

**Die Bedeutung von Sec16 alternativem Spleißen für
den COPII vermittelten Proteintransport in T-Zellen.**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ilka Wilhelmi

aus Bad Wildungen

Dezember 2015

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Florian Heyd vom 01.09.2011 bis 30.10.2013 am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) in Marburg an der Lahn, und seit dem 01.11.2013 am Fachbereich BCP der Freien Universität Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Florian Heyd
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl

Disputation am 26.02.2016

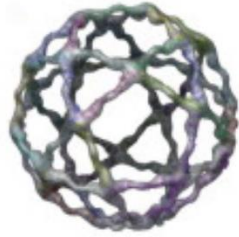


Abbildung aus (Faini et al, 2013)

Zusammenfassung

Spleißen ist neben 5'-Capping und 3'-Polyadenylierung ein wichtiger Punkt im Lauf der Prozessierung eukaryotischer prä-mRNA. Nichtkodierende Introns werden von der prä-mRNA entfernt und kodierende Exons fusioniert. Doch eine prä-mRNA kann in weitaus mehr als einem Protein resultieren, was durch alternatives Spleißen ermöglicht wird. Über 90 % aller humanen Proteinkodierenden Gene unterstehen diesem Prozess, der zelltyp- bzw. gewebs- und differenzierungsspezifisch ist. Signal-induziertes alternatives Spleißen ist eine Möglichkeit, die Genexpression in Anpassung an Änderungen im physiologischen Umfeld zu regulieren. Der Prozess der T-Zell Aktivierung ist diesbezüglich ein Modellsystem, in dem weit über 100 Exons als alternativ gespleißt identifiziert werden konnten. Wie diese Änderungen im Spleiß-Verhalten zur Funktionalität aktivierter T-Zellen beitragen, konnte jedoch noch nicht hinreichend gezeigt werden.

Die T-Zell Aktivierung ist ein komplexer und dynamischer Prozess, der in der aktivierten Zelle u.a. zu einer stark erhöhten Produktion und Sekretion von Effektormolekülen wie Zytokinen und Zytotoxinen führt. Hierfür wird angenommen, dass sich der Sekretionsapparat an die höhere Transportlast anpasst. Wie dies geschieht, ist indes nicht bekannt.

Proteinsekretion beginnt an ribosomfreien Stellen des ER, den ER *exit sites* (ERES), wo neu synthetisierte Proteine in COPII-Vesikel für ihren Transport verpackt werden. Sec16 ist ein peripheres Membranprotein an den ERES und maßgeblich in den Prozess der Vesikelbildung und -abschnürung involviert. Ein in Metazoen konservierter Bereich von ca. 220 Aminosäuren im C-Terminus des Proteins, die C-Terminale konservierte Domäne (CTD) wird u.a. von zwei Exons kodiert (E29 und E30), die nach T-Zell-Aktivierung alternativ gespleißt werden.

Diese Arbeit kombiniert biochemische und zellbiologische Methoden, um die funktionelle Relevanz Sec16 Spleißens in der T-Zell Aktivierung zu untersuchen. Initiale Experimente zeigen, dass aktivierte T-Zellen eine erhöhte Sekretionseffizienz aufweisen, die möglicherweise durch eine erhöhte Anzahl an COPII-Vesikeln ermöglicht wird. Durch Manipulation des Spleißverhaltens in einer humanen T-Zell Linie und Etablierung Sec16E29 defizienter Hek293 Zellen mittels Crispr/Cas9 wird gezeigt, dass alternatives Sec16 Spleißen für die Zunahme an COPII-Vesikeln und der Transporteffizienz notwendig ist. Dies wird durch Versuche mit primären humanen PBMCs unterstrichen. Coimmunopräzipitationen belegen eine differenzielle Interaktion der alternativen Sec16 CTDs mit anderen COPII-Proteinen.

Zusätzlich zeigen FRAP-Experimente, dass sich der COPII Turnover in Abhängigkeit von Sec16 Spleißen verändert.

Diese Arbeit beschreibt die Funktionalität eines Signal-induzierten Spleißvorgangs und schlägt eine neue Form der Regulation im COPII-vermittelten sekretorischen Apparat vor.

Summary

Beside 5'-capping and 3'-polyadenylation, splicing is one major step during eukaryotic pre-mRNA processing. Noncoding introns are removed from the pre-mRNA and coding exons are fused. Due to alternative splicing one single pre-mRNA can result in far more than one protein. Over 90 % of the human protein coding genes undergo this process which acts in a cell type, tissue and differentiation dependent manner. Signal-induced alternative splicing is one possible mechanism to control gene expression due to changes in cellular conditions. In response to T-cell activation hundreds of exons were shown to be alternatively spliced, however, how these splicing switches impact on cellular functionality is largely unknown.

T-cell activation is a complex and dynamic process leading, amongst others, to dramatic changes in the production and secretion of effector molecules. Therefore, an increase of the protein secretion capacity seems required. However, how this is achieved remains unknown. Protein secretion starts at special sites of the ER, so called ER exit sites (ERES), where newly synthesized proteins are packed in COPII-coated vesicles for further transport. Sec16 is a peripheral membrane protein at these ERES and necessary for vesicle formation and budding. A part of approximately 220 amino acids in the C-terminal part of the protein, the C-terminal conserved domain (CTD), which is conserved in metazoans, is amongst others encoded by two exons (E29 and E30) that are alternatively spliced upon T-cell activation.

This work combines biochemical and cell biological methods to analyse the functional relevance of Sec16 alternative splicing upon T-cell activation. Initial experiments show that activated T-cells have a higher secretion efficiency that might be facilitated by a higher number of COPII coated vesicles. Manipulation of the splicing pattern in a human T-cell line and generation of Sec16E29 deficient Hek293 cells using Crispr/Cas9 show that splicing of Sec16 is required for the increase of COPII coated vesicles and the higher export efficiency. This is underlined by experiments using primary human PBMCs. Coimmunoprecipitations prove a differential interaction of the alternative Sec16-CTDs with other COPII proteins. Additionally FRAP experiments show that COPII Turnover is altered due to Sec16 alternative splicing.

This work describes the functional impact of a signal induced splicing switch and provides a new regulatory mechanism for COPII mediated protein secretion.

I. Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
I. Inhaltsverzeichnis	7
II. Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	11
1.1 mRNA Prozessierung	11
1.2 Alternatives Spleißen	13
1.3 T-Zell Aktivierung.....	16
1.4 Das Sekretorische Transportsystem.....	19
1.5 Zielsetzung	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren	26
2.1.1 RNA-Extraktion	26
2.1.2 RT-PCR und RT-qPCR.....	26
2.1.3 Erstellung von Expressionskonstrukten.....	27
2.2 Zellkultur	28
2.2.1 Kultivierung und Transfektion humaner Jsl1 Zellen	28
2.2.2 Kultivierung und Transfektion humaner Hek293 und HeLa Zellen	28
2.2.3 Gewinnung, Kultivierung und Transfektion primärer humaner PBMCs.....	29
2.3 Methoden zur Protein-Analyse	29
2.3.1 Gesamtzellextrakte.....	29
2.3.2. Coimmunopräzipitation	29
2.3.3 SDS- und NUPAGE®	30
2.3.4 Western-Blot.....	30
2.4 Mikroskopie und zugehörige Methoden	31
2.4.1 Erstellung von Immunfluoreszenzpräparaten	31
2.4.2 Konfokale-Laser-Scanning Mikroskopie.....	31
2.4.3 Bildanalyse mit ImageJ	31
2.4.4 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)	32
2.5 Sonstige Methoden.....	33
2.5.1 Exportassay	33
2.5.2 Durchflusszytometrie	34
2.5.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	34
2.5.4 Statistische Berechnungen	35
3. Ergebnisse	36

3.1 Sec16 wird während der T-Zell Aktivierung alternativ gespleißt.....	36
3.2 Überexpression der Sec16-CTD wirkt sich negativ auf die Golgi-Morphologie aus	42
3.3 Aktivierte T-Zellen weisen eine erhöhte Effizienz im anterograden Transport und eine erhöhte Anzahl von COPII Vesikeln auf	46
3.4 Sec16 E29 vermittelt die Stimulations-induzierte Zunahme von COPII Vesikeln in T-Zellen...	52
3.5 Sec16 Exon 29 reguliert die Effizienz des anterograden Proteintransports	55
3.6 Sec16 Spleiß-Isoformen zeigen ein differentielles Interaktionsmuster mit anderen COPII-Proteinen.....	59
3.7 Sec16 E29 hat eine regulatorische Funktion im sekretorischen Apparat humaner primärer T-Zellen.....	62
3.8 Deletion von Sec16 Exon 29 führt zu Defekten in der COPII Vesikelbildung und im anterograden Transport	65
4. Diskussion	73
4.1 Alternatives Spleißen und T-Zell Aktivierung	73
4.2 Proteintransport in T-Zellen	75
4.3 Physiologische Relevanz	77
4.4 Rolle von Sec16 im anterograden Transportweg	78
4.5 Sec 16 als spleiß-regulierte Protein-Protein Interaktionsdomäne – Ein Modell	80
4.6 Ausblick	81
5. Literaturverzeichnis	85
III Anhang	93
A. Tabellen	93
B. Alignment	97
C. Lebenslauf.....	98
D. Danksagung	103
E. Abbildungsverzeichnis	104
F. Tabellenverzeichnis	106
G. Bescheinigung.....	107

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	FRAP	<i>fluorescence recovery after</i>
Δ	Delta		<i>Photobleaching</i>
μg	Mikrogramm	GFP	grün fluoreszierendes Protein
μl	Mikroliter	GM130	Golgi-Matrix-Protein von 130 kDa
μm	Mikrometer	GTP	Guanosintriphosphat
ActD	Actinomycin D	HeLa	Henrietta Lacks
Abb	Abbildung	Inkl	Inklusion
AS	Aminosäure	Hek	<i>human embryonic kidney</i>
Bp	Basenpaar(e)	hnRNPL	heterogenes nukleäres
BSA	<i>bovine serum albumin</i>		Ribonukleoprotein
ca	circa	IL	Interleukin
CCD	<i>central conserved domain</i>	mRNA	messenger RNA
CD	cluster of antigen	MO	Morpholino
CHX	Cycloheximid	kDa	Kilodalton
COPII	<i>coat protein complex II</i>	KDEL	Lysin-Asparagin-Glutamin-
CTD	C-Terminale-Domäne		-Leucin
DMSO	Dimethylsulfoxid	Ko	Kontroll-
DMEM	<i>Dulbecco's Modified</i>	LV	Leervektor
	<i>Eagles's medium</i>	min	Minute(n)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain</i>
EndoH	Endoglykosidase H		<i>-enhancer of activated B-cells</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum	nm	Nanometer
ERES	ER <i>exit sites</i>	Nt	Nukleotid(e)
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate</i>	PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear</i>
	<i>compartment</i>		<i>cells</i>
et al.	et alii	PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
Exkl	Exklusion	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
	<i>assay</i>	RT	Reverse Transkription
FACS	<i>fluorescence activated cell</i>	rpm	<i>rotation per minute</i>
	<i>sorting</i>	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate</i>

GDP	Guanosindiphosphat		Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek	Sekunde(n)	UTR	<i>untranslated region</i>
sgRNA	single guide RNA	VSVG	Vesikuläres-Stomatitis-
siRNA	<i>small interfering RNA</i>		Virus-Glykoprotein
Stdn	Stunden	VL	volle Länge
ts	Temperatur sensitiv	WT	Wildtyp
U2AF	<i>U2-auxiliary factor</i>		

1. Einleitung

1.1 mRNA Prozessierung

Die Prozessierung eukaryotischer prä-mRNA im Zellkern ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer funktionellen mRNA, um im Anschluss im Zytoplasma translatiert werden zu können. Die Modifizierung des 5'-Endes durch ein m7-Guanosin und die Polyadenylierung des 3'-Endes, das bis zu 250 Nukleotide lang sein kann, sind wichtig für die Stabilität und den Transport der mRNA aus dem Nukleus. 5'-Cap und Poly-A-Kette tragen zusätzlich eine zentrale Funktion in der Initiation der Translation (Preiss & Hentze, 1998). Neben den beschriebenen Modifikationen der beiden mRNA-Enden werden nichtkodierende Bereiche (Introns) aus dem Primärtranskript entfernt und die Enden kodierender Bereiche (Exons) fusioniert. Dieser Spleißen genannte Prozess verläuft cotranskriptionell und ist essentiell für die Reifung eukaryotischer mRNA (Abb. 1.1) (Tilgner et al, 2012). Nach Abschluss der Prozessierung wird die reife mRNA in Form eines *messenger* Ribonukleoproteinkomplex (mPNP) durch den Porenkomplex der Zellkernhülle (engl. *nuclear pore complex*, NPC) in das Zytoplasma exportiert, wo an Ribosomen die Translation stattfinden kann (Carmody & Wentz, 2009).

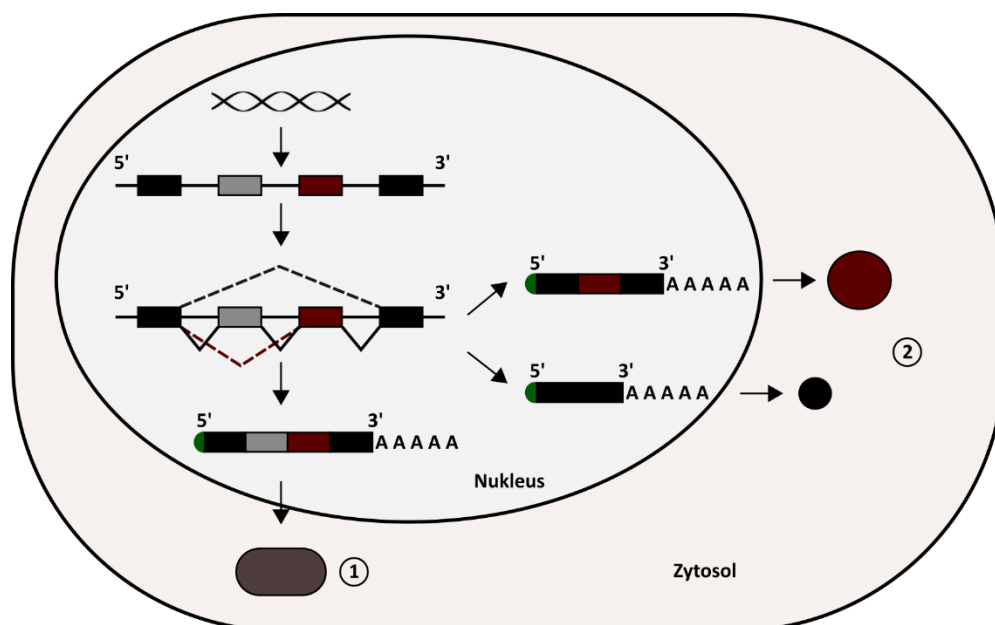


Abbildung 1. 1 Verschiedene Mechanismen der mRNA Prozessierung.

Abb.1.1 ff. Während der Transkription entsteht mit der prä-mRNA in 5'-3'-Orientierung eine komplementäre Kopie des genomischen 3'-5'-DNA-Strangs, die anstelle von Thymin Uracil enthält. Das 5'-Ende wird durch ein zusätzliches m7-Guanosin, das 3'-Ende durch eine Poly-A-Kette modifiziert. Nach Entfernung der Introns und Fusion der Exons, Spleißen, wird die reife mRNA in das Zytosol exportiert, wo sie translatiert wird (1). Die variable In- und Exklusion von Exons (alternatives Spleißen), führt zur Synthese verschiedener Proteine, die aus einer prä-mRNA entstehen können (2).

Das während dem Spleißvorgang zu entfernende Intron trägt Sequenzmerkmale an beiden Enden, den Spleiß-Stellen (Abb. 1.2). Die 5'-Spleiß-Stelle ist durch ein GU-Dinukleotid, die 3'-Spleiß-Stelle durch AG markiert. Zwischen den Spleiß-Stellen liegen der durch ein Adenosin (A) repräsentierte Verzweigungspunkt und der Polypyrimidintrakt (Py). Der Spleiß-Vorgang verläuft in zwei Transesterifizierungs-Schritten (Will & Luhrmann, 2011). Zuerst entsteht zwischen der 2'-OH-Gruppe des Verzweigungspunktes und der Phosphatgruppe der 5'-Spleiß-Stelle eine Phosphodiesterbindung, wodurch die Bindung zwischen dem ersten Exon (E1) und Intron gelöst wird und das Intron in einer „Lasso“ genannten Konformation vorliegt. In einem zweiten Schritt greift die 3'-OH-Gruppe des ersten Exons die Bindung zwischen der 3'-Spleiß-Stelle und zweitem Exon (E2) an. Abschließend werden 5'-Ende von Exon eins und 3'-Ende von Exon zwei ligiert und das Intron in seiner Lasso-Form entfernt (Reed & Maniatis, 1985; Ruskin et al, 1984).

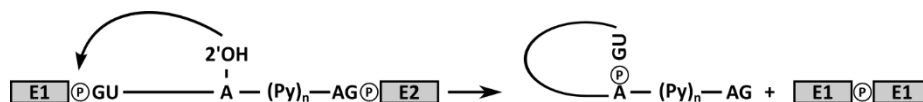


Abbildung 1. 2 Schematische Darstellung des mRNA Spleißens. Entfernung des Introns unter Bildung einer Lasso-Struktur und Ligation zweier Exons (graue Kästen: Exon1 und Exon2).

Katalysiert wird dieser Prozess von einem makromolekularen Komplex, dem Spleißosom, das sich aus fünf Ribonukleinproteinen (Wahl et al, 2009) (engl. *small nuclear ribonucleoprotein*, snRNP) und zahlreichen Zusatzfaktoren zusammensetzt (Zhou et al, 2002). Die snRNPs besitzen u.a. jeweils ein namensgebendes Uridin-reiches RNA-Molekül: U1, U2, U4, U5 und U6, das wichtig für die Bindung der snRNPs an die prä-mRNA, die Interaktion der snRNPs untereinander und für die spätere Kataylse ist (Matera & Wang, 2014). Die Formation des Spleißosoms und der damit verbundene Spleiß-Vorgang erfolgen in einer regulierten Reihenfolge (Abb. 1.3).

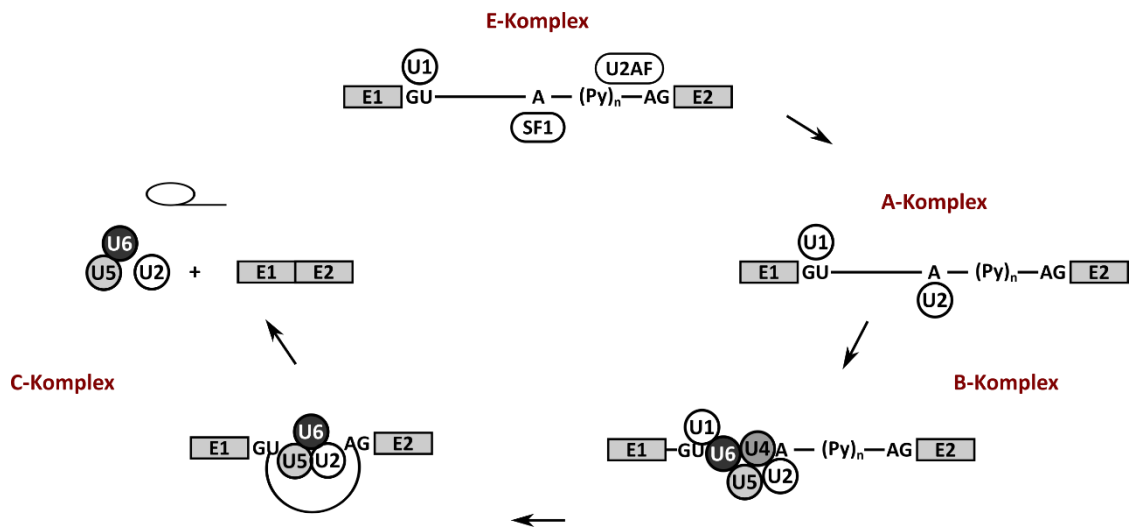


Abbildung 1. 3 Formation des Spleißosoms. Das Spleißosom formiert sich in mehreren Schritten am Intron der prä-mRNA. Dargestellt sind zwei Exons (graue Kästen), die ein Intron flankieren (schwarze Linie mit den angegebenen Signalsequenzen), die fünf snRNPs (U1-2 und U4-6), sowie die Zusatzkomponenten U2AF und SF1. Nach Ablauf des Spleiß-Vorgangs disassembliert der C-Komplex und lässt die reife mRNA und das in seiner Lassostruktur dargestellte Intron frei (Übersicht des Spleiß-Zyklus in Wahl et al, 2009).

Zuerst erfolgt die Definition des Introns durch Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleiß-Stelle, sowie Bindung des Spleiß-Faktors 1 (SF1) an den Verzweigungspunkt und Bindung des Heterodimers U2AF (engl. *auxiliary factor*, AF), bestehend aus U2AF35 und U2AF65, an den Polypyrimidintrakt und die 3'-Spleiß-Stelle. Dieser Komplex wird E-Komplex genannt (engl. *early*, E). Nach der Entfernung von SF1 von der mRNA erfolgt die Bindung des U2 snRNPs an den Verzweigungspunkt, wodurch der A-Komplex entsteht. Der A-Komplex geht durch Rekrutierung und anschließende Anlagerung des U4/5/6 snRNP-Trimers in den B-Komplex über. Durch Umstrukturierungen entsteht der katalytisch aktive C-Komplex (engl. *catalytic*, C), sodass der Spleiß-Vorgang stattfinden kann (Matera & Wang, 2014).

1.2 Alternatives Spleißen

Neben dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen konstitutiven Spleißen existieren durch die Verwendung verschiedener Spleiß-Stellen alternative Formen des Spleißens (Abb. 1.4). Dazu zählt die In- oder Exklusion von Kassetten-Exons, sich gegenseitig ausschließende Exons, und die Verwendung alternativer 5'- und 3'-Spleiß-Stellen. Alternatives Spleißen kann

auch zur Retention eines Introns in der reifen mRNA führen. Ferner können alternative 3'-Spleiß-Stellen in alternativer 3'-Polyadenylierung resultieren (Black, 2003).

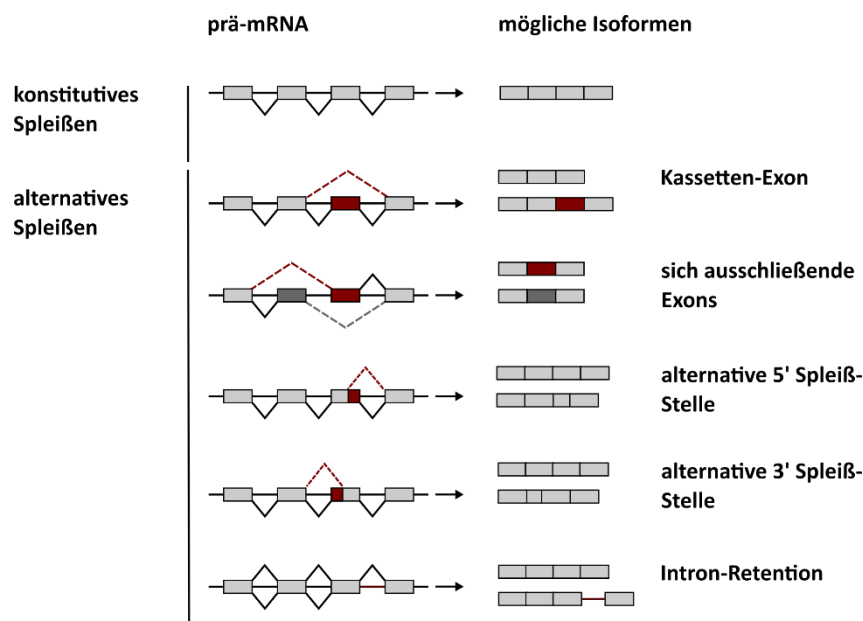


Abbildung 1. 4 Verschiedene Formen des prä-mRNA Spleißens. Neben dem konstitutiven Spleißen gibt es fünf alternative Formen: Kassetten-Exons werden entweder in die mRNA inkludiert oder exkludiert, sich ausschließende Exons sind zwei oder mehr aufeinander folgende Kassetten-Exons, von denen jeweils nur eines in die mRNA inkludiert wird, alternative 5'- und 3'-Spleiß-Stellen können die Sequenz eines Exons verlängern oder verkürzen. Exons sind als Rechtecke dargestellt, Introns als durchgezogene Linie. Durchgezogene zulaufende Linien deuten konstitutives Spleißen an, gestrichelte Linien demonstrieren den alternativen Spleißvorgang und sind wie alternative Exons farblich gekennzeichnet.

Diese variable In- und Exklusion von Sequenzen in die reife mRNA erweitert die Diversität des eukaryotischen Proteoms, da eine prä-mRNA durch alternatives Spleißen für verschiedene Proteine kodieren kann. Über 90% aller humanen proteinkodierenden Gene werden alternativ gespleißt (Pan et al, 2008; Wang et al, 2008), was die Kodierungskapazität enorm erweitert, und somit Unterschiede in der Komplexität verschiedener Organismen mit vergleichbaren Genomgrößen erklären kann (Barbosa-Morais et al, 2012).

Alternatives Spleißen geschieht nicht zufällig, sondern unterliegt vielmehr einer vielschichtigen zelltyp- bzw. gewebespezifischen und zumeist cotranskriptionellen Regulation. Die Entscheidung für oder gegen eine Spleiß-Stelle fällt bereits während der Assemblierung des Spleißosoms und ist von diversen Faktoren abhängig. Zusätzlich zu den für konstitutives Spleißen benötigten Konsensus-Sequenzen, können *cis*-regulatorische Elemente in Exons und

Introns für die Rekrutierung zusätzlicher Spleißfaktoren sorgen. Diese können den Spleißvorgang aktivieren oder hemmen, und damit Ex- und Inklusion regulierter Bereiche beeinflussen (Matlin et al, 2005). Spleiß-aktivierende Elemente in Exons (engl. *exonic splicing enhancers*, ESEs) können beispielsweise Proteine der SR-Familie binden (Graveley, 2000). Diese sind nach ihrer Serin (S) und Argenin (R) reichen Domäne benannt und besitzen zusätzlich ein RNA-Erkennungsmotiv (engl. *RNA recognition motif*, RRM). Bindung von SR-Proteinen an ESEs kann wiederum U2AF und den U1 snRNP rekrutieren, was die Bildung des E-Komplexes begünstigt. Gegenteilig können inhibierende Elemente (engl. *exonic splicing silencers*, ESS) heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs) rekrutieren, die durch ihre sterischen Eigenschaften die Bindung von Spleißfaktoren blockieren können (Han et al, 2010; Krecic & Swanson, 1999). Die Regulation von alternativen Spleiß-Vorgängen ist nicht nur während der Formation des Spleißosoms möglich, sondern auch noch während der katalytischen Phase. Eine Interaktion des Sexlethal Proteins in *Drosophila melanogaster* mit dem Spleißfaktor SPF45 kann den Spleißvorgang vor dem zweiten katalytischen Schritt inhibieren und zum Spleißen einer weiteren, ursprünglich nicht von U2AF gebunden, 3'-Spleiß-Stelle führen (Lallena et al, 2002). Die Regulation alternativen Spleißens im Zusammenhang mit der Transkription ist ferner Gegenstand aktueller Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Elongationsrate der RNA-Polymerase II die Inklusion alternativer Exons beeinflusst (Dujardin et al, 2014).

Während große Sequenzierungs-Studien immer mehr Erkenntnisse über die Regulation und Mechanismen von alternativem Spleißen liefern, ist über die Funktionalität der einzelnen Spleiß-Ereignisse deutlich weniger bekannt. Seit geraumer Zeit wird eine Rolle von alternativem Spleißen für das Immunsystem diskutiert. Ein funktionelles Immunsystem muss zeitnah auf veränderte Einflüsse im physiologischen Umfeld reagieren können. Alternatives Spleißen wird als Mechanismus vorgeschlagen, um in einer Signal-induzierten Weise die Genexpression in Zellen des Immunsystems zu regulieren (Martinez & Lynch, 2013; Martinez et al, 2012). Das prominenteste Beispiel ist in diesem Zusammenhang das alternative Spleißen von CD45 in der T-Zell Aktivierung, das mechanistisch als auch funktionell gut beschrieben ist. CD45 ist eine Transmembran-Tyrosin-Phosphatase und spielt eine wichtige Rolle während der T-Zell Aktivierung (Trowbridge & Thomas, 1994). Drei der 33 Exons der CD45 prä-mRNA sind Kassetten-Exons, die Bereiche der extrazellulären Domäne kodieren. Während der T-Zell Aktivierung ändert sich das Spleiß-Muster der fünf möglichen Isoformen in Richtung der

Exklusions-Isoform. Diese Isoform hat ein höheres Potenzial Dimere zu bilden (Xu & Weiss, 2002), was sich durch eine sterische Blockade der katalytischen Domäne negativ auf die Phosphatase-Aktivität auswirkt (Majeti et al, 1998). Dadurch kann eine dauerhafte Signaltransduktion nach Aktivierung der T-Zelle unterbunden werden (Hermiston et al, 2003; Lynch, 2004). Neben der funktionellen Bedeutung von CD45 Spleißen ist auch die Regulation dieses Prozesses bekannt. Die alternativen Exons vier, fünf und sechs tragen neben *cis*-regulatorischen Elementen, die von Spleiß-aktivierenden als auch -inhibierenden Faktoren gebunden werden können, eine sogenannte *activation-responsive sequence* (ARS). Diese Sequenzen werden u.a. von hnRNP-L, was eine basale Exklusion der Exons vermittelt, und dessen Paralog hnRNP-LL, das eine aktivierungsinduzierte Exon-Exklusion vermittelt, gebunden (Oberdoerffer et al, 2008; Rothrock et al, 2005).

1.3 T-Zell Aktivierung

T-Zellen entstammen dem lymphatischen System und sind Teil des adaptiven antigenspezifischen Immunsystems. Auf der Zelloberfläche befinden sich sogenannte T-Zell-Rezeptoren (TZR), sowie die Korezeptoren CD4 im Falle von T-Helferzellen und CD8 im Falle von zytotoxischen T-Zellen. Die initialen Schritte in der T-Zell Aktivierung liegen in der Erkennung und Bindung des TZR an sein spezifisches Antigen. Hierfür wichtig ist die Präsentation des Antigens auf der Zelloberfläche durch für diesen Prozess spezialisierte sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (APZs). Die Präsentation erfolgt durch die Haupt-Histokompatibilitätskomplexe (MHC) I und II. CD4+ Zellen erkennen durch MHCIII präsentierte Antigene, während CD8+ Zellen durch MHCI präsentierte Antigene erkennen. Neben der Bindung des Antigens an den TZR ist die gegenseitige Bindung von Korezeptoren wie z.B. CD28 und CD80/CD86 wichtig für eine vollständige Aktivierung und eine damit verbundene erfolgreiche Immunantwort (vereinfachte Darstellung in Abb. 1.5) (Rudd & Schneider, 2003). Der Prozess der T-Zell Aktivierung nach Antigenbindung ist komplex und verläuft über mehrere Stufen. Die Bindung von Antigen und TZR führt zur Aktivierung von Kinasen, die Tyrosine in sogenannten ITAM-Motiven (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) der zytosolischen Domänen des TZR/CD3 Komplexes phosphorylieren. Dies führt zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Kinasen, die Adapterproteine rekrutieren und phosphorylieren. Dadurch werden Signalkaskaden ausgelöst, die zur Bildung von *second messenger*-Molekülen und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen.

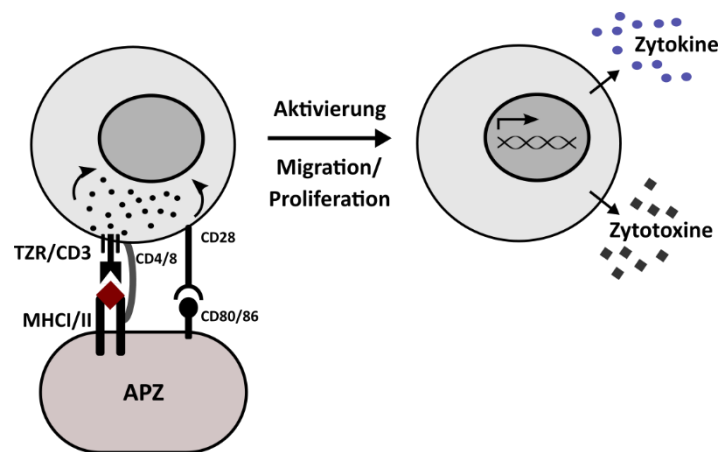


Abbildung 1. 5 Schematische Darstellung der T-Zell Aktivierung durch Antigenbindung an den T-Zellrezeptor. Antigenpräsentierende Zellen tragen Antigene über MHC I/II Komplexe auf ihrer Zelloberfläche, die durch den T-Zell Rezeptor und Korezeptoren erkannt werden. Bindung des Antigens an den TZR löst diverse Signalkaskaden aus, die u.a. zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und erhöhter Transkription entsprechender Zielgene führt.

