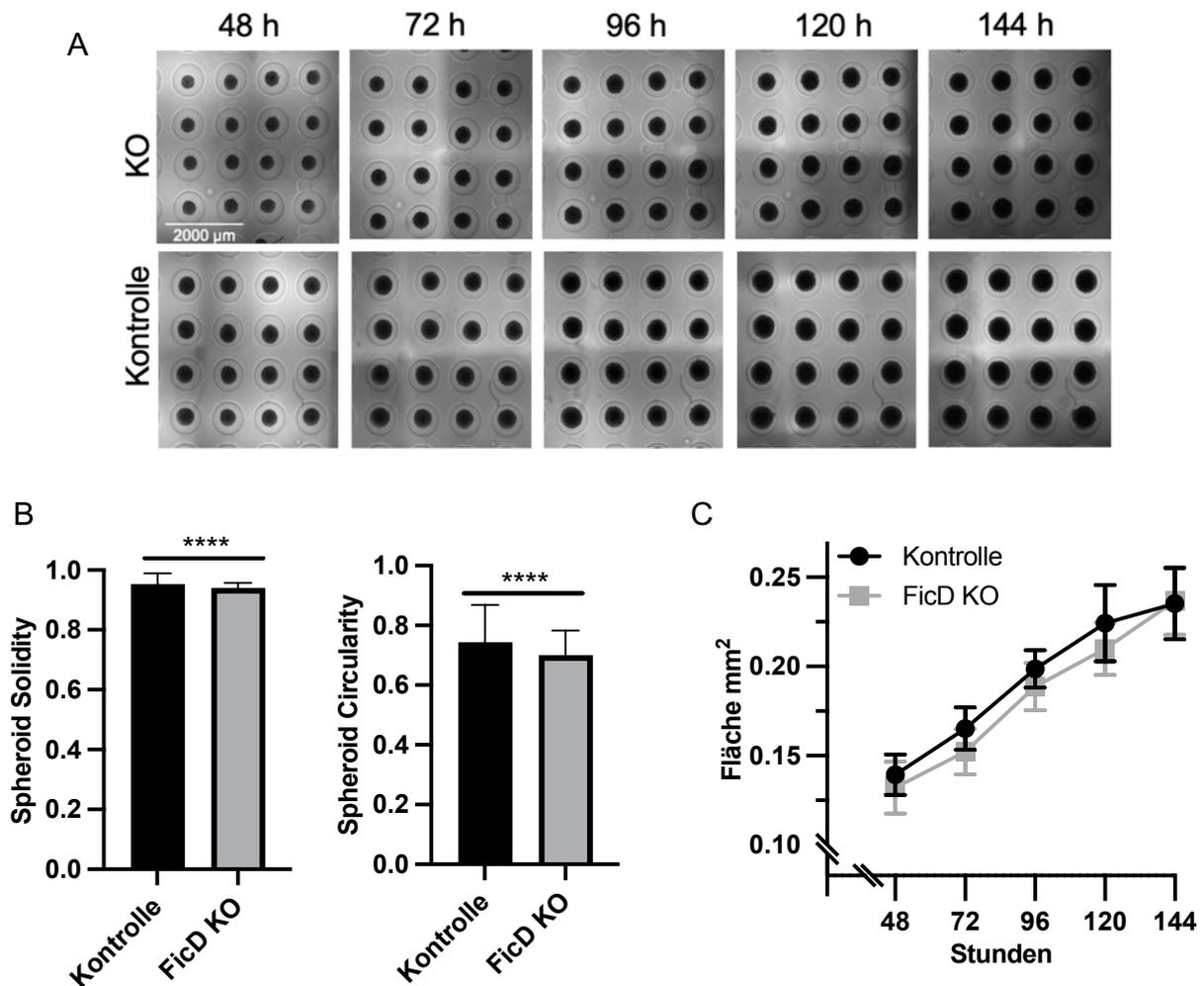


Abb. 12 Ein FicD-KO hat keine Auswirkungen auf das Spheroidwachstum. Für die Spheroidformation wurden Zellen in Micro-Wells ausgesät und anschließend über sechs Tage beobachtet. Pro Zellreihe wurden drei Micro Wells gegossen und mit Zellen ausgesät. Im Schnitt wurden 50 Spheroiden pro Micro-Well ausgewertet. (A) Representative Spheroidaufnahmen eines Mikro-Wells im Durchlichtmikroskop. (C) Mittelwerte der gemessenen Area in $\mu\text{m}^2 \pm$ Standardabweichung. Jeder Messpunkt mittelt im Schnitt 150 Spheroiden. (B) Shape-Analyse der Solidität und Circularity, Ausgewertet wurden ~ 200 Spheroiden pro Zellreihe. Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die Signifikanzen wurden durch ungepaarte t-tests berechnet. **** $p < 0,0001$, n.s. nicht signifikant.

initialer Aggregation, darauffolgend das Wachstum der Spheroide. Am sechsten Tag konnte kein signifikanter Unterschied der Spheroidgrößen gemessen werden. Allerdings zeigte sich bei den Kontrollen in der Shapeanalyse ein leicht runderer Phänotyp mit etwas höherer Solidität. Die Berechnungsgrundlage hierfür lässt sich Abschnitt 5.5.2 entnehmen.

4.7. Lokalisation von FicD im ER und NR

Um die Lokalisation von FicD in Zellorganellen zu untersuchen, wurden die FicD-GFP OE MDA-MB-231 Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Sengupta et al. 2019 zeigten in der Elektronenmikroskopie und Sanyal et al. 2015 durch AK-Färbung das FicD in das ER und den nuclear envelope (NE) lokalisiert. Diese Ergebnisse konnten wir in lebenden Zellen reproduzieren. Dazu wurden die stabil FicD-GFP überexprimierenden MDA-MB-231 Zellen mit dem ER-lokalisierenden Vektor CEPIA1er (Suzuki et al. 2014) Ko-transfiziert und mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abschnitt 5.3.6). Die GFP-OE Kontroll-Zellen zeigten eine unspezifisch diffuse Fluoreszenz, welche auch den Zellkern betraf (Abb. 13). Bei FicD-GFP-OE war kein diffuses Signal im Zellkern zu erkennen. Das Zytosol erschien retikulär fluoreszent mit zunehmender Intensität zum Kernrand und fluoreszente Saum um den Zellkern, übereinstimmend mit der erwarteten Lokalisation im ER (CEPIA1er, rot). Die Übereinanderlagerung in Abb. 13 (A) links zeigt überlappende Bereiche von FicD-GFP und CEPIA1er. Die Ko-Lokalisation kann durch übereinander gelegte Fluoreszenz-Kanäle an der gelben Färbung identifiziert werden. In der GFP-Kontrolle zeigte sich in der Überlagerung der Kanäle ein roter retikulärer durchscheinender Bereich um den Zellkern, jedoch keine Überlagerung in Gelb. Quantifiziert wurde die Ko-Lokalisierung durch eine Pixelintensitätsanalyse mit Berechnung des Pearsons Korrelationsquotienten. Die FicD-GFP-OE Zellen zeigten in dieser einen signifikant höheren Koeffizienten (Pearson: $>0,5$) als die LeGO-Zellen (Pearson: $<0,5$), sodass von einer Ko-Lokalisation in das ER ausgegangen wurde. In den FicD OE Zellen zeigten sich deutliche Fluoreszenzsignale aus dem Zellkern. Bei Aufnahme mehrerer Ebenen und Darstellung in einer Z-Projektion Abb. 14 (C-F) präsentierten sich röhrenförmige Invaginationen, teilweise mit Kontinuität durch den gesamten Zellkern. Im Kontext der primären Lokalisation FicDs (ER und nuclear envelope) wurden diese als Lokalisation in das nukleoplasmatische Retikulum (NR) gewertet. Dieses bildet ein Netzwerk aus Invaginationen der Kernmembran, mit teils durchgängigen Verbindungen zwischen Kern- und Zytosol. Dabei ähnelt das NR der Morphologie des ERs und es wird angenommen, dass es eine Erweiterung des ERs darstellt (Malhas et al. 2011).

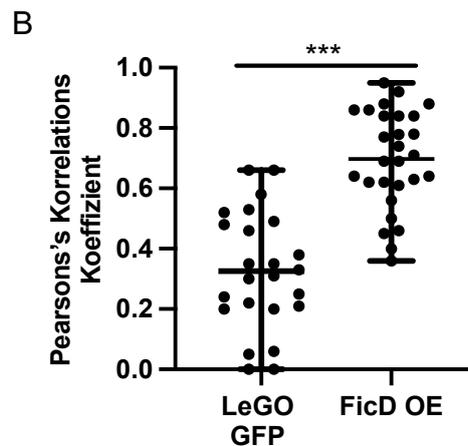
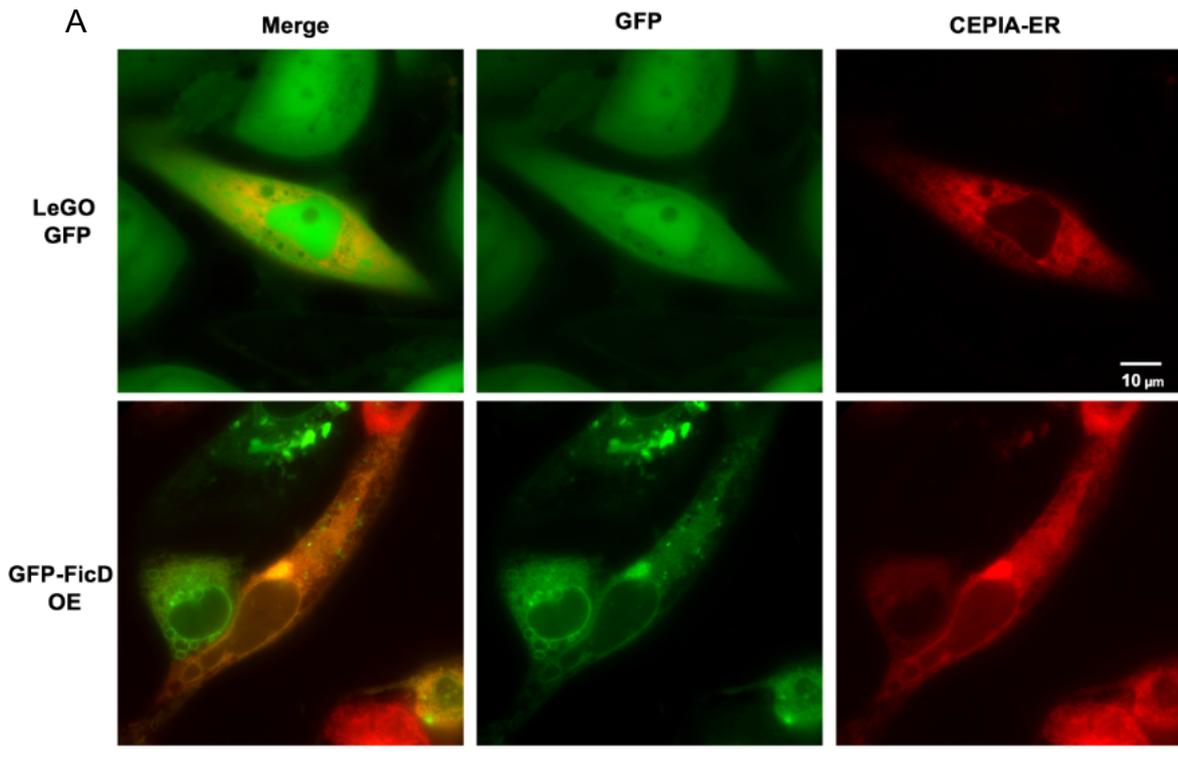


Abb. 13 MDA-MB-231 FicD-GFP Fluoreszenzaufnahmen mit ER-Marker CEPIA. (A) Representative Aufnahmen kotransfizierter OE und Kontrollzellen. Von links nach rechts: Merge, GFP (grün) und CEPIA-ER (rot). Quantifiziert wurde die Ko-Lokalisierung in (B) mittels des Pearson Korrelationskoeffizienten. Die Messbereiche wurden über Stellen gelegt, die in beiden Kanälen mittlere bis mittelhohe Intensitäten zeigten. Es wurden Zellen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ausgewertet. Insgesamt wurden bei den Kontrollen 25 und bei den OE-Zellen 27 Messungen ausgewertet. Je höher der Koeffizient, desto eher kolokalisieren die Signale. Gezeigt werden die Messpunkte mit Mittelwerten und Range. Die FicD OE Zellen kolokalisieren mit einem Pearson-Mittelwert von 0,75, die LeGO-Zellen mit einem Mittelwert von 0,3. Der Unterschied war signifikant ($p < 0,001$). Die Signifikanzen wurden durch ungepaarte t-tests berechnet. *** $p < 0,001$.

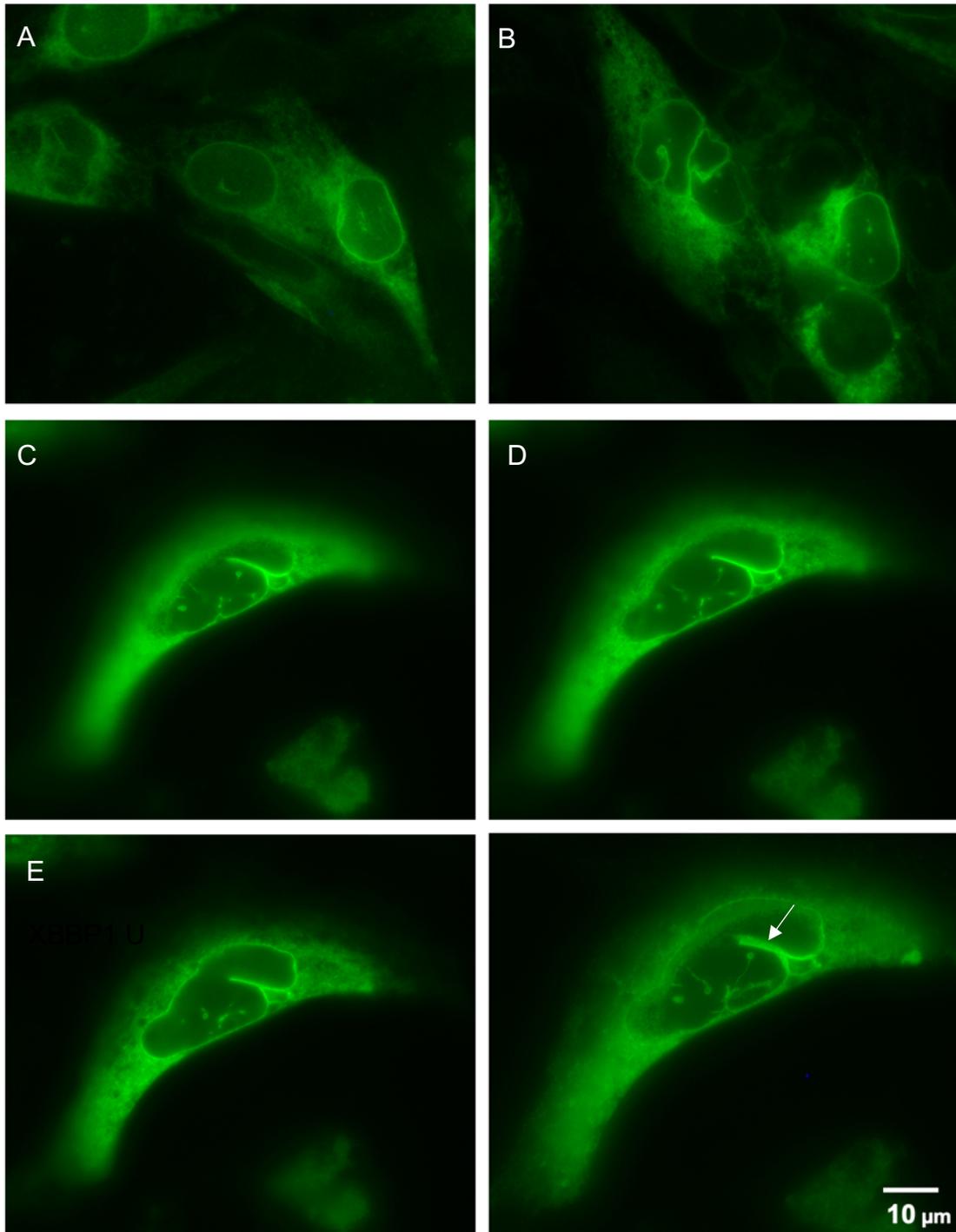


Abb. 14 Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen der MDA-MB-231 FicD-GFP OE in mehreren Ebenen demaskiert FicD im nukleoplasmatische Retikulum. **(A)** und **(B)** sind repräsentative Aufnahmen der MDA-MB-231 OE mit Kernsignalen. **(C, D und E)** zeigen Schnittaufnahmen der Z-Projektion **(F)**, die eine 3D Visualisierung aus mehreren in der z-Ebene versetzten Aufnahmen ermöglicht. Die Projektion wurde aus einem z-Stack mit 35 Ebenen erstellt. Mittig im Zellkern das nukleoplasmatische Retikulum und eine Invagination des nuclear envelopes (Typ I, Pfeil).

