

Die Identifizierung neuer Komponenten der Unfolded Protein Response durch eine Multi-Omics Analyse und die Rolle der eIF2-Phosphorylierung bei der Resistenzbildung gegen Folat-basierte Antimetabolite



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Stefan Reich

aus Ochsenhausen

im Jahr 2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:
Die Arbeit wurde angeleitet von:

12.06.2020
PD Dr. Jan Medenbach

Stefan Reich

“An investment in knowledge pays the best interest.”

Benjamin Franklin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	2
1.1 Stress in Zellen	2
1.2 ER Stress und BiP als Sensor der UPR	2
1.2.1 Expression, Aufbau und Funktionsweise von BiP.....	3
1.2.2 IRE1	5
1.2.2.1 XBP1-Splicing und transkriptionelle Aktivierung durch XBP1s	6
1.2.2.2 ERAD.....	6
1.2.2.3 RIDD	6
1.2.2.4 Interaktionen von IRE1 α und Signalunterdrückung	7
1.2.3. PERK.....	7
1.2.3.1 Hemmung der Translation durch Phosphorylierung von eIF2 α	8
1.2.3.2 Nachgeschaltete Signalübertragung durch die Phosphorylierung von eIF2 α	9
1.2.3.3 Weitere PERK-Targets	11
1.2.3.4 Regulation des PERK-Signalwegs.....	11
1.2.4 Aktivierung und Prozessierung von ATF6	12
1.2.4.1 Regulation von ATF6	13
1.2.4.2 Signaltransduktionen durch ATF6f	13
1.2.5 UPR in Krankheiten.....	14
1.2.5.1 Beteiligungen der UPR an metabolischen Erkrankungen	14
1.2.5.2 Einfluss der UPR auf neurodegenerative Erkrankungen	15
1.2.5.3 Die UPR bei entzündlichen Erkrankungen und Regulator der Immunantwort..	16
1.2.5.4 Einfluss der UPR auf Krebserkrankungen	16
1.3 Hirntumore.....	18
1.3.1 Glioblastoma multiforme	18
2. Zielsetzung der Arbeit.....	20
3. Ergebnisse.....	21
3.1 Aktivierung der Unfolded Protein Response.....	21
3.2 Multi-Omics Ansätze zur globalen Analyse der UPR	22
3.2.1 Überprüfung der Induktion der UPR in Multi-Omics Experimenten	24
3.2.2 Transkriptionelle Reprogrammierung durch die UPR.....	26
3.2.3 Herstellung von Ribosome Profiling Libraries	29
3.2.4 Detektion der Änderungen der UPR anhand von Ribosome Profiling.....	32
3.2.5 Umprogrammierung der Translation durch die UPR	36
3.2.6 Änderungen der Proteinspiegel durch die UPR.....	39
3.3 UPR Regulon.....	42
3.4 Experimentelle Validierung der UPR-abhängigen Regulation von SLFN5	43
3.4.1 Expression von SLFN5 in Gliomen.....	43
3.4.2 Induktion von SLFN5 durch die UPR.....	44
3.4.3 SLFN5 wird durch den PERK-Zweig der UPR reguliert.....	47

3.4.4	Die Induktion von SLFN5 wird durch die Phosphorylierung von eIF2 α vermittelt	47
3.4.5	SLFN5 wird durch den PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg induziert	48
3.5	Veränderungen anderer Signalwege durch die UPR	49
3.5.1	Umprogrammierung des mitochondrialen 1C-Metabolismus durch die UPR.....	50
3.5.2	MTHFD2 und SHMT2 werden durch die UPR reguliert	51
3.5.3	Der PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg der UPR ist für die Induktion von MTHFD2 und SHMT2 verantwortlich	52
3.6	Adaptionen durch die UPR führen zur Antifolatresistenz von Zellen.....	53
4.	Diskussion	56
5.	Methoden	64
5.1.	Methoden in der Zellkultur	64
5.1.1	Zellen einfrieren und auftauen	64
5.1.2	Herstellung stabiler induzierbarer Flp-In T-REx 293.....	64
5.1.3	Transfektion von Säugetierzellen	65
5.1.4	Proliferationsassay	65
5.2	Molekularbiologische Methoden	65
5.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	65
5.2.2	Mutagenese durch überlappende PCR.....	66
5.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	66
5.2.4	Bestimmung von DNA und RNA Konzentrationen.....	66
5.3	Molekulare Klonierung	66
5.3.1	Restriktionsverdau	67
5.3.2	Ligation und Transformation in E.coli.....	67
5.3.3	Extraktion von Plasmid-DNA und Sequenzierung	67
5.4	RNA-basierte Methoden	67
5.4.1	RNA Isolation	67
5.4.2	DNase Verdau für RNAseq Proben.....	68
5.4.3	Reverse Transkription.....	68
5.4.4	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	68
5.4.5	Polyacrylamid Harnstoff Gelelektrophorese für RNA und DNA.....	68
5.5	Biochemische Methoden	69
5.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	69
5.5.2	SDS-PAGE.....	69
5.5.3	Western Blot	70
5.6	Ribosome Profiling.....	70
5.7	Massenspektrometrie	73
5.7.1	Präparation der Proben für Massenspektrometrie (MS).....	73
5.7.2	Liquid-Chromatographie-MS/MS (LC-MS/MS) Analyse.....	73
5.8	Quantifizierung und statistische Analyse	74
5.8.1	RNA-Seq und Ribosome Profiling Analyse	74
5.8.2	Ungelabelte MS Datenanalyse	74

6. Material	75
6.1 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Enzyme.....	75
6.2 Kits und fertige Lösungen.....	75
6.3 Puffer und Lösungen	76
6.4 Laborausstattung	77
6.5 DNA Oligonukleotide	78
6.5.1 DNA Oligonukleotide für Klonierungen und Mutagenese.....	78
6.5.2 DNA Oligonukleotide für qRT-PCR und Splicing	78
6.5.3 DNA Oligonukleotide für Sequenzierungen	79
6.5.4 DNA Oligonukleotide für Ribosome Profiling Library Präparation.....	79
6.6 Plasmide.....	80
6.7 Antikörper	81
6.8 bakterielle Stämme und Medien	81
6.8.1 Bakterien	81
6.8.2 Medien.....	82
6.9 Säugetierzelllinien und Medien.....	82
6.9.1 Verwendete Säugerzellen.....	82
6.9.2 Medien der Zellkultur.....	82
Anhang	84
Abbildungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	97
Abkürzungen	98
Literatur	101
Publikationen und Präsentationen	129
Lebenslauf	130
Danksagung	131

Zusammenfassung

Stress im endoplasmatischen Retikulum führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, um die Akkumulation von falsch- oder ungefalteten Proteinen zu bewältigen. Dieser Signalweg, genannt die ‚Unfolded Protein Response‘ (UPR), versucht die zelluläre Homöostase durch Anpassung der Transkription und Translation wieder herzustellen. Falls diese zelluläre Homöostase nicht erreicht werden kann, löst die UPR die Apoptose der Zelle aus.

Die UPR rückte in den letzten Jahren aufgrund der Beteiligung an vielen verschiedenen Krankheiten wie Diabetes, die Alzheimer Erkrankung oder unterschiedlicher Arten von Krebs in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Viele Tumorarten wie Gliome, die durch eine schnelle Wachstumsrate, eine erhöhte Proteinsynthese und Hypoxie hohe Spiegel an ER Stress aufweisen, nutzen die überlebensfördernden Signale der UPR. Trotz anhaltendem Stress im ER führt die UPR in Tumoren nicht zur Apoptose.

Trotz großer klinischer Relevanz fehlen qualitative und quantitative Modelle der UPR in Krebszellen. Daher analysierten wir per Multi-Omics Ansatz die Veränderungen der Transkription und der Translation sowie auf Proteinebene nach Induktion der UPR in HEK293 und der Gliomzelllinie LN308. Durch stringentes Filtern unserer Daten konnten wir in LN308 eine Liste mit 267 durch die UPR induzierten Genen zusammenfassen, das UPR Regulon. Sowohl bekannte Gene der drei Zweige der UPR als auch viele noch nicht zuvor mit ER Stress oder einer anderen Art von Stress in Verbindung gebrachte Gene konnten wir im UPR Regulon detektieren.

Die Validierung unserer Daten zeigten wir anhand von SLFN5, ein noch nicht mit Stress assoziiertes Protein. In Patienten mit Gliomen führt die Überexpression von SLFN5 zu einer erhöhten Malignität des Tumors. Wir konnten nachweisen, dass SLFN5 als Teil der UPR durch den PERK-eIF2 α -ATF4-Signalweg auf transkriptioneller Ebene induziert wird.

Darüber hinaus detektierten wir auch die durch die UPR-vermittelte Induktion von Enzymen, die als Bestandteile nach der Glykolyse bei der Serinbiosynthese und des mitochondrialen 1C-Metabolismus fungieren. Der mitochondriale 1C-Metabolismus spielt bei der Nukleotidsynthese und des Aminosäurehaushalts eine wichtige Rolle. Unsere experimentellen Daten weisen durch die Induktion dieser Signalwege auf eine Chemoresistenz gegen weitverbreitet verwendete Antifolate hin.

Damit konnten wir eine weitere Verbindung der UPR und deren überlebensfördernden Wirkung mit dem Wachstum von Tumoren aufzeigen.

1. Einleitung

1.1. Stress in Zellen

Organismen und ihre Zellen sind einer Vielzahl an unterschiedlichen äußeren und inneren Einflüssen ausgesetzt, die zu verschiedenen Arten von Stress führen können. Um auf physiologische Reize oder pathogene Umstände zu reagieren, haben eukaryotische Zellen verschiedene adaptive Signalwege als Antwort auf den jeweiligen Stress entwickelt.

Bereits 1962 konnte nach Hitzeschock ein verändertes Aussehen des Speicheldrüsenchromosoms von *Drosophila busckii* gezeigt werden, was mit veränderter RNA Synthese assoziiert wurde (Ritossa, 1962). In den darauffolgenden Jahren wurden diese Chromosomenveränderungen auch als Folge anderer Arten von Stress und in anderen Drosophiliden nachgewiesen (Berendes, 1968, Ashburner, 1970, Leenders and Berendes, 1972). Bei der molekularen Analyse wurden neue Proteine identifiziert, die durch Stress, unter anderem Hitzeschock, gebildet werden (Tissieres et al., 1974). Diese wurden daraufhin Hitzeschockproteine genannt. Ihre korrespondierenden Gene sind hoch konserviert und kommen in jeder Spezies vor (Feder and Hofmann, 1999). Hitzeschockproteine spielen bei vielen Arten von Stress eine zentrale Rolle, unter anderem bei Kälte (Matz et al., 1995), bei einem Mangel an Aminosäuren (Hensen et al., 2012), unter UV-Bestrahlung (Simon et al., 1995) oder bei Infektionen mit Viren (Reyes-Del Valle et al., 2005).

Hitzeschockproteine sind Chaperone, die mit anderen Proteinen interagieren und ihnen bei deren korrekter Faltung, ihrem richtigen Zusammenbau oder ihrer Lokalisierung in Zellkompartimenten helfen (Feder and Hofmann, 1999). Die richtige Faltung der meisten Transmembranproteine und sezernierter Proteine bei eukaryotischen Zellen findet im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Trotz der Chaperone kann es zu einer Akkumulation von ungefalteten oder von nicht korrekt gefalteten Proteinen im ER kommen (Ron and Walter, 2007). Dies löst im ER Stress aus. Um diesem entgegenzuwirken und die zelluläre Homöostase wieder herzustellen wird die Antwort auf ungefaltete Proteine („Unfolded Protein Response“ [UPR]) aktiviert.

1.2. ER Stress und BiP als Sensor der UPR

Erste Hinweise auf die Anpassung an Stress durch ungefaltete Proteine wurden durch den Nachweis erhöhter Spiegel von GRP78 (Glucose-Regulated Protein, 78kDa; Gen: HSPA5) und GRP94 (Glucose-Regulated Protein, 94kDa; Gen: HSP90B1) gewonnen (Kozutsumi et al., 1988).

GRP78 wurde schon zuvor im ER von embryonalen Hühnerfibroblasten in nicht gestresstem Zustand nachgewiesen (Zala et al., 1980). Kurze Zeit später wurde immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) identifiziert, ein 78kDa großes Protein, welches nicht-kovalent an schwere Ketten von Immunglobulinen (Ig) in prä-B Lymphozyten bindet (Haas and Wabl, 1983). Ein mit dem 70kDa Hitzeschockprotein verwandtes Protein wird ins ER sezerniert und ist mit GRP78 sowie BiP identisch (Munro and Pelham, 1986).

Das ER Chaperon BiP nimmt bei der Übermittlung von ER Stress durch ungefaltete Proteine und der damit verbundenen Aktivierung der UPR eine zentrale Rolle als Sensor ein. In nicht gestressten Zellen bindet BiP an die lumenalen Domänen der drei ER-Transmembranproteine PERK (Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; Gen: EIF2AK3), IRE1 α (Inositol-requiring enzyme 1 α ; Gen: ERN1) und ATF6 (Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF6; Gen: ATF6) und inhibiert damit die Signalübertragung respektive die Prozessierung. Durch die Anhäufung ungefalteter Proteine dissoziiert

BiP reversibel von den drei Transmembranproteinen und führt zur Aktivierung von PERK, IRE1 α und ATF6 und damit zur Signalweiterleitung (Abb.1.1) (Bertolotti et al., 2000, Shen et al., 2002a). Die dadurch ausgelöste UPR versucht in zwei Schritten die Homöostase des ER wieder herzustellen. Als erste Folge des Ungleichgewichts zwischen der Anzahl ungefalteter Proteine und der Maschinerie von Chaperonen zur Bewältigung dieses Umstands wird vorübergehend die globale Proteinneusynthese und Translokation ins ER reduziert. Im zweiten Schritt wird die Transkription von UPR Zielgenen aktiviert. Hierbei handelt es sich unter anderem um Proteine, die zur korrekten Faltung von Proteinen innerhalb des ER beitragen, womit die Leistungsfähigkeit des ER-Falteapparats erhöht wird (Ron and Walter, 2007).

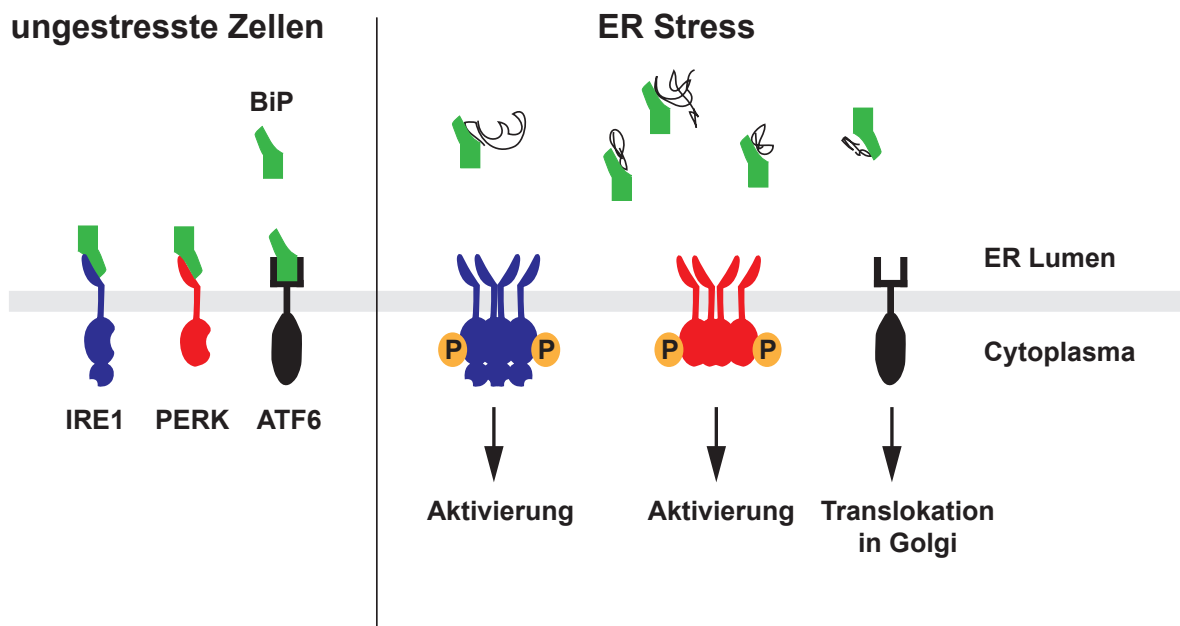


Abbildung 1.1: BiP als Sensor der UPR mit den drei Signalzweigen.

Das ER Chaperon BiP bindet an die lumenalen Domänen von IRE1, PERK und ATF6 und unterdrückt damit deren Aktivierung. Bei Anreicherung von ungefalteten Proteinen dissoziiert BiP von den Transmembranproteinen, was zur Phosphorylierung, Oligomerisierung und Aktivierung von PERK und IRE1 sowie zur Aktivierung von ATF6 führt.

Bei anhaltendem, irreversiblen ER Stress kann die UPR auch die Apoptose von Zellen einleiten (Hetz, 2012, Hetz and Papa, 2018).

1.2.1. Expression, Aufbau und Funktionsweise von BiP

BiP ist sowohl Sensor der UPR als auch ER-Chaperon und konstitutiv exprimiert. Es wird aber auch unter ER Stress vermehrt gebildet. In *Saccharomyces cerevisiae* wird BiP durch drei verschiedene cis-aktive Elemente in der Promoterregion von KAR2, welches für BiP codiert, transkriptionell reguliert: eine GC-reiche Region für die konstitutive Expression, ein Hitzeschockelement (HSE) und eine 22 Basenpaar (bp) lange Region (UPRE), die bei der Stress-vermittelten Induktion eine wichtige Rolle spielt (Mori et al., 1992). In höheren Eukaryoten wurde zunächst eine hoch konservierte regulatorische Domäne für die generelle Expression von BiP nachgewiesen (Resendez et al., 1988). Hinweise auf die Regulation von BiP unter ER Stress wurden in einer Kernregion des Promoters gefunden (Li et al., 1994). Später wurde daraufhin das ER stress response element (ERSE) vor der TATA Box in

der Promoterregion von humanem HSPA5 identifiziert, welches für die Induktion von BiP unter ER Stressbedingungen verantwortlich ist (Yoshida et al., 1998). Die Bindung des UPR-regulierten bZIP Transkriptionsfaktors ATF6f (prozessiert aus dem Transmembranprotein ATF6) an ERSE aktiviert den Promoter unter Beteiligung der Koaktivatoren NF-Y und YY1 und führt zur verstärkten Transkription des HSPA5 Gens (Haze et al., 1999, Li et al., 2000, Baumeister et al., 2005).

BiP ist Teil einer Familie von HSP70-Proteinen und hat wie die anderen Vertreter der Gruppe eine ATPase katalytische Domäne am N-Terminus und eine C-terminale Substrat-Bindedomäne (McKay, 1993). Affinität und Länge der Bindung von Polypeptidketten an die Bindedomäne ist ATP abhängig: Bei ATP-Besetzung des N-Terminus ist die Affinität für Polypeptide schwach, jedoch binden diese rasch; die Besetzung durch ADP führt zu einer starken Bindung mit langsamem Austausch. Darüber hinaus fördert die Polypeptidbindung am C-Terminus die Hydrolyse von ATP (Flynn et al., 1989, Blond-Elguindi et al., 1993a, Blond-Elguindi et al., 1993b).

Als universelles Chaperon im ER besitzt BiP die Eigenschaft entstehende Polypeptidketten mit unterschiedlichsten Sequenzen zu erkennen und gleichzeitig ungefaltete von korrekt gefalteten Proteinen zu unterscheiden. In verschiedenen Studien mit Peptiden aus Bakteriophagen oder mit Immunglobulinen wurde gezeigt, dass BiP ein heptamerisches Motiv erkennt, diese Interaktion allerdings abhängig von der Stabilität und der Geschwindigkeit der Faltung des Proteins ist (Blond-Elguindi et al., 1993a, Hellman et al., 1999). BiP bindet hierbei vor allem an Proteine, die in instabiler Konformation vorliegen oder sich langsam falten.

ER-lokalisierte DnaJ-Proteine (ERdj) agieren als Ko-Chaperone von BiP, indem sie an den N-Terminus binden und die ATP Hydrolyse stimulieren. Dadurch wird eine hohe Substrataffinität induziert. In *S. cerevisiae* kennt man unter anderem die Interaktion von BiP mit Sec63p, Scj1p und Jem1p (Feldheim et al., 1992, Schlenstedt et al., 1995, Nishikawa and Endo, 1997). Das murine Transmembranprotein MTJ1 (Gen: Dnajc1) wurde als erstes Ko-Chaperon von BiP in Säugetierzellen identifiziert (Chevalier et al., 2000). In humanen Zellen induziert ER Stress die Transkription von ERdj5 (ER DNA J domain-containing protein 5, auch DNAJC10), welches mit BiP interagiert (Cunnea et al., 2003). Des Weiteren wurden ERdj4 (DNAJB9) und ERdj3 (DNAJB11) als Ko-Chaperone von BiP identifiziert (Shen et al., 2002b, Nakanishi et al., 2004). ERdj3 wird wie ERdj4 durch die UPR verstärkt exprimiert und interagiert als Kofaktor mit BiP bei der Bindung ungefalteter Proteine (Shen and Hendershot, 2005). Darüber hinaus sind ERdj4 und ERdj5 Bestandteile des ER-associated degradation (ERAD) Signalwegs, bei dem ungefaltete Proteine unter Stressbedingungen aus dem ER entfernt und im Zytosol durch das Proteasom abgebaut werden (Dong et al., 2008). In Mäusen führte der Knockout von ERdj4 zu anhaltendem ER Stress und zur Ausbildung Stress-assoziiertes Krankheits-symptome wie Glukoseintoleranz aufgrund des Verlusts pankreatischer β -Zellen (Fritz et al., 2014). In diesem Modell führt das Fehlen von ERdj4 zu einer verminderten Bindung von BiP an IRE1 und dadurch zur Unterdrückung dieses Zweigs der UPR (Amin-Wetzel et al., 2017).

Neben der Interaktion mit Ko-Chaperonen kooperiert und koordiniert sich BiP mit anderen Chaperonen des ER. Leichte und schwere Ketten von Immunglobulinen werden in zeitlicher Abfolge zuerst von BiP und anschließend von GRP94 gebunden und korrekt gefaltet (Melnick et al., 1994). Eine ähnliche Koordination von BiP und Calnexin, einem membrangebundenen ER Chaperon, wurde bei der Faltung von Thyroglobulin identifiziert (Kim and Arvan, 1995). Durch chemisches Crosslinking wurde zudem ein funktioneller Komplex aus BiP, GRP94, Calreticulin, Calnexin und anderer Proteine bei der Faltung von Hämagglutinin aus Influenzaviren nachgewiesen (Tatu and Helenius, 1997).

1.2.2. IRE1

Durch die Dissoziation von BiP von den luminalen Domänen dreier Transmembranproteine wird die UPR aktiviert. Als erstes Protein, welches Signale ungefalteter Proteine über die ER Membran transduziert und zu einer transkriptionellen Anpassung führt, wurde IRE1p in *S. cerevisiae* identifiziert (Cox et al., 1993, Mori et al., 1993). In Hefen ist IRE1p das einzige Transmembranprotein der UPR (Urano et al., 2000a). In Mäusen und Menschen wurden zwei verschiedene Isoformen von IRE1 (IRE1 α und IRE1 β) identifiziert, wobei nur IRE1 α als Signalübermittler von ungefalteten Proteinen fungiert (Tirasophon et al., 1998, Wang et al., 1998). IRE1 β hingegen inhibiert die Proteinneusynthese durch Spaltung der 28S rRNA als Antwort auf ER Stress (Iwawaki et al., 2001).

Das humane Typ-I-Transmembranprotein IRE1 α besitzt 977 Aminosäuren (As) und besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer ER-luminalen Domäne (As 19-443), einer Transmembrandomäne (As 444-464) und einer zytoplasmatischen Domäne (As 465-977) (Tirasophon et al., 1998). Die luminalen Domäne besitzt ein MHC (major histocompatibility complex)-like Motiv, welches Chaperone wie BiP oder ungefaltete Proteine direkt binden kann (Bertolotti et al., 2000, Credle et al., 2005, Gardner and Walter, 2011). In der hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne befinden sich eine Serin/Threonin Proteinkinase sowie eine RNase Domäne (Tirasophon et al., 1998).

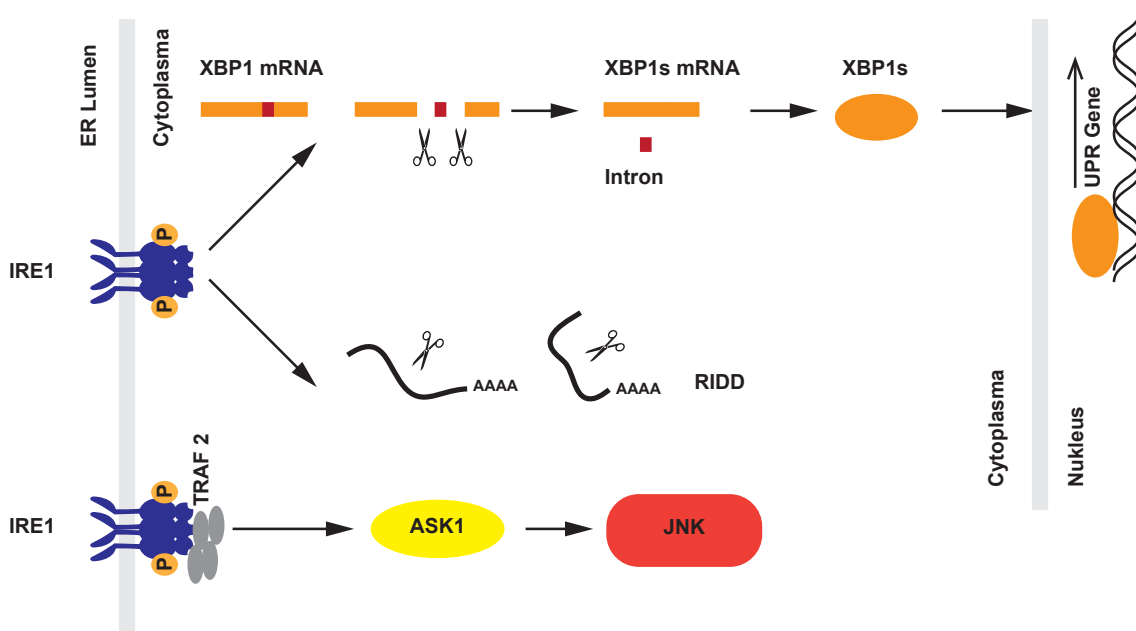


Abbildung 1.2: IRE1 vermittelt das Spleißen des Transkriptionsfaktors XBP1, RIDD und die Aktivierung des JNK Signalwegs unter ER Stress.

Ein 26 nt langes Intron von XBP1 wird nach Aktivierung von IRE1 durch die RNase Domäne freigesetzt. Darüber hinaus werden verschiedene RNAs durch IRE1 bei länger anhaltendem ER Stress abgebaut, bekannt als regulated IRE1-dependent decay (RIDD). Durch Bindung von TRAF2 aktiviert IRE1 des Weiteren den JNK-Signalweg.

Im gängigsten Modell der UPR wird als Antwort auf ER Stress IRE1 durch die Dissoziation von BiP oligomerisiert und durch die Kinase Domänen trans-autophosphoryliert (Shamu and Walter, 1996, Korneykh et al., 2009). Diese Autophosphorylierung an S724 der Kinase Domäne führt zur Aktivierung der RNase Domäne. Als wichtigstes Ziel kann IRE1 somit die X-box-binding protein 1 (XBP1) mRNA prozessieren (Abb.1.2) (Yoshida et al., 2001a, Calton et al., 2002). Das XBP1 Homolog Hac1p konnte in *S. cerevisiae* bereits zuvor identifiziert werden (Cox and Walter, 1996).

1.2.2.1 XBP1-Splicing und transkriptionelle Aktivierung durch XBP1s

Durch die Aktivierung von IRE1 α wird ein 26 Nukleotide (nt) langer, intervenierender Abschnitt innerhalb der XBP1 mRNA freigesetzt und die flankierenden Fragmente durch die tRNA-splicing Lgase RtcB ligiert (Lu et al., 2014). Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters der XBP1 mRNA, was die Translation des aktiven Transkriptionsfaktors XBP1s ermöglicht (Calfon et al., 2002). Die ungespleißte Form von XBP1 (XBP1u) wird ebenfalls translatiert. Das daraus resultierende Protein beeinflusst das Spleißen sowie die Translation der eigenen mRNA und inhibiert XBP1s durch Bindung ans ER und die Präsentation für dessen Abbau durch das Proteasom (Yoshida et al., 2006, Yanagitani et al., 2009, Yanagitani et al., 2011, Chen et al., 2014a).

Anhand von CHIP-Experimenten, einer experimentellen Detektionsmethode von Protein-DNA-Interaktionen, wurde eine Vielzahl von XBP1s-Zielgenen identifiziert (Acosta-Alvear et al., 2007). Viele Gene waren hierbei mit der Aufrechterhaltung der ER Funktion, der UPR und der Faltung von Proteinen assoziiert. So wurden unter anderem die Gene der Chaperone Grp94, Calnexin und Calreticulin, verschiedene Ko-Chaperone der DnaJ Familie oder Proteindisulfid-Isomerasen, welche die Spaltung und Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen katalysieren, als XBP1-Ziele identifiziert (Acosta-Alvear et al., 2007, Lee et al., 2003). Darüber hinaus reguliert XBP1s auch Gene, die nicht mit der Funktion des ER in Verbindung stehen. Unter anderem werden Gene des Zellwachstums, der Prozessierung und des Exports von RNA, der Differenzierung wie der Replikation oder der Reparatur von DNA als auch der Redox Homöostase von XBP1s gebunden und reguliert (Acosta-Alvear et al., 2007). Des Weiteren wurde die Rolle von XBP1s als Regulator der Lipogenese oder beim Übergang von adaptiver zu zytotoxischer UPR, welche die Apoptose der Zelle zur Folge hat, nachgewiesen (Lee et al., 2008, Fink et al., 2018). Da XBP1s die Expression wichtiger Enzyme der Hexosamin Biosynthesewege (z.B. GFAT1) reguliert, wurde die UPR mit diesem Signalweg verknüpft (Wang et al., 2014).

1.2.2.2. ERAD

Weiterhin reguliert IRE1 α -XBP1s den wichtigen Signalweg der Endoplasmic-Reticulum-associated protein degradation (ERAD). Falsch- oder ungefaltete Proteine werden durch ein Kontrollsystem innerhalb des ER erkannt, markiert, ins Zytoplasma zurück geführt und anschließend durch das Ubiquitin-Proteasome System abgebaut (Meusser et al., 2005). Dadurch ergänzt ERAD andere Komponenten der UPR, die für die korrekte Faltung der Proteine verantwortlich sind. Verschiedene Gene der DnaJ Familie (wie ERdj3, ERdj4 oder ERdj5), die durch XBP1s reguliert werden, sind Teil des ERAD Signalwegs (Acosta-Alvear et al., 2007, Shen and Hendershot, 2007, Lee et al., 2003).

Außerdem wurde die Transkriptionsregulation von EDEM1 (ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1) durch XBP1s nachgewiesen (Lee et al., 2003). EDEM1 unterbricht den Calnexin Zyklus, der die Faltung von Proteinen fördert, durch die gezielte Extraktion ungefalteter Glykopeptide. Dabei werden sich im laufenden Prozess der Faltung befindende Proteine nicht ausgewählt. Dadurch wird eine Ansammlung nicht faltbarer Proteine im Calnexin Zyklus verhindert und ein effektiverer Faltungsprozess neu synthetisierter Peptide sichergestellt (Molinari et al., 2003).

1.2.2.3. RIDD

Neben der Prozessierung von XBP1 führt die Aktivierung der RNase Domäne von IRE1 α bei anhaltendem Stress auch zum regulierten IRE1-abhängigen Abbau (regulated IRE1-dependent decay [RIDD]) (Abb.1.2). Bei dieser Stressantwort werden spezifische mRNAs abhängig von ihrer Lokalisation an der Membran des ER und der Nukleotidsequenz schnell abgebaut (Hollien and Weissman, 2006, Holli-

en et al., 2009). Auch Gene für Chaperone, des ER-Golgi Transports oder sekretorischer Prozesse der Proteintranslokation wurden als Ziel von RIDD ermittelt (Han et al., 2009). Außerdem wurde eine Verbindung von RIDD und einer erhöhten Apoptoserate von Zellen unter ER Stress durch den IRE1 α Zweig der UPR gezogen. Diese Annahme wurde durch den Abbau spezifischer microRNAs (miRNAs) durch die RNase Domäne von IRE1 α bestätigt. Diese miRNAs hemmen unter normalen Bedingungen die Translation von Caspase-2, einer Protease des mitochondrialen Apoptosewegs (Upton et al., 2012).

1.2.2.4. Interaktionen von IRE1 α und Signalunterdrückung

Neben der oben genannten Antworten auf ER Stress kann die Oligomerisierung von IRE1 α und die Interaktion mit dem TNF receptor-associated factor TRAF2 auch zur Aktivierung des Signalwegs der c-Jun amino-terminal kinases (JNK) führen (Abb.1.2) (Urano et al., 2000b). TRAF2 bindet an das COOH-Ende des zytoplasmatischen Teils von oligomerisiertem IRE1 α und häuft sich dort an. Durch diese Oligomerisierung von TRAF2 werden die nachfolgenden Faktoren des JNK Signalwegs aktiviert, wodurch am Ende der Kaskade unter anderem c-Jun phosphoryliert und als Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 die Expression spezifischer Gene reguliert wird (Baud et al., 1999, Karin, 1995).

Neben der Menge an ungefalteten Proteinen kann die Intensität der IRE1 α -Signalweiterleitung durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen reguliert werden. Bax inhibitor-1 (BI-1, ein im ER- lokalisiertes Suppressor der Apoptose) unterdrückt die IRE1 α Aktivität unter ER Stress in Fliegen und Mäusen (Lisbona et al., 2009). Für die optimale Oligomerisierung, Aktivierung und Signalübertragung von IRE1 α wurde NMIIB (nonmuscle myosin heavy chain IIB), ein hexamerer Myosin des Zytoskeletts, in MEFs (mouse embryonic fibroblasts) und *Caenorhabditis elegans* beschrieben (He et al., 2012). Als weiterer Interaktionspartner und Regulator von IRE1 α konnte die Tyrosin-protein kinase ABL1 in pankreatischen β -Zellen identifiziert werden. Unter ER Stress lokalisiert und bindet ABL1 an die ER Membran, aktiviert die RNase Domäne und verstärkt dadurch RIDD, was zu einer verstärkten Apoptoserate führt (Morita et al., 2017). Darüber hinaus wurden noch NMI (N-myc-interactor) und USP14 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14) als negative Regulatoren für IRE1 α nachgewiesen (Brozzi et al., 2014, Hyrskyluoto et al., 2014).

Wichtig für die Regulation der IRE1 α vermittelten Antwort auf ER Stress sind auch zwei Phosphatasen, welche die aktivierte Kinase Domäne dephosphorylieren. Zum einen wurde PP2A (protein phosphatase 2A) in Zusammenspiel mit RACK1 (receptor for activated C-kinase 1), zum anderen PPM1L (protein phosphatase 1-like) als Phosphatasen von IRE1 α identifiziert (Qiu et al., 2010, Lu et al., 2013). Als Gegenspieler wurde die Proteinkinase PKA (protein kinase A) im Glukosemetabolismus nachgewiesen, die, neben sich selbst, IRE1 α phosphoryliert (Mao et al., 2011).

1.2.3. PERK

Das zweite Transmembranprotein der UPR ist PERK, das mit IRE1 α in der ER lumenalen Domäne funktionelle Ähnlichkeiten hat. Diese Domänen sind ohne Funktionsverlust austauschbar (Bertolotti et al., 2000). PERK als in allen Metazoen konservierte Typ-I-Transmembranprotein besteht aus 1116 Aminosäuren, aufgeteilt auf eine N-terminale Signalsequenz (As 1-29), eine lumenale (As 30-514), eine transmembrane (As 515-535) und eine zytoplasmatische Domäne (As 536-1116). Es wurde zuerst in Inselzellen des Pankreas von Ratten entdeckt (Harding et al., 1999, Shi et al., 1998). PERK besitzt wie IRE1 α eine lumenale, sensorische Domäne und eine Proteinkinase Domäne im zytoplasmatischen Teil (die ähnlich der Domänenstruktur von (protein kinase RNA-activated [PKR] ist, einer eIF2 α Kinase) (Bertolotti et al., 2000).

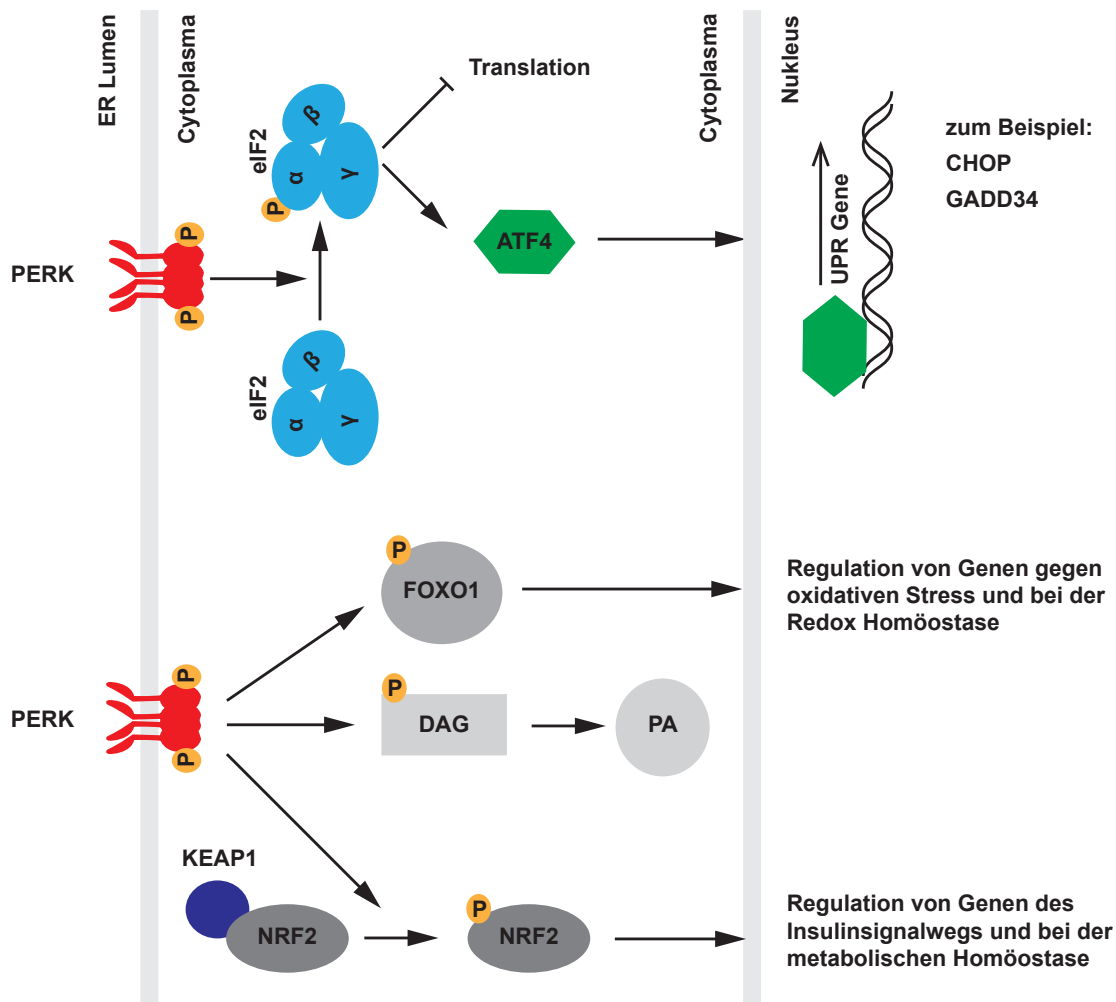


Abbildung 1.3: Die Aktivierung von PERK führt zur Inhibition der Translation und Transkription spezifischer Gene gegen Stress.

Aktiviertes PERK phosphoryliert eIF2 α , wodurch die globale Translation mit wenigen Ausnahmen inhibiert wird. Der Transkriptionsfaktor ATF4 wird unter Stressbedingungen aktiv translatiert, was zu einer Induktion UPR-spezifischer Gene wie CHOP oder GADD34 und einer Anpassung an ER Stress führt. PERK phosphoryliert und aktiviert darüber hinaus NRF2, FOXO1 sowie DAG und reguliert damit die Expression weiterer stressspezifischer Gene.

Unter normalen Bedingungen bindet BiP an die lumenale Domäne und hält PERK in inaktivem Zustand. Durch Akkumulation von ungefalteten Proteinen dissoziiert BiP von PERK, ähnlich wie bei der Aktivierung von IRE1 α . Anschließend kommt es zu einer Oligomerisierung von PERK und einer Transautophosphorylierung an verschiedenen Stellen der Kinase Domäne (wie T982 oder Y619) (Berlotti et al., 2000, Ma et al., 2002). Neben der Autophosphorylierung werden auch andere Substrate von PERK phosphoryliert, was zur Adaption an ER Stress beiträgt (Abb.1.3).

1.2.3.1. Hemmung der Translation durch Phosphorylierung von eIF2 α

Das wichtigste Zielprotein von PERK ist eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α), das mit eIF2 β und eIF2 γ den heterotrimeren Komplex eIF2 bildet (Harding et al., 1999, Hershey, 2000). eIF2 bildet mit der Initiator Methionyl-tRNA (tRNA^{Met}) und GTP den tertiären Komplex (ternary complex, TC) und bindet die kleine ribosomale Untereinheit (40S) um den 43S Prä-Initiations Komplex (preinitiation complex, PIC) zu formen. Hierbei stimulieren die Initiationsfaktoren eIF3, eIF1, eIF1A und eIF5 die Beladung

der 40S Untereinheit mit dem TC. Das 5' Ende der RNA wird durch den eIF4F Komplex gebunden, welcher wiederum mit dem poly(A)-binding protein (PABP) interagiert. Dies führt eine Zirkularisierung herbei. eIF4F kann weiterhin den 43S PIC an die RNA rekrutieren, der die 5' untranslatierte Region (5'UTR) der gebundenen mRNA bis zum Anticodon der $tRNA_{Met}$ scannt. Beim Erkennen eines Startcodons wird Phosphat aus dem TC freigesetzt, was weiteres Scanning der mRNA verhindert. Die 40S-gebundenen Initiationsfaktoren werden freigegeben und die große ribosomale Untereinheit (60S) wird mit Hilfe weiterer eIFs rekrutiert, um ein Elongations-kompetentes Ribosom zu assemblieren. Da eIF2 in seiner GDP-gebundenen Form freigesetzt wird, ist ein Austausch von GDP durch GTP erforderlich, damit eIF2 an weiteren Initiationsrunden teilnehmen kann. Dieser Guanylyl-Austausch wird durch den Guanine nucleotide exchange factor eIF2B katalysiert (Abb.1.4) (Hinnebusch, 2000, Hinnebusch, 2017).

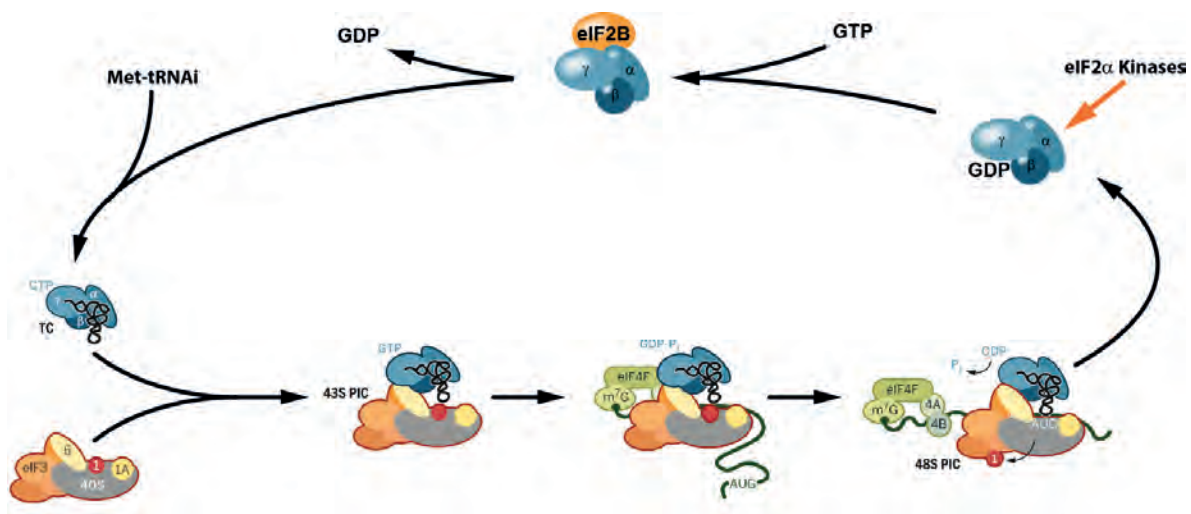


Abbildung 1.4: Schematische Übersicht des Scanmechanismus der Translationsinitiation in Eukaryoten (Hinnebusch et al., 2016)

Durch die Aktivierung von PERK wird eIF2 α an S51 als Teil der UPR phosphoryliert (Harding et al., 2000b). Diese Phosphorylierung von eIF2 α verhindert die Entstehung beziehungsweise verlängert die Dauer zur Bildung des TC, da der Austausch von GDP zu GTP aufgrund der erhöhten Affinität von phospho-eIF2 α (P-eIF2 α) an eIF2B gehemmt wird (Rowlands et al., 1988). Damit wird die Translation als Antwort auf ER Stress mit wenigen Ausnahmen global inhibiert (Hinnebusch, 2000). Die Reduktion der Translation durch die UPR verringert die Proteinneusynthese sowie die Neubeladung des bereits gestressten ER und ist damit ein essentieller Bestandteil als Antwort auf ER Stress (Harding et al., 2000b, Scheuner et al., 2001). Des Weiteren fördert die verringerte Proteinneusynthese das Überleben ER-gestresster Zellen durch Verringerung von oxidativem Stress (Marciniak et al., 2004, Back et al., 2009, Han et al., 2013)

1.2.3.2. Nachgeschaltete Signalübertragung durch die Phosphorylierung von eIF2 α

Die Phosphorylierung von eIF2 α reduziert allerdings nicht die Translation aller mRNAs. Die erhöhte Menge an P-eIF2 α führt bei weitgehend unverändertem mRNA-Level zur verstärkten Translation des ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktors ATF4 (cyclic AMP-dependent transcription factor 4) (Vallejo et al., 1993, Yukawa et al., 1999). ATF4 besitzt in der 5'UTR zwei upstream Open Reading

Frames (uORFs), die unter normalen Bedingungen vom Ribosom gescannt werden und der ATF4 codierende ORF aufgrund einer überlappenden Region mit uORF2 nicht translatiert werden kann (Vattem and Wek, 2004, Pavitt and Ron, 2012). Durch die Phosphorylierung von eIF2 α und damit einhergehend einer verzögerten Bildung des TC kann die 40S Untereinheit keine neue Translation initiieren und scannt über uORF2. Aufgrund der geringeren Verfügbarkeit des TC werden einige 40S Ribosomen zwischen uORF2 und dem ATF4 ORF gebildet, was zu einer veränderten Genexpression als Anpassung an ER Stress führt (Vattem and Wek, 2004, Harding et al., 2000a). ATF4 bindet mit der bZIP (basic-leucine zipper) Domäne als Homo- oder Heterodimer an cAMP response elements in Promoterregionen mit den Sequenz TGACGTCA und reguliert Gene des Aminosäureimports, der Translation (z.B. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen), der mitochondrialen Funktion, der Glutathionbiosynthese sowie Resistenzgene gegen oxidativen Stress (Vallejo et al., 1993, Hai and Curran, 1991, Hai and Hartman, 2001, Barbosa-Tessmann et al., 1999, Harding et al., 2003, Marchand et al., 2006). Darüber hinaus wurde ATF4 als wichtiger Regulator bei der mitochondrialen Stressantwort identifiziert (Quiros et al., 2017).