Die bedeutendsten *second messenger* in der T-Zell Aktivierung sind Diacylglycerin (DAG) und Ca^{2+} Ionen. DAG entsteht zusammen mit Inositol-Triphosphat (IP₃) nach Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C γ 1. DAG kann u.a. die Proteinkinase C θ (PKC θ) aktivieren, welche wiederum den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, während IP₃ zur Freisetzung von Ca^{2+} Ionen aus dem ER in das Zytosol der aktivierten T-Zelle führt. Dadurch steigt der Ca^{2+} Spiegel in der Zelle und führt über mehrere Schritte zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie (engl. *nuclear factor of activated T-cells*). Durch NF κ B regulierte Gene sind wichtig um eine frühzeitige Apoptose zu verhindern, die Produktion von Zytokinen anzuregen und die weitere Proliferation und Differenzierung der T-Zelle zu gewährleisten (Hayden & Ghosh, 2011). Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Mitgliedern (NFAT1-5). Sobald aktivierte NFAT-Proteine in den Zellkern gelangen, binden sie in Kombination mit anderen Faktoren an ihre überwiegend für Zytokine kodierenden Zielgene, um diese zu aktivieren. Prominentestes Beispiel ist ein Komplex aus NFAT:AP-1 (engl. *activator protein, AP*), der die Transkription von IL2 aktiviert (Macian et al, 2001). Die Bildung und Sekretion von IL2 ist ein wichtiger Baustein der frühen adaptiven Immunantwort. IL2 bindet an den T-Zell eigenen IL2-Rezeptor wodurch Signalkaskaden induziert werden, die sowohl die Proliferation als auch die Synthese weiterer Effektormoleküle stimulieren (Liao et al, 2013). Der Transport von Effektormoleküle erfolgt in

Richtung des initialen Signals, zur sogenannten immunologischen Synapse. Diese bezeichnet die Kontaktzone aus TZR/CD3-Komplex gebunden an das durch MHCII/II präsentierte Antigen (Huppa & Davis, 2003). Zu diesem Zweck erfahren das Zytoskelett und der sekretorische Apparat der aktivierten T-Zelle eine Neuausrichtung u.a. durch Polarisierung von Aktinfilamenten (Burkhardt et al, 2008). Auch das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (engl. MTOC) relokalisiert in Richtung der immunologischen Synapse (Kupfer et al, 1987), wodurch ein Mikrotubuli-abhängiger Transport an den Wirkungsort gewährleistet wird.

Zum Ende der Immunantwort wird die aktivierte T-Zelle zu einer Gedächtniszelle oder erfährt den induzierten Zelltod (engl. *activation induced cell death*, AICD). AICD wird meist durch die Bindung des in aktivierten T-Zellen exprimierten Fas-Liganden (FasL) an den Fas-Rezeptor ausgelöst, wodurch über ein Adapterprotein Caspase8 aktiviert wird, die über eine Signalkaskade zur Apoptose führt (Nagata, 1997). Der kontrollierte Zelltod ist wichtig für die Homöostase des Immunsystems, die Erhaltung der immunologischen Selbsttoleranz, und spielt ferner eine Rolle während Entzündungsreaktionen (Maher et al, 2002).

1.4 Das Sekretorische Transportsystem

Während Proteine, wie z.B. die Effektormoleküle des Immunsystems, an Ribosomen am ER synthetisiert werden, gelangen sie cotranslational in das ER-Lumen. Dort werden sie prozessiert und nehmen ihre natürliche Konformation an, bevor sie an ihren Wirkungsort transportiert werden können. Dies wird durch ein komplexes sekretorisches System gewährleistet, welches Proteine zwischen den Organellen einer Zelle mit Hilfe vesikulärer Strukturen transportiert (Abb. 1.6). Dass das vesikuläre Proteintransportsystem wichtig für die Funktionalität und das Fortleben einer Zelle ist, wurde bereits in den frühen 1980er Jahren entdeckt. In Experimenten mit temperatursensitiven Hefestämmen konnten Gene aus 23 Komplementierungsgruppen identifiziert werden, die essentiell für einen funktionellen Sekretionsapparat sind (Novick et al, 1980). Diese *Sec*-Proteine sind ebenfalls in höheren eukaryotischen Organismen zu finden, wo ihnen eine vergleichbare Funktion zukommt.

Der Vesikel vermittelte Proteintransport wird in drei Kategorien unterteilt: Der anterograde Transportweg beschreibt den durch COPII-Vesikel vermittelten Transport vom ER in Richtung des Golgi-Apparates, während der retrograde Transportweg den durch COPI-Vesikel vermittelten entgegengesetzten Weg beschreibt (Szul & Sztul, 2011). Zwischen ER und Golgi-Apparat befindet sich das ER-Golgi intermediäre Kompartiment (ERGIC), von dem CopI-Vesikel ebenfalls den Transport in Richtung des Golgi-Apparates vermitteln können (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006). Der Transport von Proteinen zwischen post-Golgi Kompartimenten und der Zellmembran erfolgt durch Clathrin-umhüllte Vesikel (Robinson, 2015).

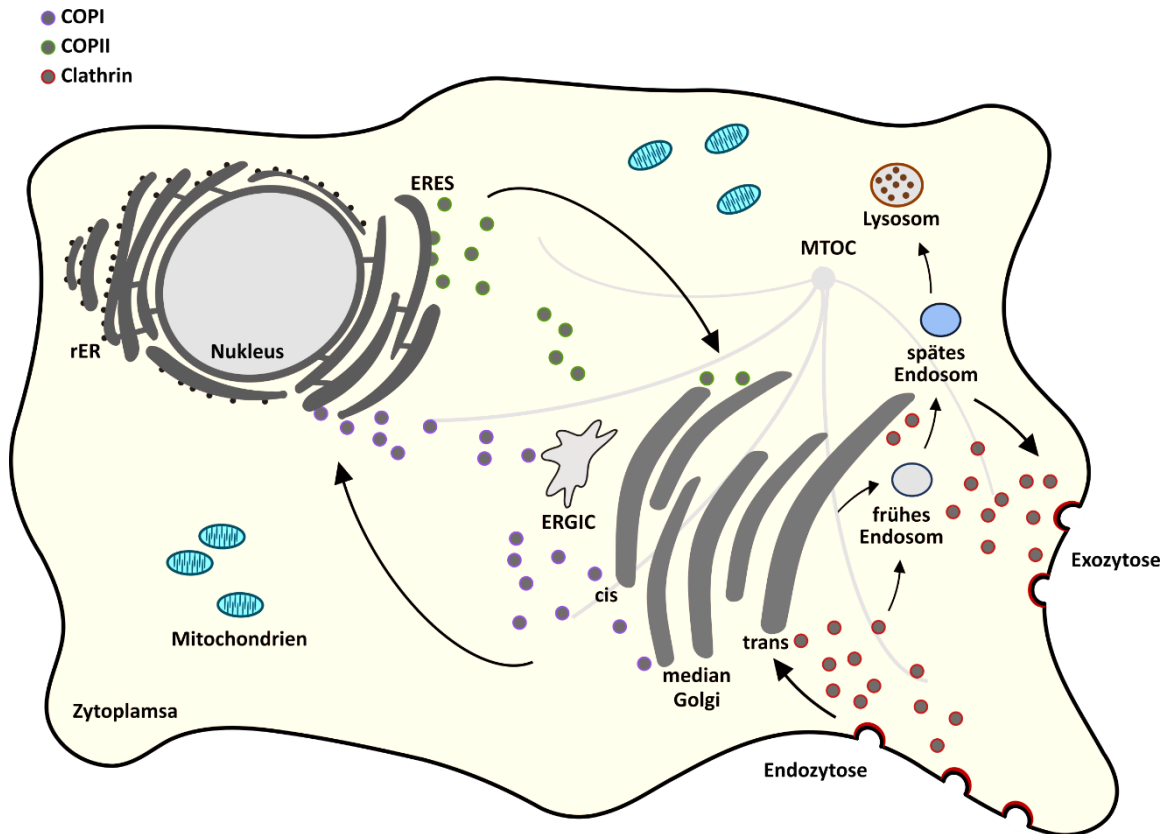


Abbildung 1. 6 Das sekretorische Transportsystem. Proteine gelangen cotranslational in das ER-Lumen, wo sie prozessiert werden. An ERES werden sie in COPII-Vesikel verpackt und weiter, über das ERGIC, in Richtung des Golgi-Apparates transportiert, wo sie weiter prozessiert werden und an ihren Zielort gelangen. COPI-Vesikel transportieren Proteine in die entgegengesetzte Richtung vom Golgi-Apparat in Richtung des ER. Der Proteintransport in post-Golgi-Kompartimenten, sowie Endo- und Exozytose, erfolgt über Clathrin-umhüllte Vesikel. Endosomen können zwecks Recycling endozytierte Stoffe aufnehmen, durch Ansäuern reift das Kompartiment zum späten Endosom, und geht später in das Lysosom über. Vesikulär vermittelter Transport erfolgt entlang von Mikrotubuli, die vom MTOC ausgehend alle Bereiche der Zelle erreichen.

Der sogenannte frühe sekretorische Transportweg beginnt an spezialisierten Ribosom-freien Stellen des ER, den *ER-exit-sites* (ERES). Sie werden durch die Lokalisation des peripheren Membranproteins Sec16 definiert (Watson et al, 2006), das wichtig für die Formation und die korrekte Abschnürung von COPII-Vesikeln ist (Hughes et al, 2009; Ivan et al, 2008). Der Begriff ERES fasst verschiedene stationäre Phasen zusammen, die ein COPII-Vesikel durchläuft. Der Ort, von dem die Vesikel abgeschnürt werden, wird *transitional ER* (tER) genannt. Von dort gelangen solitäre COPII-Vesikel auf ihren Transportweg, bevor sie mit dem ERGIC fusionieren. In diesem dreistufigen Modell ist Sec16 überwiegend am tER lokalisiert (Hughes et al, 2009). Sec16 ist ein Multidomänen-Protein von 2154 Aminosäuren und einer Masse von ca. 240 kDa und entlang des eukaryotischen Stammbaums konserviert (Bhattacharyya & Glick, 2007)(Abb.

1.7). Der Mensch besitzt zwei Varianten, Sec16A und B mit nicht redundanter Funktion (Bhattacharyya & Glick, 2007). Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Sec16A.

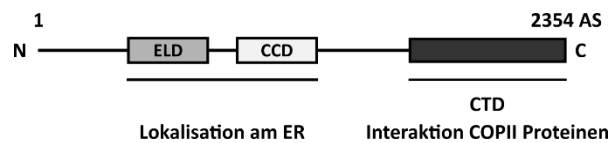


Abbildung 1. 7 Vereinfachte Domänenstruktur von humanem Sec16. ELD = ERES-Lokalisations-Domäne, CCD = *central conserved domain*, CTD = C-Terminale konservierte Domäne. Angaben zu den Funktionen der verschiedenen Domänen im Text. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

Während die Domänen zwischen verschiedenen Spezies konserviert sind, sind ihre Funktionen zum Teil noch umstritten. Die Aminosäuren 1267-1713 von Sec16A bilden die sogenannte zentrale konservierte Domäne (engl. *central conserved domain*, CCD), die zusammen mit einem weiteren konservierten Motiv im N-Terminalen Bereich des Proteins, der ERES-Lokalisations-Domäne (ELD), für die korrekte Lokalisation des Proteins am ER wichtig ist (Hughes et al, 2009). Die ELD weist ein Arginin-reiches Motiv auf, das nur in Verbindung mit der CCD funktionell ist (Hughes et al, 2009; Ivan et al, 2008; Sprangers & Rabouille, 2015). In Hefe scheint die CCD die Lokalisation an ERES durch eine Oligomerisierung zu vermitteln (Bharucha et al, 2013). Zusätzlich konnte für die CCD in Hefe eine Interaktion mit Sec13 beobachtet werden (Bharucha et al, 2013; Whittle & Schwartz, 2010), die eine Art Vorstufe in der Vesikelformation zu bilden scheint. Der C-Terminus des Proteins weist in den Bereichen der Aminosäuren 1928-2154 eine weitere konservierte Domäne, die C-Terminale konservierte Domäne (CTD), auf. Diese Domäne konnte in verschiedenen Arbeiten für verschiedene Organismen als Interaktionspartner anderer COPII-Proteine identifiziert werden, was im Folgenden weiter erläutert wird.

An den ERES erfolgt die Verpackung neu synthetisierter Proteine, die für einen entfernten Zielort vorgesehen sind, in COPII-Vesikel (Barlowe & Miller, 2013). Die Formation und Abschnürung dieser Vesikel, sowie die konkrete Rolle von Sec16 in diesem Prozess, werden in der Literatur in zwei verschiedenen Modellen diskutiert, die im Folgenden beschrieben werden. Das erste Modell beschreibt die Formation der Vesikel als einen Prozess, in dem

Sec16 als eine Art Plattform für die Rekrutierung der COPII-Proteine an den ERES fungiert (Abb. 1.8).

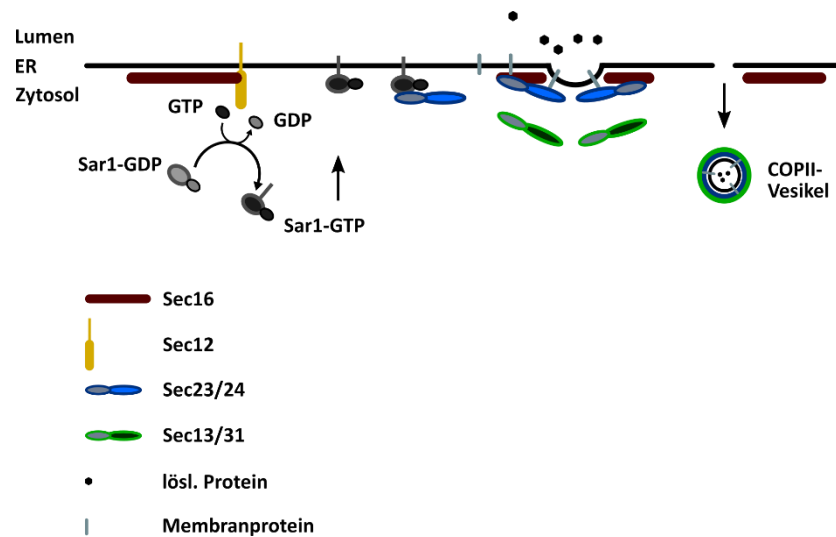


Abbildung 1. 8 Entstehung von COPII-Vesikeln. Sec12 lokalisiert an ERES, wo es mit Sec16 interagiert und den Austausch von GDP zu GTP der GTPase Sar1 reguliert. Sar1 integriert nach Aktivierung in die ER-Membran, wo es die innere Vesikelhülle aus Sec23/24 rekrutiert. Membranausstülpung und Rekrutierung der äußeren Hülle aus Sec13/31 folgen. Reife Vesikel werden von der ER-Membran abgeschnürt und transportieren lösliche als auch Membran-gebundene Proteine. Sec16 verbleibt an der ER Membran.

Der initiale Schritt ist die Rekrutierung und Aktivierung der kleinen GTPase Sar1 durch ihren GTP-Austauschfaktor (engl. *guanine nucleotide exchange factor*, GEF) Sec12, ein Transmembranprotein, das an ERES lokalisiert und mit der CTD von Sec16 interagiert (Montegna et al, 2012). Die Aktivierung der GTPase resultiert in einer Konformationsänderung, wodurch Sar1 über eine amphipathische α -Helix in die ER-Membran inseriert wird (Huang et al, 2001). Sar1-GTP rekrutiert nun Komponenten der inneren Vesikelhülle, die aus Heterodimeren der Proteine Sec23 und Sec24 besteht (Matsuoka et al, 1998). Die Rekrutierung erfolgt vermutlich über eine Interaktion mit Sec23, das außerdem das GTPase-aktivierende-Protein (GAP) der Sar1 GTPase ist. Für Sec23 konnte ebenfalls eine Interaktion mit der C-terminalen Domäne von Sec16 gezeigt werden (Bhattacharyya & Glick, 2007). Sec24 erkennt ER-Export Signalsequenzen und ist deshalb wichtig für die Sortierung und Rekrutierung der zu transportierenden Proteine. Im humanen System werden vier verschiedene Formen des Sec24 Proteins exprimiert (Sec24A-D), die möglicherweise durch unterschiedlich starke Bindung an Exportsignale die Sortierung von Proteinen im ER

beeinflussen (Wendeler et al, 2007). Nach Formation der inneren Vesikelhülle werden Komponenten der äußeren Hülle rekrutiert. Diese besteht aus Heterotetrameren der Proteine Sec13 und Sec31 (Matsuoka et al, 1998). Sec31 wirkt dabei stimulierend auf die GTPase-aktivierende Funktion von Sec23 (Antonny et al, 2001). Die Formation der äußeren Hülle ist verbunden mit einer Deformation der ER-Membran und die finale Abschnürung des reifen, mit Kargo-Proteinen beladenen Vesikels, erfolgt unter Sar1 vermittelter GTP-Hydrolyse (Kung et al, 2012). Während dem Prozess der Vesikelformation und –abschnürung verbleibt Sec16 an der ER-Membran und ist nicht im reifen Vesikel zu finden (Hughes et al, 2009; Zeuschner et al, 2006). Aktuelle Studien stellen die Notwendigkeit der GTP-Hydrolyse für die Abschnürung von COPII-Vesikeln in Frage. So konnte gezeigt werden, dass die Formation und Abschnürung von COPII-Vesikeln in semi-intakten Zellen unter Verwendung rekombinanter Hüllenproteine (Sec23/24 und Sec13/31) ohne GTP-Hydrolyse möglich ist (Adolf et al, 2013). Die GAP und GEF Eigenschaften der verschiedenen COPII-Proteine führen zu einem weiteren Modell, das auf Versuchen in den Hefen *S. cerevisiae* und *P. pastoris* basiert. In diesem Modell erfolgt die Formation der COPII-Vesikel unabhängig von Sec16. Vielmehr ist Sec16 hier statt an der Bildung an der Abschnürung der Vesikel beteiligt, in dem es den Sar1-vermittelten GTPase-Zyklus reguliert (Sprangers & Rabouille, 2015).

COPII-Vesikel, die das ER verlassen, wandern entlang von Mikrotubuli in Richtung des Golgi-Apparates, was durch eine direkte Interaktion von Sec23 mit Dynactin ermöglicht wird (Watson et al, 2005), und fusionieren mit COPI-Vesikeln aus dem retrograden Weg zum ER-Golgi intermediären Kompartiment (engl. *ER-Golgi intermediate compartment*, ERGIC) (Lee et al, 2004). Von dort gelangen sie weiter zu den Zisternen des *cis*-Golgis, von wo aus sie weiter prozessiert und transportiert werden (Papanikou & Glick, 2014). Ein abgeschnürtes Vesikel hat in etwa einen Durchmesser von 60-80 nm (D'Arcangelo et al, 2013; Jensen & Schekman, 2011). Für den Transport größerer Proteine wie z.B. Kollagen existiert deshalb ein alternativer Weg der Vesikelformation in eukaryotischen Zellen. Das Transmembran Protein TANGO1 kann mit Kollagen im ER-Lumen und Sec23 im Zyotosol zugleich interagieren. Die Interaktion mit Sec23 verhindert eine Interaktion mit Sec31, welches üblicherweise die GTPase-aktivierende Eigenschaft von Sec23 stimuliert. Dadurch kann die GTP-Hydrolyse herausgezögert werden, wodurch größere Vesikel entstehen, die große raumgreifende Proteine wie z.B. Kollagen-Fasern transportieren können (Saito et al, 2009). Ferner kann TANGO1 mit Sedlin eine Komponente des TRAPP-Komplexes (engl. *transport protein particle*) rekrutieren, die durch

ihre Interaktion mit Sar1 die Sar1-vermittelte GTP-Hydrolyse reguliert und ein Wachstum größerer Vesikel ermöglicht (Venditti et al, 2012). Eine Regulation der Vesikelformation durch Monoubiquitinierung der COPII-Proteine ist ein weiterer aktuell am Beispiel von Sec31 diskutierter Mechanismus, der einen Einfluss auf die Größe eines Vesikels hat (Jin et al, 2012). Der genaue Mechanismus bleibt jedoch noch zu klären.

Wie ein Vesikel den Weg zu seinem Zielkompartiment bewältigt, ist aus Arbeiten in Hefen bekannt (Barlowe & Miller). Eine Möglichkeit ist das *tether*-Modell: Dabei wird die Distanz zwischen Start- und Zielmembran durch Interaktionen mit großen Proteinkomplexen überbrückt. So ist z.B. eine Interaktion von TRAPP1 mit Sec23 bekannt, die zur Aktivierung der GTPase Ypt1 führt. Aktivierte Ypt1 kann Faktoren an der Zielmembran rekrutieren, die an das Vesikel binden und es zur Zielmembran ziehen. In höheren Eukaryoten erfolgt der Transport von Vesikeln entlang des Zytoskeletts unter der Hilfe von Motorproteinen (Lee et al, 2004). Zunächst entsteht durch heterogene Fusion von COPI und COPII das ER-Golgi intermediäre Kompartiment, von wo aus der Transport entlang von Mikrotubuli verläuft (Scales et al, 1997). Die finale Fusion der Vesikel mit der Zielmembran wird durch SNARE-Proteine vermittelt (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*). Ein v-SNARE in der Vesikelhülle kann drei t-SNAREs an der Zielmembran binden, die zusammen eine vierfache Helix formen. Dadurch entsteht eine Kontraktion, die das Vesikel näher an die Zielmembran bringt (Lee et al, 2004; Mossessova et al, 2003). An welchem Punkt die Auflösung der Vesikelhülle erfolgt, ist bislang nicht ausreichend geklärt und ist zusammen mit einer möglichen Rolle der Sar1 GTPase in diesem Prozess Gegenstand aktueller Diskussionen.

1.5 Zielsetzung

Sec16 ist ein ca. 240kDa großes peripheres Membranprotein, dass an sogenannten ER *exit sites* (ERES) lokalisiert ist. Dort ist es an der Bildung von COPII-Vesikeln beteiligt. Die C-terminale Domäne des Proteins wird u.a. von zwei Exons kodiert (E29 und E30), die nach T-Zell Aktivierung alternativ gespleißt werden. In aktivierten T-Zellen ist eine substantiell erhöhte Inklusion von E29 und eine erhöhte Exklusion von E30 zu beobachten. Das Expressionsmuster der daraus resultierenden vier möglichen Isoformen verschiebt sich deutlich in Richtung der Isoform, die nur E29 enthält.

Die Frage, die dieser Arbeit vorausging, war, inwiefern diese Signal-induzierte Änderung des Sec16 Spleiß-Musters eine funktionelle Rolle in der T-Zell Aktivierung spielt.

Die Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein entsprechendes Antigen führt zu einer substantiellen Umstrukturierung in der Funktionalität der ursprünglich naiven T-Zelle wie z.B. Migration, Proliferation, sowie die Synthese und Sekretion von Effektormolekülen. Inwieweit sich der frühe sekretorische Apparat der Zelle an dieses erhöhte Aufkommen anpasst, ist bislang nicht sehr gut verstanden. In initialen Experimenten sollte deshalb die Transporteffizienz ruhender und aktivierter T-Zellen mit etablierten zellbiologischen Exportassays untersucht und verglichen werden. In fluoreszenzmikroskopischen Versuchen sollte die Morphologie der Kompartimente des sekretorischen Systems analysiert und auf eine mögliche Veränderung der ERES nach Stimulation untersucht werden.

Überexpression von Sec16 und Interaktionstests mit anderen COPII Proteinen sollten Einblicke über eine differenzielle Aktivität der Sec16 Spleiß-Varianten im sekretorischen System gewähren.

Um einen Zusammenhang eines möglicherweise veränderten Transportsystems mit Sec16-Spleißen herzustellen, sollte unter Verwendung spleiß-inhibierender Morpholino-Oligomere die erhöhte Inklusion von E29 nach T-Zell Aktivierung blockiert, und die Auswirkung untersucht werden.

Mit dieser Arbeit sollte das regulatorische Potential von alternativem Spleißen unterstrichen und mit der Untersuchung von Sec16 Spleißen um einen weiteren funktionellen Aspekt erweitert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.1.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte unter Verwendung von PeqGOLD RNAPure (peqlab). Zu untersuchende Zellen wurden in PBS gewaschen und in 1 ml PeqGOLD RNAPure resuspendiert, mit 200 µl Chloroform versetzt, gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Isopropanol versetzt und durch Vortexen gemischt. Die Präzipitation der RNA erfolgte für 15 min bei 14000 rpm oder über Nacht bei -20°C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die RNA in 70 % Ethanol gewaschen. RNA-Pellets wurden in 12 µl MiliQ-Wasser resuspendiert und die Konzentration mit einem Nanophotometer (Implen) ermittelt.

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus PBMCs erfolgte mit dem GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) mit einer ProteinaseK-Behandlung parallel zur Zelllyse.

2.1.2 RT-PCR und RT-qPCR

Die Synthese von cDNA erfolgte unter Verwendung reverser Transkriptase (MMLV, Bio & Sell), 1 µg RNA und Gen-spezifischen *reverse* Oligonukleotiden. Kontrollreaktionen wurden ohne Enzym durchgeführt (-RT).

Auf diese Weise gewonnene cDNA wurde in PCR-Reaktionen eingesetzt, um Änderungen im Spleiß-Muster detektieren zu können. Dazu wurde ein in einer PNK-abhängigen Reaktion ³²P markiertes *forward* Oligonukleotid verwendet. Sec16 Spleiß-PCRs verliefen unter Verwendung der Taq-Polymerase, bei 65°C Hybridisierungstemperatur, 45 sec Elongationszeit für 30 Zyklen. PCR Produkte wurden auf einer denaturierenden 5 % Urea-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Phosphorimager (STORM) und der Imagequant Software.

Für quantitative PCRs wurde in der oben beschriebenen RT-Reaktion cDNA mit bis zu vier verschiedenen *reverse* Oligonukleotiden synthetisiert. Die qPCR-Reaktion erfolgte im 96-Well Format unter Verwendung von ABsolute qPCR SYBR green mastermix (Thermo Fisher) in einem Stratagene MX3005p Gerät. Messdaten wurden in Excel exportiert und die Expression

analysierter Gene gegen die GAPDH-Kontrolle normalisiert. Eine Auflistung aller verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 1).

2.1.3 Erstellung von Expressionskonstrukten

Für die Erstellung von Expressionskonstrukten wurden die ORFs (engl. *open reading frame*) entsprechender Gene nach erfolgter RT-PCR in einer Phusion-PCR (Thermo Fisher) von cDNA amplifiziert. Sequenzen für Restriktions-Stellen wurden durch ein entsprechendes Design der Oligonukleotide eingeführt. PCR-Produkte wurden auf 1 % Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, entsprechende Banden ausgeschnitten und unter Verwendung des NucleSpin® Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Eluate wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen (Fermentas, NEB) behandelt und mittels T4-Ligase (Fermentas) in die pCMV-N3-FLAG oder pCMV-N3-GFP Vektoren ligiert. Alle klonierten Expressionskonstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert. Zur Amplifikation von DNA-Plasmiden wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* Top10 Bakterien transformiert. Einzelklone wurden auf Agarplatten mit Antibiotikum selektioniert (50 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin) und in Flüssig-LB-Medium expandiert. Die Extraktion von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Nucleo Bond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel).

Die Klonierung des Sec12-Expressionskonstrukts erfolgte wie bereits beschrieben (Montegna *et al.*, 2012). Das ts045-VSVG-GFP-Reporterkonstrukt wurde bei Addgene erworben (#11912), das Expressionskonstrukt mit N-Terminal GFP markiertem Gesamt-Sec16 wurde von D. Stephens (University of Bristol, UK), das als ER-Marker verwendete dsRED-KDEL exprimierende Plasmid von R. Jacob (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Für die Klonierung der VSVG-Variante mit internem FLAG-Peptid erfolgte das *Annealing* entsprechender Oligonukleotide wie bereits beschrieben in einer PNK-abhängigen Reaktion während einer Stunde bei 37°C (Rao & Wilkinson, 2006). Anschließend wurde der Reaktionsansatz 1:250 in MiliQ H₂O verdünnt und in das mit EcoNI restringierte VSVG-GFP-Expressionsplasmid ligiert.

Eine Auflistung aller zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 1).

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung und Transfektion humaner Jsl1 Zellen

Jsl1 Zellen wurden in Suspension in RPMI-Medium mit 10 % FBS und 1 % Pen/Strep (Invitrogen) kultiviert (RPMI +/+). Die Stimulation erfolgte mit 20 ng/ml PMA (Sigma), als Kontrolle wurde ein adäquates Volumen DMSO verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden Experimente 48 Stunden nach Stimulation durchgeführt. Zur Untersuchung der mRNA-Stabilität wurden Jsl1 Zellen nach Stimulation mit 5 µg/ml ActinomycinD (ActD) behandelt und nach 0, 4 und 8 Stunden zwecks RNA-Extraktion geerntet. Zur Untersuchung der Sec16 Proteinstabilität wurden Jsl1 Zellen mit 40 µg/ml Cycloheximid (CHX) behandelt und 0, 6 und 10 Stunden später für weitere Analysen geerntet. Zur Induktion von ER-Stress wurden Jsl1 Zellen mit 1 µg/ml Tunikamycin über Nacht behandelt. Die Expression von Markergenen wurde mittels RT-qPCR verifiziert.

Die Manipulation des Sec16 Spleiß-Musters erfolgte durch Elektroporation von Jsl1 Zellen mit dem E29 Morpholino (Sequenzen im Anhang, Tabelle 1). Dazu wurden 10 ml einer 1×10^6 dichten Suspension geerntet und zweimal in RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen (RPMI -/-). Zellen wurden in 400 µl -/- Medium resuspendiert und in eine Küvette überführt, mit 10 µl einer 300 nm Lösung Morpholino versehen und bei 250 mV in einem Elektroporator (Biorad) elektroporiert. Die Suspension wurde in 5 ml +/+ RPMI Medium kultiviert und am Folgetag stimuliert.

Zur Etablierung stabil exprimierender Zellen, wurden 1×10^7 Zellen mit einem linearisierten Plasmid mittels Elektroporation transfiziert. Die Selektion von Einzelklonen erfolgte unter Verwendung von 2 mg/ml G418, ein Expressionsnachweis wurde durch Western Blot erbracht. Transiente Transfektion von Jsl1 Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Attractene von Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2 Kultivierung und Transfektion humaner Hek293 und HeLa Zellen

Hek293 und HeLa Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FBS und 1 % Pen/Strep (Invitrogen) kultiviert. Für transiente Transfektionen wurden 1×10^5 HeLa Zellen und $1,5 \times 10^5$ Hek293 Zellen pro 12-Well bzw. $2,5 \times 10^5$ HeLa Zellen und $3,5 \times 10^5$ Hek293 Zellen pro 6-Well in DMEM-Medium ohne Antibiotika ausgesät. Die Transfektion beider Zell-Linien erfolgte am Folgetag mit Lipofectamine2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Die Analyse transfizierter Zellen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, 48 Stunden nach Transfektion.

2.2.3 Gewinnung, Kultivierung und Transfektion primärer humaner PBMCs

Zur Gewinnung primärer humaner PBMCs wurde humanes Vollblut zu gleichen Teilen mit PBS gemischt. 20 ml Ficoll-Paque™ (GE Healthcare) wurden mit 25 ml der Blut-PBS-Suspension überschichtet und für 40 min bei 400 g, im Ausschwingrotor und ohne Bremskraft der Zentrifuge, bei Raumtemperatur aufgetrennt. Die sich in einer Interphase zwischen Blutplasma und Ficoll befindlichen PBMCs wurden vorsichtig abgenommen und zweimal im Ausgangsvolumen PBS gewaschen. 20 ml einer PBS-Zell-Suspension wurden für 1-2 Stunden bei 37°C in einer T75-Zellkulturflasche zwecks Adhärentselektion inkubiert. Die Zelldichte, sowie der Anteil CD4 und CD8 positiver T-Zellen, deren Anteil für eine weitere Verwendung bei über 60% liegen sollte, wurden per FACS ermittelt. Auf diese Weise gewonnene PBMCs wurden in einer 24-Well-Platte mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro Well ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen vivo-Morpholino transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen in zuvor mit 1 µg α-CD3 beschichteten 24-Well-Platten überführt und eventuell mit zusätzlich 1 µg α-CD28 stimuliert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Stimulation für weitere Analysen geerntet.

2.3 Methoden zur Protein-Analyse

2.3.1 Gesamtzellextrakte

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden Zellen geerntet und einmal in PBS gewaschen. Zur Lyse wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen FLAG-Lyse Puffer (60mM Tris pH 7,5; 30 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % TritonX-100) resuspendiert, 10-15 min auf Eis inkubiert und gelegentlich gevortext. Anschließend wurden Zelltrümmer für 15 min bei 14000 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einer Bradfordmessung (Amresco Lifescience) in einem Bio-Photometer (Eppendorf).

2.3.2. Coimmunopräzipitation

Coimmunopräzipitationen wurden wie zuvor optimiert durchgeführt (Preußner *et al.*, 2014). Dazu wurden Hek293 Zellen zu gleichen Teilen mit Expressionsplasmiden putativer Interaktionspartner cotransfiziert. 48 Stunden später wurden die Zellen geerntet und lysiert.

50 µg Gesamtzellextrakt wurden zunächst mit 15 µl Protein A/G-Sepharose-Beads (Santa Cruz) in 500 µl modifiziertem RIPA Puffer (10 mM Tris pH 8, 1 % NP40, 5mg/ml Natriumdeoxycholat, 2 mM EDTA und 200 mM NaCl) mit 2 % BSA und Proteinaseinhibitoren rotierend bei 4°C zur Entfernung unspezifischer Bindungen inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 1 min bei 4°C und 7000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 15 µl M2 α-FLAG-Beads versehen. Die Proben wurden über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert und am Folgetag dreimal in RIPA-Puffer gewaschen. Die Beads wurden in 40 µl 2xSDS-Lade-Puffer resuspendiert und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Analyse der Präzipitate erfolgte durch Western Blot.

2.3.3 SDS- und NUPAGE®

Die Auftrennung von Gesamtzellextrakten und Immunpräzipitaten erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung. Standardmäßig wurden hierfür 6-10 % SDS-Acrylamidgele verwendet. In der Regel wurden 10 µg Gesamtzellextrakt bzw. 20 µl IP-Eluat analysiert. Die Auftrennung von Proben auf SDS-Gelen erfolgte bei 140 V.

Für die Detektion der Sec16-Isoformen auf Gesamtprotein-Ebene wurden 10-20 µg Jsl1 Gesamtzellextrakt auf einem 4-12 % NUPAGE® Bis-Tris-Gel (Thermo Fisher) unter Verwendung von MOPS-Laufpuffer (50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA und pH 7,7) bei 100 V aufgetrennt.