4.8. Die Rolle von FicD in der Unfolded Protein Response

Um mögliche Einflüsse von FicD auf die UPR zu untersuchen, wurden HEK-293-FicD KO und MDA-MB-231 FicD-OE Zellen mit Tg und CHX gestresst. Tg stört die Calcium-Homöostase des ERs und führt zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine, welche ER-Stress auslösen (Baumeister et al. 2005). CHX stoppt die Proteinbiosynthese (Yuan et al. 2021). Die behandelten Zellen wurden auf Veränderungen in UPR-Response Elementen, in der Proliferation und im AMPylierungs Status untersucht.

4.8.1. Proliferation und FicD nach Inkubation mit Thapsigargin

Die FicD-KO (HEK-293) und -OE Zellen (MDA-MB-231) wurden anhaltendem Stress mit Tg ausgesetzt und durch den MTS-Assays untersucht (Abschnitt 5.3.4). Dabei wurde an vier abfolgenden Tagen die Proliferation gemessen. Alle mit Tg behandelten Zellen zeigten nach 48 h keinen Anstieg der Viabilität mehr (Abb. 15). Am vierten Tag zeigte der FicD-KO eine um 30% ($p < 0,0001$) reduzierte Viabilität im Vergleich zum WT. In den DMSO-Leerkontrollen zeigte sich eine um 25% reduzierte Viabilität im FicD-KO, jedoch war diese nicht signifikant. Auch in den Tg behandelten FicD OE MDA-MB-231 zeigte sich nach 96 h ein Unterschied zu den Kontrollzellen. Am vierten Tag waren ca. 20% ($p < 0,0001$) mehr FicD-OE Zellen viabel als Kontrollzellen. In den DMSO-Leerkontrollen zeigten die FicD OE im Mittel eine 25% höhere Viabilität, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

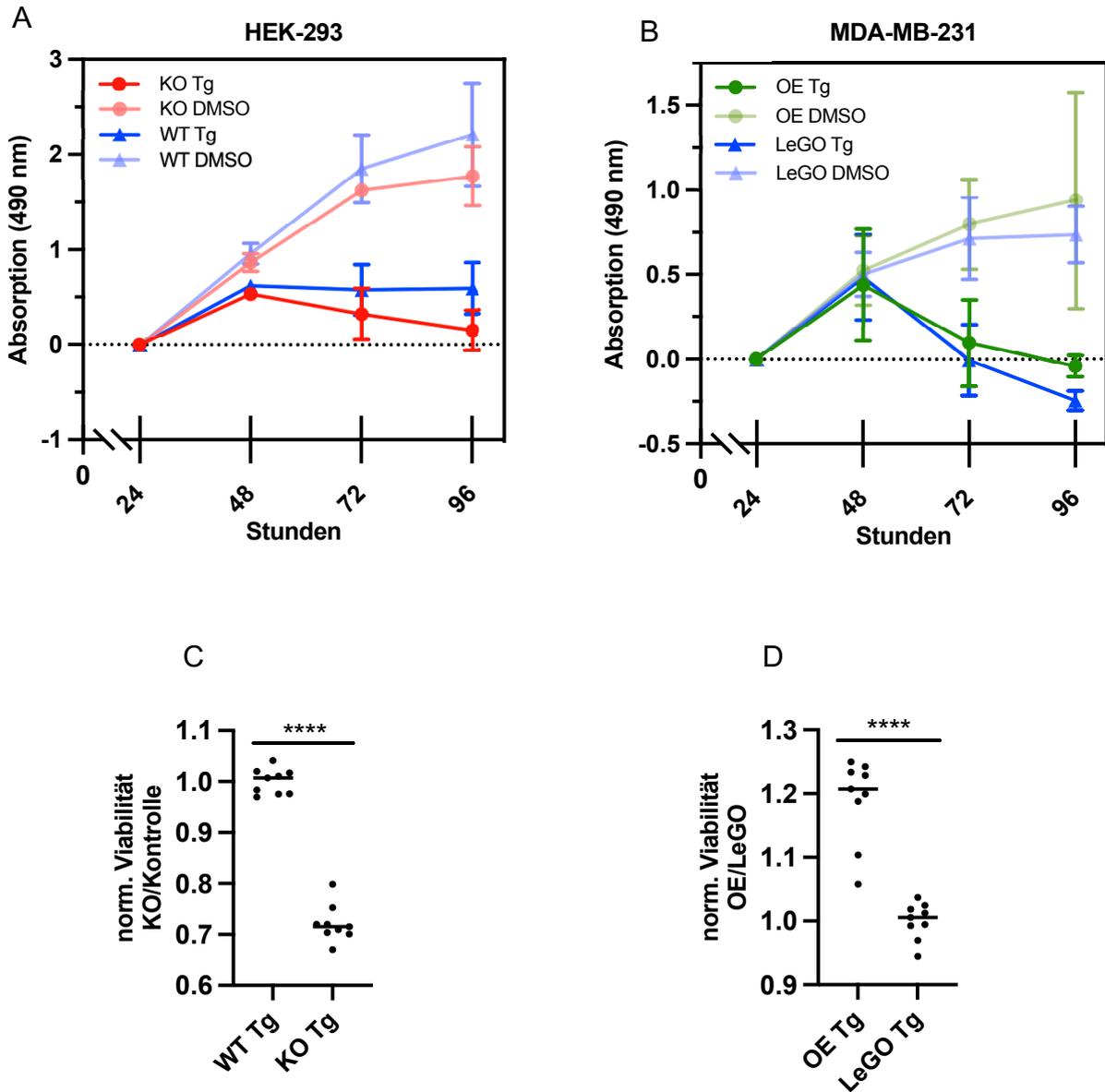


Abb. 15 Proliferation unter Tg Stress Absorptionmessungen im MTS-Assay über vier Tage mit 0,5 μ M Tg bzw. DMSO als Leerkontrolle von (A) HEK-293 FicD-KO und (B) MDA-MB-231 FicD-OE Zellen. Das Experiment erfolgte in drei voneinander unabhängigen Versuchen. Jede Messung erfolgte in Triplikaten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Normalisierung erfolgte auf den Anwachstag nach 24 h. (C) und (D) Absorptionen am Tag 4, normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollen. Die Signifikanzen wurden durch ungepaarte t-tests berechnet. **** $p < 0,0001$.

4.8.2. FicD hat Einfluss auf UPR Response Elemente

Um die Veränderungen von ER-Stress Indikatoren in HEK-293 FicD-KO und MDA-MB-231 FicD OE Zellen zu untersuchen, wurden qPCR Messungen durchgeführt. Dabei wurden die drei Indikatoren BiP, CHOP und XBP1 (Unspliced, Spliced und Total) untersucht, die einzelne Komponenten der UPR Signalkaskade darstellen und Rückschlüsse auf die Aktivierung der einzelnen Signalwege geben. BiP hat nicht nur Chaperon-Aktivität, sondern fungiert auch als Sensor für ungefaltete Proteine im ER. CHOP und XBP1 sind Transkriptionsfaktoren für die Regulation von Apoptose und Proteinfaltungsprozessen. Das ungespleißte XBP1 U wird im Laufe der UPR gespleißt (XBP1 S) und damit aktiviert (Osowski und Urano 2011).

Zur Untersuchung der Rolle FicDs während der UPR wurden HEK-293 WT Zellen, wie in Abschnitt 5.3.4 beschrieben, für 6 h mit 0,5 μ M Tg inkubiert, die RNA der Zellpellets isoliert und die FicD Expression per qPCRs untersucht. Dabei zeigte sich unter Tg Behandlung FicD signifikant höher (+670%; $p < 0,0001$) exprimiert im Vergleich zur DMSO Kontrolle (Abb. 16).

Die ER-Stress Indikatoren zeigten sich in den FicD OE Zellen im ungestresstem Zustand im Mittel um 20% reduziert. Besonders die BiP Expression war bei Überexpression FicDs um ca. 35% ($p < 0,001$) erniedrigt (Abb. 17 B). In den FicD KO Zellen gab es ohne Tg Behandlung keine signifikanten Unterschiede. Bei der Behandlung mit Tg reagierten alle UPR Response Elemente. Im FicD KO zeigte sich XBP1 S um 120% ($p < 0,001$) erhöht, die ungespleißte Variante XBP1 U dahingegen um 50% ($p < 0,001$) erniedrigt (Abb. 17 A, C). In der FicD OE

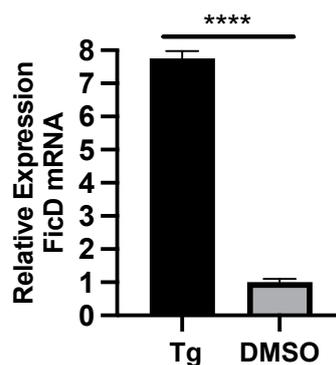


Abb. 16 Expression unter Tg-Behandlung von HEK-293 WT-Zellen. Bestimmung der mRNA-Expression mittels qPCR von isolierter RNA aus Zellpellets, mit GAPDH als endogene Kontrolle und DMSO als Leerkontrolle. Die Berechnungen erfolgten anhand der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Es wurden drei voneinander unabhängige Messungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Signifikanz wurde durch den ungepaarten t-test berechnet. **** $p < 0,0001$

war nur XBP1 U signifikant höher exprimiert (+ 50%; $p < 0,001$). XBP1 S und BiP zeigten sich ebenso erhöht, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.

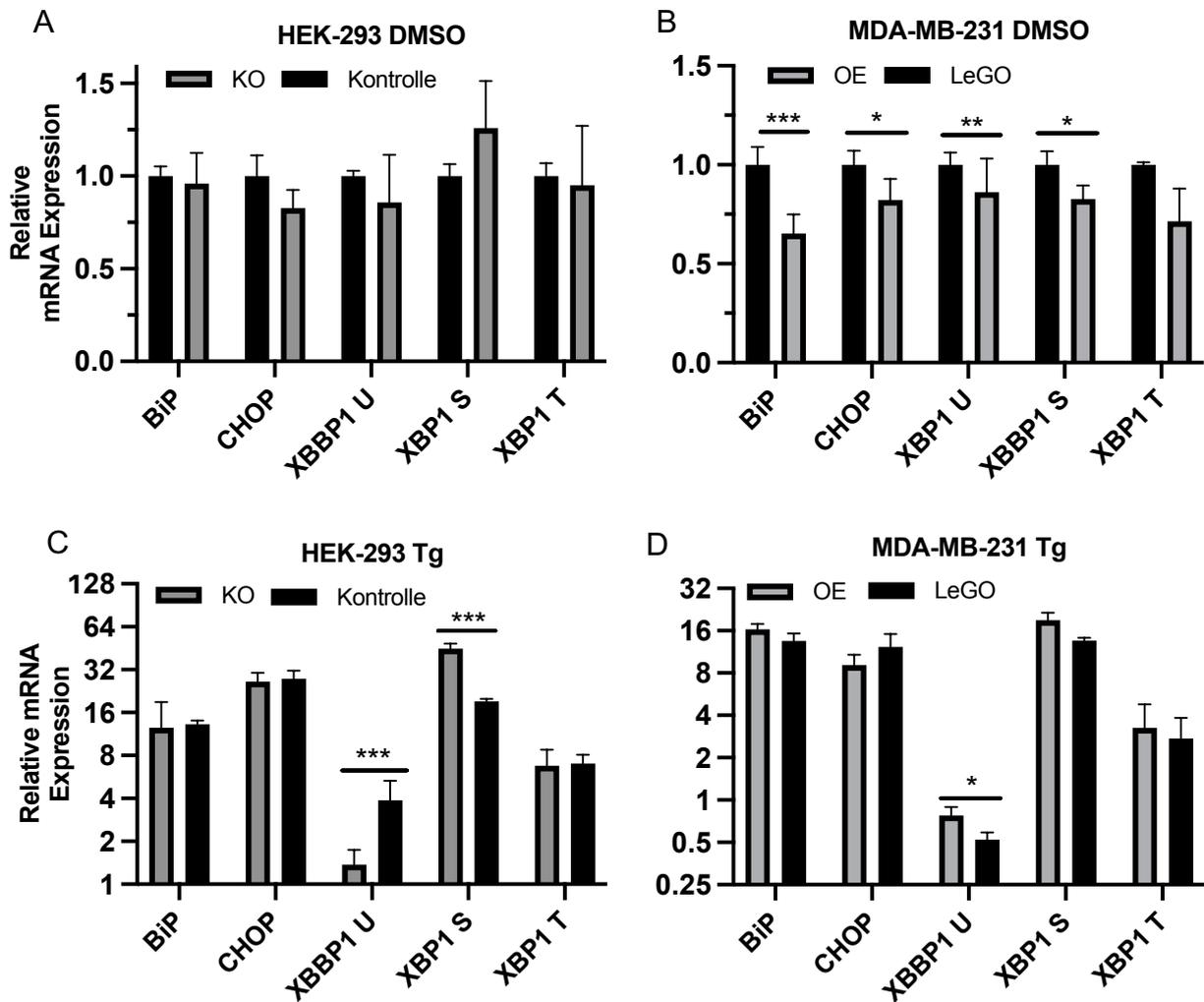


Abb. 17 UPR-Response in FicD-KO und -OE Zellen. Untersuchung von fünf UPR-Response Elementen mit qPCRs von isolierter RNA aus Zellpellets, mit GAPDH als endogene Kontrolle. Die Berechnungen erfolgten anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Es wurden drei voneinander unabhängige Messungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Basisexpressionen der Response Elemente in (A) HEK-293 KO und (B) MDA-MB-231 OE. (C) und (D) relative Unterschiede der Expressionen von Response Elemente bei Tg Behandlung, normiert auf die DMSO-Kontrollen. Die Signifikanzen wurde durch den ungepaarten t-test berechnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.8.3. Die AMPylierungs- und deAMPylierungsaktivität von FicD ist abhängig von ER Stress

Zur Untersuchung von Veränderungen der AMPylierung und Proteinexpression von BiP unter Tg wurden WB verwendet. Diese zeigten Unterschiede in der AMPylierung von BiP nach Behandlung mit Tg und CHX. In den FicD defizienten Zellen konnte keine AMPylierungen gemessen werden. In den HEK-293 Control Zellen nahm die AMPylierung nach CHX Behandlung zu und in Gegenwart von Tg ab. Dabei zeigte sich bei der Tg Behandlung ein 96% ($p < 0,05$) niedrigeres AMP-Signal als mit CHX (Abb. 18). Ein ähnliches Muster präsentierte sich auch bei den FicD OE MDA-MB-231 Zellen mit 98% ($p < 0,05$) reduzierter AMPylierung in Gegenwart von Tg im Vergleich zur CHX Behandlung. Auch im Vergleich zur LeGO Kontrolle kam es nach Tg Behandlung bei FicD OE zu 95% ($p < 0,05$) weniger AMPylierung, bei CHX dagegen zu einer Zunahme von +460% ($p < 0,05$).