Die Phosphorylierung von eIF2 α und die Translation von ATF4 sind zentrale Bestandteile der Integrated Stress Response (ISR), die in Eukaryoten als Antwort auf verschiedenste pathologische Bedingungen aktiviert werden um die zelluläre Gesundheit durch eine veränderte Genexpression wieder herzustellen (Pakos-Zebrucka et al., 2016). Vier unterschiedliche Kinasen bei verschiedenen Stressarten (zum Beispiel der Mangel an Aminosäuren oder einer Infektion mit Viren) phosphorylieren eIF2 α und führen primär zu einer anti-apoptotischen, die Homöostase wiederherstellender Reprogrammierung (Dever et al., 1992, Deng et al., 2002, Berlanga et al., 2006, Perkins and Barber, 2004, Wek et al., 2006).

Als Antwort auf verschiedene Arten von Stress wird allerdings durch P-eIF2 α -ATF4 auch CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; auch DNA damage-inducible transcript 3 protein DDIT3), ein multifunktionaler, proapoptotischer, bZIP Transkriptionsfaktor verstärkt exprimiert (Fawcett et al., 1999, Harding et al., 2000a, Ron and Habener, 1992, Wang et al., 1996). Um die Dauer und Intensität der Proteinexpression sicher zu stellen wird CHOP durch die Phosphorylierung von eIF2 α auch auf translationaler Ebene reguliert (Palam et al., 2011). Als Transkriptionsfaktor reguliert CHOP die Expression von proapoptotischem BIM (Bcl2-interactin mediator of cell death) und vermittelt die Herunterregulierung von Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), welches die Apoptose von Zellen unterdrückt. Damit reguliert CHOP die Apoptose bei anhaltendem ER Stress (Puthalakath et al., 2007, McCullough et al., 2001). Zusätzlich reguliert der PERK-Zweig der UPR IRE1 und fördert damit die Apoptose (Chang et al., 2018).

Darüber hinaus wird ERO1- α (ER oxidoreductin-1-like protein α) durch CHOP reguliert, womit eine Verbindung der UPR zur Kalzium-vermittelten Apoptose hergestellt wird (Li et al., 2009). Außerdem induziert CHOP PPP1R15A (protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A), auch bekannt als GADD34 (Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34), welches die Serin/Threonin Proteinphosphatase PP1C rekrutiert und P-eIF2 α dephosphoryliert (Marciniak et al., 2004, Novoa et al., 2001). Durch diese negative Rückkopplung steigt die Proteinneusynthese und damit die Beladung des ER mit ungefalteten Proteinen, wodurch sich die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) erhöht. Dagegen wird die Menge an ATP verringert, mithin die Apoptose der Zelle induziert (Marciniak et al., 2004, Han et al., 2013). GADD34 wird, ähnlich wie CHOP, translational durch einen Leaky-Scanning-Mechanismus reguliert (Lee et al., 2009). Bei diesem Mechanismus übergeht der 43S PIC ein Startcodon und beginnt die Translation an einem nachgeschalteten AUG. In die Regulation von GADD34 ist darüber hinaus ATF3 (cyclic AMP-dependent transcription factor 3) involviert, wie ATF4 ein Mitglied der ATF/CREB (activation transcription

factor/cAMP responsive element-binding) Proteinfamilie der Transkriptionsfaktoren. ATF4 induziert GADD34, indem es mit CHOP einen heterodimeren Komplex bildet (Chen et al., 1996, Hai and Hartman, 2001, Jiang et al., 2004).

Dieser Rückkopplungs-Mechanismus der Dephosphorylierung von eIF2 α durch GADD34 im Zusammenspiel mit PP1C ist auch Ansatz für pharmakologischer Forschungen der UPR (Boyce et al., 2005, Tsaytler et al., 2011).

1.2.3.3. Weitere PERK-Targets

Neben eIF2 α sind noch andere durch PERK regulierte Proteine bekannt. Der Cap 'n' Collar Transkriptionsfaktor NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) wurde als direktes Substrat von PERK identifiziert (Cullinan et al., 2003). In nicht gestressten Zellen liegt NRF2 an KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) gebunden vor und hemmt die Translokation in den Zellkern und die transkriptionelle Aktivität von NRF2 (Itoh et al., 1999). Die Aktivierung von PERK durch ER Stress führt zur Phosphorylierung von NRF2 an T80, zur Dissoziation von KEAP1 und zur Aufnahme in den Zellkern (Cullinan et al., 2003). Als Transkriptionsfaktor ist NRF2 ein Hauptregulator von Genen der Antwort auf oxidativen Stress sowie der Redox Homöostase und limitiert ROS durch die Expression von antioxidativen Enzymen wie GCLC (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit) (Cullinan and Diehl, 2004, Cullinan and Diehl, 2006, Wild et al., 1999). NRF2 vermittelt damit einen überlebensfördernden Aspekt der UPR (Cullinan and Diehl, 2006).

Darüber hinaus konnte die Phosphorylierung und damit einhergehend die Aktivierung von FOXO1 (Forkhead box protein O1) durch PERK in Drosophilazellen und humanen Zellen nachgewiesen werden (Zhang et al., 2013). FOXO1 interagiert mit ATF4 in Osteoblasten beim Aminosäureimport, bei der Proteinsynthese und bei der Reaktion auf oxidativen Stress (Rached et al., 2010). Die Phosphorylierung von FOXO1 führt zur Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Zellkern und zur Regulation von Genen des Insulinsignalwegs oder der metabolischen Homöostase als Antwort auf oxidativen Stress (Hall et al., 2000, Nakae et al., 2002). Zusammengenommen hat dieser Mechanismus großen Einfluss auf die Vermittlung der Insulinresistenz durch ER Stress und die UPR (Zhang et al., 2013).

Außerdem phosphoryliert PERK den wichtigen Second Messenger Diacylglycerol (DAG), woraus Phosphatidsäure (PA) gebildet werden kann (Bobrovnikova-Marjon et al., 2012). PA reguliert viele verschiedene, essentielle Zellfunktionen (Metabolismus, Proliferation) und spielt eine Rolle bei der Tumorentwicklung (Bruntz et al., 2014). Dies verdeutlicht die Bedeutung des PERK-Zweigs der UPR bei verschiedenen Krankheitsbildern.

1.2.3.4. Regulation des PERK-Signalwegs

Sowohl PERK als auch P-eIF2 α werden reguliert. Dadurch wird die Antwort dieses UPR-Zweigs angepasst oder deaktiviert. Neben dem zuvor beschriebenen, durch CHOP induzierten GADD34 (oder PPP1R15A) rekrutiert auch das ubiquitär exprimierte CReP (constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation; auch PPP1R15B) PP1C, um P-eIF2 α zu dephosphorylieren (Jousse et al., 2003, Harding et al., 2009).

Die Inaktivierung der von PERK ausgehenden Signalkaskade kann wie bei IRE1 α durch die Bindung an BiP oder durch die Interaktionen mit anderen Proteinen erfolgen (Bertolotti et al., 2000). Die Protein Tyrosin Phosphatase PTPN1 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1; auch PTP1B) dephosphoryliert PERK an T619 in der Kinase-Domäne und inhibiert damit die Signalübertragung an

Zielproteine (Krishnan et al., 2011). Darüber hinaus wird DNAJC3 (DnaJ homolog subfamily C member 3; auch p58IPK) durch den ATF6-Zweig der UPR induziert und damit PERK inhibiert, wodurch eIF2 α nicht mehr phosphoryliert wird (Yan et al., 2002, van Huizen et al., 2003). Außerdem wurde die Rolle von NCK1 (Cytoplasmic protein NCK1) sowohl bei der Regulation von PERK durch Interaktion als auch bei der Dephosphorylierung von P-eIF2 α in einem Komplex verdeutlicht (Yamani et al., 2014, Kebache et al., 2004, Latreille and Larose, 2006). Zusätzlich werden der PERK-eIF2 α -ATF4- und IRE1 α -XBP1-Signalweg durch TMEM33 (Transmembrane protein 33) über die Bindung an PERK reguliert (Sakabe et al., 2015).

1.2.4. Aktivierung und Prozessierung von ATF6

Als dritter Übermittler von ER Stress wurde ATF6 als ERSE bindendes Protein der Promotorregionen von BiP, GRP94 und Calreticulin identifiziert (Yoshida et al., 1998). Die beiden Isoformen ATF6 α (zytoplasmatische Domäne: AS 1-377; transmembrane Domäne: As 378-398; lumenale Domäne: As 399-670) und ATF6 β (zytoplasmatische Domäne: AS 2-396; transmembrane Domäne: As 397-417; lumenale Domäne: As 418-703) sind Typ-II Transmembranproteine, die unter normalen Zellbedingungen Disulfidbrücken im C-Terminus ausbilden und an BiP gebunden vorliegen (Nadanaka et al., 2007, Shen et al., 2002a). Diese Disulfidbrücken werden unter ER Stress reduziert und BiP wird, im Gegensatz zur kompetitiven Dissoziation bei IRE1 α und PERK, in einem aktiven Regulationsmechanismus von ATF6 getrennt (Nadanaka et al., 2007, Shen et al., 2005). Durch die Dissoziation von BiP werden zwei Golgi Translokationsstellen (GLS) im C-Terminus von ATF6 demaskiert, wodurch dieser Faktor in den Golgi-Apparat transloziert wird (Shen et al., 2002a, Nadanaka et al., 2007).

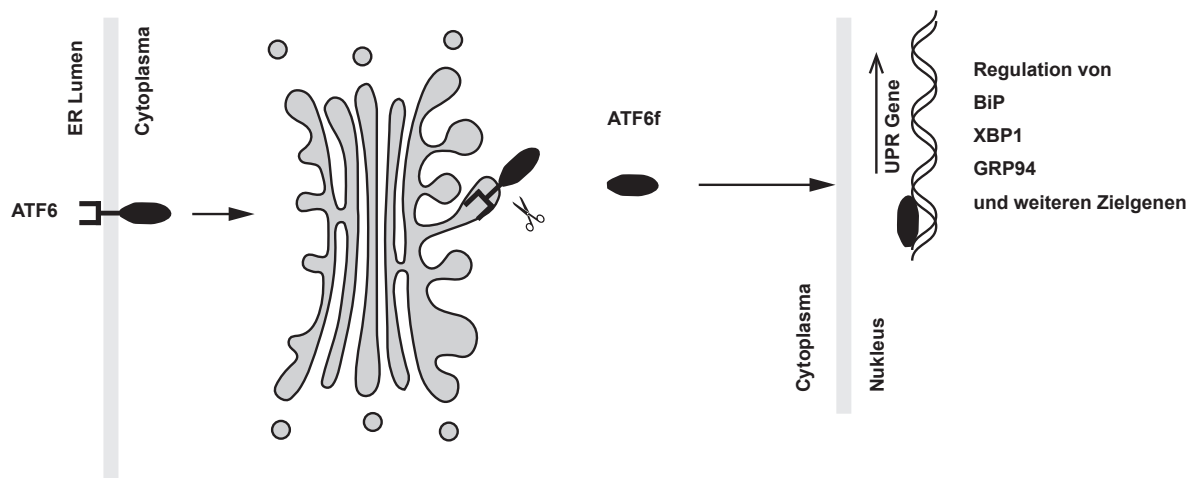


Abbildung 1.5: ATF6 wird als Antwort auf ER Stress prozessiert und reguliert die Transkription verschiedener UPR-Zielgene.

Nach Dissoziation von BiP transloziert ATF6 in den Golgi-Apparat und wird dort proteolytisch prozessiert. Der daraus entstandene aktive Transkriptionsfaktor ATF6f reguliert im Nucleus die Expression verschiedener UPR-Gene wie BiP, XBP1 oder GRP94.

Diese Lokalisationsänderung führt zur Prozessierung des anfangs 90kDa großen ATF6, das in ein 50kDa großes, aktives, aus dem zytoplasmatischen N-Terminus bestehendes ATF6f proteolytisch durch S1P (Site-1 protease; auch MBTPS1) und S2P (MBTPS2) umgewandelt wird (Haze et al., 1999, Ye et al., 2000). Nach dieser Prozessierung aktiviert ATF6f, ein Mitglied der C/EBP (CCAAT/

enhancer-binding proteins) Familie von bZIP Transkriptionsfaktoren im Zellkern die Genexpression, wobei ATF6 α -f als transkriptioneller Aktivator und ATF6 β -f als transkriptioneller Repressor wirkt (Abb.1.5) (Hai and Hartman, 2001, Haze et al., 1999, Thuerlauf et al., 2004).

1.2.4.1. Regulation von ATF6

ATF6 kann durch verschiedene Mechanismen während der Aktivierung im ER, der proteolytischen Prozessierung oder den Lokalisationsänderungen reguliert werden. Wichtig bei der Intensitätsregulation der Antwort auf ER Stress durch ATF6 sind auch die relativen Konzentrationen beider Isoformen, da ATF6 β ein transkriptioneller Repressor der α -Isoform ist (Thuerlauf et al., 2007). Hierbei spielt auch die Glykosylierung von ATF6 β und damit verbunden die Eigenschaft der Calreticulin-Bindung eine wichtige Rolle (Guan et al., 2009, Hong et al., 2004). Ein weiterer Regulator bei der anfänglichen Aktivierung ist PDIA5 (Protein disulfide-isomerase A5), welches die Disulfidbrücken von ATF6 unter ER Stress verändert und dadurch zur Translokation aus dem ER führt (Higa et al., 2014). In transgenen Mäusen unterstützt zudem die Interaktion von Thrombospondin-4 mit ATF6 α im ER Lumen die Lokalisationsänderung (Lynch et al., 2012). Für den Transport wird ATF6 nach Exposition der GLS in COPII-Vesikel gepackt, wobei auch die lumenale Domäne involviert ist (Schindler and Schekman, 2009).

In Plattenepithelkarzinomzellen ist die nukleare Translokation und transkriptionelle Aktivierung von ATF6 abhängig von MAPKK6 (mitogen-activated protein kinase kinase 6), MAPK14 (auch p38 α) und MAPK11 (p38 β) (Schewe and Aguirre-Ghiso, 2008). Interleukin-10 verringert in Epithelzellen des Darms die Bindung von ATF6f an den GRP78 Promoter und damit die Expression von BiP als Antwort auf ER Stress (Shkoda et al., 2007). Außerdem wirkt WFS1 (Wolfram syndrome 1) als negativer Regulator von ATF6. WFS1, durch Mutationen verantwortlich für das Wolfram Syndrom, ist beteiligt an der Regulation der Ca²⁺-Konzentration im ER. Es verringert die ATF6 α -vermittelte Genexpression, stabilisiert die E3 Ubiquitinligase HRD1, interagiert mit dem Proteasom und ATF6 α und führt zu dessen Abbau (Strom et al., 1998, Takei et al., 2006, Fonseca et al., 2005, Fonseca et al., 2010).

1.2.4.2. Signaltransduktionen durch ATF6f

Als Heterodimer regulieren beide Isoformen von ATF6f als Teil der UPR im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen. Als erster Interaktionspartner von ATF6f wurde NF-Y (Nuclear transcription factor Y) identifiziert (Haze et al., 1999, Yoshida et al., 2000, Yoshida et al., 2001b). NF-Y, auch bekannt als CBF, bindet an das CCAAT regulierende Element von ERSE, während ATF6f davon abhängig an die Sequenz CCACG 9bp downstream bindet, um den ER stress response factor (ERSF)-Komplex zu bilden (Roy and Lee, 1995, Roy et al., 1996, Yoshida et al., 2000, Yoshida et al., 2001b). Dieser Komplex reguliert die Expression von wichtigen ER Chaperonen wie BiP, GRP94 oder Calreticulin, das ERAD-Protein HERPUD1 (Homocysteine-responsive ER-resident ubiquitin-like domain 1 protein) oder HYOU1 (Hypoxia upregulated protein 1), welches eine zellschützende Aufgabe bei Stress durch Hypoxie übernimmt (Haze et al., 1999, Li et al., 2000, Baumeister et al., 2005, Yoshida et al., 1998, Shoulders et al., 2013, Adachi et al., 2008, Ozawa et al., 1999). Darüber hinaus wurde der proapoptotische Transkriptionsfaktor CHOP als Ziel des ERSF-Komplexes identifiziert (Yoshida et al., 2000, Nakanishi et al., 2005).

Durch die Regulation von Chaperonen wie GRP94 oder Calreticulin sowie CHOP durch ATF6f, dessen Expressionen auch durch IRE1 α oder PERK gesteuert werden können, wird die Interaktion und die funktionale Redundanz der UPR-Zweige deutlich (Lee et al., 2003, Ron and Walter, 2007). Ein weiterer Beweis für die Vernetzung der UPR-Zweige ist die ATF6f induzierte Transkription von XBP1, einem wichtigen Transkriptionsfaktor des IRE1 α -Arms der UPR (Yoshida et al., 2001a, Lee et al., 2002).

ATF6f reguliert nicht nur, sondern interagiert mit XBP1s in einem heterodimeren Komplex für die Induktion von ERAD-Komponenten wie EDEM, HERPUD1 oder die E3 Ubiquitin-Protein Ligase Synoviolin (Yamamoto et al., 2007, Shoulders et al., 2013). Darüber hinaus reguliert ATF6f, wahrscheinlich im Zusammenspiel mit XBP1s, GADD45 (Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45) und p58IPK, einem PERK-Inhibitor (Lee et al., 2003, van Huizen et al., 2003). RCAN1 (Regulator of Calcineurin 1) ist ein von ATF6 reguliertes Gen und ein endogener Inhibitor von Calcineurin (Belmont et al., 2008, Genesca et al., 2003). Des Weiteren stellt die ATP abhängige, für die Calcium-Homöostase im ER oder sarkoplasmatischen Retikulum verantwortliche Ca^{2+} -Ionenpumpe SERCA2 (Sarco/endoplasmic Reticulum Calcium ATPase-2) ein Zielgen für ATF6f dar (Thuerauf et al., 2001, Misquitta et al., 1999). In Plattenepithelkarzinomzellen vermittelt ATF6f durch die Regulation von Rheb (Ras homolog enriched in brain) und die Aktivierung der Serin/Threonin-Protein Kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) überlebensfördernde Signale (Schewe and Aguirre-Ghiso, 2008).

1.2.5. UPR in Krankheiten

Intrazelluläre Signale durch metabolische Veränderungen (wie Hyperglykämie, oder Hyperlipidämie), aber auch durch Entzündungen induzierende Zytokine führen zu einer fehlerhaften Proteinfaltung innerhalb des ER und damit zur Aktivierung der UPR (Wang and Kaufman, 2012, Hetz et al., 2013, Hetz and Papa, 2018). Nicht zuletzt wurde die relevante Funktion der UPR für die Ausbildung und den Verlauf vieler Erkrankungen in Modellen auf der Basis genetisch modifizierter Mäuse nachgewiesen (Überblick siehe Abb.1.6) (Kaufman, 2002, Bommiasamy and Popko, 2011).

1.2.5.1 Beteiligungen der UPR an metabolischen Erkrankungen

Diabetes Typ1 und Typ2 wurden mit ER Stress in Verbindung gebracht (Scheuner et al., 2001, Harding et al., 2000b). Verschiedene genetische, pathologische oder umweltbedingte Umstände induzieren ER Stress in β -Zellen des Pankreas und führen zu einer proapoptotischen Antwort der UPR (Harding et al., 2001, Fonseca et al., 2011, Lipson et al., 2006, Cnop et al., 2007, Cao and Kaufman, 2013, Zhang et al., 2006b). Für die Synthese und Faltung von Proinsulin ist der IRE1-XBP1-Zweig der UPR essentiell, allerdings spielt auch die Translationskontrolle durch den PERK-eIF2 α -Arm bei der Apoptose von β -Zellen eine wichtige Rolle (Lipson et al., 2006, Lee et al., 2011a, Harding et al., 2001, Scheuner et al., 2001, Song et al., 2008). Darüber hinaus führt eine Mutation von PERK zum Wolcott-Rallison Syndrom, einer seltenen, autosomal rezessiv vererbten Form neonataler Diabetes (Delepine et al., 2000, Zhang et al., 2006b). In Knockout Mäusen führt das Fehlen von ATF6 α zu Fehlbildungen der β -Zellen des Pankreas (Usui et al., 2012). Mutationen im mit ATF6 interagierenden WFS1 können zu einer unregelmäßigen UPR und zur Apoptose von β -Zellen führen (Fonseca et al., 2010).

Neben Fehlbildungen der β -Zellen und der Insulinsynthese spielt die UPR auch eine wichtige Rolle bei der Ausprägung von hepatischer Insulinresistenz sowie bei Adipositas und damit Typ2 Diabetes (Marciniak and Ron, 2006, Ozcan et al., 2004, Flamment et al., 2012, Ozcan et al., 2006). Die UPR kann die Insulinresistenz unter anderem durch die Regulation verschiedener Enzyme oder Transkriptionsfaktoren wie JNK, TRB3 (Tribbles Pseudokinase 3), CREBH (Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3) oder CRTC2 (CREB-regulated transcription coactivator 2) vermitteln (Ozcan et al., 2006, Nakamura et al., 2010, Du et al., 2003, Ohoka et al., 2005, Oberkofler et al., 2010, Zhang et al., 2006a, Lee et al., 2010c, Wang et al., 2009b).

Darüber hinaus führen die Interaktionen von XBP1s mit den regulatorischen Untereinheiten p85 α und p85 β der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase), oder mit MAPK14 zu einer erhöhten nuklearen Translokation und zu einer veränderten UPR-Antwort (Park et al., 2010, Winnay et al., 2010, Lee et al., 2011b).

Neben dem Einfluss auf Diabetes Typ1 und Typ2 wurde die UPR unter anderem auch mit der Entstehung und dem Verlauf der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung sowie der Atherosklerose in Verbindung gebracht (Puri et al., 2008, Pfaffenbach et al., 2010, Zhang et al., 2012, Myoishi et al., 2007, Moore and Tabas, 2011, Gao et al., 2011).

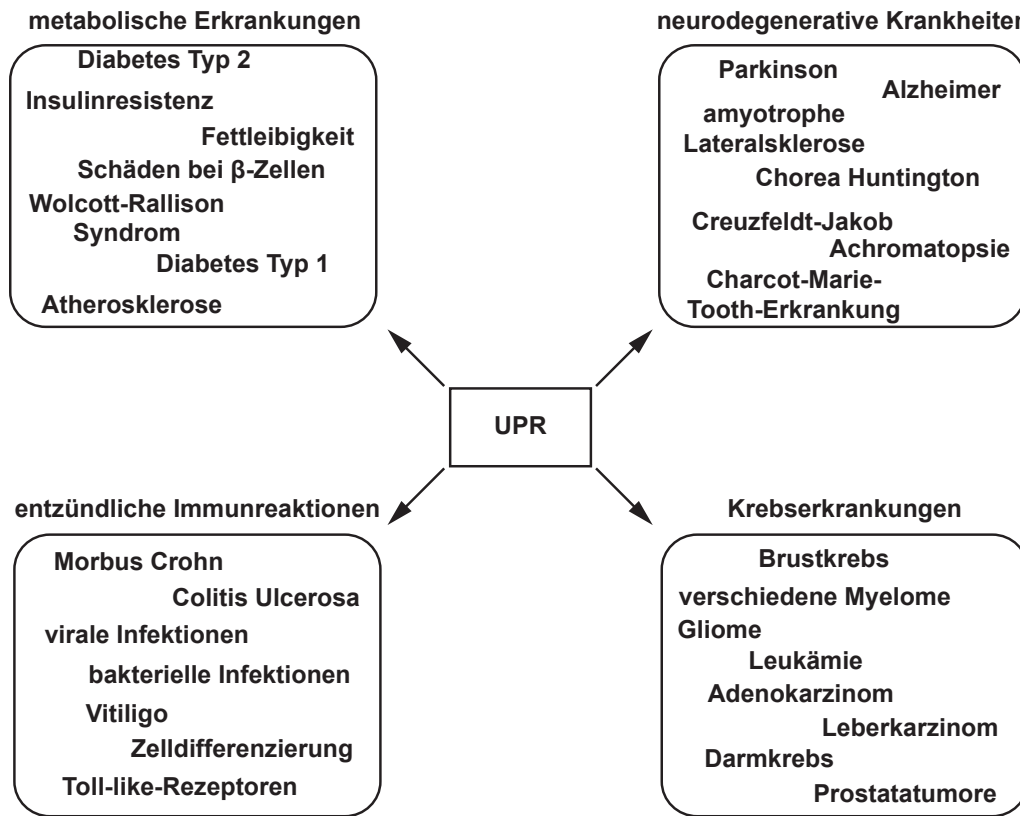


Abbildung 1.6: Übersicht der Beteiligung von ER Stress und der UPR in menschlichen Krankheiten.

1.2.5.2 Einfluss der UPR auf neurodegenerative Erkrankungen

Bei vielen neurodegenerativen Krankheiten ist eine Ansammlung inkorrekt gefalteter Proteine und damit ER Stress nachweisbar. Damit trägt die UPR zur Entstehung und zum Verlauf dieser Erkrankungen bei (Hetz et al., 2013, Hetz and Saxena, 2017, Doyle et al., 2011, Roussel et al., 2013). In Gehirnen verstorbener Patienten mit Alzheimer wurde eine Aktivierung der UPR nachgewiesen (Hoozemans et al., 2005, Hoozemans et al., 2009, Lee et al., 2010b). Zur Aggregation neigendes Amyloid β aktiviert die UPR und wird als mitverantwortlich für die Alzheimer Erkrankung gesehen. Es wird jedoch auch vom PERK-eIF2 α -Zweig beeinflusst, wodurch sich ein Ansatzpunkt für eine mögliche Behandlung ergibt (Shoji et al., 1992, Resende et al., 2008, Lee et al., 2010a, Ma et al., 2013, Hetz and Saxena, 2017). Darüber hinaus fördert Amyloid β das Splicing von XBP1 in Neuronen von Säugetieren und *D. melanogaster*, wodurch sich die Toxizität von Amyloid β verringert (Casas-Tinto et al., 2011, Liu et al., 2013). Neben Amyloid β beeinflusst die UPR auch die Lokalisierung und die Prozessierung von APP (amyloid precursor protein) (Kudo et al., 2006). Die UPR reguliert weiterhin Presenilin-1, welches wichtig bei der Herstellung von Amyloid β aus dem Vorläufer APP und der Ausprägung von Alzheimer ist (Sherrington et al., 1995, Hardy, 1997, Katayama et al., 1999, Milhavet et al., 2002).

Neben Alzheimer spielt ER Stress und die UPR auch bei Parkinson sowie bei der Huntington-Krankheit eine wichtige Rolle und ist damit auch Ziel für die Behandlungen dieser Erkrankungen (Mercado et al., 2013, Roussel et al., 2013, Hetz and Saxena, 2017, Shacham et al., 2019). In Zellkulturexperimenten wurde Parkinson mit allen drei Zweigen der UPR in Verbindung gebracht (Bouman et al., 2011, Kitada et al., 1998, Sado et al., 2009, Hashida et al., 2012, Bellucci et al., 2011). Zudem wiesen Patienten mit Parkinson phosphoryliertes PERK und P-eIF2 α im Neuromelanin von Neuronen der Substantia nigra auf (Hoozemans et al., 2007). Bei der erblich bedingten, autosomal dominanten Form der Huntington-Krankheit wurde unter anderem ein Defekt des ERAD-Signalwegs und eine XBP1-abhängige Pathogenese nachgewiesen (Duennwald and Lindquist, 2008, Vidal et al., 2012).

Darüber hinaus beeinflusst die UPR die familiäre amyotrophe Lateralsklerose (Nagata et al., 2007, Sasaki, 2010, Wang et al., 2011, Hetz et al., 2009). In durch Prionen bedingten Erkrankungen wie Creutzfeldt-Jakob wurde eine Degeneration von Neuronen durch Translationsinhibition im Anschluss an die Phosphorylierung von eIF2 α nachgewiesen, wobei XBP1 die Replikation der Prionen und die Pathogenese nicht beeinflusst (Moreno et al., 2012, Hetz et al., 2008). Außerdem wirken sich Dysfunktionen des ER auf Achromatopsie durch Mutationen von ATF6, als Risikofaktor für die bipolare Störung durch einen Polymorphismus von XBP1, auf die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung und die Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit aus (Kohl et al., 2015, Ansar et al., 2015, Kakiuchi et al., 2003, Penuto et al., 2008, Sidoli et al., 2016, Southwood et al., 2002).

1.2.5.3 Die UPR bei entzündlichen Erkrankungen und Regulator der Immunantwort

Auch in die Immunantwort und bei Entzündungsreaktionen ist die UPR involviert (Grootjans et al., 2016). Die Deletion von XBP1 beeinflusst die Ausprägung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (Kaser et al., 2008). Darüber hinaus wurde für CHOP eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose nachgewiesen (Thorp et al., 2009). Außerdem regulieren verschiedene Viren, wie das Hepatitis C Virus oder das Herpes Simplex Virus 1, Teile der UPR, um ihre Expression oder Verbreitung zu verbessern (Tardif et al., 2004, Ke and Chen, 2011, Cheng et al., 2005, Burnett et al., 2012). Das seit 2015 in Lateinamerika gehäuft auftretende Zika-Virus, das unter anderem zu schweren Schädigungen bei Feten führt, löst die UPR in der Großhirnrinde aus und fördert die Bildung einer Mikrozephalie (Gladwyn-Ng et al., 2018).

Darüber hinaus sind IRE1 α und XBP1 bei der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, der Entwicklung von dendritischen Zellen und von eosinophilen Granulozyten essentiell (Reimold et al., 2001, Shaffer et al., 2004, Zhang et al., 2005, Iwakoshi et al., 2007, Bettigole et al., 2015). Toll-like-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems können ebenfalls Teile der UPR regulieren (Martinon et al., 2010, Woo et al., 2009).

1.2.5.4 Einfluss der UPR auf Krebserkrankungen

Unterschiedliche Tumorzellen (unter anderem Darm-, Leber-, Hirn- oder Brustkarzinomzellen) passen sich an einen erhöhten Protein- und Lipidbedarf durch gesteigerte Proliferation bei oxidativem Stress und Mangel an Nährstoffen an, indem sie unter anderem die überlebensfördernden Mechanismen der UPR für die Transformation, die Zellteilung, die Angiogenese oder die Metastasenbildung ausnutzen (Madden et al., 2019, Wang and Kaufman, 2012). Mutationen in den drei Sensoren der UPR, PERK, IRE1 α und ATF6, wurden dabei in verschiedenen Tumorarten (Karzinom der Leber, Glioblastome) nachgewiesen (Greenman et al., 2007, Chevet et al., 2015, Parsons et al., 2008).

Bei der Veränderung von normalen Hautzellen zu Melanomen spielt die UPR eine wichtige Rolle (Denoyelle et al., 2006). Die Induktion der UPR in Melanomen wird unter anderem durch den MEK/ERK-Signalweg vermittelt (Croft et al., 2014). In Lymphomen wurde für die UPR die Regulation des PERK/eIF2 α /CHOP-Zweigs durch das proto-Oncogen c-myc und die dadurch verstärkte Tumortransformation gezeigt (Hart et al., 2012). In Epithelzellen wurde ein Zusammenhang zwischen dem IRE1 α -Arm der UPR und der durch Ras induzierten Zellproliferation (einem initialen Schritt bei der Tumorentwicklung verschiedener Krebsarten) hergestellt (Blazanin et al., 2017). Darüber hinaus hemmt der zuvor beschriebene PERK-Inhibitor p58IPK die proapoptotischen Signale der UPR durch den PERK/ATF4/CHOP-Signalweg bei geringer Glukosekonzentration, was zur Adaption der Zellen und zur Karzinogenese beiträgt (Huber et al., 2013).

In Darm- und Brustkrebszellen wurde für den IRE1 α -Zweig der UPR eine Beteiligung am Tumorstadium durch die Regulation von tumorfördernden Faktoren wie β -Catenin, IL-6, CXCL1 oder TGF β 2 nachgewiesen (Li et al., 2017, Logue et al., 2018). Der PERK-Signalweg spielt durch die Aktivierung von CHK1 beim Übergang zur G2 Phase des Zellzyklus sowie bei der Hemmung der DNA Synthese durch die Phosphorylierung von Claspin und Aktivierung von CHK1 eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung (Malzer et al., 2010, Cabrera et al., 2017).

Durch die beim Wachstum von Tumoren auftretende Hypoxie wird die UPR aktiviert und trägt zum Überleben von Krebszellen bei (Harding et al., 2003, Bobrovnikova-Marjon et al., 2010). Dabei sind vor allem PERK (durch Hypoxie aktiviert) und der IRE1 α -XBP1-Signalweg der UPR essentiell für die Proliferation und das Wachstum von Tumoren (Koumenis et al., 2002, Bobrovnikova-Marjon et al., 2010, Romero-Ramirez et al., 2004). In dreifach negativem Mammakarzinom, einer aggressiven Form von Brustkrebs, interagiert XBP1 mit HIF1 α und reguliert damit die Expression der HIF1 α -Zielgene, die Tumorigenität sowie die Adaption an Hypoxie (Chen et al., 2014b, Majmundar et al., 2010).

Neben oxidativem Stress passen sich verschiedene Tumore auch an den Mangel an Nährstoffen durch die Regulation unterschiedlicher Signalwege an (Slawson and Hart, 2011, Madden et al., 2019). XBP1s ist ein transkriptioneller Aktivator der Gene des Hexosamin Biosynthese Signalwegs, welche den Metabolismus und die Proliferation in verschiedenen Tumoren steuern (Wang et al., 2014, Olivier-Van Stichelen et al., 2012). Daneben können Tumore auch durch Immunsuppression oder durch die verringerte Expression von Oberflächenrezeptoren wie UPR regulierter MHC Klasse 1 Peptide ihr Wachstum beeinflussen (Mahadevan et al., 2012, Granados et al., 2009, Fang et al., 2014). In Ovarialkarzinomen verlieren Krebs-assoziierte dendritische Zellen durch XBP1 ihre Aktivität, wodurch die tumorspezifische T-Lymphozytenantwort gehemmt wird (Cubillos-Ruiz et al., 2015).

Darüber hinaus beeinflusst der IRE1 α -XBP1-Zweig der UPR auch die Angiogenese von Tumoren durch die transkriptionelle Regulation von VEGF-A (Drogat et al., 2007, Ghosh et al., 2010, Wang et al., 2012). Neben VEGF-A wurden in Gliomen noch weitere Angiogenese-fördernde Faktoren wie IL-6 und IL-8 identifiziert, die durch IRE1 α reguliert werden (Auf et al., 2010). Neben der Regulationskontrolle durch XBP1 wird die antagonistische Funktion von RIDD bei der Tumorentwicklung von Gliomen verdeutlicht (Lhomond et al., 2018). Außerdem wurden bei PERK-knockdown Experimenten verringerte Mengen an VEGF-A, IL-6 oder FGF nachgewiesen (Wang et al., 2012, Ghosh et al., 2010).

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein wichtiger Prozess während der embryonalen Entwicklung und bei Tumoren ein Hauptrisiko für die Invasion von Tumorzellen sowie die Metastasenbildung. Sie wird ebenfalls durch die IRE1 α -XBP1- und PERK-eIF2 α -ATF4-Zweige induziert (Lawson et al., 2008, Tanjore et al., 2011, Zhong et al., 2011, Feng et al., 2014). Außerdem aktiviert LOXL2 in Brustkrebs- und Adenokarzinomzellen den IRE1 α -XBP1-Signalweg, wodurch die EMT reguliert wird

(Cuevas et al., 2017). Die Ablösung von Tumorzellen von der extrazellulären Matrix führt zur Bildung von ROS und zu ihrer Apoptose. Adaptive Signalwege wie die UPR wirken dem entgegen (Schafer et al., 2009). In Brustkrebszellen wurde die Beteiligung von IRE1- und PERK-Signalen zur Vermeidung der Apoptose nach Ablösung von der extrazellulären Matrix nachgewiesen (Chen et al., 2014b, Avivar-Valderas et al., 2011). Bis zur Ansiedlung von neuem Gewebe bei der Metastasierung sind Tumorzellen (bei Lungen- oder Prostatakarzinomen) inaktiv. Dabei wurde eine erhöhte Expression von UPR Proteinen gezeigt (Aguirre-Ghiso, 2007, Bartkowiak et al., 2015). In Plattenepithelkarzinomen wurde ein konstitutives ATF6-Signal nachgewiesen, welches durch den Rheb und mTOR Signalweg für das Überleben der Zelle verantwortlich ist (Schewe and Aguirre-Ghiso, 2008).

Alle drei Arme der UPR spielen eine wichtige Rolle bei der durch Stammzellen vermittelten Chemoresistenz, etwa bei Gliomen (Eramo et al., 2006). Bei Brust-, Darmkrebs und Gliomen sensitiviert der Knockdown von GRP78, ATF6 oder ATF4 resistente Zellen für Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil oder Temozolomid (Wang et al., 2009a, Kim et al., 2016, Chen et al., 2017a). In Stammzell-ähnlichen Zellen des Zervixkarzinoms wurde durch den Knockdown von PERK und IRE1 die Apoptoserate bei der chemotherapeutischen Behandlung erhöht (Fujimoto et al., 2016). In einem Mausmodell mit humanen Xenotransplantaten wurde die RNase-Aktivität von IRE1 in dreifach negativen Mammakarzinomen als wichtig für das Tumorwachstum nachgewiesen. Dies wurde durch Paclitaxel (einen Inhibitor mitotischer Zellen) verstärkt (Logue et al., 2018). Außerdem wurde in Karzinomen des Pankreasganges und in Gliomen der Zusammenhang zwischen BiP und einer gesteigerten Chemoresistenz gezeigt (Gifford et al., 2016, Pyrko et al., 2007).

1.3. Hirntumore

Die UPR hat einen erheblichen Einfluss auf Hirntumore. Der Sammelbegriff Hirntumor umfasst eine Vielzahl von unterschiedlichen Tumoren, die durch die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation [WHO]) in verschiedene Klassifikationen und Grade eingeteilt werden (Louis et al., 2016). In Hirntumoren wird, wie in andere Tumorarten, in primärer (Tumore entstehen im Gehirn) und sekundärer Art (Metastasen anderer primärer Tumore infiltrieren in das Gehirn) unterschieden (DeAngelis, 2001). Im Jahr 2014 erkrankten in Deutschland nach den Daten des Zentrums für Krebsregister am Robert Koch-Institut etwa 6700 Menschen mit einem primären, malignen Hirntumor. Davon waren 229 Kinder. Die relative Fünfjahresüberlebensrate bei Erwachsenen mit Hirntumor lag bei 21% (Kraywinkel and Spix, 2019). Gliome sind die häufigste Form des primären Hirntumors (Schwartzbaum et al., 2006).

1.3.1 Glioblastoma multiforme

Gliome unterscheiden sich wiederum nach der WHO Klassifizierung. Das Glioblastome multiforme (GBM; auch Astrozytom Grad IV oder nur Glioblastom) ist die häufigste und zugleich bösartigste Form. Die Häufigkeit von GBM liegt bei etwas mehr als drei Fällen pro 100.000 Personen. Es tritt in Patienten mit einem mittleren Alter von 64 Jahren auf (Tamimi and Juweid, 2017). Die 5-jährige Überlebensrate von Patienten mit einem Glioblastom liegt deutlich unter 10% (Kraywinkel and Spix, 2019). Unter der kombinierten Therapie aus chirurgischer Resektion, Chemotherapie und Bestrahlung liegt die mittlere Überlebensdauer von GBM-Patienten bei 13 Monaten (Stupp et al., 2005, Gilbert, 2011).

GBM entstehen vorwiegend als primäre Tumore de novo in älteren Patienten. Seltener entwickeln sich Glioblastome auch sekundär aus Grad II oder Grad III Astrozytomen (Ohgaki and Kleihues, 2013). Primäre und sekundäre GBM sind histochemisch und klinisch nicht zu unterscheiden (Brennan et al., 2013). Das GBM zeichnet sich durch eine frühe Infiltration in umliegende Gewebe aus. Dabei breiten

sich die Tumorzellen entlang von Myelin aus (Giese, 2003, Cuddapah et al., 2014, Amberger et al., 1998). Glioblastome besitzen eine zelluläre und morphologische Heterogenität. Dabei sind Gliomstammzellen resistenter gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie (Chen et al., 2012, Bao et al., 2006, Liu et al., 2006). Die Heterogenität von Gliomen ist Grundlage der Migrations/Proliferations-Hypothese: Proliferierende Zellen aus dem Tumorkern migrieren nicht in umliegendes Gewebe, wogegen invasive Gliomzellen sich nicht teilen (Pham et al., 2012). Da Chemotherapie und Bestrahlung hauptsächlich auf proliferierende Zellen wirken ist diese go-or-grow Dichotomie eine Herausforderung bei der Behandlung des GBM (Giese et al., 2003, Hatzikirou et al., 2012, Xie et al., 2014).

2. Zielsetzung der Arbeit

Trotz der großen klinischen Relevanz von Stress im endoplasmatischen Retikulum und der UPR als Signalweg in verschiedenen Krankheiten, darunter auch diverse Arten von Krebs, fehlen qualitative und quantitative Modelle, die die UPR beschreiben.

Durch diese Arbeit sollten die Änderungen unter ER Stress auf Transkriptions- und Translationsebene mit deep sequencing Methoden analysiert werden. Als Modellorganismen dienen humane embryonale HEK293- Nierenzellen sowie die Gliomzelllinie LN308. Aufgrund der globalen Antwort auf Stress im endoplasmatischen Retikulum soll ein ausführliches Modell erstellt werden, das die Aspekte der UPR im Hinblick auf die Invasivität und die Pathogenität in Gliomen beschreibt. Aufbauend auf dieses Modell könnten mögliche Ziele der UPR für therapeutische Ansätze definiert sowie die UPR zum Vorteil von Patienten verändert werden.

Anschließend an die globale Analyse in Zellen sollten einzelne, regulierte Kandidaten mit weiterführenden biochemischen Methoden validiert werden, die zuvor nicht mit der UPR assoziiert waren und gleichzeitig Einfluss auf die Überlebenschancen von Patienten mit Hirntumoren aufweisen.

Als weiterer Aspekt dieser Arbeit sollte der Einfluss von ER Stress auf die Wirksamkeit verschiedener Chemotherapeutika untersucht werden. Es ist bekannt, dass invasive Gliomzellen eine geringere Proliferationsrate und damit auch eine erniedrigte Apoptoserate aufweisen (Giese et al., 2003). Dies kann zu Resistenzen der Tumore gegen Behandlungen mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung führen. Die Rolle von Stress im endoplasmatischen Retikulum und der UPR ist in diesem Zusammenhang noch nicht bekannt und sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit im Rahmen des SUPR-G Konsortiums beschrieben. Die Präparation der Ribosome Profiling Libraries der LN308-Zellen wurde durch Dr. Dominik Conrad (Universität Regensburg) unterstützt. Die Auswertung der deep sequencing Daten wurden von Dr. Grischa Tödt (EMBL, Heidelberg) durchgeführt. Dr. Canan Has (ISAS, Dortmund) trug mit den Darstellungen der deep sequencing Resultate zu dieser Arbeit bei. In Zusammenarbeit mit Din Lien Chi Nguyen (ISAS; Dortmund) wurde die Massenspektrometrie durchgeführt. Die Vorversuche zum Spleißen von XBP1 durch die UPR (Abb.3.2) wurden durch Himanshu Soni (DKFZ, Heidelberg) ausgeführt.

3.1. Aktivierung der Unfolded Protein Response

Die UPR ist ein Signalweg, der als Antwort auf Stress im endoplasmatischen Retikulum aktiviert wird um die zelluläre Homöostase wieder herzustellen. Um dies zu bewerkstelligen wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten Translation und Transkription angepasst (Hetz, 2012). Falls die Homöostase im ER nicht erreicht werden kann, leitet die UPR die Apoptose der Zelle ein.