2.3.4 Western-Blot

Proteine, die zuvor per SDS-PAGE oder NUPAGE® elektrophoretisch aufgetrennt wurden, konnten anschließend mittels semi-dry Western Blot unter einer Stromstärke von 1,5 mA/cm² während 90 min auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Zur Immunodetektion wurde die Membran 1 Stunde in Blockingreagenz (2 % BSA in 1 x LS-TBST) schwenkend inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C unter konstantem Schwenken. Am Folgetag wurde die Membran dreimal in 1x HS-TBS-T gewaschen und mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper 1 Stunde schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Membranen wurden mit ECL-Lösung (Thermo Scientific) benetzt und die Chemolumineszenz unter Verwendung von Röntgenfilmen detektiert. Eine Auflistung aller verwendeten Antikörper befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabellen 2 und 3).

2.4 Mikroskopie und zugehörige Methoden

2.4.1 Erstellung von Immunfluoreszenzpräparaten

Zur Erstellung von Immunfluoreszenzpräparaten wurden 8×10^4 HeLa Zellen auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Platte ausgesät und je nach Fragestellung wie beschrieben transfiziert. Alle beschriebenen Schritte erfolgten bei Raumtemperatur im Well. Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 4 % PFA fixiert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS und die Äquilibration mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 20 min. Nach dreimaligem Waschen wurden unspezifische Bindungen mit 5 % Ziegen Serum in PBS für 45 min blockiert und die Proben für 2 Stunden mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden die Proben mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde inkubiert und erneut viermal gewaschen. Anschließend folgte die Kernfärbung unter Verwendung von Hoechst33258 (Sigma) für 10 min. Nach drei finalen Waschschriffen wurden die Präparate mit Moviol eingedeckelt und über Nacht zur Aushärtung lichtgeschützt verwahrt.

Jsl1 Zellen wurden geerntet, einmal in PBS gewaschen und für 20 min in 4 % PFA im Reaktionsgefäß fixiert. Nach drei Waschschriffen wurden die Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert und via Cytospin für 7 min bei 200 rpm auf einen Objektträger transferiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben in einer feuchten Kammer. Eine Auflistung der hier verwendeten Primär- und Sekundärantikörper befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabellen 2 und 3).

2.4.2 Konfokale-Laser-Scanning Mikroskopie

Oben beschriebene Fluoreszenzpräparate wurden mit einem Leica Sp2 und Leica SP8 unter Verwendung eines 63er Objektivs und Immersionsöl analysiert. Alle Fluorophore wurden entsprechend ihres Spektrums angeregt und die Emission mittels PMT (engl. *photomultiplier*) oder HyD-Detektoren (engl. *hybrid detector*) erfasst.

Mit Leica LAS AF (SP2) und Leica LASX (SP8) getätigte Aufnahmen wurden für weitere Analysen und Bearbeitungen als TIFF-Datei exportiert.

2.4.3 Bildanalyse mit ImageJ

Die Analyse von Mikroskopieaufnahmen zur Quantifizierung von ERES und COPII Vesikeln erfolgte mit der frei zugänglichen Bildbearbeitungssoftware ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)

unter Verwendung des *particle count* Plug-Ins. Zu diesem Zweck wurden die Bilder in ein 8 bit Format in Graustufen konvertiert und unter der Anwendung eines gleichmäßigen Schwellenwertes analysiert. Für jede Aufnahme wurde der Maßstab definiert und Partikel mit einem Mindestdurchmesser von 60 nm, entsprechend der Größe eines Vesikels (Jensen und Schekman, 2011), pro Zelle gezählt. Messwerte wurden in eine Excel Tabelle für weitere Berechnungen exportiert.

2.4.4 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

Um den COPII *Turnover* in Abhängigkeit von Sec16 Spleißen zu bestimmen, wurde ein FRAP Experiment in E29-deletierten Hek293 Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 1×10^5 WT und Δ E29 Zellen in 2 ml DMEM mit 10 % FBS in Willco-Schalen von 4 cm Durchmesser ausgesät und am Folgetag mit einem Sec23-GFP kodierenden Plasmid transfiziert. Für die Durchführung des FRAP-Versuches 24 Stunden nach Transfektion wurde das vorhandene Medium gegen DMEM ohne Phenolrot und Karbonat, mit 10 % FBS und 20 mM HEPES ausgetauscht. Der Versuch wurde mit einem Leica SP2 in einer auf 37°C vorgeheizten Wärmekammer unter Verwendung eines 63er Ölimmersions-Objektives und einem 488 nm Argon-Laser durchgeführt. Positiv transfizierte Zellen wurden zunächst durch GFP-Epifluoreszenz identifiziert. Anschließend wurde eine vesikuläre Struktur innerhalb der Zelle als *region of interest* (ROI) definiert. Unter 20 % Laserintensität wurden fünf Aufnahmen getätigt, bevor die ROI während acht Aufnahmen unter 100 % Laserintensität geblichen wurde. Nach dem Bleichvorgang wurden durchschnittlich 150 Bilder mit einer Scan-Geschwindigkeit von 400 Hz aufgenommen. Dieser Versuch wurde für jede Zell-Linie unter zahlreichen Messungen in vier unabhängigen Experimenten durchgeführt. Jede Messung wurde zunächst mit der Leica SAF Software einzeln ausgewertet. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität in der für den FRAP-Vorgang definierten ROI, einer ROI in der Zellperipherie, sowie außerhalb der Zelle bestimmt. Messungen, bei denen sich die mikroskopierte Zelle oder ROI aus dem Fokus bewegten, sowie Zellen mit unvollständigem Bleichvorgang, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Alle Messwerte wurden für weitere Berechnungen in eine Excel Tabelle exportiert und nach einer etablierten Methode analysiert (Goodwin & Kenworthy, 2005). Dort wurde für jeden Messvorgang eine sogenannte *fullscale* Normalisierung durchgeführt. Dabei wurde für jede Messung aus den anfänglichen fünf Aufnahmen die durchschnittliche Ausgangs-Fluoreszenz berechnet und gleich eins und

die Fluoreszenz unmittelbar nach dem Bleichvorgang gleich null gesetzt. Die auf diese Weise erhaltenen Werte wurden mit der GraphPad Prism5 Software weiter bearbeitet und eine FRAP Kurve wurde erstellt. Aus den FRAP Werten wurde die Zeit berechnet, die Sec23-GFP braucht, um 50 % der Ausgangs-Fluoreszenz Intensität wiederzuerlangen (im Text Halbwertszeit genannt).

2.5 Sonstige Methoden

2.5.1 Exportassay

Für den Mikroskopie basierten Exportassay wurden 8×10^4 HeLa Zellen in 12-Well Platten mit Deckgläschen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Morpholinos unter Verwendung des Endopoter Transfektionsreagenzes transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Transfektion mit dem VSVG-GFP kodierenden Expressionsplasmid und ein über Nacht Hitzeschock bei 40°C. Am Folgetag wurden die Zellen mit 100 µg/ml Cycloheximid (CHX) versetzt und für die angegebenen Zeitpunkte bei 32°C inkubiert. Anschließend wurden Fluoreszenzpräparate angefertigt (s.o.). Zellen wurden entweder mit dem dsRed-KDEL kodierenden Plasmid cotransfiziert oder mit dem *cis*-Golgi Marker GM130 gefärbt. Dies ermöglichte eine Bewertung des Sekretions-Levels anhand der Lokalisation des VSVG-Reporters im ER, Golgi oder post-Golgi Kompartimenten. Der gleiche Assay wurde in stabil exprimierenden JSI1:VSVG-GFP Zellen wie beschrieben durchgeführt. Zur Erstellung von IF-Präparaten wurden 1×10^6 Zellen pro Cytospin eingesetzt.

Für den Exportassay in Hek293 Zellen wurden diese in 6-Well Platten ausgesät und am Folgetag transfiziert. Nach Hitzeschock, CHX-Zugabe und Inkubation bei 32°C wurden die Zellen geerntet und lysiert. 10 µg Gesamtzelleextrakt wurden zur Denaturierung 10 min bei 95°C inkubiert, anschließend mit 100 U EndoH_f Enzym (NEB) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und schließlich auf einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Western Blot wurden PVDF-Membranen mit α-GFP und α-hnRNPL Antikörpern behandelt und detektiert. die Quantifizierung der Western Blots erfolgte mit der frei zugänglichen Gelquant Software (<http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html>). Die Berechnung der Exporteffizienz erfolgte nach einer bereits beschriebenen Methode (Yonekawa et al, 2011), bei der der prozentuale Anteil der EndoH_f-resistenten Form ermittelt wurde.

2.5.2 Durchflusszytometrie

Für die Auswertung des Exportassays via Durchflusszytometrie wurde der Versuch wie beschrieben, unter Verwendung einer ts045-VSVG-Variante (siehe Abschnitt 2.1.3) mit interner FLAG-Peptid-Sequenz, durchgeführt. Hek293 Zellen wurden in 12-Well Platten ausgesät und mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Nach dem über Nacht Hitzeschock wurden die Zellen trypsinisiert und zu gleichen Teilen aufgeteilt. Ein Teil wurde unmittelbar analysiert (entspricht 0 min), der andere Teil wurde für 90 min bei 32°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 4°C kaltem PBS gewaschen und dann zur Färbung des FLAG-Epitops mit α -FLAG in 3 % BSA in PBS für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte und die Inkubation mit einem Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper in 3 % BSA für 30 weitere min auf Eis. Zum Schluss wurden die Zellen gewaschen und in einem adäquaten Volumen PBS resuspendiert und mit einem Guava easy Cyte™ 8 FACS analysiert. Dabei wurde aus der Population lebender Zellen die Population GFP-exprimierender Zellen bestimmt, die wiederum auf positive FLAG-Oberflächenfärbung untersucht wurden. Die Analyse erfolgte mit der guavaSoft 2.7 Software und Messwerte wurden für weitere Berechnungen in eine Excel Tabelle exportiert. Für JSL1 Zellen erfolgte der Versuch wie beschrieben, ohne die Zellen jedoch vor der Ernte zu trypsinieren.

2.5.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Messung von IL2-Konzentrationen erfolgte in einem Sandwich ELISA mit dem ELISA MAX™ Kit (BioLegend). Dazu wurde am Vortag der Messung eine 96-Well-Platte mit dem sogenannten *capture* Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert, damit dieser an den Boden der Wells bindet. Am Folgetag wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Platte dreimal mit Wasch-Puffer (0,05 % Tween-20 in PBS) gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Platte 1 Stunde mit Puffer A schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal gewaschen und dann mit 100 μ l Zellüberstand versehen. Zur Referenz wurde eine IL2-Standardreihe verwendet, die in Halbierungsschritten ein Spektrum von 500 pg/ml bis 7,8 pg/ml abdeckte. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde die Platte viermal gewaschen und 1 Stunde mit dem sogenannten *detection* Antikörper inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und nun für 30 min mit einer Avidin-HRP-Lösung inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte und die lichtgeschützte Inkubation der Platte mit der TMB-Substrat-Lösung für

weitere 30 min. Um nach Ablauf der Inkubationszeit die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Wells zu gleichen Teilen mit 2N H₂SO₄ versehen und die Extinktion bei 450 nm mit einem TECAN GENios Microplate Reader gemessen. Alle Proben wurden in technischen Duplikaten gemessen und die Messwerte für weitere Berechnungen in eine Excel Tabelle exportiert.

Für die Messung des Gesamt IL2-Gehaltes wurden PBMCs 40 min mit 5 µg/ml Brefeldin A (BFA) bei 37°C inkubiert, bevor sie geerntet und lysiert wurden. Die Lyse erfolgte in einem nicht-denaturierenden Lysepuffer (20 mM TrisHCl pH 8, 137 mM NaCl, 10 % Glycerin, 1% NP40, 2mM EDTA sowie Proteinase-Inhibitoren).

2.5.4 Statistische Berechnungen

Angaben zur Anzahl von Experimenten und Proben befinden sich in den Bildunterschriften. Alle angegebenen Fehler repräsentieren die errechnete Standardabweichung. Unter Annahme der Normalverteilung aller gezeigten Daten, wurde die Signifikanz mittels ungepaartem Student's T-Test in Excel berechnet. Dabei wurden folgende Kriterien angewandt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Sec16 wird während der T-Zell Aktivierung alternativ gespleißt

Sec16 ist ein Multidomänen-Protein von ca. 240 kDa, das eine wichtige Rolle in der Formation und der Abschnürung von COPII-Vesikeln im frühen sekretorischen Apparat spielt. Die kodierende Sequenz von humanem Sec16 umfasst 36 Exons, die zu neun bekannten Transkripten führen, von denen sieben für Proteine kodieren (Ensemble, ENSG00000148396). Zwei der Exons wurden jüngst als alternative Exons identifiziert, deren Inklusion während dem Prozess der T-Zell Aktivierung reguliert ist (Martinez et al, 2012). Dies sind Exon 29 und 30, die Teile des C-Terminalen Bereichs des Sec16-Proteins kodieren (Abb. 3.1 A). Die unterschiedliche Inklusion der beiden alternativen Exons in die mRNA ermöglicht vier Isoformen, die entweder beide, jeweils eine oder keine der genannten variablen Exons enthalten. Diese werden dementsprechend in dieser Arbeit als „volle Länge“ (VL: inkl. E29 und E30), E29- (inkl. E29; exkl. E30), E30- (exkl. E29; inkl.E30) und Exklusions-Isoform (Exkl.: exkl. E29 und E30) bezeichnet.

Im Zell-Kultur-System können durch die Behandlung der T-Zell-Linie Jsl1 mit PMA Aspekte der T-Zell-Aktivierung primärer humaner T-Zellen nachempfunden werden (Lynch & Weiss, 2000). So konnte in einer Spleiß-sensitiven RT-PCR unter Verwendung adäquater Oligonukleotide, die in den Exons 28 und 31 binden, gezeigt werden, dass sich die Verteilung der oben genannten Isoformen nach erfolgter Stimulation substantiell ändert (Abb. 3.1 B und C).

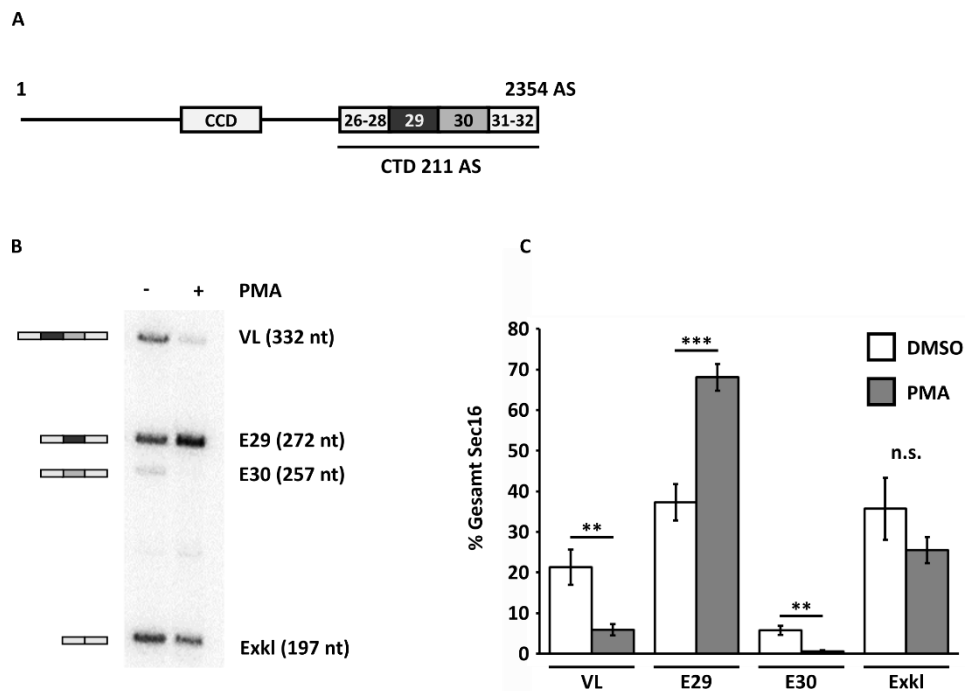


Abbildung 3. 1 Sec16 Exon 29 und 30 werden nach T-Zell Aktivierung alternativ gespleißt. A: Domänenstruktur von Sec16. CCD = *central conserved domain*, CTD = C-Terminale Domäne. Die C-Terminale Domäne umfasst 211 Aminosäuren im Falle der „volle Länge“ Isoform bestehend aus den Exons 26-32. Die Darstellung der Exons ist nicht maßstabsgetreu. **B:** Durch radioaktive Spleiß-sensitive RT-PCR können vier verschiedene Isoformen in aktivierten und ruhenden Jsl1 T-Zellen detektiert werden. Schematische Darstellung der Exonstruktur links und Nomenklatur mit Größenangabe (nt = Nukleotide) rechts. **C:** Quantifizierung drei in B repräsentierter unabhängiger Experimente. Die Grafik zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der Spleiß-Isoformen an der gesamten Sec16 mRNA +/- Standardabweichung. P-Werte sind von links nach rechts: 0,0041; 0,00067; 0,0015; 0,099.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf einer denaturierenden Urea-PAGE ermöglicht die Visualisierung der vier Spleiß-Varianten entsprechend ihrer errechneten Größe (Abb. 3.1 B). Vergleicht man das Bandenmuster ruhender und stimulierter T-Zellen, zeigt die E29-Isoform den offensichtlichsten Unterschied: Eine deutliche Zunahme nach Stimulation. Für die VL- und Exkl-Isoformen ist entsprechend eine Abnahme zu beobachten, die im Falle der Exkl-Form weniger stark ausfällt. Die E30-Isoform zeigt ebenfalls eine Reduktion und ist nach Stimulation kaum mehr sichtbar. Eine Quantifizierung unabhängiger Experimente zeigt die beobachtete Veränderungen im Verhältnis der Spleiß-Isoformen (Abb. 3.1 C).

Um eine geeignete Dauer der Stimulation für weiterführende Experimente zu bestimmen, wurde eine Stimulationszeitreihe mit anschließender Analyse des Sec16-Spleißmusters durchgeführt. Wie bereits für das Signal-induzierte Spleißen von CD45 während der T-Zell-

Aktivierung gezeigt werden konnte (Lynch & Weiss, 2000), setzt eine detektierbare Veränderung des Spleiß-Musters 24 Stunden nach Stimulation ein (Abb. 3.2).

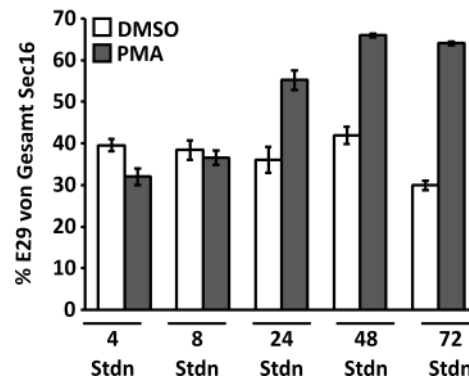


Abbildung 3. 2 Sec16 Spleiß-Zeitreihe zeigt eine Zunahme der E29 Isoform nach 24 Stunden. Die Quantifizierung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der E29 Isoform +/- Standardabweichung in aktivierten und ruhenden Jsl1 T-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten aus drei unabhängigen Experimenten.

Ein Maximum der E29 Isoform wird nach 48 Stunden erreicht und ist bis zu einem Zeitraum von 72 Stunden nach Stimulation stabil.

Um zu zeigen, dass es sich bei der beobachteten Änderung der Isoformexpression tatsächlich um ein während der T-Zell Aktivierung induziertes alternatives Spleiß-Event und nicht um eine regulierte Stabilität der einzelnen Isoformen handelt, wurde ein RNA-Stabilitäts-Assay durchgeführt. Dazu wurden Jsl1 Zellen 48 Stunden nach Stimulation mit dem Zytostatikum Actinomycin D (ActD) behandelt, welches die Transkription blockiert und die Bestimmung der mRNA-Stabilität ermöglicht. Nach erfolgter RT-PCR wurde der Anteil der jeweiligen Isoform nach Quantifizierung ermittelt und auf den Zeitpunkt T = 0 normiert (Abb. 3.3).

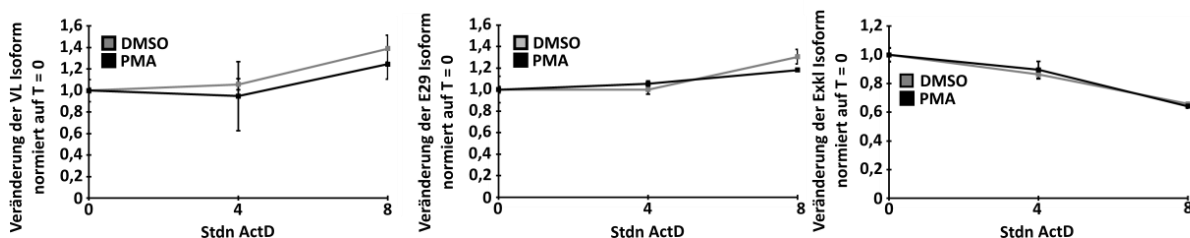


Abbildung 3. 3 Sec16 mRNA Stabilität ist während der T-Zell Aktivierung nicht reguliert.

Abb. 3.3 ff. Ruhende (DMSO) und aktivierte (PMA) Jsl1 T-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit ActD behandelt. Die Analyse der mRNA Stabilität erfolgte mit einer radioaktiven Spleiß-sensitiven RT-PCR. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der alternativen Isoformen normiert auf T = 0 +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Eine Quantifizierung für die E30 Isoform ist nicht gezeigt, da diese in aktivierten Zellen teilweise nicht zu detektieren war.

Nach Auswertung dieser Analyse war kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Stabilität der verschiedenen Spleiß-Isoformen nach T-Zell Aktivierung festzustellen.

Um ferner ausschließen zu können, dass es sich bei der Änderung im Spleiß-Muster von Sec16 um einen unspezifischen Nebeneffekt der PMA-Behandlung handelt, wurden Kontrollexperimente unter dem Aspekt der ER-Stress-Induktion durchgeführt. Unter ER-Stress versteht man im Allgemeinen eine Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine im ER, die durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden kann. In einigen Fällen kann ER-Stress zur Aktivierung pro-apoptotischer Faktoren führen, was über eine Permeabilisierung der ER-Membran zu erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen führt. Eine PMA-Behandlung resultiert durch die direkte Aktivierung der PKC ebenfalls in Ca^{2+} -Ausschüttung. Um einen möglichen Zusammenhang auszuschließen wurden ruhende und aktivierte Jsl1 Zellen via qPCR auf Expression von bekannten ER-Stress-Markern untersucht (Abb. 3.4 A): EDEM, eine Mannosidase, die im ER assoziierten Degradierungs-Signalweg (ERAD) involviert ist, und ATF4, einem während ER-Stress aktiven Transkriptionsfaktor (Oslowski & Urano, 2011). Dabei konnte nachweislich keine Induktion der genannten ER-Stress-Marker nach PMA-Stimulation beobachtet werden. Als Positivkontrolle wurden RNA-Proben aus Jsl1 Zellen verwendet, die mit Tunikamycin, einem Inhibitor der Glykoprotein-Biosynthese, behandelt wurden.

In einem weiteren Versuch wurde das Sec16 Spleiß-Verhalten unter tatsächlichen ER-Stress Bedingungen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Jsl1 Zellen zur Stress-Induktion, wie oben beschrieben, mit Tunikamycin behandelt. Die Quantifizierung radioaktiver RT-PCRs lässt in diesem Fall keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und Kontrollproben erkennen (Abb. 3.4 B).

Sec16 Spleißen wird also spezifisch mit der T-Zell Aktivierung reguliert, und bleibt unter ER-Stress Bedingungen in Jsl1 Zellen konstant.

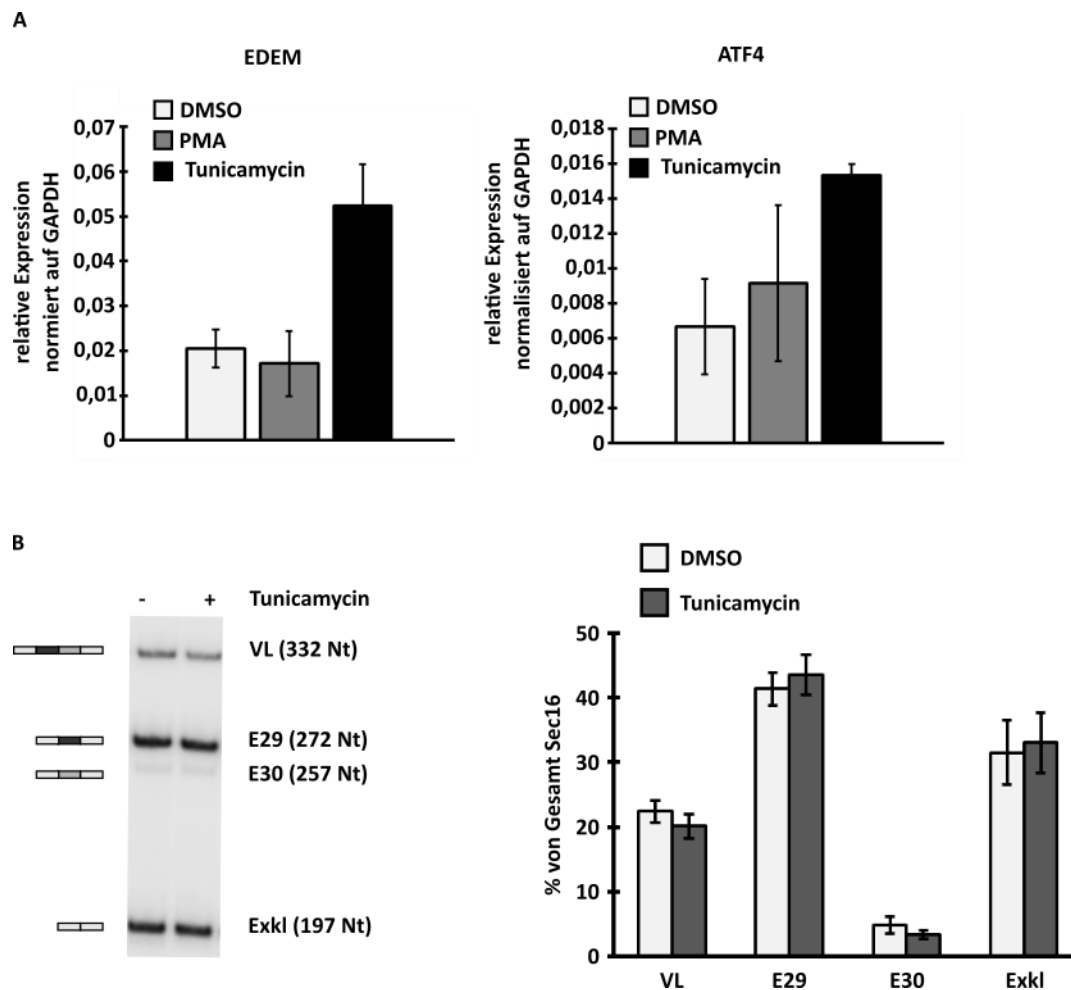


Abbildung 3. 4 Sec16 Spleißen und ER-Stress. **A:** PMA-Stimulation induziert keinen ER-Stress. Jsl1 Zellen wurden 48 Stunden mit DMSO oder PMA behandelt, als Positivkontrolle wurden Zellen mit Tunicamycin behandelt. Die Expression von zwei ER-Stress-Markern wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Die Darstellung zeigt das durchschnittliche Expressionsniveau +/- Standardabweichung normiert auf GAPDH entsprechender RNA-Proben aus drei unabhängigen Stimulationen in technischen Duplikaten gemessen. **B:** Sec16 Spleißen bleibt unter ER-Stress konstant. Jsl1 Zellen wurden wie in A mit Tunicamycin behandelt, um ER Stress zu induzieren. Die Analyse der RNA erfolgte in einer radioaktiven Spleiß-sensitiven RT-PCR wie in Abb. 3.1 B. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der Sec16 Isoformen +/- Standardabweichung für n = 6. Daten aus B zur Verfügung gestellt von Dr. M. Preußner.

Um den beobachteten Unterschied der Isoformexpression auf mRNA-Ebene auf der Gesamtprotein-Ebene zu bestätigen, wurden Gesamtzellextrakte von stimulierten und ruhenden Jsl1 Zellen angefertigt, welche im Weiteren nach erfolgter Auftrennung auf einer 6%-SDS-PAGE mittels Western Blot untersucht wurden. Danach wurde durch Verwendung des Sec16 Antikörpers eine distinkte Bande detektiert, die im Vergleich beider Proben keinen Unterschied erkennen ließ. Dies zeigt, dass die Gesamtproteinmenge von Sec16 nach Stimulation gleich bleibt. Nach Auftrennung vergleichbarer Proben auf einer 4-12 % NUPAGE®

war es hingegen möglich drei Banden zu detektieren, von denen die mittlere Bande in stimulierten Proben an Intensität gewinnt (Abb. 3.5 B, rechts). Dies deutet darauf hin, dass auch auf Proteinebene die alternativen Sec16-Isoformen exprimiert werden. Die Detektion von drei statt der vier beschriebenen Formen liegt möglicherweise an dem geringen Massenunterschied der E29- und E30-Isoform, die sich in lediglich fünf Aminosäuren unterscheiden.

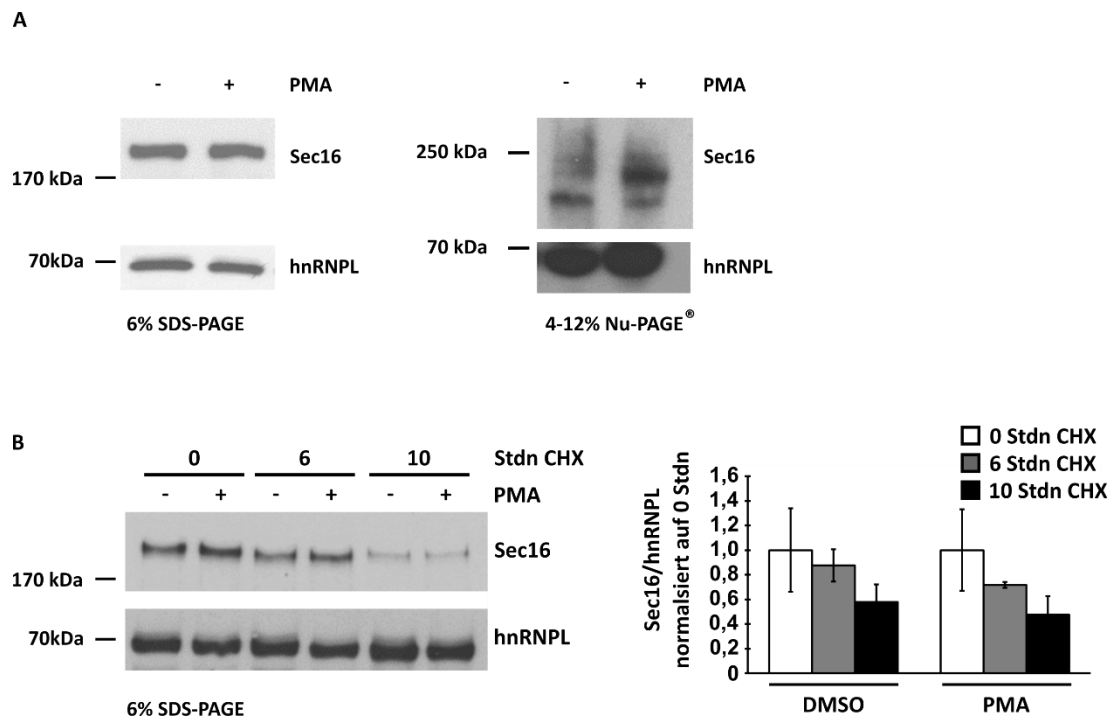


Abbildung 3. 5 Nachweis der Sec16 Spleiß-Isoformen auf Proteinebene und Bestimmung der Halbwertszeit. A: 20 µg Gesamtzelleextrakt von stimulierten und ruhenden Jsl1 T-Zellen wurden mit einer 6 %-SDS-PAGE (links) und einer 4-12 %-Gradienten-NuPAGE® (rechts) aufgetrennt und nach erfolgtem Western Blot mit Sec16 Antikörper nachgewiesen. hnRNPL diente als Ladekontrolle. **B:** Sec16 hat eine Halbwertszeit von ca. 10 Stunden in aktivierten und ruhenden Jsl1 T-Zellen. Aktivierte und ruhende Jsl1 T-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 40 µg/ml CHX behandelt. 20 µg Gesamtzelleextrakt wurden im Western Blot unter Verwendung des Sec16 Antikörpers und hnRNPL als Ladekontrolle analysiert. Die Quantifizierung der Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten zeigt das durchschnittliche Verhältnis von Sec16 zur Ladekontrolle +/- Standardabweichung.

In einem weiteren Versuch wurde die Halbwertszeit des Sec16-Proteins bestimmt. Hierfür wurden Jsl1 Zellen 48 Stunden nach Stimulation mit dem Antibiotikum Cycloheximid (CHX) behandelt, welches in eukaryotischen Zellen zur Hemmung der Proteinbiosynthese führt und dadurch eine Bestimmung der Proteinstabilität ermöglicht. Dabei zeigte sich nach Quantifizierung entsprechender Western Blots, dass Sec16 in stimulierten als auch in

ruhenden Jsl1 Zellen eine Halbwertszeit von etwa 10 Stunden aufweist (Abb. 3.5 B), was mit Ergebnissen aus anderen Zelltypen vergleichbar ist (Tillmann et al, 2015). Aufgrund der beobachteten Veränderung im Sec16 Spleiß-Muster 48 Stunden nach Stimulation und der ermittelten Halbwertszeit des Proteins von 10 Stunden, wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente 48 Stunden nach Stimulation durchgeführt, um von einem vollständigen Austausch der Isoformen auch auf Proteinebene ausgehen zu können.