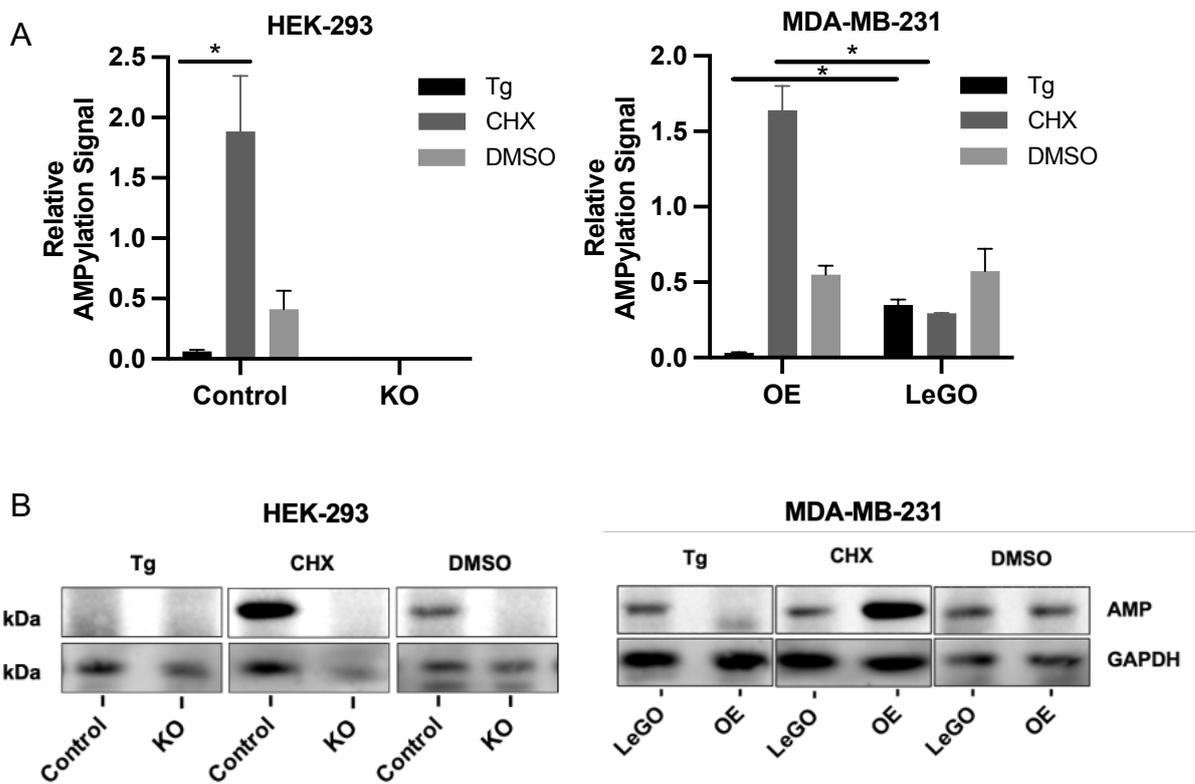


Abb. 18 AMPylierungsstatus von BiP unter Tg und CHX Behandlung WB mit anti-AMP AK, als endogene Kontrolle wurde GAPDH, als Behandlungs-Kontrolle DMSO verwendet. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. (A) Quantitative Auswertung der WBs mit AMPylierungs-Signal BiPs nach CHX, Tg und DMSO. Normalisiert wurde auf die jeweilige GAPDH Expression in der Zellprobe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. (B) Representative WBs mit AMPylierung unter Tg, CHX und DMSO. Die Signifikanzen wurden durch den ungepaarten t-test berechnet. * $p < 0,05$.

Tg Stress führte im Vergleich zu CHX zu 95% ($p < 0,001$) gesteigerter BiP Expression in FicD KO Zellen (Abb. 19). Signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen konnten nicht

festgestellt werden. In der MDA-MB-231 LeGO Kontrolle stieg die BiP Expression um +25% ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen FicD OE und LeGO Zellen ließen sich ebenfalls nicht feststellen.

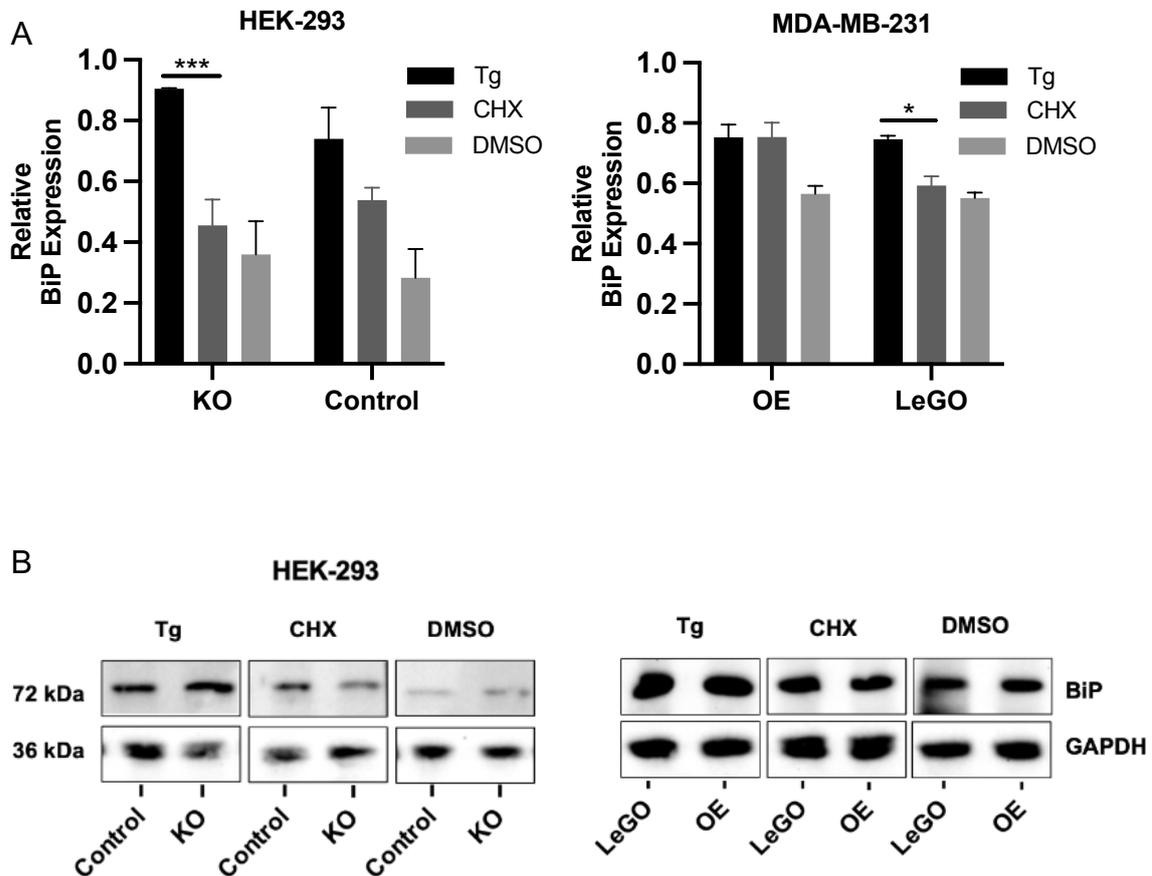


Abb. 19 Expression von BiP unter Tg und CHX-Behandlung. WB mit BiP-AK, als endogene Kontrolle wurde GAPDH, als Behandlungs-Kontrolle DMSO verwendet. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. **(A)** Quantitative Auswertung der WBs mit BiP-Signal nach CHX, Tg und DMSO. Normalisiert wurde auf die jeweilige GAPDH Expression in der Zellprobe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. **(B)** Representative WBs mit Expression BiPs unter Tg, CHX und DMSO. Die Signifikanzen wurden durch den ungepaarten t-test berechnet. $*p < 0,05$.

5. Diskussion

Krebszellen sind in der Tumorentwicklung und -progression einer Reihe von Stressfaktoren ausgesetzt. Dazu gehören z.B. Veränderung in der Proteinbiosynthese, Nährstoffmangel und Hypoxie durch schnelles Tumorwachstum und Veränderungen der Tumor-Mikroumgebung. Die UPR reguliert die Proteinfaltung und den Abbau fehlerhafter Proteine im ER und ist deshalb ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase (McGrath et al.

2018). Damit spielt diese auch eine wichtige Rolle für das Überleben von Krebszellen und bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Therapien (Xu et al. 2022). Bei vielen Tumoren konnte eine konstitutive Aktivierung der UPR nachgewiesen werden, die es den Krebszellen ermöglicht sich stressigen Bedingungen anzupassen und zu proliferieren. Die UPR ist dabei kein ausschließlich pathogener Vorgang, sondern ein endogener Zellmechanismus, der an vielen physiologischen Prozessen, wie Zelldifferenzierung und Stoffwechsellanpassungen beteiligt ist (Wang und Kaufman 2014). Jedoch scheint die ständige Aktivierung der UPR in Tumorzellen ein entscheidendes Unterscheidungsmerkmal im Vergleich zu gesunden Zellen zu sein, sodass diese als vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Therapien angesehen wird (McGrath et al. 2018).

Da BiP als Chaperon und Sensor eine Doppelrolle in der UPR einnimmt, ist seine Regulierung durch FicD via AMPylierung ein interessanter Ansatzpunkt zur Untersuchung in Tumorzellen. Ob die beschriebenen Effekte der UPR in Tumorzellen durch FicD reguliert werden und welchen Einfluss diese auf die Proliferation haben, ist noch nicht umfassend untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle FicDs in Tumorzellen zu charakterisieren. Insbesondere wurde die Relevanz der AMPylierung BiPs in Verbindung zum Tumorzellüberlebens untersucht. Daher wurde besonderer Fokus auf die Einflüsse FicDs auf Proliferation, Lokalisation sowie auf (de)AMPylierungs-Dynamik und Veränderungen in der UPR-Signalkaskade gelegt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FicD über das ER hinaus in das NR lokalisiert. Die Störung des Calciumhaushalts durch Tg und die Anhäufung ungefalteter Proteine, führte in Zellen neben einer verstärkten UPR-Aktivierung auch zu einer vermehrten FicD Expression. Es ist anzunehmen, dass FicD in der UPR durch die DeAMPylierung BiPs, die Faltungskapazität erhöht. Eine verstärkte (de)AMPylierungsVeränderung BiPs ging mit einem erhöhtem Tumorzellüberleben einher, während Zellen mit ausschließlich deAMPyliertem BiP ein niedrigeres Überleben zeigten. Dieser Überlebensvorteil war bei ungestressten Zellen nicht signifikant. Im Detail zeigten sich in der UPR-Signalkaskade Veränderungen bei der IRE1 vermittelten Spleißung des XBP1 Transkriptionsfaktors, während vorbeschriebene Einflüsse FicDs auf den ATF6 und PERK Signalweg nicht bestätigt werden konnten.

5.1. FicD wird stark von Triple-Negativer Brustkrebszelle MDA-MB-231 exprimiert

FicD wurde bereits in einigen Tumorzellen untersucht, jedoch wurde nicht spezifisch die Expression in unterschiedlichen Zelllinien verglichen. In der Literatur wurden die HEK-293T Zelle und die Östrogenrezeptor positive (ER+) Brustkrebszellreihe MCF-7 verwendet, um anhand von FicD Knockdown, Überexpression und Tg Behandlung mögliche Einflüsse auf die UPR zu untersuchen (Sanyal et al. 2015).

In unserem Screening von 14 Zelllinien zeigten die HEK-293 relativ zur H1299 Referenz-Zellen eine FicD Expression von +89%. Die Brustkrebszellen MCF-7 und MDA-MB-231 zeigten die höchste Expression FicDs. Dabei zeigten die Tripple-Negative Brustkrebszellreihe (TNBC) MDA-MB-231 die höchste Expression (+480%), die MCF-7 Zelle die zweithöchste Expression (+271%). Die MDA-MB-468, ebenfalls eine TNBC, gehörte dagegen mit +42% zu den niedrig exprimierenden Zellen. Diese Variabilität in der Expression ist nicht unüblich für Brustkrebs, welcher durch seine Heterogenität bzgl. molekularer Subtypen und Klinik geprägt ist (Sotiriou und Pusztai 2009). Ob die Expressionsunterschiede auch in der Klinik bestehen und klinische Relevanz besitzen, müssen Studien an Patientendaten zeigen.

Im Kontext von Brustkrebs wurde FicD noch wenig untersucht. Jedoch ist die Erforschung der UPR in diesem Zusammenhang ein wachsendes Forschungsfeld, da zunehmend dessen Bedeutung für die Tumorprogression, Metastasierung und Chemotherapie-Resistenz in den Vordergrund rückt (Madden et al. 2019). Auch spezifisch für BiP konnten Zusammenhänge in Brustkrebs-Zellen zwischen Antiangiogenese und der Zytostatika Resistenz festgestellt werden (Dong et al. 2005). Die Rolle von FicD ist in diesem Kontext noch weitestgehend unerforscht.

5.2. FicD lokalisiert in das ER und NR

Es konnte mithilfe von Elektronenmikroskopie (Sengupta et al. 2019) und Transfektion eines FicD-GFP Fusionsproteins in Verbindung mit ER-Färbungen (Sanyal et al. 2015) bereits gezeigt werden, dass FicD im ER lokalisiert ist. Durch stabile Expression eines FicD-GFP Fusionsproteins mit Kotransfektion eines ER-Trackers konnte dies in lebenden Zellen bestätigt werden (Abschnitt 6.7). Zusätzlich zeigten sich deutliche GFP-Signale aus dem Kerninneren. Diese stellten sich bei 3D-Projektion mehrerer Ebenen als tubuläre Strukturen mit Verbindung zur Kernmembran- bzw. ER dar. In der Literatur wird das Auftreten dieser Strukturen als nukleoplasmatisches Retikulum (NR) beschrieben. Dabei handelt es sich um ein intranukleäres Netzwerk aus invaginierenden Kanälen der Kernhülle bzw. als nukleäre Erweiterung des ERs.

Es werden zwei Haupttypen von NR-Strukturen unterschieden. Typ I ist eine Invagination der inneren Kernmembran, die von einer Einzelmembran ohne zytoplasmatische Kernporen begrenzt wird. Typ II ist eine Doppelmembran-Invagination der inneren und äußeren Kernmembran und stellt sich durchlässig zum Zytoplasma dar. Letzterer Typ besitzt Kernporenkomplexe und es wird angenommen, dass dieser sowohl eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genexpression als auch beim selektiven Transport von Makromolekülen besitzt (Malhas et al. 2011).

Unsere Aufnahmen stellen die erstmalige Beschreibung von FicD im NR dar. Interessant wird dies, wenn man diese Beobachtung in Kontext zu weiteren AMPylierten Proteinen stellt, die im Rahmen proteochemischer Untersuchungen gefunden wurden. So konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die konstitutiv aktivierte E234G FicD Mutante zu morphologisch veränderten Zellkernen in HeLa Zellen führte. Ferner wurden die Histone H2-4 aber nicht H1 als *in vitro* Substrate von FicD identifiziert. Histone sind an der Bildung von Nukleosomen beteiligt, wobei die post-translationale Modifikationen dieser die Chromosomenstruktur und Genexpression beeinflusst. (Truttmann et al. 2015). Ob es bei der NR Lokalisation FicDs auch zu AMPylierungen nukleärer Proteine mit epigenetischer Relevanz kommt, ist jedoch nicht belegt.

FicD konnte bisher nur in ER und Kernmembran detektiert werden (Sengupta et al. 2019). BiPs Lokalisation ist über das ER hinaus in weiteren Zellkompartimenten wie dem Nukleus beschrieben, wo der BiP Einfluss die Transkription zu beeinflussen scheint (Liu et al. 2023). Unsere Ergebnisse legen die Möglichkeit für einen regulatorischen Einfluss FicDs über das ER hinaus nahe. Inwieweit FicD auch in anderen Kompartimenten wie NE und der beschriebenen NR- regulatorisch aktiv ist, wurde noch nicht ausreichend untersucht. Zwar konnte für die bakterielle Fic-Variante *Coxiella burnetii* (CbFic2) eine AMPylierung von Histon 3 nachgewiesen werden, die Daten für mögliche Histon-AMPylierungen FicDs beschränken sich jedoch auf *in vitro* Experimente (Truttmann et al. 2015; Höpfner et al. 2023).

Zur gezielten Identifizierung möglicher nukleärer FicD Substrate, wäre eine Isolation nukleärer Proteine aus Zelllysaten mit anschließendem Screening auf AMPylierung analog zu Abschnitt 5.4.2 möglich. Sollten sich die AMPylierung von Histonen durch FicD bestätigen, stellt sich die Frage des Mechanismus, da eine membrangebundene Lokalisation FicDs die Substratlokalisierung auf das NR und ER beschränken müsste. Abgesehen von der Histon-Frage, erweitert die NR-Lokalisation den möglichen Aktionsradius FicDs auf den Nukleus und stellt die Relevanz der BiP-AMPylierung insbesondere im Kontext des transkriptionellen Einflusses von BiP in ein neues Licht.