Stress im ER und damit die UPR können durch verschiedene Substanzen hervorgerufen werden (Oslowski and Urano, 2011). Die am weitesten verbreiteten Substanzen zur Aktivierung der UPR sind Tunicamycin (TM, ein Inhibitor der N-Glykosylierung) und Thapsigargin (TH, ein Inhibitor der sarco/endoplasmatischen Retikulum Ca²⁺ ATPase [SERCA]) (Harding et al., 1999, Harding et al., 2000b).

Die Adaption von Zellen auf Stress im ER erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Signalübertragungen. Im ersten Schritt wird zunächst die globale Translation durch die Phosphorylierung von eIF2 α inhibiert. In einer zweiten Reaktion wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren die Expression zur Adaption an Stress führenden Genen aktiviert. Alternativ wird bei anhaltendem ER Stress die Apoptose eingeleitet (Hetz, 2012).

Aufgrund dieser zeitlichen Abfolge der UPR wollten wir zuerst die Dauer bis zu ihrer Aktivierung in LN308 und HEK293 ermitteln. Dazu wurden diese Zellen mit aus der Literatur bekannten Konzentrationen von TM und TH für unterschiedliche Zeiten behandelt (Abb.3.1) (Harding et al., 2000b).

Ein Schlüsselprotein bei der Induktion der UPR ist PERK, welches durch ER Stress phosphoryliert und aktiviert wird. Diese Aktivierung wird anhand einer leichten Verschiebung der Proteinbande nach oben bereits nach 2 h Behandlung beobachtet. Die Detektion erhöhter Spiegel von P-eIF2 α , das durch PERK an Serin 51 phosphoryliert wird und die Initiation der Translation durch Bindung an eIF2B hemmt, ist ebenfalls bereits nach 2 h zu sehen. Die Menge an P-eIF2 α in HEK293-Zellen bleibt, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, bei einer Behandlungsdauer von 2 h bis 24 h konstant. In LN308-Zellen hingegen detektierten wir bei einer Behandlungsdauer von 6-8 h eine starke Phosphorylierung von eIF2 α im Vergleich zu den Kontrollen, die sich nach längerer Inkubationsdauer abschwächten. Aufgrund der Phosphorylierung von eIF2 α wird ATF4 durch einen Reinitiationsmechanismus translatiert (Vattem and Wek, 2004). Die ATF4 Konzentrationen in LN308- sowie HEK293-Zellen erhöhen sich ab 2 h, erreichen ein Maximum nach 4-6 h, fallen allerdings bei längerer Inkubation wieder ab.

Durch unsere Experimente konnten wir die Konzentration und die minimale Zeitdauer ermitteln, bei denen Schlüsselproteinen der UPR aktiviert und die Zellen gleichzeitig noch nicht apoptotisch werden.

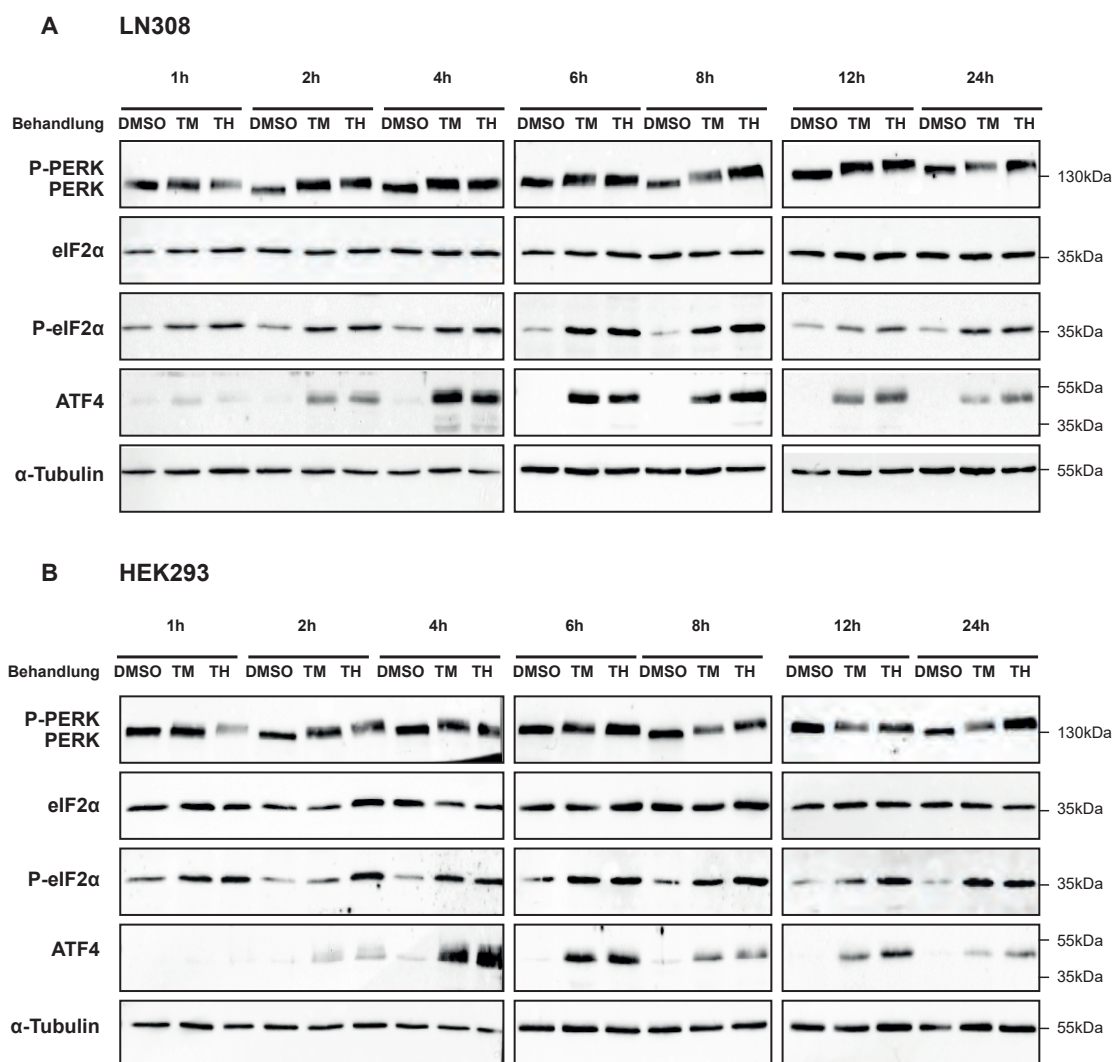


Abbildung 3.1: Zeitliche Aktivierung von PERK und nachgeordneter Proteine als Teil der UPR-Induktion in LN308 und HEK293 durch TM oder TH.

LN308- (A) oder HEK293-Zellen (B) wurden für die angegebenen Zeiträume (1-24 h) mit 2,5 µg/ml TM oder 200 nM TH behandelt und die UPR Proteine PERK, eIF2α per Western Blot analysiert. α-Tubulin wurde als Ladekontrolle und DMSO als Kontrolle der Behandlung verwendet. Die Banden des molekularen Größenmarkers wurden auf der rechten Seite dargestellt.

3.2. Multi-Omics Ansätze zur globalen Analyse der UPR

Um eine tiefe und globale Untersuchung der UPR zu machen führten wir Multi-Omics Ansätze durch. Dabei wurden das gesamte Transkriptom (RNA-Seq), das Translatom (Ribosome Profiling [Ribo-Prof]) und das Proteom (Massenspektrometrie [MS]) untersucht. Wie in Abbildung 3.1 gezeigt wird die Translation durch die Phosphorylierung von eIF2α nach Induktion der UPR bereits früh gehemmt und verstärkt sich bis ca. 6 h nach Behandlung. Daher wählten wir als Zeitpunkte für das Ribosome Profiling eine Behandlungsdauer von 2 und 6 h. Parallel zur Analyse des Translatoms wurde das Transkriptom in den gleichen Zeiträumen untersucht um Translationseffizienzänderungen zu berechnen. Nach einer Behandlungsdauer von 6 h ist dann auch die transkriptionelle Reprogrammierung durch die UPR zu erkennen.

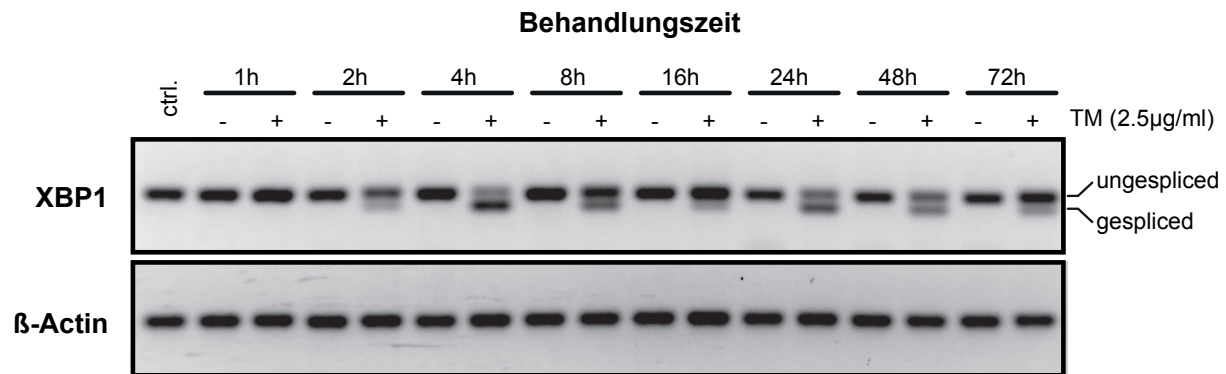


Abbildung 3.2: Zeitliche Abhängigkeit des Spleißens von XBP1 nach Induktion in LN308-Zellen durch TM. LN308-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume (1-72 h) mit 2,5 µg/ml TM behandelt und die zytoplasmatische Prozessierung der XBP1 mRNA wurde per PCR auf Agarosegelen detektiert. β-Actin wurde als Ladekontrolle und DMSO als Kontrolle der Behandlung verwendet.

Zur weiteren Überprüfung analysierten wir darüber hinaus die Prozessierung von XBP1 durch IRE1 nach Induktion der UPR. Das Spleißen von XBP1 konnte in TM behandelten LN308-Zellen bereits nach 2 h mit einem Maximum nach 4 h nachgewiesen werden (Abb.3.2). Bei längerer Induktion der UPR zeigt sich auch hier, ähnlich zu ATF4, eine Abnahme des Transkriptionsfaktors. Dies zeigt auch für den IRE1-XBP1-Signalweg eine frühe Übermittlung der ersten Prozessierung, wodurch im Anschluss die Transkription durch diesen Arm der UPR angepasst wird.

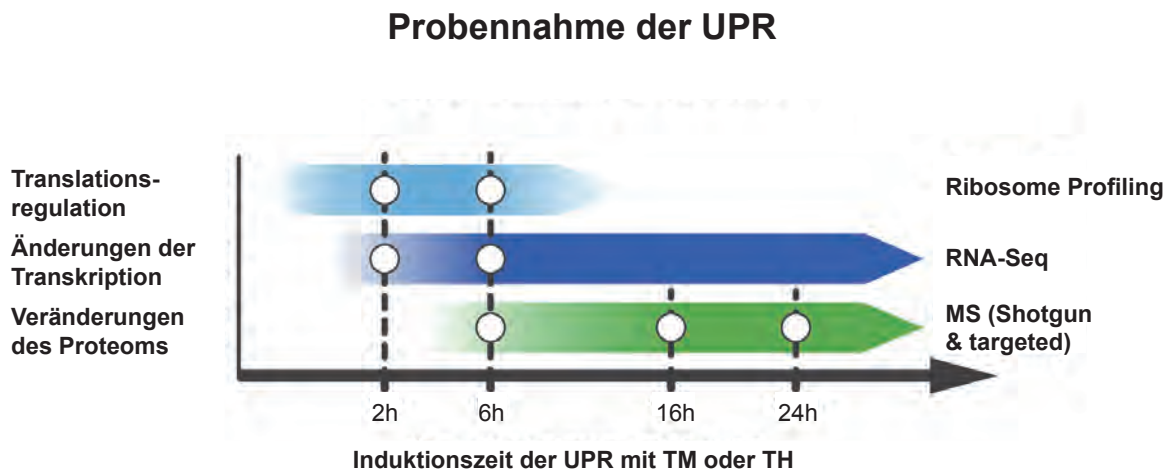


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der gezeiteten Probennahme für die Entzifferung der UPR. Für die Multi-Omics Datenerhebung zur Ermittlung der globalen Änderungen der UPR wurde für die Untersuchungen der Translation (Ribosome Profiling), der Transkription (RNA-Seq) und des Proteoms (MS) verschiedene Zeitpunkte gewählt.

Veränderungen im Proteom treten erst verzögert aufgrund der vorangehenden Translations- und Transkriptionsänderungen auf. Daher wurde die Detektion des Proteoms durch die UPR nach 6,

16 und 24 h durchgeführt. Als überlappender Zeitpunkt aller drei Analysen und als Antwort auf die veränderten Translationsbedingungen wurde 6 h gewählt, da eine längere Behandlungsdauer einen Einblick in die Anpassung an länger anhaltenden Stress im ER widerspiegeln (Abb.3.3).

3.2.1. Überprüfung der Induktion der UPR in Multi-Omics Experimenten

Zur Detektion der Transkriptionsänderungen bei ER Stress wurden LN308- und HEK293-Zellen für 2 oder 6 h mit entweder 2,5 µg/ml TM oder 200 nM TH inkubiert und die RNA Expression analysiert. Parallel dazu wurden auch Proben für das Ribosome Profiling gewonnen um die Translation zu untersuchen (siehe 3.2.4. und 3.2.5.). Unbehandelte LN308- und HEK293-Zellen dienen als Kontrollen bei der Analyse.

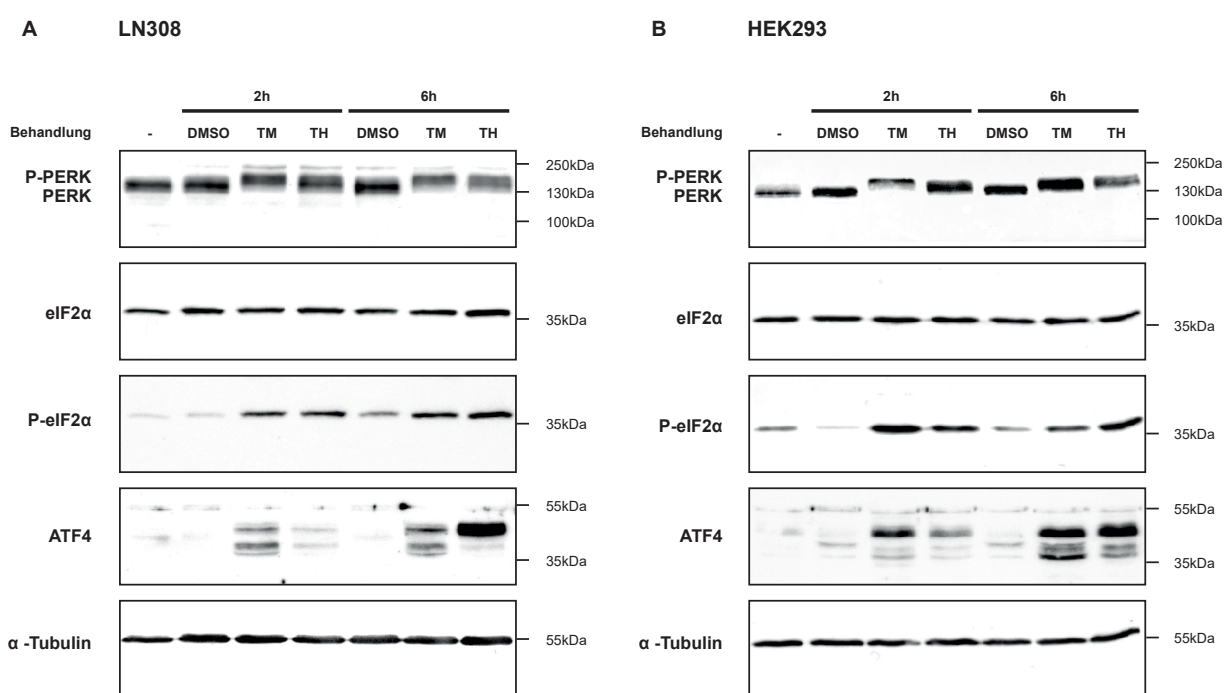


Abbildung 3.4: Aktivierung der UPR durch TM oder TH nach 2 oder 6 h in LN308 und HEK293.

Unbehandelte, für 2 oder 6 h mit 2,5 µg/ml TM bzw. 200 nM TH behandelte LN308- (A) oder HEK293-Zellen (B) wurden mittels Western Blot analysiert. Proteinkonzentrationen spezifischer UPR Komponenten (PERK, eIF2α und ATF4) wurden detektiert. α-Tubulin wurde als Ladekontrolle und DMSO als Kontrolle der Behandlung verwendet. Die Banden des molekularen Größenmarkers wurden auf der rechten Seite dargestellt.

Zur Überprüfung der Aktivierung der UPR wurden Western Blots der Lysate von Zellen parallel zu den Transkriptom- und Translatomproben generiert (Abb.3.4). Hierbei führt die Inkubation mit TM oder TH nach 2 sowie 6 h sowohl in LN308- wie auch HEK293-Zellen zu einer Phosphorylierung von PERK und dadurch zu einem erhöhten Spiegel an P-eIF2α. Darüber hinaus wurde die steigende Expression von ATF4 nach Induktion der UPR nachgewiesen (Abb.3.4). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die UPR durch Inkubation mit TM und TH zu beiden Zeitpunkten sowohl in LN308 als auch HEK293 aktiviert wurde und die Multi-Omics-Datensätze sich zum Vergleich ungestresster und ER gestresster Zellen eignen.

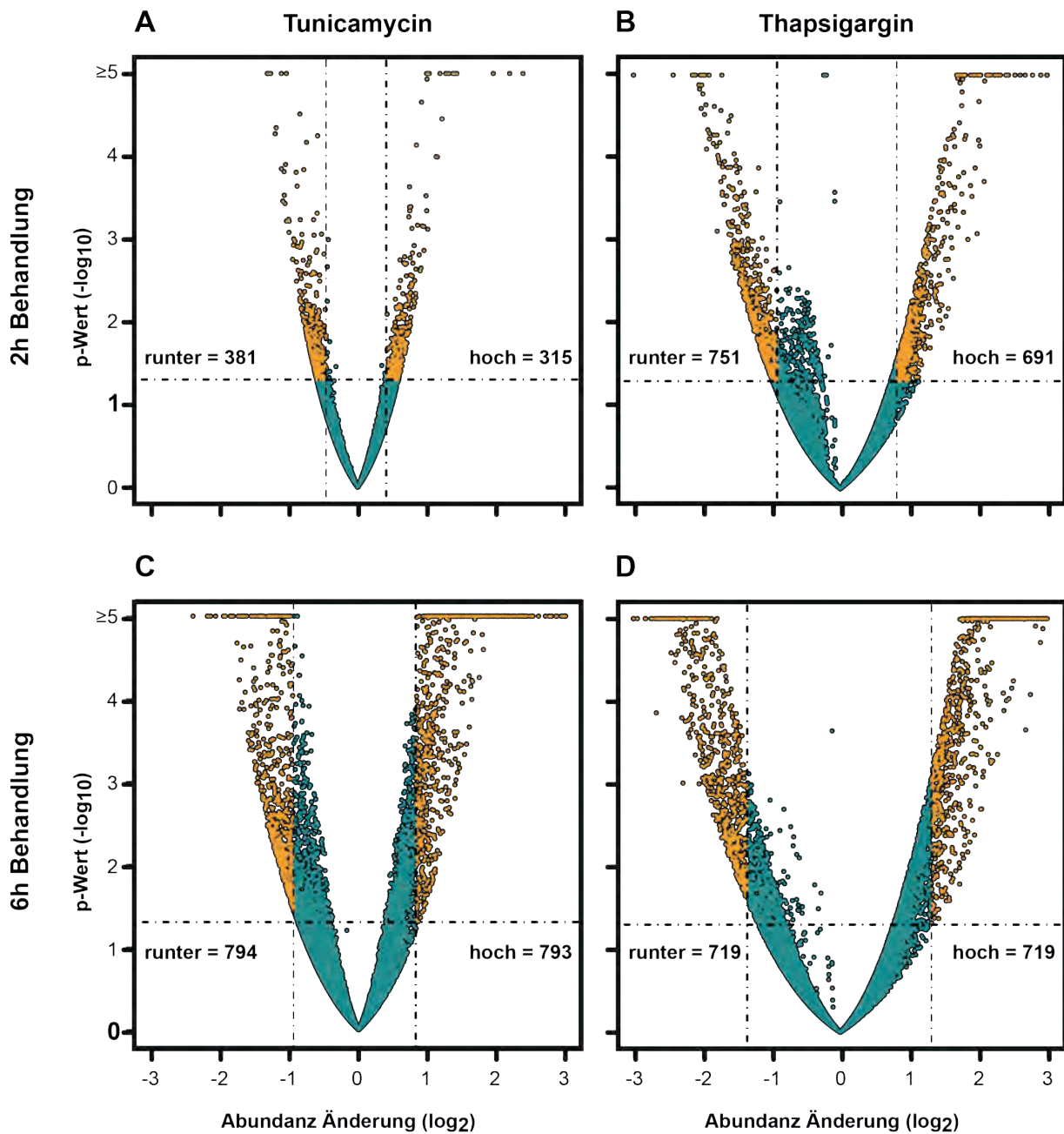


Abbildung 3.5: Die Auswertung der mRNA Abundanzänderungen enthüllt die Adaption an ER Stress in LN308-Zellen. LN308-Zellen wurden entweder für 2 (A+B) oder 6 h (C+D) mit 2,5 µg/ml TM oder 200 nM TH inkubiert und die mRNAs im Vergleich zu unbehandelten Zellen analysiert. Signifikant hoch- bzw herunterregulierte mRNAs sind in gelb markiert, nicht regulierte mRNAs in blau. Die Anzahl regulierter Transkripte ist angegeben.

3.2.2. Transkriptionelle Reprogrammierung durch die UPR

Nach dem Beweis der Induktion der UPR wurden die RNA Expression und das Ribosome Profiling (siehe 3.2.3) der LN308- und der HEK293-Zellen per Hochdurchsatz-Sequenzierung analysiert. Bei der RNA-Seq detektierten wir jeweils knapp 14.000 einzelne mRNAs und beobachteten so signifikante Adaptionen an ER Stress durch die Inkubation mit TM oder TH (Abb.3.5). Darunter befanden sich auch wenig abundante und damit kaum exprimierte mRNAs mit einer sehr geringen Anzahl an Reads.

Bei zweistündiger Inkubation der LN308-Zellen mit TM fanden wir 315 mRNAs signifikant hoch- und 381 signifikant herunterregulierte (Abb.3.5 A). Nach 6 h waren 793 mRNAs hoch- und 794 herunterregulierte detektierbar (Abb.3.5 C). Im Gegensatz dazu wurde bei der Behandlung mit TH bereits nach 2 h eine deutliche Transkriptionsantwort gemessen (691 mRNAs hochreguliert und 751 herunterreguliert; Abb.3.5 B). Diese Veränderungen waren auch nach 6 h konstant (719 mRNAs hoch-, 719 herunterreguliert; Abb.3.5 D).

Im nächsten Schritt analysierten wir die regulierten Transkripte auf zwei verschiedene Arten: Zum einen verglichen wir die zeitliche Anpassung der Zellen zwischen 2 und 6 h einer Substanz, zum anderen untersuchten wir die substanzabhängigen Wirkungen von TM und TH der Zeitpunkte (Abb.3.6). Bei der Behandlung mit TM sind nur wenige mRNAs zu beiden Zeitpunkten gemeinsam reguliert (110 mRNAs hoch-, 171 herunterreguliert). Dies weist auf eine dynamische Antwort der UPR auf die Exposition mit TM hin.

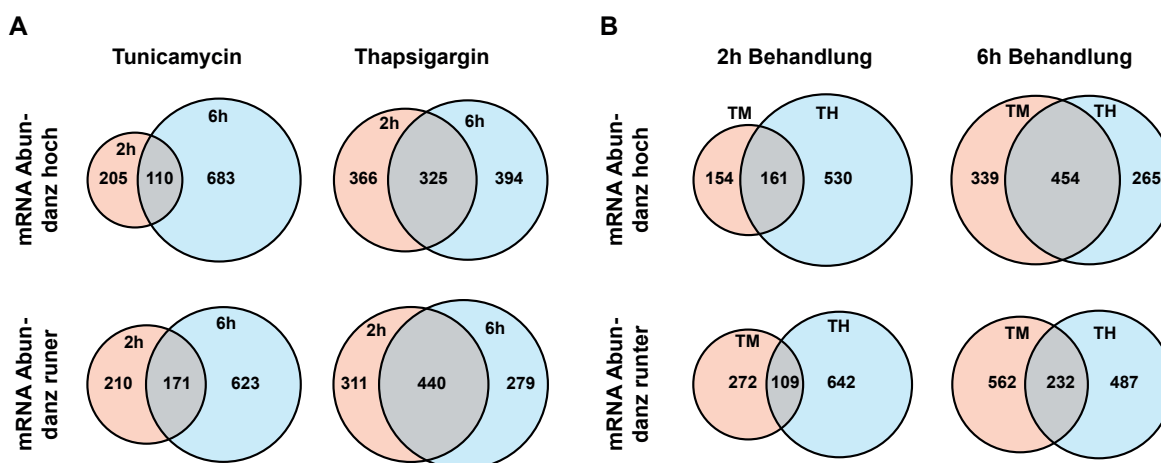


Abbildung 3.6: LN308-Zellen zeigen eine zeit- und eine substanzabhängige Anpassung der Transkription an ER Stress. Venn-Diagramm Darstellung der signifikant regulierten mRNAs aus LN308-Zellen, die entweder für 2 oder 6 h mit 2,5 µg/ml TM oder 200 nM TH inkubiert wurden. Die Diagramme zeigen die zeitliche Regulation einer Substanz (A) oder die Regulation beider Substanzen zum gleichen Zeitpunkt (B).

Bei der Behandlung mit TH konnten wir eine deutlich größere Überschneidung der regulierten Transkripte nachweisen. Hierbei überlappen knapp 50% der Transkripte sowohl nach 2 als auch nach 6 h Behandlung und sind gemeinsam hochreguliert (insgesamt 326 mRNAs zu beiden Zeitpunkten). Noch deutlicher wird dies bei negativ regulierten mRNAs (440 mRNAs gemeinsam zu beiden Zeitpunkten herunterreguliert). Somit konnten wir bei der Behandlung mit TH sowohl nach 2 h als auch nach 6 h mehr Transkripte gemeinsam reguliert identifizieren als exklusiv zu den einzelnen Zeitpunkten (Abb.3.6 A).

Durch die zeitlich angepasste RNA-Expression der UPR nach Inkubation beider Substanzen korrelierten wir zusätzlich die logarithmischen Veränderungen (\log_2FC) der RNA Abundanz nach 2 und 6 h. Durch die kleine Menge gemeinsam regulierter Gene detektierten wir bei in TM inkubierten LN308 nur ein geringes Bestimmtheitsmaß ($R^2=0,32$; Abb.3.7 A). Die Veränderungen nach Inkubation in TH korrelierten dagegen deutlich besser ($R^2=0,71$; Abb.3.7 B).

Zeitlich nahezu unabhängig von der Art des Stimulus werden nach Aktivierung der UPR spezifische Ereignisse zur Bewältigung von ER Stress reguliert. Diese Abfolge wird vor allem durch die Eigenschaften der regulatorischen Enzyme und durch die Kinetik der Genexpression vermittelt. Die substanzunabhängige Kinetik der stressinduzierten Antwort der UPR auf TM und TH zeigten wir bereits in Teilen (Abb.3.1 und Abb.3.4). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise rufen TM und TH neben ER Stress allerdings noch verschiedene Nebenwirkungen hervor, die nicht mit der UPR assoziierten Effekten entsprechen. Daher analysierten wir zu beiden Zeitpunkten die gemeinsam regulierten Gene nach Inkubation mit TM oder TH (Abb.3.6 B und 3.8). Im Vergleich mit der zeitabhängigen Anpassung an ER Stress (Abb.3.6 A) zeigten wir eine deutlich höhere Koregulation der mRNAs bei der substanzabhängigen Analyse (Abb.3.6 B). Nach 2 h konnten wir 161 (mithin etwa 51% der durch TM regulierten mRNAs) und nach 6 h 454 gemeinsam hochregulierte Transkripte detektieren. Dies entspricht 57% (bei Inkubation mit TM) und 63% (bei Inkubation mit TH) der mRNAs der LN308-Zellen. Deutlich weniger mRNAs sind gemeinsam herunterreguliert (109 nach 2 h, 232 nach 6 h; Abb.3.6 B).

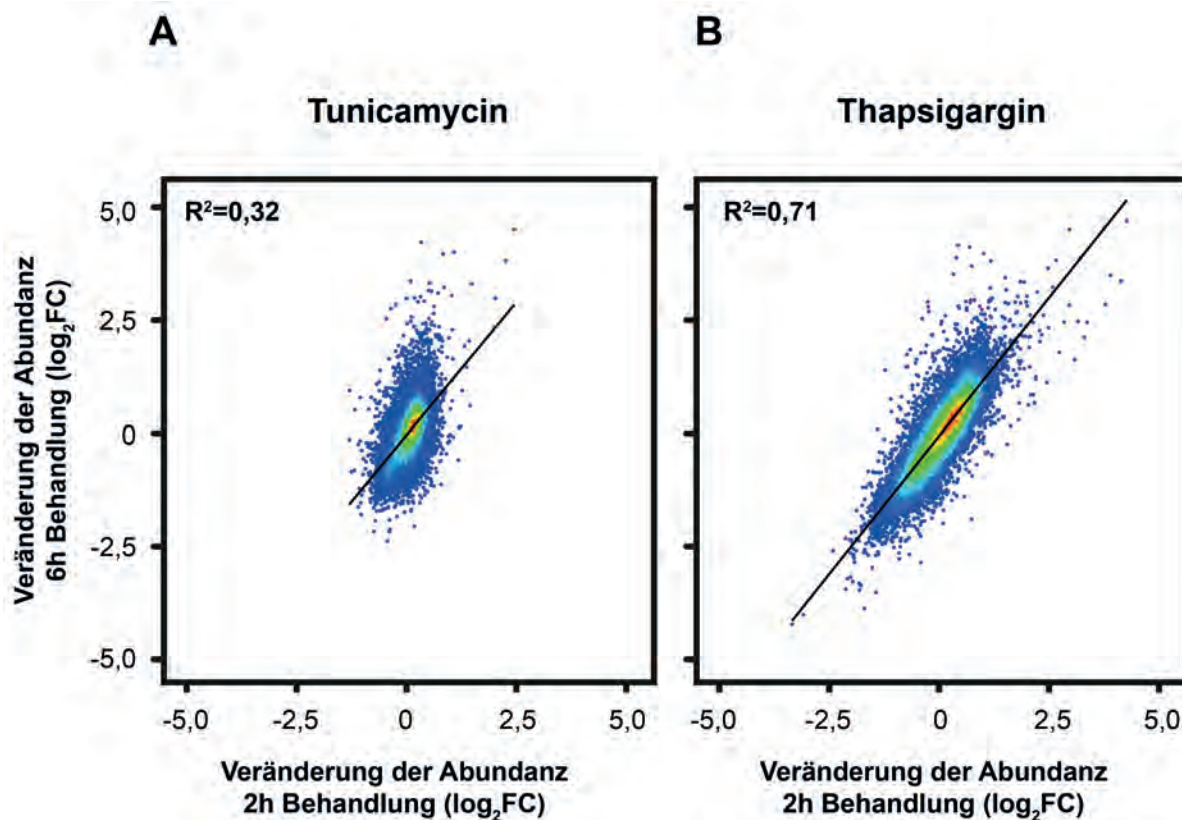


Abbildung 3.7: Scatter Plots zeigen die transkriptionelle Veränderung der Genexpression durch die UPR über zwei Zeitpunkte.

Vergleich der Veränderungen (logarithmisch dargestellt; \log_2FC) durch die Induktion der UPR in LN308-Zellen nach Inkubation mit TM oder TH über 2 oder 6 h. Die Scatter Plot Darstellung vergleicht die Anpassung durch die UPR durch TM (A) oder TH (B).

Allerdings wiesen die \log_2FC -Werte der Transkriptionsänderungen nach Inkubation mit TM oder TH noch immer eine relativ geringe Korrelation auf ($R^2=0,46$ nach 2, $R^2=0,58$ nach 6 h; Abb.3.8). Dies beruht auf den verschiedenen Wirkmechanismen beider Substanzen und zeigt, dass TM und TH unterschiedliche und nur teilweise überlappende zelluläre Signalwege auslösen. Jedoch waren viele Transkripte, deren Proteine in der UPR involviert sind, nach Inkubation mit einem oder beiden Stimuli signifikant hochreguliert (Abb.3.8; in rot markiert). Darunter identifizierten wir auch die wichtigsten Signalproteine der UPR in mindestens einem Datensatz. Nach 2 h weisen wir bereits BiP (HSPA5), XBP1 (als Ziel der Genexpression durch ATF6), das Transmembranprotein PERK (EIF2AK3) und, als Antwort der Aktivierung von PERK und der Phosphorylierung von eIF2 α , sowohl ATF4 als auch CHOP (DDIT3) in mit TM und TH inkubierten Zellen nach (Abb.3.8 A; mit Pfeilen hervorgehoben). Zusätzlich finden wir nach 6 h Behandlung noch die Transmembranproteine IRE1 α (ERN1) und ATF6 in mit TM inkubierten Proben (Abb.3.8 B).

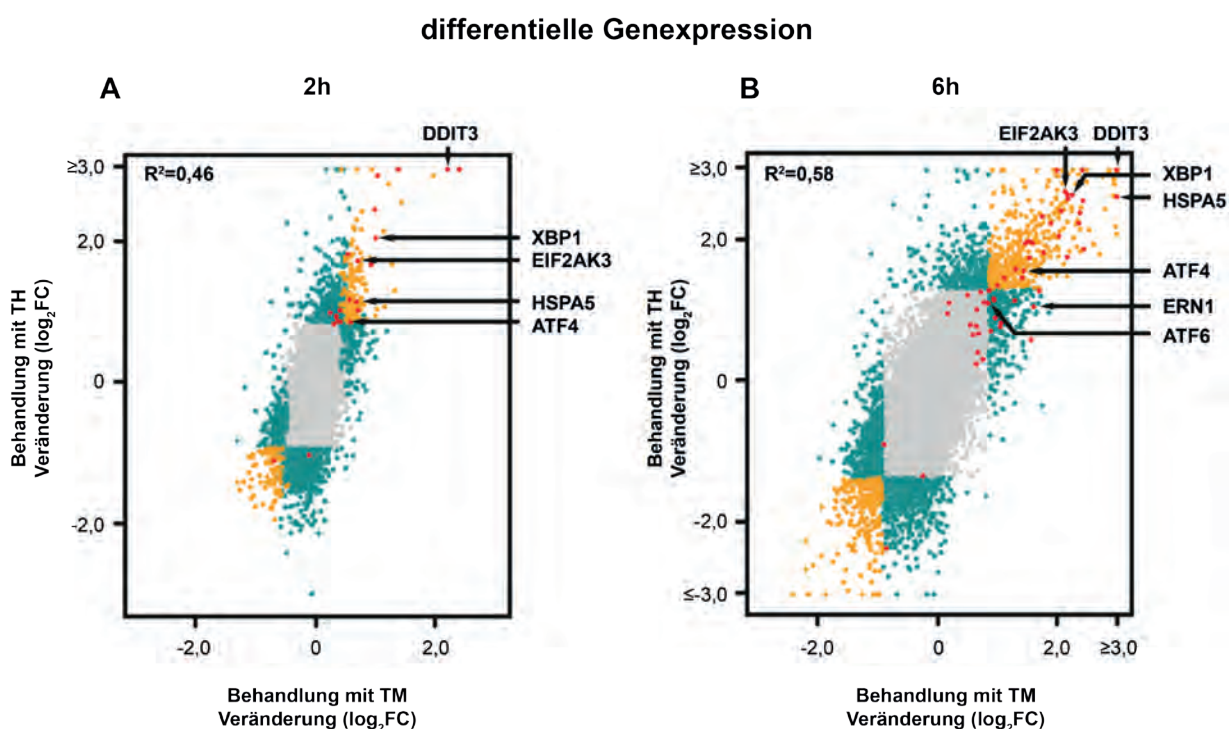


Abbildung 3.8: Scatter Plot der Transkriptionsänderungen nach UPR Induktion.

Vergleich der Veränderungen (logarithmisch dargestellt; \log_2FC) der mRNA Abundanz von Protein codierenden Genen von LN308-Zellen nach Behandlung mit TM oder TH für 2 (A) oder 6 h (B). Farbliche Darstellungsweise - grau: in beiden Behandlungen (TM oder TH) nicht signifikant verändert, grün: bei nur einem Stimulus signifikant hoch- oder herunterreguliert oder durch TM und TH gegenläufig reguliert, gelb: durch beide Stimuli statistisch signifikant gleichgerichtet reguliert, rot: bekannte Komponenten der UPR, spezifische UPR Komponenten sind für die genauere Beschreibung durch Pfeile markiert.

Für eine umfassendere Analyse der erhaltenen Daten prüften wir im Anschluss eine mögliche Anreicherung von biologischen Prozessen der signifikant hoch regulierten Transkripte nach 2 h mittels Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000). Wir untersuchten die einzelnen Datensätze bei Inkubation mit TM oder mit TH und analysierten zusätzlich die koregulierten Gene. Bei der individuellen Analyse mit TM oder TH behandelten LN308-Zellen detektierten wir eine Anreicherung der GO-Terms „PERK-mediated unfolded protein response“ (GO:36499; TM: ~44fache Anreicherung,

p-Wert: $2,17 \times 10^{-6}$; TH: $\sim 17,5$ fach, p-Wert: $1,1 \times 10^{-2}$) und „Regulation of response to ER stress“ (GO:1900101; TM: ~ 8 fach, p-Wert: $1,15 \times 10^{-2}$; TH: ~ 6 fach; p-Wert: $1,72 \times 10^{-4}$; Abb.3.9). Indem wir nur die von TM und TH gemeinsam regulierten Transkripte betrachteten filterten wir die Analyse stringenter und steigerten die GO-Term Anreicherung noch weiter (GO:36499: ~ 75 fach; GO:1900101: ~ 14 fach). Ähnliche Ergebnisse erhielten wir bei der Analyse der RNA-Seq Ergebnisse nach 6 h Inkubation. Nach Inkubation mit TM oder TH wurden durch die Betrachtung von koregulierten Genen falsch positive oder nicht mit der UPR assoziierte Ergebnisse minimiert und eine Anreicherung von UPR-bedingten Veränderungen erzielt.

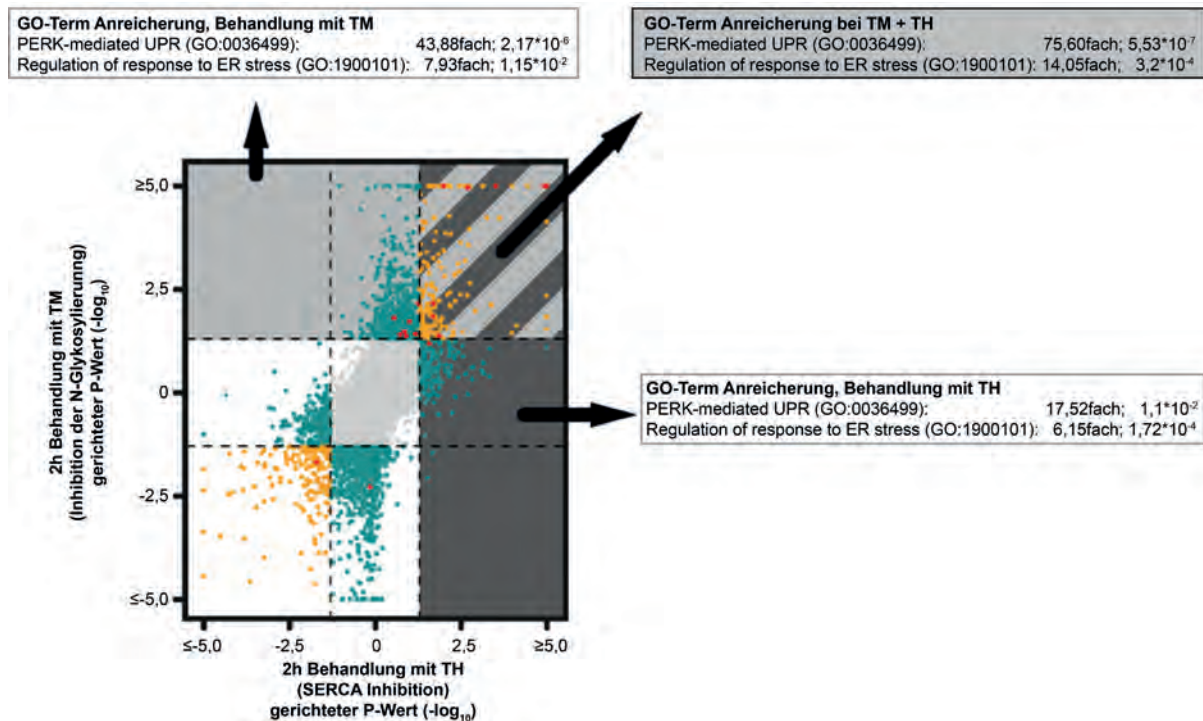


Abbildung 3.9: Die RNA Expression der signifikant hochregulierten Transkripte nach Inkubation mit TM oder TH zeigt eine Anreicherung von Komponenten der UPR.

Vergleich der gerichteten p-Werte ($-\log_{10}$) der RNA Expression von Protein codierenden Genen zwischen mit TM oder mit TH über 2 h inkubierten LN308-Zellen. Die Werte der Anreicherung und p-Werte für die GO-Terms „PERK-mediated UPR“ (GO:0036499) und „Regulation of response to ER stress“ (GO:1900101) sind für TM (hellgrau), für TH (dunkelgrau) sowie für die Koregulation unter dem Einfluss beider Substanzen (gestrichelter Bereich) angegeben.

3.2.3. Herstellung von Ribosome Profiling Libraries

Neben Änderungen der Transkription bewirkt die UPR auch eine Anpassung der Translation an ER Stress. Die Phosphorylierung von eIF2 α durch PERK führt zu einer Hemmung der Translationsinitiation der meisten mRNAs. Jedoch gibt es auch vermehrt oder ausschließlich unter Stressbedingungen translatierte Transkripte. Diese gegenüber P-eIF2 α resistenten Transkripte besitzen in der Regel in ihrer 5'UTR upstream open reading frames (uORFs) (Pavitt and Ron, 2012, Andreev et al., 2015). Das bekannteste Beispiel hierfür ist das durch einen Reinitiationsmechanismus unter Stress translatierte ATF4 (Vattem and Wek, 2004).

Zur Detektion der Translationsänderungen durch die UPR wandten wir die Methode des Ribosome Profiling (RiboProf) an. Dieses Verfahren ermöglicht eine genomweite, quantitative Untersuchung der Translation indem ein globaler Schnappschuss aktiv translatierter, Ribosom-gebundener mRNA-Fragmente erstellt wird (Ingolia et al., 2009, Ingolia et al., 2012). Durch einen Nukleaseverdau werden hierbei durch Ribosomen geschützte mRNA-Fragmente (ribosome protected fragments [RPFs]) generiert, welche die exakte Position von Ribosomen auf Transkripten darstellen. Die RPFs können in eine DNA Library umgewandelt und per Hochdurchsatzsequenzierung analysiert werden.

Unsere RiboProf Daten wurden parallel zu den RNA-Seq Daten generiert. Die Aktivierung der UPR unter unseren Versuchsbedingungen wurde bereits in Kapitel 3.2.1. gezeigt.

Für die Herstellung von RiboProf Libraries wurden zunächst Lysate von Zellen mit Nuklease (RNase I) verdaut und anschließend mittels Sucrose Gradienten aufgereinigt.

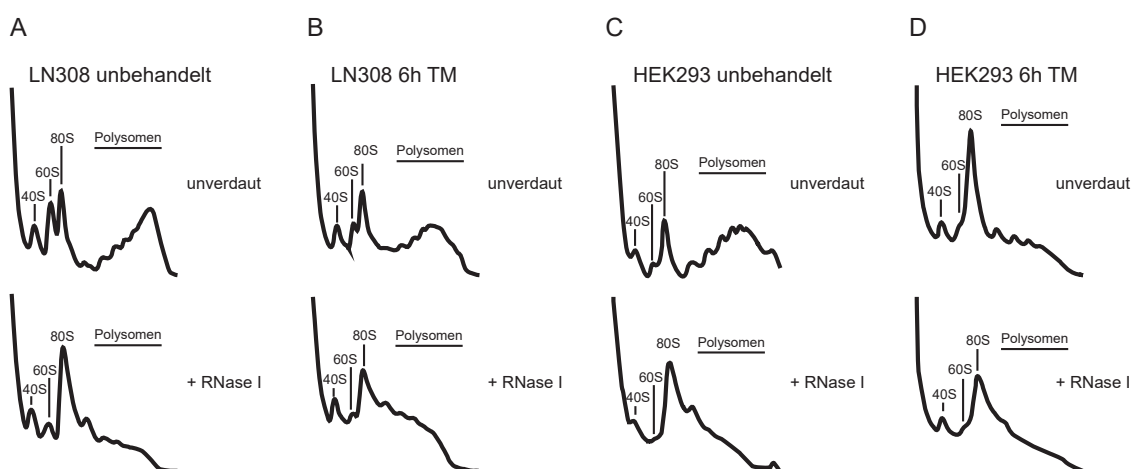


Abbildung 3.10: Repräsentative Sucrose Gradienten von LN308 und HEK293 zur Auftrennung von 80S-Monosomen für das Ribosome Profiling.

Unbehandelte oder über 6 h mit TM stimulierte LN308- (A+B) oder HEK293- (C+D) Zellen wurden lysiert und unverdaut (obere Zeile) oder nach RNase I Verdau (untere Zeile) auf 10-50% Sucrose Gradienten aufgetrennt. Abgebildet ist das A254nm Profil der Gradienten. Die verdauten 80S Fraktionen wurden für die Präparation von RiboProf Libraries gesammelt.