3.2 Überexpression der Sec16-CTD wirkt sich negativ auf die Golgi-Morphologie aus

Die beiden alternativen Exons E29 und E30 kodieren für Teile der C-Terminalen-Domäne (CTD) im Sec16 Protein. Dieser Bereich des Proteins ist als Interaktionspartner der beiden COPII-Proteine Sec12 und Sec23 beschrieben (Bhattacharyya & Glick, 2007; Montegna et al, 2012). In einem Überexpressionsversuch sollten die alternativen Sec16 Isoformen auf eine mögliche unterschiedliche Funktionalität im sekretorischen Apparat untersucht werden. Wie bereits in einer früheren Studie gezeigt werden konnte, resultiert die Überexpression der Sec16-CTD (in dieser Arbeit die VL-Isoform) in einer zytoplasmatischen Lokalisation und Zerstörung der Struktur des Golgi-Apparates und anderer sekretorischer Kompartimente, indem es andere COPII-Komponenten blockiert (Bhattacharyya & Glick, 2007). Eine derartige Blockade des anterograden Transports blockiert den Export von Komponenten, die u.a. für die Aufrechterhaltung des Golgi-Apparates wichtig sind. Eine Unterbrechung dieses Transports führt zur Auflösung der distinkten Golgi-Struktur. In dem hier beschriebenen Versuch wurden Expressionskonstrukte generiert, die für die vier verschiedenen Isoformen mit C-Terminal fusioniertem GFP kodieren (Abb. 3.6 A). In einem ersten Kontrollversuch wurde das Expressionsniveau der verschiedenen Konstrukte analysiert, um dosisabhängige Effekte in Folgeexperimenten ausschließen zu können. Dazu wurden Gesamtzellextrakte transfizierter HeLa-Zellen im Western Blot untersucht (Abb. 3.6 B). Hiernach war im Vergleich mit der Ladekontrolle GAPDH kein Unterschied im Expressionsniveau zu erkennen. Als Kontrolle diente ein GFP-Expressionsvektor ohne Fusionsprotein (LV = Leervektor).

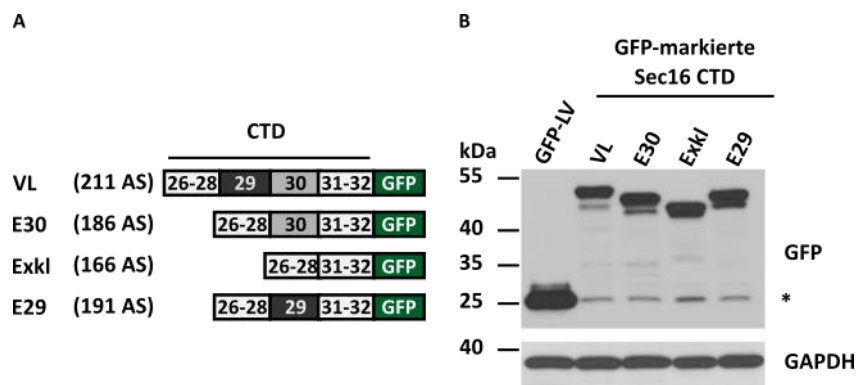


Abbildung 3. 6 Überexpression von Sec16 CTDs in HeLa Zellen A: Schematische Darstellung der alternativen Sec16 Isoformen als GFP-Fusionskonstrukt. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. **B:** Vergleich des Expressionsniveaus der Sec16-CTD-Konstrukte. 10 µg Gesamtzelleextrakt transfizierter HeLa Zellen wurden mittels Immunoblot auf Vergleichbarkeit untersucht. GAPDH diente als Ladekontrolle, * markiert GFP allein.

Um eine qualitative Aussage über die Integrität des Golgi-Apparates nach Überexpression der Sec16-CTDs treffen zu können, wurde zunächst ein ausführlicher Kontrollversuch durchgeführt, in dem einige Bewertungskriterien festgelegt wurden. In mehreren unabhängigen Experimenten wurde der Golgi-Apparat unbehandelter und transfizierter HeLa Zellen gefärbt und analysiert (Abb. 3.7). Der Golgi-Apparat ist in unbehandelten HeLa Zellen als eine zusammenhängende kompakte Struktur in der Nähe des Zellkerns zu sehen (Obere Bildreihen). Die Auflösung dieser definierten Struktur führt zu einem punktartigen Verteilungsmuster bis in die Zellperipherie (mittlere Bildreihen, Zellen nach Überexpression der Sec16-CTD, GFP nicht gezeigt).

Zellen, die sich gerade in der Teilungsphase befinden, weisen ebenfalls eine aufgelöste Golgi-Struktur auf (untere Bildreihen). Diese Zellen konnten durch Färbung der DNA mit Hoechst anhand des kondensierenden oder bereits geteilten Chromatins identifiziert und somit von der Quantifizierung ausgeschlossen werden.

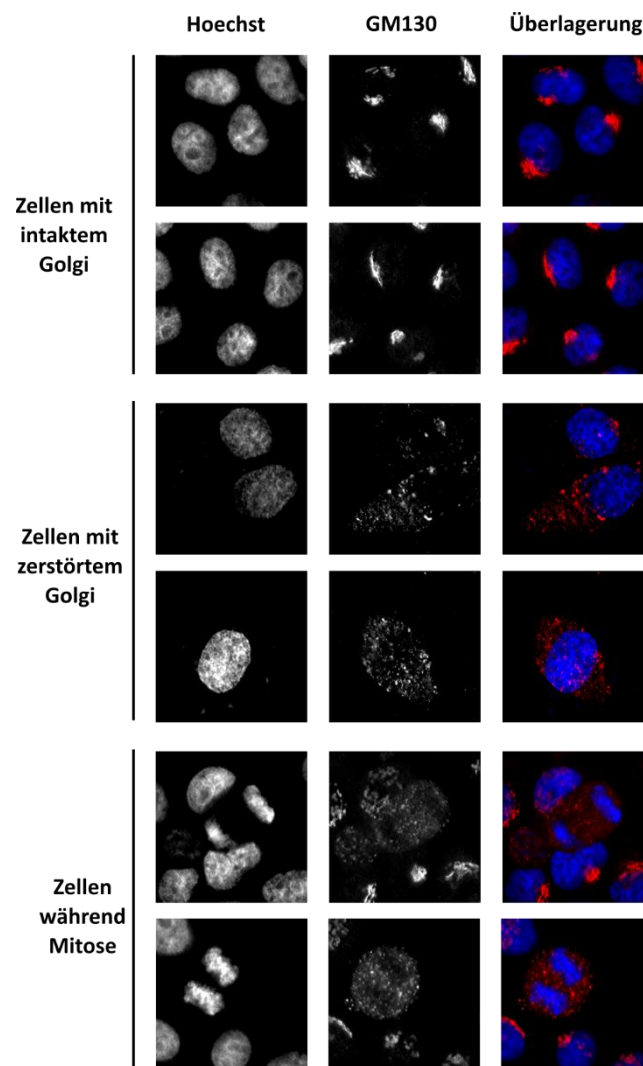


Abbildung 3. 7 Definition der Golgi-Morphologie. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von HeLa Zellen, deren Golgi-Apparat jeweils unter Verwendung des *cis*-Golgi Markers GM130 visualisiert wurde. Die obere Bildreihe zeigt den Golgi-Apparat unbehandelter Zellen, dessen Struktur als intakt definiert wurde. Die mittlere Bildreihe zeigt eine zerstörte Golgi-Struktur, während die untere Bildreihe den veränderten Golgi-Apparat in sich teilenden Zellen zeigt.

Um den differentiellen Einfluss der alternativen Sec16-CTDs auf die Golgi-Morphologie zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit den eingangs beschriebenen Konstrukten transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 gefärbt. In einem fluoreszenzmikroskopischen Ansatz wurden transfizierte Zellen aufgrund ihres GFP-Signals identifiziert und auf ihre Golgi-Morphologie untersucht. Die Expression der CTD allein resultiert in einer zytoplasmatischen Lokalisation, da die CCD-Sequenz, die für die Lokalisation am ER wichtig ist, nicht vorhanden ist (Bhattacharyya & Glick, 2007). Dabei zeigte sich, dass

sich die Überexpression der verschiedenen Sec16-Varianten unterschiedlich stark auf den Zusammenfall des Golgi-Apparates auswirkten (Abb. 3.8).

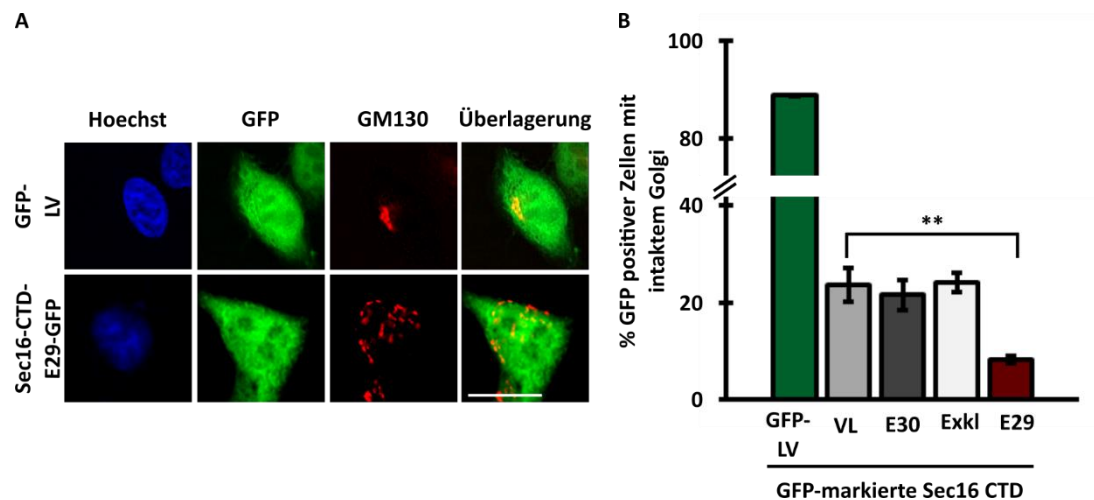


Abbildung 3. 8 Überexpression der Sec16 CTD führt zur Zerstörung der Golgi-Struktur. A: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder zeigen HeLa Zellen, die mit den angegebenen Expressionskonstrukten transfiziert wurden. Positiv transfizierte Zellen wurden mittels GFP-Fluoreszenz identifiziert und ihr Golgi-Apparat durch Färbung mit dem *cis*-Golgi Marker GM130 visualisiert. Kontrollzellen (obere Bildreihe) wurden mit GFP-Leervektor transfiziert und weisen eine intakte Golgistruktur auf, während Zellen die mit dem E29-CTD-GFP Fusionskonstrukt transfiziert wurden, eine zerstörte Golgistruktur zeigen. Der Maßstab entspricht 20 μ m. **B:** Überexpression der Sec16-E29-CTD hat den stärksten Einfluss auf die Zerstörung des Golgi-Apparates. In B beschriebene Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit mind. 100 Zellen pro Kondition auf ihre Golgi-Struktur untersucht. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen mit intakter Golgi-Struktur +/- Standardabweichung. $p = 0.0015$.

Der stärkste Effekt, bei konstantem Expressionslevel aller Konstrukte, wurde für die E29-Isoform beobachtet. Um sicherzustellen, dass es sich bei den beobachteten Effekten nicht um Artefakte einer Überexpression handelt, wurden parallel Zellen analysiert, welche GFP allein ohne Fusionsprotein exprimierten (GFP-LV). In diesen Zellen wurde ein erheblich geringerer Prozentsatz mit einer zerstörten Golgi-Struktur beobachtet.

Die Überexpression der alternativen Sec16 C-Termini übte sich also unterschiedlich stark auf die Integrität des Golgi-Apparates aus, was auf unterschiedliche Funktionen der Sec16-CTDs hinweist, die evtl. über eine differentielle Interaktion mit anderen COPII-Komponenten vermittelt wird.

3.3 Aktivierte T-Zellen weisen eine erhöhte Effizienz im anterograden Transport und eine erhöhte Anzahl von COPII Vesikeln auf

Nach erfolgter Aktivierung produziert eine T-Zelle im Zuge der Immunantwort erhebliche Mengen an Effektor-Molekülen wie Zytokinen und Zytotoxinen. Deshalb wird vermutet, dass die aktivierte T-Zelle ihren Sekretionsapparat an die erhöhte Anzahl zu transportierender Moleküle anpasst. Während Prozesse regulierten Proteintransports in aktivierten T-Zellen bislang hauptsächlich für post-Golgi-Kompartimente beschrieben sind (Lettau et al, 2007), ist sehr wenig über die frühen Prozesse des sekretorischen Transportwegs bekannt.

In einem initialen Experiment wurde deshalb zunächst die Effizienz des anterograden Transports, dem Weg vom ER in Richtung des Golgi-Apparates, im Vergleich von aktivierten und ruhenden T-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Jsl1 Zell-Linien etabliert, die stabil den Reporter ts045-VSVG-GFP exprimieren. Dieses Protein ist eine Abwandlung des vesikulären Stomatitis-Virus-Glykoprotein und ein etablierter Reporter um den anterograden Transport zu studieren (Presley *et al.*, 1997). Durch eine Mutation wird das Protein temperatursensitiv, und wird, nachdem man es einem Hitzeschock von 40°C ausgesetzt hat, aufgrund einer Fehlfaltung im ER zurückgehalten. Diese Fehlfaltung ist reversibel, sodass das Protein bei 32°C seine korrekte Konformation einnimmt und sekretiert werden kann. Als Glykoprotein ist VSVG an der Plasmamembran einer Zelle zu finden, in welche es durch eine Transmembrandomäne inseriert ist. Durch die Fusion mit GFP kann man die Sekretion fluoreszenzmikroskopisch verfolgen. Für die Analyse der Transporteffizienz in aktivierten T-Zellen wurden stabile Jsl1:ts045-VSVG-GFP-Zellen 48 Stunden nach Stimulation einem 40°C-Hitzeschock über Nacht ausgesetzt. Am Folgetag wurde den Proben Cycloheximid (CHX) zugegeben, um eine Neusynthese des Reporterproteins zu blockieren, und für die angegebenen Zeitpunkte bei 32°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben fixiert und verschiedene Kompartimente des sekretorischen Apparates fluoreszenz-immunologisch gefärbt. Dabei zeigte sich in anfänglichen Vorversuchen, dass ts045-VSVG-GFP nach dem Hitzeschock in Strukturen, die positiv für den ERGIC-Marker ERGIC53 sind, lokalisiert (Abb. 3.9 B). Deshalb wurde die Lokalisation dieses Proteins nach Hitzeschock untersucht. Dazu wurden Jsl1 Zellen mit dem dsRed-KDEL kodierenden Expressionsplasmid transfiziert und analog der für den Exportassay beschriebenen Prozedur behandelt. Eine Färbung dieser Zellen mit dem ERGIC-Marker ERGIC53 zeigte eine deutliche Colokalisation mit dem exprimierten ER-Marker (Abb. 3.9 A). Vermutlich führt der Hitzeschock zu einem Zusammenbruch des ERGIC und zur

Relokalisation ERGIC residenter Proteine in das ER. Aufgrund dieser Annahme und der beschriebenen Beobachtung wurde davon ausgegangen, dass ts045-VSVG-GFP nach über Nacht Hitze-Schock von 40°C tatsächlich im ER, und nicht im ER-Golgi intermediären Kompartiment lokalisiert.

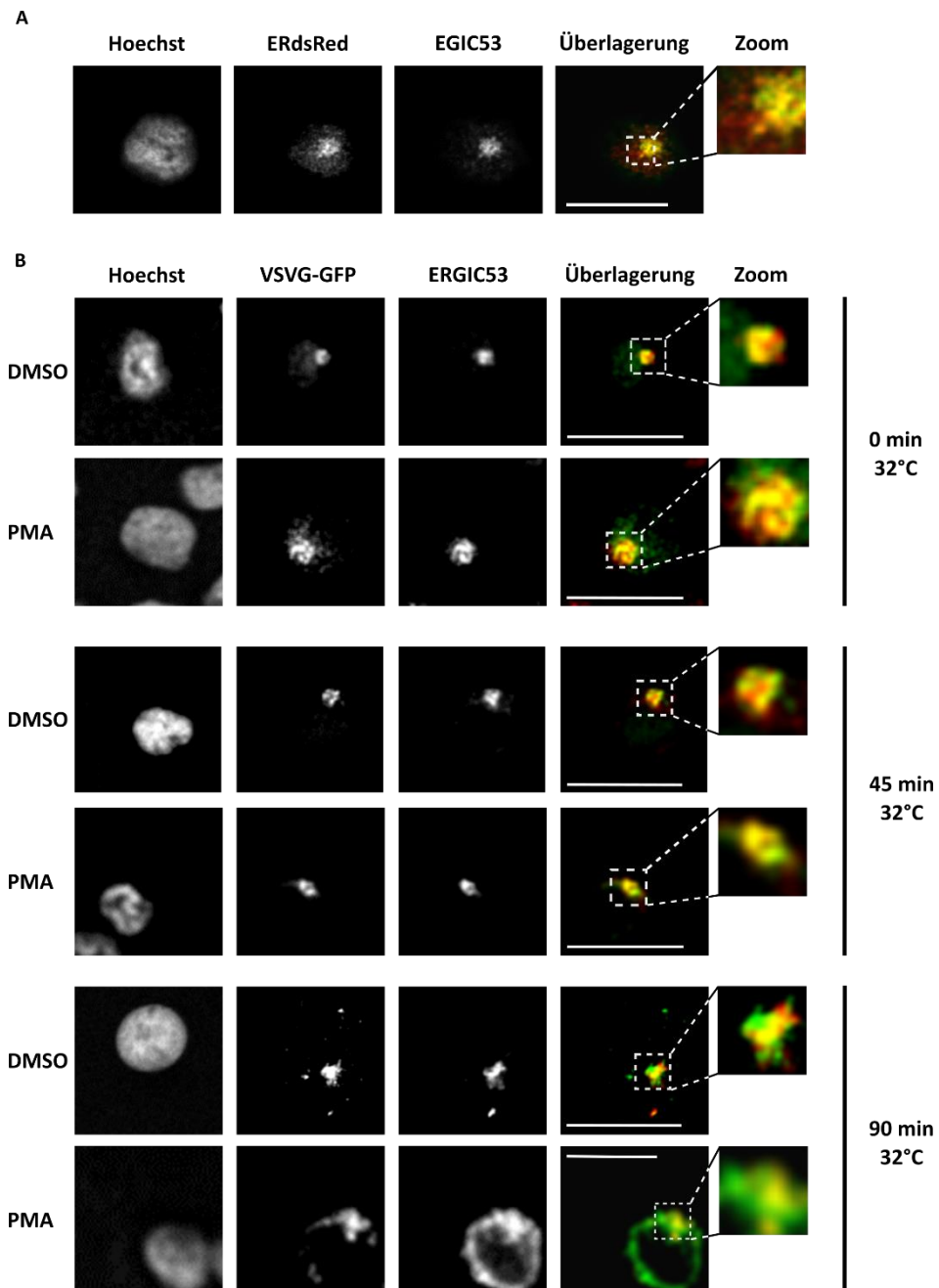


Abbildung 3. 9 Exportassay in Jsl1 Zellen.

Abb. 3.9 ff. A: ERGIC53 lokalisiert nach 40°C über Nacht Hitzeschock im ER in Jsl1 Zellen. Repräsentative Colokalisation. Jsl1 Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, welches dsRed gekoppelt an ein ER Retentions-Signal exprimiert. Die Zellen wurden einem über Nacht Hitzeschock von 40°C ausgesetzt, am Folgetag fixiert und mit dem ERGIC-Marker ERGIC53 gefärbt. Der Maßstab entspricht 20 µm. **B:** VSVG-GFP lokalisiert nach Hitzeschock in ERGIC53 positiven Strukturen in Jsl1 Zellen. VSVG-GFP exprimierende Jsl1 Zellen wurden mit DMSO oder PMA behandelt und einem über Nacht Hitzeschock von 40°C ausgesetzt. Die Lokalisation des Reporterproteins erfolgte via Fluoreszenzmikroskopie. Zu sehen sind repräsentative Cofärbungen mit dem ERGIC-Marker ERGIC53. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Die Transporteffizienz wurde anhand der Lokalisation des GFP-Signals bestimmt und zwischen ruhenden (DMSO) und aktivierten (PMA) T-Zellen verglichen. Dabei wurde unter Berücksichtigung der ERGIC53 Cofärbung zwischen sekretiertem und nicht sekretiertem Protein unterschieden. Eine Colokalisation mit ERGIC53 wurde als nicht sekretiert bewertet, da ERGIC53 selbst nach 40°C Hitzeschock im ER relokalisiert (Abb. 3.9 A). Eine Lokalisation außerhalb ERGIC53-positiver ER-Strukturen im Zytoplasma und an der Zellmembran wurde als sekretiert bewertet. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien, war die Anzahl der Zellen, die eine vollständige Sekretion des Reporterproteins 90 min nach Hitzeschock zeigten, in stimulierten Zellen deutlich erhöht (Abb. 3.10 A).

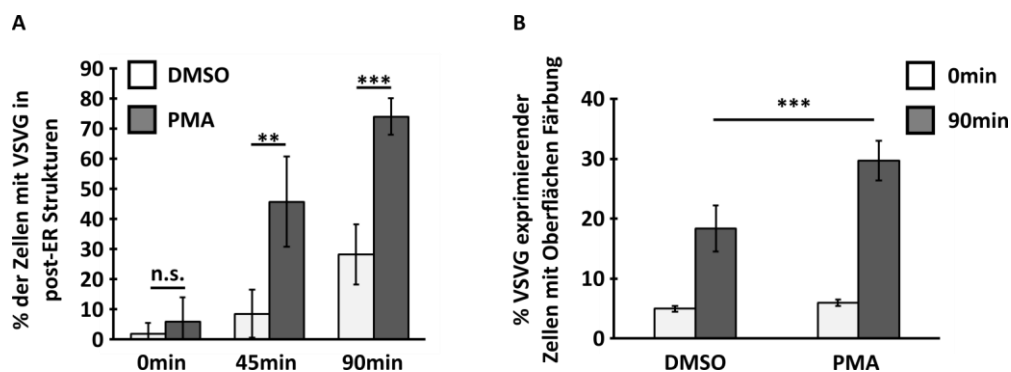


Abbildung 3.10 Sekretionseffizienz steigt mit der T-Zell Aktivierung. A: In Abb. 3.9 B beschriebene Zellen wurden hinsichtlich der Lokalisation des Reporters quantifiziert. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil ruhender (DMSO) und aktivierter (PMA) T-Zellen mit VSVG-GFP in post-ER Strukturen nach Analyse zwei unabhängiger Klone in zwei unabhängigen Experimenten, mit mind. zehn Zellen pro Zeitpunkt und Kondition. P-Werte von links nach rechts: 0,33; 0,0012; $2,2 \times 10^{-4}$. **B:** Quantifizierung des ER-Exports nach Oberflächenfärbung mittels FACS. Die Darstellung zeigt die durchschnittliche prozentuale Anzahl GFP-exprimierender Zellen mit positiver Oberflächenfärbung aus vier unabhängigen Experimenten, $p = 6,5 \times 10^{-6}$.

Die in Abb. 3.10 A gewonnenen Erkenntnisse beruhen auf der Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen und unterscheiden nicht zwischen verschiedenen

Stufen der Sekretion, sondern zwischen ER-resident und in post-ER Strukturen lokalisiert. Diese Ergebnisse sollten mit einer zusätzlichen quantitativen Methode untermauert werden. Deshalb wurde ein Exportassay mit einer auf Durchflusszytometrie basierenden Auswertung etabliert, der den Level der Sekretion an einem definierten Punkt misst. Zu diesem Zweck wurde das bereits beschriebene Reporterkonstrukt ts045-VSVG-GFP modifiziert, indem eine für das FLAG-Peptid kodierende Sequenz in eine interne EcoNI-Schnittstelle in die VSVG-Sequenz inseriert wurde, ohne den Leserahmen zu unterbrechen oder zu verändern. Der modifizierte Bereich des Reporters entspricht der extrazellulären Domäne des Glykoproteins und sollte eine Oberflächenfärbung nach erfolgreicher Sekretion ermöglichen. Die Auswertung dieses Versuchs nach FACS-Messung bestätigte eine signifikant höhere Sekretionseffizienz in stimulierten Jsl1 Zellen verglichen zu ruhenden Zellen (Abb. 3.10 B). Zwar war der prozentuale Anteil an Zellen mit positiver Oberflächenfärbung kleiner als der im vorangegangenen Versuch mikroskopisch bestimmte Anteil an Zellen mit vollständiger Sekretion, doch das Verhältnis in ruhenden und aktivierten T-Zellen blieb gleich und unterstützt damit die bereits gewonnenen Erkenntnisse.

So konnte also eine höhere Exporteffizienz in aktivierten T-Zellen beobachtet werden. Wie diese durch den sekretorische Apparat ermöglicht wird, war bislang jedoch nicht bekannt. Deshalb wurde die Morphologie sekretorisch aktiver Kompartimente des anterograden Transportweges vor und nach Stimulation in einem fluoreszenzmikroskopischen Ansatz untersucht. Darunter waren ER, ERES, ERGIC, der Golgi-Apparat sowie COPII-Vesikel. Um das ER zu visualisieren, wurden stabile Jsl1 Zellen etabliert, die das fluoreszierende Protein *dsRed* gekoppelt an das ER-Retentions-Signal KDEL exprimieren. Dabei war kein substantieller Unterschied in der Struktur des ER vor und nach Stimulation zu beobachten (Abb. 3.11, obere Bildreihe).

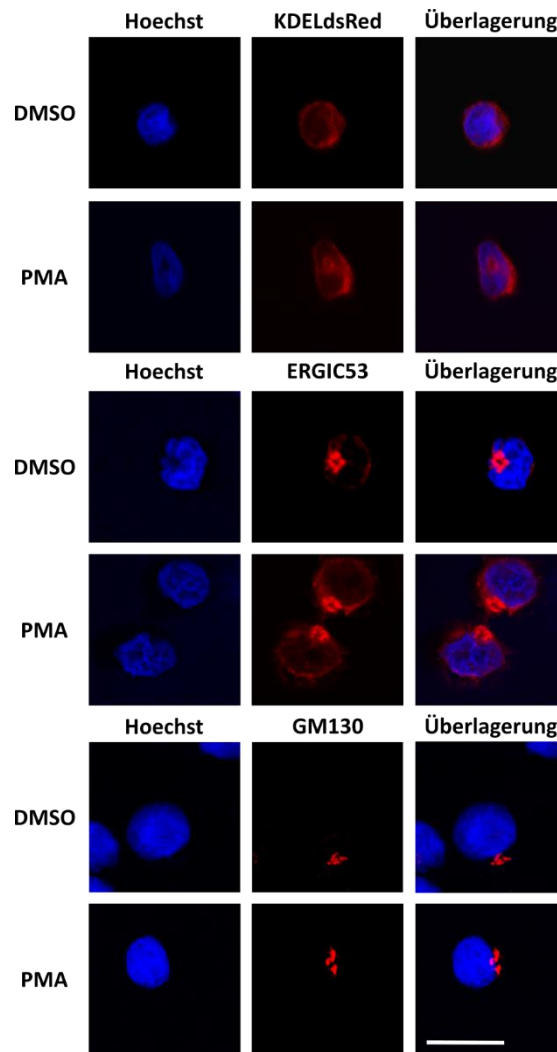


Abbildung 3.11 Die Morphologie der sekretorischen Kompartimente ER, ERGIC und Golgi-Apparat zeigen keine Veränderung nach T-Zell Aktivierung. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder ruhender und aktiviert Jsl1 T-Zellen mit Färbung verschiedener Kompartimente des frühen Sekretionsweges. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Dem Sekretionsfluss folgend wurde das ER-Golgi-intermediäre Kompartiment (ERGIC) mit dem bereits erwähnten Marker ERGIC53 gefärbt und analysiert. Die Färbung des ERGIC wies eine ringähnliche Struktur auf, die in kernnahe beobachtet werden konnte (Abb. 3.11, mittlere Bildreihe). Auch dieses Kompartiment wies keinen signifikanten Unterschied in seiner Morphologie vor und nach Stimulation auf. Als finale Station des anterograden Transportweges wurde der Golgi-Apparat durch Färbung mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 analysiert. Die kompakte Struktur in kernnahe veränderte sich ebenfalls nicht in stimulierten T-Zellen (Abb. 3.11, untere Bildreihe). Um die am ER lokalisierten *exit sites* (ERES) zu untersuchen, wurden diese mit einem Antikörper gegen Sec16A fluoreszenzimmunologisch gefärbt. Sec16-positive Strukturen waren in einem punktartigen Muster im Zytoplasma

organisiert, die sich in der Nähe des Zellkerns in einer ringähnlichen Struktur konzentrierten (Abb. 3.12 A). Die Verteilung, als auch die Anzahl der ERES zeigten keine Veränderung nach erfolgter Stimulation (Abb. 3.11 B, Sec16). Als letzte Komponente des frühen sekretorischen Apparates wurden COPII-Vesikel fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurde Sec31, Teil des Sec13-31 Heterotetramers der äußeren Vesikelhülle, als Marker für COPII-Vesikel verwendet (Hughes et al; Zeuschner et al, 2006). Während das Verteilungsmuster in Anzahl und Struktur in ruhenden T-Zellen stark dem der Sec16-positiven ERES ähnelte, konnte in aktivierten Zellen ein substantieller Unterschied beobachtet werden. Zunächst konnte eine Veränderung im Verteilungsmuster der Vesikel beobachtet werden, indem sich mehr Vesikel in der Zellperipherie außerhalb der beschriebenen ringähnlichen Struktur befanden. Außerdem hat sich die Anzahl der Vesikel ebenfalls nach Stimulation vergrößert (Abb. 3.12 A).

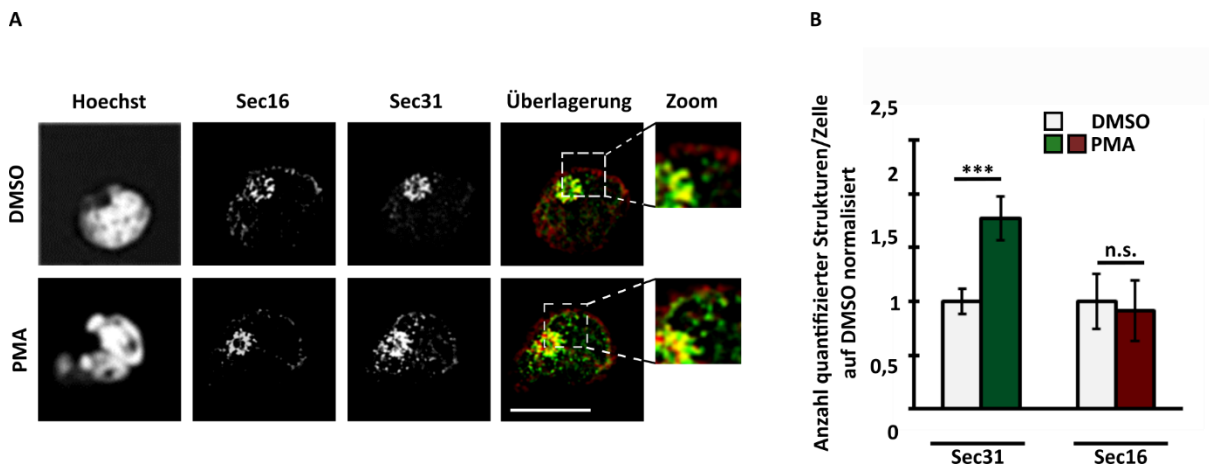


Abbildung 3. 12 Anzahl von COPII Vesikeln steigt mit der T-Zell Aktivierung. A: Die Anzahl der ERES nach T-Zell Aktivierung ist konstant, während die Anzahl der COPII-Vesikel zunimmt. Repräsentative Fluoreszenzbilder ruhender (DMSO) und aktivierter (PMA) T-Zellen mit Färbung der ERES (Sec16; rot in der Überlagerung) und COPII-Vesikel (Sec31; grün in der Überlagerung). Der Maßstab entspricht 20 μm . **B:** Quantifizierung von ERES und COPII-Vesikeln in A beschriebener Zellen. Die Darstellung zeigt die durchschnittliche Anzahl von ERES und Vesikeln pro Zelle +/- Standardabweichung mit DMSO = 1 gesetzt aus drei unabhängigen Experimenten mit 15 Zellen pro Kondition. P-Werte sind 0.00094 für Sec31 und 0.47 für Sec16.

Um eine qualitative Aussage treffen zu können, wurden die entsprechenden Aufnahmen mit dem für die Bildanalyse etablierten Programm ImageJ quantifiziert. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der COPII-Vesikel nach Stimulation von Jsl1 T-Zellen um den Faktor 1,7 erhöht, während die Anzahl Sec16 positiver ERES konstant bleibt (Abb. 3.12 B).

Eine Tabelle mit Auflistung der quantifizierten Strukturen befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 4).

Dass die Zunahme an COPII-Vesikeln nicht unmittelbar mit einer Zunahme an COPII-Proteinen gekoppelt ist, konnte durch die Analyse von Gesamtzellextrakten stimulierter und ruhender Jsl1 Zellen im Western Blot demonstriert werden (Abb. 3.13).

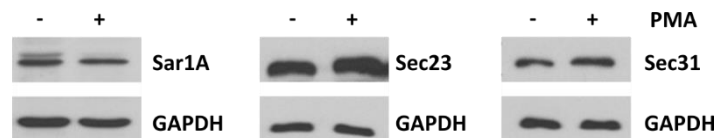


Abbildung 3. 13 Western Blot Analyse von COPII-Proteinen in ruhenden und stimulierten Jsl1 Zellen. Geringe Unterschiede im Gesamtproteingehalt von Sar1A/B, Sec23 und Sec31 im Vergleich mit der GAPDH Ladekontrolle sind in repräsentativ dargestellten Western Blots zu sehen.

Getestet wurden die Gesamtprotein-Level der GTPase Sar1A, sowie jeweils einem repräsentativen Protein der inneren und äußeren Vesikelhülle mit Sec23 und Sec31. In Western Blots gegen Sar1 war in den Proben unstimulierter Zellen mehrfach eine zusätzliche Bande oberhalb der Hauptbande zu erkennen, in Proben stimulierter Proben hingegen nicht. Dies spricht für eine mögliche Modifikation des Proteins, die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde. Für Sec23 und Sec31 war ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Gesamtproteingehalt zu beobachten.

So ließen aktivierte Jsl1 T-Zellen Veränderungen im frühen sekretorischen Apparat beobachten, indem sie eine höhere Exporteffizienz sowie eine Zunahme vesikulärer Strukturen aufzeigten, die nicht mit einem Anstieg der Gesamtprotein-Level zu erklären sind.