5.3. FicD Knockout in MDA-MB-231 nicht etablierbar

Ein CRISPR-KO Versuch FicD in MDA-MB-231 Zellen gestaltete sich als schwierig. Zwar ließ sich initial ein einzelner Klon mit Frameshift-Mutation vor der FicD Domäne expandieren. Dieser zeigte aber interessanterweise bei der AMPylierung BiPs ein Restsignal (Abb. 21) mit im Vergleich zum Wildtyp um 50% reduziertem Signal im anti-AMP WB. Ob es sich um eine Rest-AMPylierungs Fähigkeit FicDs oder um einen anderen Ursprung der AMPylierung BiPs handelte konnte nicht abschließend geklärt werden. Auch, da sich diese Daten nicht replizieren ließen, da sich weitere KO-Klone als nicht überlebensfähig erwiesen.

In der Literatur lassen sich keine Hinweise auf erschwerte Knockout-Bedingungen bzgl. FicD finden. Ein mouse-FicD (mFicD) AMPylase Knockout Maus erwies sich als lebensfähig (McCaul et al. 2021). In HEK-293T Zellen zeigte sich ein siRNA vermittelter Knockdown als überlebensfähig (Sanyal et al. 2015). Auch in unseren Versuchen ließ sich in HEK-293 Zellen ein CRISPR/Cas9 vermittelter Knockdown etablieren. Die FicD-mRNA war stark reduziert, vereinbar mit Nonsense mediated mRNA decay (NMD), eine Form von RNA-Qualitätskontrolle, in der mRNAs mit vorzeitigem Translationsstopp vorzeitig abgebaut werden (Kurosaki und Maquat 2016). Der Knockout wies außerdem ein komplettes Fehlen der BiP-Ampylierung auf.

Eine Ursache, weshalb sich bei den MDA-MB-231 kein KO etablieren ließ, könnte die Zellreihe selbst darstellen. In unseren Versuchen zeigte diese stets niedrige Transfektion-Effizienzen mit dem CRISPR/Cas9 System und eine niedrige Viabilität nach dem FACS single cell sorting. Dabei könnte FicD eine essenzielle Bedeutung für die Viabilität in MDA-MB-231 Zellen haben, was die Schwäche des shRNA vermittelten Knockdowns erklären könnte.

5.4. FicD Knockout hat keinen Einfluss auf Spheroidwachstum

Der Einfluss FicDs auf die Proliferation in Tumorzellen wurde bisher wenig untersucht. Mit der Etablierung von KD bzw. KO-Zelllinien und der Durchführung von MTS Assays (6.3) ließen sich dazu erste Erkenntnisse gewinnen. Sowohl im shRNA vermitteltem KD in MDA-MB-231 Zellen als auch im CRISPR vermitteltem KO in HEK-293 Zellen konnte kein signifikanter Einfluss FicDs auf die Proliferation im ungestressten Zustand festgestellt werden. In der Literatur wurde dahingegen eine vermehrte absolute Anzahl apoptotischer Zellen beim siRNA vermitteltem KD bei HEK-293T Zellen festgestellt (Sanyal et al. 2015). Diese Versuche sind nur bedingt miteinander vergleichbar, da in dieser Arbeit die apoptotischen Zellen nicht zur viablen Zellmasse in Verhältnis gesetzt wurden und in unserer Arbeit eine andere Methodik mit

einem stabilen FicD KO durchgeführt wurde. Außerdem muss eine häufigere Apoptose in FicD defizienten Zellen nicht obligatorisch mit einem signifikant messbaren Effekt auf die Proliferation einhergehen.

Für BiP konnte in Lungenkarzinom Zellen gezeigt werden, dass der siRNA vermittelte BiP KD zu ringierem Spheroid Wachstum führte. Dieser Effekt kommt den Autoren zufolge durch Wegfall einer BiP gesteuerten Rekrutierung von phosphorylierter Extracellular-signal Regulated Kinases (p-ERK) an Mikrotubuli zustande (Wattanathamsan et al. 2023). Da BiP von FicD modifiziert und reguliert wird, stellte sich die Frage, ob auch FicD einen Einfluss auf das Spheroid Wachstum besitzt. Dabei konnten wir bei den im Abschnitt 7.4 durchgeführten HEK-293 Spheroid-Assays keinen signifikanten Einfluss FicDs feststellen. Eine Möglichkeit wäre, dass die Feinregulation BiPs innerhalb der UPR vom Tumorzelltyp abhängig ist oder ein anderer Mechanismus, wie z.B. eine veränderte Basisexpression BiPs die eine fehlende Regulation durch AMPylierung ausgleicht.

5.5. FicD wirkt positiv auf Proliferation bei induziertem ER-Stress

Zunehmend geraten bei der Pathophysiologie von Krebs physiologische Stressreaktionen von Zellen, wie die UPR, in den Fokus. Es konnte gezeigt werden, dass diese von Tumorzellen genutzt werden, um ihr Überleben sowohl bei starker Proliferation als auch bei Sauerstoff- und Nährstoffmangel zu gewährleisten (Madden et al. 2019). Um einen Stresszustand zu simulieren und im speziellen die UPR zu aktivieren, setzten wir Tg ein. Dieses inhibiert die SERCA im ER und sorgt über die Störung der Calcium-Hömaostase zu erniedrigter Chaperon-Aktivität und führt zur Anreicherung ungefalteter Proteine (Oslowski und Urano 2011).

Bisher wurde der Einfluss von FicD unter dieser Art Zellstress nicht im Detail untersucht. Zwar konnten Sanyal et al. 2015 zeigen, dass es bei FicD KD Zellen zu verstärkter Apoptose unter Tg kommt, jedoch lässt dies keine direkte Ableitung auf das Proliferationsverhalten zu. Bei der Bifunktionalität FicDs, welches mit (de)AMPylierung sowohl stimulierend als auch inhibierend auf die Chaperonaktivität BiPs einwirkt, wäre zu erwarten, dass es beim Wegfall der inhibierenden AMPylierung zu vermehrtem Zellüberleben und höherer Proliferation bei ER-Stress kommt. Unserer Ergebnisse zeigen jedoch, dass FicD gerade bei ER-Stress einen positiven Einfluss auf die Tumorzellproliferation besitzt. Eine mögliche Ursache könnte in der Feinregulierung der UPR liegen. Ob diese durch AMPyliertes BiP oder durch FicD selbst zustande kommt und inwiefern dadurch apoptotische Signale über die UPR-Kaskade unterdrückt werden, ist jedoch unklar.

Eine weitere Ursache für die niedrigere Proliferationsrate der FicD defizienten Zellen könnte der Energieumsatz sein. Die AMPylierung besitzt inhibierenden Einfluss auf die ATPas-Aktivität von BiP und reguliert somit die Chaperonaktivität (Fauser et al. 2021a). Schlussfolgernd könnte davon ausgegangen werden, dass FicD defiziente Zellen einen erhöhten Energieumsatz aufweisen, da bei diesen BiP nur im deAMPylierten Zustand vorkommt. Dies könnte sich wiederum negativ auf die Proliferationsrate auswirken. Dieser Mechanismus bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, da die Zusammenhänge zwischen FicD, UPR und Energieumsatz noch weitestgehend unklar sind.

5.6. FicD Überexpression hat Einfluss auf AMPylierungs Verhalten

In der Literatur wurden bereits Zellversuche mit einer Überexpression FicDs beschrieben (Sanyal et al. 2015). Dabei präsentierten HeLa (Zervix-Ca Epithelzelle) und A549 (Lungen-Adenocarcinom) Zellen mit Überexpression des WTs keine phänotypischen Veränderungen, die mit der hyperaktiven Mutante E234G transfizierten Zellen wiesen jedoch offensichtliche Anzeichen von zellulärem Stress und eine erhöhte Zelltodesrate auf. Auch zeigten sich die Zellkerne deformiert mit nuclear-blep ähnlichen Strukturen. (Truttmann et al. 2015). Durch den Unterschied zwischen Wildtyp und E234G Mutante wurde auf die Relevanz der starken intrinsischen Regulation der AMPylierungs-Aktivität FicDs geschlossen. Dabei konnten bereits eine Reihe von möglichen Mechanismen identifiziert werden, wie die der autoinhibitorischen Schleife (α_{inhib}). Diese wurde in der FicD hyperaktiven Mutante mit der Mutation des Glu234 zu Glycin verändert, sodass FicD ausschließlich BiP-AMPylierung katalysiert (Fauser et al. 2021a).

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, könnte die AMPylierung eine mögliche Ursache darstellen, dass überexprimierende FicD-WT Zellen in ER-Stress Situationen einen Proliferationsvorteil besitzen. Die Veränderung der BiP AMPylierung wurde von uns in Abschnitt 7.6 mit anti-AMP AK im WB untersucht. Dabei konnten wir eine verstärkte (de)AMPylierungs Dynamik in der FicD-OE feststellen. Tg induzierter ER-Stress führte zu verstärkter deAMPylierung, eine Inhibition der Proteinbiosynthese mit CHX zu verstärkter AMPylierung BiPs. Die erhöhte Viabilität der FicD-OE bei aktivierter UPR könnte auf die verstärkte deAMPylierungs Aktivität zurückzuführen sein, da die daraus resultierende erhöhte Chaperon-Aktivität BiPs bei ER-Stress einen Überlebensvorteil bieten würde. Andererseits lag BiP beim FicD-KO ebenfalls vollständig deAMPyliert vor und dieser zeigte im Gegensatz eine niedrigere Proliferation als der WT. Daraus kann geschlossen werden, dass sich eine mögliche

feinregulatorische Funktion der AMPylierung BiPs positiv auf das Zellüberleben unter ER-Stress auswirkt. Offen bleibt, ob FicD dabei direkte Einflüsse auf die UPR-Kaskade ausübt.

5.7. FicD-KO aktiviert vermehrt IRE1-Kaskade der UPR

IRE1 bildet zusammen mit XBP1 eine Signalkaskade. XBP1 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen mRNA nach Aktivierung von IRE1s Ribonuklease-Domäne gespleißt und durch die 5'-OH Ligase ligiert wird. Durch das Herausschneiden eines Introns wird ein Frameshift verursacht, der für den XBP1 S Transfaktionsfaktor codiert. Dieser verstärkt die UPR-Antwort durch vermehrte Expression von Chaperonen und ER-assoziiertem Proteinabbau (ERAD) (Lee et al. 2003).

Mögliche Effekte FicDs auf die UPR-Signalkaskade werden bereits in der Literatur beschrieben. Mittels siRNA vermitteltem FicD KD konnte hierbei in HEK-293T Zellen eine 30% erhöhte Expression XBP1 S unter ER-Stress festgestellt werden. Auch zeigten sich eine signifikante Erniedrigung der BiP- und CHOP-Expressionen. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass FicD die Aktivierung der ATF6- und PERK-Signalwege positiv beeinflusse (Sanyal et al. 2015).

Im Gegensatz dazu konnten wir in unserem CRISPR/Cas9 vermitteltem FicD KO in HEK-293 die erniedrigten BiP- und CHOP- Expressionen nicht replizieren. Der Literatur entsprechend zeigte sich dafür die Expression von XBP1 S deutlich erhöht (+ 120%). Dass FicD möglicherweise Auswirkungen auf die IRE1 Kaskade besitzt, wird zusätzlich dadurch untermauert, dass die FicD OE MDA-MB-231 Zellen ebenfalls Veränderungen im XBP1 Verhältnisses von unmodifizierter und gespleißter Variante (XBP1 U/S) zeigten und im entgegengesetzten Verhältnis mit einer Erhöhung des ungespleißten XBP1 U (+ 50%).

Die Verschiebung des Verhältnisses von XBP1 U zu XBP1 S im FicD KO könnte auf eine verstärkte Ribonuklease-Aktivität von IRE1 zurückzuführen sein. Interessanterweise wird in der Literatur eine BiP unabhängige IRE1-Aktivierung beschrieben (Kimata et al. 2004), sodass ein über BiP hinausgehender Einfluss FicDs denkbar wäre. Auffällig ist auch, dass nur die IRE1-Kaskade signifikanten Veränderungen zeigte, während CHOP und BiP kaum verändert waren. Da FicD modifizierend auf den UPR-Sensor BiP einwirkt, wäre ein Einfluss der AMPylierung BiPs wahrscheinlich. Jedoch zeigte sich BiP bei Tg-Behandlung sowohl FicD KO also auch in der OE überwiegend im deAMPylierten Zustand, sodass eine andere Form von inhibierendem Mechanismus auf die IRE1 Kaskade möglich wäre. Abschließend bleibt offen, ob FicD einen direkten Einfluss auf diesen Teil der UPR-Signalkaskade ausübt oder dieser Effekt durch einen FicD-KO allgemein verstärkten ER-Stress zustande kommt.

6. Ausblick und Fazit

Um die Relevanz des Einflusses FicDs auf Spheroidwachstum, Proliferation, AMPylierung und die UPR-Signalkaskade besser auf Brustkrebszellen anwenden zu können, müssten replizierbare KO-Versuche in MDA-MB-231 oder MCF-7 Zellen erfolgen. Beide Zellreihen besitzen eine hohe endogene FicD-Expression, sodass möglicherweise andere Effekte als in HEK-293 Zellen auftreten. Durchführbar wäre dies z.B. mit einer lentiviralen Transduktion des CRISPR/Cas9 Systems. Sollte mit der lentiviralen Methode ebenfalls kein KO etabliert werden können, könnte zur weiteren Differenzierung das AMPylierungs-Ziel T518 des BiP Chaperons zu T518A mutiert werden. In der Literatur führte diese Mutation zum Verlust der BiP AMPylierung. Bei der BiP^{T518A} Mutante wären ähnliche Effekte wie beim FicD KO zu erwarten, da auch bei diesem BiP in einem unmodifizierten Zustand vorliegt. Sollte sich die BiP Mutation als deutlich viabler als FicD KO erweisen, wäre ein von der AMPylierung BiPs unabhängiger Effekt, wie die AMPylierung anderer Substrate, die u.a. in Abschnitt 7.2 diskutiert wurden, möglich.

Zur weiteren Untersuchung der FicD und IRE1 Zusammenhänge könnte eine Rückexpression des FicD-WT in voller Länge mit anschließendem Pulldown-Assay zur Identifikation möglicher Protein-Protein Interaktionen zwischen FicD und IRE1 durchgeführt werden. Zusätzlich wäre mit einer gezielten Mutation der AMPylierungs-Stelle BiPs mit der BiP^{T518A} Mutante und stabiler Expression des FicD-WT die Untersuchung von AMPylierungs unabhängigen Effekten FicDs auf die UPR-Kaskade möglich.

Im Kontext von Brustkrebs wäre es außerdem interessant, ob die Erkenntnisse aus den HEK-KO Zellen auch auf die MDA-MB-231 Zellen übertragbar wären, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass XBP1 in TNBC hochreguliert wird, positiv auf die Tumorprogression wirkt und einen gemeinsamen Transkriptionskomplex mit *Hypoxie induced Factor* (HIF) 1 α bildet. In Patientendaten korrelierte eine spezifische XBP1 Gensignatur mit einer schlechten Prognose (Chen et al. 2014).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass FicD über das ER hinaus im NR lokalisiert ist und FicD selbst einen Proliferationsvorteil für Tumorzellen bei induziertem ER-Stress darstellt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei FicD defizienten Zellen der IRE-1-Signalweg der UPR stärker aktiviert wurde. Im Zuge wachsenden Interesses bzgl. der UPR innerhalb der Tumorforschung, konnten für BiP bereits einige Inhibitoren entwickelt werden, die präklinisch u.a. die Zytostatika Resistenz senken konnten oder zu vermehrtem Zelltod führten. Ob FicD oder die AMPylierung BiPs ebenso für mögliche Therapieansätze bei

Krebs infrage kommen, müssen weitere Untersuchungen klären. Jedoch zeigen unsere Ergebnisse, dass FicD und die AMPylierung als PTM mögliche Relevanz für die Tumorprogression besitzen.