Durch den Verdau der mRNA durch RNase I werden die Polysomen abgebaut und nur die RPFs der mRNA bleiben intakt. Die vereinzelt Ribosomen verschieben sich in die 80S Fraktion (Abb.3.10). Wir wiesen nach Inkubation mit TM eine verringerte Anzahl von Polysomen nach. Dies deutet auf eine veränderte und gehemmte Translation hin (Abb.3.10, Vergleich A und B oder C und D, jeweils oberste Zeile).

Aus den verdauten 80S-Fraktionen wurden Ribosome Profiling Libraries erstellt. Ein Beispiel für die einzelnen Schritte bei der Präparation einer RiboProf Library ist in Abb.3.11 dargestellt.

Im ersten Schritt extrahierten wir die RPFs, die eine Größe von etwa 30nt haben, mittels Urea Polyacrylamid Gelelektrophorese (Urea-PAGE; Abb.3.11 A). Durch Ligation eines Linkers an die RPFs konnten wir die RNA im darauffolgenden Schritt durch Reverse Transkription (RT) in cDNA umschrei-

ben (Abb.3.11 B+C). Vor der für die PCR Amplifikation der RiboProf Libraries benötigten Zirkularisation wurde die rRNA mittels Antisense-Oligos depletiert. Nach PCR Amplifikation (Abb.3.11 D) wurden die RiboProf Libraries per TapeStation überprüft (Abb.3.11 E) und daraufhin per Hochdurchsatzsequenzierung analysiert.

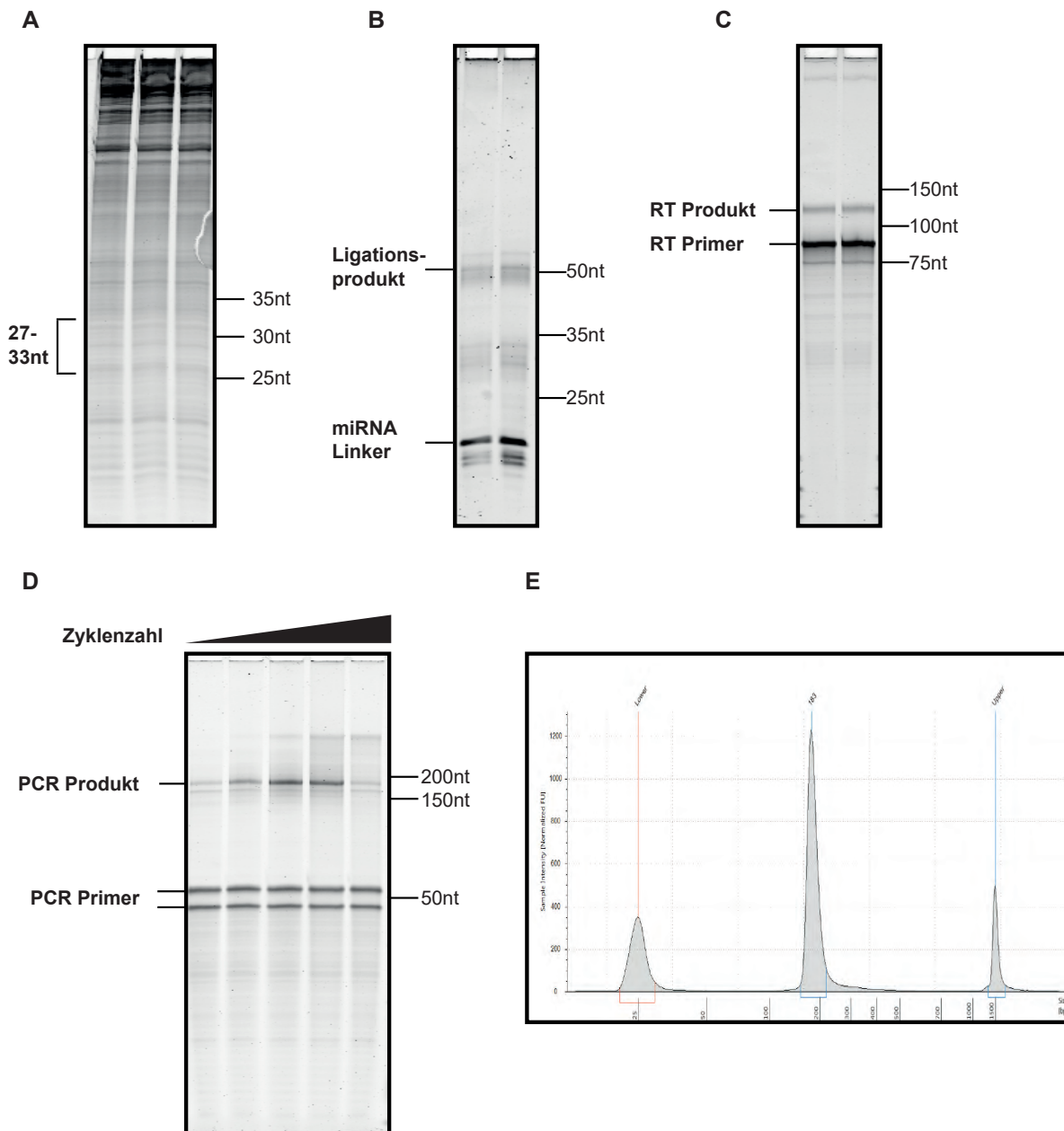


Abbildung 3.11: Herstellung einer repräsentativen RiboProf Library.

Nach Aufreinigung der RNA aus 80S-Monosomen wurden die RPFs anhand der Größe in Polyacrylamid (PAA) Urea Gelen extrahiert (A), mit einem RNA Linker ligiert (B) und in cDNA umgewandelt (C). Nach PCR Amplifikation (D) wurde die Größe und Reinheit mittels TapeStation analysiert (E). Abgebildet ist die Präparation einer RiboProf Library aus unbehandelten LN308-Zellen.

3.2.4. Detektion der Änderungen der UPR anhand von Ribosome Profiling

Ähnlich wie bei der RNA-Seq Analyse untersuchten wir bei RiboProf Experimenten signifikant hoch- bzw. herunterregulierte RPFs als Äquivalente zu aktiv translaterter mRNA. Die Veränderungen von RPFs von Protein codierenden Transkripten können entweder durch Änderungen der Abundanz von mRNAs oder durch eine veränderte Translationsrate hervorgerufen werden. Zur Berechnung der Translationseffizienz einzelner Transkripte wird die Abundanz der RPFs mit der der mRNA aus der RNA-Seq Analyse normalisiert (siehe 3.2.5.).

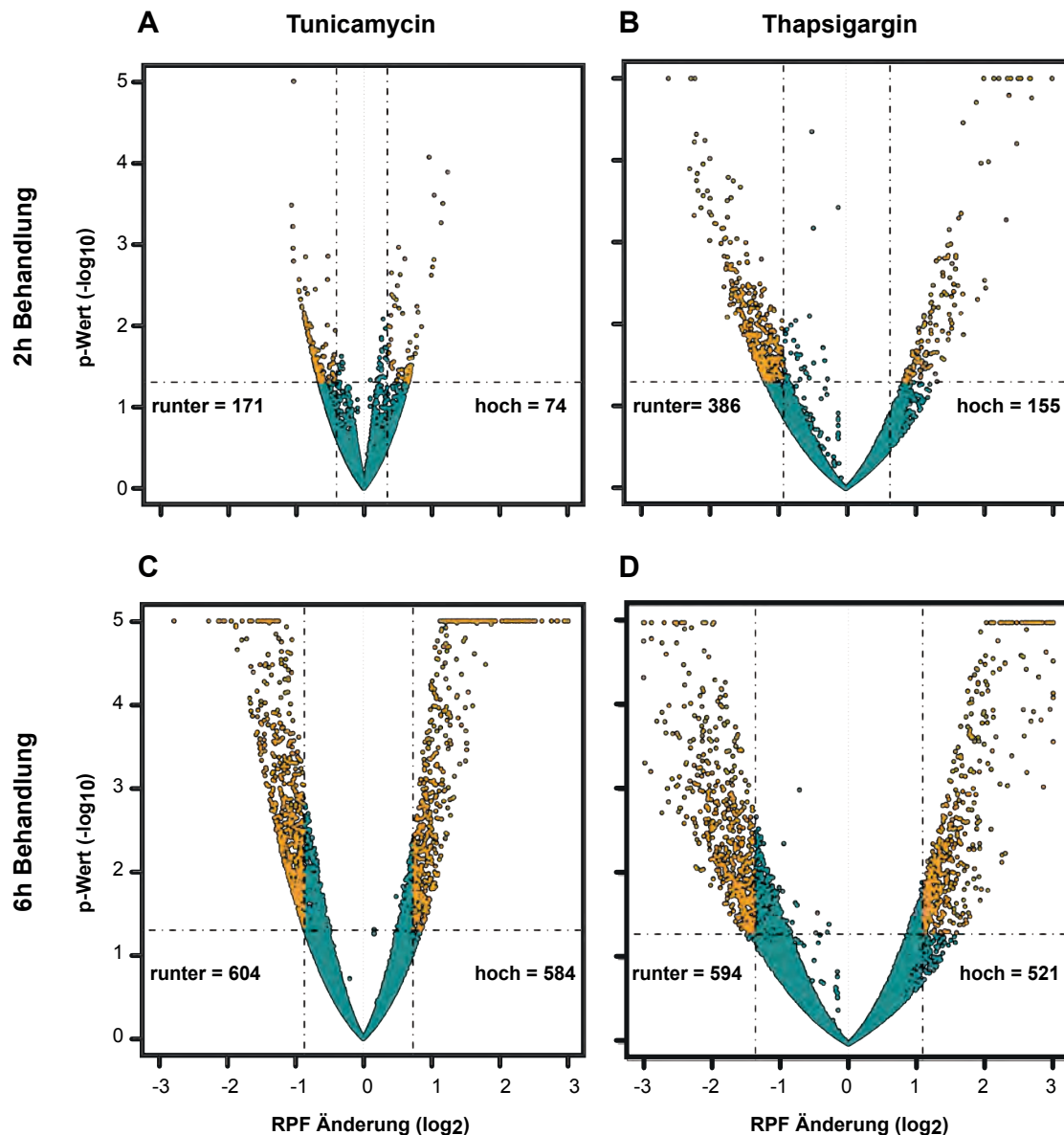


Abbildung 3.12: Änderungen der RPF Abundanz nach Induktion der UPR in LN308-Zellen.

Volcano-Plot-Darstellung von LN308-Zellen, die entweder für 2 (A+B) oder für 6 h (C+D) in 2,5 µg/ml TM oder in 200 nM TH inkubiert wurden. Die durch Ribosomen vor dem Abbau geschützten mRNA Fragmente (RPFs) wurden mittels Ribosome Profiling analysiert und mit denen unbehandelter Zellen verglichen. Signifikant hoch- bzw herunterregulierte mRNAs sind in gelb markiert, nicht regulierte mRNAs in blau. Die Anzahl regulierter Transkripte nach Behandlung ist in jedem Plot angegeben.

Hierbei erkannten wir nach zweistündiger Inkubation mit TM oder TH deutlich mehr herunterregulierte (171 bei TM, 386 bei TH) als hochregulierte RPFs (74 bei TM, 155 bei TH; Abb.3.12 A+B). Erklärt wird dies durch die Inhibition der Translation über die Phosphorylierung von eIF2 α nach Aktivierung von PERK (Harding et al., 2000b). Im Vergleich zu TM (wie bei den RNA-Seq Daten) ist nach zweistündiger Inkubation mit TH eine deutlich stärkere Regulation erkennbar. Nach 6 h Behandlung ergibt die Analyse der RiboProf Daten hingegen eine ähnliche Anzahl hoch- und herunterregulierter RPFs (TM: 604 hoch-, 584 herunterreguliert; TH: 594 hoch-, 521 herunterreguliert; Abb.3.12 C+D).

Um die zeitliche Anpassung der Zellen an ER Stress und die Wirkmechanismen von TM und TH im Hinblick auf die RiboProf Ergebnisse zu überprüfen verglichen wir (ähnlich wie bei den RNA-Seq Daten) die zu beiden Zeitpunkten signifikant regulierten RPFs. Bei Inkubation mit TM sind nur wenige RPFs gemeinsam reguliert, vor allem die Überschneidung hochregulierter Transkripte ist sehr gering (11 hoch-, 76 herunterreguliert). Bei in TH inkubierten Zellen ist eine nur etwas größere Koregulation erkennbar (90 hoch-, 157 herunterreguliert; Abb.3.13 A).

Wir ermittelten durch die niedrige gemeinsame Regulation auch eine sehr geringe Korrelation zwischen den beiden Zeitpunkten ($R^2=0,16$ für TM; $R^2=0,32$ für TH; Abb.3.14). Hierdurch wird die zeitliche Abfolge der Translationshemmung und der anschließenden Induktion der Expression spezifischer UPR-Zielgene deutlich.

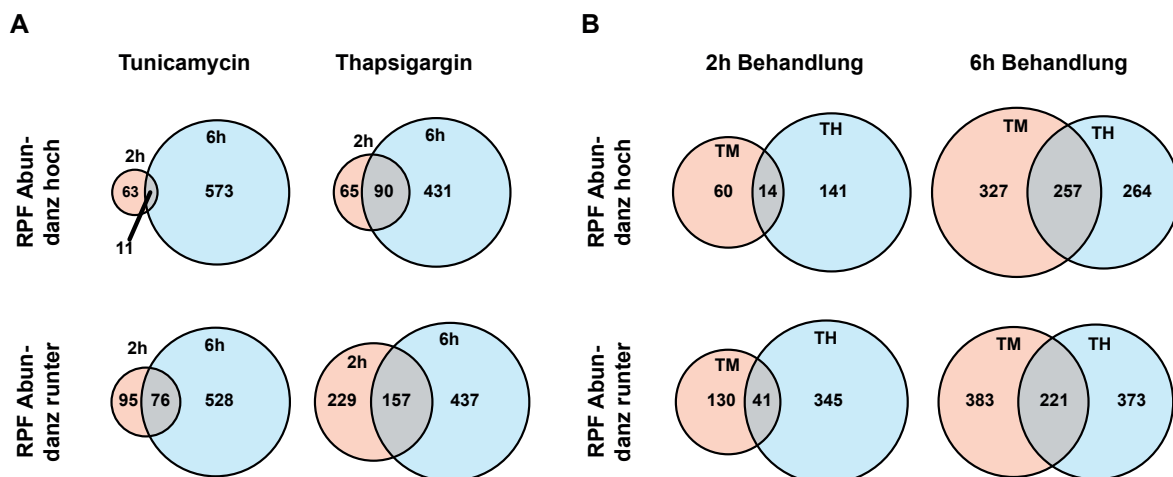


Abbildung 3.13: Die Behandlung von LN308-Zellen zeigt eine zeit- und substanzabhängige Anpassung der Translation an ER Stress.

Venn-Diagramm Darstellung der signifikant regulierten RPFs aus LN308-Zellen, die entweder für 2 oder 6 h mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TM bzw. 200nM TH behandelt wurden. Die Diagramme zeigen die zeitliche Regulation unter TM oder TH (A) sowie die Regulation beider Stimuli zum gleichen Zeitpunkt (B).

Darüber hinaus verglichen wir die Regulation der RPFs nach Inkubation in TM oder in TH. Ähnlich wie bei der transkriptionellen Regulation durch die UPR fanden wir bei der Analyse der RPFs nach 2 h eine sehr geringe Anzahl an gemeinsam regulierten Transkripten (14 hoch-, 41 herunterreguliert; Abb.3.13 B). Dies reflektiert erneut die verschiedenen Wirkmechanismen von TM und TH sowie die Unterschiede in der Zellantwort nach Inkubation mit diesen beiden Stimuli.

Nach 6 h konnten wir allerdings eine deutlich erhöhte Anzahl an koregulierten RPFs nachweisen (257 hoch-, 221 herunterreguliert; Abb.3.13 B).

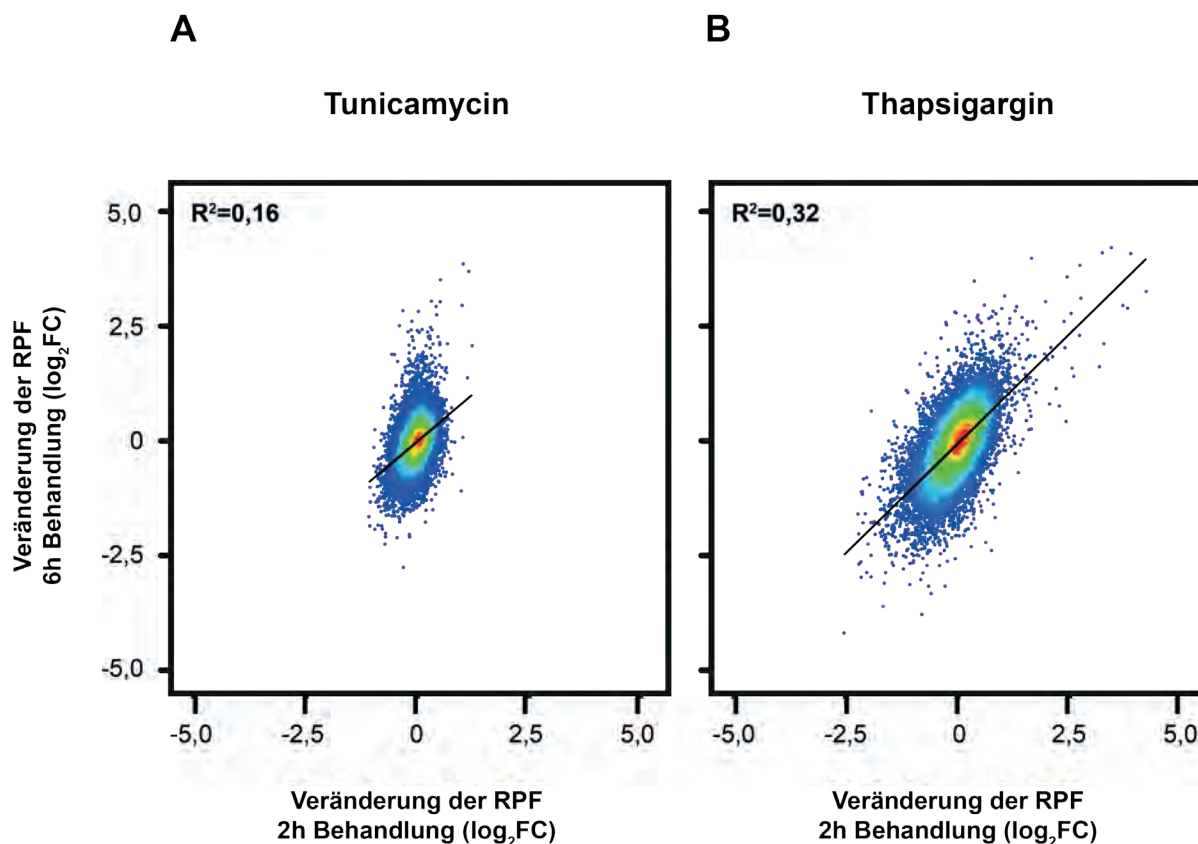


Abbildung 3.14: Scatter Plots zeigen die Änderungen der RPFs nach Induktion der UPR. Vergleich der Veränderungen (logarithmisch dargestellt; log₂FC) durch die Induktion der UPR in LN308-Zellen nach 2 oder 6 h. Die Scatter Plot Darstellung vergleicht die Anpassung durch die UPR zu den verschiedenen Zeitpunkten bei Inkubation mit TM (A) oder mit TH (B).

Ähnlich wie beim RNA-Sequencing analysierten wir die Veränderungen (in logarithmischer Darstellung [log₂FC]) der regulierten RPFs. Anschließend verglichen wir die Werte der über 2 oder 6 h in TM inkubierten Zellen mit den Veränderungen nach Inkubation in TH (Abb.3.15).

Nach 2 h konnten wir eine nur sehr geringe Korrelation beider Datensätze zeigen (R²=0,24; Abb.3.15 A). Diese erhöht sich nach 6 h Behandlungsdauer leicht (R²=0,42), belegt jedoch weiterhin die unterschiedlichen zellulären Antworten auf die Inkubation in TM oder TH (Abb.3.15 B).

Ribosomal geschützte Fragmente (RPF)

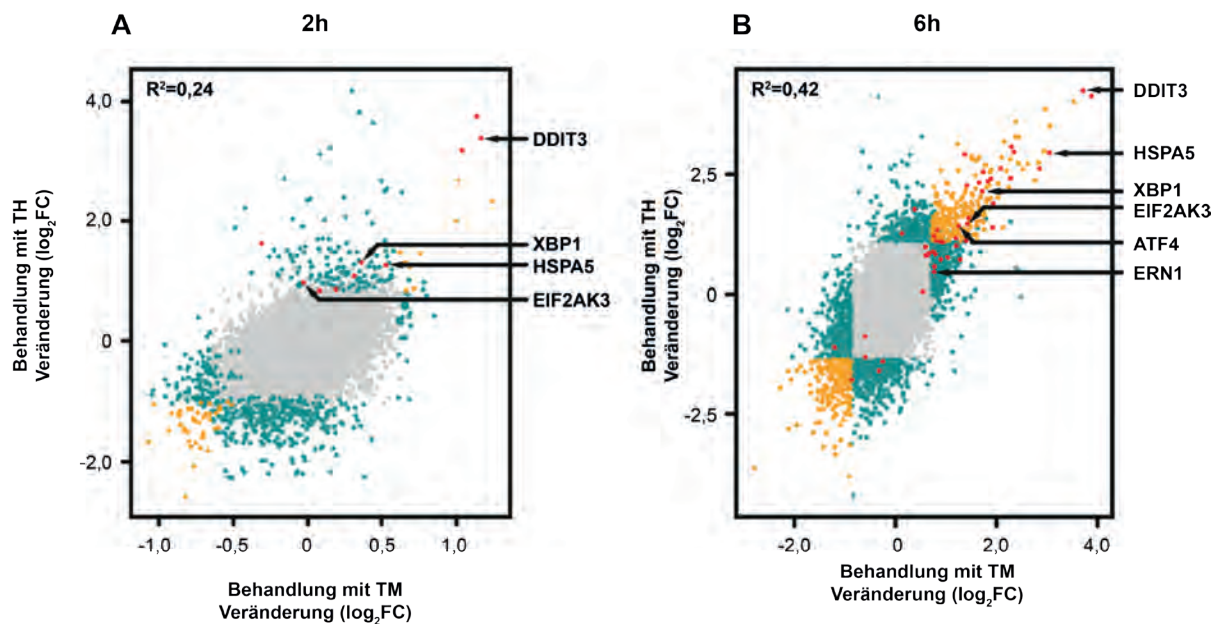


Abbildung 3.15: Scatter Plot der Abundanzänderungen von RPFs nach Induktion der UPR. Vergleich der Veränderungen (logarithmisch dargestellt; \log_2FC) der RPF Abundanzen von Protein codierenden Genen in LN308-Zellen nach Inkubation in TM oder TH für 2 (A) oder 6 h (B). Farbliche Darstellungsweise - grau: bei TM oder TH nicht signifikant verändert, grün: bei TM oder TH signifikant hoch- oder herunterreguliert, alternativ bei TM und TH gegenläufig reguliert, gelb: bei beiden Stimuli gleichläufig statistisch signifikant reguliert, rot: bekannte Komponenten der UPR, spezifische Komponenten sind für die genauere Beschreibung durch Pfeile markiert.

Durch unsere Analyse konnten wir erneut viele signifikant hochregulierte RPFs identifizieren, deren Proteine als Teil der UPR eine wichtige Rolle bei der Antwort auf ER Stress spielen. Nach 2 h fanden wir CHOP (DDIT3) als eines der 14 von TM und TH gemeinsam hochregulierten RPFs, welches als Teil der UPR sowohl auf Translations- als auch Transkriptionsebene reguliert wird (Pavitt and Ron, 2012, Yoshida et al., 2000). Nach 6 h Behandlung wiesen wir neben CHOP noch BiP (HSPA5), PERK (EIF2AK3), ATF4 und XBP1 als koreguliert nach. Diese Komponenten der UPR übermitteln wichtige Signalwege (Abb.3.15 B). IRE1 α (ERN1) als weiteres wichtiges Transmembranprotein der UPR war nach 6 h Inkubation in TM ebenfalls signifikant hochreguliert.

Zum Nachweis einer möglichen Anreicherung biologischer Signalwege unter den gemeinsam hochregulierten 257 RPFs nach 6 h Inkubation führten wir eine GO-Term Analyse durch. Die p-Werte ($-\log_{10}$) der zehn am meisten angereicherten Signalwege sind in Abb.3.16 dargestellt.

Durch die Betrachtung von gemeinsam hochregulierten RPFs nach Inkubation mit TM oder TH wurde eine Anreicherung von zellulären Prozessen erreicht, die mit der UPR bzw. der Antwort auf ER Stress assoziiert sind. Unter den am meisten angereicherten Signalwegen identifizierten wir „response to ER stress“ (GO:0034976), aber auch „ER unfolded protein response“ (GO:0030968) als generelle Antwort auf induzierten ER Stress und konnten auch Teile der UPR wie den „ERAD pathway“ (GO:0036503) nachweisen (Abb.3.16).

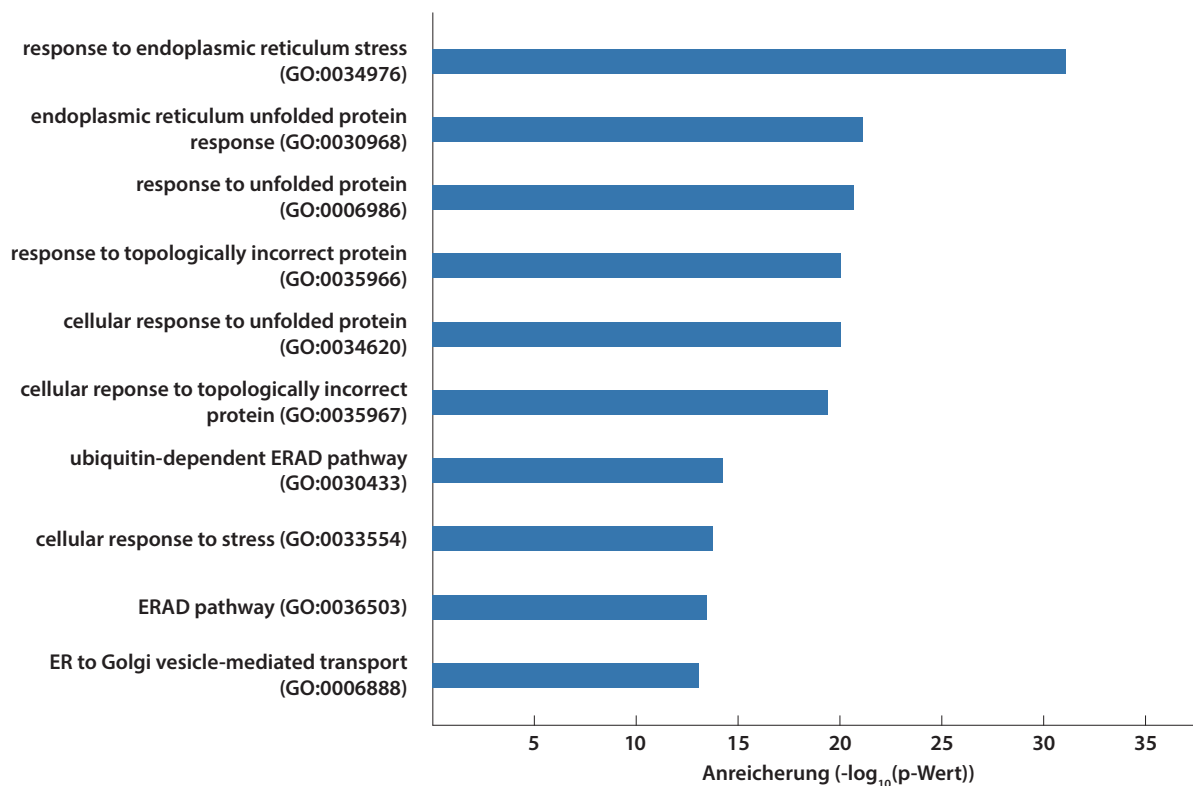


Abbildung 3.16: GO-Term Analyse der koregulierten RPFs nach Induktion der UPR.

Analyse der Anreicherung der 257 gemeinsam hochregulierten RPFs (aus 3.14) nach sechsstündiger Inkubation von LN308-Zellen in TM oder TH.

3.2.5. Umprogrammierung der Translation durch die UPR

Veränderungen der RPF Abundanzen nach RiboProf sind auf Änderungen der mRNA Abundanz, der Translation oder auf beide Mechanismen zurückzuführen. Um die tatsächlichen Änderungen der Translation durch die Induktion der UPR zu ermitteln, wurden die Daten aus dem Ribosome Profiling mit den RNA Abundanzen aus dem RNA-Seq verglichen. Hierbei detektierten wir eine geringe Korrelation ($R^2=0,12$) der logarithmischen Veränderungen der RNA Abundanzen und der RPFs nach 2 h Inkubation mit TM (Abb.3.17 A). Dies können verschiedene Mechanismen verursachen. Als erstes lässt sich vermuten, dass die Regulation der Transkription und Translation unterschiedliche Gene bzw. Transkripte als frühe Antwort auf ER Stress beeinflussen. Darüber hinaus kann bei einer kurzen Induktion die Translationskontrolle der UPR gegenüber der Transkription dominieren. Auch ein blockierter Export der RNA aus dem Zellkern kann hierbei eine wichtige Rolle spielen.

Im Gegensatz dazu konnten wir eine deutlich höhere Korrelation ($R^2=0,70$) der Veränderungen (in logarithmischer Darstellung [\log_2 FC]) der RNA Abundanzen und der RPFs nach 6 h Inkubation mit TM beobachten (Abb.3.17 B). Dies deutet darauf hin, dass die Anpassungen durch die UPR an ER Stress zu diesem späteren Zeitpunkt vor allem durch eine veränderte Genexpression und nicht durch eine selektive Translation bestimmt wird.

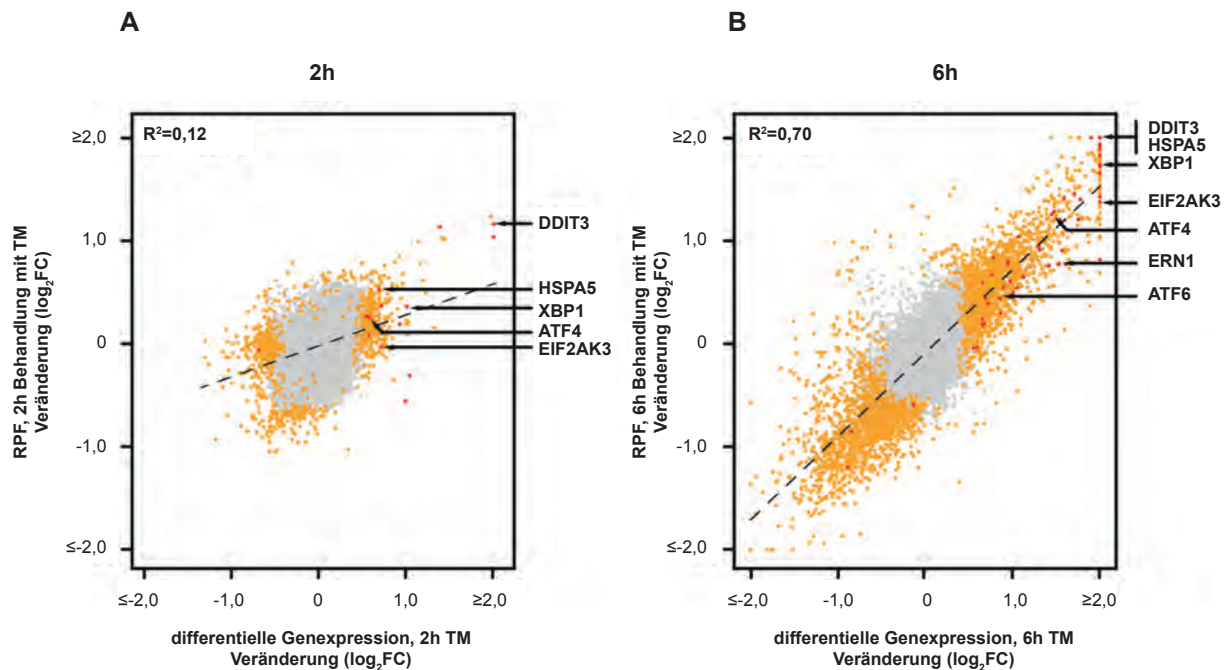


Abbildung 3.17: Globale Analyse der UPR-vermittelten translationalen Regulation.

Vergleich der Veränderungen (logarithmisch dargestellt; log₂FC) nach RNA-Seq und RiboProf nach Inkubation von LN308-Zellen mit TM für 2 (A) oder 6 h (B). Signifikant veränderte mRNAs (gelb) und nicht signifikant veränderte mRNAs (grau) sind farblich getrennt dargestellt. Bekannte UPR Komponenten wurden in rot markiert.

Um einen genaueren Hinweis auf einzelne, auf Translationsebene regulierte mRNAs zu erhalten, normalisierten wir im nächsten Schritt die RPF Abundanz mit der RNA Abundanz. Durch diesen Wert der ribosomalen Beladung berechneten wir die annäherungsweise mRNA Translationseffizienz für die einzelnen Transkripte, die ribosomale Beladung (Ingolia et al., 2009). Dieser Wert kann auf eine translationale Regulation hinweisen. Veränderungen in der ribosomalen Beladung können aber auch auf eine Blockade der Translationselongation der mRNA hindeuten. Aufgrund großer Schwankungen für niedrig abundante RNAs setzten wir in unserem Datensatz einen Grenzwert.

Durch Induktion der UPR für 2 h (Abb.3.18 A) oder 6 h (Abb.3.18 B) stellten wir eine generelle Abnahme der ribosomalen Beladung fest. Dies wird durch die PERK-vermittelte Phosphorylierung von eIF2 α an Serin 51 vermittelt. Bei nur wenigen Transkripten detektierten wir eine signifikante Zunahme der ribosomalen Beladung nach der UPR Induktion und damit eine Translationsresistenz gegenüber der Phosphorylierung von eIF2 α nach Inkubation mit TM. Dies sehen wir für GLIS3 (GLI-Similar 3), welches nach 6 h Inkubation eine stark erhöhte ribosomale Beladung aufweist (Abb.3.18 B). Dies wurde schon für die durch Natriumarsenite induzierte Phosphorylierung von eIF2 α durch HRI (Heme-Regulated Inhibitor, auch EIF2AK1, Kinase von eIF2 α unter verschiedenen Arten von Stress, zum Beispiel Häm-Mangel) gezeigt (Andreev et al., 2015). Darüber hinaus konnten wir auch mRNAs identifizieren, welche nach Phosphorylierung von eIF2 α eine unterdurchschnittliche Menge der ribosomalen Beladung aufweisen. Beispiele hierfür sind BLID (BH3-Like Motif Containing, Cell Death Inducer) oder ZNF20 (Zinc Finger Protein 20; Abb.3.18).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Unterschiede der RPFs durch Inkubation mit TM über 2 als auch über 6 h überwiegend durch transkriptionelle Regulation oder veränderte Gleichge-

wichtszustände der RNA bedingt sind. Allerdings scheinen einige mRNAs resistent oder hypersensibel gegenüber der Phosphorylierung von eIF2 α zu sein und damit einer translationalen Regulation zu unterliegen.

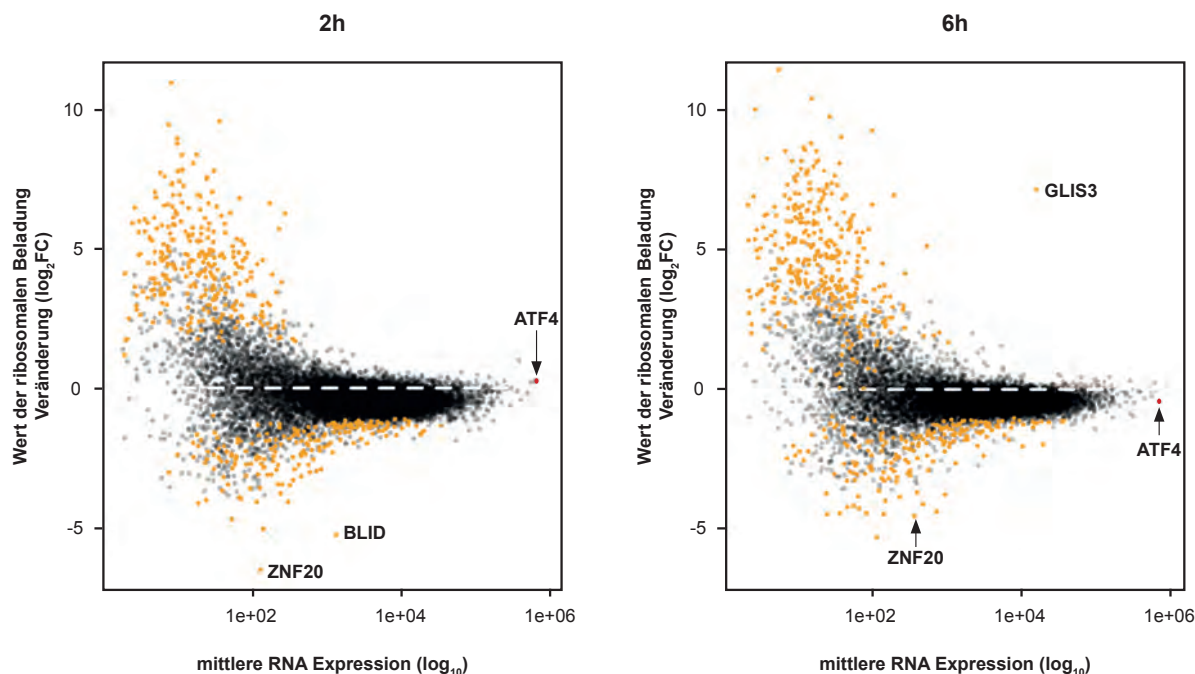


Abbildung 3.18: Die ribosomale Beladung von mRNAs wird durch die Induktion der UPR verringert.

Analyse der ribosomalen Beladung von Protein codierenden Transkripten nach Inkubation von LN308-Zellen mit TM für 2 (A) oder 6 h (B). Die gestrichelte Linie dient zur Orientierung für Veränderungen der ribosomalen Beladung. Signifikant veränderte mRNAs (gelb) und nicht signifikant veränderte mRNAs (grau) sind farblich getrennt dargestellt. Niedrig abundante RNAs wurden nicht berücksichtigt.

Allerdings konnten wir für ATF4, ein unter Stress durch translationale Regulation exprimiertes Protein, keine Veränderungen der ribosomalen Beladung der LN308-Zellen nach 2 oder 6 h Inkubation nachweisen (Abb.3.18). Daher wollten wir einen genaueren Blick auf ATF4 werfen. Hierzu waren jedoch nur Daten der HEK293-Zellen verfügbar. Durch Verwendung des Integrated Genome Viewers (IGV) Version 2.3.91 betrachteten wir die Reads aus RNA-Seq und Ribosome Profiling unter Berücksichtigung des humanen Referenzgenom (hg38, University of California Santa Cruz).

Dabei analysierten wir die Lokalisierung der Sequenzierdaten auf der mRNA von ATF4. Obwohl wir laut des Wertes der ribosomalen Beladung keine signifikante Änderung der Translation von ATF4 beobachteten, wiesen wir eine Anreicherung der Reads des Ribosome Profiling innerhalb der codierenden Sequenz nach Inkubation in TH im Vergleich zu Kontrollzellen nach (Abb.3.19). Die Reads aus der RNA-Sequenzierung waren unter beiden Bedingungen ähnlich. In unbehandelten Zellen beobachteten wir eine Anreicherung der Reads im überlappenden uORF (uORF2). Zusammenfassend zeigen die Berechnungen der ribosomalen Beladungen der einzelnen Transkripte einen guten ersten Hinweis auf eine Regulation der Translation, die allerdings individuell mit weiteren Verfahren und Experimenten überprüft werden müssen.

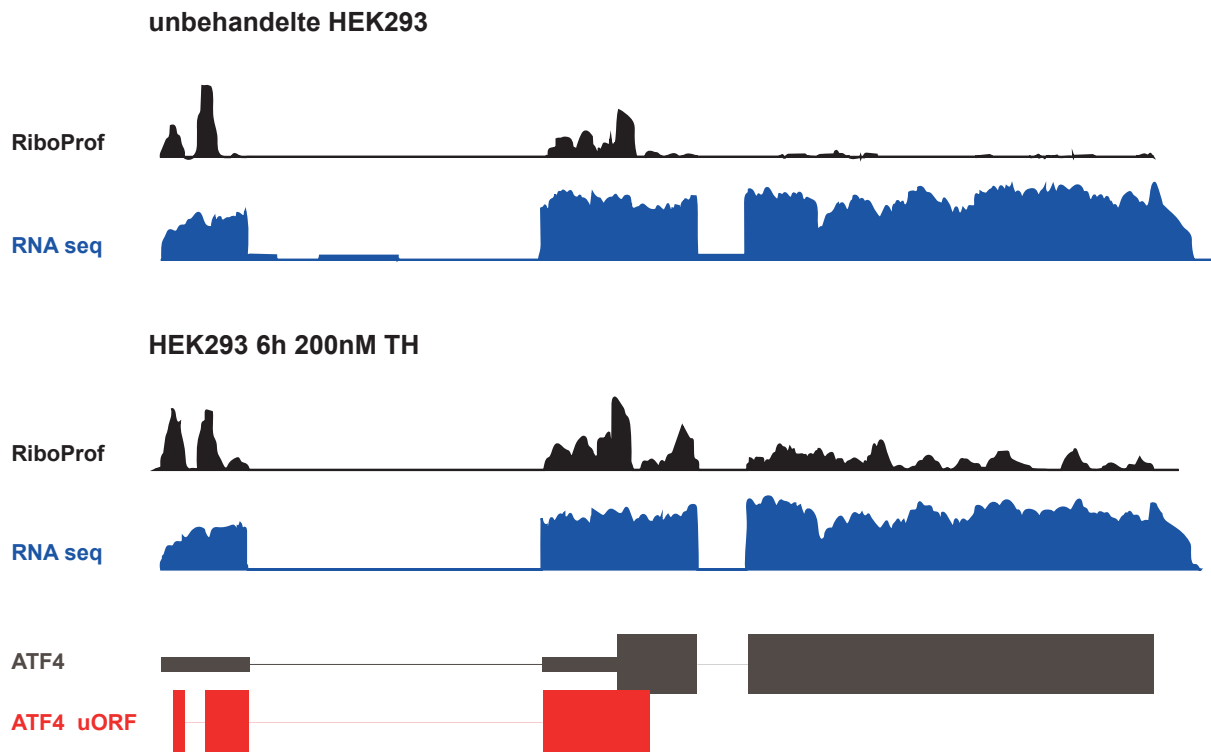


Abbildung 3.19: IGV-Analyse der ATF4 mRNA.

RNA-Seq und RiboProf Daten von unbehandelten oder 6 h in TH inkubierten HEK293- Zellen wurden mittels IGV an der ATF4 mRNA betrachtet. Reads des Ribosome Profiling (schwarz) und RNA-Seq (blau) sind grafisch dargestellt. Die mRNA (grau) und die beiden uORFs von ATF4 (rot) sind schematisch abgebildet.

3.2.6. Änderungen der Proteinspiegel durch die UPR

Neben transkriptionellen Anpassungen und Veränderungen der Translation durch Induktion der UPR analysierten wir die Veränderungen der Proteinspiegel mittels Shotgun Massenspektrometrie (MS) nach Inkubation mit TM oder TH für 6 h, 16 h oder 24 h. Dabei detektierten wir insgesamt 4131 Proteine mit mindestens 2 eindeutig zuordenbaren Peptiden, von denen ungefähr 50% (2136 Proteine) unter einer oder mehreren Bedingungen signifikante Veränderungen der Abundanz aufwiesen. Wir identifizierten 309 Proteinen mit einer Veränderung (\log_2FC) von $>+2$ oder <-2 im logarithmischen Maßstab der Standardabweichung, was etwa 7% des gemessenen Proteoms entspricht.

Im ersten Analysenschritt der Veränderungen des Proteoms nach Induktion der UPR verglichen wir die zeitliche Abhängigkeit der signifikant regulierten Proteine nach Inkubation mit TM bzw. TH (Abb.3.20). Aufgrund der nach 6, 16 und 24 h Inkubation geringen Zahl gemeinsam hochregulierter Proteine für TM (3 koregulierte Proteine) und TH (5 koregulierte Proteine) wird erneut deutlich, dass die Antwort der UPR auf ER Stress dynamisch ist (Abb.3.20, obere Zeile).

Eine größere Koregulation identifizierten wir bei Betrachtung der Änderungen nach 16 und 24 h (TM:13 koreguliert, TH:11 koreguliert). Mithin sind nach 6 h noch wenige Proteine reguliert, dagegen läuft nach 16 und 24 h die Transkription und Translation der UPR-Transkriptionsfaktoren und deren Zielgene als Adaption auf ER Stress ab. Allerdings identifizierten wir mehr signifikant herunterregulierte Proteine

(Abb.3.20, untere Zeile). Dies ist ähnlich den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung und des Ribosome Profiling, bei denen vor allem nach kurzer Inkubationsdauer mehr Gene herunterreguliert waren. Bei den negativ regulierten Peptiden fanden wir außerdem eine leicht erhöhte Überschneidung zwischen den beiden Stimuli der UPR (TM: 7 koreguliert; TH: 27 koreguliert).