3.4 Sec16 E29 vermittelt die Stimulations-induzierte Zunahme von COPII Vesikeln in T-Zellen

Um den Zusammenhang zwischen Sec16-Spleißen und den beschriebenen Effekten in der T-Zell-Aktivierung herzustellen, wurde zunächst das Spleiß-Muster in Jsl1 T-Zellen manipuliert, um die aktivierungsinduzierte Veränderung des Sec16 Spleißens zu blockieren. Dies geschah durch Transfektion mit modifizierten *antisense* Oligonukleotiden (Morpholinos), welche durch die Blockierung der 5'-Spleiß-Stelle zur Exklusion des zu untersuchenden Exons führen (Abb. 3.14 A). RNA-Extrakte Morpholino transfizierter und stimulierter Zellen wurden in einer

radioaktiven Spleiß-sensitiven RT-PCR untersucht. Als Kontrolle wurde ein vom Hersteller bereitgestellter Morpholino verwendet (Sequenz siehe Anhang, Tabelle 1), um zusätzlich die Spezifität des E29-Morpholinos zu überprüfen und *off target*-Effekte ausschließen zu können. So konnte gezeigt werden, dass die starke Zunahme der E29-Isoform während der Stimulation durch die Behandlung mit dem Morpholino blockiert werden kann und sogar unter dem Level der Kontrollmorpholino transfizierten unstimulierten Proben liegt (Abb. 3.14 B und C).

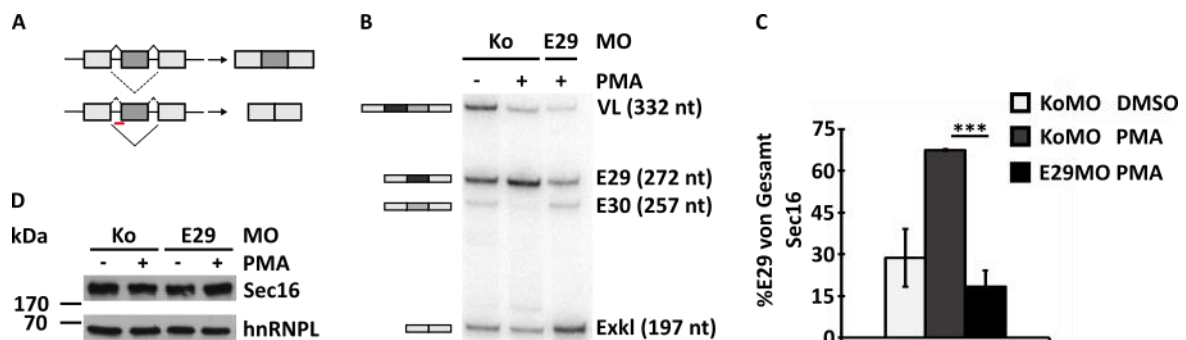


Abbildung 3. 14 Manipulation von Sec16 Spleißen in Jsl1 Zellen A: Vereinfachte schematische Darstellung des Morpholino Wirkungsprinzips. Das Ziel-Exon des Morpholinos (roter Balken) ist grau gefärbt. **B:** Transfektion mit Sec16 E29MO führt zur Exklusion von E29. Repräsentative Radioaktive Spleiß-sensitiven RT-PCR von ruhenden und aktivierten T-Zellen, entsprechend der Beschriftung transfiziert, belegt den Effekt des Morpholinos. **C:** Quantifizierung der Sec16 E29 Isoform von drei unabhängigen in B beschriebenen Experimenten. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der E29 Isoform von Gesamt Sec16 +/- Standardabweichung. $P = 1,3 \times 10^{-4}$ **D:** Morpholino-Behandlung hat keinen Einfluss auf den Sec16-Gesamtproteingehalt in Jsl1 Zellen. Immunoblot-analyse von 20 µg Gesamtzellextrakt wurden auf einer 6%-SDS-PAGE aufgetrennt und mit Sec16-Antikörper detektiert. hnRNPL diente als Ladekontrolle. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus unabhängigen Experimenten ($N > 3$).

Diese Veränderungen des Sec16-Spleißens haben keine Auswirkung auf den Sec16 Gesamtproteingehalt, wie durch Western Blot Analyse entsprechender Proben gezeigt werden konnte (Abb. 3.14 D).

Zellen mit stimulationsinduziertem veränderten Sec16 Spleiß-Verhalten wurden, im Vergleich mit einer Kontrollpopulation, auf morphologische Unterschiede im sekretorischen Apparat vor und nach Stimulation untersucht. Die Analyse der ERES und COPII-Vesikel in der Kontrollgruppe zeigte den bereits zuvor beobachteten Anstieg von Vesikeln 48 Stunden nach Stimulation, während die Anzahl der ERES konstant blieb. Eine stimulationsinduzierte Zunahme vesikulärer Strukturen blieb in Zellen, die mit dem E29-Morpholino behandelt

waren, jedoch völlig aus. Ebenso konnte keine Veränderung in der Anzahl und Lokalisierung der ERES beobachtet werden (Abb. 3.15). Eine Tabelle mit Auflistung der quantifizierten Strukturen befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 5).

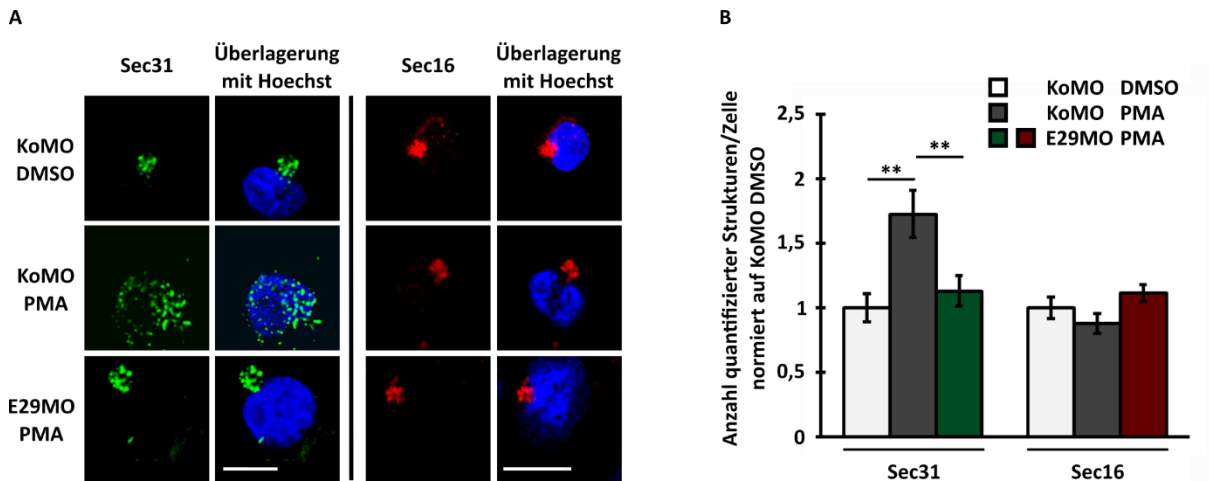


Abbildung 3. 15 Transfektion des E29MOs verhindert die Zunahme von COPII Vesikeln nach T-Zell Aktivierung in JSL1 Zellen. **A:** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von Sec31 (grün) und Sec16 (rot) in Morpholino behandelten Jsl1 Zellen +/- PMA. Der Maßstab entspricht 20 μm . **B:** In A beschriebene Zellen wurden mit dem ImageJ *particle counting tool* analysiert. Die Darstellung zeigt die durchschnittliche Anzahl quantifizierter Strukturen normiert auf KoMO DMSO +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit 15 Zellen pro Kondition. P-Werte sind 0,00409 (KoMO DMSO-PMA) und 0,00912 (PMA KoMO-E29MO).

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3 und 3.4 bringen eine höhere Sekretionseffizienz in aktivierten T-Zellen in Zusammenhang mit einer einhergehenden Zunahme von COPII-Vesikeln, die wiederum von der Zunahme der Sec16 E29-Isoform abhängig ist (Abb. 3.15).

Um diese Ergebnisse miteinander zu verknüpfen, wurde ein Exportassay in aktivierten T-Zellen mit Spleiß-manipulierenden Morpholinos durchgeführt. Dazu wurden Jsl1 Zellen mit Morpholinos transfiziert, um eine Exklusion von Sec16 E29 zu induzieren. 48 Stunden später wurden sie mit dem modifizierten ts045-FLAGint-VSVG-GFP Expressionsplasmid transfiziert und mit PMA stimuliert. Nach 36 Stunden wurden diese Zellen einem 40°C Hitzeschock über Nacht ausgesetzt und schließlich 0 und 90 min nach Inkubation bei 32°C via FACS analysiert (Abb. 3.16).

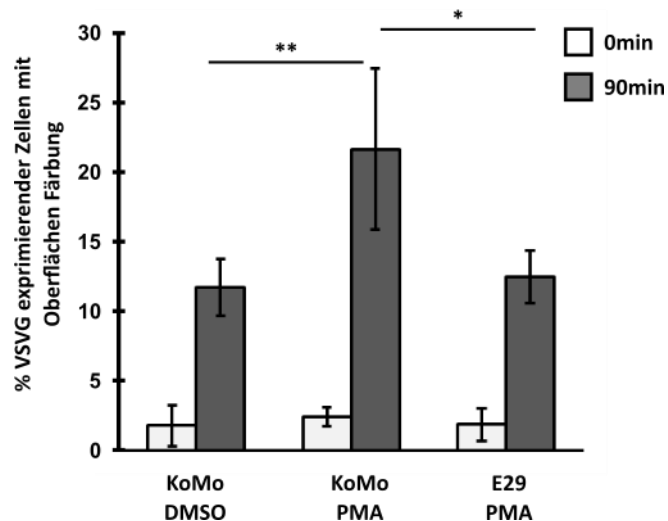


Abbildung 3. 16 Quantifizierung des ER-Exports in Jsl1 Zellen nach FLAG-Oberflächenfärbung mittels FACS. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil VSVG-GFP exprimierender Zellen mit positiver Oberflächenfärbung +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. P = 0,004 und 0,048.

Die Analyse der mit Kontrollmorpholino (KoMo) transfizierten Zellen zeigte den bereits zuvor beobachteten signifikanten Anstieg der Exporteffizienz nach Stimulation, während die Exporteffizienz E29MO transfizierter Zellen 90 min nach Hitzeschock auf dem Niveau unstimulierter Zellen lag.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine COPII vermittelte höhere Exporteffizienz in aktivierten T-Zellen in direktem Zusammenhang mit alternativem Sec16-Spleißen steht.

3.5 Sec16 Exon 29 reguliert die Effizienz des anterograden Proteintransports

Nachdem eine funktionelle Bedeutung der Sec16 E29-Isoform spezifisch für den sekretorischen Apparat aktivierter T-Zellen gezeigt werden konnte, wurde diese Funktion in einem allgemeineren Kontext studiert. Dies geschah unter Verwendung des etablierten HeLa-Zellkultursystems. Dazu wurde zunächst die Expression der in Jsl1 T-Zellen anfänglich beschriebenen vier alternativen Spleiß-Isoformen untersucht und bestätigt (Abb. 3.17 A).

Für den Fortgang weiterer Experimente wurde die Funktionalität des Sec16 E29 Morpholinos in HeLa Zellen getestet. Die Transfektion dieses Oligonukleotids führte zu einer signifikanten Reduktion der E29-Isoform (Abb. 3.17 A), sowie einer Abnahme der VL-Isoform (nicht gezeigt). Eine Angabe zur Anzahl quantifizierter Strukturen in HeLa Zellen nach Morpholinos transfektion befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 6).

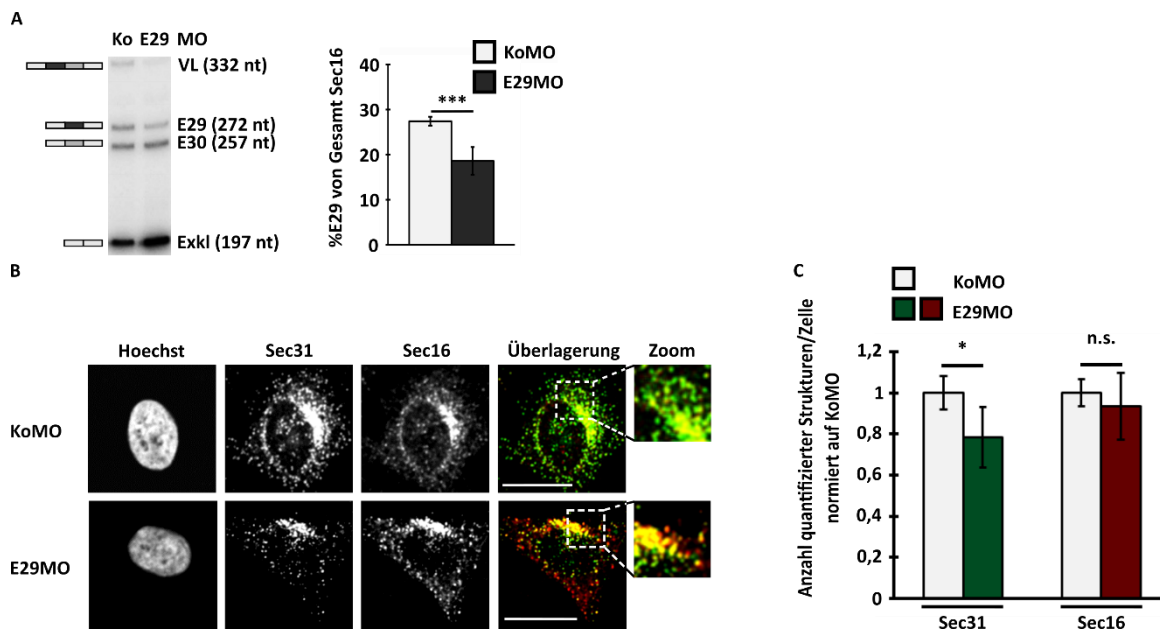


Abbildung 3. 17 Manipulation von Sec16 Spleißen beeinflusst den anterograden Proteintransport in HeLa Zellen. **A:** Sec16 E29MO ist funktionell in HeLa Zellen. Zu sehen ist eine repräsentative radioaktive RT-PCR in MO behandelten HeLa Zellen sowie, eine Quantifizierung von vier unabhängigen Experimenten. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der E29 Isoform von gesamt Sec16 +/- Standardabweichung. **B:** Sec16 E29 transfizierte HeLa Zellen weisen eine reduzierte Anzahl an COPII Vesikeln und eine konstante Anzahl von ERES auf. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder MO behandelter HeLa Zellen mit Färbung von Sec16 (in der Überlagerung rot) und Sec31 (in der Überlagerung grün). Der Maßstab entspricht 20 μm . **C:** Quantifizierung in B dargestellter Zellen mit ImageJ. Die Darstellung zeigt die durchschnittliche Anzahl gezählter Strukturen +/- Standardabweichung normiert auf KoMO. $P = 0,037$.

HeLa Zellen mit auf diese Weise manipuliertem Spleiß-Muster wurden weiteren funktionellen Untersuchungen unterzogen. Zunächst wurden die Lokalisation und die Anzahl von ERES und COPII-Vesikeln in einem fluoreszenzmikroskopischen Ansatz untersucht. Die Visualisierung erfolgte mittels Immunfärbung unter Verwendung der Sec16 und Sec31 Antikörper. ERES und COPII-Vesikel waren in Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Watson et al, 2006) in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma organisiert, die sich an jeweils einer Stelle in Nähe des Zellkerns konzentrierten (Abb. 3.17 B). Die Überlagerung der entsprechenden Fluoreszenzbilder lässt dabei eine teilweise, aber nicht vollständige, Colokalisation der beiden gefärbten Strukturen beobachten, wie die Vergrößerung zeigt. Nach Transfektion mit dem E29MO zeigte sich für die Verteilung und die Anzahl der ERES kein Unterschied im Vergleich zu Kontrollzellen, während die Anzahl der COPII-Vesikel signifikant reduziert war (Abb. 3.17 B

und C). Diese durch E29MO Behandlung induzierte Reduktion ist vergleichbar mit dem Effekt eines siRNA *knockdown* von Gesamt-Sec16 (Farhan et al, 2008; Tillmann et al, 2015).

Um zu zeigen, dass die durch veränderte Sec16-Isoformexpression bedingte Reduktion der COPII-Vesikel die Funktionalität des Proteintransports beeinflusst, wurden Exportassays mit MO behandelten HeLa Zellen durchgeführt. Die Transfektion mit dem Reporterkonstrukt erfolgte 48 Stunden nach MO Behandlung, um die manipulierte Änderung der Isoformexpression auf Proteinebene zu gewährleisten. Nach einem Hitzeschock von 40°C über Nacht wurden die Zellen mit Cycloheximid (CHX) behandelt und für die entsprechenden Zeitpunkte bei 32°C inkubiert. Die Bewertung des Sekretionsniveaus erfolgte fluoreszenzmikroskopisch basierend auf der Lokalisation des Reporters. Dabei wurde zwischen drei Stadien unterschieden: Der Lokalisation des Reporters im ER, dem Golgi-Apparat und in post-Golgi-strukturen. Unterstützt wurden diese Kriterien durch Cofärbungen des ERs, mittels Coexpression des dsRed-KDEL Fusionsproteins, und des Golgi-Apparates durch Färbung mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 (Abb. 3.18).

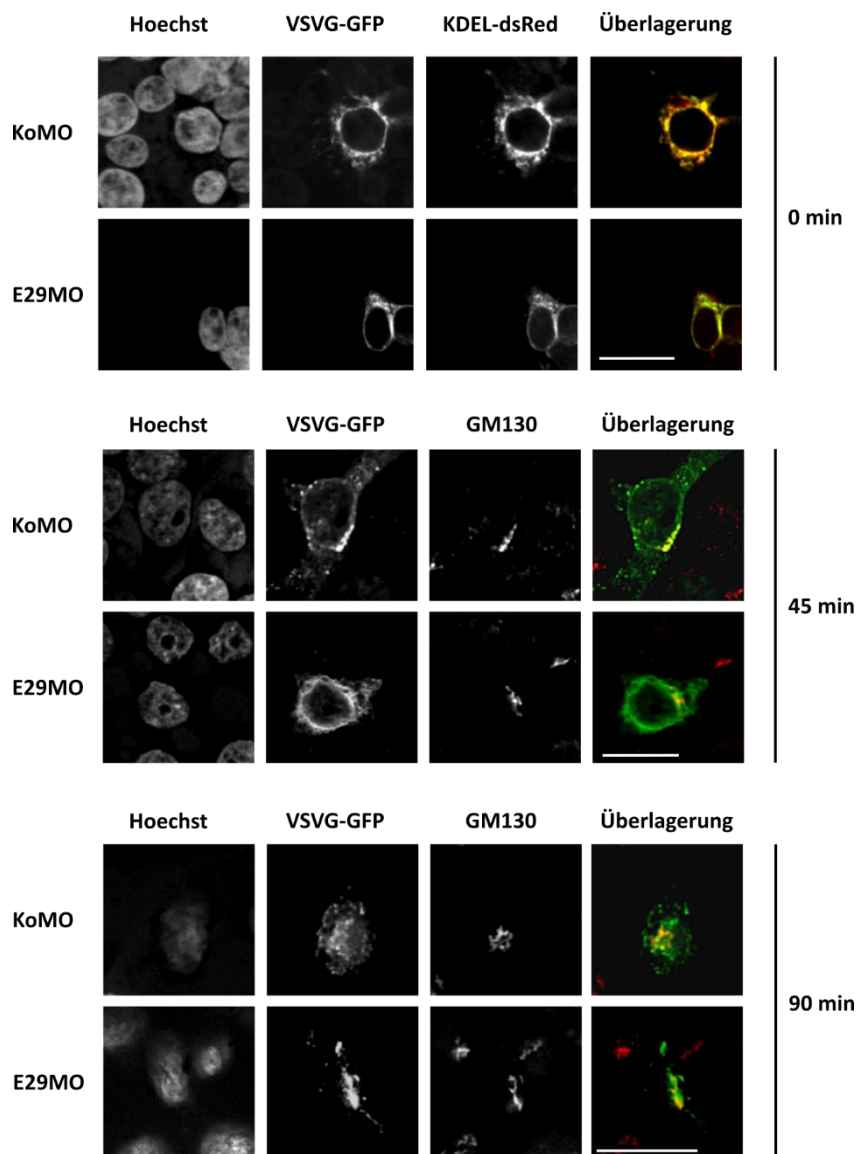


Abbildung 3. 18 Einfluss des Sec16 E29MO auf die Effizienz des ER-Exports in HeLa Zellen. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder verschiedener Zeitpunkte nach 40°C über Nacht Hitzeschock. Für den Zeitpunkt 0 min ist das ER gefärbt (rot), für die Zeitpunkte 45 und 90 min wurde der Golgi-Apparat gefärbt (rot). Der Maßstab entspricht 20 µm.

In drei unabhängigen Experimenten wurden mindestens 50 Zellen pro Bedingung analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Regeneration des sekretorischen Apparates nach Hitzeschock in E29MO behandelten Zellen im Vergleich zu KoMO behandelten Zellen deutlich langsamer verlief (Abb. 3.19).

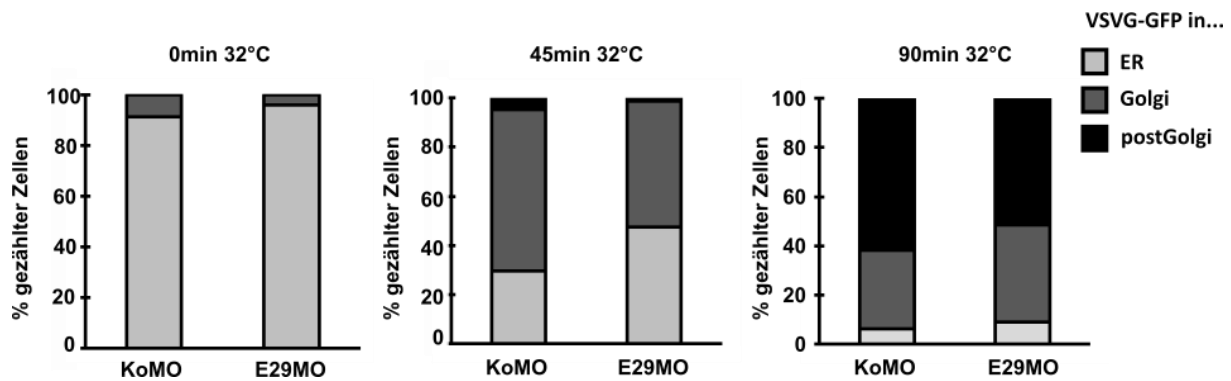


Abbildung 3. 19 Sec16 E29MO vermindert die anterograde Transport-Effizienz in HeLa Zellen. Die Darstellung zeigt die Quantifizierung eines VSVG-GFP basierten Exportassays in MO behandelten HeLa Zellen zu drei Zeitpunkten nach Hitzeschock hinsichtlich der Lokalisation des Reporters. Zu sehen ist der durchschnittliche prozentuale Anteil des Reporters in den angegebenen Kompartimenten aus drei unabhängigen Experimenten. P-Werte sind 0,016 für VSVG im Golgi nach 45 min und 0,024 für VSVG in post-Golgi Strukturen nach 90 min bei 32°C.

Unmittelbar nach Hitzeschock zeigten über 90 % beider Zellpopulationen eine Lokalisation des Reporters im ER. Nach 45 min bei 32°C war bereits ein deutlicher Unterschied zu sehen. E29MO behandelte Zellen zeigten eine Lokalisation des Reporters zu annähernd gleichen Teilen im ER und Golgi-Apparat, während in den Kontrollzellen deutlich mehr Zellen eine Lokalisation des Reporters im Golgi-Apparat aufwiesen. Und auch nach 90 min war der Anteil der Zellen, die eine Lokalisation des Reporters in post-Golgi-Strukturen zeigten, in den Kontrollzellen höher. Eine Tabelle mit exakten Prozentangaben inklusive Standardabweichung befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 7).

Eine Verminderung der Sec16 E29-Isoform führte also zur Reduktion der COPII-Vesikel und einem verringerten Sekretionsfluss in HeLa Zellen.

3.6 Sec16 Spleiß-Isoformen zeigen ein differentielles Interaktionsmuster mit anderen COPII-Proteinen

Die bislang geschilderten Ergebnisse beschreiben die Funktionalität der Sec16 E29-Isoform in der Anpassung des frühen anterograden Transportweges an das erhöhte Cargo-Aufkommen während der T-Zell Aktivierung. In weiteren Experimenten sollte eine mechanistische Grundlage gefunden und charakterisiert werden.

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bereits bekannt, dass die C-Terminale Domäne von Sec16 mit anderen COPII-Proteinen wie Sec12 und Sec23 interagiert (Bhattacharyya & Glick, 2007;

Montegna et al, 2012). Zusätzlich konnte in *Drosophila* eine weitere Interaktion von Sec16 mit der kleinen GTPase Sar1 beobachtet werden, deren Bindedomäne jedoch noch unbekannt ist (Ivan et al, 2008). Aus dieser Arbeit ist nicht ersichtlich, ob es sich bei der beschriebenen Interaktion um Sar1A oder Sar1B handelt. Diese beiden Paraloge sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 90% identisch und ihre möglicherweise unterschiedliche Funktion im sekretorischen Apparat noch nicht völlig geklärt, weshalb in diesem Experiment mit Sar1A als auch Sar1B gearbeitet wurde. Mit diesen Informationen als Grundlage, wurde das Interaktionspotential der vier alternativen Sec16-CTDs mit den anfangs beschriebenen COPII-Proteinen in Coimmunopräzipitations-Studien untersucht. Dazu wurden Fusionskonstrukte der vier alternativen Sec16-CTDs mit C-Terminalem FLAG-Peptid und den COPII-Proteinen mit C-Terminalem GFP generiert. Hek293 Zellen wurden mit den Konstrukten zwei potentieller Interaktionspartner cotransfiziert und 48 Stunden später in einer FLAG-Immunopräzipitation (IP) analysiert. Als Negativkontrolle wurden GFP-Fusionskonstrukte zusammen mit einem FLAG-Leervektor cotransfiziert. Lysate wurden mit α FLAG-gekoppelten Partikeln inkubiert und das Präzipitat im Western Blot analysiert (Abb. 3.20).

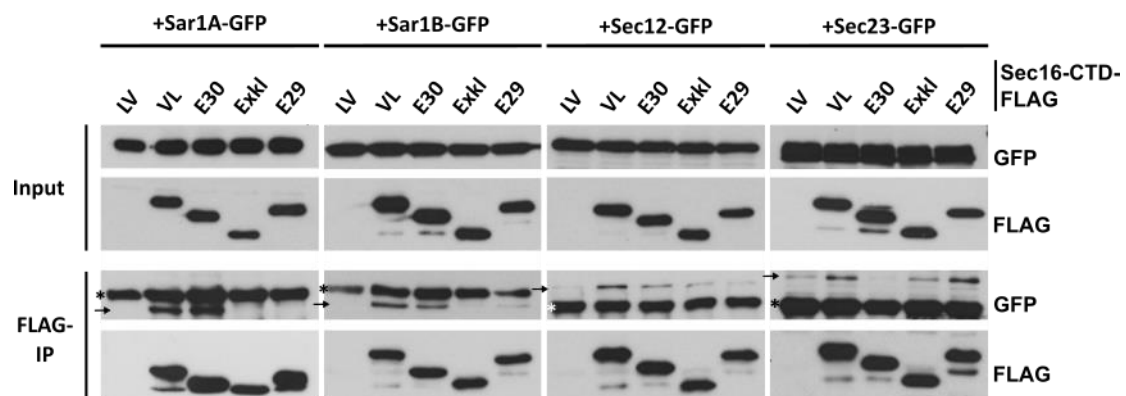


Abbildung 3. 20 Alternative Sec16 Isoformen interagieren differentiell mit anderen COPII Proteinen. Coimmunopräzipitationen der alternativen Sec16-CTDs mit Sar1A, Sar1B, Sec12 und Sec23 zeigen unterschiedliche Interaktionsmuster. Hek293 Zellen wurden mit den entsprechenden Fusionskonstrukten cotransfiziert. FLAG-Präzipitate wurden im Western Blot unter Verwendung von α FLAG und α GFP Antikörpern analysiert. Die obere Hälfte zeigt jeweils 5 % des in der IP eingesetzten Gesamtzellextrakts, die untere Hälfte die FLAG-Präzipitate. → markiert das copräzipitierte Protein, * markiert die schwere Kette des Antikörpers. Die Darstellung zeigt repräsentative Western Blots unabhängiger Experimente (N > 3).

5 % des in der Präzipitation eingesetzten Gesamtzellextrakts wurden auf Gleichmäßigkeit überprüft (obere Hälfte, „Input“) und die Copräzipitation der GFP-Fusionsproteine mittels GFP-Antikörper nachgewiesen (untere Hälfte, „FLAG-IP“). Dabei konnte ein differentielles Interaktionsmuster der alternativen Sec16-CTDs mit den eingesetzten COPII-Proteinen beobachtet werden. VL und E30-Isoform zeigten eine deutliche Interaktion mit Sar1A und Sar1B. Ein Modell, das auf *in vitro* Studien basiert, schlägt eine unterschiedlich starke Interaktion der Sar1 Paraloge mit dem äußeren Hüllkomplex vor, wodurch die Größe von COPII-Vesikeln beeinflusst werden kann (Fromme et al, 2008). Eine Aussage über die Stärke der hier demonstrierten Interaktionen der Sec16-CTDs mit Sar1A und Sar1B kann anhand dieser Western Blots jedoch nicht getroffen werden und müsste in einer quantitativeren Methode untersucht werden. Sec12 zeigte die stärkste Interaktion mit der VL-Isoform, die beide alternativen Exons enthält. Sec23 hingegen ließ als einziger getesteter Kandidat, neben der VL-Isoform, eine vergleichbar starke Interaktion mit der E29-Isoform beobachten. Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass die durch die Exons 29 und 30 kodierten Bereiche die Interaktion der Sec16-CTDs mit den COPII-Proteinen beeinflussen. E30 ist essentiell für eine Interaktion mit Sar1, E29 für eine Interaktion mit Sec23. Die alternative In- und Exklusion dieser definierten Bereiche verändert das Interaktionspotenzial der Sec16-CTD.

Da Sec23, neben der Interaktion mit der VL-Isoform, als einziger der untersuchten Kandidaten eine solide Interaktion mit der E29-Isoform zeigte, sollte diese Interaktion auf eine biologische Relevanz untersucht werden. Dazu wurde Sec23 als CFP-Fusionsprotein zusammen mit Sec16 E29-CTD-GFP in HeLa Zellen coexprimiert und der Einfluss auf die Integrität des Golgi-Apparates untersucht. In einem Kontrollexperiment wurde zunächst der Einfluss der Expression von Sec23 allein untersucht. Dabei konnte kein negativer oder positiver Effekt auf die Golgi-Morphologie beobachtet werden (Abb. 21 A).

Während die Expression von Sec16 E29-CTD-GFP allein den Golgi-Apparat zerstörte, konnte dieser Effekt durch die Coexpression von Sec23-CFP deutlich revidiert werden (Abb. 21 B und C). Möglicherweise interagiert die überexprimierte Sec16-E29-CTD mit endogenem Sec23, was dadurch dem Transportsystem nicht mehr zur Verfügung steht und den Proteintransport negativ beeinflusst. Die Coexpression des Interaktionspartners kann diesen Effekt kompensieren.

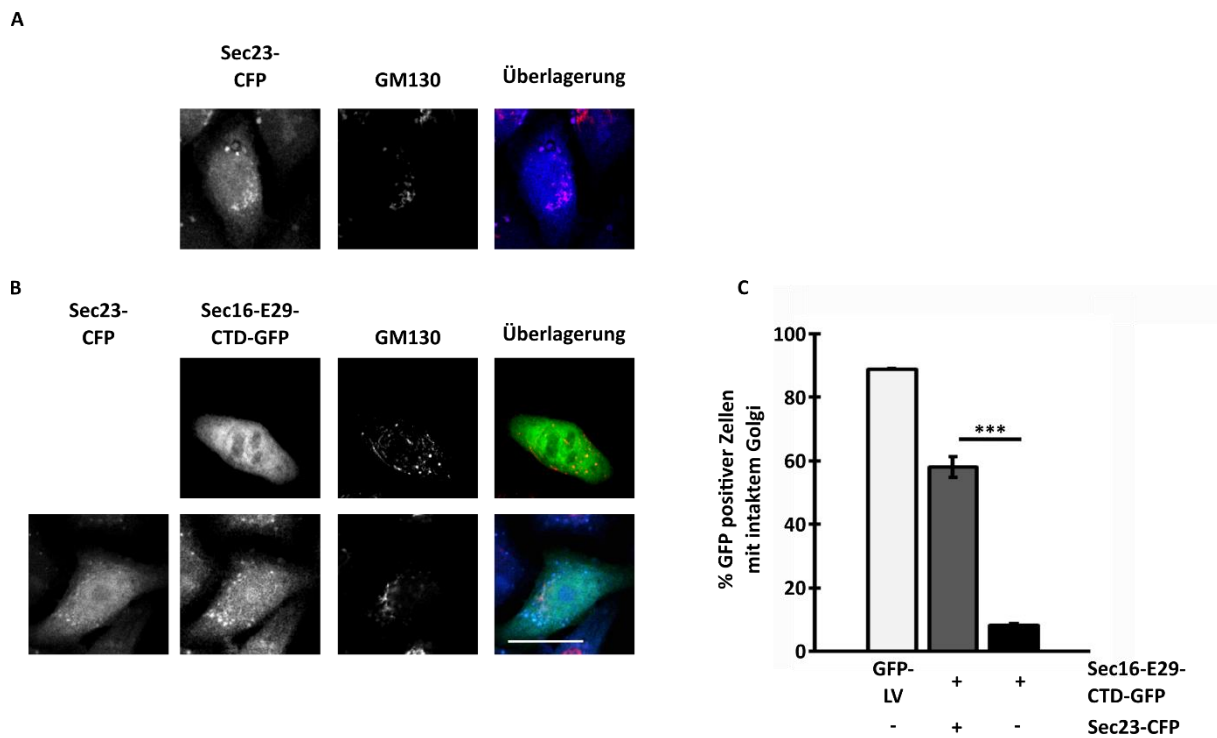


Abbildung 3. 21 Coexpression von Sec23 mit der Sec16-E29-CTD revidiert den negativen Effekt auf die Golgi-Morphologie. **A:** Expression von Sec23-CFP hat keinen Einfluss auf die Golgi-Morphologie. Repräsentative Aufnahmen von HeLa Zellen, die Sec23-CFP exprimieren (blau). Der Golgi wurde unter Verwendung des cis-Golgi-Markers GM130 (rot) visualisiert. **B:** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von HeLa Zellen, die Sec16-E29-CTD-GFP mit Sec23-CFP coexprimieren (obere Bildreihe), oder Sec16-E29-CTD-GFP allein (untere Bildreihe). Der Golgi wurde durch Verwendung des cis-Golgi Markers GM130 visualisiert. Der Maßstab entspricht 20 μ m. **C:** In B beschriebene Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit durchschnittlich 120 Zellen pro Kondition auf ihre Golgi-Struktur untersucht und mit den Ergebnissen aus Abb. 3.8 verglichen. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen mit intakter Golgi-Struktur. $p = 1,4 \times 10^{-4}$.