7. Zusammenfassung

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist als Ort für Synthese, Faltung und Modifikation von Proteinen elementarer Bestandteil für die Proteinbiosynthese. Dabei stellt bei vermehrtem Auftreten fehlgefalteter Proteine die *Unfolded Protein Response* (UPR) einen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dar. In den letzten Jahren wurde der UPR eine wichtige Rolle für das Überleben und die Resistenzentwicklung von Krebszellen zugewiesen. Elementar für die UPR ist das *Binding Immunoglobulin Protein* (BiP), da es als Chaperon direkt an der Faltung von Proteinen im ER beteiligt ist und ebenso als Sensorprotein der UPR dient. BiP wird mit AMPylierung bzw. deAMPylierung durch die AMP-Transferase *filamentation-induced-by-cyclic-AMP* (FicD) reguliert. Die AMPylierung hat hemmenden Einfluss auf die ATPase- und damit auf die Chaperon-Aktivität von BiP.

Ziel dieser Arbeit war es neben der Charakterisierung von FicD in Tumorzellen auch die Bedeutung der BiP AMPylierung auf die UPR und das Tumorzellüberleben zu untersuchen. Der Schwerpunkt wurde auf die Lokalisation sowie auf die (de)AMPylierungs-Dynamik FicDs und den Einfluss auf Proliferation und UPR-Signalkaskade gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass FicD über das ER hinaus in das nukleoplasmatische Retikulum (NR) lokalisiert und die (de)AMPylierung von BiP stark mit dem ER-Stresszustand korrelierte. Ebenso ging eine verstärkte (de)AMPylierungs Dynamik mit einem erhöhtem Tumorzellüberleben einher. Bei FicD Knockout (KO) und Überexpression (OE) in HEK-293 und MDA-MB-231 Zellen konnten Veränderungen in der UPR-Signalkaskade, speziell bei der IRE1 vermittelten Spleißung des *X-box binding protein 1* (XBP1) Transkriptionsfaktors (TF), festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die BiP-AMPylierung bzw. die Expression von FicD mit dem Überleben von Tumorzellen korrelierte, obwohl dies mechanistisch betrachtet eine übergreifend verminderte Chaperon Aktivität bedeuten würde. Dies zeigt, wie entscheidend die Feinregulation BiPs für die korrekte Funktion der UPR zu sein scheint und eröffnet mögliche Ansatzpunkte für das tiefere Verständnis der UPR-Regulation und damit mögliche Therapieansätze für zukünftige Krebstherapien.

8. Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is an elementary component of protein biosynthesis as a site for the synthesis, folding and modification of proteins. The unfolded protein response (UPR) is a mechanism for maintaining cellular homeostasis when misfolded proteins occur. In recent years, the UPR has been assigned an important role in the survival and development of resistance in cancer cells. The binding immunoglobulin protein (BiP) is elementary for the UPR, as it is directly involved in the folding of proteins in the ER as a chaperone and serves as a sensor protein of the UPR. BiP is regulated by AMPylation or deAMPylation by the AMP transferase filamentation-induced-by-cyclic-AMP (FicD). AMPylation has an inhibitory effect on the ATPase and thus on the chaperone activity of BiP.

The aim of this work was to characterize FicD in tumor cells and to investigate the significance of BiP AMPylation on the UPR and tumor cell survival. The focus was on the localization and (de)AMPylation dynamics of FicD and its influence on proliferation and the UPR signaling cascade. It was shown that FicD localizes beyond the ER into the nucleoplasmic reticulum (NR) and that the (de)AMPylation of BiP correlated strongly with the ER stress state. Similarly, increased (de)AMPylation dynamics were associated with increased tumor cell survival. FicD knockout (KO) and overexpression (OE) in HEK-293 and MDA-MB-231 cells revealed alterations in the UPR signaling cascade, specifically in IRE1-mediated splicing of the X-box binding protein 1 (XBP1) transcription factor (TF).

In summary, it could be shown that BiP-AMPylation or the expression of FicD correlated with the survival of tumor cells, although mechanistically this would mean an overall reduced chaperone activity. This shows how crucial the fine regulation of BiP appears to be for the correct function of the UPR and reveals potential starting points for a deeper understanding of UPR regulation and thus possible therapeutic approaches for future cancer therapies.

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
3D	dreidimensional
A. dest	Doppelt destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CHOP	<i>C/EBP Homologous Protein</i>
API	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i>
ERdjs	<i>ER-localized DnaJ-like proteins</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälber Serum)
FicD	<i>Filamentous induced by cyclic AMP</i>
FW	<i>forward</i>
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
His	Histidin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Hsp70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KAN	Kanamycin
kDa	Kilodalton
Ki-67	Antigen Kiel 76
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LeGO	Lentiviral gene ontology
M	molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar

mm	Millimeter
MP	Milchpulver
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NBD	Nucleotid bindende Domäne
NEF	<i>nucleotide exchange factor</i>
NR	nukleoplasmatische Retikulum
n.s.	Nicht signifikant
ng	Nanogramm
nm	NanometernM Nanomolar
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat-buffered-saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTMs	Posttranslationale Modifikationen
QC	Quickchange Mutagenese
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RV	Reverse
SAC	Spindle assembly checkpoint
SBD	Substrat bindende Domäne
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TF	Transkriptionsfaktor

XBP1	X-box-binding protein 1
sec	Sekunde(n)
shRNA	Small hairpin RNA
SLIC	sequence- and ligation-independent cloning
S1P/S2P	site-1 and site-2 proteases
TB	Terrific broth
TBS-T	Tris-buffered-saline, 0,1% Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TPR	Tetratricopeptid Repeats
UPR	Unfolded Protein Response
V	Volt

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zelllinien mit Kulturmedien und Zusätzen	15
Tabelle 2 Plasmide zur Expression mit Resistenzangaben.....	16
Tabelle 3 Primer für qPCR von FicD und UPR Response Elementen	16
Tabelle 4 Primer für die Klonierung des pEGFP N1 + FicD Plasmids	16
Tabelle 5 Primer für die Klonierung des LeGO iB ₂ Neo + FicD-GFP Plasmids	17
Tabelle 6 sgRNAs für die Klonierung des pSpCas9-2A-GFP FicD-KO Plasmids und Sequenzierprimer für die KO-Klone.....	17
Tabelle 7 shRNAs für FicD Knockdown.....	18
Tabelle 8 Verwendete Antikörper für Western-Blot.....	18
Tabelle 9 Puffer und Lösungen	19
Tabelle 10 Zusammensetzung der Q5 PCR Reaktion	20
Tabelle 11 Zusammensetzung der SLIC Reaktion	21
Tabelle 12 Zusammensetzung des Reaktionsmix zur Plasmidlinearisierung.....	21
Tabelle 13 Reaktionsansatz 1 für sgRNA Phosphorylierung	22
Tabelle 14 Thermozykler Programm zur Phosphorylierung und Primeranlagerung der sgRNA	22
Tabelle 15 Reaktionsansatz 2 zur pSpCas9-2A-GFP FicD KO Plasmid Klonierung .	23
Tabelle 16 Thermozykler Programm Verdau und Ligation des pSpCas9-2A-GFP FicD KO Plasmids.....	23
Tabelle 17 Reaktionsansatz 3 Exonuklease Behandlung des pSpCas9-2A-GFP FicD KO Plasmids.....	23
Tabelle 18 Thermozykler Programm Exonuklease Behandlung des pSpCas9-2A-GFP FicD KO Plasmids	23
Tabelle 19 Transfektionsansatz für HEK-293 Zellen	24
Tabelle 20 Transfektionsansatz für MDA MB 231 Zellen.....	24
Tabelle 21 Transfektionsansätze zur Produktion lentiviraler Viren mit LeGO iB ₂ Neo+ GFP FicD OE	27
Tabelle 22 Transfektionsansatz zur Produktion lentiviraler Viren mit shRNA zum FicD KO	28
Tabelle 23 Thermozykler Programm cDNA Synthese.....	29
Tabelle 24 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für qPCR-Messung pro Well30	
Tabelle 25 Angepasster Transfektionsansatz für MDA-MB-231 Zellen.....	32
Tabelle 26 Zusammensetzung Sequenzieransatz.....	34

11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: ER-Stressoren in Tumorzellen.....	6
Abb. 2: UPR Signalkaskade.....	8
Abb. 3: BiP Chaperon-Zyklus	11
Abb. 4: Model der konfirmationsabhängigen (de)AMPylierungs Funktion FicDs.....	12
Abb. 5: Schema zum möglichen Einfluss FicDs auf Tumorzellen	14
Abb. 6: qPCR-Screening von Tumorzelllinien auf FicD.....	37
Abb. 7: FicD Knockdown hat keinen Einfluss auf die Proliferation in MDA-MB-231 ..	38
Abb. 8: FicD OE und Proliferation in MDA-MB-231	39
Abb. 9: Schematische Darstellung des FicD Gens in WT und FicD Mutanten.....	40
Abb. 10: Strukturvorhersagen der FicD-KO Mutanten zeigen Fehlen der Fic-Domäne	41
Abb. 11: HEK-293 FicD KO Klon Heterogenität in Proliferation und BiP Expression.	42
Abb. 12: Ein FicD-KO hat keine Auswirkungen auf das Spheroidwachstum.....	44
Abb. 13: MDA-MB-231 FicD-GFP Fluoreszenzaufnahmen mit ER-Marker CEPIA....	46
Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen der MDA-MB-231 FicD-GFP OE	47
Abb. 15: Proliferation unter Tg Stress	49
Abb. 16: FicD Expression unter Tg-Behandlung von HEK-293 WT-Zellen.....	50
Abb. 17: UPR-Response in FicD-KO und -OE Zellen.	51
Abb. 18: AMPylierungsstatus von BiP unter Tg und CHX Behandlung.....	52
Abb. 19: Expression von BiP unter Tg und CHX-Behandlung	53
Abb. 20: Schematische Darstellung des FicD Gens in WT und FicD Mutanten	81
Abb. 21: AMPylierung Status und Proliferation FicD KO Klon MDA-MB-231	82
Abb. 22: Strukturvorhersagen der FicD-KO Mutanten zeigen Fehlen der Fic-Domäne	82
Abb. 23: pLKO.1 sh1 FicD KO Plasmid	83
Abb. 24: pEGFP-N1 +FicD Plasmid	84
Abb. 25: LeGO-iB2-Neo+ FicD-GFP Plasmid.....	85
Abb. 26: LeGO-iB2-Neo+ GFP-Plasmid	86
Abb. 27: pCMV R-CEPIA1er Plasmid	87
Abb. 28: pSpCas (BB)-GFP (PX458) + sgRNA1 FicD KO.....	88
Abb. 29: LeGO-iB2-Neo+ GFP-Plasmid	89

12. Literaturverzeichnis

Ah C, Tc O, Ja B, Jg C (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications* 3

Baumeister P, Luo S, Skarnes WC, Sui G, Seto E, Shi Y, Lee AS (2005): Endoplasmic Reticulum Stress Induction of the Grp78/BiP Promoter: Activating Mechanisms Mediated by YY1 and Its Interactive Chromatin Modifiers. *Molecular and Cellular Biology* 25, 4529

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326–332

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, 394–424

Bubendorf L, Feichter GE, Obermann EC, Dalquen P: Funktionelle Anatomie der Zelle. In: Bubendorf L, Feichter GE, Obermann EC, Dalquen P, Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W (Hrsg.): *Pathologie: Zytopathologie*. Springer, Berlin, Heidelberg 2011, 1–18

Buck TM, Wright CM, Brodsky JL (2007): The Activities and Function of Molecular Chaperones in the Endoplasmic Reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 18, 751–761

Bunney TD, Cole AR, Broncel M, Esposito D, Tate EW, Katan M (2014): Crystal structure of the human, FIC-domain containing protein HYPE and implications for its functions. *Structure* 22, 1831–1843

Chambers JE, Petrova K, Tomba G, Vendruscolo M, Ron D (2012): ADP ribosylation adapts an ER chaperone response to short-term fluctuations in unfolded protein load. *J Cell Biol* 198, 371–385

Chen X, Cubillos-Ruiz JR (2021): Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer* 21, 71–88

Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, Tang Q, Greenblatt MB, Hatzia Apostolou M, Lim E, Tam WL, Ni M, Chen Y, et al. (2014): XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* 508, 103–107

Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, Lanas F, Lopez-Jaramillo P, Gupta R, Diaz R, Avezum A, Oliveira GBF, Wielgosz A, et al. (2020): Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* 395, 785–794

Denning W, Das S, Guo S, Xu J, Kappes JC, Hel Z (2013): Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: effect of sera and polycations. *Mol Biotechnol* 53, 308–314

Denzel MS, Antebi A (2015): Hexosamine pathway and (ER) protein quality control. *Curr Opin Cell Biol* 33, 14–18

- Dong D, Ko B, Baumeister P, Swenson S, Costa F, Markland F, Stiles C, Patterson JB, Bates SE, Lee AS (2005): Vascular Targeting and Antiangiogenesis Agents Induce Drug Resistance Effector GRP78 within the Tumor Microenvironment. *Cancer Research* 65, 5785–5791
- Dong L, Krewson EA, Yang LV (2017): Acidosis Activates Endoplasmic Reticulum Stress Pathways through GPR4 in Human Vascular Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* 18, 278
- Fauser J, Gulen B, Pogenberg V, Pett C, Pourjafar-Dehkordi D, Krisp C, Höpfner D, König G, Schlüter H, Feige MJ, et al. (2021a): Specificity of AMPylation of the human chaperone BiP is mediated by TPR motifs of FICD. *Nat Commun* 12, 2426
- Fauser J, Gulen B, Pogenberg V, Pett C, Pourjafar-Dehkordi D, Krisp C, Höpfner D, König G, Schlüter H, Feige MJ, et al. (2021b): Specificity of AMPylation of the human chaperone BiP is mediated by TPR motifs of FICD. *Nat Commun* 12, 2426
- Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE (1991): Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353, 726–730
- Guth S, Völzing C, Müller A, Jung M, Zimmermann R (2004): Protein transport into canine pancreatic microsomes. *European Journal of Biochemistry* 271, 3200–3207
- Ham H, Woolery AR, Tracy C, Stenesen D, Krämer H, Orth K (2014): Unfolded Protein Response-regulated Drosophila Fic (dFic) Protein Reversibly AMPylates BiP Chaperone during Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *J Biol Chem* 289, 36059–36069
- Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE (1998): BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747–758
- Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton J-P, Xu W, Hagen A, Backes BJ, Oakes SA, Papa FR (2009): IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 138, 562–575
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F (2019): Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5, 66
- Hedberg C, Itzen A (2015): Molecular perspectives on protein adenylation. *ACS Chem Biol* 10, 12–21
- Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ (2020): Mechanism, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 421–438
- Hollien J, Weissman JS (2006): Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 313, 104–107
- Höpfner D, Fauser J, Kaspers MS, Pett C, Hedberg C, Itzen A (2020): Monoclonal Anti-AMP Antibodies Are Sensitive and Valuable Tools for Detecting Patterns of AMPylation. *iScience* 23, 101800
- Höpfner D, Cichy A, Pogenberg V, Krisp C, Mezouar S, Bach NC, Grotheer J, Zarza SM, Martinez E, Bonazzi M, et al. (2023): The DNA-binding induced (de)AMPylation activity of a *Coxiella burnetii* Fic enzyme targets Histone H3. *Commun Biol* 6, 1–25

IHME, (2024): Global Burden of Disease Study 2021.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, et al. (2021): Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589

Kampinga HH, Craig EA (2010): The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 579–592

Kimata Y, Oikawa D, Shimizu Y, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K (2004): A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol* 167, 445–456

Koumenis C (2006): ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Curr Mol Med* 6, 55–69

Kurosaki T, Maquat LE (2016): Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci* 129, 461–467

Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH (2003): XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23, 7448–7459

Li MZ, Elledge SJ (2007): Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 4, 251–256

Liou G-Y, Storz P (2010): Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44, 10.3109/10715761003667554

Liu Z, Liu G, Ha DP, Wang J, Xiong M, Lee AS (2023): ER chaperone GRP78/BiP translocates to the nucleus under stress and acts as a transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120, e2303448120

Madden E, Logue SE, Healy SJ, Manie S, Samali A (2019): The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biology of the Cell* 111, 1–17

Malhas A, Goulbourne C, Vaux DJ (2011): The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends in Cell Biology* 21, 362–373

McCaul N, Porter CM, Becker A, Tang C-HA, Wijne C, Chatterjee B, Bousbaine D, Bilate A, Hu C-CA, Ploegh H, Truttmann MC (2021): Deletion of mFICD AMPylase alters cytokine secretion and affects visual short-term learning in vivo. *J Biol Chem* 297, 100991