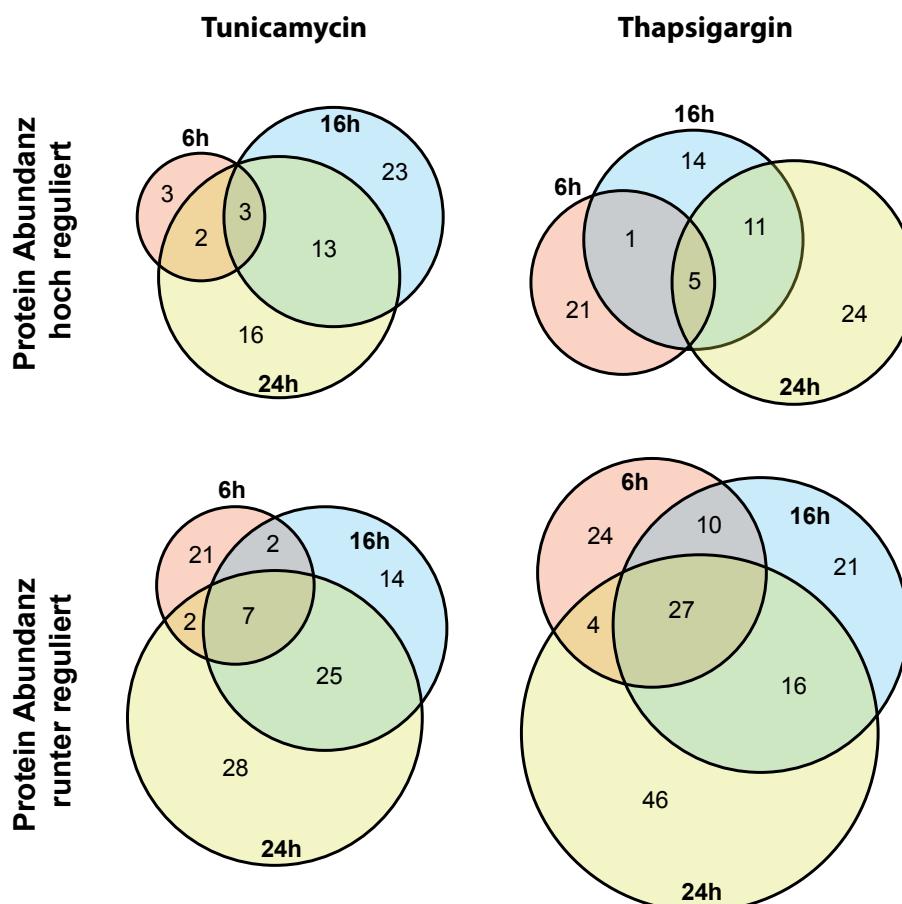


Abbildung 3.20: Zeitabhängiger Vergleich der Veränderungen regulierter Proteine nach UPR Induktion. LN308-Zellen wurden mit TM oder TH für 6 h, 16 h oder 24 h inkubiert und die Proteinspiegel mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Koregulation der Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten der Behandlungen wurden verglichen.

Die erhöhte Anzahl herunterregulierter Proteine wird auch beim Vergleich der substanzabhängigen Veränderungen zu den drei einzelnen Zeitpunkten deutlich (Abb.3.21). Nach 6 h wiesen wir insgesamt 85 herunterregulierte Proteine (TM:32; TH:65, 12 davon gemeinsam) und 31 hochregulierte Proteine (TM:8; TH: 27, 4 davon gemeinsam) nach (Abb.3.21, linke Spalte). Die Änderungen des Proteoms sind im Gegensatz zu den Veränderungen bei der RNA-Sequenzierung und dem Ribosome Profiling erst verzögert messbar. Nach 16 h Inkubationsdauer identifizierten wir insgesamt 55 hochregulierte (15 koreguliert) und 96 herunterregulierte Proteine (26 koreguliert). Nach 24 h Inkubation fanden wir 52 hochregulierte (12 koreguliert) und 122 herunterregulierte Proteine (33 koreguliert). Ähnlich wie bei der RNA-Sequenzierung und dem Ribosome Profiling zeigte sich nur eine geringe gemeinsame Regulation des Proteoms durch TM und TH.

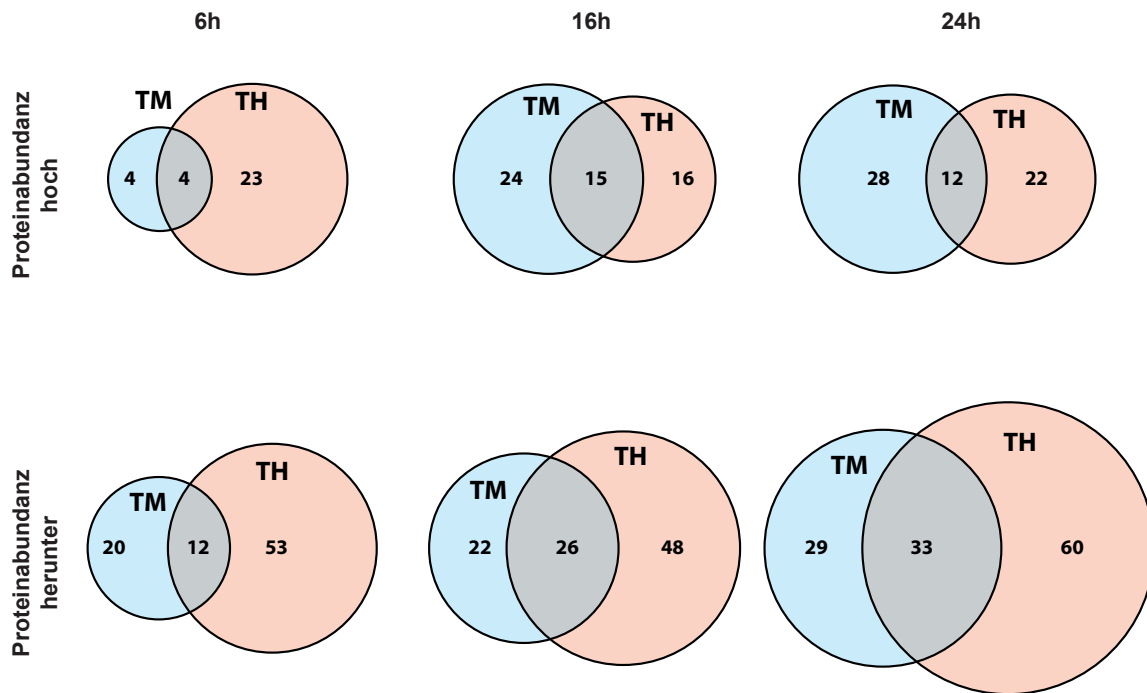


Abbildung 3.21: Vergleich der regulierten Proteine nach UPR Induktion durch TM und TH. LN308-Zellen wurden mit TM oder TH für 6, 16 oder 24 h inkubiert und die Proteinspiegel mittels Massenspektrometrie analysiert. Das Venn-Diagramm vergleicht die unterschiedliche Regulation durch TM und TH zu den drei verschiedenen Zeitpunkten.

Diese geringe Koregulation lässt sich auch am geringen Bestimmtheitsmaß nach 6 ($R^2=0,42$), 16 ($R^2=0,45$) und 24 h ($R^2=0,46$) ablesen (Abb.3.22).

Anhand der Veränderungen überprüften wir, wie bei der RNA-Sequenzierung und dem Ribosome Profiling, die Regulation bekannter UPR Komponenten im Proteomics-Datensatz. Im Shotgun-Verfahren der MS fanden wir jedoch aufgrund der geringen Abundanz nur BiP als wichtiges in die UPR involviertes Protein. Somit etablierten wir im Rahmen des SUPR-G Konsortiums einen „targeted Proteomics“ Ansatz, um die Expression von insgesamt acht Schlüsselproteinen der UPR (PERK, IRE1 α , ATF6, ATF4, XBP1, CHOP, GADD34 und ATF3) zu kontrollieren (Nguyen et al., 2019).

Die erhöhte Regulation von BiP, welches als abundantes Protein bereits in den Shotgun-MS Daten detektierbar war und als wichtige UPR Komponente durch ATF6 verstärkt exprimiert wird, wiesen wir nach 16- und 24-stündiger Inkubation mit TM sowie mit TH nach (Abb.3.22 B+C). Vereinzelt identifizierten wir noch weitere bekannte abundante UPR-Komponenten, die nach Behandlung mit TM oder mit TH reguliert waren (Abb.3.22, rote Punkte).

Darüber hinaus detektierten wir durch das „targeted Proteomics“ Massenspektrometrierverfahren die Regulation einer Mehrzahl der ausgewählten Schlüsselproteine der UPR. Allerdings fanden wir im Gegensatz zur RNA-Sequenzierung und zum Ribosome Profiling keine signifikant positive Regulation der drei Transmembranproteine PERK (EIF2AK3), IRE1 α (ERN1) und ATF6 (Abb.3.22). Für IRE1 α wiesen wir eine Hochregulation nach 24 h Inkubation mit TM sowie TH nach (Abb.3.22 C). Dagegen war dieses Protein nach 16 h Inkubation mit TM negativ reguliert (Abb.3.22 B). Für PERK sahen wir zu keinem Zeitpunkt eine Regulation, bei ATF6 nur nach 6 h Inkubation mit TH eine herunterregulierten

Spiegel. Dahingegen fanden wir die Transkriptionsfaktoren ATF4, XBP1, CHOP (DDIT3) und ATF3 sowie GADD34 (PPP1R15A, welches die PP1C Phosphatase rekrutiert um eIF2 α zu dephosphorylieren) mehrfach signifikant hochreguliert (Abb.3.22). Unter anderem bestimmten wir eine etwa 30-fache Anreicherung des ATF4 Proteins nach 6 h Inkubation mit TM und TH. Für XBP1 (~60fache Anreicherung) und CHOP (~50fach) detektierten wir einen noch größeren Anstieg der Proteinspiegel nach Induktion der UPR. Diese Anreicherungen stimmen mit den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung und des Ribosome Profiling überein (Abb.3.8 + 3.15), für ATF4 zusätzlich auch mit denen der Detektion mittels Western Blot (Abb.3.1 + 3.4).

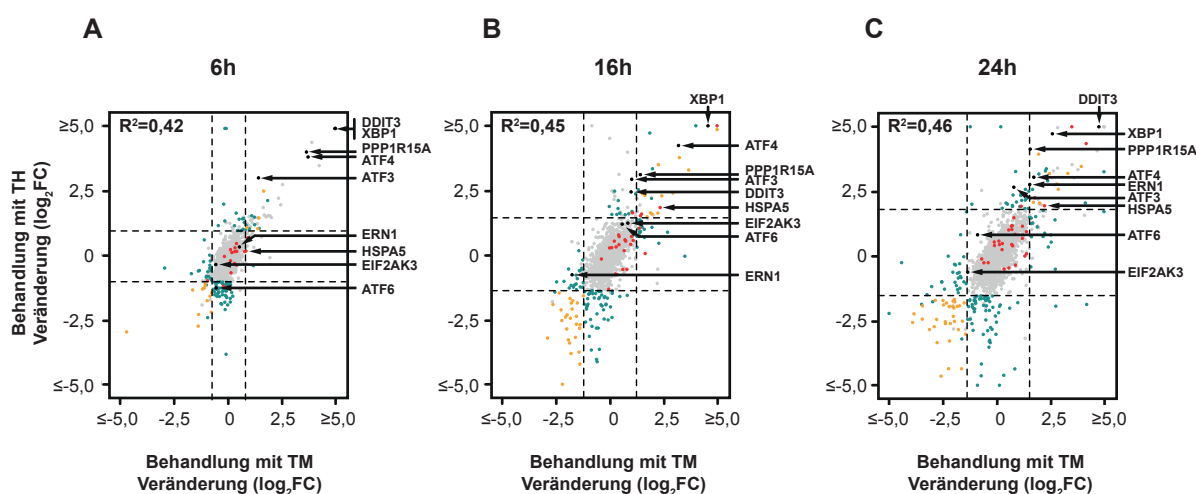


Abbildung 3.22: Scatter Plot regulierte Proteine nach UPR Induktion durch TM und TH.

LN308-Zellen wurden mit TM oder TH für 6, 16 oder 24 h inkubiert und die Proteinspiegel mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Veränderungen (logarithmisch dargestellt; \log_2FC) der einzelnen Proteine nach Inkubation mit TM oder TH wurden verglichen. Farbliche Darstellungsweise - grau: durch beide Stimuli (TM und TH) nicht signifikant verändert, grün: Nur durch einen Stimulus signifikant hoch- oder herunterreguliert, alternativ durch TM und TH gegenläufig reguliert, gelb: durch beide Stimuli gleichläufig statistisch signifikant reguliert, rot: bekannte Komponenten der UPR, spezifische UPR Komponenten sind für die genauere Beschreibung durch Pfeile markiert. Durch „targeted Proteomics“ gefundene zusätzliche Datenpunkte (Nguyen et al., 2019) wurden als schwarze Punkte hinzugefügt.

3.3. UPR Regulon

Durch unsere Hochdurchsatzverfahren zur Detektion des Transkriptom, Translatoms und des Proteoms konnten wir die adaptiven Veränderungen nach Induktion der UPR aufzeigen. Die größte Anreicherung bekannter Komponenten der UPR detektierten wir bei einer gemeinsamen Regulation nach Inkubation mit TM oder TH. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass auch die Expression anderer unter beiden Bedingungen signifikant regulierter Gene und Proteine sehr wahrscheinlich durch die UPR kontrolliert wird. Aufgrund unserer Datensätze können wir daher das UPR Regulon definieren.

Hierbei konzentrierten wir uns auf Protein codierende Gene, die eine erhöhte Syntheserate nach UPR-Induktion aufweisen und damit vermutlich eine Funktion bei der Antwort auf ER Stress haben (siehe Anhang, Seite 84 ff.). Mittels RNA-Sequenzierung gefundene transkriptionell regulierte Gene können zwar ebenfalls als Teil des UPR Regulon betrachtet werden, allerdings muss eine erhöhte Abundanz der mRNA nicht gleichbedeutend mit einer gesteigerten Translationsrate oder Proteinabundanz sein. Deswegen beschränkten wir unser UPR Regulon zunächst auf das Ribosome Profiling und die MS, bei denen Regulationen zu einem veränderten Proteinspiegel führen und zur Antwort auf

ER Stress beitragen können. In ähnlicher Weise berücksichtigten wir keine Proteine mit geänderter Abundanz wenn nicht gleichzeitig ein Anstieg der Proteinsyntheserate im Ribosome Profiling detektiert wurde. Somit schlossen wir Proteine mit einem erhöhten Umsatz aus, die wahrscheinlich nicht direkt durch die UPR reguliert werden und die Antwort auf ER Stress nicht beeinflussen.

Insgesamt sammelten wir durch unseren Ansatz eine Liste mit 267 durch ER Stress induzierten Genen. Darunter befanden sich 37 bereits mit der UPR in Verbindung gebrachte Kandidaten, welche aber noch nicht als sichere UPR-Komponenten gelten. Darüber hinaus identifizierten wir eine Vielzahl durch ATF4-induzierte Gene. Darunter befanden sich die Gene für VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A), EIF4EBP1 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1) oder für verschiedene Aminoacyl-tRNA-Synthethasen (AARS, CARS, EPRS, GARS, MARS, SARS, WARS) (Roybal et al., 2004, Yamaguchi et al., 2008, Adams, 2007, Han et al., 2013). Außerdem wiesen wir tumorroassoziierte Gene nach, beispielsweise die in die Regulation des Zellzyklus involvierte PLK3 (Polo-like kinase 3). Diese waren bereits mit anderen Arten von Stress in Verbindung gebracht (Helmke et al., 2016), nun wurde es auch bei ER Stress und bei der UPR nachgewiesen. Des Weiteren identifizierten wir die Regulation von NF- κ B2 (Nuclear Factor Kappa B Subunit 2) durch die UPR. Als Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist NF- κ B2 an Zellproliferation, Stressantwort oder Entzündungsreaktionen beteiligt (Kaneko et al., 2003, Courtois and Gilmore, 2006).

Die Aktivierung aller Zweige der UPR zeigten wir unter anderem durch die Regulation von GFPT1 (Glutamin-fructose-6-phosphate aminotransferase 1; auch GFAT1) und PTGS2 (Prostaglandin G/H synthase 2; auch COX-2 genannt) als XBP1- bzw. ATF6-Zielgene.

Allerdings fanden wir durch Definition des UPR überwiegend Gene und Proteine, die zuvor weder mit der UPR noch mit einem anderen stressassoziierten Signalweg verknüpft waren. Darunter befanden sich Transkriptionsfaktoren (wie KLF5 [Krueppel-like factor 5] oder LZTFL1 [Leucine Zipper Transcription Factor Like 1]), deren Interaktionspartner (wie BEX2 [Brain Expressed X-Linked 2] oder MXD1 [Max dimerization protein 1, auch MAD genannt]) verschiedene Enzyme (wie PHGDH [Phosphoglycerate Dehydrogenase], PSAT1 [Phosphoserine Aminotransferase 1] und PSPH [Phosphoserine Phosphatase], siehe 3.5.) sowie noch wenig studierte Proteine (wie ISOC2 [Isochorismatase Domain Containing 2]).

3.4. Experimentelle Validierung der UPR-abhängigen Regulation von SLFN5

3.4.1. Expression von SLFN5 in Gliomen

Um unseren Ansatz und damit unsere Auflistung des UPR Regulon zu überprüfen, wählten wir ein noch nicht mit der UPR oder einer anderen Art von Stress in Verbindung gebrachtes Gen, welches sowohl in unserem RNA-Sequencing als auch im Ribosome Profiling durch TM sowie TH hochreguliert war. Dabei beschränkten wir uns auf eine Inkubation von 6 h, da nach 2 h Behandlung nur sehr wenige RPFs reguliert waren. Zusätzlich betrachteten wir die mittels Massenspektrometrie gefundenen Proteinspiegel.

Ein interessanter Kandidat hierfür war SCHLAFEN5 (SLFN5). SLFN5 ist eines der 5 SLFN Isoformen (SLFN5, SLFN11, SLFN12, SLFN13 und SLFN14). Es besitzt eine Helicase-Domäne sowie ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localisation signal [NLS]) (Mavrommatis et al., 2013). Es ist bekannt, dass SLFN5 (wie die anderen SLFN-Isoformen) von Interferon α (IFN α) induziert wird, dass die Expression mit einer verringerten Invasivität von Melanom- und Nierenkarzinomzellen assoziiert ist und mit einer besseren Überlebensrate von Patienten mit diesen Tumoren korreliert (Katsoulidis et al., 2010, Sas-

sano et al., 2015). Im Gegensatz dazu wurde die erhöhte Expression von SLFN5 mit der Progredienz von Gliomen und Magenkrebs in Verbindung gebracht (Arslan et al., 2017, Companioni Napoles et al., 2017).

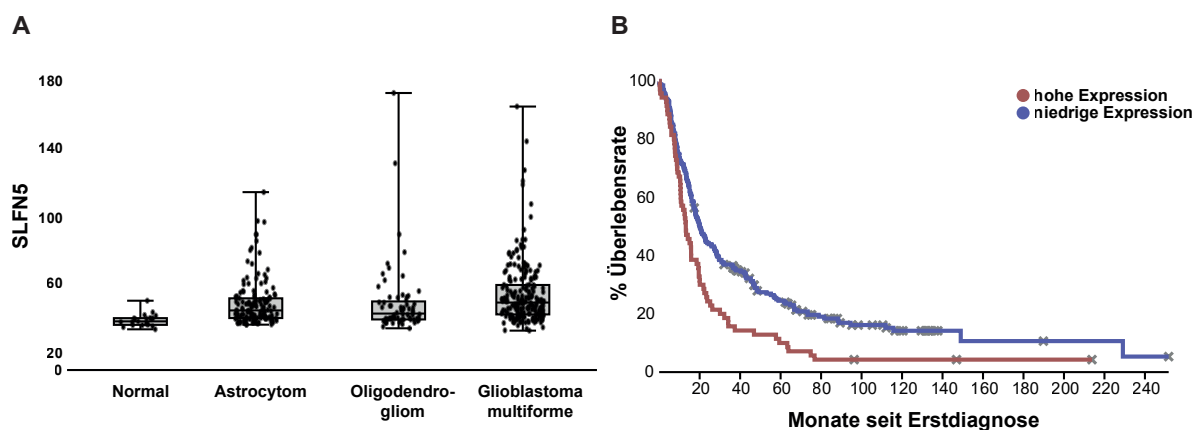


Abbildung 3.23: Die Expression von SLFN5 ist in Gliomen erhöht und korreliert negativ mit der Überlebensrate von Patienten.

(A) Boxplot Darstellung der Expression von SLFN5 mRNA in GBM, Oligodendriogliomen, Astrozytomen und normalem Hirngewebe. (B) Kaplan-Meier Diagramm von Patienten mit Gliomen mit hoher (rot) oder niedriger (blau) SLFN5 mRNA Expression. Die Daten stammen aus der REMBRANDT Datenbank und wurden mit der Plattform Affymetrix HG U133 v2.0 Plus generiert.

Um die Expression von SLFN5 und die Überlebensrate von Patienten bei hoher SLFN5 Expression zu überprüfen benutzten wir die Datenbank Repository of Molecular Brain Neoplasia Data (REMBRANDT). Diese verbindet Daten zur Genexpression und Analysen zur Variation der Kopienzahl mit klinischen Phänotypen von Gliompatienten (Madhavan et al., 2009). Dabei zeigt sich die erhöhte SLFN5 mRNA Expression in verschiedenen Formen von Gliomen im Vergleich zu gesunden Individuen (Abb.3.23 A). Außerdem ist ein Anstieg der SLFN5 Expression beim bösartigeren GBM (WHO Grad IV) gegenüber Astrozytomen (WHO Grad I-III) erkennbar. Deswegen überprüften wir im nächsten Schritt den Zusammenhang zwischen höherer SLFN5 Expression und einer schlechteren Prognose von Gliompatienten und fanden eine erhöhte Expression von SLFN5 mit einer verkürzten Lebensdauer assoziiert (Abb.3.23 B). Mithin ist SLFN5 in erhöhtem Maß in malignen Gliomen exprimiert und kann potentiell als Tumormarker verwendet werden.

3.4.2. Induktion von SLFN5 durch die UPR

Im nächsten Schritt wollten wir beweisen, dass SLFN5 nicht nur durch IFN α , sondern auch durch die UPR reguliert wird. In unserem Datensatz war IFN α bei keinem Experiment signifikant reguliert, wohingegen SLFN5 eines der am stärksten regulierten Gene nach 6 h Stimulierung war (Log₂FC-Werte RNA-Seq: TM=3,28; TH=3,73. Log₂FC-Werte Ribosome Profiling: TM=2,83; TH=2,73). Auch in der Massenspektrometrie war SLFN5 zu späteren Zeitpunkten signifikant erhöht (Log₂FC-Werte MS, 16 h: TM=3,68; TH=3,29. Log₂FC-Werte MS, 24 h: TM=3,94; TH=3,46).

Hierzu inkubierten wir LN308 und HEK293 mit TM oder TH über unterschiedliche Zeiten und untersuchten die Proteinspiegel mittels Western Blot. In beiden Zelllinien sahen wir eine eindeutige Erhö-

hung der Konzentration von SLFN5 (Abb.3.24 A+B). Der Anstieg von SLFN5 war erst nach 12, 16 und 24 h sichtbar. Somit nehmen wir an, dass SLFN5 auf der Ebene der Transkription und nicht auf der Ebene der Translation reguliert ist.

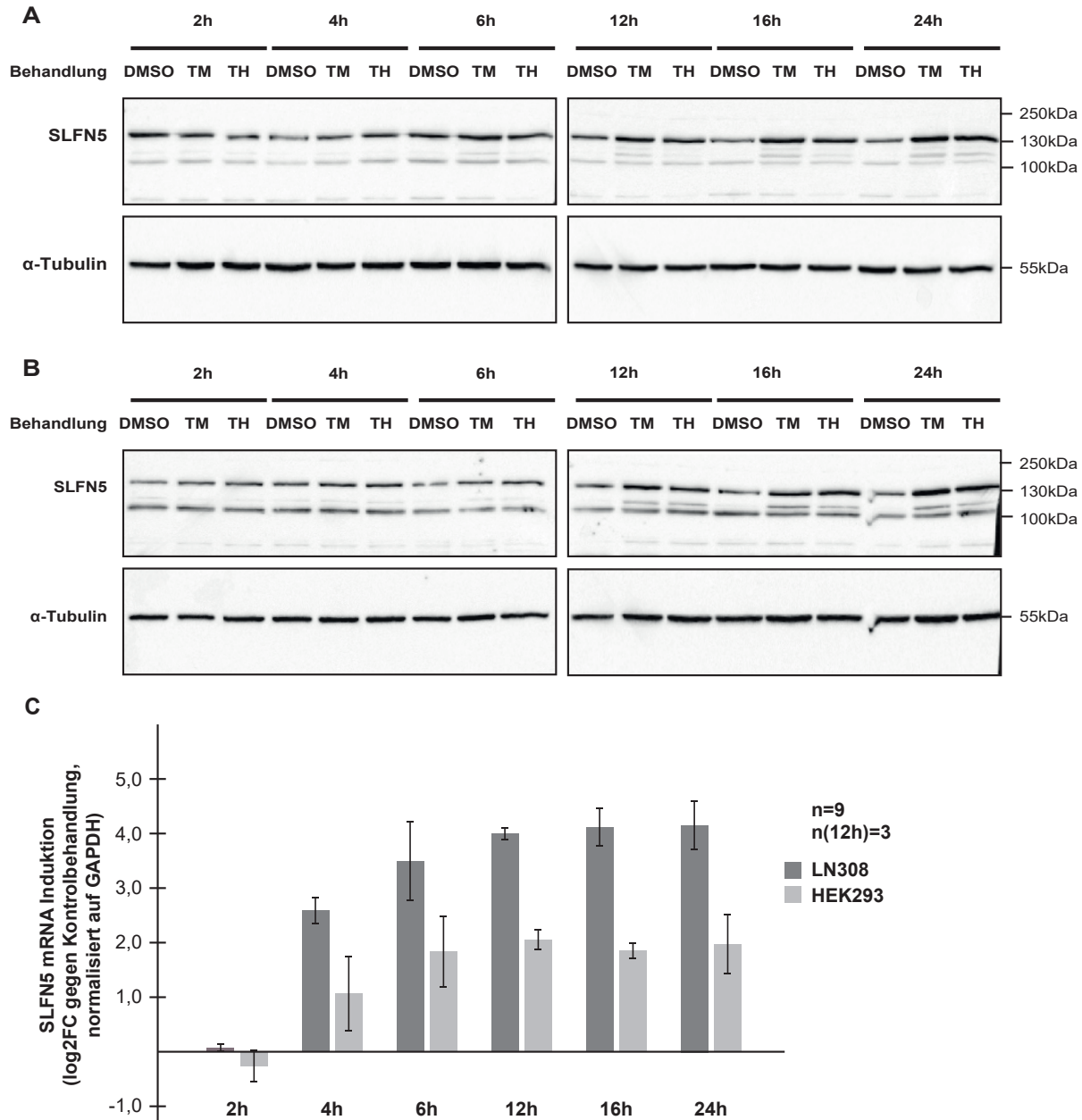


Abbildung 3.24: ER Stress induziert SLFN5.

LN308- (A) oder HEK293-Zellen (B) wurden für die angegebenen Zeiträume (2-24 h) mit 2,5 μ g/ml TM oder 200 nM TH inkubiert und SLFN5 mittels Western Blot analysiert. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle und DMSO als Kontrolle der Behandlung verwendet. Die Banden des molekularen Größenmarkers sind auf der rechten Seite dargestellt. (C) SLFN5 mRNA Spiegel wurden durch quantitative real-time PCR nach Behandlung von LN308 oder HEK293 mit TM für 2-24 h analysiert und die logarithmischen Veränderungen gegenüber unbehandelten Zellen bestimmt. GAPDH wurde als interne Kontrolle für die Normalisierung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei biologischen Replikaten in technischen Triplikaten im Western Blotting bzw. mittels qRT-PCR.

Für die Bestätigung der Regulation Ebene der mRNA ermittelten wir zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulierung mit TM die Menge der SLFN5 mRNA mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR). Unsere Analyse zeigt, dass ER Stress zum Anstieg der SLFN5 mRNA nach 4 h mit einer Sättigung nach längerer Behandlungsdauer (zwischen 6 und 12 h) führt (Abb.3.24 C). Die frühere Veränderung der SLFN5 mRNA im Vergleich zum Protein deutet auf eine transkriptionelle Regulation von SLFN5 nach Aktivierung eines der drei Signalwege der UPR hin.

Mithin zeigten wir, dass SLFN5, ein in seiner Expression noch nicht mit Stress in Verbindung gebrachtes Gen, durch die Induktion der UPR reguliert wird. Diese Regulation erfolgt wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene. Damit konnten wir einen noch nicht mit ER Stress in Verbindung gebrachtes Protein des UPR Regulons vorläufig validieren.

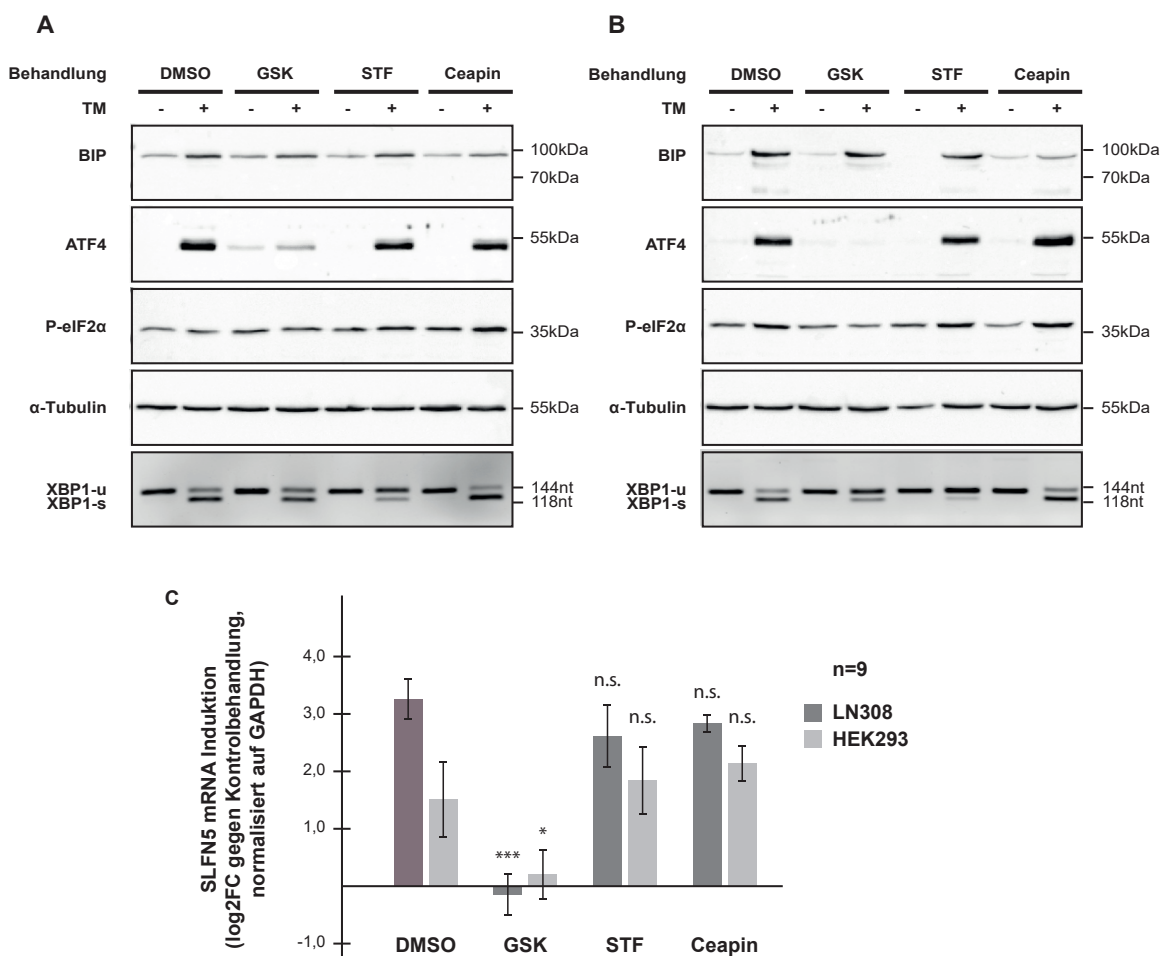


Abbildung 3.25: Der PERK-Signalweg der UPR induziert SLFN5 bei ER Stress.

LN308- oder HEK293-Zellen wurden über 2 h mit 1 μ M GSK2606414, 50 μ M STF-083010 oder 1 μ M Ceapin-A7 präinkubiert und anschließend mit TM in Anwesenheit der Inhibitoren für 6 h stimuliert. Die Proteinspiegel in LN308 (A) und HEK293 (B) (von BiP, ATF4, und P-eIF2 α) wurden mittels Western Blot analysiert. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle und DMSO als Kontrolle der Behandlung verwendet. Die zytosolische Prozessierung der XBP1 mRNA wurde per PCR auf Agarosegelen detektiert. Die Banden des molekularen Größenmarkers und des DNA Markers sind auf der rechten Seite dargestellt. (C) SLFN5 mRNA in LN308- oder HEK293-Zellen wurden durch quantitative real-time PCR analysiert und die Veränderungen (logarithmisch dargestellt; log₂FC) gegenüber unbehandelten Zellen berechnet. GAPDH wurde als interne Kontrolle für die Normalisierung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei biologischen Replikaten in technischen Triplikaten im Western Blotting bzw. mittels qRT-PCR. ***P<0,005; *P<0,05; n.s.: nicht signifikant.

3.4.3. SLFN5 wird durch den PERK-Zweig der UPR reguliert

Um herauszufinden, durch welchen Signalweg SLFN5 reguliert wird, inhibierten wir die drei der UPR bedeutsamen sensorischen Transmembranproteine. Die spezifische Inhibition von PERK durch GSK2606414 (Axten et al., 2012), von IRE1 α durch STF-083010 (Papandreou et al., 2011) und von ATF6 durch Ceapin-A7 (Gallagher et al., 2016) erlaubt die Blockade jeweils eines der drei Zweige der UPR.

Zum Nachweis der pharmakologischen Wirkung überprüften wir in LN308 und HEK293 die ATF6-abhängige Expression von BiP, die Phosphorylierung von eIF2 α sowie die anschließende Induktion von ATF4 durch PERK und die IRE1 α -vermittelte Prozessierung von XBP1 (Abb.3.25 A+B). Für beide Zelllinien wiesen wir die erfolgreiche Hemmung der einzelnen UPR-Zweige nach.

Im Anschluss untersuchten wir die mRNA Expression der behandelten LN308- und HEK293-Zellen mittels qRT-PCR. Während im Vergleich zur Kontrolle die Hemmung von IRE1 α durch STF-083010 und von ATF6 durch CeapinA7 keinen signifikanten Effekt auf die TM bedingte Induktion der SLFN5 mRNA aufwies, war diese nach Inhibition von PERK durch GSK2606414 signifikant reduziert (Abb.3.25 C).

3.4.4. Die Induktion von SLFN5 wird durch die Phosphorylierung von eIF2 α vermittelt

Der UPR-Sensor PERK hat verschiedene Zielproteine, jedoch ist die Phosphorylierung von eIF2 α für die Adaption an ER Stress essentiell. Zur Überprüfung der Signalübertragung bei der Induktion von SLFN5 durch PERK über die Phosphorylierung von eIF2 α etablierten wir induzierbare, stabile Flp-In T-REx 293 Zellen mit einer phosphomimetischen Mutante (S51D) bzw. einer nicht-phosphorylierbaren Mutante von eIF2 α (S51A). In diesen Zellen führte eine 24-stündige Stimulation mit Tetracyclin (Tet) zur Expression der Transgene. Wir detektierten nach dieser Stimulierung aber weder eine Aktivierung von PERK noch eine erhöhte Phosphorylierung von eIF2 α (Abb.3.26 A). Der Nachweis der Aktivierung der weiteren Signalkaskade in der Mutante S51D erfolgte durch die Detektion von ATF4 im Western Blot (Abb.3.26 A).

Anschließend analysierten wir nach Expression der mutierten eIF2 α -Proteinvarianten die Expression von SLFN5 auf Proteinebene mittels Western Blotting (Abb.3.26 B) und auf Ebene der mRNA per qRT-PCR (Abb.3.26 C). Nach 24-stündiger Induktion mit Tet zeigten wir einen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöhten SLFN5 Proteinspiegel in S51D-Zellen (Abb.3.26 B). Die Induktion der nicht-phosphorylierbaren Mutante in S51A-Zellen führte dagegen nicht zur Änderung der SLFN5 Expression. Zudem fanden wir in S51D-Zellen nach Inkubation mit Tet einen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte SLFN5 mRNA Spiegel. Dies war in S51A-Zellen mit der nicht-phosphorylierbaren Mutante nicht zu erkennen (Abb.3.26 C).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass SLFN5 unter ER Stressbedingungen durch PERK und die Phosphorylierung von eIF2 α reguliert wird.

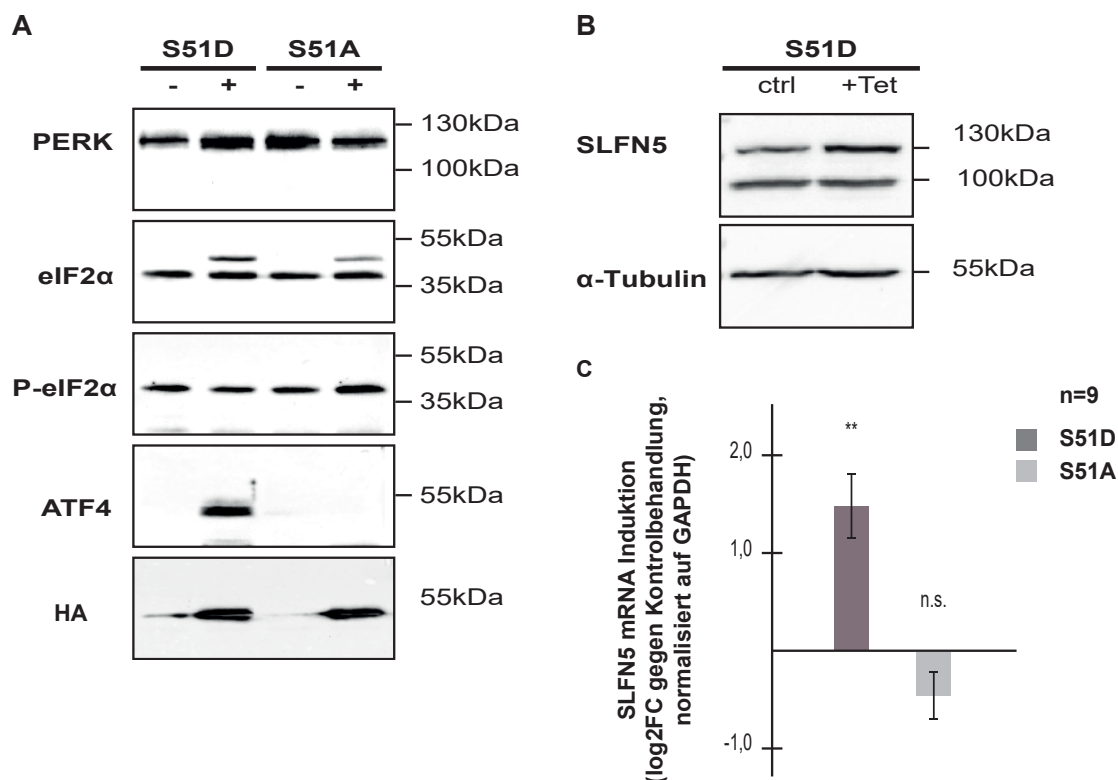


Abbildung 3.26: SLFN5 wird durch die Phosphorylierung von eIF2α induziert.

Stabile induzierbare Flp-In T-REx 293 mit der phosphomimetischen Mutante 3xHA-eIF2α-S51D oder nicht phosphorylierbaren Mutante 3xHA-eIF2α-S51A wurden für 24 h mit Tetracyclin (Tet) induziert. Nicht induzierte Zellen dienten als Kontrollen. (A) Die Expression von 3xHA-eIF2α-S51D und 3xHA-eIF2α-S51A sowie vor- (PERK) und nachgeschalteter Proteine der UPR (ATF4) wurden per Western Blotting detektiert. (B) Die Induktion von SLFN5 durch eIF2α-S51D wurde per Western Blot analysiert. α-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Banden des molekularen Größenmarkers sind auf der rechten Seite dargestellt. (C) SLFN5 mRNA Spiegel wurde durch quantitative real-time PCR analysiert und die Veränderungen (logarithmisch dargestellt; log₂FC) gegenüber nicht induzierten Zellen berechnet. GAPDH wurde als interne Kontrolle für die Normalisierung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei biologischen Replikaten in technischen Triplikaten im Western Blotting bzw. mittels qRT-PCR. **P<0,01; n.s.: nicht signifikant.

3.4.5. SLFN5 wird durch den PERK-eIF2α-ATF4 Signalweg induziert

Die Phosphorylierung von eIF2α führt zu einer globalen Inhibition der Translation, jedoch werden einige mRNAs (beispielsweise ATF4) dabei verstärkt translatiert (Pavitt and Ron, 2012). ATF4 ist ein unter ER Stress aktivierter Transkriptionsfaktor, das Schlüsselprotein des PERK-eIF2α-Signalwegs und reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen (Harding et al., 2003, Han et al., 2013).

Um zu überprüfen ob ATF4 für die erhöhte Expression von SLFN5 verantwortlich ist, transfizierten wir LN308- und HEK293-Zellen mit 3xHA-getaggetem ATF4 oder einem Kontrollplasmid. Die erfolgreiche Expression von ATF4 wiesen wir 24 h nach Transfektion per Western Blotting nach. Hierbei detektierten wir eine erhöhte Menge SLFN5 (Abb.3.27 A).

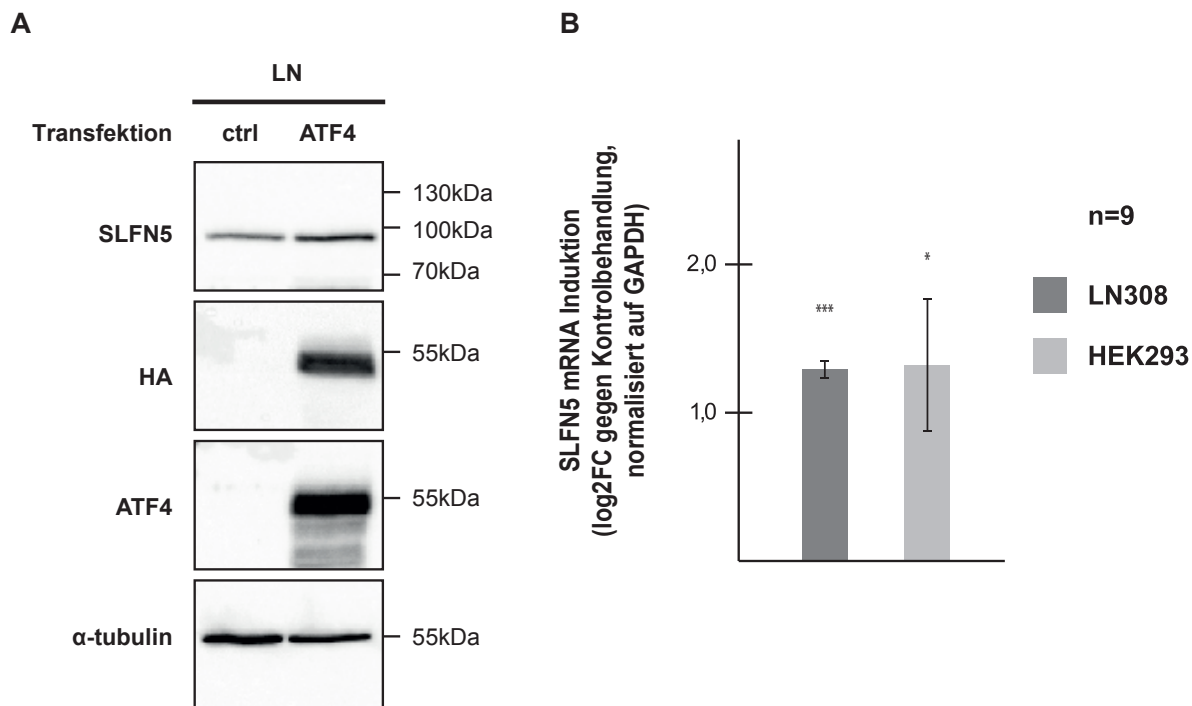


Abbildung 3.27: Der Transkriptionsfaktor ATF4 induziert die Expression von SLFN5.

(A) LN308-Zellen wurden mit 3xHA-getaggttem ATF4 transient transfiziert und die Proteinspiegel von ATF4 und SLFN5 per Western Blot analysiert. Ein Leervektor diente als Kontrolle. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Banden des molekularen Größenmarkers sind auf der rechten Seite dargestellt. (B) LN308 und HEK2993 wurden mit 3xHA-getaggttem ATF4 transient transfiziert und die SLFN5 mRNA wurde durch quantitative real-time PCR analysiert. Die Veränderungen (logarithmisch dargestellt; log₂FC) gegenüber der mit einem Leervektor transfizierten Kontrolle wurden berechnet. GAPDH wurde als interne Kontrolle für die Normalisierung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei biologischen Replikaten in technischen Triplikaten im Western Blotting bzw. mittels qRT-PCR. ***P<0,005; *P<0,05.

Im darauffolgenden Schritt analysierten wir die SLFN5 mRNA nach ATF4 Transfektion in LN308- und HEK2993-Zellen. Durch Transfektion von ATF4 detektierten wir nach 24 h Inkubation eine gegenüber Kontrollzellen signifikante Anreicherung von SLFN5 mRNA (Abb.3.27 B).

Durch diese Experimente zeigten wir, dass SLFN5 durch den PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg der UPR reguliert und induziert wird.