Diese Beobachtung unterstreicht die bereits beschriebene Rolle der E29-Isoform in der Regulation des frühen anterograden Transports, für die eine Interaktion mit Sec23 von zusätzlicher Bedeutung zu sein scheint.

3.7 Sec16 E29 hat eine regulatorische Funktion im sekretorischen Apparat humaner primärer T-Zellen

Um die Bedeutung der Sec16-E29 Isoform weiter zu unterstreichen, wurde ihre Funktionalität in einem physiologisch relevanten Kontext untersucht. Dazu wurde mit humanen Primärzellen gearbeitet. Aus humanem Blut lässt sich mittels Dichtegradientenzentrifugation eine Fraktion mononukleärer Zellen aufreinigen, fortlaufend PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear*

cells) genannt, die zu einem Großteil aus T-Zellen besteht. Auf diese Weise gewonnene Zellen wurden mit den physiologisch relevanten Stimuli α CD3 und α CD28 behandelt und einer Analyse des Sec16 Spleiß-Musters unterzogen. Hierbei fiel zunächst auf, dass nicht in allen Proben verschiedener Spender die E30-Isoform nachgewiesen werden konnte, weshalb sie in den folgenden Quantifizierungen nicht berücksichtigt wurde. Für die VL und E29-Isoform konnte eine signifikante Zunahme 48 Stunden nach Stimulation mit α CD3 als auch α CD3 zusammen mit α CD28 nachgewiesen werden (Abb. 3.22), während die Exklusions-Isoform deutlich abnahm.

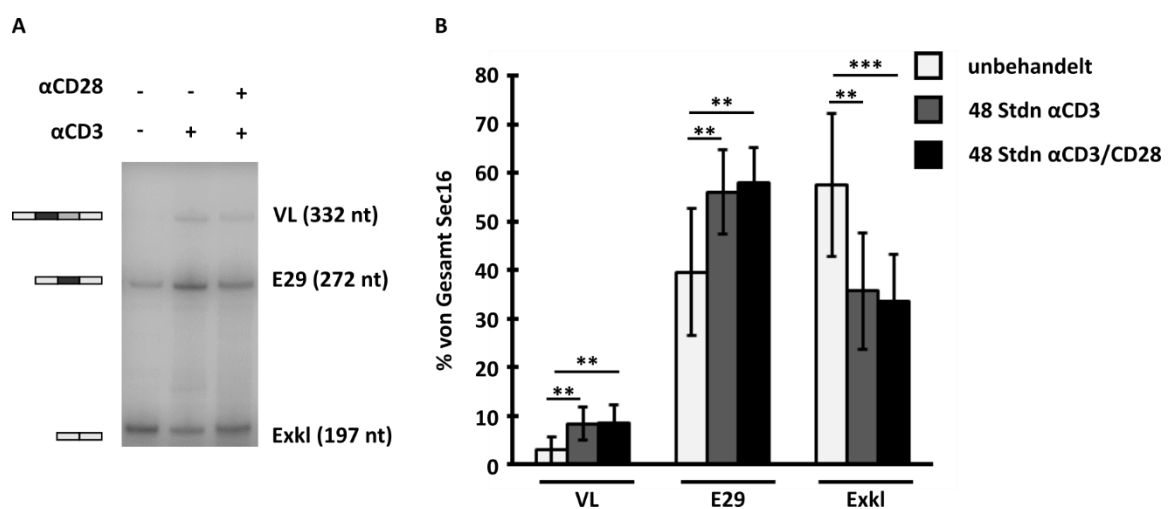


Abbildung 3. 22 Alternatives Sec16 Spleißen hat eine funktionelle Relevanz in humanen Primärzellen. A: Sec16 wird nach Aktivierung primärer humaner PBMCs alternativ gespleißt. Repräsentative radioaktive Spleiß-sensitive RT-PCR humaner PBMCs 48 Stunden nach Stimulation mit $1\mu\text{g}$ α CD3 allein oder zusammen mit $1\mu\text{g}$ α CD28. **B:** Die Quantifizierung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der alternativen Sec16 Isoformen im Vergleich zu Gesamt Sec16 aus den Proben von vier unabhängigen Spendern +/- Standardabweichung. Gezeigt sind hier drei der vier Isoformen, da die E30 Isoform nicht in allen primären Proben nachzuweisen war. P-Werte sind für CD3: 0,002 (VL); 0,006 (E29); 0,003 (Exkl.); für CD3/28 0,003 (VL); 0,002 (E29), $8,7 \times 10^{-4}$ (Exkl.).

Um die Exklusion von Exon 29 in Primärzellen zu induzieren, wurden diese mit einer modifizierten Form des Morpholinos, genannt vivoMorpholino, behandelt. Diese *antisense*-Oligonukleotide entsprechen in Sequenz und Aufbau den bereits beschriebenen Morpholinos, sind jedoch zusätzlich mit einem Arginin-reichen Peptid fusioniert, welches eine Penetration der Zellmembran ermöglicht. Durch Behandlung der Primärzellen mit dem E29 vivoMO konnte eine Reduktion der E29-Isoform erzielt werden (Abb. 3.23 A).

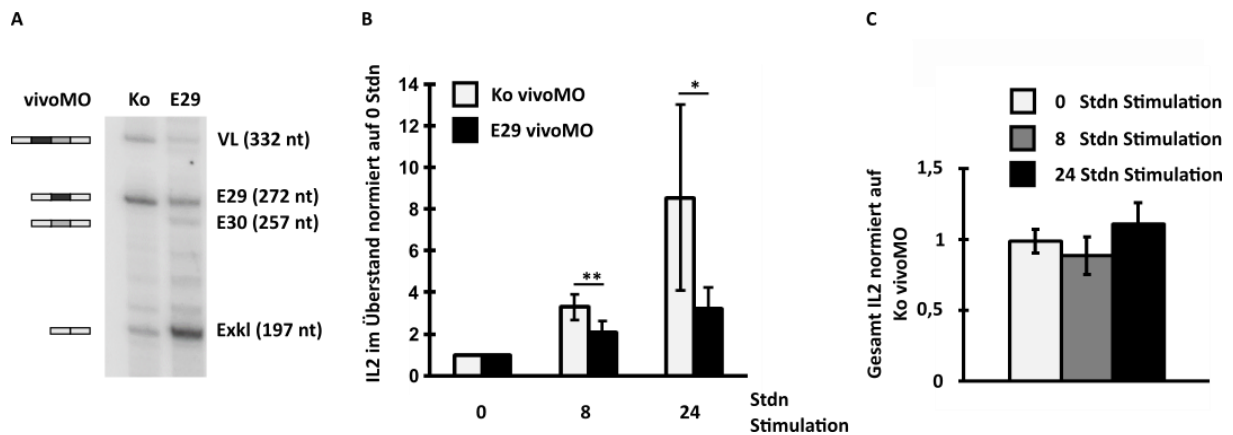


Abbildung 3. 23 Sec16 E29 vivoMO manipuliert das Spleiß-Muster primärer Zellen. **A:** Radioaktive Spleiß-sensitive RT-PCR mit vivo-MO transfizierten PBMC Zellen. **B:** Sec16 Spleißen beeinflusst die IL2 Sekretion in primären Zellen. PBMCs wurden mit vivoMO transfiziert und mit α CD3/ α CD28 für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. IL2 wurde im Überstand dieser Zellen mittels ELISA bestimmt. Die Messwerte sind auf den Wert unstimulierter Zellen normiert und zeigen die durchschnittliche IL2-Sekretion aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei unabhängigen Stimulationen +/- Standardabweichung. P-Werte sind 0,009 und 0,031. **C:** In B beschriebene Zellen wurden für 40 min vor Zellernte mit BFA behandelt und anschließend lysiert. IL2 wurde wie in B beschrieben bestimmt. Die Darstellung zeigt die durchschnittliche IL2 Menge in E29MO transfizierten Zellen relativ zu KoMO transfizierten Zellen +/- Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

Derart modifizierte Zellen wurden im Weiteren auf Veränderungen im Sekretionsapparat untersucht, indem die Sekretion von Interleukin 2 (IL2) im Zellüberstand via ELISA gemessen wurde. IL2 wird früh nach der Aktivierung über den T-Zell Rezeptor verstärkt von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen produziert und sekretiert, und ist deshalb ein geeignetes Effektormolekül, um Proteinsekretion während der T-Zell Aktivierung zu messen. PBMCs wurden mit vivoMOs behandelt und anschließend mit α CD3 und α CD28 stimuliert. Zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben aus dem Überstand der Zellen genommen und anschließend in einem IL2-sandwich-ELISA analysiert. Während in den Kontrollzellen ein kontinuierlicher Anstieg von sekretiertem IL2 im Überstand nachgewiesen wurde, war der Anstieg der IL2 Konzentration zu allen Zeitpunkten nach Stimulation in E29 vivoMO behandelten Zellen signifikant geringer (Abb. 3.23 B). Um zu zeigen, dass es sich bei den beobachteten Effekten tatsächlich um einen Defekt in der Sekretionsmaschinerie handelt, wurde der Gesamtgehalt von IL2 zu denselben oben genannten Bedingungen bestimmt. Allerdings wurden die Zellen in diesem Versuch 40 min vor der Zellernte mit Brefeldin A (BFA) behandelt, um die Sekretion zu stoppen und den Gesamt-IL2-Gehalt besser bestimmen zu können. Hierbei war zu allen

analysierten Zeitpunkten kein Unterschied im IL2 Gesamtgehalt von KoMO und E29MO behandelten Zellen zu sehen (Abb. 3.23 B).

Dieses Ergebnis zeigt den Einfluss von Sec16-Spleißen auf die Sekretion eines endogenen Effektormoleküls im Primärzellsystem nach einer physiologisch relevanten Stimulation.

3.8 Deletion von Sec16 Exon 29 führt zu Defekten in der COPII Vesikelbildung und im anterograden Transport

Um die Bedeutung von Sec16 E29 für den sekretorischen Apparat in einem weitreichenderen Modell global untersuchen zu können, wurde mit Sec16 E29-deletierten Hek293 Zellen gearbeitet. Die Generierung dieser Zell-Linie erfolgte von Frau Dr. Regina Kanski in der AG Heyd, und wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Deletion von E29 erfolgte unter Verwendung des Crispr/Cas9-Systems. Dies ist ein aus Prokaryoten stammendes Abwehrsystem gegen bakteriophage DNA, und wird in der Molekularbiologie genutzt, um gezielt genomische DNA zu modifizieren (Ran et al, 2013). Auf diese Weise konnten Doppelstrangbrüche in Intron 28 und 29 im genomischen Lokus von Sec16 induziert, und Exon 29 deletiert werden (Abb. 3.24 A). Die erfolgreiche Deletion von Exon 29 wurde durch PCR auf genomischer Ebene, RT-PCR auf RNA Ebene (Abb. 3.24 B), sowie durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt. Durch den Verlust von E29 werden statt der üblichen vier Isoformen die beiden Isoformen exprimiert, die E29 nicht enthalten, die E30- und Exklusions-Isoform. Diese veränderte Isoformexpression hat keinen nachweislichen Effekt auf den Gesamtproteingehalt von Sec16, wie durch Western Blot Analyse von Gesamtzellextrakten aus WT und Δ E29 Hek293 Zellen gezeigt werden konnte (Abb. 3.24 C).

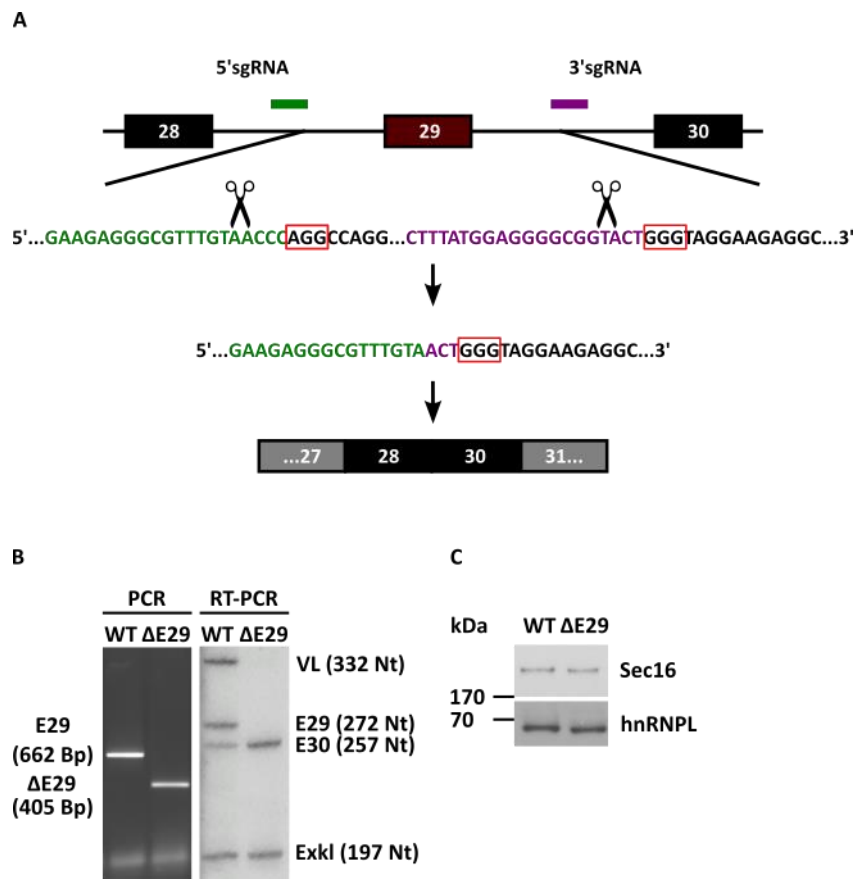


Abbildung 3. 24 Etablierung einer E29-deletierten Zell-Linie. **A:** Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Verfahrens. Die Cas9 Nuklease wurde durch *single guide* RNAs (sgRNAs) zu Sequenzen im Intron 5' (grün) und 3' (violett) von Sec16 E29 geführt. Die durch die Deletion des Exons veränderte genomische Sequenz wurde durch Sequenzierung des PCR-Produktes ermittelt. Die rote Box markiert die PAM-Sequenz. (engl. *protospacer adjacent motif*) **B:** Verifizierung der E29 Deletion in Hek293 Zellen mittels CRISPR/Cas9 auf genomischer (PCR links) und RNA Ebene (RT-PCR rechts). **C:** Sec16 Western Blot von 20 µg Gesamtzellextrakt aus WT und ΔE29 Hek293 Zellen zeigt keinen Unterschied auf der Gesamtprotein Ebene. hnRNPL diente als Ladekontrolle.

Nachdem in ΔE29 Zellen kein Unterschied im Gesamtproteingehalt von Sec16 beobachtet werden konnte, wurde die zelluläre Lokalisation, sowie die Anzahl der ERES fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Nach Färbung von endogenem Sec16 und Auswertung entsprechender mikroskopischer Aufnahmen, war in der Lokalisation von Sec16 und der Anzahl der ERES kein Unterschied im Vergleich von WT und ΔE29 Hek293 Zellen ersichtlich (Abb. 3.25).

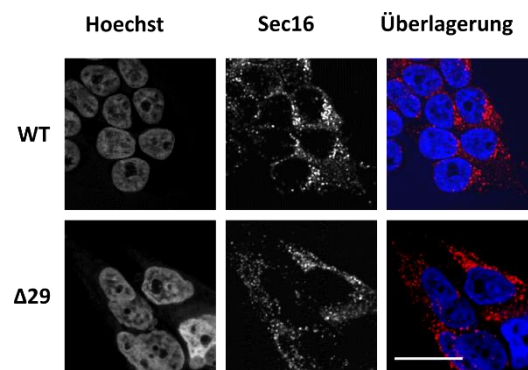


Abbildung 3. 25 Deletion von E29 hat keinen Einfluss auf Lokalisation und Anzahl der ERES in Hek293 Zellen. WT und Δ E29 Hek293 Zellen wurden fixiert und endogenes Sec16 gefärbt. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

Für Jsl1 und HeLa Zellen konnte bereits demonstriert werden, dass eine erhöhte Exklusion von Sec16 E29 mit einer Reduktion von COPII Vesikeln bei konstant bleibender ERES Anzahl verbunden ist (Abb. 3.15 und 3.17). Deshalb wurden neben den oben beschriebenen ERES auch COPII-Vesikel auf Anzahl und Lokalisation untersucht. In WT Hek293 Zellen waren nach Sec31-Färbung punktartige, im Zytoplasma verteilte, Strukturen zu beobachten, die sich nahe des Zellkerns konzentrierten. In Δ E29 Hek293 Zellen waren diese punktartigen Strukturen weniger stark in der Zellperipherie zu finden, und auch die kernnahe Struktur erschien kompakter. Quantifizierung endogener Sec31-Färbungen in drei unabhängigen Experimenten bekräftigen diese Beobachtungen. Sie zeigt eine erhebliche Reduktion der COPII-Vesikel in Δ E29 Hek293 Zellen im Vergleich zum WT (Abb. 3.26 A und B). Die Anzahl quantifizierter Vesikel ist im Anhang dieser Arbeit zu finden (Tabelle 8).

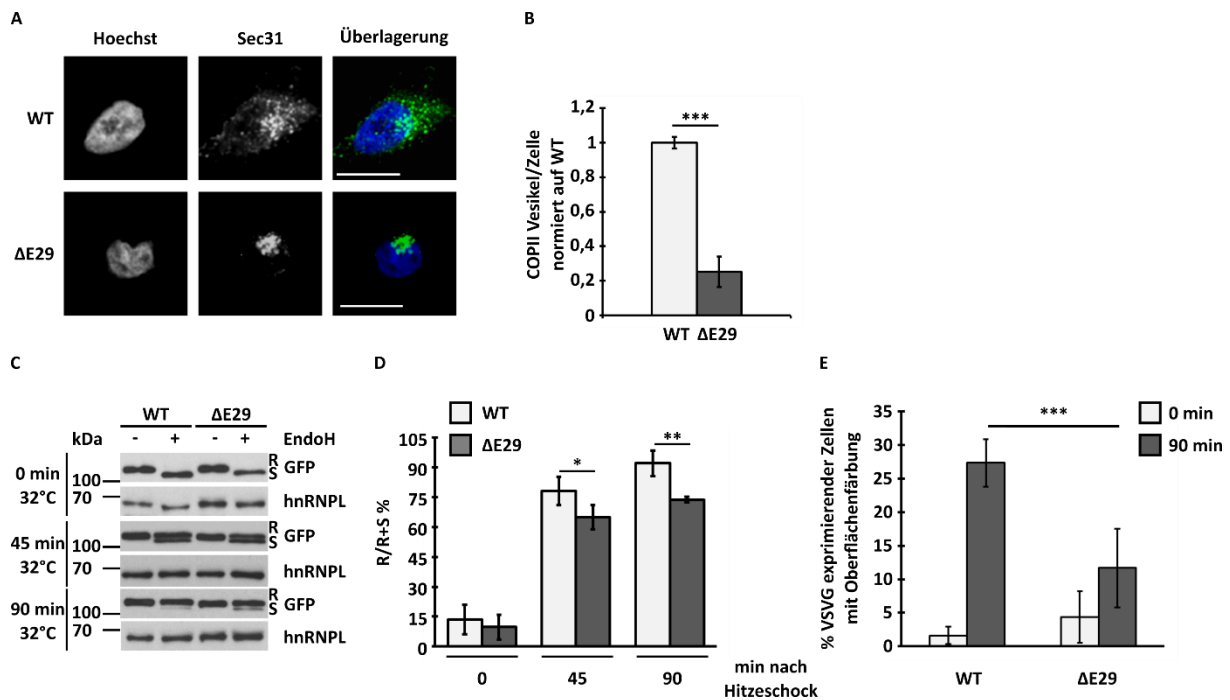


Abbildung 3. 26 Sec16 E29 ist essentiell für die Bildung von COPII Vesikeln und den anterograden Proteintransport in Hek293 Zellen. **A:** Deletion von Sec16 E29 reduziert die Anzahl von COPII Vesikeln. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von WT und ΔE29 Hek293 Zellen mit Sec31-Färbung (in der Überlagerung grün). Der Maßstab entspricht 20 μm. **B:** In A beschriebene Zellen wurden mit ImageJ quantifiziert. Die Darstellung zeigt die durchschnittliche Anzahl von COPII-Vesikeln normiert auf den WT +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten und n = 30. P = 0,002. **C:** Sec16 E29 Deletion führt zu Defekten im anterograden Transportweg. Exportassay in WT und ΔE29 Hek293 Zellen unter Verwendung von EndoHf (siehe Methoden). VSVG-GFP wurde durch Verwendung des αGFP-Antikörpers nachgewiesen, hnRNPL diente als Ladekontrolle. R = resistent gegenüber EndoHf, S = Sensitiv gegenüber EndoHf. **D:** Quantifizierung vier unabhängiger in C dargestellter Experimente. P-Werte: 0,47; 0,03 und 0,0015. **E:** Der Verlust von Sec16 E29 führt zu einer reduzierten Proteinsekretion. FACS basierter Exportassay in WT und ΔE29 Hek293 Zellen unter Verwendung einer VSVG-GFP Variante mit internem FLAG-Peptid als Oberflächenmarker. Die Darstellung zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil VSVG exprimierender Zellen mit positiver Oberflächenfärbung +/- Standardabweichung aus drei unterschiedlichen Experimenten zu zwei Zeitpunkten. P = 1,4 x 10⁻⁴.

Eine funktionelle Untersuchung der E29-deletierten Zellen sollte mit dem bereits beschriebenen VSVG basierten Exportassay unter fluoreszenzmikroskopischer Auswertung erfolgen. Diese Herangehensweise erwies sich jedoch als ungeeignet, da die mutante Zell-Linie nach 40°C Hitzeschock eine erheblich reduzierte Adhärenz aufwies, was die Anfertigung fluoreszenzmikroskopischer Präparate in ausreichender Quantität nicht zuließ. Aus diesem Grund wurde der Exportassay unter Verwendung einer alternativen Methode, dem EndoH-Assay, ausgewertet. Der Versuch wurde nach bekanntem Protokoll durchgeführt und transfizierte Hek293 Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach 40°C über Nacht Hitzeschock geerntet, lysiert und mit der Endoglykosidase EndoHf inkubiert. Diese Methode

wird in der Molekularbiologie verwendet, um die Modifikation eines Proteins mit Zuckerresten zu bestimmen und anhand dieser Aussagen über den Grad der Translokation innerhalb des sekretorischen Apparates treffen zu können. Das VSVG-Reporterprotein ist ein Hüllprotein des vesikulären Stomatitis Virus und wird nach Synthese im ER zur Zelloberfläche transportiert. Proteine, die nach Synthese zu ihrem Wirkungsort gelangen müssen, erhalten im ER eine posttranslationale Modifikation mit Zuckerresten, die im Golgi-Apparat weiter prozessiert wird. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Zuckerreste sensitiv gegenüber der Endoglykosidase EndoH_f, welche unprozessierte, Mannose-reiche Oligosaccharide spalten kann. Dies führt zu einer Veränderung der Masse, die man im Western Blot detektieren kann: Nicht prozessierte Proteine im ER sind EndoH-sensitiv; prozessierte Proteine im Golgi-Apparat und post-Golgistrukturen sind EndoH-resistent und laufen deshalb im Western Blot nach EndoH-Verdau oberhalb der sensitiven Form. Die Durchführung dieses Versuchs in WT und Δ E29 Hek293 Zellen ließ eine reduzierte Sekretionseffizienz in E29-deletierten Hek293 Zellen vermuten und konnte durch Quantifizierung entsprechender Western Blots bestätigt werden (Abb. 3.26 D). Um dieses Ergebnis mit einer weiteren, quantitativen Methode zu untermauern, wurde der Exportassay mit der bereits beschriebenen VSVG-Variante und einer FACS-basierten Messung wiederholt. Das Ergebnis zeigte einen deutlich sichtbaren Defekt in der Sekretionseffizienz in E29-deletierten Zellen. Nach 90 Minuten bei 32°C nach 40°C über Nacht Hitzeschock war für Δ E29 Hek293 Zellen der prozentuale Anteil VSVG-exprimierender Zellen mit positiver Oberflächenfärbung signifikant reduziert (Abb. 26 E). Die Δ E29 Hek293 Zell-Linie erwies sich als geeignetes Mittel, um die Bedeutung und Funktion der Sec16 E29-Isoform zu studieren. Die bisher durch PMA Stimulation und Morpholino Behandlung herbeigeführten Effekte auf die Vesikelformation und den Sekretionsfluss konnten in diesem Zell-System erfolgreich reproduziert werden. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte bislang jedoch nicht studiert werden. Bisherige Evidenzen schlagen eine effizientere Vesikelformation und die Interaktion von Sec16-E29 mit Sec23 als mechanistisch bedeutend vor. Deshalb wurde das Δ E29 Hek293 Modell-System in weiteren Experimenten auf Veränderungen in der COPII-Maschinerie untersucht, um mehr Einblick in einen möglichen Mechanismus zu gewinnen. Um die Turnover-Rate von COPII-Komponenten im E29 freien Kontext zu bestimmen, wurden deshalb FRAP (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*) Experimente durchgeführt. Dabei wird das zu untersuchende Protein, fusioniert an ein fluoreszierendes Protein, in Zellen exprimiert und unter *live cell* Bedingungen analysiert. Eine ausgewählte fluoreszierende

Region der Zelle wird unter hoher Laserintensität gebleicht, und die Zeit gemessen, in der das Fluoreszenzsignal 50% der Ausgangsintensität wiedererlangt. Diese Methode erlaubt es, die Dynamik eines Proteins in einem gewissen Kontext zu untersuchen. Als Repräsentant der COPII-Maschinerie wurde Sec23 gewählt, da dieses Protein eine exklusive Interaktion mit Sec16 E29 der Sec16-CTD zeigte (Abb. 3.20). WT und Δ E29 Hek293 Zellen wurden mit einem für Sec23-GFP kodierenden Plasmid transfiziert und 24 Stunden später analysiert. Sec23-GFP lokalisierte in vesikulären Strukturen in der Nähe des Zellkerns. Diese Strukturen erschienen etwas größer als die endogen gefärbten Sec31 positiven COPII-Vesikel, was durch die Überexpression des Proteins verursacht werden kann. In den beschriebenen Messungen wurde jeweils eine dieser Strukturen analysiert. Um die durchschnittliche Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen zu bestimmen, wurden fünf Bilder bei einer Laserintensität von 20 % aufgenommen. Anschließend wurde die zuvor ausgewählte Region in der Zelle unter voller Laserintensität gebleicht und in regelmäßigen Abständen weitere rund 120 Aufnahmen getätigt (Abb. 3.27 A).

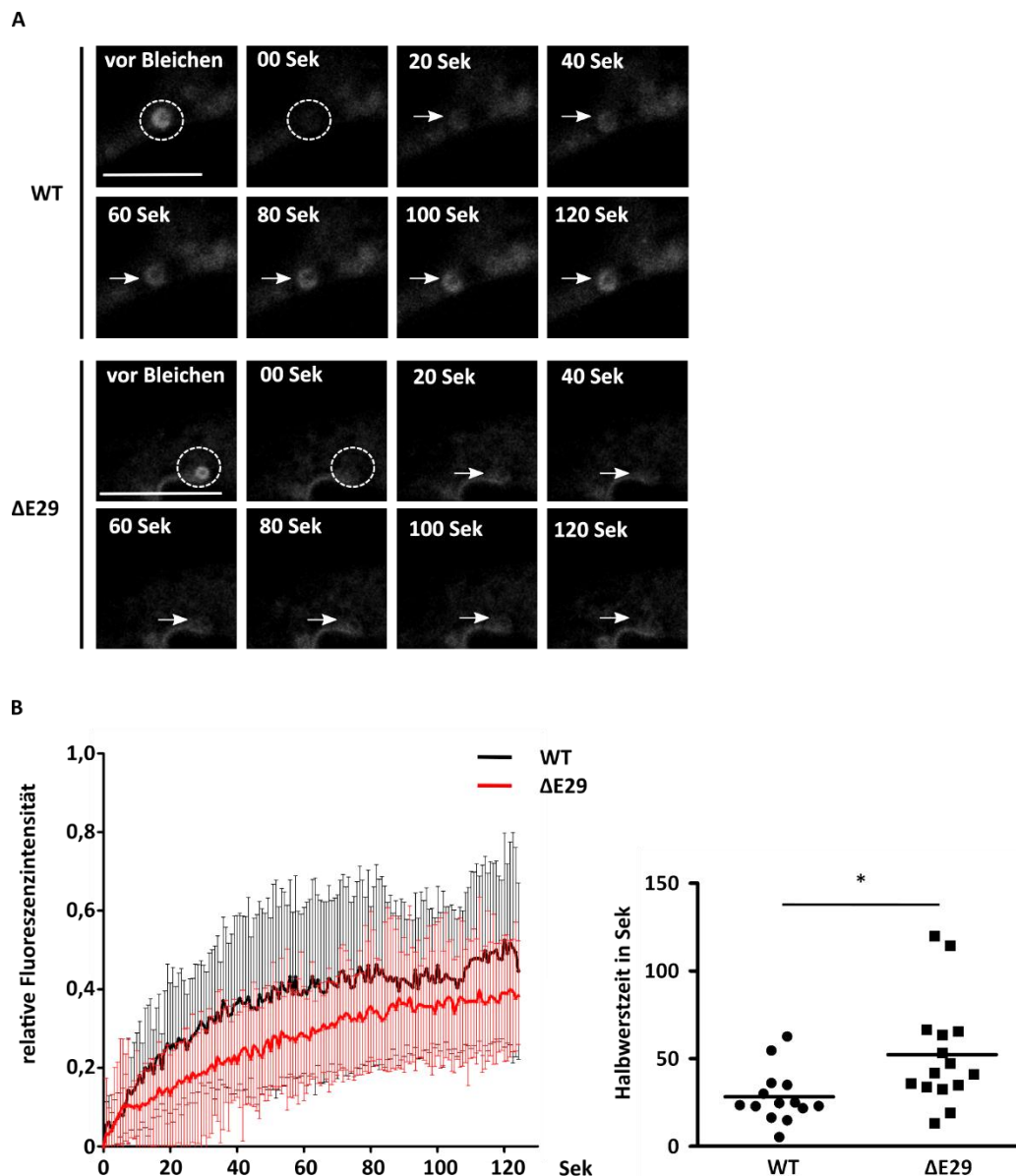


Abbildung 3. 27 COPII Turnover ist reduziert in $\Delta E29$ Zellen. WT und $\Delta E29$ Hek293 Zellen wurden mit einem Sec23-GFP Fusionskonstrukt transfiziert und der Sec23 Turnover mittels FRAP bestimmt. **A:** Repräsentative Fluoreszenzbilder zeigen Aufnahmen für den jeweiligen Zelltyp zu den angegebenen Zeitpunkten. **B:** FRAP-Kurve (links unten) zeigt Unterschiede im Vergleich von WT (schwarz) und $\Delta E29$ (rot) Hek293 Zellen. Die errechnete Halbwertszeit zu Wiedererlangung der anfänglichen Fluoreszenzintensität ist in $\Delta E29$ Hek293 Zellen deutlich erhöht (unten rechts). Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Experimenten mit $n = 15$. $P = 0,0137$.

Bereits die in der Abbildung dargestellten Aufnahmen der Sec23-GFP-Fluoreszenz lassen eine langsamere COPII-Dynamik in E29-deletierten Zellen erahnen. Während im WT die, durch den Kreis markierte, vesikuläre Struktur bereits nach 60 Sekunden deutlich an Fluoreszenzintensität zurückgewinnt, ist das für die $\Delta E29$ Mutante nicht der Fall. Der Vergleich der FRAP-Kurve, die die gemessene Fluoreszenzintensität normiert auf Intensität vor Bleichen

= 1 und unmittelbar danach = 0 darstellt, zeigt ebenfalls einen Unterschied zwischen WT und E29-deletierten Hek293 Zellen (Abb. 3.27 B). Aus diesen Werten lässt sich eine Halbwertszeit errechnen, die die Zeit widerspiegelt, die Sec23 in dem jeweiligen Zelltyp benötigt, um auf 50 % der anfänglichen Fluoreszenzintensität zurückzukommen. Für den WT liegt diese Zeit bei 28,31 +/- 4 Sekunden und für die Mutante bei 52,32 +/- 8 Sekunden. Dieses abschließende Experiment unterstreicht noch einmal die wichtige Rolle von Sec16 E29 im COPII vermittelten anterograden Transport, und lässt vermuten, dass die Regulation in diesem Prozess über Sec23 vermittelt wird.