McGrath EP, Logue SE, Mnich K, Deegan S, Jäger R, Gorman AM, Samali A (2018): The Unfolded Protein Response in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 10, 344

Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G, Piqani B, Eisenhaure TM, Luo B, Grenier JK, et al. (2006): A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283–1298

- Moore CE, Omikorede O, Gomez E, Willars GB, Herbert TP (2011): PERK activation at low glucose concentration is mediated by SERCA pump inhibition and confers preemptive cytoprotection to pancreatic β -cells. *Mol Endocrinol* 25, 315–326
- Munro S, Pelham HR (1986): An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46, 291–300
- Mythri RB, Vali S, Bharath MMS: Oxidative Stress, Protein Damage. In: Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho K-H, Yokota H (Hrsg.): *Encyclopedia of Systems Biology*. Springer, New York, NY 2013, 1619–1620
- Osowski CM, Urano F (2011): Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol* 490, 71–92
- Perera LA, Rato C, Yan Y, Neidhardt L, McLaughlin SH, Read RJ, Preissler S, Ron D (2019): An oligomeric state-dependent switch in the ER enzyme FICD regulates AMPylation and deAMPylation of BiP. *EMBO J* 38, e102177
- Perera LA, Preissler S, Zaccai NR, Prévost S, Devos JM, Haertlein M, Ron D (2021): Structures of a deAMPylation complex rationalise the switch between antagonistic catalytic activities of FICD. *Nat Commun* 12, 5004
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslén LA, et al. (2000): Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752
- Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM (2019): The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem* 294, 2098–2108
- Preissler S, Chambers JE, Crespillo-Casado A, Avezov E, Miranda E, Perez J, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2015): Physiological modulation of BiP activity by trans-protomer engagement of the interdomain linker. *eLife* 4, e08961
- Preissler S, Rohland L, Yan Y, Chen R, Read RJ, Ron D (2017a): AMPylation targets the rate-limiting step of BiP's ATPase cycle for its functional inactivation. *Elife* 6, e29428
- Preissler S, Rato C, Perera L, Saudek V, Ron D (2017b): FICD acts bi-functionally to AMPylate and de-AMPylate the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nat Struct Mol Biol* 24, 23–29
- Rai R, Kennedy AL, Isingizwe ZR, Javadian P, Benbrook DM (2021): Similarities and Differences of Hsp70, hsc70, Grp78 and Mortalin as Cancer Biomarkers and Drug Targets. *Cells* 10, 2996
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281–2308
- Rehm H, Letzel T: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Springer, Berlin, Heidelberg 2016
- Römisch K (2005): Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 435–456

- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ (2006): Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins. *PLoS Biol* 4, e374
- Sanyal A, Chen AJ, Nakayasu ES, Lazar CS, Zbornik EA, Worby CA, Koller A, Mattoo S (2015): A Novel Link between Fic (Filamentation Induced by cAMP)-mediated Adenylation/AMPylation and the Unfolded Protein Response*. *Journal of Biological Chemistry* 290, 8482–8499
- Sengupta R, Poderycki MJ, Mattoo S (2019): CryoAPEX - an electron tomography tool for subcellular localization of membrane proteins. *J Cell Sci* 132, jcs222315
- Shamir ER, Ewald AJ (2014): Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 647–664
- Sotiriou C, Pusztai L (2009): Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 360, 790–800
- Storz P (2005): Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 10, 1881–1896
- Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M (2014): Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nat Commun* 5, 4153
- Truttmann MC, Wu Q, Stiegeler S, Duarte JN, Ingram J, Ploegh HL (2015): HypE-specific Nanobodies as Tools to Modulate HypE-mediated Target AMPylation. *J Biol Chem* 290, 9087–9100
- Wang M, Kaufman RJ (2014): The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer* 14, 581–597
- Wattanathamsan O, Chantaravisoot N, Wongkongkathep P, Kungsukool S, Chetprayoon P, Chanvorachote P, Vinayanuwattikun C, Pongrakhananon V (2023): Inhibition of histone deacetylase 6 destabilizes ERK phosphorylation and suppresses cancer proliferation via modulation of the tubulin acetylation-GRP78 interaction. *J Biomed Sci* 30, 4
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B (2008): A Multicolor Panel of Novel Lentiviral “Gene Ontology” (LeGO) Vectors for Functional Gene Analysis. *Molecular Therapy* 16, 698–706
- Wieteska L, Shahidi S, Zhuravleva A (2017): Allosteric fine-tuning of the conformational equilibrium poises the chaperone BiP for post-translational regulation. *eLife* 6, e29430
- Windhorst S, Fliegert R, Blechner C, Möllmann K, Hosseini Z, Günther T, Eiben M, Chang L, Lin H-Y, Fanick W, et al. (2010): Inositol 1,4,5-Trisphosphate 3-Kinase-A Is a New Cell Motility-promoting Protein That Increases the Metastatic Potential of Tumor Cells by Two Functional Activities. *J Biol Chem* 285, 5541–5554
- Won K-A, Spruck C (2020): Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol* 57, 1245–1261
- Woolery AR, Luong P, Broberg CA, Orth K (2010): AMPylation: Something Old is New Again. *Front Microbiol* 1, 113

- Worby CA, Mattoo S, Kruger RP, Corbeil LB, Koller A, Mendez JC, Zekarias B, Lazar C, Dixon JE (2009): The fic domain: regulation of cell signaling by adenylylation. *Mol Cell* 34, 93–103
- Xiao J, Worby CA, Mattoo S, Sankaran B, Dixon JE (2010): Structural basis of Fic mediated adenylylation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1004–1010
- Xu D, Liu Z, Liang M-X, Fei Y-J, Zhang W, Wu Y, Tang J-H (2022): Endoplasmic reticulum stress targeted therapy for breast cancer. *Cell Communication and Signaling* 20, 174
- Yang J, Nune M, Zong Y, Zhou L, Liu Q (2015): Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structure* 23, 2191–2203
- Yang J, Zong Y, Su J, Li H, Zhu H, Columbus L, Zhou L, Liu Q (2017): Conformation transitions of the polypeptide-binding pocket support an active substrate release from Hsp70s. *Nature Communications* 8
- Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, Grishin NV, Ball HL, Orth K (2009): AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* 323, 269–272
- Yoon S-B, Park Y-H, Choi S-A, Yang H-J, Jeong P-S, Cha J-J, Lee S, Lee SH, Lee J-H, Sim B-W, et al. (2019): Real-time PCR quantification of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) using a universal primer method. *PLoS One* 14, e0219978
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001): XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881–891
- Yuan J, Yao C, Tang J, Liu Y, Huang C, Yu S, Wei H, Han Y, Chen G (2021): Enhanced GRP78 protein expression via the IRE1 α /ASK1/p38 MAPK pathway during As₂O₃-induced endoplasmic reticulum stress in BEAS-2B cells. *Toxicology* 462, 152962
- Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen M-T, Poulsen HS (2007): Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cellular Signalling* 19, 2013–2023

13. Anlagen

13.1. Verwendete Gefahrstoffe

Jegliche mit Bakterien- oder Zellkultur kontaminierten Materialien wurden ordnungsgemäß autoklaviert und entsorgt. Der Flüssigabfall aus der Zellkultur wurde mit Natriumhypochlorit versetzt und zusätzlich autoklaviert.

Chemikalie	Gefahrensymbol	H- und P-Sätze
2-Propanol		H: 225, 319, 336 P: 210, 280, 305+351+338, 337+313
Acrylamid/Bis-Lösung, 30%		H: 302, 315, 317, 319, 340, 350, 361f, 372 P: 201, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 308+313
Ammoniumpersulfat (APS)		H: 272, 302, 315, 317, 319, 334, 335 P: 261, 280, 302+352, 305+351+338, 332+313, 337+313
Ampicillin		H: 317, 334 P: 261, 280, 302+352, 342+311
Dithiotreitol (DTT)		H: 302, 319, 315, 335 P: 280, 302+352, 305+351+338, 308+311
Essigsäure		H: 226, 314 P: 210, 280, 301+330+331, 303+361+353
Ethanol		H: 225, 319 P: 210, 233, 305+351+338
Ethidiumbromid		H: 302, 330, 341 P: 201, 260, 280, 304+340, 308+311
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)		H: 332, 373 P: 260, 314
Geneticindisulfat (G418)		H: 317, 334 P: 260, 302+352, 342+311
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung		H: 225, 301+311+331, 370 P: 210, 233, 280, 301+310,

		303+361+353, 304+340+311
Imidazol		H: 302, 314, 360D P: 202, 270, 280, 305+351+338, 310
Kohlenstoffdioxid		H: 280 P: 403

Methanol, reinst		H: 225, 301+311+331, 370 P: 210, 270, 280, 303+361+353, 304+340, 308+311
N, N, N', N'- Tetramethylethy- lendiamin (TEMED)		H: 225, 302+332, 314 P: 210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+361+338, 310
Natriumazid		H: 300+310+330, 373, 410 P: 270, 273, 280, 302+352, 304+340, 310
Natriumhydroxid (NaOH)		H: 290, 314 P: 233, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Natriumhypochlorit		H: 290, 314, 410 P: 273, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Paraformaldehyd (PFA)		H: 228, 302+332, 315-318, 335, 341, 350 P: 202, 210, 270, 280, 305+351+338, 308+313
Penicillin/ Streptomycin		H: 315, 317, 334, 335 P: 280, 261, 264, 284, 271, 302+352, 304+340, 333+313, 342+311, 312
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		H: 301, 314 P: 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Puromycin dihydrochlorid		H: 302
Salzsäure		H: 290, 314, 335 P: 280, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310
SERVA DNA Stain G		H: 315, 319 P: 280, 264, 362+364, 305+351+338, 337+313, 302+352

Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	 	H: 302, 315, 318, 412 P: 273, 280, 302+352, 305+351+338, 312
Strickstoff, flüssig		H: 281 P: 282, 336+315, 403
Triton-X-100	  	H: 302, 318, 411 P: 270, 273, 280, 305+351+338, 310
β -Mercaptoethanol	   	H: 301+331, 310, 315, 317, 318, 373, 410 P: 273, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 310

H-Satz**Gefahrenhinweise**

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H272	Giftig bei Verschlucken.
H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H281	Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H300+H310+H330	Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
H301	Giftig bei Verschlucken.
H301+H331	Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.
H301+H311+H331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H302+H332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (bei Exposition).
H350	Kann Krebs erzeugen (bei Exposition).
H350i	Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H370	Schädigt die Organe (Auge).
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen (Atmungssystem) bei längerer oder wiederholter Exposition (bei Einatmen).
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P-Satz**Sicherheitshinweise**

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.

P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie an- deren Zünd-quellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P260	Staub nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Augenschutz tragen.
P282	Schutzhandschuhe mit Kälteisolierung und zusätzlich Gesichtsschild oder Augenschutz tragen.
P284	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P301+P310	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/ Arzt anrufen.
P301+P312	BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P301+P330+P331	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P303+P361+P353	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P304+P340	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P304+P340+P311	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. GIFTINFORMATIONSZENTRUM/ Arzt anrufen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglich- keit entfernen. Weiterspülen.
P308+P310	BEI Exposition oder falls betroffen: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P308+P311	BEI Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzu-ziehen.
P310	Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P312	Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P332+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P336+P315	Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben. Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hin- zuziehen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342+P311	Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.

P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

13.2. FicD Knockout in MDA-MB-231

Mithilfe von CRISPR/Cas9 wurde ein Knockout Versuch FicDs in MDA-MB-231 gestartet. Bei diesem konnte ein Klon expandiert und sequenziert werden.

Diese zeigte eine Frameshift-Mutation an Aminosäure 230 des FicD Gens auf. Diese Mutation führte zu neu codierten Bereichen in der Fic-Domäne und einem vorzeitigem Translationsstopp. Die Strukturvorhersagen in zeigen das Vorhandensein der Transmembrandomäne eine TPR-Region inkongruente Bereiche in der FicD-Domäne.

Bei der Überprüfung des AMPylierungs Status BiPs zeigte sich ein um ca. 50% abgeschwächtes Signal im Vergleich zur Kontrolle.

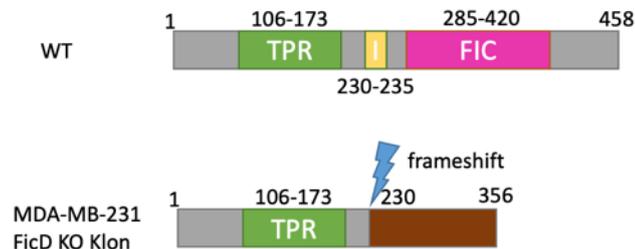


Abb. 20 Schematische Darstellung des FicD Gens in WT und FicD Mutanten. Dargestellt sind relevante Abschnitte, Tetratricopeptide Repeat Motiv (TPR, grün), Inhibitions- (I, gelb) und Fic-Motiv (pink). Die neu codierten Abschnitte nach den frameshifts sind braun hervorgehoben.

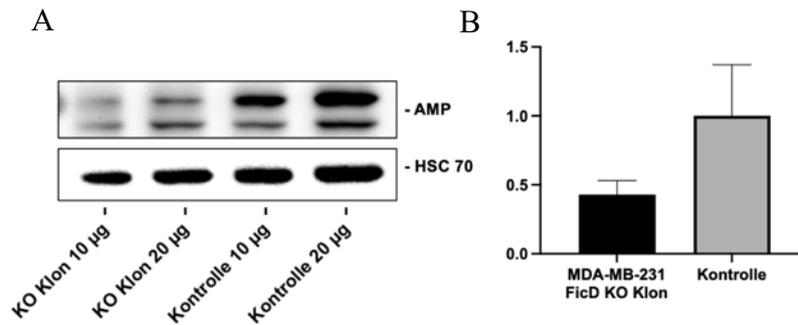


Abb. 22 AMPylierung Status und Proliferation FicD KO Klon MDA-MB-231. (A) WB mit anti-AMP-AK. Als endogene Kontrolle wurde HSC-70 verwendet. (B) Quantitative Auswertung des AMP-Blots. Normalisiert wurde auf die jeweilige HSC-70 Expression in der Zellprobe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. (C) Absorptionsmessungen im MTS-Assay über vier Tage. Das Experiment erfolgte in drei voneinander unabhängigen Versuchen. Jede Messung erfolgte in Triplikaten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Normalisierung erfolgte auf den Anwachstag nach 24 h.

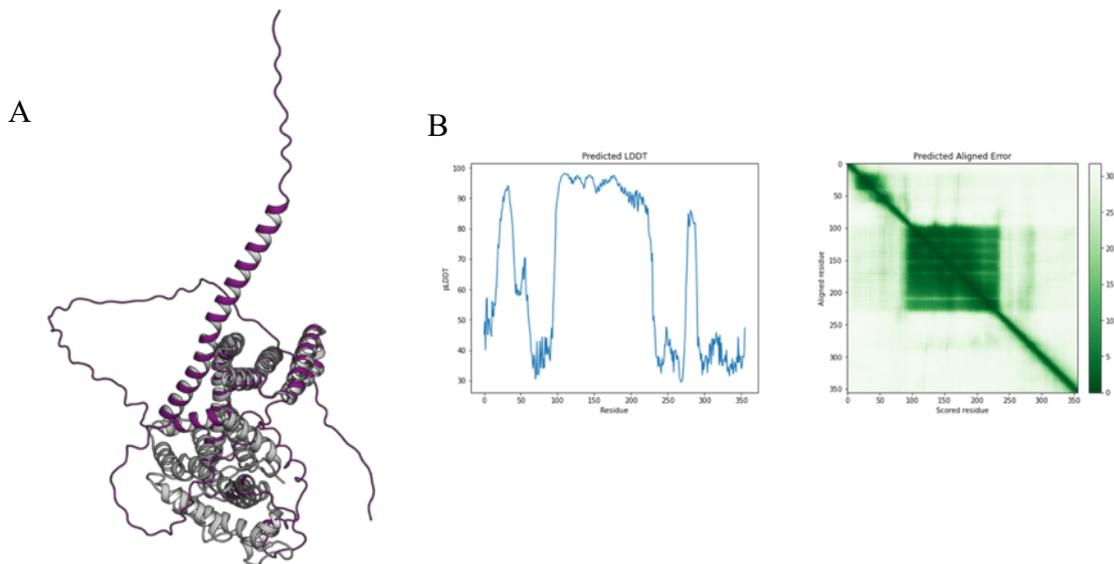


Abb. 21 Strukturvorhersagen der FicD-KO Mutante zeigen Fehlen der Fic-Domäne. Die mit Alphafold berechneten Strukturvorhersagen der FicD KO Mutante (links, türkis) mit angelagerter FicD-Kristallstruktur (grau, PDB: 6i7j). Die angelagerte Kristallstruktur FicDs visualisiert den fehlenden Enzymteil. (B) Qualitäts- und Wahrscheinlichkeitsparameter der Alphafold Strukturvorhersagen. Links die per-residue confidence metric (pLDDT), welcher die Konfidenz der Strukturberechnung der einzelnen AS angibt und der Predicted Aligned Error, welcher Konfidenzen der größeren Topografie und Domänen betrachtet. Regionen mit pLDDT > 70 gelten als verlässliche Vorhersage, während Regionen mit Scores zwischen 50-70 mit Vorsicht zu analysieren sind. Regionen mit pLDDTs < 50 sollten nicht interpretiert werden. (

13.3. Vektorkarten

Alle Vektorkarten wurden mit SnapGene erstellt. Die zur Klonierung und Sequenzierung verwendeten Primer werden in lila dargestellt.