3.5. Veränderungen anderer Signalwege durch die UPR

Bei genauerer Betrachtung des UPR Regulon identifizierten wir mehrere durch PERK-eIF2 α -ATF4 aktivierte Signalwege. Unter anderem fanden wir sieben verschiedene Aminoacyl-tRNA Synthetase Gene (AARS, CARS, EPRS, GARS, MARS, SARS und WARS), die nach 6 h Inkubation mit TM und TH koinduziert waren. Insgesamt fanden wir sogar zwölf Aminoacyl-tRNA Synthetasen (zusätzlich NARS, TARS, IARS, YARS, FARSA), die durch eine der beiden Substanzen reguliert wurden. Die Regulation der Aminoacyl-tRNA Synthetasen durch ATF4 war bereits gezeigt worden (Adams, 2007, Han et al., 2013). Außerdem wiesen wir die Regulation von Genen nach, die beim Transport und bei der Synthese von Aminosäuren, bei der Transkription sowie bei der Translation oder bei antioxidativen Prozessen eine Rolle spielen.

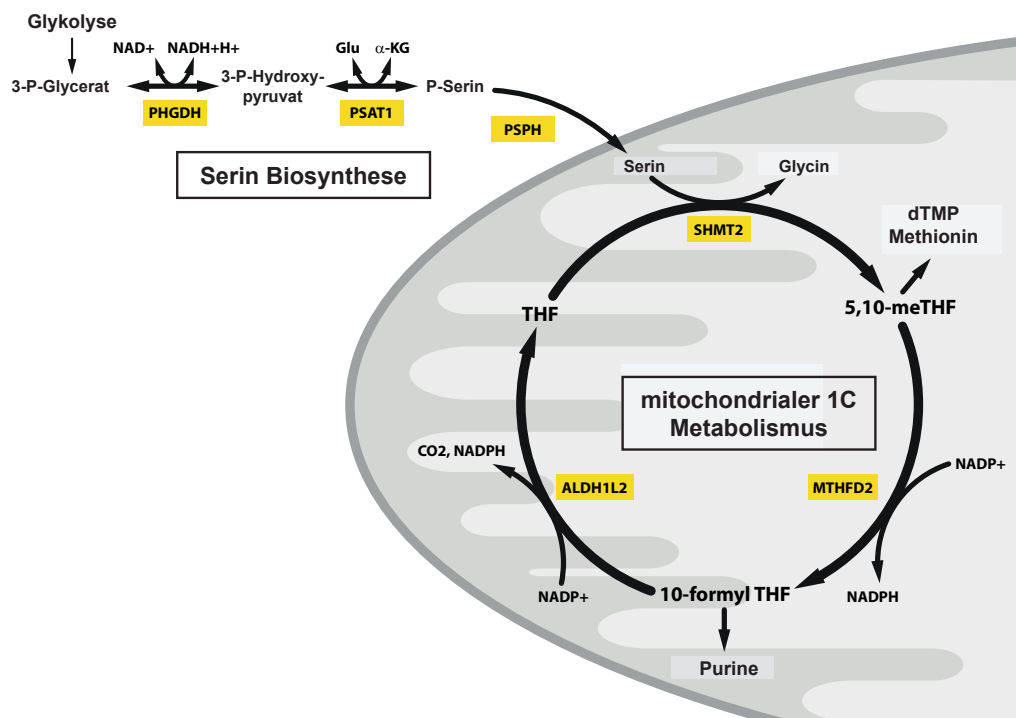


Abbildung 3.28: Schematische Darstellung des Serin Biosynthesewegs und des mitochondrialen 1C-Metabolismus. Wichtige Enzyme dieser Biosynthesewege wurden durch die UPR induziert. PHGDH: D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, PSAT1: Phosphoserine aminotransferase 1, PSPH: Phosphoserine phosphatase, SHMT2: Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial, MTHFD2: Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial, ALDH1L2: Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase

Weiterhin ist der aus den drei Enzymen Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH), Phosphoserine Aminotransferase 1 (PSAT1) und Phosphoserine Phosphatase (PSPH) bestehende Serin Biosyntheseweg durch die UPR reguliert. Die verstärkte Transkription dieser Gene durch ATF4 in Zusammenhang mit einem Defizit von Aminosäuren ist bekannt (Adams, 2007). Wir konnten in unseren Untersuchungen die Regulation des Serin Synthesewegs unter ER Stress durch die UPR zeigen (Abb.3.28).

3.5.1. Umprogrammierung des mitochondrialen 1C-Metabolismus durch die UPR

Auch die Gene des mitochondrialen 1C-Metabolismus waren unter ER Stress induziert (Abb.3.28). Mittels RNA-Sequencing, Ribosome Profiling und Massenspektrometrie wiesen wir die Regulation von Serine-hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2), Bifunctional Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/Cyclohydrolase 2 (MTHFD2) und Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L2 (ALDH1L2) nach. Die Induktion von MTHFD2 durch die UPR wurde bereits gezeigt (Harding et al., 2003). Wir bestimmten aber zusätzlich die Aktivierung anderer Komponenten des mitochondrialen 1C-Metabolismus als Reaktion auf ER Stress.

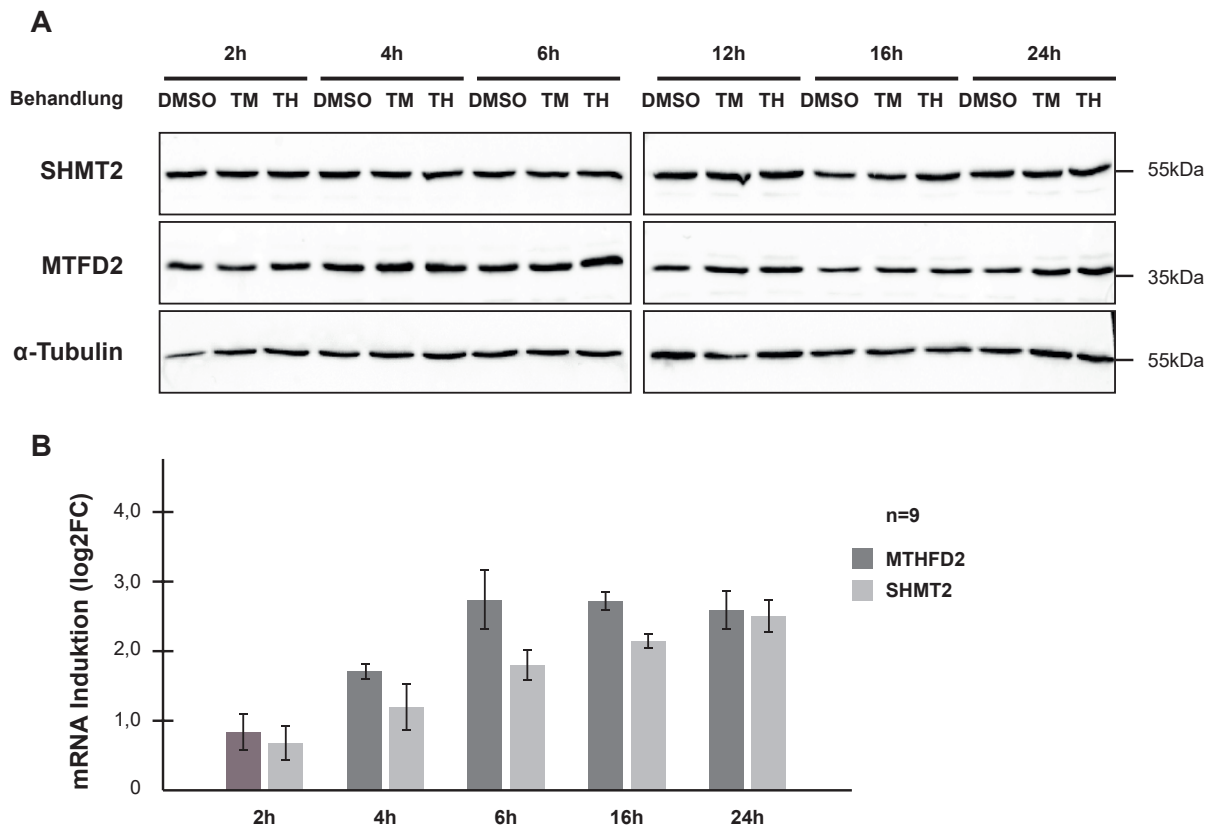


Abbildung 3.29: ER Stress induziert MTHFD2 und SHMT2.

(A) LN308-Zellen wurden für 2-24 h mit 2,5 µg/ml TM oder 200 nM TH inkubiert und MTHFD2 sowie SHMT2 per Western Blot analysiert. α-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Banden des molekularen Größenmarkers sind auf der rechten Seite dargestellt. (B) mRNA Spiegel von MTHFD2 und SHMT2 wurden durch quantitative real-time PCR nach Inkubation von LN308-Zellen mit TM für 2-24 h analysiert und die Veränderungen (logarithmisch dargestellt; log₂FC) gegenüber unbehandelten Zellen berechnet. GAPDH wurde als interne Kontrolle für die Normalisierung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei biologischen Replikaten in technischen Triplikaten im Western Blotting bzw. mittels qRT-PCR.

3.5.2. MTHFD2 und SHMT2 werden durch die UPR reguliert

Zur Überprüfung der Daten des UPR Regulons analysierten wir die zeitaufgelöste Regulation von MTHFD2 und SHMT2 durch ER Stress. Hierfür aktivierten wir die UPR in LN308-Zellen erneut durch die Inkubation mit TM oder TH nach verschiedenen Zeitpunkten (2-24 h) und detektierten die Änderungen der Proteinmenge mittels Western Blotting.

Anhand des Proteinspiegels konnten wir keine signifikanten Änderungen von SHMT2 durch die UPR finden. Dagegen war ein schwacher Anstieg der Spiegel von MTHFD2 erkennbar (Abb.3.29 A).

Zur genaueren Analyse behandelten wir LN308-Zellen mit TM für 2-24 h und detektierten die mRNA mittels qRT-PCR. Im Gegensatz zum Western Blot wiesen wir eine deutliche Induktion von MTHFD2 und SHMT2 nach (Abb.3.29 B). Ähnlich wie bei SLFN5 konnte die Induktion von MTHFD2 und SHMT2 zuerst der Ebene der mRNA nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine transkriptionelle Regulation der Enzyme des mitochondrialen 1C-Metabolismus hin.

3.5.3. Der PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg der UPR ist für die Induktion von MTHFD2 und SHMT2 verantwortlich

Der Einfluss von ATF4 auf SHMT2 wurde für Stress durch ein Aminosäuredefizit und damit einhergehend der Aktivierung der eIF2 α -Kinase GCN2 (General Control Nonderepressible 2, auch EIF2AK4) gezeigt (Adams, 2007). Dagegen wurde die Induktion von MTHFD2 durch die UPR bereits nachgewiesen (Harding et al., 2003). Um zu zeigen, dass auch die von ER Stress abhängige Phosphorylierung von eIF2 α durch PERK zur Induktion von SHMT2 neben MTHFD2 führt, inhibierten wir die drei Zweige der UPR in LN308 mit GSK2606414, STF-083010 oder Ceapin-A7 für 2 h. Anschließend inkubierten wir die Zellen für 6 h mit TM in Anwesenheit der drei genannten Inhibitoren und analysierten die mRNA-Werte per qRT-PCR (Abb.3.30 A).

Gegenüber der DMSO-Kontrolle stellten wir keine Veränderungen der Spiegel der mRNA bei IRE1 α - und ATF6-inhibierten Zellen fest. Allerdings inhibierten wir durch die Hemmung von PERK die Induktion von MTHFD2 und SHMT2 komplett (Abb.3.30 A).

Um die Rolle von eIF2 α bei der Aktivierung von MTHFD2 und SHMT2 zu verdeutlichen, verwendeten wir die etablierten, stabilen, induzierbaren Zelllinien S51D und S51A (siehe 3.4.4.) und detektierten 24 h nach Induktion der eIF2 α -Mutanten die mRNA-Expression von MTHFD2 und SHMT2 mittels qRT-PCR.

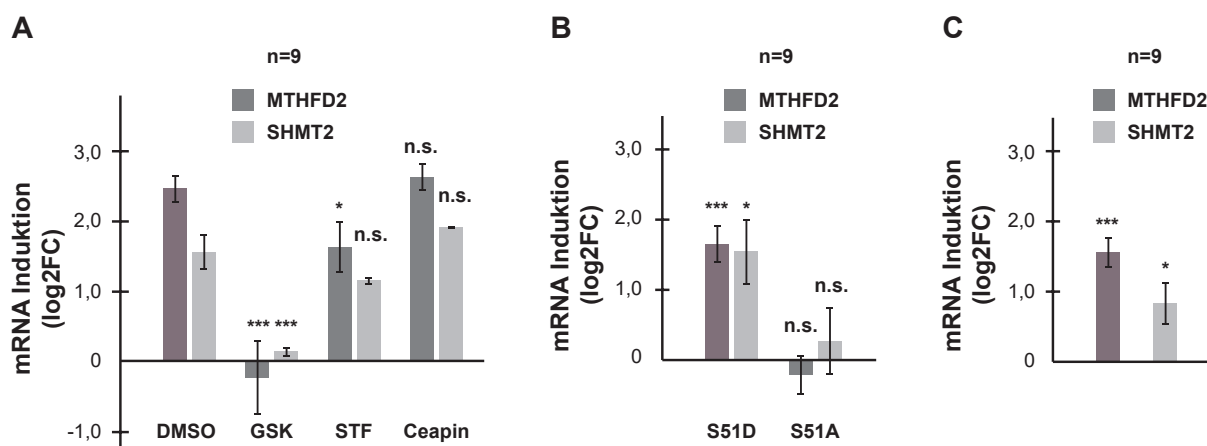


Abbildung 3.30: MTHFD2 und SHMT2 werden durch den PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg der UPR reguliert.

(A) LN308-Zellen wurden 2 h mit 1 μ M GSK2606414, 50 μ M STF-083010 oder 1 μ M Ceapin-A7 präinkubiert und anschließend mit TM in Anwesenheit der Inhibitoren für 6 h stimuliert. (B) Stabile induzierbare Flp-In T-Rex 293 mit eIF2 α -S51D oder eIF2 α -S51A wurden für 24 h mit Tetracyclin induziert. Nicht induzierte Zellen dienten als Kontrollen. (C) LN308-Zellen wurden transient mit ATF4 transfiziert, der Leervektor diente als Kontrolle. MTHFD2 und SHMT2 mRNA wurden durch quantitative real-time PCR analysiert und die Veränderungen (logarithmisch dargestellt; log₂FC) gegenüber der Kontrolle berechnet. GAPDH wurde als interne Kontrolle für die Normalisierung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei biologischen Replikaten in technischen Triplikaten im Western Blotting bzw. mittels qRT-PCR. ***P<0,005; *P<0,05; n.s.: nicht signifikant.

Die Induktion von phosphomimetischem eIF2 α -S51D führte zu einer erhöhten Transkription beider Gene des mitochondrialen 1C-Metabolismus. Dagegen sahen wir bei der unphosphorylierbaren Mutante S51A keine Veränderung gegenüber der Kontrolle (Abb.3.30 B).

Um den direkten Einfluss von ATF4 auf die Expression von MTHFD2 und SHMT2 nachzuweisen, transfizierten wir LN308-Zellen transient mit ATF4 und analysierten die mRNA nach 24 h. Die Analyse der mRNA mittels qRT-PCR zeigte, dass die Transfektion von ATF4 die Expression von MTHFD2 als auch SHMT2 induziert (Abb.3.30 C).

Somit konnten wir durch unseren Ansatz zeigen, dass MTHFD2 und auch SHMT2 durch den PERK-eIF2 α -ATF4-Signalweg der UPR reguliert und der mitochondriale 1C-Metabolismus unter ER Stressbedingungen aktiviert ist.

3.6. Adaptionen durch die UPR führen zur Antifolatresistenz von Zellen

Der mitochondriale 1C-Metabolismus spielt eine wichtige Rolle bei der Lieferung von Ein-Kohlenstoffgruppen für die de novo Synthese von Purinen und Thymidylat, beim Aminosäuremetabolismus und bei der Methylierung von DNA (Gonen and Assaraf, 2012). Er ist des Weiteren auch Ziel bei der Behandlung verschiedener Tumore (Locasale, 2013). Bereits 1948 wurde Aminopterin, ein Inhibitor des Enzyms Dihydrofolatreduktase (DHFR), bei akuter Leukämie von Kindern eingesetzt und zeigte die Remission der Tumore (Farber et al., 1948). Aufgrund der Toxizität von Aminopterin wurde Methotrexat als Analogon entdeckt, das in klinischen Studien gegen Chorionkarzinome erfolgreich eingesetzt wurde (Hertz et al., 1956). Verschiedene Substanzen wurden bei der Weiterentwicklung von Folsäure-Antagonisten gefunden, die gegen DHFR oder andere Enzyme des Folatzyklus wirken. Unter anderem konnte Pemetrexed als Substanz identifiziert werden, das mehrere Enzyme inhibiert (Hemmer der DHFR als auch der Thymidylat-Synthase [TS], sowie der Glycinamid-Ribonukleotid-Formyltransferase [GARFT] und Aminoimidazole-Carboxamide-Formyl-Transferase [AICARFT]) (Walling, 2006).

Aufgrund der metabolischen Umprogrammierung des mitochondrialen 1C-Metabolismus durch die UPR stellten wir uns die Frage, ob ER Stress zu einer veränderten Wirksamkeit von Antifolaten führt. Dazu untersuchten wir unter Induktion der UPR durch TM die zytotoxische Wirkung verschiedener, von der FDA zugelassener Chemotherapeutika auf LN308-Zellen.

In unserem Ansatz untersuchten wir die Antifolate Methotrexat (kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase [DHFR]) und Pemetrexed, das als Inhibitor mehrerer Enzyme des Folatzyklus fungiert (Walling, 2006).

Da wir durch das UPR Regulon mehrere aktivierte Signalwege beeinflussen können, untersuchten wir auch andere Klassen von Chemotherapeutika auf ihre Wirksamkeit unter ER Stress, namentlich Temozolomid (ein bei Glioblastomen eingesetztes alkylierendes Zytostatikum), Doxorubicin (ein DNA-Interkalans) und 5-Fluorouracil (ein Basenanalogen).

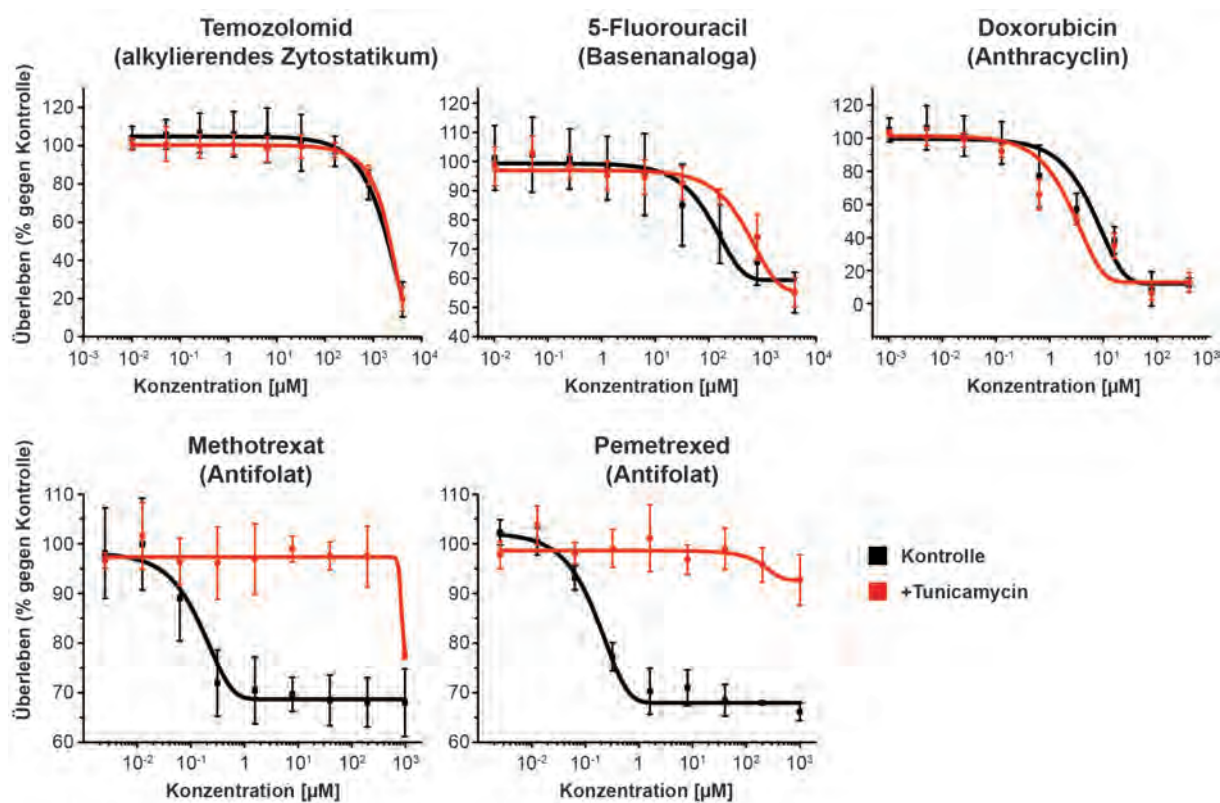


Abbildung 3.31: Die UPR führt zur Resistenz von Zellen gegen Antifolate.

LN308-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Chemotherapeutika für 24 h behandelt. Parallel dazu wurde die UPR mit 2,5 µg/ml TM (rote Linie) induziert. DMSO diente als Kontrolle (schwarze Linie), bei der die UPR nicht aktiviert wurde. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTA-Assay ermittelt. Dabei wurden die Überlebensraten in % der Vitalität nicht mit Chemotherapeutika behandelter Zellen angegeben. Die angepasste Kurve wurde anhand der Sigmoidfunktion nach Boltzmann erstellt. Dargestellt sind die Messwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Die Sensitivität von LN308-Zellen gegenüber Temozolomid und Doxorubicin war unter Induktion der UPR unverändert. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir mit 5-Fluorouracil, für welches wir eine nahezu unveränderte mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) berechneten. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung der UPR zu einer nahezu kompletten Resistenz für die Antifolate Methotrexat und Pemetrexed (Abb. 3.31). Unter Inkubation mit TM ermittelten wir eine Veränderung der IC_{50} von Methotrexat um den Faktor 10.000. Nach UPR Induktion zeigten sich LN308-Zellen auch bei hohen Konzentrationen resistent gegen Pemetrexed. Eine Ermittlung der IC_{50} unter ER Stressbedingungen war deshalb nicht möglich. Der IC_{50} -Wert von Pemetrexed wird durch Koinkubation mit TM mehr als 10.000fach erhöht.

Um eine zellspezifische Resistenz von LN308 gegen die Antifolate Methotrexat und Pemetrexed auszuschließen, untersuchten wir die Wirkung von Methotrexat auf stabile Flp-In T-Rex 293 Zellen mit der phosphomimetischen Variante von eIF2 α (S51D). Im Gegensatz zu der aus einem Astrozytom gewonnen LN308-Zellen stammt die Flp-In T-Rex 293 Zelllinie aus HEK293 (humane embryonale Nierenzellen) und wurde durch Transfektion mit Adenovirus DNA immortalisiert.

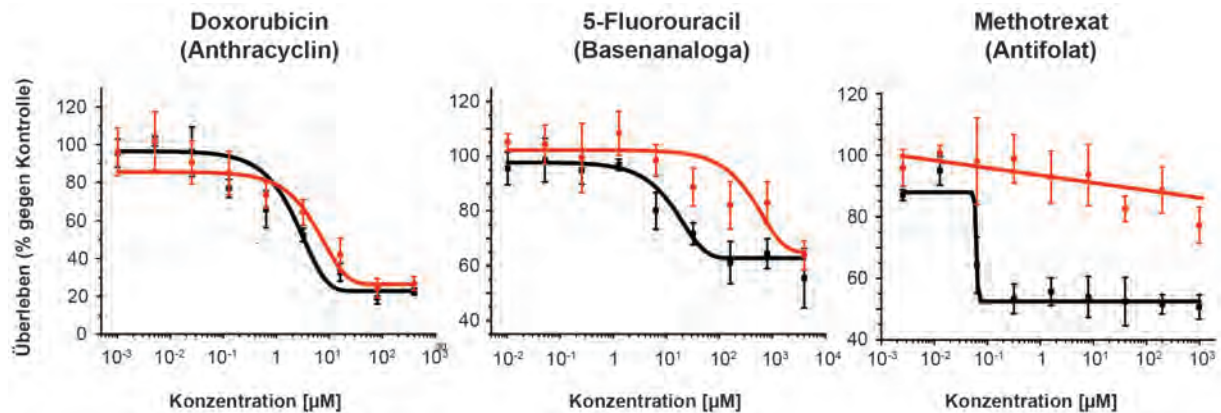


Abbildung 3.32: Die Induktion der UPR führt zur Resistenz von Flp-In T-REx 293 Zellen gegen Antifoliate. Die Vitalität stabiler Flp-In T-REx Zellen wurde unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen verschiedener Chemotherapeutika mittels MTA-Assay ermittelt. Dazu wurde die phosphomimetische Mutante von eIF2 α (S51D) induziert (rote Linie). DMSO diente als Kontrolle (schwarze Linie), bei der die Mutante nicht exprimiert wurde (schwarze Linie). 24 h nach Induktion von eIF2 α -S51D wurden die Zellen für weitere 24 h mit den genannten Konzentrationen der Chemotherapeutika inkubiert. Zur Normalisierung wurden die Überlebensraten der Zellen in % der Vitalität nicht mit Zytostatika behandelter Kontrollzellen dargestellt. Die angepasste Kurve wurde anhand der Sigmoidfunktion nach Boltzmann erstellt. Dargestellt sind die Messwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Durch die Expression der phosphomimetischen eIF2 α -Mutante konnten wir eine Erhöhung der IC₅₀ gegen Methotrexat in S51D-Zellen um mehr als 1.000fach induzieren. Dagegen war die Sensitivität der Zellen gegenüber Doxorubicin auch nach Induktion dieser Mutante noch gegeben. Für 5-Fluorouracil wiesen wir unter Expression der Mutante eine nur leichte, nicht signifikante Verschiebung der IC₅₀-Konzentration um Faktor 10 nach (Abb.3.32).

Mithin konnten wir in unterschiedlichen Zellen eine durch den PERK-Signalweg der UPR vermittelte Resistenz gegen Antifoliate zeigen. Auf diese Resistenz haben ATF6 und IRE1 α in unserem gezeigten Modell keinen Einfluss. Der Mechanismus der Resistenz wird unabhängig vom Zelltyp sowie dessen Transformationsstatus reguliert.

4. Diskussion

Trotz deutlich steigender Publikationszahlen innerhalb der letzten 20 Jahre (nach Entdeckung der drei verschiedenen Transmembranproteine bei Säugetieren) ist die UPR immer noch ein aktuelles Forschungsgebiet mit vielen ungeklärten Fragen. Die Auswirkungen von ER Stress und der folgenden UPR werden in immer mehr Signalwegen deutlich. Neben zahlreichen Einflüssen auf verschiedene Krankheiten wurde auch die Bedeutung der UPR für die Reprogrammierung von somatischen Zellen verdeutlicht (Simic et al., 2019). Diese Rückführung differenzierter Zellen in einen pluripotenten Zustand war ein wichtiger Schritt bei der Erforschung von Stammzellen, welche zahlreiche medizinische Anwendungen ermöglichen (Takahashi and Yamanaka, 2006, Takahashi et al., 2007). Darüber hinaus wurde die Beteiligung der UPR an der Bildung von Superkomplexen der Atmungskette aufgezeigt (Balsa et al., 2019). Der PERK-eIF2 α -ATF4-Signalweg fördert die Bildung dieser Superkomplexe durch die Induktion von SCAF1 (supercomplex assembly factor 1, auch als COX7A2L bezeichnet), wodurch die Funktion und die Stabilität dieser Komplexe der Atmungskette erhöht wird (Balsa et al., 2019, Schagger and Pfeiffer, 2000, Lenaz and Genova, 2012).

Aufgrund der Komplexität der UPR wurden bislang nur vereinzelte Gene und Proteine als Teil der ER Stressantwort identifiziert. Mit dieser Arbeit führten wir eine globale Analyse der UPR anhand eines Multi-Omics Ansatz durch und erstellten eine Liste von Genen, die mit großer Wahrscheinlichkeit durch die UPR reguliert werden, zuvor jedoch noch nicht mit dieser in Verbindung gebracht wurden. Diese Liste bezeichnen wir als UPR Regulon.

Das UPR Regulon

Die von uns generierte Gensammlung umfasst insgesamt 267 durch die UPR regulierte Kandidaten. Durch stringentes Filtern über die Selektion von Genen, die gemeinsam nach Induktion durch die Inkubation mit TM als auch mit TH reguliert werden, konnten wir substanzspezifische Effekte minimieren und dadurch zuverlässig noch nicht bekannte UPR Komponenten ermitteln. Aufgrund dieser starken Begrenzung können wir die Beteiligung von nicht in unserem UPR Regulon aufgelisteter Gene nicht vollständig ausschließen. Einzelne nur durch TM oder TH signifikant regulierte Gene sind eventuell falsch negativ deklariert. Diese müssen separat untersucht und validiert werden.

Durch die Validierung von SLFN5, ein zuvor noch nicht mit Stress in Verbindung gebrachtes Gen, überprüften wir das UPR Regulon. SLFN5 fördert die Malignität von Glioblastomen. Die Regulation dieses Faktors durch den PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg verbindet diese Komponente der UPR mit der Entstehung und Malignität von Hirntumoren sowie der Chemoresistenz dieser Tumore (Arslan et al., 2017, Hombach-Klonisch et al., 2018).

Neben SLFN5 identifizierten wir noch weitere interessante Kandidaten des UPR Regulons.

Weitere Kandidaten des UPR Regulons

Wir fanden im UPR Regulon nicht nur Kandidaten des PERK-eIF2 α -ATF4 Signalwegs (wie die genannten Kandidaten SLFN5, MTHFD2 und SHMT2), sondern auch Komponenten des ATF6- und des IRE1 α -XBP1-Arms der UPR. So konnten wir mit RCAN1 (Regulator of Calcineurin 1) einen Inhibitor der Calcineurin-vermittelten Transkription als durch ATF6 reguliert zeigen. RCAN1 führt zu einem verringerten Bedarf der Proteinfaltungsprozesse, fördert die Degradation von ungefalteten Proteinen und damit die Adaption an ER Stress (Belmont et al., 2008, Glembotski, 2014). Außerdem unterdrückt RCAN1 im Gegensatz zu SLFN5 das Wachstum von humanen Gliomzellen (Chen et al., 2017b). Als

XBP1-Zielgen wiesen wir GFPT1 (Glutamin—fructose-6-phosphate aminotransferase 1; auch GFAT1) nach. Dies verbindet die UPR mit dem Hexosamin Biosyntheseweg und der Aktivierung von ERAD (Wang et al., 2014, Denzel et al., 2014). Durch den Nachweis der Regulation bekannter ATF6- und XBP1-Zielgene konnten wir die Aktivierung aller Zweige der UPR zeigen.

Teil des UPR Regulons ist auch PTGS2 (Prostaglandin G/H synthase 2; auch COX-2 genannt). Die Regulation von PTGS2 durch die UPR unter Beteiligung von eIF2 α und ATF6 wurde bereits gezeigt (Rasheed and Haqqi, 2012, Cormenier et al., 2018). Möglicherweise führt die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren ATF4 und ATF6 zur Induktion von PTGS2 (Hai and Hartman, 2001). PTGS2 ist in vielen Tumoren exprimiert und spielt eine Rolle bei ihrer Entwicklung und ihrer Ausbildung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika oder Bestrahlung (Hashemi Goradel et al., 2019). Darüber hinaus wird PTGS2 auch in Gliomen exprimiert. Diese Expression nimmt mit der Malignität des Tumors zu und ist mit einer kürzeren Lebenserwartung von Patienten mit GBM assoziiert (Xu et al., 2014). PTGS2 ist daher ein interessanter Kandidat für die weitere Forschung an Gliomen.

Neben bereits mit der UPR in Verbindung gebrachten Genen konnten wir innerhalb des UPR Regulons mögliche neue Komponenten der UPR nachweisen. So konnten wir den unter Stressbedingungen bislang nur bei Hitzeschock reguliert nachgewiesenen Transkriptionsfaktor KLF5 (Krueppel-like factor 5) als neues Zielgen der UPR in unserem Multi-Omics Ansatz identifizieren. (Sun et al., 2015). KLF5 wird durch verschiedene Signalwege (Ras/MAPK) und Enzyme (PKC) reguliert. Der Transkriptionsfaktor ist essentiell bei der Differenzierung von Adipozyten und bei der Regulation des Zellzyklus sowie der Apoptose (Oishi et al., 2005, Dong and Chen, 2009). Aufgrund einer C/EBP β und C/EBP δ abhängigen Expression können verschiedene Transkriptionsfaktoren der UPR (ATF6 oder CHOP) unter ER Stressbedingungen die Induktion von KLF5 durch Dimerisierung regulieren.

LZTFL1 (Leucine Zipper Transcription Factor Like 1) ist ein weiterer durch die UPR regulierter Kandidat unserer Liste. Sowohl in Magen- als auch in Lungentumoren wirkt LZTFL1 als Tumorsuppressor (Wei et al., 2016). Zu Gliomen sind noch keine Daten verfügbar.

BEX2 (Brain Expressed X-Linked 2) ist als Onkogen in Mammakarzinomen bekannt (Naderi, 2019). Auch dieser Faktor wurde in unserem Datensatz durch die UPR reguliert. BEX2 spielt eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems sowie bei neurologischen Erkrankungen. Die Überexpression von BEX2 in Gliomen führt zu einer gesteigerten Zellmigration und Invasion (Zhou et al., 2013).

Wir identifizierten auch MXD1 (Max dimerization protein 1, auch MAD) unter den Genen des UPR Regulons. MXD1 ist ein bekannter transkriptioneller Repressor, ein mit MAX heterodimerisierender Antagonist von c-Myc (Ayer et al., 1993). In Astrozytomen wurde die inhibierende Wirkung von MXD1 auf die Tumorentstehung und die Proliferation von Tumorzellen nachgewiesen (Chen et al., 1995).

ISOC2 (Isochorismatase Domain Containing 2) wiesen wir ebenfalls im UPR Regulon nach. Anhand von Massenspektrometrie-Messungen handelt es sich bei ISOC2 um ein abundantes Protein. ISOC2 ist ein Inhibitor von p16INK4a (auch CDKN2A [Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A] genannt) (Huang et al., 2007). Durch die Hemmung von p16INK4a, welches CDK4 und CDK6 inhibiert und die Proliferation von Zellen negativ reguliert, ist ISOC2 selbst ein das Tumorwachstum förderndes Gen.

Transkriptionelle Regulation von mRNAs durch die UPR

Nicht berücksichtigt im UPR Regulon sind positive Veränderungen der Abundanz von Protein codierenden mRNAs unter ER Stress. Obwohl eine Vielzahl von Transkripten nach Inkubation mit TM und

TH reguliert wird, wirken nicht alle als Teil der UPR bei der Rückgewinnung der Homöostase oder der Apoptose (bei anhaltendem Stress). Aufgrund der Phosphorylierung von eIF2 α und der damit einhergehenden verringerten Translationsrate unter ER Stress werden viele mRNAs trotz erhöhter Abundanz schlechter translatiert. Dies kann unveränderte oder sinkende Proteinspiegel zur Folge haben. Im Vergleich zu den Proteinen des UPR Regulon können wir dadurch eine Funktion dieser Gene bei der UPR nur mit geringerer Sicherheit vorhersagen.

Durch die Induktion der UPR fanden wir neben der Zunahme der mRNA Abundanz auch eine negative Regulation von Transkripten. Diese Abnahme der Abundanz wird vermutlich durch RIDD (regulated IRE1-dependent decay) ausgelöst. Unter den herunter regulierten mRNAs analysierten wir solche, die Membranproteine codierten. Allerdings stimmen nur wenige publizierte RIDD-Zielgene mit den von uns gefundenen negativ regulierten mRNAs überein. Einige der bekannten Substrate der IRE1 α RNase, also RIDD-Ziele (zum Beispiel PDIA4 oder PER1), zeigten sogar eine erhöhte RNA-Abundanz nach Induktion der UPR. Im Gegensatz zu unseren Daten wurde auch eine Anreicherung von durch RIDD beeinflussten mRNAs für ER-lokalisierte Proteine beschrieben (Maurel et al., 2014). Mithin erscheint die Identifizierung von RIDD-Zieltranskripten unter ER Stressbedingungen nicht trivial. Es ist möglich, dass RIDD die Abnahme der Abundanz einzelner RNAs nicht alleine bestimmt.

Transkriptionelle Regulation von nichtcodierenden RNAs

Neben mRNAs reguliert die UPR nach unseren Ergebnissen auch eine Vielzahl nichtcodierender RNAs. Diese konnten wir nur im RNA-Seq und nicht beim Ribosome Profiling nachweisen. So sind nichtcodierende Transkripte auch nicht im UPR Regulon aufgelistet. Es wurde bereits gezeigt, dass nichtcodierende RNAs bei der Regulation der UPR eine wichtige Rolle übernehmen. Darüber hinaus kann die UPR auch die Expression spezifischer miRNAs steuern. Ein Beispiel hierfür ist miR-211, welche durch PERK induziert wird, und selbst durch Bindung an den proximalen Promoter die Expression von CHOP beeinflusst (Bartoszewska et al., 2013, McMahon et al., 2017, Maurel and Chevet, 2013, Chitnis et al., 2012).

Die stärkste Anreicherung nach Inkubation mit TM oder TH unter den miRNAs zeigten wir für miR-616 (log₂FC-Wert TM:2,76; TH:2,51). In HEK293- und HeLa-Zellen wurde bereits eine erhöhte Expression von miR-616 durch die UPR nachgewiesen (Dai et al., 2015). In Patienten mit Prostata- und Leberzellkarzinom wurde miR-616 verstärkt nachgewiesen. Dabei korrelierte die Expression mit einer schlechteren Überlebensprognose. In beiden Tumoren reguliert miR-616 Tumorsuppressoren (wie TFPI-2 [Tissue Factor Pathway Inhibitor 2] oder PTEN [Phosphatase and Tensin Homolog]), wodurch eine gesteigerte Proliferation sowie eine erhöhte Migration und Invasion von Tumorzellen zu beobachten war (Ma et al., 2011, Zhang et al., 2016). In Gliomen wurde für miR-616 eine erhöhte Expression nachgewiesen werden, was mit einer verstärkten Proliferation und Hemmung der Apoptose von Tumorzellen einhergeht (Bai et al., 2017). In unseren Untersuchungen identifizierten wir somit einen nichtcodierenden Kandidaten der UPR, der als Inhibitor von Tumorsuppressoren wirkt und damit den Verlauf maligner Erkrankungen beeinflusst.

Weitere signifikant hochregulierte miRNAs in unserer Analyse sind unter anderem miR-3929, miR-130B oder miR-635.

Neben miRNAs konnten wir auch durch die UPR signifikant regulierte long non-coding RNAs (lncRNA), small nuclear RNAs (snRNA) und small nucleolar RNAs (snoRNAs) identifizieren. Um diese nichtcodierenden RNAs aber sicher als Teil der UPR zu etablieren müssen allerdings weiterführende Versuche zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt werden. Zusammenfassend aber können wir

feststellen, dass durch die Generierung unserer Datensätze eine Auflistung geschaffen wurde, die nicht nur mRNAs, sondern auch verschiedene Typen nichtcodierender RNAs enthält, unter denen sich eine Vielzahl potenzieller UPR Komponenten befinden.

Neben hochregulierten RNAs konnten wir auch negativ regulierte, nichtcodierende RNAs identifizieren. Vier durch den RIDD-Signalweg der UPR abgebaute verschiedene miRNAs sind bereits beschrieben (Upton et al., 2012). Diese miRNAs wurden in unseren Versuchen jedoch entweder nicht signifikant reguliert oder aufgrund der geringen Abundanz nicht berücksichtigt. Allerdings identifizierten wir nach Inkubation mit TM und TH signifikant herunterreguliert sowohl miR-4740 als auch verschiedene lncRNAs (unter anderem PCAT14 oder LINC01630) und snRNAs. Ob diese RNAs durch RIDD oder über andere Mechanismen reguliert werden müssen weitergehende Versuche zeigen.

UPR-abhängige translationale Veränderungen

Die Analyse der Abundanz der RNAs durch die RNA-Sequenzierung und der aktiv translatierten mRNAs mittels Ribosome Profiling ermöglichte uns die Berechnung der durch die UPR vermittelten Änderungen der Translation. Wir wiesen eine generelle Abnahme der ribosomalen Beladung und damit eine Reduktion der Translation aufgrund der Phosphorylierung von eIF2 α durch PERK nach.

ATF4 wurde zur Validierung der Werte der ribosomalen Beladung herangezogen. ATF4 ist das bekannteste Beispiel einer mRNA, die nur unter Stress nach der Phosphorylierung von eIF2 α translatiert wird (Pavitt and Ron, 2012). Die translationale Regulation von ATF4 nach Inkubation mit TM wurde durch das Ribosome Profiling bereits nachgewiesen (Sidrauski et al., 2015). Wir stellten allerdings keinen signifikanten Anstieg der ribosomalen Beladung für ATF4 nach Induktion der UPR sowohl nach 2 als auch 6 h fest, sondern detektierten eine Steigerung der ATF4 mRNA-Spiegel mittels RNA-Sequencing. Dies ist vermutlich auf die im Vergleich zu publizierten Experimenten längere Inkubation mit TM zurückzuführen und erklärt die trotz unveränderter ribosomaler Beladung erhöhten ATF4-Proteinspiegel.

Aufgrund der schnellen Anpassung der Translation an ER Stress (Phosphorylierung von eIF2 α durch PERK) sind die gewählten Zeitpunkte zur unmittelbaren Detektion der Veränderungen aktiv translaterter mRNAs durch Ribosome Profiling möglicherweise zu lange gewählt. Zur Untersuchung der Translationsänderung wurden Zellen lediglich für 1h mit TM oder für 30 min in Natriumarsenit inkubiert (Sidrauski et al., 2015, Andreev et al., 2015). Darüber hinaus wird die ATF4 Translation als Teil der den PERK-Zweig der UPR beinhaltenden Integrated Stress Response (ISR) durch die Methylierung an N6 von Adenosin (m6A) reguliert (Zhou et al., 2018, Powers and Brar, 2018). Damit zeichnet sich ein komplexes Zusammenspiel verschiedener die Translation unter Stressbedingungen in zeitlicher Abhängigkeit regulierender Reaktionen ab.

Trotz der fehlenden translationalen Regulation von ATF4 detektierten wir einige mRNAs mit signifikanten Änderungen der ribosomalen Beladung. Während nach kurzer Inkubation (2 h) bei mehreren Kandidaten mit relativ geringer mRNA-Abundanz eine erhöhte ribosomale Beladung zu sehen war, zeigte sich dies später (6 h) vor allem für GLIS3. GLIS3 ist ein Transkriptionsfaktor der Krüppel-like Zinkfinger Proteine und unter anderem für die Funktion von Beta-Zellen verantwortlich. Somit spielt dieser Transkriptionsfaktor bei der Ausprägung von Typ1 und Typ2 Diabetes eine wichtige Rolle (Kim et al., 2003, Yang et al., 2013). In der 5'UTR von GLIS3 konnten wir potentielle uORFs identifizieren, die eine angepasste Translation nach Induktion der UPR erklären könnten. Neben GLIS3 konnten wir weitere Mitglieder der Krüppel-like Zinkfinger Proteine (wie KLF4 und KLF5) im UPR Regulon identifizieren. Dies weist auf eine Verbindung dieser Transkriptionsfaktoren zur UPR hin.

Neben einem Anstieg detektierten wir auch mRNAs, die nach Phosphorylierung von eIF2 α eine verringerte ribosomale Beladung und damit eine reduzierte Translation zeigten. Dies gilt insbesondere für BLID (BH3-Like Motif Containing, auch Cell Death Inducer genannt) und ZNF20 (Zinc Finger Protein 20). BLID ist ein proapoptotisches Protein und Teil der Bcl-2 Familie. Dagegen ist über ZNF20 sehr wenig bekannt (Broustas et al., 2010). Auch über die Ursache oder die Funktionen einer solchen Hypersensitivität von mRNAs gegenüber phosphoryliertem eIF2 α oder einer Ursache hierfür sind keine Daten vorhanden. Durch die verringerte Translation proapoptotische Proteine wie BLID kann die UPR Zeit zur Bewältigung von Stress im ER gewinnen. Diese Aussage muss aber noch durch eine genaue Analyse der Daten sowie vor allem durch experimentelle Validierung der Befunde bestätigt werden.

Insgesamt sollten diese Ergebnisse für die einzelnen Kandidaten mittels in vitro Translationsanalysen unter Zugabe von 35S-Methionin zum Nachweis der Translationsprodukte überprüft werden.

Veränderungen des Proteoms durch die UPR

Aufgrund der Dauer der Signalkaskaden, der Transkription sowie der Translation waren durch die Induktion der UPR hervorgerufene Veränderungen der Proteinspiegel erst nach 16 und 24 h zu sehen. Daher analysierten wir für die Aufstellung des UPR Regulons lediglich die Daten dieser späteren Zeitpunkte nach UPR Induktion.

Allerdings konnten wir, nur mit BiP als Ausnahme, die Proteine der UPR mittels MS-Shotgun-Verfahren nicht detektieren. Vor dem Hintergrund einer gesteigerten Transkription (wie CHOP) oder eine ausschließlich unter Stress stattfindenden Translation einzelner Gene (wie ATF4) konnten wir viele Proteine der UPR in unbehandelten Zellen nicht nachweisen. Darüber hinaus sind die drei Transmembranproteine PERK, IRE1 α und ATF6 niedrig abundant und daher mittels Shotgun-Verfahren nicht detektierbar. So etablierten wir eine „targeted Proteomics“ Methode zum Quantifizieren dieser Transmembranproteine sowie wichtiger Transkriptionsfaktoren der UPR (Nguyen et al., 2019). Mit diesem Verfahren wiesen wir die zelluläre Abundanz dieser UPR-Komponenten über eine Konzentrationsspanne von wenigen Hundert bis 60.000 Molekülen pro Zelle nach. Aufgrund ihrer Flexibilität und Reproduzierbarkeit kann diese experimentelle Methodik auch zur Untersuchung anderer Signalwege und Proteine verwendet werden.