4. Diskussion

4.1 Alternatives Spleißen und T-Zell Aktivierung

Der Prozess der T-Zell Aktivierung ist sehr dynamisch und gleichzeitig hoch reguliert. Sobald eine naive T-Zelle auf ihr Antigen trifft, beginnen diverse Signalkaskaden die Funktionalität der Zelle zu verändern. Hierfür wichtig ist die einhergehende Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, deren Zielgene die Aspekte der T-Zell Aktivierung beeinflussen und kontrollieren. Dazu zählen die Transkriptions-Faktoren der NFAT Familie (engl. *nuclear factor of activated T-cells*), die die Transkription von Zytokinen wie zum Beispiel den Interleukinen aktivieren (Muller & Rao, 2010), sowie der ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*). NF- κ B kann während der Immunantwort von Zytokinen aktiviert werden, und wiederum selbst die Transkription zahlreicher Chemokine fördern (Hayden & Ghosh, 2011). Neben der Untersuchung von Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Genexpression treten post-transkriptionelle Aspekte immer mehr in den Fokus aktueller Studien. Alternatives Spleißen von prä-mRNA wird in diesem Zusammenhang als weiterer Regulator der Genexpression diskutiert. Bereits zu Beginn der 2000er Jahre wurde durch genomweite Analysen erkannt, dass der Großteil aller Proteinkodierender humaner Primärtranskripte alternativ gespleißt wird, und dass dies u.a. in Zellen des Immunsystems gehäuft auftritt (Johnson et al, 2003; Modrek et al, 2001). Dieses Wissen konnte im Laufe der Jahre durch verbesserte Analysemethoden erweitert und präzisiert werden (Barbosa-Morais et al, 2012; Martinez et al, 2012), sodass das regulatorische Potenzial alternativen Spleißens immer mehr an Beachtung findet. Während neben diesem regulatorischen Aspekt im Kontext der T-Zell Aktivierung das Wissen um die zugrunde liegenden Mechanismen stetig wächst, ist über die funktionellen Konsequenzen alternativen Spleißens weitaus weniger bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Bedeutung alternativen Spleißens in der T-Zell Aktivierung am Beispiel von Sec16 zu untersuchen und zu belegen.

Zu Beginn konnte gezeigt werden, dass Exon 29 und 30 des Sec16 Gens mit der T-Zell Aktivierung alternativ gespleißt werden, was zu einer erhöhten Inklusion von Exon 29 führt (Abb. 3.1). Dass es sich bei dieser signalinduzierten Veränderung des Spleiß-Musters tatsächlich um einen mit der T-Zell Aktivierung spezifisch regulierten Prozess handelt, konnte in diversen Kontrollexperimenten demonstriert werden. Zum einen ist die Veränderung der

Sec16 Isoformexpression nicht mit einer während der Stimulation regulierten mRNA-Stabilität verbunden (Abb. 3.3), zum anderen konnte unter physiologischeren Bedingungen im Primärzellsystem (PBMCs) ebenfalls eine Inklusion von Exon 29 induziert werden (Abb. 3.22). Ferner ermöglicht die durch CHX-Experimente ermittelte Halbwertszeit von ca. zehn Stunden in Jsl1 Zellen einen zeitnahen Austausch in die durch alternatives Spleißen entstehenden Protein-Isoformen.

In bislang unveröffentlichten Daten konnte in der AG Heyd gezeigt werden, dass sich das Sec16 Spleiß-Muster in verschiedenen Geweben der Maus unterschiedlich verhält. Auch die diversen COPII-Orthologe werden gewebsspezifisch exprimiert (Miller & Schekman, 2013). Wie wichtig dies für die Entwicklung eines Organismus ist, zeigen beispielsweise die Mausmodelle für Sec24C, Sec23B und Sec23A, die meist mit einem frühen letalen Phänotyp verbunden sind (Adams et al, 2014; Tao et al, 2012; Zhu et al, 2015). Die Kombination aus einer differenziellen Expression der Sec-Proteine und alternativem Spleißen hat ein hohes Potenzial, den sekretorischen Apparat individuellen Anforderungen anzupassen.

Die Ergebnisse der Morpholino-Experimente und die Arbeit in $\Delta E29$ Hek293 Zellen berücksichtig nicht, dass die durch E29MO Behandlung induzierte Exklusion und die Deletion von E29 in 293Hek Zellen gleichzeitig zu einer Reduktion bzw. zum Verlust der VL-Isoform und einer Zunahme der E30- und Exkl-Isoformen führen. Die durch Überexpression der alternativen Sec16-CTDs in HeLa Zellen gewonnenen Erkenntnisse unterstützen allerdings die These, dass der Verlust der E29-Isoform ausschlaggebend ist, da diese den stärksten Einfluss auf den COPII-vermittelten Transport zeigte.

Alternatives Spleißen kann zu einer differenziellen Isoformexpression mit Proteinen verstärkter, schwächerer oder gar gegensätzlicher Funktionen resultieren. Beispielsweise entsteht durch alternatives Spleißen des Spleißfaktors U2AF26 (engl. U2 *auxiliary factor 26*) eine Veränderung im Leserahmen der mRNA, die zur Translation in die 3'-UTR (engl. *untranslated region*) und damit zu einem Protein mit Funktion in der circadianen Uhr führt (Preussner et al, 2014). Außerdem können Proteine entstehen, die dominant negativ gegenüber bereits vorhandenen Proteinen agieren, und somit biologische Prozesse beeinflussen können. Das kann im Kontext der Immunbiologie am Beispiel des Transkriptionsfaktors FoxP3 illustriert werden. FoxP3 ist wichtig für die Differenzierung und Funktionalität von CD4⁺ Zellen in regulatorische T-Zellen (Treg). Alternatives Spleißen der Exons zwei und sieben führt zu einer differenziellen Isoformexpression, deren Funktionen

lange Zeit nicht bekannt waren. In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass IL-1 β die Exklusion von Exon sieben stimuliert. Während FoxP3-VL und FoxP3 Δ 2 wichtig für die repressiven Eigenschaften von Treg-Zellen sind, konnte mit der FoxP3 Δ 2 Δ 7-Isoform eine weitere Funktion charakterisiert werden. Diese Isoform spielt eine bislang unbekannte Rolle in der Differenzierung von Th17 Zellen (Mailer et al, 2015).

Die während der T-Zell Aktivierung induzierte Inklusion von Sec16 E29 resultiert in einem Protein, das in seiner Funktionalität insofern verändert ist, als das es in einem bislang unbekanntem Mechanismus eine höhere Sekretionseffizienz nach T-Zell Aktivierung ermöglicht. Die biologische Funktionalität dieser E29 Isoform soll im Folgenden diskutiert werden.

4.2 Proteintransport in T-Zellen

Die Aktivierung einer T-Zelle führt unter anderem zur Synthese und Sekretion von Effektormolekülen, die im Rahmen der Immunantwort benötigt werden. Wie die aktivierte Zelle jedoch diesem erhöhten Sekretionsbedarf durch Anpassung der Proteintransport-Maschinerie gerecht wird, ist bislang nur marginal untersucht. So ist bekannt, dass die aktivierte T-Zelle durch eine Verlagerung des MTOC sowie Polarisierung von Aktinfilamenten den sekretorischen Apparat in Richtung der immunologischen Synapse ausrichten kann (Burkhardt et al, 2008; Kupfer et al, 1987). Dies erklärt einen zielorientierten Transport, nicht aber die Anpassung an eine höhere Transportlast.

Das Wissen über den sekretorischen Apparat in T-Zellen umfasst zu großen Teilen den Transport von Effektormolekülen zwischen post-Golgi Kompartimenten und der Plasmamembran. Ein gut studiertes Modellsystem ist das sekretorische Lysosom in CD8+ Zellen. Lysosomen sind im Allgemeinen durch Membranen vom Zytosol abgetrennte Strukturen, deren inneres Milieu sich durch einen angesäuerten pH-Wert auszeichnet. Diese Strukturen sind an Recycle-Prozessen innerhalb einer Zelle beteiligt. Sekretorische Lysosomen kommen in hematopoetischen Zell-Linien vor, wo sie zur regulierten Proteinsekretion fähig sind (Blott & Griffiths, 2002). In CD8+ Zellen sind sekretorische Lysosomen maßgeblich am Transport und der Sekretion zytotoxisch wirkender Moleküle zur immunologischen Synapse beteiligt (Lettau et al, 2007). Über die frühen initialen Schritte des Proteintransports in Zellen des Immunsystems, die dieser finalen Sekretion vorangehen und sie ermöglichen, ist jedoch vergleichsweise wenig bekannt.

Diese Arbeit demonstriert, wie sich der frühe sekretorische Apparat einer ansteigenden Transportlast nach T-Zell Aktivierung anpasst. So konnte gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen eine höhere Transporteffizienz im Vergleich zu ruhenden T-Zellen aufweisen (Abb. 3.9 und 3.10). Als Grundlage hierfür wird eine Zunahme von COPII-Vesikeln vorgeschlagen, die abhängig von alternativem Spleißen von Sec16 ist (Abb. 3.15). Ferner konnte gezeigt werden, dass alternatives Sec16-Spleißen die Sekretion von IL2 in primären PBMCs beeinflusst (Abb. 3.23). Aus Studien in HeLa Zellen ist bekannt, dass sich sowohl eine chronische als auch eine akute Erhöhung der Transportlast auf die Anzahl und Morphologie von ERES auswirkt (Farhan et al, 2008). Demnach resultiert ein akuter Anstieg der Cargolast in größeren vesikulären Strukturen, während eine chronisch hohe Cargolast gleichzeitig zu einem Anstieg als auch zur Größenzunahme vesikulärer Strukturen führt. Diese Arbeit analysiert jedoch kein endogenes Cargomolekül, sondern beruht vielmehr auf Überexpression des anterograden Cargomoleküls GAT1 (engl. *GABA transporter 1*). Außerdem wird in dieser Studie die Anpassung von ERES an veränderte Cargolast untersucht, während sich die hier vorliegende Arbeit mit COPII-Vesikeln beschäftigt. Ein Vergleich mit der genannten Studie ist insofern interessant, da COPII-Vesikel aus ERES hervorgehen (Hughes et al, 2009). Definiert man die Sekretion von Effektormolekülen während der Immunantwort als chronische Cargolast, die zwar durch einen akuten Stimulus ausgelöst wird, aber über einen längeren Zeitpunkt abläuft, scheint die Zunahme vesikulärer Strukturen ein wichtiger gemeinsamer Punkt zu sein. Unterstützend kann hier ein mathematisches Modell herangezogen werden, das die Zunahme von ERES durch erhöhte Transportlast in Abhängigkeit des COPII-Expressionslevels und des COPII Turnovers beschreibt (Heinzer et al, 2008). Eine Veränderung im Expressionslevel verschiedener COPII-Proteine nach T-Zell Aktivierung konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3.13), sodass dieser Punkt der Modellierung hier vernachlässigt werden kann.

Dieses Modell sagt außerdem voraus, dass eine erhöhte Sar1-GTPase-Aktivität das Recycling von COPII-Komponenten erhöht. Dabei wird zwischen einem freien zytosolischen und einem membrangebundenen Pool von COPII-Proteinen unterschieden. Eine höhere Recycling-Rate resultiert nach dem beschriebenen Modell in kleineren ERES und einem größeren zytosolischen Pool an COPII-Komponenten (Heinzer et al, 2008). Eine Analyse der Vesikelgröße und die Bestimmung des zytosolischen und membrangebundenen COPII-Protein Pools in aktivierten T-Zellen könnte die Anwendung des beschriebenen mathematischen Modells auf

das T-Zell-Modell begründen oder verwerfen. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Sar1-GTPase-Aktivität durch eine differenzielle Interaktion der Sec16-CTDs mit dem GTPase-aktivierenden Faktor Sec23 beeinflusst wird. Die in aktivierten T-Zellen verstärkt vorkommende Sec16-E29-CTD interagiert stärker mit Sec23. Dadurch kann die Sar1-GTPase Aktivität erhöht werden, was einen höheren COPII-Turnover zur Folge hat (siehe auch Abb. 4.1).

4.3 Physiologische Relevanz

Die Bedeutung eines funktionellen sekretorischen Apparates wird durch zahlreiche Krankheitsbilder deutlich, die mit Mutationen in einem oder mehreren der Sec-Proteine verbunden sind (Jensen & Schekman, 2011). Spleiß-Defekte sind hier bislang jedoch noch nicht berücksichtigt worden.

Dass alternatives Spleißen von Sec16 eine funktionelle Bedeutung in einem physiologisch relevanten Kontext hat, konnte in Experimenten mit humanen Primärzellen gezeigt werden. Dass eine Stimulation primärer CD4+ Zellen mit PHA alternatives Sec16 Spleißen induzieren kann, ist bereits bekannt (Martinez et al, 2012) und konnte in dieser Arbeit in einem analogen System reproduziert werden (Abb. 3.22). Die funktionelle Bedeutung konnte am Beispiel der IL2 Sekretion demonstriert werden (Abb. 3.23). Die Auswirkung der aktivierungsinduzierten Inklusion von E29 auf die Sekretion eines endogenen Cargomoleküls wie IL2 verdeutlicht die physiologische Relevanz von alternativem Spleißen in Zellen des Immunsystems. Die Untersuchung weiterer endogener Cargomoleküle und die Etablierung zusätzlicher Exportassays, könnten diesen Aspekt weiter untermauern und eine mögliche Cargo-Spezifität beleuchten. Um umfassendere und weiterführende Experimente betreiben zu können, empfiehlt sich die Etablierung Sec16 E29 defizienter T-Zell-Linien. Durch Anwendung der Crispr/Cas9-Methode konnten bereits Δ E29 293-Zell-Linien generiert und analysiert werden (Abb. 3.24-27). Die Übertragung dieses Systems auf Jsl1 Zellen blieb bislang jedoch ohne Ergebnisse. Die transiente Transfektion dieser Zell-Linie ist im Vergleich zu anderen etablierten Zell-Linien gering, was eine Selektion positiver Einzelklone erschwert. Die Etablierung des Crispr/Cas9-Systems in Jsl1 Zellen durch Transduktion viral basierter Plasmide könnte hier eine Möglichkeit darstellen, den Verlust von Exon 29 in einer relevanten T-Zell-Linie zu untersuchen.

Sec16 ist ein essentielles Gen, was bedeutet, dass ein Knockout letal ist. Dies konnte in Hefe und im eukaryotischen Zellkultursystemen demonstriert werden (Blomen et al, 2015; Connerly et al, 2005; Espenshade et al, 1995; Wang et al, 2015), und erklärt weshalb bislang kein Sec16-Mausmodell zur Verfügung steht. Ein Exon spezifischer Knockout wäre eine Alternative, um die Auswirkungen eines Verlusts von Sec16-E29 in Zellen des Immunsystems zu untersuchen. Die Sequenz von Sec16 ist zwischen Maus und Mensch gut konserviert und ein alternatives Gewebe-spezifisches Spleiß-Muster der Exons 29 und 30 und zusätzlich auch 31 konnten bereits in der Maus beobachtet werden (unveröffentlichte Daten). Die Anwendung des Crispr/Cas9-Systems im Mausmodell, bietet eine spannende Möglichkeit die präzise Rolle der Sec16-Spleiß Isoformen zu untersuchen.

4.4 Rolle von Sec16 im anterograden Transportweg

Dass Sec16 essentiell für einen funktionellen Sekretionsapparat ist, ist aus mehreren Arbeiten bekannt, während seine konkrete Funktion hingegen weiterhin umstritten ist: Zum einen wird Sec16 als eine Art Plattform beschrieben, die an ERES lokalisiert und in einem regulierten Ablauf COPII-Proteine zur Vesikelformation rekrutiert (Barlowe & Miller, 2013; Budnik & Stephens, 2009). Zum anderen wird Sec16 als negativer Regulator des Sar1 GTPase-Zyklus diskutiert (Bharucha et al, 2013; Supek et al, 2002). Neuere Arbeiten bringen gar beide Funktionen in Zusammenhang: Zum einen wird die negative regulatorische Eigenschaft von Sec16 auf die GTPase-Aktivität von Sar1 als evolutionsgeschichtlich ursprünglicher angenommen, da diese Eigenschaften in Hefemodellen beobachtet wurden. Und zum anderen wird die rekrutierende Funktion als eine zusätzlich erworbene Eigenschaft höherer Eukaryotischen dargestellt (Sprangers & Rabouille, 2015).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schließen keines der beiden Modelle explizit aus. Vielmehr wird durch die funktionelle Charakterisierung der alternativen Sec16 Spleiß-Isoformen eine weitere mögliche Form der Regulation des sekretorischen Apparats in Anpassung an veränderte externe Stimuli beschrieben.

Das Sec16 Spleiß-Muster ändert sich mit der T-Zell Aktivierung und die daraus resultierenden Isoformen zeigen eine differentielle Funktionalität im frühen sekretorischen Apparat. Das unterschiedliche Interaktionspotenzial der alternativen Sec16-CTDs unterstützt sowohl das Modell einer COPII-Rekrutierungs-Plattform, als auch das Modell des negativen Sar1-Regulators. Eine stärkere Interaktion mit Sec23 kann zur Rekrutierung weiterer Komponenten

der Vesikelhülle führen, die wiederum die GTPase-aktivierende Funktion von Sec23 stärken. Eine daraus veränderte GTPase-Aktivität von Sar1 kann wiederum den Prozess der Vesikelformation und -abschnürung beschleunigen oder verlangsamen. Die beiden diskutierten Eigenschaften von Sec16 im anterograden Proteintransport scheinen sich also vielmehr zu ergänzen, als gegenseitig auszuschließen. Welcher Stimulus welchen Prozess in welcher Reihenfolge bedingt, bleibt jedoch herauszufinden.

Eine weitere mögliche Funktion der alternativen Sec16-CTDs könnte in einem Beitrag zur Cargospezifität liegen. Die mikroskopische Analyse des Exportassays war in $\Delta E29$ Hek293 Zellen nach 40°C über Nacht Hitzeschock nahezu unmöglich. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde ein massiver Verlust der Adhärenz beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die Sekretion für die Adhärenz wichtiger Moleküle in $\Delta E29$ Hek293 Zellen defekt ist, was in Adhärenz- und proteinspezifischen Sekretionsassays untersucht werden könnte.

4.5 Sec 16 als spleiß-regulierte Protein-Protein Interaktionsdomäne – Ein Modell

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in einem Modell zusammenfassen, in dem die C-Terminale Domäne von Sec16 eine Protein-Interaktions-Plattform darstellt, die durch alternatives Spleißen reguliert wird und aufgrund differentieller Interaktionen mit anderen COPII-Komponenten die Effizienz der COPII-Vesikel-Formation beeinflusst (Abb. 4.1).

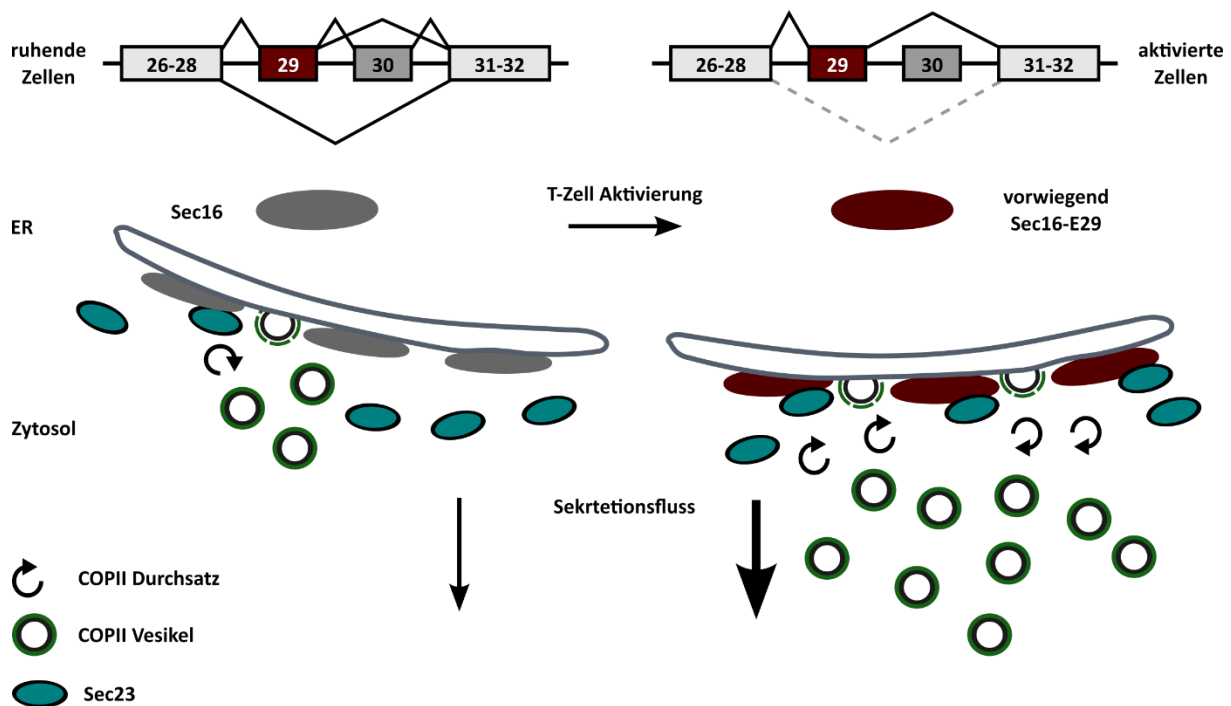


Abbildung 4. 1 Modell: Rolle von Sec16 Spleißen im frühen sekretorischen Apparat während der T-Zell Aktivierung. Im oberen Teil sind die alternativen Sec16 Spleiß-Varianten dargestellt. Nach T-Zell Aktivierung liegt hauptsächlich die E29 Isoform vor (dunkelrot). Diese zeigt in aktivierten T-Zellen eine stärkere Interaktion mit Sec23, wodurch eine höhere COPII-Dynamik ermöglicht wird. Dies führt zu einer erhöhten Vesikelzahl und einem erhöhten Sekretionsfluss.

24 Stunden nach T-Zell Aktivierung ändert sich das Sec16-Spleiß Muster, was zu einer erhöhten Inklusion von Exon 29 und einer einhergehenden Exklusion von Exon 30 führt. Durch eine geringe Halbwertszeit von zehn Stunden kann der Sec16 Proteingehalt der ruhenden T-Zelle (Abb. 4.1, links im Modell, in grau dargestellt) gegen die nach Aktivierung vorwiegend exprimierte E29-Isoform ausgetauscht werden (Abb. 4.1, rechts im Modell, dunkelrot dargestellt). Durch die alternative Inklusion der Exons 29 und 30 wird das Interaktionspotential der Sec16-CTD mit anderen COPII-Komponenten verändert. Die

vorrangige Interaktion der E29-Isoform mit Sec23 begünstigt eine höhere COPII-Dynamik, die in einem bislang ungeklärten Mechanismus in einer erhöhten Vesikelzahl resultiert.

Auf diese Weise reguliert alternatives Spleißen die Funktionalität von Sec16, wodurch die Zelle nach Aktivierung in der Lage ist, ihren sekretorischen Apparat durch eine erhöhte Anzahl von COPII-Vesikeln an die erhöhte Transportlast nach T-Zell Aktivierung anzupassen.

4.6 Ausblick

Fokus dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des alternativen Sec16 Spleißens in der T-Zell-Aktivierung. Der diesem Spleiß-Event zugrundeliegende Mechanismus wurde hingegen nicht untersucht. Für die Regulation der Sec16-Expression und Aktivität gibt es bereits verschiedene Modelle, die alternatives Spleißen jedoch nicht berücksichtigen. Phosphorylierung ist ein in der Literatur diskutierter Mechanismus, der die Funktionalität von Komponenten des sekretorischen Apparates wie Sec16 beeinflussen kann. In Neuronen scheint Sec16 ein Substrat der LRRK2 (engl. *Leucine-rich repeat kinase 2*) zu sein (Cho et al, 2014), während es in anderen Kontexten durch Phosphorylierung der Kinasen ERK2 und ERK7 reguliert werden kann (Farhan et al, 2010; Zacharogianni et al, 2011). Dabei wird ERK2 durch den EGF (engl. *epidermal growth factor*) aktiviert, was die Rekrutierung von Sec16 an ERES stimuliert (Farhan et al, 2010), während die Aktivierung von ERK7 im Zusammenhang mit Nährstoffmangel einen gegenteiligen Effekt zeigt (Zacharogianni et al, 2011). Neben der Aktivierung der ERK2 durch EGF vermittelte Signalkaskaden konnte außerdem gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren die Sec16 Expression regulieren können, und damit einen Einfluss auf die Proliferation einer Zellpopulation haben (Tillmann et al, 2015). Phosphorylierung ist eine wichtige Komponente der Signaltransduktion in der T-Zell Aktivierung (siehe Kapitel 1.3). Eine Kombination dieses und anderer Regulationsmechanismen zusammen mit alternativem Spleißen, ist denkbar um die Funktionalität von Sec16 während der T-Zell Aktivierung zu steuern. Die Untersuchung des Sec16-Spleiß Mechanismus könnte hierzu einen großen Beitrag für ein besseres Verständnis leisten.

Eine Form des alternativen Spleißens, die hier bislang nicht beschrieben wurde, ist die Entstehung zirkulärer RNAs (circRNAs), denen ein hohes regulatorisches Potenzial zugeschrieben wird (Memczak et al, 2013). Diese ungewöhnliche Form nichtkodierender RNA entsteht durch die Fusion der 3'-Spleiß-Stelle eines Exons mit der 5'-Spleiß-Stelle eines vorangehenden Exons unter Verwendung kanonischer Signalsequenzen (Starke et al, 2015).

Die Zirkularisierung eines oder mehrerer Exons wird durch repetitive Elemente in den flankierenden Introns, die umgekehrt komplementär zueinander sind, begünstigt (Ivanov et al, 2015). Die Introns 28 und 30 des Sec16 Gens weisen einen hohen Grad komplementärer Sequenzen auf (siehe Alignment im Anhang). Eine circRNA, die Exon 29 und/oder E30 von Sec16 enthält, konnte jedoch in Jsl1 Zellen nicht nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Dies könnte mit den vergleichsweise gering ausfallenden Größen von 75 Nukleotiden des Exons 29 und 60 Nukleotiden des Exons 30 zusammenhängen. Der Anteil komplementärer Sequenzen in den Introns 28 und 30 kann jedoch zur Bildung einer Sekundärstruktur führen, die zwar nicht in einer zirkulären RNA resultiert, den Spleiß-Vorgang aber auf eine bislang nicht bekannte Weise beeinflussen kann.

Proteine der SR-Familie sind als Spleiß-aktivierende Faktoren wichtige Komponenten in der Regulation dieses Prozesses (Graveley, 2000). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass der Spleißfaktor SRSF10 zahlreiche alternative Spleiß-Events reguliert (Zhou et al, 2014). Diese Studie beruht auf RNA-Sequenzierungsdaten nach SRSF10 *knockout* in der aus Hühnern stammenden B-Zell-Linie DT40 und benennt Sec16 als davon betroffenes Zielgen. Ein Einfluss auf das Spleiß-Muster der alternativen Exons 29 und 30 in Sec16 konnte in einer humanen Zell-Linie nach SRSF10 *knockdown* jedoch nicht bestätigt werden (unveröffentlichte Daten). Um den regulierenden Mechanismus dennoch zu identifizieren, könnte mit einem in der Jsl1 Zell-Linie bereits etablierten Minigen-System gearbeitet werden (Michel et al, 2014). Dabei wird ein sogenanntes Minigen erstellt, das die alternativen Exons inklusive der flankierenden Intron-Sequenzen in einem konstitutiven Kontext enthält. Dadurch kann man ein Konstrukt erhalten, das die Regulation des endogenen Gens rekapituliert. Durch Mutationsanalysen des entsprechenden Minigens kann die *cis*-regulierende Sequenz identifiziert werden. Mit der auf diese Weise identifizierten Sequenz könnte dann im Anschluss in RNA-Protein-Interaktionsstudien der regulatorische Faktor ermittelt werden, der an diese Sequenz bindet. Eine weitere Möglichkeit den *trans*-regulatorischen Faktor zu identifizieren ist die Anwendung eines etablierten siRNA-Screens (Schultz, unveröffentlichte Daten). Dieser Screen ist gegen 100 RNA-bindende Proteine gerichtet und ein siRNA-vermittelte *knock down* des putativen *trans*-regulatorischen Faktors sollte durch Spleiß-sensitive RT-PCRs ermittelt werden können. hnRNPLL und CELF2 sind zum Beispiel in der T-Zell Aktivierung hochregulierte Spleißfaktoren, die in diesem Zusammenhang untersucht werden könnten (Mallory et al, 2015; Oberdoerffer et al, 2008). Anschließend könnte überprüft werden, ob derselbe Mechanismus das

alternative Spleißen weiterer Kandidaten mit putativer Funktion in der Proteinsekretion mit der T-Zell Aktivierung reguliert. Ein Beispiel ist das Chaperon ERp29, das ein alternatives Exon enthält, welches nach Stimulation 25% mehr Inklusion aufweist (Martinez et al, 2012). Ferner könnte die Untersuchung der Zelltyp-Spezifität dieser Spleiß-Events zum weiteren Verständnis beitragen. Bislang sind diese Prozesse nur in T-Zellen bekannt, nicht aber in weiteren Immunzellen wie zum Beispiel B-Zellen.

Neben der Untersuchung des Spleiß-Mechanismus von Sec16A sind einige Aspekte der Funktionalität der Spleiß-Isoformen weiterhin ungeklärt. In Coimmunopräzipitationsstudien konnte eine differentielle Komplexbildung der alternativen Sec16-Isoformen mit verschiedenen COPII-Proteinen demonstriert werden, die durch In- oder Exklusion eines einzelnen Exons verändert waren (Abb. 3.20). Bislang unbeachtet geblieben ist jedoch die Frage inwiefern die alternative Inklusion der Exons 29 und 30 den C-Terminus strukturell verändert um diese differentielle Interaktion zu ermöglichen. Aussagen über eine solche Veränderung sind bisher nicht möglich, da der C-Terminale Bereich von Sec16 strukturell noch nicht aufgeklärt werden konnte. Anhand der Interaktionstests kann außerdem nicht gezeigt werden, ob es sich bei den beobachteten Komplexen um direkte Bindungen handelt, oder ob diese über einen weiteren Interaktionspartner vermittelt werden. Die Arbeit mit aufgereinigten rekombinanten Proteinen könnte hier einen guten Beitrag über das Verständnis der Sec16 Interaktionen leisten. Die bevorzugte Interaktion der Sec16 E29-Isoform mit Sec23 scheint eine höhere COPII-Dynamik zu ermöglichen, was in FRAP-Experimenten gezeigt werden konnte (Abb. 3.27). FRAP-Experimente mit Sec13 oder 31 aus der äußeren Vesikelhülle könnten diese Beobachtung weiter unterstützen. Der Mechanismus, der in Verbindung mit einer höheren COPII-Dynamik zu einer erhöhten Vesikelzahl führt, ist bislang nicht bekannt. Durch das vermehrte Binden von Sec23 an Sec16 E29 könnte die GTPase-Aktivität von Sar1 in aktivierten T-Zellen höher sein als in ruhenden, da Sec23 die GTPase-Aktivität von Sar1 stimuliert. Die Dynamik von Sec31 müsste der von Sec23 entsprechen, denn Sec31 stimuliert die GTPase-aktivierende Eigenschaft von Sec23. Der Einfluss auf die Sar1 vermittelte GTP-Hydrolyse könnte in GTPase-Assays unter Verwendung der erwähnten rekombinanten Proteine untersucht werden. Eine mögliche Form dieses Experiments ist die Bestimmung der GTP-Hydrolyse durch Messung von Tryptophan-Fluoreszenz. Die Bindung von GTP oder GDP verändert die Konformation der GTPase, sodass

aromatische Seitenketten frei oder okkupiert sind. Dies kann anhand der intrinsischen Fluoreszenz von Tryptophan gemessen werden und ermöglicht dadurch eine Aussage über den Verlauf der Sar1 vermittelten GTP-Hydrolyse (Antonny et al, 2001; Sato & Nakano, 2005).

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal, den Einfluss von alternativem Spleißen für den COPII-vermittelten Proteintransport in T-Zellen und bietet eine Grundlage für eine neue Regulationsform der Proteinsekretion. Die Identifizierung weiterer alternativ gespleißter ER-residenter Proteine mit putativer Funktion im sekretorischen Apparat (Martinez et al, 2012) deutet daraufhin, dass noch weitere Beispiele folgen können.