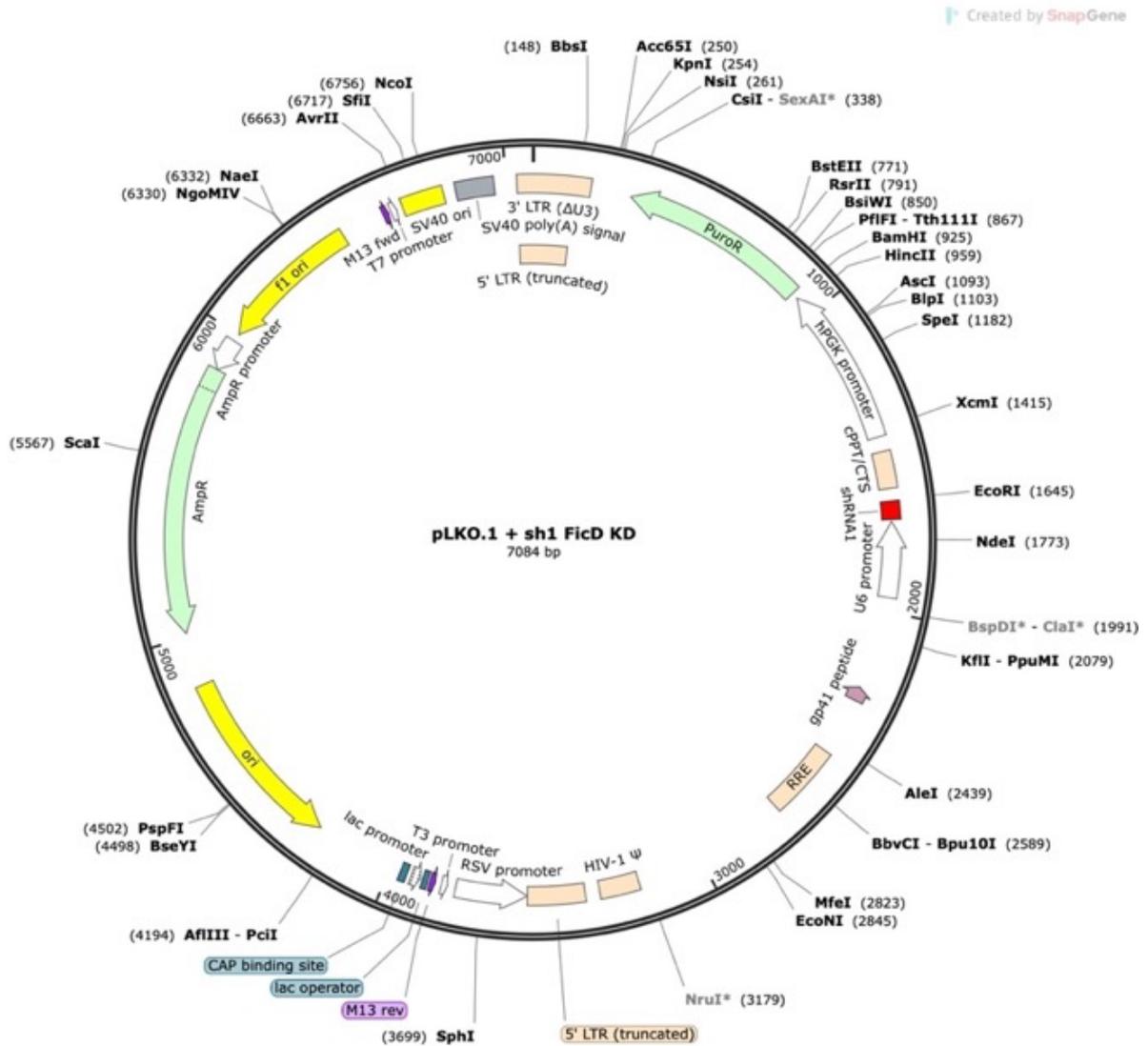


Abb. 23 pLKO.1 sh1 FicD KO Plasmid. Darstellung ist das pLKO 1 + sh1 FicD KD Plasmid, mit versehener sh1 shRNA aus Tabelle 7.

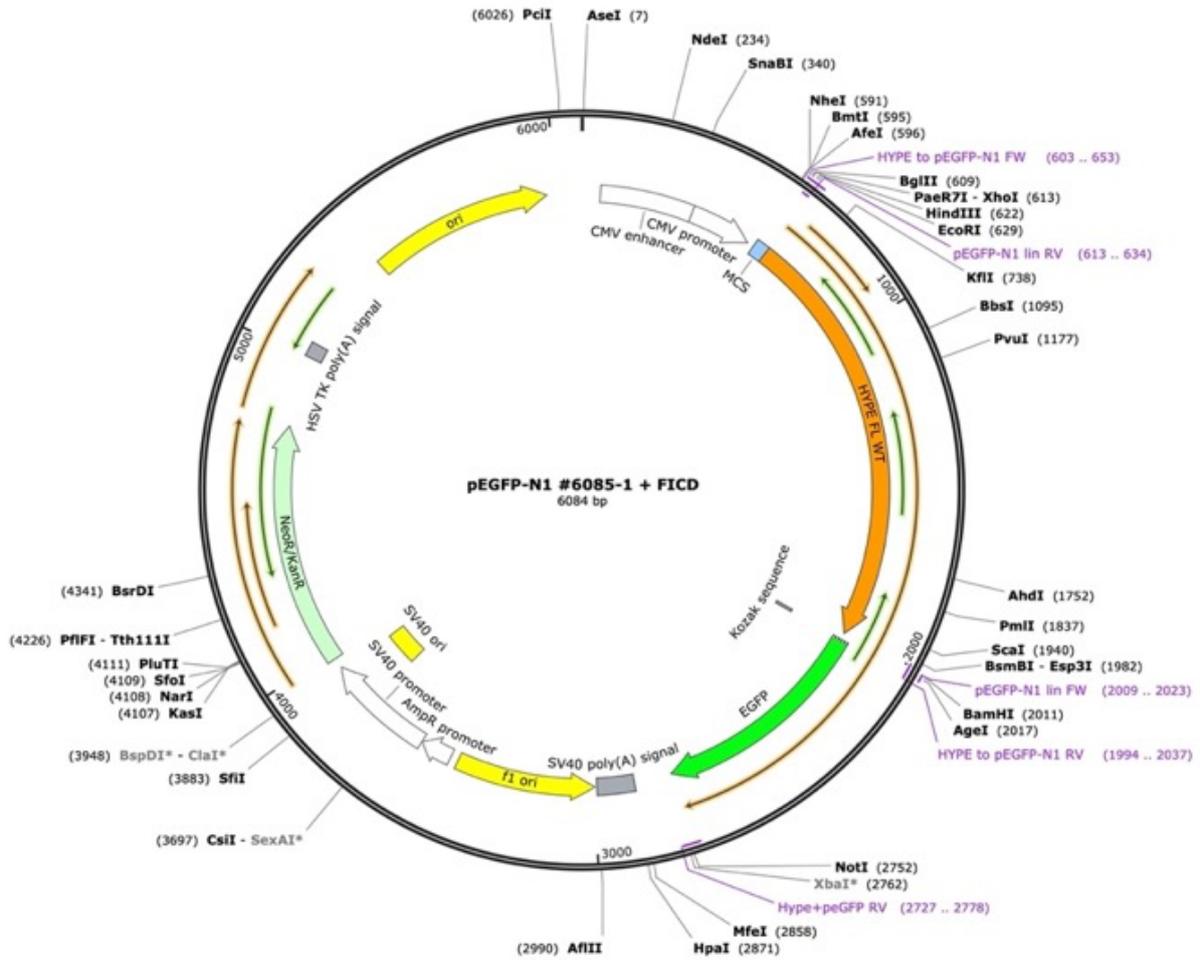


Abb. 24 pEGFP-N1 +FicD Plasmid. Darstellung des pEGFP-N1 #6085-1 + FicD Vektors, linearisiert mit pEGFP-N1 lin Primern, und über SLIC Reaktion mit FicD-GFP Insert versehen. Die Primer sind in lila dargestellt.

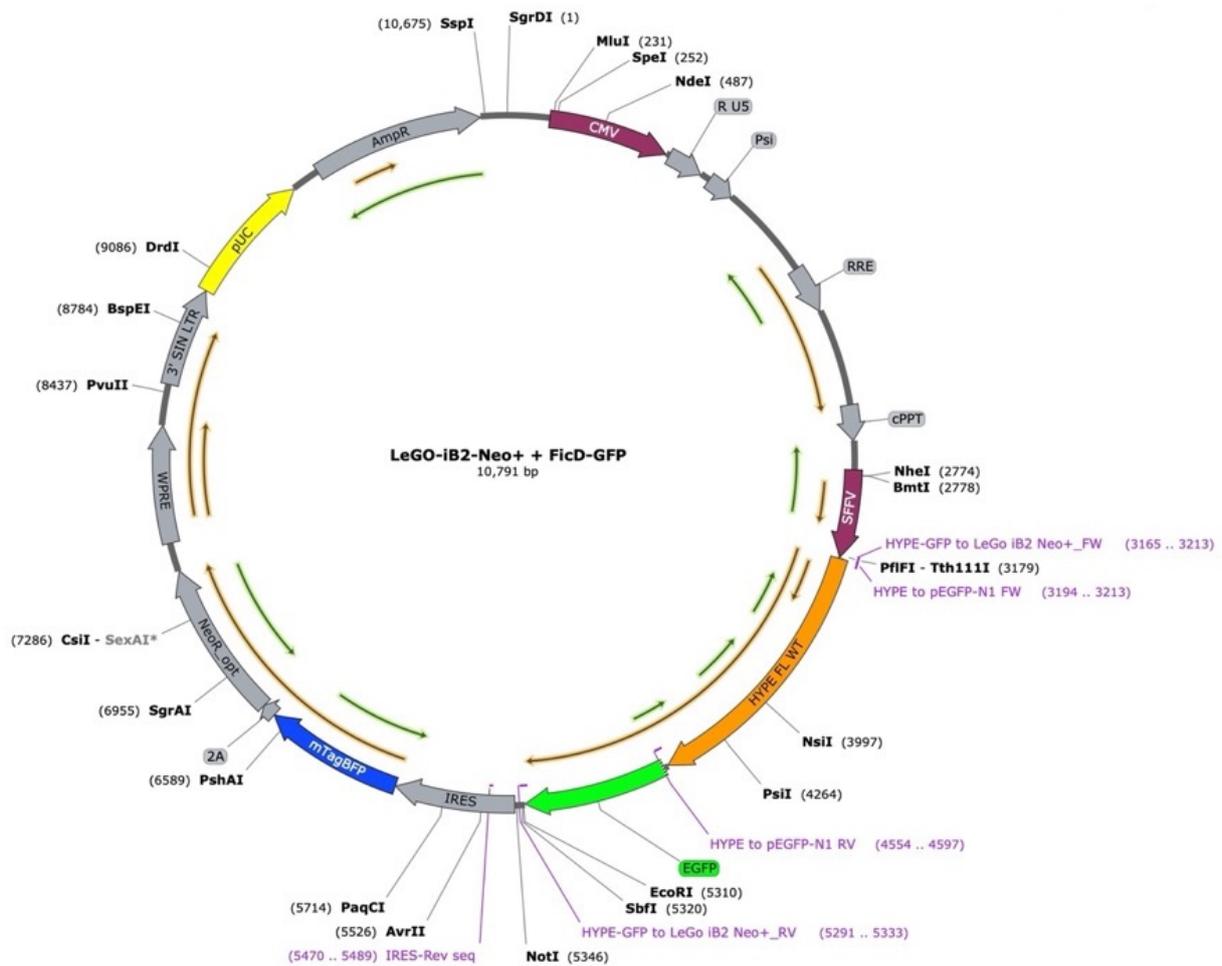


Abb. 25 LeGO-iB2-Neo+ FicD-GFP Plasmid. LeGO iB2-Neo+ FicD-GFP Plasmid, analog zum LeGO-iB2- Neo+ GFP-Plasmid kloniert, nur statt GFP mit dem FicD-GFP versehen. Die verwendeten Primer sind lila dargestellt.

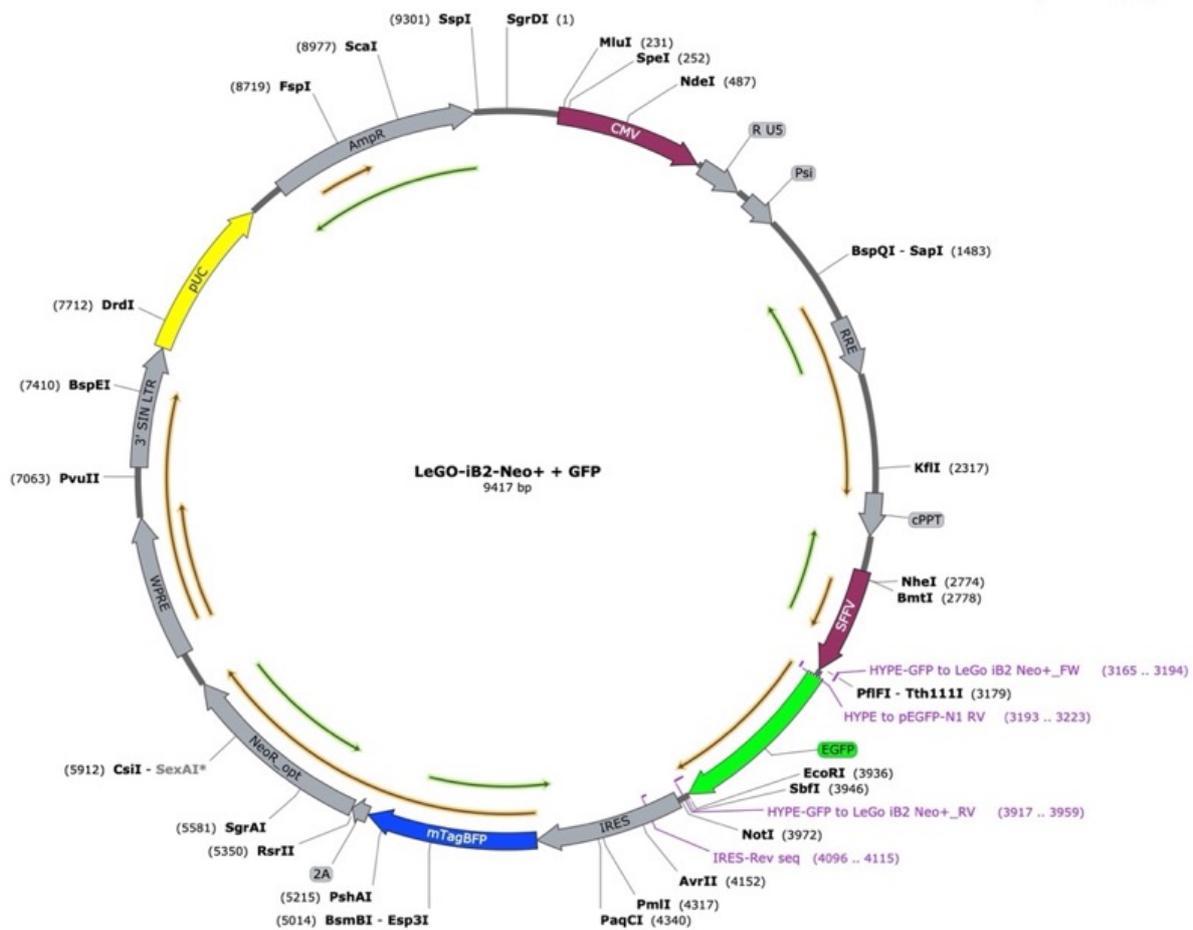


Abb. 26 LeGO-iB2-Neo+ GFP Plasmid. Dargestellt ist das LeGO-iB2-Neo+ GFP Plasmid, geschnitten mit EcoR1 und BamH1. Das HYPE-GFP Insert wurde aus pEGFP Plasmid amplifiziert und mit BamH1 geschnitten. Das GFP-Insert wurde mittels Hype-GFP to LeGO Primern mittels T4 Reaktion kloniert. Die dazu verwendeten Primer sind lila dargestellt.