Diese Analyse zeigt eine deutliche Erhöhung der Proteinspiegel der Transkriptionsfaktoren der UPR. Dagegen sind die Transmembranproteine nicht oder nur unmerklich reguliert. PERK und IRE1 α sind als Signaltransduktoren fest in der Membran des ER verankert und bleiben nach Induktion der UPR auf einem konstanten Niveau um auf weiteren Stress reagieren zu können. Bei einem deutlichen Anstieg beider Proteine muss parallel eine signifikante Steigerung von BiP erfolgen, damit in nicht gestresstem Zustand PERK und IRE1 α gebunden und inhibiert werden. Dahingegen wird die Transkription von ATF6, welches durch ER Stress im Golgi Apparat prozessiert wird und im Nukleus als Transkriptionsfaktor fungiert, über eine positive Rückkoppelung durch ATF6f reguliert (Namba et al., 2007). Somit ist trotz Prozessierung im ER eine kontinuierliche Menge von ATF6 als Transmembranprotein vorhanden.

Nach unseren Untersuchungen werden veränderte Proteinspiegel der Transkriptionsfaktoren ATF4, XBP1, CHOP und ATF3 vorwiegend durch Änderungen der Transkription gesteuert. Obwohl für eine gesteigerte Proteinproduktion von ATF4, ATF3 und CHOP neben der transkriptionellen auch eine translationale Regulation gezeigt wurde (Pavitt and Ron, 2012), sahen wir dies in unseren Experimenten nicht. Ein Anstieg dieser Transkriptionsfaktoren führt zu einer positiven Rückkoppelung und damit zu einer besseren Anpassung an Stress. Anhaltender ER Stress induziert dagegen über eine weiter

gesteigerte Proteinexpression von ATF4 und CHOP eine Depletion von ATP sowie oxidativen Stress und mündet letztlich in der Apoptose der Zelle (Han et al., 2013).

SLFN5 als neue Komponente der UPR

Zur Überprüfung des von uns aufgestellten UPR Regulons war SLFN5 ein geeigneter Kandidat, da wir nach Induktion der UPR sowohl mittels RNA-Sequencing als auch mittels Ribosome Profiling und Massenspektrometrie signifikante Änderungen auf der Ebene der mRNA oder des Proteins detektierten. Über SLFN5 ist wenig bekannt, doch wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression des Faktors und der Malignität von Gliomen gezeigt (Arslan et al., 2017). Eine veränderte Regulation durch Stress, wie zum Beispiel der UPR, wurde bei SLFN5 noch nicht nachgewiesen.

Unsere Untersuchungen zeigen die Regulation von SLFN5 durch den PERK-eIF2 α -ATF4-Signalweg der UPR. Die physiologische Rolle von SLFN5 wie auch die bei der UPR ist noch unklar. Allerdings wurde die durch den NLS bedingte nukleäre Lokalisation von SLFN5 nachgewiesen (Katsoulidis et al., 2010). Andere Gene der SLFN Familie haben unterschiedliche Funktionen in T-Lymphozyten oder bei der Replikation von Viren (Liu et al., 2018). Die Expression von SLFN5 in verschiedenen Tumoren führt zu unterschiedlichen Effekten. SLFN5 kann entweder als Tumorsuppressor fungieren, aber auch die Proliferation von Tumorzellen begünstigen (Sassano et al., 2015, Arslan et al., 2017). In malignen Gliomen ist SLFN5 vermehrt exprimiert. Weiterführende Experimente müssen zeigen, welche Funktionen SLFN5 hier, in ungestressten Zellen oder als Teil der UPR spielt.

Regulation des Serin Biosynthesewegs und des mitochondrialen 1C-Metabolismus

Das UPR Regulon verdeutlicht, dass die Anzahl der in die Adaption an ER Stress involvierten Gene und Proteine erheblich größer ist als bislang bekannt. Auch Gene des Serin Biosynthesewegs und des daran gekoppelten mitochondrialen 1C-Metabolismus wurden in diesem Zusammenhang von uns identifiziert. Stress durch ein Defizit an Aminosäuren wurde bereits mit Genen der Serin Biosynthese in Verbindung gebracht und auch die Regulation von MTHFD2 durch PERK als Teil der UPR ist bekannt (Adams, 2007, Harding et al., 2003). Gemeinsam zeigen diese zellulären Adaptionen an Stress die Aktivierung einer Kinase, die Phosphorylierung von eIF2 α und die anschließende aktive Translation des Transkriptionsfaktors ATF4. Dieser zentrale Effektor der sogenannten Integrated Stress Response (ISR) interagiert durch die Leucin-Zipper Domäne mit anderen Proteinen (wie ATF3 oder CHOP) und bestimmt dadurch den Ausgang der Stressantwort (Pakos-Zebrucka et al., 2016).

Aufgrund der unterschiedlichen, weiteren durch ER Stress aktivierten Signalwege (IRE1 α und ATF6) untersuchten wir nach Induktion der UPR unter Zugabe von spezifischen Inhibitoren essentielle Gene des mitochondrialen 1C-Metabolismus. Zur Bestätigung der Ergebnisse verwendeten wir zusätzlich mit zwei funktionell unterschiedlichen Mutanten von eIF2 α transfizierte Zellen. Dabei zeigten wir, dass sowohl MTHFD2 als auch SHMT2 durch den PERK-eIF2 α -ATF4-Signalweg der UPR reguliert wird. Wir sahen keine Veränderungen bei der Inhibition des IRE1 α - oder ATF6-Signalwegs. Die durch Stress bedingte Regulation des mitochondrialen 1C-Metabolismus unabhängig von IRE1 α und ATF6 legt nahe, dass ATF4 entweder als Homodimer oder mit durch ATF4 selbst induzierten Transkriptionsfaktoren interagiert.

Für ALDH1L2 als dritte Komponente des mitochondrialen 1C-Metabolismus sowie für PHGDH, PSAT1 und PSPH als Gene des Serin Biosynthese Signalwegs müssen weiterführende Versuche die Regulation durch ATF4 klären.

Resistenzbildung gegen Antifolate nach Induktion der UPR

Ein interessantes Ergebnis unserer Arbeit ist die durch ER Stress induzierte Entstehung einer Resistenz gegen zytostatisch wirkende Antifolate. Diese Resistenz unter ER Stress wiesen wir sowohl in LN308- als auch in HEK293-Zellen für die Antifolate Methotrexat und Pemetrexed nach. Wir sahen dies nicht bei anderen Zytostatika (wie 5-Fluorouracil, Doxorubicin oder Temozolomid). Diese Resistenz gegen Antifolate kann aufgrund einer UPR-vermittelten Regulation des mitochondrialen 1C-Metabolismus entstehen.

Zur Überprüfung unserer Vermutung führten wir knockdown Versuche mit LN308- und HEK293-Zellen durch. Um eine komplette Hemmung des Wachstums oder eine gesteigerte Apoptoserate der Zellen möglichst gering zu halten, regulierten wir MTHFD2 herunter. Aufgrund des Homologs MTHFD2L (Bifunctional Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/ Cyclohydrolase 2 Like) von MTHFD2, das nicht im UPR Regulon aufgelistet ist, stellten wir die Aufrechterhaltung des mitochondrialen 1C-Metabolismus sicher.

Allerdings erkannten wir bereits die Ausbildung der Resistenz gegenüber Antifolaten nach Transfektion mit den siPools gegen MTHFD2 und auch der Kontrolle ohne Induktion der UPR. Dies wiesen wir bei mit TM inkubierten LN308 und den durch Tetracyclin-induzierten HEK293 mit der phosphomimetischen Mutante von eIF2 α (S51D) nach. Die Transfektion von siRNAs mit Lipofectamin 2000 aktiviert die UPR (Li et al., 2019). Dadurch ist die weitere Verwendung dieses Transfektionsreagens ungeeignet, da LN308 und HEK293 trotz fehlender Inkubation mit TM oder Induktion durch Tet bereits eine Resistenz gegenüber Antifolaten ausbildeten.

Unter Hypoxie wurde eine totale Antifolatresistenz in HeLa Zellen aufgrund eines angehaltenen Zellzyklus nachgewiesen (Raz et al., 2014). Hypoxie, wie die UPR und andere Arten von Stress zusammengefasst zur ISR, führt ebenfalls zur Phosphorylierung von eIF2 α (Pakos-Zebrucka et al., 2016). Durch die globale Inhibition der Translation nach eIF2 α -Phosphorylierung – mit wenigen Ausnahmen wie ATF4 – wird die Proliferationsrate von Zellen unter ER Stress erheblich verringert.

Dies konnten wir durch Proliferationsexperimente bestätigen. Nach Induktion der UPR befanden sich LN308-Zellen zunächst in einer länger anhaltenden lag-Phase, bevor sich eine Proliferation einstellte. Der Wirkmechanismus von Antifolaten beruht auf der Inhibition von Enzymen des Folat-Zyklus, welche Folsäure zu Dihydrofolat (DHF) und DHF zu Tetrahydrofolat (THF) hydrieren. Damit wird die Biosynthese von Nukleotiden und die DNA Replikation gestört. Aus diesem Zellzyklus-abhängigen Wirkmechanismus resultiert, dass nur proliferierende Zellen sensitiv gegenüber Antifolaten sind.

Die Entstehung der Resistenz gegen Antifolate kann daher entweder durch die UPR vermittelte Regulation des mitochondrialen 1C-Metabolismus oder einer gehemmten Proliferation vermittelt werden.

Allerdings stellten wir im Gegensatz zu den postulierten Veränderungen der Enzyme des Folat-Zyklus unter Hypoxie keine signifikante Regulation der oben genannten Proteine nach Induktion der UPR fest (Raz et al., 2014). Trotz gemeinsamer Phosphorylierung von eIF2 α und Translation von ATF4 deutet dies auf eine unterschiedliche Antwort der UPR im Vergleich zu Stress durch Hypoxie hin. Durch Induktion der phosphomimetischen eIF2 α -Mutante S51D identifizierten wir allerdings den PERK-eIF2 α -ATF4-Zweig der UPR als Resistenz gegen Antifolate übermittelnden Signalweg. Dies deutet darauf hin, dass die Enzyme des Folat-Zyklus unter Hypoxie durch andere Faktoren herunterreguliert werden.

Für den vollständigen Nachweis der Entstehung der Resistenz gegen Antifolate aufgrund der Phosphorylierung von eIF2 α durch PERK nach Induktion der UPR können andere Kinasen der ISR in weiterführenden Versuchen untersucht werden. Hierbei können die vier einzelnen Kinasen durch verschiedene Substanzen oder auch der Effekt der Phosphorylierung von eIF2 α durch ISRIB inhibiert werden. ISRIB unterbindet Translationsänderungen trotz Phosphorylierung von eIF2 α als Antwort verschiedener Arten von Stress, indem die Bildung von Stress Granules gehemmt wird (Sidrauski et al., 2015). Dadurch sollte trotz Induktion der UPR mit TM oder TH die Sensitivität von Zellen gegenüber Antifolaten erhalten bleiben.

Zusammenfassend konnten wir durch die hier dargestellten Multi-Omics Ansätze eine Vielzahl von Genen identifizieren, die bis dato noch nicht mit der UPR in Verbindung gebracht wurden. Durch die Betrachtung Protein codierender Gene, die eine erhöhte Syntheserate nach UPR-Induktion aufweisen und damit vermutlich eine Funktion bei der Antwort auf ER Stress haben, konnten wir das UPR Regulon definieren. Anhand dieser Datensammlung potenzieller Kandidaten konnten wir SLFN5 als Teil der UPR nachweisen. Darüber hinaus identifizierten wir den Serin-Biosyntheseweg sowie den mitochondrialen 1C-Metabolismus als Teil der UPR. Da der mitochondriale 1C-Metabolismus seit vielen Jahren als Ansatzpunkt für die Chemotherapie durch Antifolate gilt, konnten wir eine weitere Verbindung zwischen der UPR und Tumoren herstellen. Dabei zeigte sich auch, dass durch die Aktivierung der UPR sowohl LN308- als auch HEK293-Zellen eine Resistenz gegenüber Antifolaten aufweisen.

Der Mechanismus dieser Antifolatresistenz konnte durch unseren Ansatz noch nicht identifiziert werden, welcher in weiterführenden Studien ermittelt werden muss. Diese Übermittlung der Resistenz gegen Antifolate kann bei der Behandlung verschiedener Tumore eine zentrale Rolle spielen. Durch eine gezielte Steuerung der UPR könnten verschiedene Krebsarten gegenüber Antifolaten sensitiviert werden und damit eine Erweiterung der Chemotherapie darstellen.

Des Weiteren konnten wir durch die Aufstellung des UPR Regulons einen Datensatz generieren, der nicht nur die oben genannten Gene und Synthesewege mit ER Stress assoziiert. Viel mehr soll das UPR Regulon Ansätze für die weitere Erforschung liefern und neue Gene identifizieren, die als Teil der UPR an der Antwort auf ER Stress beteiligt sind.

5. Methoden

5.1 Methoden in der Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ (zugesetzt zur Atmosphärenluft) bei hoher Luftfeuchtigkeit in DMEM Medium mit 10% fetalem Rinderserum (FBS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Verschiedene Selektionsantibiotika zur Etablierung stabiler HEK Flp-In TRex Zellen wurden wie unter 5.1.1 beschrieben benutzt.

Alle Zelllinien wurden wöchentlich zweimal unter Verwendung von Trypsin-EDTA (0,25%; Thermo Fisher Scientific) passagiert.

5.1.1 Zellen einfrieren und auftauen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese in T175-Zellkulturflaschen bis zu einer Dichte von 90% kultiviert. Die Zellen wurden trypsiniert, bei 125x G für 5 min pelletiert und anschließend in 4 ml Einfriermedium (DMEM mit 20% FBS und 10% DMSO) pro T175-Flasche resuspendiert. Aliquots à 1 ml wurden in Cryo-Röhrchen abgefüllt, über Nacht (üN) in Isopropanol bei -80°C inkubiert und daraufhin in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Zellen wurden beim Auftauen möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C erwärmt und direkt in Kulturmedium überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt um nicht angewachsene Zellen, Zelltrümmer und restliches DMSO zu entfernen.

5.1.2 Herstellung stabiler induzierbarer Flp-In T-REx 293

Das Flp-In™ 293 T-REx System (Thermo Fisher Scientific) ermöglicht die schnelle Herstellung stabiler Zelllinien mit einer homogenen Proteinexpression. Die Flp-In™ 293 T-REx Zellen besitzen eine stabil integrierte FRT (Flippase [Flp] recognition target) Erkennungssequenz an einer transkriptionell aktiven genomischen Stelle. Durch Ko-Transfektion der Zellen mit dem Flp-In™ Expressionsvektor und dem Vektor der Flp Rekombinase, pOG44, wird eine gezielte Integration des Expressionsvektors mit dem zu transfizierenden Gen am gleichen Locus jeder Zelle erzielt. Dadurch wird eine homogene Genexpression sicher gestellt.

Zur Herstellung stabiler induzierbarer Flp-In T-REx 293 Zelllinien wurden die Zellen zunächst mit Zeocin (100 µg/ml) und Blastocidin (10 mg/ml; beide Thermo Fisher Scientific) kultiviert und 24 h vor Transfektion ohne Selektionsantibiotika in 6-Kavitäten Platten ausgesät. Im Verhältnis 9:1 wurden die Zellen mit pOG44 und pcDNA5-FRT/TO mit Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) ko-transfiziert und nach 24 h in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen durch die Zugabe von Blastocidin (10 µg/ml) und Hygromycin B (50 µg/ml; Thermo Fisher Scientific) in einer 15 cm Zellkulturschale selektioniert. Klone wurden 10-14 Tage nach Selektionsstart ausgewählt, bei einer Hygromycin B Konzentration von 100 µg/ml vereinzelt kultiviert und auf die Sensitivität für Zeocin, Induzierbarkeit mit Tetracyclin (1 µg/ml; Thermo Fisher Scientific) sowie die Stärke der Expression getestet. Positive Klone wurden in Selektionsmedium weiter kultiviert und Stammkulturen angelegt (siehe 5.1.1). Zur Induktion wurden die Zellen mit Tetracyclin im Selektionsmedium für die angegebenen Zeitintervalle behandelt.

5.1.3 Transfektion von Säugetierzellen

LN308 und HEK293 wurden mit pCDNA5-FRT/TO-Vektoren transient mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Dazu wurden die Zellen 24 h zuvor in 6 cm oder 10 cm Zellkulturschalen mit einer Dichte von ~90% ausgesät. Nach den Anweisungen des Herstellers wurden 5 µg pCDNA5-FRT/TO und 10 µl Lipofectamine 2000 für 6 cm Schalen oder 10 µg Plasmid und 20 µl Lipofectamine 2000 für 10 cm Schalen für die Transfektion verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte 6 h nach Transfektion, die Ernte 24 h oder 48 h nach Transfektion.

5.1.4 Proliferationsassay

Zur Detektion der Zellproliferation wurde der CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) von Promega (Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA) verwendet. Hierzu wurden 1×10^4 LN308-Zellen oder 2×10^4 Flp-In T-Rex 293 eIF2 α S51D Zellen in 96-Kavitäten Platten ausgesät. Für die Flp-In T-Rex 293 eIF2 α S51D Zellen wurden die Platten für 3 h mit Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) inkubiert und nach Absaugen für mindestens 1 h an der Luft getrocknet. Mit den entsprechenden Konzentrationen der Chemotherapeutika wurden die LN308-Zellen mit oder ohne TM behandelt oder Flp-In T-Rex 293 eIF2 α S51D Zellen mit oder ohne Tetracyclin induziert. Nach der Behandlung wurde das Medium abgesaugt, 100 µl der verdünnten MTS-Lösung für 30 min bis zu 1 h zugegeben und die Extinktion bei 490nm bestimmt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA durch PCR wurde entweder mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc. (NEB), Ipswich, Massachusetts; oder selber hergestellt) oder Taq DNA Polymerase (NEB) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. In Tabelle 6.4 sind die verwendeten Primer aufgelistet. Der Standard-PCR-Reaktionsansatz wurde aus folgenden Komponenten hergestellt:

Tabelle 5.1: Genereller PCR-Ansatz für Phusion High Fidelity (HF) oder Taq-DNA Polymerase

PCR-Ansatz, 50µl	Phusion	Taq
DNA-Template	<250 ng	<1.000 ng
5x Phusion HF Puffer	10 µl	---
10x Taq Reaction Puffer	---	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl	1 µl
10 µM Primer forward	1 µl	1 µl
10 µM Primer reverse	1 µl	1 µl
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	---
Taq DNA Polymerase	---	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl

Die PCR wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt, wobei die Annealing-Temperatur abhängig von den Schmelztemperaturen der Primerpaare war:

Tabelle 5.2: Schema für die PCR mit Phusion High Fidelity oder Taq-DNA Polymerase

	Phusion	Taq
Initiale Denaturierung	98°C, 2 min	95°C, 3 min
Denaturierung	98°C, 20 sec	95°C, 30 sec
Annealing	X°C, 20 sec	X°C, 20 sec
Elongation	72°C, 30 sec/kb	68°C, 60 sec/kb
Finale Elongation	5-10 min	5-10 min

Zur Detektion der DNA wurde die PCR auf einem Agarosegel überprüft und mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) aufgereinigt.

5.2.2 Mutagenese durch überlappende PCR

Einzelne Mutationen wurden durch die Methode der PCR mit überlappenden Verlängerungen in dsDNA in zwei aufeinander folgenden PCRs eingefügt (Heckman and Pease, 2007). Dabei wurden zwei innere, überlappende Primer bei der zu mutierenden Stelle und zwei äußere Primer des kompletten, zu amplifizierenden DNA-Abschnitts verwendet. Bei der ersten PCR wurden zwei Produkte hergestellt, die vom 5'-Ende bis zur Mutation beziehungsweise vom 3'-Ende bis zur Mutation jeweils mit Überhängen amplifiziert wurden. Beim zweiten Schritt wurden beide PCR-Produkte als Template in äquimolarem Verhältnis eingesetzt und mit den äußeren Primern amplifiziert.

5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA Fragmente wurden auf 0,7-2% (Gewicht/Volumen [w/v]) Agarosegele durch Elektrophorese bei 100 V in 1x TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) getrennt. Um die DNA bei UV-Licht sichtbar zu machen wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt und im ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, USA) detektiert. Bei präparativen Agarosegelen wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel heraus geschnitten und die DNA mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.2.4 Bestimmung von DNA und RNA Konzentrationen

Die Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Proben wurde durch die Messung der Absorption am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

5.3 Molekulare Klonierung

Die während dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind in Tabelle 6.8 und die verwendeten Primer in den Tabellen 6.4 und 6.5 aufgelistet.

5.3.1 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau bei 37°C von PCR Produkten für 1 h oder DNA-Plasmiden (ca. 5 µg) für 3 h wurde mit den entsprechenden HF Restriktionsenzymen (NEB) in einem Volumen von 20-50 µl durchgeführt. Verdaute PCR Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, verdaute Plasmide zuerst über ein Agarosegel und anschließender Gel-Aufreinigung (siehe 5.3.3) extrahiert.

5.3.2 Ligation und Transformation in E.coli

Mit Hilfe der T4 DNA Ligase (NEB) wurden DNA-Fragmente in linearisierten Vektoren ligiert. Hierbei wurden 50 ng verdauter, aufgereinigter Vektor mit verdautem DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit 200 U T4 DNA Ligase und 1x T4 DNA Ligase Puffer in einem 10 µl Ansatz bei Raumtemperatur (RT) für 2 h inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde anschließend in 50 µl chemisch kompetente E.coli TOP10 transformiert. Dabei wurden die Bakterien zunächst für 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C wurden die Bakterien für weitere 5-10 min auf Eis gelagert. Für die Ampicillin-Selektion wurden die Bakterien direkt auf LB-Platten (lysogeny broth) mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei anderen Antibiotika-Resistenzen wurden die Bakterien vor dem Ausplattieren mit 500 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C leicht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (für Mini Präparation) oder 50 ml LB-Medium plus Antibiotikum (für Midi Präparation) mit einzelnen Kolonien inokuliert und über Nacht bei 37°C mit kontinuierlichem Schütteln inkubiert.

Für Retransformationen wurden nur 10-20 ng Plasmid mit dem oben beschriebenen Protokoll verwendet.

5.3.3 Extraktion von Plasmid-DNA und Sequenzierung

Für die Extraktion von Plasmid DNA wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit oder das QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurden 400-500 ng der aufgereinigten DNA mit 2,5 µM des passenden Sequenzierprimers bei der Firma GATC Biotech AG (GATC

Biotech AG, Konstanz, Deutschland; seit 2017: Eurofins Scientific SE, Luxemburg) sequenziert.

5.4 RNA-basierte Methoden

5.4.1 RNA Isolation

RNA-Extraktionen aus Zellen wurden mit TRIzol Reagenz (Thermo Fisher Scientific) laut den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 0,5 ml TRIzol bei einer 6 cm Zellkulturschale verwendet, direkt auf die Zellen gegeben, die Zellen abgespült und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach maximal 5 min Inkubation wurden 120 µl Chloroform hinzugegeben, das Reaktionsgefäß invertiert und anschließend bei 21.000x G und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Isopropanol bei -20°C für mindestens 2 h gefällt.

Um RNA aus Flüssigkeiten zu extrahieren wurde die Probe mit dem gleichen Volumen an Roti®-Aqua-P/C/I 25:24:1 (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) vermischt, geschüttelt und für mindestens 15 min bei 21.000x G und 4°C zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen (Vol) Chloro-

form versetzt und erneut bei 21.000x G und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 0,1x Vol NaOAc, 2 µl linearem Acrylamid und 2x Vol EtOH für mindestens 2 h bei -20°C präzipitiert. Die RNA wurde nach Inkubation durch Zentrifugation bei 21.000x G bei 4°C für 30 min gefällt. Die sedimentierte RNA wurde mit 80% EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in Nuklease-freiem Wasser (behandelt mit Diethylidicarbonat [DEPC]) resuspendiert.

5.4.2 DNase Verdau für RNAseq Proben

Zur Vorbereitung für die Transkriptionsanalyse wurden die Proben mit TurboDNase (Thermo Fisher Scientific) verdaut. Dazu wurden, nach Aufreinigung mit TRIzol Reagenz, 10 µg der RNA in einem 50 µl Ansatz mit 2 U TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific) für 30 min bei 37°C verdaut, um die restliche, kontaminierende DNA zu entfernen. Nach Inkubation wurde die RNA mit 0,1x Vol NaOAc, 2 µl linearem Acrylamid und 2x Vol EtOH präzipitiert und anschließend in 10 µl DEPC H₂O resuspendiert.

5.4.3 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde aufgereinigte RNA nach TRIzol-Extraktion verwendet. Dabei wurden 2,5 µg RNA für die Reaktion eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µl OligodT Primer (10 µM) vermischt, mit DEPC H₂O auf 13,5 µl aufgefüllt und bei 65°C für 5 min denaturiert. Nach Abkühlen wurden 4 µl 5x First Strand Puffer (FS; Thermo Fisher Scientific), 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTPS (10 µM) und 0,5 µl SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) zum Reaktionsansatz gegeben und für 1 h bei 50°C inkubiert. Durch Hitzeinaktivierung bei 85°C für 5 min wurde die Reaktion gestoppt. Durch optionale Zugabe von 1 µl RNase H (Thermo Fisher Scientific) und anschließender Inkubation für 20 min bei 37°C konnte die RNA abgebaut werden.

5.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR wurde RNA zunächst in cDNA revers transkribiert (siehe 5.4.3), und die cDNA 1:5 mit Nuklease-freiem H₂O verdünnt. Pro Ansatz wurden 10 µl SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), 250 nM vorwärts und 250 nM reverse Primer und 1 µl cDNA (nach 1:5-Verdünnung) in 20 µl Endvolumen verwendet. Jede Probe wurde in technischen Triplikaten bestimmt. Die qRT-PCR wurde auf einem CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) laut EvaGreen Protokoll mit Enzymaktivierung bei 98°C für 1 min, Denaturierung bei 98°C für 5 sec und Annealing- sowie Elongationsschritt bei 58°C für 15 sec mit 40 Zyklen durchgeführt. Nach der PCR wurde eine Schmelzkurve von 60-95°C mit Schritten von 0,5°C/5 sec gemessen. Die Analyse der Daten und die Berechnung der logarithmischen Veränderungen (\log_2FC) wurden nach dem mathematischen Model nach Pfaffl (Pfaffl, 2001) durchgeführt. Die Werte wurden auf GAPDH normalisiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6.5 aufgelistet.

5.4.5 Polyacrylamid Harnstoff Gelelektrophorese für RNA und DNA

Zum Auftrennen und anschließender Aufreinigung kleiner RNA- und DNA-Moleküle wurden Polyacrylamid (PAA) Harnstoff Gele verwendet. Dazu wurden Lösungen mit 7-8 M Harnstoff, 10-15% Polyacrylamid und 1x TBE in Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Für das Gel wurden 40 ml der Lösung mit 300 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS) und 30 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) für mindestens 1 h polymerisiert. Vor der Beladung wurde das Gel bei 250 V für etwa 30 min vorgewärmt und die Geltaschen zum Entfernen des überschüssigen Harnstoffs gespült. Die RNA und DNA wurde mit 2x Formaldehyd-Ladepuffer (2x FA) gemischt, für 90 sec bei 80°C erhitzt und in die Geltaschen

geladen. Die RNA/DNA wurden bei 15 W für 1,5-2 h auf den PAA Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Die DNA nach PCR Amplifikation wurde nach der Zugabe von 2x FA-Puffer nicht erhitzt, sondern direkt in die Geltaschen geladen und bei 250 V getrennt. Die Gele wurden mit SYBR Gold (1:10.000 in 1x TBE-Puffer) für 3 min bei RT und leichtem Schütteln gefärbt und mit dem ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) visualisiert. Die entsprechenden Gelbanden wurden ausgeschnitten und mit 400 µl RNA/DNA Gel Extraktionspuffer zunächst für 30 min in Trockeneis inkubiert. Anschließend wurde die RNA/DNA durch Schütteln bei RT über Nacht extrahiert und danach mit 2x Vol EtOH bei -80°C für mindestens 2 h gefällt.

Tabelle 5.3: Zusammensetzung 2x FA-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
2x FA-Puffer	90% (Volumen/Volumen [v/v]) Formamid; 10 mM EDTA (pH 8,0); Bromphenolblau; Xylencyanol

5.5 Biochemische Methoden

5.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Herstellung von Zell-Lysaten wurde entweder 1x unmodifizierter RIPA-Puffer (mit Proteinaseinhibitor) oder, um den Zellkern ebenfalls zu lysieren, 1x modifizierter RIPA-Puffer (mit Proteinaseinhibitor) verwendet. Zellsedimente wurden mit dem entsprechenden Volumen an RIPA-Puffer resuspendiert, bei 4°C 20 min inkubiert und anschließend bei 4°C und 21.000x G für 10 min zentrifugiert. Um genomische DNA zu entfernen wurde der Überstand bei Lyse mit 1x modifizierter RIPA-Puffer zusätzlich mit QIAshredder (Qiagen) durch 2 min Zentrifugation bei 21.000x G aufgereinigt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC™ Protein Assay (Bio-Rad) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt.

Tabelle 5.4: Zusammensetzung RIPA-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
1x unmodifizierter RIPA-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1% (w/v), NP-40; 0,1% (w/v) SDS; 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat
1x modifizierter RIPA-Puffer	20 mM Tris (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1% (w/v), NP-40; 2% (w/v) SDS; 5 mM EDTA

5.5.2 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine wurden 30-50 µg Lysat pro Tasche beladen und entweder mit einem 6% oder 10% Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Dazu wurde das Lysat mit 2x Laemmli Puffer versetzt und bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V im Bereich des Sammelgels und anschließend bei 120 V im Bereich des Trenngels mit 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt.

Tabelle 5.5: Zusammensetzung der SDS-PAGE Komponenten

Gel/Puffer	Zusammensetzung
SDS-PAGE Sammelgel	5% (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung (37,5:1); 125 mM Tris (pH 6,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED
SDS-PAGE Trenngel	6-10% (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung (37,5:1); 375 mM Tris (pH 8,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED
2x Laemmli Puffer	100 mM Tris (pH 6,8); 2% (w/v) SDS; 20% (w/v) Glycerol; 0,2 M DTT; Bromphenolblau
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS

5.5.3 Western Blot

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine zur weiteren Detektion auf eine Nitrocellulose Membran (Amersham™ Protran® Premium 0.45 NC, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) übertragen. Dazu wurden die Membran und sechs Whatman Papiere (Whatman 3MM Blotting papers; GE Healthcare) vorbereitet und in Transferpuffer (Bio-Rad) eingeweicht. Drei Whatman Papiere, die Membran, das Gel und die weiteren drei Whatman Papiere wurden von Anode nach Kathode laut Anleitung übereinander gelegt und mit dem Trans-Blot® Turbo™ Blotting System (Bio-Rad) bei konstanten 1 mA für 30 min geblottet. Die Membran wurde anschließend in TBS-T mit 3% BSA für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 6.9) in der entsprechenden Verdünnung in TBS-T mit 5% Milch (Carl Roth) für 2 h bei RT oder üN bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde wiederum dreimal mit TBS-T gewaschen und mit einem passenden Zweitantikörper (1:10.000 verdünnt in TBS-T mit 5% Milch; siehe 6.7) für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Daraufhin wurde die Membran zweimal mit TBS-T sowie TBS gewaschen. Die Proteine wurden mit dem Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) laut Herstellerangaben detektiert und auf dem ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad) visualisiert.

Bei Mehrfachdetektion wurde die Membran mit TBS gewaschen und anschließend zweimal für 10 min bei RT unter Schütteln in Stripping Puffer inkubiert. Die so behandelte Membran konnte für die Detektion weiterer Proteine verwendet werden.

Tabelle 5.6: Zusammensetzung Stripping Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Stripping Puffer	0,2 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS; 1% (v/v) Tween20; pH 2,2

5.6 Ribosome Profiling

HEK293- oder LN308-Zellen wurden für die entsprechenden Zeitpunkte unbehandelt oder mit 2,5 µg/ml TM bzw. 200 nM TH (beide Sigma-Aldrich) behandelt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Translation der mRNA durch Zugabe von 100 µg/ml Cycloheximid (CHX;

Sigma-Aldrich) und 5-minütiger Inkubation gestoppt. Für die Ernte bei 4°C wurden das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS + CHX gewaschen und mit einem Zellspatel von der Zellkulturschalen abgeschabt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 1.500x G für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Zellen einer 15 cm Zellkulturschale wurden mit 300 µl hypotonischem Lysepuffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 21.000x G wurde die RNA-Konzentration des Lysats mittels NanoDrop-Messung bestimmt.

Für den weiteren Verlauf der Gradienten wurden 200-300 µg RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,2 U RNase I / 1 µg RNA (Thermo Fisher Scientific) für 15 min bei 25°C (HEK293) oder 0,175 U RNase I / 1 µg RNA bei 4°C (LN308) verdaut. Eine Probe ohne RNase I diente als Kontrolle des Verdaus. Nach Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 U Superaseln (Thermo Fisher Scientific) gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf 12 ml 10%-50% Sucrose-Gradienten, welche mit Hilfe des 107 Gradient Master IP (BioComp Instruments, Fredericton, Kanada) hergestellt wurden, vorsichtig geschichtet. In einem SW-41 Rotor wurden die Proben für 3 h bei 35.000 rpm in der Optima™ LE-80K Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) und 4°C ultrazentrifugiert.

Mittels des ÄKTA FPLC Systems (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) wurden die ribosomalen Untereinheiten von den Monosomen- und Polysomen-Fractionen getrennt. Durch die Unterschichtung mit einer 60%igen Sucrose-Lösung bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurden die Gradienten beginnend mit dem niedrigsten Zuckergehalt fraktioniert. Die RNA der Monosomen-Fractionen nach RNase I Verdau wurden anschließend mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; P/C/I) aufgereinigt. Zunächst wurden die Fractionen 1:1 mit DEPC behandeltem H₂O verdünnt, um einen Phasenwechsel zu vermeiden. Die Proben wurden mit 1x Vol P/C/I vermischt und bei 21.000x G und 4°C für mindestens 20 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt und wiederum bei 21.000x G und 4°C für 20 min zentrifugiert. Erneut wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und die RNA mit 0,1x Vol 3 M NaOAc (pH 5,2), 2,5 µl GlycoBlue und 2x Vol 100% EtOH bei 80°C über Nacht gefällt.

Die aufgereinigte RNA wurde anschließend bei 21.000x G und 4°C für mindestens 30 min zentrifugiert, mit 80% EtOH gewaschen und in 30 µl DEPC H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl 2x FA Puffer und Denaturierung bei 80°C für 90 sec wurde die RNA auf einem 15% PAA 8 M Harnstoff TBE-Gel bei 15 W aufgetrennt (siehe 5.4.5). Die Banden wurden mit SYBR Gold (1:10.000 in 1x TBE Puffer) für 3 min bei leichtem Schütteln detektiert und mit dem ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) entwickelt. Die vom Ribosom geschützten RNA Fragmente der Länge 27 nt – 33 nt wurden aus dem Gel geschnitten und mit 400 µl RNA Extraktionspuffer aufgereinigt. Dabei wurden die Gelausschnitte zunächst für 30 min auf Trockeneis und anschließend über Nacht bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Daraufhin wurde die RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 µl GlycoBlue und 2x Vol 100% EtOH bei -80°C über Nacht gefällt.

Nach Fällung wie oben beschrieben wurde die RNA in 43 µl DEPC H₂O resuspendiert und bei 80°C für 90 sec denaturiert. Mit 5 µl 10x PNK (Polynukleotidkinase) Puffer und 20 U T4 PNK (NEB) wurde die RNA bei 37°C für 1 h dephosphoryliert. Zur erneuten Präzipitation der RNA wurden 150 µl DEPC H₂O, 0,1x Vol 3 M NaOAc (pH 5,2), 2,5 µl GlycoBlue und 2x Vol 100% EtOH zum Reaktionsansatz pipettiert und bei -80°C für mindestens 2 h inkubiert. Die dephosphorylierte RNA wurde nach Fällung in 10,3 µl DEPC H₂O resuspendiert und abermals 90 sec bei 80°C denaturiert. Für die Ligation wurden 6 µl PEG4000 (Thermo Fisher Scientific), 2 µl DMSO, 2,2 µl 10x RNA Ligase Puffer (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µl Universal miRNA Cloning Linker (NEB, 100 µM) und 1 µl T4 RNA Ligase 2

truncated zur RNA hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4°C und anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der Ligation wurde die RNA auf einem 15% PAA 8 M Harnstoff TBE-Gel bei 15 W aufgetrennt. Mit SYBR Gold wurde die RNA detektiert, das Ligationsprodukt bei einer Größe von ~50 nt ausgeschnitten und die RNA aufgereinigt.

Nach Ligation wurde die RNA in 12,7 µl DEPC H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 µl Reverse Transkriptase Oligo (100µM, Sequenz siehe Tabelle 6.7) wurde die Probe über 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde dann mit 4 µl 5x First Strand (FS) Puffer, 1 µl dNTPS (10 mM), 1 µl DTT (100 mM) und 1 µl SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) vermischt und bei 50°C für 1 h inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit 2x FA Puffer versetzt und auf einem 10% PAA 7 M Urea TBE-Gel bei 15 W aufgetrennt. Die revers transkribierte DNA mit einer Größe von ~140 nt wurde nach Färbung mit SYBR Gold aus dem Gel ausgeschnitten und mit DNA Gel Extraktion Puffer aufgereinigt. Durch alkalische Hydrolyse mit 0,1x Vol 1 M NaOH für 20 min bei 95°C wurden die RNA-Stränge abgebaut. Zur Fällung der DNA wurden wie bei der RNA-Fällung 2,5 µl GlycoBlue und 2x Vol 100% EtOH verwendet und bei -80°C für mindestens 2 h inkubiert.

Die kontaminierenden Sequenzen aus ribosomaler RNA wurden im nächsten Schritt depletiert. Dazu wurde die DNA in 8 µl DEPC H₂O resuspendiert und mit 1 µl SSC (20x) und 1 µl biotinylierten Depletionsoligos (Mix 1, PD Oligos 1-11 Bio, Tabelle 6.7) gemischt. Nach Denaturierung bei 95°C für 90 sec wurde die Probe bei 25°C für 20 min zur Hybridisierung der komplementären Stränge inkubiert. Zur Reaktion wurden 10 µl Streptavidin-gekoppelte Magnetic Beads (NEB), die zuvor dreimal in 2x Wasch/Bindepuffer gewaschen und anschließend resuspendiert wurden, zugegeben und bei 25°C und 400 rpm im Thermomixer® comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für weitere 20 min gemischt. Die Beads wurden mit einem Magnet für 1 min getrennt. Das Eluat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und analog zur oben beschriebenen ersten rRNA Depletion durch 2 weitere Depletionsschritte, erneut mit Depletionsoligo-Mix 1 und anschließend mit Depletionsoligo-Mix 2 (PD Oligos 12-15 Bio, Tabelle 6.7), depletiert. Im Anschluss wurde die DNA mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt und mit 0,1x Vol 3 M NaOAc (pH 5,2), 2,5 µl GlycoBlue und 2x Vol 100% EtOH gefällt.

Nach Fällung wurde die DNA in 15 µl DEPC H₂O resuspendiert und 2 µl 10x CircLigase II Puffer, 1 µl 25 mM MnCl₂, 1 µl 1 mM ATP und 1 µl CircLigase II ssDNA Ligase (Epicentre, Madison, Wisconsin, USA; 100 U/µl) zugegeben. Für die Zirkularisierung wurde der Reaktionsansatz bei 60°C für 60 min inkubiert und anschließend bei 80°C für 10 min hitzeinaktiviert. Nachträglich wurde nochmals 1 µl CircLigase II ssDNA Ligase zugegeben sowie die Reaktion erneut bei 60°C für 60 min und 80°C für 10 min inkubiert.

Für die Amplifikation wurde per PCR 0,5 µl zirkularisierte DNA eingesetzt. Zur DNA wurden 2 µl 10x Taq DNA Polymerase Puffer (NEB), 0,5 µl 10mM dNTPs, 0,1 µl 100 µM D5 Oligo Primer, 0,1 µl 100 µM TrueSeq P7 Index Primer (siehe Tabelle 6.7) und 0,3 µl Taq DNA Polymerase (NEB, 5 U/µl) in einem 20 µl Ansatz eingesetzt. Die PCR wurde mit einer anfänglichen Denaturierung für 30 sec bei 95°C und anschließenden 10-18 Zyklen mit 20 sec Denaturierung bei 95°C, 20 sec Annealing bei 60°C und 20 sec Elongation bei 68°C durchgeführt. Nach einer finalen Elongation für 2 min bei 68°C wurde die DNA auf einem 10% PAA 7 M Urea TBE-Gel bei 250 V für etwa 4 h aufgetrennt. Die erwartete Größe der DNA der Library von ~180 nt wurde aus dem Gel heraus geschnitten und wie zuvor beschrieben aufgereinigt sowie präzipitiert. Anschließend wurde die DNA in H₂O resuspendiert. Analysiert wurde sie mittels einem Qubit HS dsDNA Assay (Qubit 2.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific) und entweder einem Bioanalyzer (HS DNA, 2100 Bioanalyzer Instrument; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) oder einer TapeStation (HS D1000, TapeStation 4200, Agilent Technologies). Alle Analysen erfolgten gemäß den Anweisungen der Hersteller.

5.7 Massenspektrometrie

Im Folgenden sind die Arbeiten zur Generierung der Proteomics-Daten dargestellt. Diese Arbeiten wurden zum Großteil von Din Lien Chi Nguyen (ISAS; Dortmund) unter Leitung von Dr. Robert Ahrends (ISAS, Dortmund) durchgeführt.

5.7.1 Präparation der Proben für Massenspektrometrie (MS)

Für die Analyse des Proteoms wurden jeweils biologische Triplikate verwendet. LN308- oder HEK293-Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit TM (2,5 µg/ml) oder TH (200 nM) für 6 h, 16 h oder 24 h behandelt. Nach Lyse der Zellen in 50-200 µl Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1% SDS, 1x cComplete™; Sigma-Aldrich) wurden 1 µl Benzonase® Nuclease (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 1 µl 1 M MgCl₂ pro 300 µl Volumen zu den Lysaten gegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 30 min wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min bei 18.000x G und 4°C abgetrennt. Nach Ermittlung der Proteinkonzentration (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) wurden freie Sulfhydrylgruppen mit 30 mM Iodoacetamide (Sigma-Aldrich) für 30 min bei 25°C im Dunkeln alkyliert. Die Proben wurden mittels proteolytischem Verdau und einem Präparationsprotokoll mit Filtern weiter aufgereinigt. Anschließend wurden die Proteinproben in SDS-Puffer gelöst und die SDS Konzentration durch Verdünnen mit Harnstoff Puffer (8 M Harnstoff in 100 mM Tris-HCl pH 8,5) auf weniger als 0,2% reduziert. Die Proteine wurden mit einer Pall Nanosep Zentrifugeneinheit (Pall Corporation, Port Washington, New York, USA) und einer 30 kDa molekularen Ausschluss-Größe bei 13 500x G bei 25°C aufgereinigt. Dafür wurde die Membran mit 100 µl Harnstoff Puffer vor Anwendung equilibriert. Nach viermaligem Waschen mit 100 µl Harnstoff Puffer wurde die Membran mit 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ (pH 7,8) dreimal gewaschen. Für den enzymatischen Verdau wurde Trypsin (Trypsin Gold, Promega) in einem Verhältnis von 1:25 (Gewicht/Gewicht [w/w], Protease zu Substrat) in 100 µl Puffer (0,2 M Guanidin-HCl, 2 mM CaCl₂, 50 mM NH₄HCO₃ [pH7,8]) verwendet und die Proben bei 37°C für maximal 15 h inkubiert. Die verdauten Proteine wurden durch Zentrifugation in 25 mM NH₄HCO₃ (pH7,8) bei 200 µl finalem Volumen gesammelt und mit 10 µl 10% Trifluoressigsäure (TFA) versetzt. Die Effizienz des Verdau wurde mit der monolithischen Umkehrphasentrennung (Burkhart et al., 2012) überprüft. Die Peptide wurden abschließend bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

5.7.2 Liquid-Chromatographie-MS/MS (LC-MS/MS) Analyse

Pro Ansatz wurde 1 µg Peptid auf ein Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) nano System mit einem gekoppelten Q Exactive Plus Massenspektrometer (beide Thermo Fisher Scientific) geladen. Die Peptide wurden mit einer vorgeschalteten Säule (Acclaim C18 PepMap100, 100 µm 2cm, Thermo Fisher Scientific) mit 0,1% TFA bei einer Flussrate von 20 µl/min gesammelt. Anschließend wurden die Peptide mit einer Umkehrphasensäule (Acclaim C18 PepMap100, 75 µm 50 cm, Thermo Fisher Scientific) unter Benutzung eines binären Gradienten (A: 0,1% Ameisensäure; B: 84% Acetonitril + 0,1% Ameisensäure) bei einer Flussrate von 250 nl/min getrennt. Der lineare Gradient wurde von 3 auf 42% für 180 min bei konstanter Flussgeschwindigkeit von 250 nl/min durchgeführt. Für die Analyse wurden die MS Scans bei einer Auflösung von 70.000 Halbwertsbreite, ein Zielwert von 3x10⁶ und einer maximalen Injektionszeit von 120 ms generiert. Daten-abhängige MS Scans wurden mit kollisionsinduzierter Dissoziation der 15 abundantesten Ionen (Top 15) bei normalisierter Kollisionsenergie von 27%, Auflösung von 17.500 Halbwertsbreite, Isolationsfenster von 1,2 m/z, Zielwert von 5x10⁴ und einer maximalen Injektionszeit von 250 msec gesammelt. Nur Vorläuferionen mit einer Ladung zwischen 2 und 4 wurden fragmentiert.

5.8 Quantifizierung und statistische Analyse

Die statistischen Analysen der Multi-Omics Ansätze wurden durch Dr. Grischa Tödt (EMBL, Heidelberg) und Dr. Canan Has (ISAS, Dortmund) durchgeführt.