5. Literaturverzeichnis

Adams EJ, Chen XW, O'Shea KS, Ginsburg D (2014) Mammalian COPII coat component SEC24C is required for embryonic development in mice. *The Journal of biological chemistry* **289**: 20858-20870

Adolf F, Herrmann A, Hellwig A, Beck R, Brugger B, Wieland FT (2013) Scission of COPI and COPII vesicles is independent of GTP hydrolysis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **14**: 922-932

Antonny B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2001) Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nature cell biology* **3**: 531-537

Appenzeller-Herzog C, Hauri HP (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of cell science* **119**: 2173-2183

Barbosa-Morais NL, Irimia M, Pan Q, Xiong HY, Gueroussov S, Lee LJ, Slobodeniuc V, Kutter C, Watt S, Colak R, Kim T, Misquitta-Ali CM, Wilson MD, Kim PM, Odom DT, Frey BJ, Blencowe BJ (2012) The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science (New York, NY)* **338**: 1587-1593

Barlowe CK, Miller EA (2013) Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* **193**: 383-410

Bharucha N, Liu Y, Papanikou E, McMahon C, Esaki M, Jeffrey PD, Hughson FM, Glick BS (2013) Sec16 influences transitional ER sites by regulating rather than organizing COPII. *Molecular biology of the cell* **24**: 3406-3419

Bhattacharyya D, Glick BS (2007) Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Molecular biology of the cell* **18**: 839-849

Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry* **72**: 291-336

Blomen VA, Majek P, Jae LT, Bigenzahn JW, Nieuwenhuis J, Staring J, Sacco R, van Diemen FR, Olk N, Stukalov A, Marceau C, Janssen H, Carette JE, Bennett KL, Colinge J, Superti-Furga G, Brummelkamp TR (2015) Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science (New York, NY)* **350**: 1092-1096

Blott EJ, Griffiths GM (2002) Secretory lysosomes. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 122-131

Budnik A, Stephens DJ (2009) ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS letters* **583**: 3796-3803

-
- Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH (2008) The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annual review of immunology* **26**: 233-259
- Carmody SR, Wente SR (2009) mRNA nuclear export at a glance. *Journal of cell science* **122**: 1933-1937
- Cho HJ, Yu J, Xie C, Rudrabhatla P, Chen X, Wu J, Parisiadou L, Liu G, Sun L, Ma B, Ding J, Liu Z, Cai H (2014) Leucine-rich repeat kinase 2 regulates Sec16A at ER exit sites to allow ER-Golgi export. *The EMBO journal* **33**: 2314-2331
- Connerly PL, Esaki M, Montegna EA, Strongin DE, Levi S, Soderholm J, Glick BS (2005) Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Current biology : CB* **15**: 1439-1447
- D'Arcangelo JG, Stahmer KR, Miller EA (2013) Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 2464-2472
- Dujardin G, Lafaille C, de la Mata M, Marasco LE, Munoz MJ, Le Jossic-Corcus C, Corcos L, Kornblihtt AR (2014) How slow RNA polymerase II elongation favors alternative exon skipping. *Molecular cell* **54**: 683-690
- Espenshade P, Gimeno RE, Holzmacher E, Teung P, Kaiser CA (1995) Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *The Journal of cell biology* **131**: 311-324
- Faini M, Beck R, Wieland FT, Briggs JA (2013) Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends in cell biology* **23**: 279-288
- Farhan H, Weiss M, Tani K, Kaufman RJ, Hauri HP (2008) Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load. *The EMBO journal* **27**: 2043-2054
- Farhan H, Wendeler MW, Mitrovic S, Fava E, Silberberg Y, Sharan R, Zerial M, Hauri HP (2010) MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. *The Journal of cell biology* **189**: 997-1011
- Fromme JC, Orci L, Schekman R (2008) Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends in cell biology* **18**: 330-336
- Goodwin JS, Kenworthy AK (2005) Photobleaching approaches to investigate diffusional mobility and trafficking of Ras in living cells. *Methods (San Diego, Calif)* **37**: 154-164
- Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA (New York, NY)* **6**: 1197-1211
- Han SP, Tang YH, Smith R (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *The Biochemical journal* **430**: 379-392

-
- Hayden MS, Ghosh S (2011) NF-kappaB in immunobiology. *Cell research* **21**: 223-244
- Heinzer S, Worz S, Kalla C, Rohr K, Weiss M (2008) A model for the self-organization of exit sites in the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* **121**: 55-64
- Hermiston ML, Xu Z, Weiss A (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology* **21**: 107-137
- Huang M, Weissman JT, Beraud-Dufour S, Luan P, Wang C, Chen W, Aridor M, Wilson IA, Balch WE (2001) Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *The Journal of cell biology* **155**: 937-948
- Hughes H, Budnik A, Schmidt K, Palmer KJ, Mantell J, Noakes C, Johnson A, Carter DA, Verkade P, Watson P, Stephens DJ (2009) Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *Journal of cell science* **122**: 2924-2934
- Huppa JB, Davis MM (2003) T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature reviews Immunology* **3**: 973-983
- Ivan V, de Voer G, Xanthakis D, Spoorendonk KM, Kondylis V, Rabouille C (2008) Drosophila Sec16 mediates the biogenesis of tER sites upstream of Sar1 through an arginine-rich motif. *Molecular biology of the cell* **19**: 4352-4365
- Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath HT, Orejuela MR, Piechotta M, Levanon EY, Landthaler M, Dieterich C, Rajewsky N (2015) Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell reports* **10**: 170-177
- Jensen D, Schekman R (2011) COPII-mediated vesicle formation at a glance. *Journal of cell science* **124**: 1-4
- Jin L, Pahuja KB, Wickliffe KE, Gorur A, Baumgartel C, Schekman R, Rape M (2012) Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature* **482**: 495-500
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science (New York, NY)* **302**: 2141-2144
- Krecic AM, Swanson MS (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Current opinion in cell biology* **11**: 363-371
- Kung LF, Pagant S, Futai E, D'Arcangelo JG, Buchanan R, Dittmar JC, Reid RJ, Rothstein R, Hamamoto S, Snapp EL, Schekman R, Miller EA (2012) Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *The EMBO journal* **31**: 1014-1027

-
- Kupfer A, Swain SL, Singer SJ (1987) The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *The Journal of experimental medicine* **165**: 1565-1580
- Lallena MJ, Chalmers KJ, Llamazares S, Lamond AI, Valcarcel J (2002) Splicing regulation at the second catalytic step by Sex-lethal involves 3' splice site recognition by SPF45. *Cell* **109**: 285-296
- Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 87-123
- Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O (2007) Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunology letters* **108**: 10-19
- Liao W, Lin JX, Leonard WJ (2013) Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* **38**: 13-25
- Lynch KW (2004) Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nature reviews Immunology* **4**: 931-940
- Lynch KW, Weiss A (2000) A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Molecular and cellular biology* **20**: 70-80
- Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**: 2476-2489
- Maher S, Toomey D, Condron C, Bouchier-Hayes D (2002) Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunology and cell biology* **80**: 131-137
- Mailer RK, Joly AL, Liu S, Elias S, Tegner J, Andersson J (2015) IL-1beta promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Scientific reports* **5**: 14674
- Majeti R, Bilwes AM, Noel JP, Hunter T, Weiss A (1998) Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science (New York, NY)* **279**: 88-91
- Mallory MJ, Allon SJ, Qiu J, Gazzara MR, Tapescu I, Martinez NM, Fu XD, Lynch KW (2015) Induced transcription and stability of CELF2 mRNA drives widespread alternative splicing during T-cell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: E2139-2148
- Martinez NM, Lynch KW (2013) Control of alternative splicing in immune responses: many regulators, many predictions, much still to learn. *Immunological reviews* **253**: 216-236

Martinez NM, Pan Q, Cole BS, Yarosh CA, Babcock GA, Heyd F, Zhu W, Ajith S, Blencowe BJ, Lynch KW (2012) Alternative splicing networks regulated by signaling in human T cells. *RNA (New York, NY)* **18**: 1029-1040

Matera AG, Wang Z (2014) A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**: 108-121

Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**: 386-398

Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, Yeung T (1998) COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**: 263-275

Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, Le Noble F, Rajewsky N (2013) Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **495**: 333-338

Michel M, Wilhelmi I, Schultz AS, Preussner M, Heyd F (2014) Activation-induced tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (Traf3) alternative splicing controls the noncanonical nuclear factor kappaB pathway and chemokine expression in human T cells. *The Journal of biological chemistry* **289**: 13651-13660

Miller EA, Schekman R (2013) COPII - a flexible vesicle formation system. *Current opinion in cell biology* **25**: 420-427

Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C (2001) Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic acids research* **29**: 2850-2859

Montegna EA, Bhawe M, Liu Y, Bhattacharyya D, Glick BS (2012) Sec12 binds to Sec16 at transitional ER sites. *PloS one* **7**: e31156

Mossesso E, Bickford LC, Goldberg J (2003) SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* **114**: 483-495

Muller MR, Rao A (2010) NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature reviews Immunology* **10**: 645-656

Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-365

Novick P, Field C, Schekman R (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205-215

Oberdoerffer S, Moita LF, Neems D, Freitas RP, Hacohen N, Rao A (2008) Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL. *Science (New York, NY)* **321**: 686-691

Osowski CM, Urano F (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in enzymology* **490**: 71-92

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics* **40**: 1413-1415

Papanikou E, Glick BS (2014) Golgi compartmentation and identity. *Current opinion in cell biology* **29**: 74-81

Preiss T, Hentze MW (1998) Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* **392**: 516-520

Preussner M, Wilhelmi I, Schultz AS, Finkernagel F, Michel M, Moroy T, Heyd F (2014) Rhythmic U2af26 alternative splicing controls PERIOD1 stability and the circadian clock in mice. *Molecular cell* **54**: 651-662

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* **8**: 2281-2308

Rao MK, Wilkinson MF (2006) Tissue-specific and cell type-specific RNA interference in vivo. *Nature protocols* **1**: 1494-1501

Reed R, Maniatis T (1985) Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. *Cell* **41**: 95-105

Robinson MS (2015) Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*

Rothrock CR, House AE, Lynch KW (2005) HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer. *The EMBO journal* **24**: 2792-2802

Rudd CE, Schneider H (2003) Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nature reviews Immunology* **3**: 544-556

Ruskin B, Krainer AR, Maniatis T, Green MR (1984) Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* **38**: 317-331

Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, Woodley D, Polischuk R, Schekman R, Malhotra V (2009) TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell* **136**: 891-902

Sato K, Nakano A (2005) Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nature structural & molecular biology* **12**: 167-174

Scales SJ, Pepperkok R, Kreis TE (1997) Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* **90**: 1137-1148

Sprangers J, Rabouille C (2015) SEC16 in COPII coat dynamics at ER exit sites. *Biochemical Society transactions* **43**: 97-103

Starke S, Jost I, Rossbach O, Schneider T, Schreiner S, Hung LH, Bindereif A (2015) Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell reports* **10**: 103-111

Supek F, Madden DT, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2002) Sec16p potentiates the action of COPII proteins to bud transport vesicles. *The Journal of cell biology* **158**: 1029-1038

Szul T, Sztul E (2011) COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda, Md)* **26**: 348-364

Tao J, Zhu M, Wang H, Afelik S, Vasievich MP, Chen XW, Zhu G, Jensen J, Ginsburg D, Zhang B (2012) SEC23B is required for the maintenance of murine professional secretory tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: E2001-2009

Tilgner H, Knowles DG, Johnson R, Davis CA, Chakraborty S, Djebali S, Curado J, Snyder M, Gingeras TR, Guigo R (2012) Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome research* **22**: 1616-1625

Tillmann KD, Reiterer V, Baschieri F, Hoffmann J, Millarte V, Hauser MA, Mazza A, Atias N, Legler DF, Sharan R, Weiss M, Farhan H (2015) Regulation of Sec16 levels and dynamics links proliferation and secretion. *Journal of cell science* **128**: 670-682

Trowbridge IS, Thomas ML (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annual review of immunology* **12**: 85-116

Venditti R, Scanu T, Santoro M, Di Tullio G, Spaar A, Gaibisso R, Beznoussenko GV, Mironov AA, Mironov A, Jr., Zelante L, Piemontese MR, Notarangelo A, Malhotra V, Vertel BM, Wilson C, De Matteis MA (2012) Sedlin controls the ER export of procollagen by regulating the Sar1 cycle. *Science (New York, NY)* **337**: 1668-1672

Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**: 701-718

Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**: 470-476

Wang T, Birsoy K, Hughes NW, Krupczak KM, Post Y, Wei JJ, Lander ES, Sabatini DM (2015) Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science (New York, NY)* **350**: 1096-1101

Watson P, Forster R, Palmer KJ, Pepperkok R, Stephens DJ (2005) Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. *Nature cell biology* **7**: 48-55

Watson P, Townley AK, Koka P, Palmer KJ, Stephens DJ (2006) Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **7**: 1678-1687

Wendeler MW, Paccaud JP, Hauri HP (2007) Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO reports* **8**: 258-264

Whittle JR, Schwartz TU (2010) Structure of the Sec13-Sec16 edge element, a template for assembly of the COPII vesicle coat. *The Journal of cell biology* **190**: 347-361

Will CL, Luhrmann R (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**

Xu Z, Weiss A (2002) Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nature immunology* **3**: 764-771

Yonekawa S, Furuno A, Baba T, Fujiki Y, Ogasawara Y, Yamamoto A, Tagaya M, Tani K (2011) Sec16B is involved in the endoplasmic reticulum export of the peroxisomal membrane biogenesis factor peroxin 16 (Pex16) in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 12746-12751

Zacharogianni M, Kondylis V, Tang Y, Farhan H, Xanthakis D, Fuchs F, Boutros M, Rabouille C (2011) ERK7 is a negative regulator of protein secretion in response to amino-acid starvation by modulating Sec16 membrane association. *The EMBO journal* **30**: 3684-3700

Zeuschner D, Geerts WJ, van Donselaar E, Humbel BM, Slot JW, Koster AJ, Klumperman J (2006) Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers. *Nature cell biology* **8**: 377-383

Zhou X, Wu W, Wei N, Cheng Y, Xie Z, Feng Y (2014) Genome-wide analysis of SRSF10-regulated alternative splicing by deep sequencing of chicken transcriptome. *Genomics data* **2**: 20-23

Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R (2002) Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**: 182-185

Zhu M, Tao J, Vasievich MP, Wei W, Zhu G, Khoriaty RN, Zhang B (2015) Neural tube opening and abnormal extraembryonic membrane development in SEC23A deficient mice. *Scientific reports* **5**: 15471

III Anhang

A. Tabellen

Tabelle 1 Oligonukleotide. Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit Angabe des jeweiligen Verwendungszwecks.

Klonierung	Name	Sequenz
Insert		
Sec16-CTDs VL und Exkl	Sec16-CTD-XhoI-fw	GCCTCGAGACCATGGAGAAGAAAGCCCCGCCCC
VL und Exkl	Sec16-CTD-BamHI-rev	GCGGATCCGTTTCAGCACCAGGTGCTTCCTC
E30	Sec16-E30-fw	CTTTCGCGCTGTAGTTCAATG
E30	Sec16-E30-rev	GCTCCTACAGCGCGAAAGCTTGGGCTCTGGGGCAG
E29	Sec16-E29-fw	GCTCCTGGCGACCTCCCTGC
E29	Sec16-E29-rev	GGTCGCCAGGAGCCTCTCCTCCCTGGG
zytoplasmatische Sec12 Domäne	Sec12-XhoI-fw	GCCTCGAGATGGGCCGGCGCCGGGCGC
zytoplasmatische Sec12 Domäne	Sec12-BamHI-rev	CGGGATCCCCGTGAGGGCAACAGATGCAGC
Sec23	Sec23-XhoI-fw	AGCTCGAGATGACAACCTATTTGGAATTCATTCAAC
Sec23	Sec23-BamHI-rev	GCGGATCCAGCAGCACTGGACACAGCAAGTTTCTTC
Sar1A	Sar1A-NdeI-fw	CGCATATGTCTT TCATCTTTGA GTGGATCTAC AATGG
Sar1A	Sar1A-BamHI-rev	GCGGATCCGTCAATATACTGGGAGAGCCAGCGG
Sar1B	Sar1B-NdeI-fw	CGCATATGTCCT TCATATTTGA TTGGATTTAC AGTGG
Sar1B	Sar1B-BamHI-rev	GCGGATCCATCAATGTACTGTGCCATCCAGCGGAAGC
FLAG-Peptid	FLAG-int-fw	GAG ACT ACA AAG ACG ATG ACG ACA AGG
FLAG-Peptid	FLAG-int-rev	CCC TTG TCG TCA TCG TCT TTG TAG TCT
CRISPR/Cas9 sgRNAs		
E29 5`FW		caccGAAGAGGGCGTTTGTAACCC

E29 5`Rev		aaacGGGTTACAAACGCCCTCTTC
E29 3`FW		CaccgCTTTATGGAGGGGCGGTACT
E29 3`Rev		aaacAGTACCGCCCTCCATAAAGc
CRISPR/Cas9 Validierung		
Sec16-DE29-fw		GCA CAC ACA GGC ACC TGG TAG
Sec16-DE29-rev		GAAC ACC TTC GAG GTG CTC
qPCR		
hGAPDH-fw	<i>house keeping gene</i>	CTTCGCTCTCTGCTCCTCTGTTTCG
hGAPDH-rev	<i>house keeping gene</i>	ACCAGGCGCCCAATACGACCAAAT
hATF4-fw	ER-Stressmarker	GTTCTCCAGCGACAAGGCTA
hATF4-rev	ER-Stressmarker	ATCCTGCTTGCTGTTGTTGG
hEDEM-fw	ER-Stressmarker	CAAGTGTGGGTACGCCACG
hEDEM-rev	ER-Stressmarker	AAAGAAGCTCTCCATCCGGTC
Spleiß-PCR		
Sec16A-fw		GATGGCCTCCTCGCTCTCTCATCCC
Sec16A-rev		GCCAGCTGAGCAGGGTTGTAGAAGG
Morpholinos		
Sec16-E29		ACCTGCCGAGGAAAAGAAGAATTGC
Kontrolle		CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA

Tabelle 2 Primär- Antikörper. Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Primär-Antikörper unter Angabe der Applikation und eingesetzten Mengen.

Primär-Antikörper	gewonnen aus	Hersteller	Applikation	Konzentration
anti Sar1A	Maus	Sigma	Western Blot	1:500
anti Sec16A	Hase	Bethyl	Western Blot IF	1:1000 1:200
anti Sec31A	Maus	Santa Cruz	IF Western Blot	1:200 1:1000
anti GM130	Hase	Epitomics	IF	1:400
anti FLAG	Hase	Cell Signaling	Western Blot	1:1000
anti FLAG	Maus	Sigma	Facs	1:400
anti Sec23A	Hase	GeneTex	Western Blot	1:1000
anti ERGIC53	Hase	Sigma	IF	1:400
anti GFP	Maus	Santa Cruz	Western Blot	1:500
anti hnRNPL	Maus	Santa Cruz	Western Blot	1:5000
anti GAPDH	Maus	GeneTex	Western Blot	1:5000

Tabelle 3 Sekundärantikörper. Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Sekundär-Antikörper unter Angabe der Applikation und eingesetzten Mengen.

Sekundär-Antikörper	Modifikation	Hersteller	Applikation	Konzentration
anti Maus	HRP	Cell Signaling	Western Blot	1:5000
anti Hase	HRP	Cell Signaling	Western Blot	1:5000
anti Maus	Alexa 488	Life Technologies	IF	1:400
anti Hase	Alexa 647	Life Technologies	IF	1:400
anti Maus	Cy5	Jackson Immuno Research	Facs	1:400

Tabelle 4 Anzahl quantifizierter ERES und COPII-Vesikel in Jsl1 Zellen nach Stimulation. Durchschnittliche Anzahl quantifizierter Strukturen mit Angabe der Standardabweichung.

	Anzahl	Standardabweichung
Sec16 DMSO	33,8	8,6
Sec16 PMA	29,3	4,7
Sec31 DMSO	39,3	4,5
Sec31 PMA	68,9	3,7

Tabelle 5 Anzahl quantifizierter ERES und COPII-Vesikel in JS11 Zellen nach Morpholinotransfektion und Stimulation. Durchschnittliche Anzahl quantifizierter Strukturen mit Angabe der Standardabweichung.

	Anzahl	Standardabweichung
Sec16 KoMO DMSO	39,4	3,2
Sec16 KoMO PMA	34,6	3,1
Sec16 E29MO PMA	40,4	2,6
Sec31 KoMO DMSO	35,5	3,9
Sec31 KoMO PMA	61,4	6,5
Sec31 E29MO PMA	40,2	4,2

Tabelle 6 Anzahl quantifizierter ERES und COPII-Vesikel in HeLa Zellen nach Morpholinotransfektion. Durchschnittliche Anzahl quantifizierter Strukturen mit Angabe der Standardabweichung.

	Anzahl	Standardabweichung
Sec16 KoMO	130,8	8,7
Sec16 E29MO	122,7	25,6
Sec31 KoMO	183,7	14,9
Sec31 E29MO	142,2	21,7

Tabelle 7 Ergänzung zu Abbildung 3.19 Sec16 E29MO vermindert die anterograde Transport-Effizienz in HeLa Zellen. Durchschnittlicher prozentualer Anteil von VSVG in den angegebenen Kompartimenten aus drei unabhängigen Experimenten unter Angabe der Standardabweichung.

VSVG im	ER		Golgi		Post-Golgi	
	%	Stabw.	%	Stabw.	%	Stabw.
KoMO 0 min 32°C	91,1	2,8	8,9	2,8	/	/
KoMO 45 min 32°C	29,8	3,6	65,7	5,5	4,5	3,3
KoMO 90 min 32°C	6,1	2,6	31,9	1,9	61,9	4,2
E29MO 0 min 32°C	95,8	1,3	4,2	1,3	/	/
E29MO 45 min 32°C	47,6	3,7	51,3	2,7	1,1	1,1
E29MO 90 min 32°C	9,1	3,5	39,3	0,6	51,6	2,9

Tabelle 8: Anzahl quantifizierter COPII-Vesikel in WT und Δ E29 293Hek Zellen. Durchschnittliche Anzahl quantifizierter Strukturen mit Angabe der Standardabweichung.

	Anzahl	Standardabweichung
WT 293Hek	77,1	2,6
Δ E29 293Hek	19,5	6,8

B. Alignment

Das Alignment wurde mit der Sec16-I28-Sequenz und der Sequenz von Sec16-I30 in revers komplementierter Orientierung mit der frei zugänglichen ClustalOmega-Software angefertigt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). I30 ist im Alignment nicht in vollständiger Länge, sondern nur für den Teil der komplementären Bindung zu I28 dargestellt.

```

I28          --agttacag-----agaaattacctaccgataataaaaagttaagtatatattttcatccaa
I30_rev_complement  ttggaagagcaaaatgacagaaccactcattga-----ctagg-----ac-acctc
      .*::* **      :*:.* :*** **  **:::      :**      :* :***:
I28          aaaaaaaaaa caaaaaca aatgactcccatgtga-----agtagaacagctcagaccag
I30_rev_complement  aggg-----tc--gatccaagtgc--cccatgtatgtggagactgaacagcaaaaccccc
      *...      :*  .*:.*:*. **  *****.:      ..:*****:*. **
I28          --tcggg---agtggtggatgatgcctgtaatccagactcttgggaggctgagctgggc
I30_rev_complement  ttaaggccatttaaggaacactgctgtaatctcagcacttgggaggctgagcgggc
      *..**      : *..:***: *  ***** *****:*****  *****  ****
I28          ggtcacctgaggtcaggagttcagaccagcctggccaacatggtgaaacccatctct
I30_rev_complement  ggatcacctgaggtt-----gggaccagcctgaccaacatggagaaccccgctctct
      ** .*****      * .***** .***** .***** .*****
I28          actaaaaaaaaa caaaat ttacctgggtgtggtggcgggtgcctgtaatccagctact
I30_rev_complement  actaaaaat ac----aaaattagctgggcgtggtggtcactgcctgtaatccagctact
      *****:.*  ***:*** ***** ***** .*****
I28          cag-aaggctgaggcagaagaatcgcttgaccaggaggcagaggttgcagtgagctga
I30_rev_complement  caggaaggccgagacaggagatggcttgaaccaggaggtggaggtggcggtgagctga
      *** ***** ** .** .** .** ***** .***** .***** ** .*****
I28          gatgcgccattgcactccatcccgggcaaca-gagccagactccatctcaaaaaaaaaa
I30_rev_complement  gatcacaccattgcatccagcctgggcaacaagagcgaactccgtctcaaaaaaaaaa
      *** .*.***** ***** ** ***** ***** *.***** .*****
I28          aaaaaaaaa ccagctcagactgcactctgtacgggtgggacaggcctgggcctaactctgt
I30_rev_complement  aaaaaaaaaaaggaa-----
      ***** .** :.
I28          tctccattcatcagctgtgtaaagcatggggcagtcactcacctgtctaagcctcagttt ...
I30_rev_complement  -----

```

C. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

- 07/2009 – 09/2009 Philipps-Universität Marburg
Wissenschaftliche Hilfskraft
Fachbereich 17, Biologie
Labor für Zellbiologie, Prof. Dr. Uwe G. Maier
Schwerpunkt: molekularbiologische Methoden, Transfektion von
Diatomeen, *in vivo* Lokalisationsstudien mittels
Fluoreszenzmikroskopie
- 08/2008 – 09/2008 Klinikum Kassel, Gesundheit Nordhessen Holding AG
Berufspraktikum im Zentrallabor, mikrobiologische Abteilung
Schwerpunkt: Diagnostik

PUBLIKATIONEN

Sec16 alternative splicing dynamically controls COPII transport efficiency. Ilka Wilhelmi, Regina Kanski, Florian Hoff, Ralf Jacob, Marco Preußner, Florian Heyd. In Vorbereitung zur Submission bei **Nature Communications**.

Rhythmic U2af26 Alternative Splicing Controls PERIOD1 Stability and the Circadian Clock in Mice. Marco Preußner, Ilka Wilhelmi, Astrid-Solveig Schultz, Florian Finkernagel, Monika Michel, Tarik Möröy, Florian Heyd. **Molecular Cell** 2014, 54(4):651-62

Activation-induced Traf3 alternative splicing controls the non-canonical NFkB pathway and chemokine expression in human T cells. Monika Michel, Ilka Wilhelmi, Astrid-Solveig Schultz, Marco Preußner, Florian Heyd. **Journal of Biological Chemistry** 2014, 289(19):13651-60

Distribution of the SELMA Translocon in Secondary Plastids of Red Algal Origin and Predicted Uncoupling of Ubiquitin-Dependent Translocation from Degradation. Simone Stork, Daniel Moog, Jude M. Przyborski, Ilka Wilhelmi, Stefan Zauner, Uwe G. Maier. **Eukaryotic Cell** 2012, 11(12):1472

KONFERENZEN UND SYMPOSIA

- 04.-09.07.2015 FEBS Kongress "The Biochemical Basis of Life", Berlin. Poster-Beitrag: "Sec16 alternative splicing controls the adaptation of the COPII machinery to higher secretory cargo load upon T-cell activation".
- 02.-04.07.2015 "FEBS Young Scientist Forum", MDC Berlin. Vortrag mit dem Titel „Sec16 alternative splicing controls the adaptation of the COPII machinery to higher secretory cargo load upon T-cell activation“.
- 26.-31.05.2015 "The Twentieth Annual Meeting of the RNA Society" in Madison (Wisconsin, USA). Poster-Beitrag: "Sec16 alternative splicing dynamically controls COPII transport efficiency."

-
- 23.-25.03.2015 Organisation und Teilnahme am Symposium “From RNA pools to single RNA molecules“ der IRI-Graduiertenschule. Chair der Session „Translation“ und Poster-Beitrag: „Sec16 alternative splicing dynamically controls COPII transport efficiency“.
- 09.-12.10.2014 “RNA Biochemistry 2014 & Workshop RNA modification” Meeting der GBM-Studiengruppe “RNA-Biochemie” in Bonn. Vortrag mit dem Titel: “Functional consequences of Sec16 alternative splicing in T-cells and its influence on the early secretory pathway”.
- 31.08-03.09.2014 Symposium “Quantitative Approaches in Cell Biology – Biophysics, Bioengineering, and Systems Biology” der Signgene Graduiertenschule, MDC Berlin Buch. Chair der Session “Metabolic networks” und Poster-Beitrag: „Functional consequences of Sec16 alternative splicing in T-cells and its influence on the early secretory pathway“ und “Student problem solving workshop” unter der Leitung von Amit Meller (Technion Israel und MIT Boston) und Andreas Herrmann (HU Berlin).

FÖRDERUNGEN

- 10/2015 – 03/2016 Abschlussstipendium des SFB 985
- 07/2015 YSF-Stipendium FEBS-Meeting 2015
- 05/2015 Reisestipendium der IRI-Graduiertenschule
- 05/2015 Frauenförderung des Fachbereichs BCP der FU Berlin
- 10/2014 Frauenförderung des Fachbereichs BCP der FU Berlin

D. Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Florian Heyd für die Betreuung meiner Arbeit in den letzten vier Jahren, seine Unterstützung, konstruktive Kritik, Motivation und vor allem seine Fähigkeit Begeisterungen zu wecken, bedanken

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Markus Wahl für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit, und seine stets freundliche und hilfsbereite Art.

Ein herzlicher Dank gilt meinen lieben Kollegen, ohne die die manchmal frustrierende Arbeit im Labor nur halb so viel Spaß machen würde. Die Mischung aus wissenschaftlichem Interesse und der Begeisterung für die (kulinarischen) Freuden des Lebens sind eine tolle Mischung! Danke auch den Mitarbeitern der AG Wahl für stete Unterstützung und Zusammenarbeit, allen voran Ronja und Bernhard.

Ein weiterer Dank gilt unseren TAs Antje und Inge für Hilfe und Unterstützung, und nicht zu vergessen Monika, die uns während unserer Zeit in Marburg bereichert hat. Vielen Dank auch an Karin für ihre Hilfe mit Papierkram jeder Art.

Vielen Dank an Prof. Dr. Ralf Jakob und seine Mitarbeiter und die Unterstützung beim FRAP-Experiment.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitbewohnern, die in meiner Marburger WG-Zeit mein Leben durchkreuzt und mir immer eine gute Zeit beschert haben: Christof, Kai-Steffen, Moritz, Dominik, Philipp, Daniel und Belinda und allen Freunden und Bekannten die ich während dieser Zeit kennenlernen konnte, vor allem danke ich Flo für die vielen wirklich „so schönen“ Erlebnisse!

Ich danke meiner Familie für ihre Unterstützung, meiner Schwester Katja für ihre Korrekturen, und Marco für das kritische und aufmerksame Lesen dieser Arbeit und die tolle Umsorgung, die ich in der letzten Zeit erfahren durfte.

E. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. 1 Verschiedene Mechanismen der mRNA Prozessierung.	11
Abbildung 1. 2 Schematische Darstellung des mRNA Spleißens.....	12
Abbildung 1. 3 Formation des Spleißosoms.....	13
Abbildung 1. 4 Verschiedene Formen des prä-mRNA Spleißens.	14
Abbildung 1. 5 Schematische Darstellung der T-Zell Aktivierung durch Antigenbindung an den T-Zellrezeptor.	17
Abbildung 1. 6 Das sekretorische Transportsystem.....	20
Abbildung 1. 7 Vereinfachte Domänenstruktur von humanem Sec16.	21
Abbildung 1. 8 Entstehung von COPII-Vesikeln.....	22
Abbildung 3. 1 Sec16 Exon 29 und 30 werden nach T-Zell Aktivierung alternativ gespleißt....	37
Abbildung 3. 2 Sec16 Spleiß-Zeitreihe zeigt eine Zunahme der E29 Isoform nach 24 Stunden.	38
Abbildung 3. 3 Sec16 mRNA Stabilität ist während der T-Zell Aktivierung nicht reguliert.....	38
Abbildung 3. 4 Sec16 Spleißen und ER-Stress.	40
Abbildung 3. 5 Nachweis der Sec16 Spleiß-Isoformen auf Proteinebene und Bestimmung der Halbwertszeit.....	41
Abbildung 3. 6 Überexpression von Sec16 CTDs in HeLa Zellen	43
Abbildung 3. 7 Definition der Golgi-Morphologie.....	44
Abbildung 3. 8 Überexpression der Sec16 CTD führt zur Zerstörung der Golgi-Struktur.....	45
Abbildung 3. 9 Exportassay in Jsl1 Zellen.....	47
Abbildung 3. 10 Sekretionseffizienz steigt mit der T-Zell Aktivierung.	48
Abbildung 3. 11 Die Morphologie der sekretorischen Kompartimente ER, ERGIC und Golgi-Apparat zeigen keine Veränderung nach T-Zell Aktivierung.....	50
Abbildung 3. 12 Anzahl von COPII Vesikeln steigt mit der T-Zell Aktivierung.....	51
Abbildung 3. 13 Western Blot Analyse von COPII-Proteinen in ruhenden und stimulierten Jsl1 Zellen.	52
Abbildung 3. 14 Manipulation von Sec16 Spleißen in Jsl1 Zellen	53
Abbildung 3. 15 Transfektion des E29MOs verhindert die Zunahme von COPII Vesikeln nach T-Zell Aktivierung in JSL1 Zellen.	54

Abbildung 3. 16 Quantifizierung des ER-Exports in Jsl1 Zellen nach FLAG-Oberflächenfärbung mittels FACS.....	55
Abbildung 3. 17 Manipulation von Sec16 Spleißen beeinflusst den anterograden Proteintransport in HeLa Zellen.	56
Abbildung 3. 18 Einfluss des Sec16 E29MO auf die Effizienz des ER-Exports in HeLa Zellen. .	58
Abbildung 3. 19 Sec16 E29MO vermindert die anterograde Transport-Effizienz in HeLa Zellen. Die.....	59
Abbildung 3. 20 Alternative Sec16 Isoformen interagieren differentiell mit anderen COPII Proteinen.....	60
Abbildung 3. 21 Coexpression von Sec23 mit der Sec16-E29-CTD revidiert den negativen Effekt auf die Golgi-Morphologie..	62
Abbildung 3. 22 Alternatives Sec16 Spleißen hat eine funktionelle Relevanz in humanen Primärzellen.....	63
Abbildung 3. 23 Sec16 E29 vivoMO manipuliert das Spleiß-Muster primärer Zellen.	64
Abbildung 3. 24 Etablierung einer E29-deletierten Zell-Linie.....	66
Abbildung 3. 25 Deletion von E29 hat keinen Einfluss auf Lokalisation und Anzahl der ERES in Hek293 Zellen.....	67
Abbildung 3. 26 Sec16 E29 ist essentiell für die Bildung von COPII Vesikeln und den anterograden Proteintransport in Hek293 Zellen.....	68
Abbildung 3. 27 COPII Turnover ist reduziert in Δ E29 Zellen.....	71
Abbildung 4. 1 Modell: Rolle von Sec16 Spleißen im frühen sekretorischen Apparat während der T-Zell Aktivierung.....	80

F. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Oligonukleotide.	93
Tabelle 2 Primär- Antikörper.....	94
Tabelle 3 Sekundärantikörper.....	95
Tabelle 4 Anzahl quantifizierter ERES und COPII-Vesikel in Jsl1 Zellen nach Stimulation.	95
Tabelle 5 Anzahl quantifizierter ERES und COPII-Vesikel in JS11 Zellen nach Morpholinotransfektion und Stimulation.	95
Tabelle 6 Anzahl quantifizierter ERES und COPII-Vesikel in HeLa Zellen nach Morpholinotransfektion.....	96
Tabelle 7 Ergänzung zu Abbildung 3.19 Sec16 E29MO vermindert die anterograde Transport-Effizienz in HeLa Zellen.....	96
Tabelle 8: Anzahl quantifizierter COPII-Vesikel in WT und Δ E29 293Hek Zellen.....	96

G. Bescheinigung

gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom
04.09.2007 des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Bedeutung von Sec16 alternativem Spleißen für den COPII vermittelten Proteintransport in T-Zellen.“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe, und dass ich meine Dissertation, im Falle der Ablehnung, nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden werde.

Berlin, den 17.12.2015

Ilka Wilhelmi

It kicks like a sleep twitch.