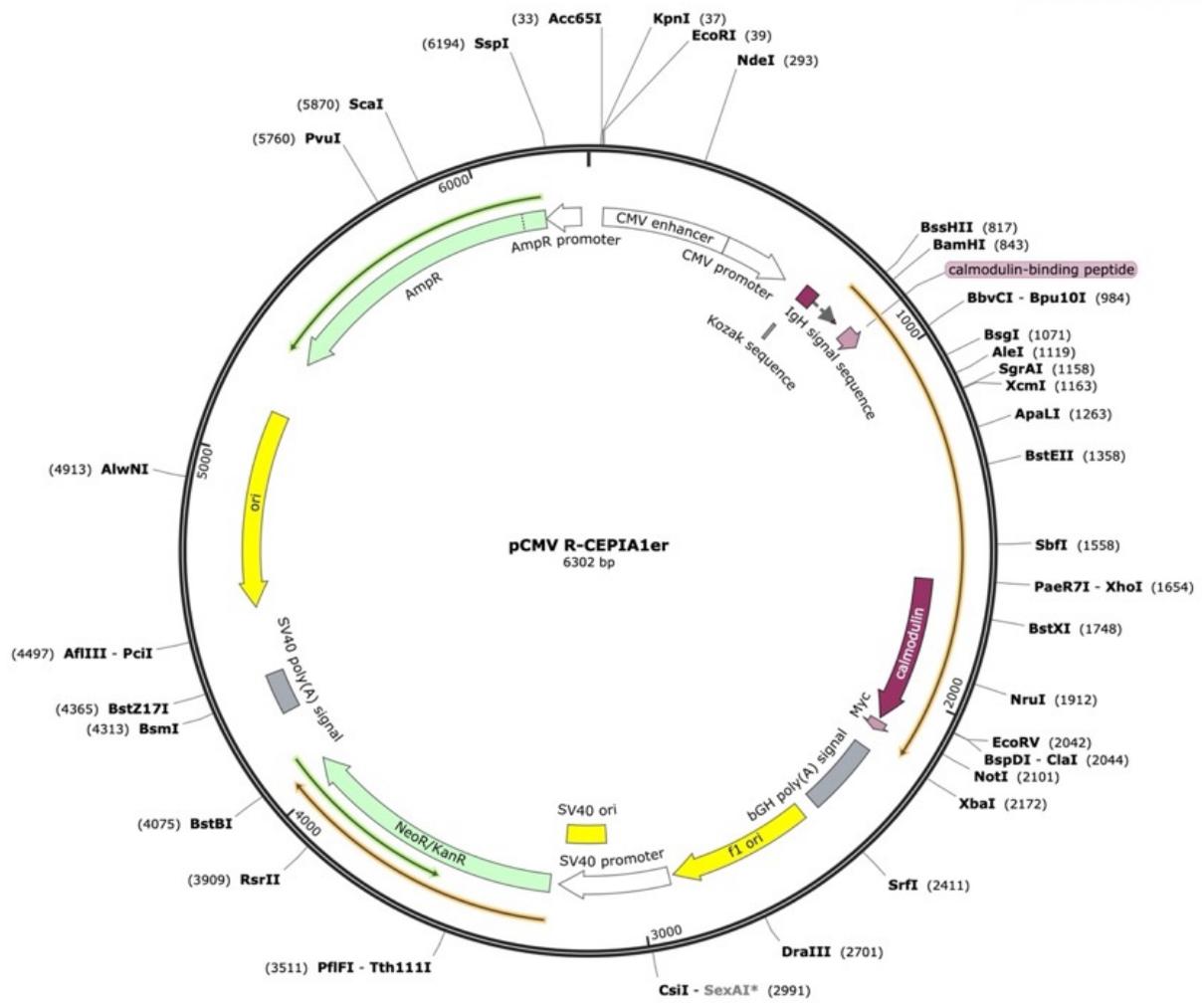


Abb. 27 pCMV R-CEPIA1er Plasmid. Dargestellt ist das pCMV R-CEPIA1er Plasmid, welches für einen ER-Marker codiert.

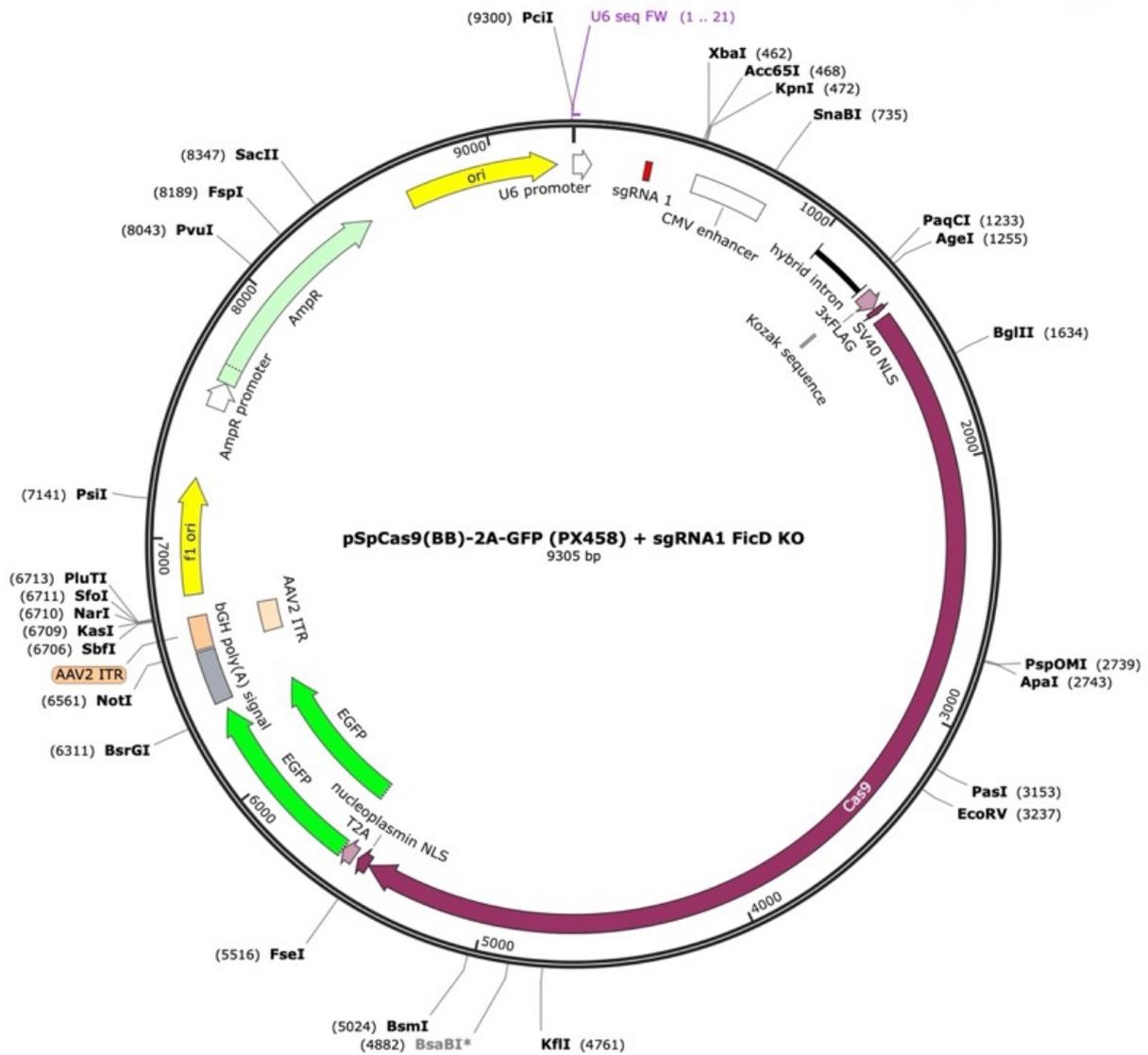


Abb. 28 pSpCas (BB)-GFP (PX458) + sgRNA1 FicD KO. Darstellung von pSPCas (BB)-GFP versehen mit sgRNA1 mit FicD KO Eigenschaften. Das Plasmid wurde mit Bpil geschnitten und mit der sgRNA und der T4 Ligase ligiert.

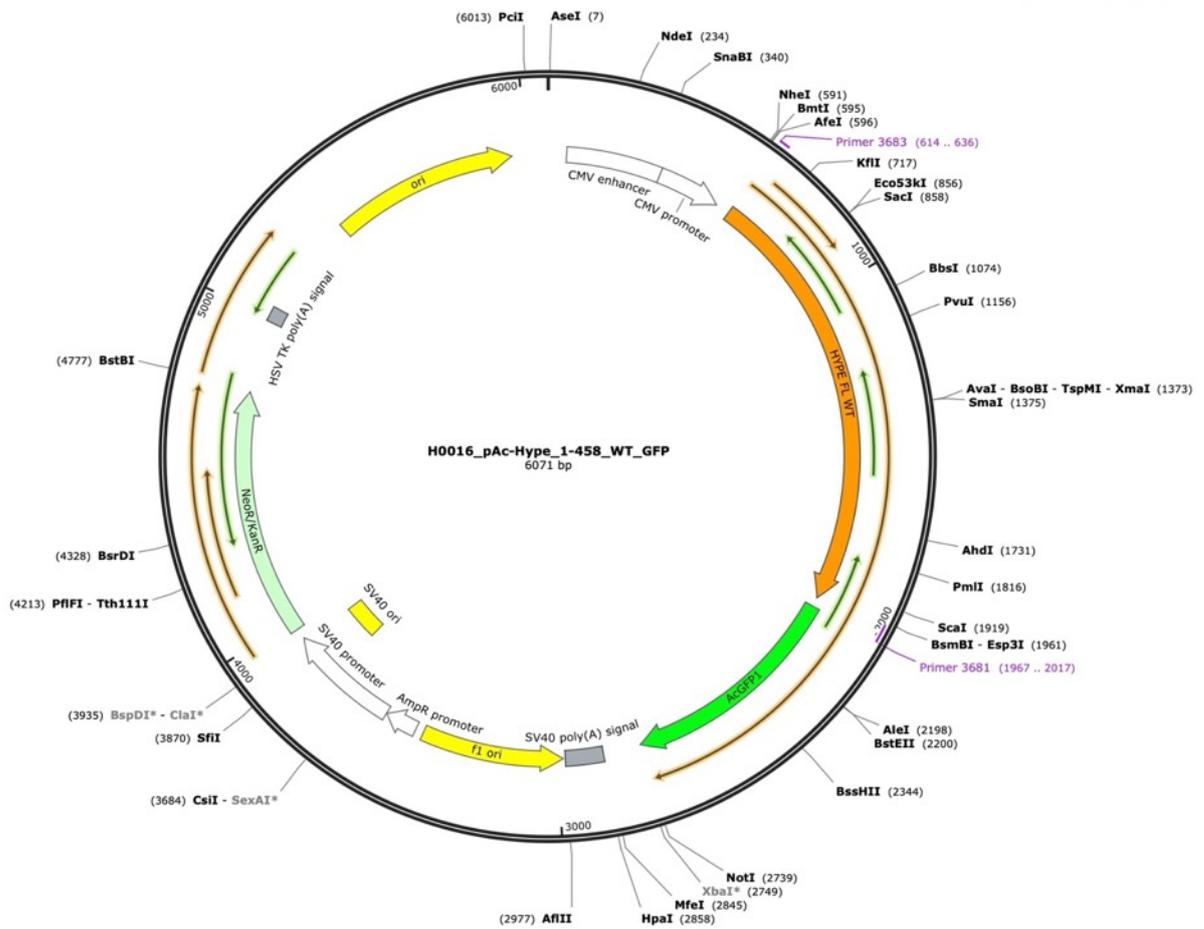


Abb. 29 LeGO-IB2-Neo⁺ FicD-GFP Plasmid. LeGO iB2-Neo⁺ FicD-GFP Plasmid, analog zum LeGO-iB2- Neo⁺ GFP-Plasmid kloniert, nur statt GFP mit dem FicD-GFP versehen. Die verAbb. 13 LeGO-iB2-Neo⁺ GFP Plasmid. Dargestellt ist das LeGO-iB2-Neo⁺ GFP Plasmid, geschnitten mit EcoR1 und BamH1. Das HYPE-GFP Insert wurde aus pEGFP Plasmid amplifiziert und mit BamH1 geschnitten. Das GFP-Insert wurde mittels Hype-GFP to LeGO Primern mittels T4 Reaktion kloniert. Die dazu verwendeten Primer sind lila dargestellt.

14. Danksagung

Während meiner Labor- und Schreibphase haben mir viele Menschen große Unterstützung, Inspiration und emotionalen Beistand geleistet. Allen voran meine Doktormutter Sabine Windhorst, die mich an das FicD-Thema heranführte und sich regelmäßig die Zeit nahm, den Stand aktueller Laborarbeiten abzufragen und den zukünftigen Plan für Experimente zu erstellen. Nur weil ihre Tür immer für mich offenstand, ließen sich auch die kompliziertesten Probleme gemeinsam lösen. Das galt auch für meine Betreuerin Stefanie Muhs, die sich insbesondere die Zeit nahm, mir neben den grundlegendsten Fragen der Molekularbiologie auch bei der Umsetzung der Laborexperimente und Problemlösungen zu helfen. Auch in der langwierigen Auswertungs- und Korrekturphase konnte ich immer auf sie zählen.

Im praktischen Laboralltag bin ich Christine zu allergrößtem Dank verpflichtet! Die Engelsgeduld, die sie an den Tag legte, als sie mich als Laborneuling in die Laborpraxis einführte und auch über meine gesamte Laborzeit immer ein Ohr und schnelle Antworten für mich hatte, werde ich nie vergessen. Ebenso danke ich allen Mitgliedern der AG Itzen für die lehrreiche Zeit, die ich bei euch und in euren Laboren verbringen durfte. Meine Zeit bei euch ist mir sehr angenehm in Erinnerung geblieben, sei es von den interessanten Journal-Clubs über die entspannten Mittagspausen bis zum kulinarischen gemeinsamen Crêpe-Abend. Auch Themis, Christian, Daniel und Miriam möchte ich danken. Nicht nur, dass ihr mir bei vielen, auch AG-übergreifenden Tätigkeiten helfen konntet, sondern auch für die großartige Gesellschaft, die in den Pausen für Entspannung sorgte.

Letitia Oliveira-Ferra danke ich für die Bereitstellung der CRISPR/Vektoren, des Protokolls und die schnellen Antworten auf all meine Fragen bei meinen Klonierungen. Ich danke Björn aus der AG Guse für die großartige Hilfe bei den ER-Trackern und der Bereitstellung der CEPIA-ER-Vektoren sowie bei der späteren Auswertung mit Fiji. Bei der vielen Zeit, die ich am Fluoreszenzmikroskop verbrachte, war ich sehr froh, dass ich auf Bernd aus der UMIF zählen konnte, der jedes zunächst dramatisch anmutende Problem schnell zu entschärfen wusste.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meiner Mutter Jessica, meinem Bruder Jacob, Johannes und meinem Großvater, dass ihr mir stets seelischen Beistand geleistet habt und mit der Zeit auch großes Feingefühl besaßt, wann es besser war, nicht nach dem Fortschritt dieser Arbeit zu fragen. Ohne euch hätte ich diese Arbeit vielleicht nicht zu Ende gebracht. Danke!

15. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: 