5.8.1 RNA-Seq und Ribosome Profiling Analyse

Für die statistische Datenanalyse wurden die Programme R (R_Core_Team 2019) und Python (Python_Core_Team 2019) verwendet. Nach dem Demultiplexen der Sequenzen wurden die Adapter mit Trimmomatic Version 0.38 abgeschnitten (Bolger et al., 2014). Daraufhin wurden die Sequenzen mit dem RNA-seq Aligner STAR Version 2.5.4b an die Referenzannotation GENCODE des humanen Genoms (GRCh38.primary_assembly, gencode.v26.annotation) ausgerichtet (Dobin et al., 2013, Frankish et al., 2019). Die Quantifizierungen der Genexpressionsstärke wurden mittels HTSeq (Anders et al., 2015) durchgeführt. Für die Zählung der Rohdaten der RNA-Sequenzierung sowie für die Berechnung der Veränderungen wurde die DESeq2 Methode verwendet (Love et al., 2014). Die Mengen der ribosomalen Beladung aus den Daten der RNA-Sequenzierung und des Ribosome Profiling wurden mittels RiboDiff analysiert (Zhong et al., 2017). Für die Gene Ontology (GO)-basierte, funktionelle Analyse der Daten wurden die Programme DAVID oder Panther verwendet (Dennis et al., 2003, Mi and Thomas, 2009).

5.8.2 Ungelabelte MS Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde die Progenesis Q1 for Proteomics Software (Version 3.0 NonLinear Dynamics) verwendet. Die Identifikation der Peptide wurde mit den zwei Suchalgorithmen X!Tandem (Craig and Beavis, 2004) mit dem SearchGUI Interface Version 2.5.0 (Vaudel et al., 2011) und Mascot 2.4 (Matrix Science) durchgeführt. Die humane UniProt Datenbank (Heruntergeladen am 22.07.2015) wurde mit folgenden Parametern verwendet: Trypsin als Protease (maximal 2 verpasste proteolytische Spaltungen), Carbamidomethylierung an Cystein als festgesetzte Modifikation, Oxidation an Methionin als variable Modifikation, 10 ppm als MS1 Toleranz und 0,02 Da als MS2 Toleranz. Um die Suchergebnisse von X!Tandem und Mascot 2.4 zu kombinieren wurde PeptideShaker Version 1.9.0 (Vaudel et al., 2015) mit einer Fehlerquote der Befunde von 1% verwendet. Für die abschließende Analyse wurden nur Proteine in Betracht gezogen, die durch mindestens zwei eindeutige Peptide identifiziert wurden. Die R Version 3.3.1 (Codename „Bug in Your Hair“) wurde für die statistische Analyse genutzt. Die Berechnung und Datenformatierung wurde mit dem R Package reshape2 durchgeführt. Die Packages ggplot2 und gridExtra wurden für die graphischen Darstellungen verwendet. Die P-Werte wurden mit dem funktionalen t-Test (Student's t-test, zwei Stichproben, gleiche Varianz, Konfidenzniveau 95%) berechnet. Proteine wurden als unterschiedlich reguliert betrachtet, wenn $P < 0,05$ und die Änderung größer als die mediane Änderung plus der doppelten Standardabweichung (hochreguliert) oder wenn die Änderung niedriger als die mediane Änderung minus der doppelten Standardabweichung (herunterreguliert) war.

6. Material

6.1 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Enzyme

Verbrauchs- und andere Plastikwaren wurden von den Firmen Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich), Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA) und GE Healthcare (Chicago, Illinois, USA) erworben. Von der Schott AG (Mainz, Deutschland) und VWR International (Radnor, Pennsylvania, USA) stammten die Glaswaren.

Die gängigen, für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Unternehmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Promega Corporation (Fitchburg, Wisconsin, USA) und AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Enzyme, falls nicht anders angegeben, DNA- und RNA-Leitern sowie Protein Größenstandards zur Komigration wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA), New England Biolabs Inc. (Ipswich, Massachusetts, USA) und Epicentre (Madison, Wisconsin, USA) erworben.

DNA Oligonukleotide wurden von Thermo Fisher Scientific, Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) und Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa, USA) bezogen.

6.2 Kits und fertige Lösungen

Tabelle 6.1: Auflistung der fertigen Kits und Lösungen sowie deren Hersteller

Kit/Lösung	Hersteller
30% Acrylamide/Bis Solution, 19:1	Bio-Rad Laboratories
30% Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1	Bio-Rad Laboratories
40% Acrylamide/Bis Solution, 19:1	Bio-Rad Laboratories
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Bio-Rad Laboratories
Clarity™ Western ECL Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific Inc.
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen N.V. (Venlo, Niederlande)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen N.V.
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen N.V.
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen N.V.
QIAshredder	Qiagen N.V.
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc.
SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain	Thermo Fisher Scientific Inc.

Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc.
TRIzol Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.

6.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 6.2: Auflistung der verwendeten, selbstgemachten Puffer und Lösungen und die Zusammensetzung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
DNA Gel Extraktionspuffer	0,3 M NaCl; 1 mM EDTA (pH 8,0); 10 mM Tris (pH 8,0)
2x FA-Puffer	90% (v/v) Formamid; 10 mM EDTA (pH 8,0); Bromphenolblau; Xylencyanol
2x Laemmli Puffer	100 mM Tris (pH 6,8); 2% (w/v) SDS; 20% (w/v) Glycerol; 0,2 M DTT; Bromphenolblau
LB Medium	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,5
LB Platten	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; 1,5% (w/v) Agar-Agar; pH 7,5
Hypotonischer Lysepuffer	5 mM Tris (pH 7,4); 1,5 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 0,5% (v/v) Triton X-100; 0,5% (w/v) Na-Deoxycholate; 100 µg/ml Cycloheximid; 1x RNasin; 1x Protease-Inhibitor cOmplete™
Lysepuffer MS	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1% SDS, 1x cOmplete™
1x PBS	130 mM NaCl; 774 mM Na ₂ HPO ₄ ; 226 mM NaH ₂ HPO ₄
1x modifizierter RIPA-Puffer	20 mM Tris (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1%(w/v) NP-40; 2% (w/v) SDS; 5 mM EDTA
1x unmodifizierter RIPA-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1% (w/v) NP-40; 0,1% (w/v) SDS; 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat
RNA Gel Extraktionspuffer	0,3 M Natriumacetat; 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,25% (w/v) SDS
SDS-PAGE Sammelgel	5% (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung (37,5:1); 125 mM Tris (pH 6,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED
SDS-PAGE Trenngel	6-10% (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung (37,5:1); 375 mM Tris (pH 8,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS
Stripping Puffer	0,2 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS; 1% (v/v) Tween20; pH 2,2
Sucrose-Lösung (10%)	10% (w/v) Sucrose; 20 mM Tris (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 100 µg/ml Cycloheximid
Sucrose-Lösung (50%)	50% (w/v) Sucrose; 20 mM Tris (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 100 µg/ml Cycloheximid

Sucrose-Lösung (60%)	60% (w/v) Sucrose; 60 mM Tris (pH 7,4); 450 mM NaCl; 15 mM MgCl ₂
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
1x TBE	89 mM Tris (pH 8,3); 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
1X TBS	10 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl
1x TBS-T	10 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20
Verdau-Puffer MS	0,2 M Guanidin-HCl, 2 mM CaCl ₂ , 50 mM NH ₄ HCO ₃ (pH 7,8)
2x Wasch/Bindepuffer	2 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0); 5 mM Tris (pH 7,4); 0,2% (v/v) Triton X-100

6.4 Laborausstattung

Tabelle 6.3: Auflistung der benutzten Laborgeräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc.
4200 TapeStation System	Agilent Technologies
ÄKTApurifier™ system	GE Healthcare
Centrifuge 5424	Eppendorf AG
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter Diagnostics
Optima™ LE-80K Ultracentrifuge	Beckman Coulter Diagnostics
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific
CO2 Inkubator HeraCell™ 240i	Thermo Fisher Scientific
ChemiDoc Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories
Mikroplattenleser Mithras LB940	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories
Consort™ Elektrophorese Netzgerät EV233	Consort bvba (Turnhout, Belgien)
Consort™ Elektrophorese Netzgerät EV233	Consort bvba (Turnhout, Belgien)
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
Thermomixer® comfort	Eppendorf AG

Model 107 Gradient Master IP	BioComp Instruments
Shaker DRS-12	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
HeraSafe™ KS	Thermo Fisher Scientific
Ultrospec 3300pro	GE Healthcare

6.5 DNA Oligonukleotide

6.5.1 DNA Oligonukleotide für Klonierungen und Mutagenese

Tabelle 6.4: Auflistung der DNA Oligonukleotide für die molekulare Klonierung mit Angabe des Restriktionsenzym

Name	Sequenz 5' -> 3'
ATF4 for SbfI	GCTAGACCTGCAGGCATGACCGAAATGAGCTTCCTGA GC
ATF4 rev NotI	CGTAATGCGGCCGCCTAGGGGACCCTTTTCTTCCC
XBP1s for SbfI	CGATCGCCTGCAGGTATGGTGGTGGTGGCAGCCGC
XBP1s rev NotI	CGTCATGCGGCCGCTTAGACACTAATCAGCTGGGG
ATF6f for SbfI	CGACTACCTGCAGGAATGGGGGAGCCGGCTGGGGTT GC
ATF6f rev NotI	CGTCTAGCGGCCGCCTAGTTCTCTGACACAACCTTCAT CCAGC
eIF2α for SbfI	GCGGGAATCACACACACCTGCAGGAATGCCGGGGTC
eIF2α rev BamHI	ACAGCCGGATCCCGCTGCTCTGTGTTCCCTTAAATTG
eIF2α S51A for	TCTTAGTGAATTAGCCAGAAGGCGTATCCG
eIF2α S51A rev	CGGATACGCCTTCTGGCTAATTCACTAAGA
eIF2α S51D for	TCTTAGTGAATTAGACAGAAGGCGTATCCG
eIF2α S51D rev	CGGATACGCCTTCTGTCTAATTCACTAAGA

6.5.2 DNA Oligonukleotide für qRT-PCR und Splicing

Tabelle 6.5: Auflistung der DNA Oligonukleotide für qRT-PCR Versuche und Splicing von XBP1 mit Angabe des Restriktionsenzym

Name	Sequenz 5'→3'
GAPDH for	GGTCTCCTCTGACTTCAACA
GAPDH rev	AGCCAAATTCGTTGTCATAC
MTHFD2 for	CTTGTTTCAGTTGCCTCTTCC
MTHFD2 rev	CCACACACCCCATGGAGTAGCC
SHMT2 for	TCAATGTCCAGCCCTACTCC
SHMT2 rev	GCTTGACGTCAGACATGTAGC

SLFN5 for	CAACCGTGTGAGACAATTGC
SLFN5 rev	GCTGCTCTTTCAGACATTCC
XBP1 for	CCTGGTTGCTGAAGAGGAGG
XBP1 rev	CCATGGGGAGATGTTCTGGAG

6.5.3 DNA Oligonukleotide für Sequenzierungen

Tabelle 6.6: Auflistung der DNA Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz 5'→3'
CMV for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG

6.5.4 DNA Oligonukleotide für Ribosome Profiling Library Präparation

Die nachfolgenden Oligonukleotide wurden zur Herstellung der Ribosome Profiling Libraries verwendet. Die Depletionsoligos PD Oligo 1 Bio bis PD Oligo 11 Bio wurden als Depletionsoligos-Mix 1, PD Oligo 12 Bio bis PD Oligo 15 als Mix 2 bezeichnet.

Tabelle 6.7: Auflistung der DNA Oligonukleotide bei der Herstellung der Ribosome Profiling Libraries.

Diese Tabelle beinhaltet DNA Oligonukleotide für die Reverse Transkription, die rRNA Depletion und die DNA Amplifikation

Name	Sequenz 5' → 3'
D5 PCR Oligo	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCTTTC CCTACACGACGCTCTTCCG
PD Oligo 1 Bio	5'Biotin-GGGGGGATGCGTGCATTTATCAGATCA
PD Oligo 2 Bio	5'Biotin-TTGGTGACTCTAGATAACCTCGGGCCGATCG CACG
PD Oligo 3 Bio	5'Biotin-GAGCCGCTGGATACCGCAGCTAGGAATAAT GGAAT
PD Oligo 4 Bio	5'Biotin-TCGTGGGGGGCCCAAGTCCTTCTGATCGAGG CCC
PD Oligo 5 Bio	5'Biotin-GCACTCGCCGAATCCCGGGGCCGAGGGAGC GA
PD Oligo 6 Bio	5'Biotin-GGGGCCGGGCCACCCCTCCCACGGCGCG
PD Oligo 7 Bio	5'Biotin-CCCAGTGCGCCCCGGGCGTCGTCGCGCCGTCGGGTCCCCGGG
PD Oligo 8 Bio	5'Biotin-AGGGGCTCTCGCTTCTGGCGCCAAGCGT
PD Oligo 9 Bio	5'Biotin-GAGCCTCGGTTGGCCTCGGATAGCCGGTCCC CCGC
PD Oligo 10 Bio	5'Biotin-TCGCTGCGATCTATTGAAAGTCAGCCCTCGA CACA
PD Oligo 11 Bio	5'Biotin-TCCTCCCGGGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCTG CT
PD Oligo 12 Bio	5'Biotin-AACCCGGCGGGCGGGTCCGGCCGTGTCGGC
PD Oligo 13 Bio	5'Biotin-CTCGCCGGCCGAGGTGGGATCCCGAGG
PD Oligo 14 Bio	5'Biotin-TCTCGCTTCTGGCGCCAAGCGCCCCGCCCCG

PD Oligo 15 Bio	5'Biotin-ATTGAAAGTCAGCCCTCGACACAAGGGTTT
RT Oligo Primer	5'Phospho-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGA/ Int/ Spacer18/ CACTCA/ IntSpacer18/GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCTNNNNNNATTGATGGTGCCTACAG
TruSeq P7 Index 4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC
TruSeq P7 Index 6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATTGGCGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC
TruSeq P7 Index 12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC
TruSeq P7 Index 24	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTACCGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC
TruSeq P7 Index 31	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCGTGGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC
TruSeq P7 Index 37	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATTCCGGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC
TruSeq P7 Index 42	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGATTAGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC
TruSeq P7 Index 47	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAATGAGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC

6.6 Plasmide

Tabelle 6.8: Auflistung der verwendeten Plasmide mit Anmerkungen

Name	Anmerkungen
pcDNA5/FRT/TO	Expression in Säugetierzellen, induzierbarer Vektor mit dem Flp-In™ T-Rex™ System
pOG44	Flp-Recombinase Expressionsvektor, Klonierung und Expression im Flp-In™ T-Rex™ System

Beide Plasmide wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen.

6.7 Antikörper

Tabelle 6.9: Verwendete Primärantikörper für Western Blot.

Zusätzlich werden Immunglobulin (Ig)-Spezies, genaue Spezifikation, verwendete Verdünnung und Herkunft des Antikörpers angegeben.

Antigen	Ig-Spezies	Spezifikation	Anwendung (Verdünnung)	Herkunft
ATF4	Kaninchen	mAb (D4B8)	WB (1:1.000)	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)
BiP	Kaninchen	mAb (C50B12)	WB (1:1.000)	Cell Signaling Technology
eIF2 α	Kaninchen	pAb	WB (1:1.000)	Cell Signaling Technology
P-eIF2 α (phospho S51)	Kaninchen	mAb (E90)	WB (1:2.000)	Abcam plc. (Cambridge, UK)
HA	Maus	mAb (HA-7)	WB (1:1.000)	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA)
MTHFD2	Kaninchen	mAb (D8W9U)	WB (1:1.000)	Cell Signaling Technology
PERK	Kaninchen	mAb (C33E10)	WB (1:1.000)	Cell Signaling Technology
SHMT2	Kaninchen	pAb	WB (1:1.000)	Cell Signaling Technology
SLFN5	Kaninchen	pAb	WB (1:2.000)	Sigma-Aldrich
α -Tubulin	Maus	mAb (DM1A)	WB (1:4.000)	Sigma-Aldrich

Zur Detektion der Primärantikörper wurde ein HRP-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG (polyklonal, spezifisch für die leichte Kette; 1:10.000 verdünnt) oder ein HRP-gekoppelter Maus anti-Kaninchen IgG (monoklonal, spezifisch für die leichte Kette; 1:10.000 verdünnt) als Zweitantikörper verwendet (beide Zweitantikörper bezogen von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Cambridgeshire, UK).

6.8 bakterielle Stämme und Medien

Im Folgenden sind die E.coli Stämme und die verwendeten Medien aufgeführt, die für Klonierungen verwendet wurden.

6.8.1 Bakterien

Tabelle 6.10: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
DH5a	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -

6.8.2 Medien

Tabelle 6.11: Verwendete Medien

LB (lysogeny broth) Medium	5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton; 10 g NaCl; ad 1 l H ₂ O
LB Agar	1 l LB Medium; 16,4 g Agar

Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) wurden dem LB Medium und den LB Agarplatten für Mini oder Midi Präparationen von Plasmid DNA zugegeben. Für Blau/Weiß Selektionen wurden 40 µl einer X-Gal Lösung (20 mg/ml) 30 min vor dem Ausplattieren der Bakterien auf LB Agarplatten verteilt.

6.9 Säugetierzelllinien und Medien

6.9.1 Verwendete Säugerzellen

Nachfolgend sind die verschiedenen Zelllinien und Medien aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die stabilen, induzierbaren Zelllinien wurden wie unter 5.1.2 beschrieben hergestellt. Alle Zelllinien wuchsen adhärent.

Tabelle 6.12: Verwendete Säugetierzellkulturen

Flp-In T-REx 293	humane embryonale Nierenzellen, stabile Expression des lacZ-Zeocin Fusionsgens und Tet Repressors, geeignet für die Herstellung einer stabilen, Tetracyclin-induzierbaren Zelllinie mittels Flp-In T-Rex System (Thermo Fisher Scientific)
Flp-In T-REx 293 S51A	stabile, Tetracyclin-induzierbare Zelllinie mit humanem, unphosphorylierbarem eIF2α S51A
Flp-In T-REx 293 S51D	stabile, Tetracyclin-induzierbare Zelllinie mit einer phosphomimetischen Mutante des humanen eIF2α (S51D)
HEK293	humane embryonale Nierenzellen, weiblich
NIH/3T3	murine embryonale Fibroblasten
LN308	humane Glioblastom-Zelllinie, ursprünglich entnommen von einem männlichen, 60-jährigen Patienten, Defizienz des zellulären Tumor Antigens p53 (TP53)

6.9.2 Medien der Zellkultur

Tabelle 6.13: Verwendete Medien für die Kultivierung der Säugetierzelllinien

Medium	Zusatz
Zellkulturmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); 10% (v/v) FBS; 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Einfrüermedium	DMEM; 20% (v/v) FBS; 10% (v/v) DMSO

DMEM Zeo/Blast	DMEM; 10% (v/v) FBS; 100 µg/ml Zeocin; 10µg /ml Blastocidin
DMEM HygB/Blast	DMEM; 10% (v/v) FBS; 50 µg/ml / 100 µg/ml Hygromycin B; 10 µg/ml Blastocidin
OptiMEM	-

Für die Induktion der stabilen Zelllinien wurden zum DMEM HygB/Blast Medium 0,1% (v/v) Tetracyclin zugegeben und für die angegebenen Zeiträume inkubiert. OptiMEM Medium wurde für die stabile und transiente Transfektion von Zellen verwendet.

Alle Medien und Zusätze waren von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

Anhang

Farbcode

bekannte UPR Faktoren

x	im MS nicht detektiert
n.r.	keine Regulation detektiert
n.s.	nicht signifikant reguliert
down	herunterreguliert
up	hochreguliert

UPR Regulon

Gen	Genname	Entrez	RPF Anzahl bei		Protein Abundanz bei		
			2h	6h	6h	16h	24h
(bekannte UPR Faktoren in blau hervorgehebt)			2h	6h	6h	16h	24h
AAK1	AP2 associated kinase 1(AAK1)	22848	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.s.
AARS	alanyl-tRNA synthetase(AARS)	16	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
ABCF3	ATP binding cassette subfamily F member 3(ABCF3)	55324	n.r.	up	x	n.r.	n.s.
ADM2	adrenomedullin 2(ADM2)	79924	n.r.	up	x	x	x
AKNA	AT-hook transcription factor(AKNA)	80709	n.r.	up	x	x	x
ALDH1L2	aldehyde dehydrogenase 1 family member L2(ALDH1L2)	160428	n.r.	up	x	up	up
ALG2	ALG2, alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase(ALG2)	85365	n.r.	up	up	n.r.	n.r.
AP3D1	adaptor related protein complex 3 delta 1 subunit(AP3D1)	8943	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
AP4B1	adaptor related protein complex 4 beta 1 subunit(AP4B1)	10717	n.r.	up	x	x	x
ARFGAP3	ADP ribosylation factor GTPase activating protein 3(ARFGAP3)	26286	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.r.
ARFGEF3	ARFGEF family member 3(ARFGEF3)	57221	n.r.	up	x	x	x
ARFIP2	ADP ribosylation factor interacting protein 2(ARFIP2)	23647	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
ARHGEF2	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2(ARHGEF2)	9181	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.

ASNS	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)(ASNS)	440	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
ATF3	activating transcription factor 3(ATF3)	467	up	up	up	up	up
ATF4	activating transcription factor 4(ATF4)	468	n.r.	up	up	up	up
ATG101	autophagy related 101(ATG101)	60673	n.r.	up	x	x	x
ATG13	autophagy related 13(ATG13)	9776	n.r.	up	x	x	x
AVPI1	arginine vasopressin induced 1(AVPI1)	60370	n.r.	up	x	x	x
BAG3	BCL2 associated athanogene 3(BAG3)	9531	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.s.
BET1	Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein(BET1)	10282	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
BET1L	Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein like(BET1L)	51272	n.r.	up	x	x	x
BEX2	brain expressed X-linked 2(BEX2)	84707	n.r.	up	x	x	x
BHLHA15	basic helix-loop-helix family member a15(BHLHA15)	168620	n.r.	up	x	x	x
BLOC1S3	biogenesis of lysosomal organelles complex 1 subunit 3(BLOC1S3)	388552	n.r.	up	x	x	x
BOLA1	bolA family member 1(BOLA1)	51027	n.r.	up	x	x	x
BTG1	BTG anti-proliferation factor 1(BTG1)	694	n.r.	up	x	x	x
C12orf10	chromosome 12 open reading frame 10(C12orf10)	60314	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.r.
C14orf28	chromosome 14 open reading frame 28(C14orf28)	122525	n.r.	up	x	x	x
C1GALT1	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1(C1GALT1)	56913	n.r.	up	x	x	n.s.
C6orf48	chromosome 6 open reading frame 48(C6orf48)	50854	n.r.	up	x	x	x
CAMTA2	calmodulin binding transcription activator 2(CAMTA2)	23125	n.r.	up	x	x	x
CARS	cysteinyl-tRNA synthetase(CARS)	833	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
CBLB	Cbl proto-oncogene B(CBLB)	868	n.r.	up	x	x	x
CCDC174	coiled-coil domain containing 174(CCDC174)	51244	n.r.	up	x	x	x
CCDC9	coiled-coil domain containing 9(CCDC9)	26093	n.r.	up	x	x	x
CCNYL1	cyclin Y like 1(CCNLYL1)	151195	n.r.	up	x	x	x
CDC6	cell division cycle 6(CDC6)	990	n.r.	up	x	x	x

CDK2AP2	cyclin dependent kinase 2 associated protein 2(CDK2AP2)	10263	n.r.	up	x	x	x
CDKN1B	cyclin dependent kinase inhibitor 1B(CDKN1B)	1027	n.r.	up	x	x	x
CDR2	cerebellar degeneration related protein 2(CDR2)	1039	n.r.	up	x	x	x
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein beta(CEBPB)	1051	n.r.	up	up	n.r.	n.r.
CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein gamma(CEBPG)	1054	n.r.	up	x	x	x
CEP120	centrosomal protein 120(CEP120)	153241	n.r.	up	x	x	x
CHAC1	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1(CHAC1)	79094	up	up	x	x	x
CISD2	CDGSH iron sulfur domain 2(CISD2)	493856	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
CPEB4	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4(CPEB4)	80315	n.r.	up	n.s.	up	up
CRELD2	cysteine rich with EGF like domains 2(CRELD2)	79174	n.r.	up	n.r.	up	up
CTH	cystathionine gamma-lyase(CTH)	1491	n.r.	up	x	x	x
CXorf40B	chromosome X open reading frame 40B(CXorf40B)	541578	n.r.	up	x	x	x
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3(DDIT3)	1649	up	up	up	up	up
DDIT4	DNA damage inducible transcript 4(DDIT4)	54541	n.r.	up	x	x	x
DDX49	DEAD-box helicase 49(DDX49)	54555	n.r.	up	x	n.s.	n.s.
DDX59	DEAD-box helicase 59(DDX59)	83479	n.r.	up	x	x	x
DEDD2	death effector domain containing 2(DEDD2)	162989	n.r.	up	x	x	x
DEPDC7	DEP domain containing 7(DEPDC7)	91614	up	up	x	x	x
DERL2	derlin 2(DERL2)	51009	n.r.	up	x	n.r.	n.s.
DERL3	derlin 3(DERL3)	91319	n.r.	up	x	x	x
DHDDS	dehydrodolichyl diphosphate synthase subunit(DHDDS)	79947	n.r.	up	x	x	x
DNAJB11	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B11(DNAJB11)	51726	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.r.
DNAJB5	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B5(DNAJB5)	25822	n.r.	up	x	x	x
DNAJB9	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9(DNAJB9)	4189	n.r.	up	x	up	up

DNAJC3	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3(DNAJC3)	5611	n.r.	up	n.s.	up	n.r.
DYNLL1	Dynein Light Chain LC8-Type 1	8655	up	n.r.	n.s.	n.s.	n.s.
DYRK3	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 3(DYRK3)	8444	n.r.	up	x	x	x
E2F7	E2F transcription factor 7(E2F7)	144455	up	up	x	x	x
EAF1	ELL associated factor 1(EAF1)	85403	n.r.	up	x	x	x
EDEM1	ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1(EDEM1)	9695	n.r.	up	x	x	x
EGR2	Early Growth Response 2	1959	up	n.r.	x	x	x
EGR3	Early Growth Response 3	1960	up	n.r.	x	x	x
EIF1B	eukaryotic translation initiation factor 1B(EIF1B)	10289	n.r.	up	x	x	x
EIF2AK3	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3(EIF2AK3)	9451	n.r.	up	n.s.	n.s.	down
EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1(EIF4EBP1)	1978	n.r.	up	n.s.	x	x
EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase(EPRS)	2058	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.s.
ERO1B	endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 beta(ERO1B)	56605	n.r.	up	x	x	up
EXOSC1	exosome component 1(EXOSC1)	51013	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.s.
FAM110B	family with sequence similarity 110 member B(FAM110B)	90362	n.r.	up	x	x	x
FAM129A	family with sequence similarity 129 member A(FAM129A)	116496	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
FAM161B	family with sequence similarity 161 member B(FAM161B)	145483	n.r.	up	x	x	x
FICD	FIC domain containing(FICD)	11153	n.r.	up	x	x	x
FKBP11	FK506 binding protein 11(FKBP11)	51303	n.r.	up	n.s.	up	up
FNDC3B	fibronectin type III domain containing 3B(FNDC3B)	64778	n.r.	up	n.s.	up	n.r.
FRMD3	FERM Domain Containing 3	257019	up	n.r.	x	x	x
GADD45A	growth arrest and DNA damage inducible alpha(GADD45A)	1647	n.r.	up	x	x	x
GARS	glycyl-tRNA synthetase(GARS)	2617	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
GCC1	GRIP and coiled-coil domain containing 1(GCC1)	79571	n.r.	up	n.r.	n.s.	x
GDF15	growth differentiation factor 15(GDF15)	9518	n.r.	up	x	up	up

GFPT1	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1(GFPT1)	2673	n.r.	up	n.s.	up	n.r.
GHITM	growth hormone inducible transmembrane protein(GHITM)	27069	n.r.	up	x	x	x
GLRX	glutaredoxin(GLRX)	2745	n.r.	up	x	up	n.r.
GLRX2	glutaredoxin 2(GLRX2)	51022	n.r.	up	x	x	x
GMPPA	GDP-mannose pyrophosphorylase A(GMPPA)	29926	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
GMPPB	GDP-mannose pyrophosphorylase B(GMPPB)	29925	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
GNL3	G protein nucleolar 3(GNL3)	26354	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
GOLPH3L	golgi phosphoprotein 3 like(GOLPH3L)	55204	n.r.	up	x	x	x
GORAB	golgin, RAB6 interacting(GORAB)	92344	n.r.	up	x	x	x
GORASP2	golgi reassembly stacking protein 2(GORASP2)	26003	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
GOT1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1(GOT1)	2805	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
GPR1	G protein-coupled receptor 1(GPR1)	2825	n.r.	up	x	x	x
GPT2	glutamic--pyruvic transaminase 2(GPT2)	84706	n.r.	up	n.s.	up	up
GRM8	glutamate metabotropic receptor 8(GRM8)	2918	n.r.	up	x	x	x
GTPBP2	GTP binding protein 2(GTPBP2)	54676	n.r.	up	x	x	x
H1F0	H1 histone family member 0(H1F0)	3005	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.s.
HERPUD1	homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1(HERPUD1)	9709	up	up	x	x	x
HGS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate(HGS)	9146	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.s.
HID1	HID1 domain containing(HID1)	283987	n.r.	up	x	x	x
HIF1A	hypoxia inducible factor 1 alpha subunit(HIF1A)	3091	n.r.	up	x	x	x
HIST1H3H	histone cluster 1 H3 family member h(HIST1H3H)	8357	n.r.	up	x	x	x
HIST1H3I	histone cluster 1 H3 family member i(HIST1H3I)	8354	n.r.	up	x	x	x
HIST3H2BB	histone cluster 3 H2B family member b(HIST3H2BB)	128312	n.r.	up	x	x	x
HOXB9	homeobox B9(HOXB9)	3219	n.r.	up	x	x	x
HSPA5	heat shock protein family A (Hsp70) member 5(HSPA5)	3309	n.r.	up	up	up	up

HSPA9	heat shock protein family A (Hsp70) member 9(HSPA9)	3313	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.r.
HYOU1	hypoxia up-regulated 1(HYOU1)	10525	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
IFRD1	interferon related developmental regulator 1(IFRD1)	3475	n.r.	up	up	up	up
IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3(IGFBP3)	3486	n.r.	up	x	x	x
IL20RB	interleukin 20 receptor subunit beta(IL20RB)	53833	n.r.	up	x	x	x
INHBE	inhibin beta E subunit(INHBE)	83729	n.r.	up	x	x	x
IQCG	IQ motif containing G(IQCG)	84223	n.r.	up	x	x	x
IRF7	interferon regulatory factor 7(IRF7)	3665	n.r.	up	x	x	x
ISL2	ISL LIM homeobox 2(ISL2)	64843	n.r.	up	x	x	x
ISOC2	isochorismatase domain containing 2(ISOC2)	79763	n.r.	up	n.r.	up	up
JUNB	JunB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	3726	up	n.r.	x	x	x
KCTD5	potassium channel tetramerization domain containing 5(KCTD5)	54442	n.r.	up	x	n.r.	x
KDM4A	lysine demethylase 4A(KDM4A)	9682	n.r.	up	x	x	x
KIAA0040	KIAA0040(KIAA0040)	9674	n.r.	up	x	x	x
KIF2C	kinesin family member 2C(KIF2C)	11004	n.r.	up	n.s.	n.r.	
KLF4	Kruppel like factor 4(KLF4)	9314	n.r.	up	x	x	x
KLF5	Kruppel like factor 5(KLF5)	688	n.r.	up	x	x	x
KLHDC7B	kelch domain containing 7B(KLHDC7B)	113730	n.r.	up	x	x	x
LARP1B	La ribonucleoprotein domain family member 1B(LARP1B)	55132	n.r.	up	x	x	x
LARP6	La ribonucleoprotein domain family member 6(LARP6)	55323	n.r.	up	x	x	x
LCA5	LCA5, lebercilin(LCA5)	167691	n.r.	up	x	x	x
LIN54	lin-54 DREAM MuvB core complex component(LIN54)	132660	n.r.	up	x	x	x
LONP1	lon peptidase 1, mitochondrial(LONP1)	9361	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
LRRC59	leucine rich repeat containing 59(LRRC59)	55379	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
LYSMD3	LysM domain containing 3(LYSMD3)	116068	n.r.	up	x	x	x
LZTFL1	leucine zipper transcription factor like 1(LZTFL1)	54585	n.r.	up	x	n.r.	up

MANF	mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor(MANF)	7873	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
MARS	methionyl-tRNA synthetase(MARS)	4141	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.s.
MBD1	methyl-CpG binding domain protein 1(MBD1)	4152	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.s.
MBNL2	muscleblind like splicing regulator 2(MBNL2)	10150	n.r.	up	x	up	n.r.
MCEE	methylmalonyl-CoA epimerase(MCEE)	84693	n.r.	up	x	x	x
MED8	mediator complex subunit 8(MED8)	112950	n.r.	up	x	x	x
MID1IP1	MID1 interacting protein 1(MID1IP1)	58526	n.r.	up	x	x	x
MIS12	MIS12, kinetochore complex component(MIS12)	79003	n.r.	up	x	x	x
MON1B	MON1 homolog B, secretory trafficking associated(MON1B)	22879	n.r.	up	x	x	x
MPV17L2	MPV17 mitochondrial inner membrane protein like 2(MPV17L2)	84769	n.r.	up	x	x	x
MSTO1	misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator(MSTO1)	55154	n.r.	up	x	x	x
MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase(MTHFD2)	10797	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
MTMR4	myotubularin related protein 4(MTMR4)	9110	n.r.	up	x	x	x
MXD1	MAX dimerization protein 1(MXD1)	4084	n.r.	up	x	x	x
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase(NAMPT)	10135	n.r.	up	n.s.	up	n.r.
NANS	N-acetylneuraminase synthase(NANS)	54187	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
NCKAP5L	NCK associated protein 5 like(NCKAP5L)	57701	n.r.	up	x	x	x
NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated(NFIL3)	4783	n.r.	up	x	x	x
NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2(NFKB2)	4791	n.r.	up	n.s.	x	n.s.
NFKBIA	NFKB Inhibitor Alpha	4792	up	n.r.	x	x	x
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta(NFKBIZ)	64332	n.r.	up	x	x	x
NMNAT2	nicotinamide nucleotide adenyltransferase 2(NMNAT2)	23057	n.r.	up	x	x	x
NRBF2	nuclear receptor binding factor 2(NRBF2)	29982	n.r.	up	x	x	x
NUCB2	nucleobindin 2(NUCB2)	4925	n.r.	up	n.s.	up	n.r.
OSBP	oxysterol binding protein(OSBP)	5007	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.

PARP2	poly(ADP-ribose) polymerase 2(PARP2)	10038	n.r.	up	n.s.	n.s.	x
PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial(PCK2)	5106	n.r.	up	n.r.	up	up
PDE4D	phosphodiesterase 4D(PDE4D)	5144	n.r.	up	x	x	x
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein(PDE4DIP)	9659	n.r.	up	x	x	x
PDIA4	protein disulfide isomerase family A member 4(PDIA4)	9601	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
PELO	pelota homolog (Drosophila)(PELO)	53918	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.s.
PFDN2	prefoldin subunit 2(PFDN2)	5202	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.r.
PGM3	phosphoglucomutase 3(PGM3)	5238	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.s.
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase(PHGDH)	26227	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
PIGA	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A(PIGA)	5277	n.r.	up	x	x	x
PJA1	praja ring finger ubiquitin ligase 1(PJA1)	64219	n.r.	up	x	x	x
PLEKHF1	pleckstrin homology and FYVE domain containing 1(PLEKHF1)	79156	n.r.	up	x	x	x
PLK3	polo like kinase 3(PLK3)	1263	n.r.	up	x	x	x
PLPP5	phospholipid phosphatase 5(PLPP5)	84513	n.r.	up	x	x	x
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1(PMAIP1)	5366	n.r.	up	x	x	x
PNP	purine nucleoside phosphorylase(PNP)	4860	n.r.	up	x	x	x
PNPLA8	patatin like phospholipase domain containing 8(PNPLA8)	50640	n.r.	up	x	x	x
POLR3C	RNA polymerase III subunit C(POLR3C)	10623	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
PPP1R15A	protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A(PPP1R15A)	23645	n.r.	up	x	x	x
PREB	prolactin regulatory element binding(PREB)	10113	n.r.	up	n.s.	up	n.r.
PRRC1	proline rich coiled-coil 1(PRRC1)	133619	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1(PSAT1)	29968	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
PSMG1	proteasome assembly chaperone 1(PSMG1)	8624	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.r.
PSPH	phosphoserine phosphatase(PSPH)	5723	n.r.	up	n.r.	n.r.	up
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2(PTGS2)	5743	n.r.	up	up	up	up
PTPRH	protein tyrosine phosphatase, receptor type H(PTPRH)	5794	n.r.	up	x	x	x

PXK	PX domain containing serine/threonine kinase like(PXK)	54899	n.r.	up	x	x	x
PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1(PYCR1)	5831	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
RAB36	RAB36, member RAS oncogene family(RAB36)	9609	n.r.	up	x	x	x
RAB39B	RAB39B, member RAS oncogene family(RAB39B)	116442	n.r.	up	x	x	x
RAD9A	RAD9 checkpoint clamp component A(RAD9A)	5883	n.r.	up	x	x	x
RCAN1	regulator of calcineurin 1(RCAN1)	1827	n.r.	up	x	x	x
RGAG1	retrotransposon gag domain containing 1(RGAG1)	57529	n.r.	up	x	x	x
RNF181	ring finger protein 181(RNF181)	51255	n.r.	up	x	x	x
RNF41	ring finger protein 41(RNF41)	10193	n.r.	up	x	x	x
RPS27	ribosomal protein S27(RPS27)	6232	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.s.
RWDD2A	RWD domain containing 2A(RWDD2A)	112611	n.r.	up	x	x	x
SARS	seryl-tRNA synthetase(SARS)	6301	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
SDF2L1	stromal cell derived factor 2 like 1(SDF2L1)	23753	n.r.	up	n.r.	n.r.	up
SEC11C	SEC11 homolog C, signal peptidase complex subunit(SEC11C)	90701	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
SEC13	SEC13 homolog, nuclear pore and COPII coat complex component(SEC13)	6396	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.s.
SEC23B	Sec23 homolog B, coat complex II component(SEC23B)	10483	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
SEC24D	SEC24 homolog D, COPII coat complex component(SEC24D)	9871	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.s.
SEC31A	SEC31 homolog A, COPII coat complex component(SEC31A)	22872	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
SEC61B	Sec61 translocon beta subunit(SEC61B)	10952	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
SEC61G	Sec61 translocon gamma subunit(SEC61G)	23480	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
SEL1L	SEL1L ERAD E3 ligase adaptor subunit(SEL1L)	6400	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
SELENOK	selenoprotein K(SELENOK)	58515	n.r.	up	x	up	x
SELENOS	selenoprotein S(SELENOS)	55829	n.r.	up	n.s.	up	up
SEPHS2	selenophosphate synthetase 2(SEPHS2)	22928	n.r.	up	x	x	x

SERP1	stress associated endoplasmic reticulum protein 1(SERP1)	27230	n.r.	up	x	x	x
SESN2	sestrin 2(SESN2)	83667	up	up	x	up	x
SGTB	small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing beta(SGTB)	54557	n.r.	up	x	up	up
SH3BGR	SH3 domain binding glutamate rich protein(SH3BGR)	6450	n.r.	up	x	x	x
SH3RF1	SH3 domain containing ring finger 1(SH3RF1)	57630	n.r.	up	x	x	x
SHCBP1	SHC binding and spindle associated 1(SHCBP1)	79801	n.r.	up	n.s.	n.s.	down
SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2(SHMT2)	6472	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.s.
SIAH2	siah E3 ubiquitin protein ligase 2(SIAH2)	6478	n.r.	up	x	x	x
SLC10A7	solute carrier family 10 member 7(SLC10A7)	84068	n.r.	up	x	x	x
SLC31A1	solute carrier family 31 member 1(SLC31A1)	1317	n.r.	up	x	x	x
SLC35B1	solute carrier family 35 member B1(SLC35B1)	10237	n.r.	up	x	x	x
SLC6A9	solute carrier family 6 member 9(SLC6A9)	6536	n.r.	up	x	x	x
SLFN5	schlafen family member 5(SLFN5)	162394	n.r.	up	x	up	up
SNRPA	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A(SNRPA)	6626	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.s.
SPRYD3	SPRY domain containing 3(SPRYD3)	84926	n.r.	up	x	x	x
SRA1	steroid receptor RNA activator 1(SRA1)	10011	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.s.
SRP68	signal recognition particle 68(SRP68)	6730	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.s.
STARD4	StAR related lipid transfer domain containing 4(STARD4)	134429	n.r.	up	x	x	x
STOX2	storkhead box 2(STOX2)	56977	n.r.	up	x	x	x
STX5	syntaxin 5(STX5)	6811	n.r.	up	x	n.r.	up
SYBU	syntabulin(SYBU)	55638	n.r.	up	x	x	x
SYVN1	synoviolin 1(SYVN1)	84447	n.r.	up	up	up	up
TFG	TRK-fused gene(TFG)	10342	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.s.
TGIF1	TGFB induced factor homeobox 1(TGIF1)	7050	n.r.	up	x	x	x
TIMM17A	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast) (TIMM17A)	10440	n.r.	up	x	n.s.	up

TIMM44	translocase of inner mitochondrial membrane 44(TIMM44)	10469	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
TMCC3	transmembrane and coiled-coil domain family 3(TMCC3)	57458	n.r.	up	x	x	x
TMEM214	transmembrane protein 214(TMEM214)	54867	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
TNFSF9	TNF Superfamily Member 9	8744	up	n.r.	x	x	x
TRIB3	tribbles pseudokinase 3(TRIB3)	57761	n.r.	up	x	x	x
TRIM16	tripartite motif containing 16(TRIM16)	10626	n.r.	up	x	x	n.r.
TRIM25	tripartite motif containing 25(TRIM25)	7706	n.r.	up	n.r.	n.r.	n.r.
TUBE1	tubulin epsilon 1(TUBE1)	51175	n.r.	up	x	x	x
TUFT1	tuftelin 1(TUFT1)	7286	n.r.	up	x	x	x
TULP3	tubby like protein 3(TULP3)	7289	n.r.	up	x	x	x
TXNDC11	thioredoxin domain containing 11(TXNDC11)	51061	n.r.	up	x	x	x
UBC	ubiquitin C(UBC)	7316	n.r.	up	x	x	x
UBE2J1	ubiquitin conjugating enzyme E2 J1(UBE2J1)	51465	n.r.	up	x	n.r.	n.r.
UFM1	ubiquitin fold modifier 1(UFM1)	51569	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.r.
UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase(UGDH)	7358	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
UHRF1BP1	UHRF1 binding protein 1(UHRF1BP1)	54887	n.r.	up	x	x	x
ULK4	unc-51 like kinase 4(ULK4)	54986	n.r.	up	x	x	x
VCP	valosin containing protein(VCP)	7415	n.r.	up	n.s.	n.r.	n.r.
VEGFA	vascular endothelial growth factor A(VEGFA)	7422	n.r.	up	x	x	x
WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase(WARS)	7453	n.r.	up	n.r.	up	up
WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2(WFDC2)	10406	n.r.	up	x	x	x
WFS1	wolframin ER transmembrane glycoprotein(WFS1)	7466	n.r.	up	n.s.	n.s.	n.r.
WIPI1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1(WIPI1)	55062	n.r.	up	x	x	x
XBP1	X-box binding protein 1(XBP1)	7494	n.r.	up	up	up	up
ZFAND2A	zinc finger AN1-type containing 2A(ZFAND2A)	90637	n.r.	up	x	x	x
ZNF213	zinc finger protein 213(ZNF213)	7760	n.r.	up	x	x	x
ZNF446	zinc finger protein 446(ZNF446)	55663	n.r.	up	x	x	x
ZNF622	zinc finger protein 622(ZNF622)	90441	n.r.	up	n.r.	n.s.	n.s.
ZNF70	zinc finger protein 70(ZNF70)	7621	n.r.	up	x	x	x

Abbildungsverzeichnis

- 1.1 BiP als Sensor der UPR mit drei Signalzweigen
- 1.2 IRE1 vermittelt das Spleißen des Transkriptionsfaktors XBP1, RIDD und die Aktivierung des JNK Signalwegs unter ER Stress
- 1.3 Die Aktivierung von PERK führt zur Inhibition der Translation und Transkription spezifischer Gene gegen Stress
- 1.4 Schematische Übersicht des Scanmechanismus der Translationsinitiation in Eukaryoten
- 1.5 ATF6 wird als Antwort auf ER Stress prozessiert und reguliert die Transkription verschiedener UPR-Zielgene
- 1.6 Übersicht der Beteiligung von ER Stress und der UPR in menschlichen Krankheiten
- 3.1 Zeitliche Aktivierung von PERK und nachgeordneter Proteine als Teil der UPR-Induktion in LN308 und HEK293 durch TM oder TH
- 3.2 Zeitliche Abhängigkeit des Spleißen von XBP1 nach Induktion in LN308-Zellen durch TM
- 3.3 Schematische Darstellung der gezeiteten Probennahme für die Entzifferung der UPR
- 3.4 Aktivierung der UPR durch TM oder TH nach 2 oder 6 h in LN308 und HEK293
- 3.5 Die Auswertung der mRNAs enthüllt die Adaption an ER Stress in LN308- Zellen
- 3.6 LN308- Zellen zeigen eine zeit- und eine substanzabhängige Anpassung der Transkription an ER Stress
- 3.7 Scatter Plots zeigen die transkriptionelle und zeitliche Änderung der Genexpression durch die UPR über zwei Zeitpunkte
- 3.8 Scatter Plot der Transkriptionsänderungen nach UPR Induktion
- 3.9 Die RNA Expression der signifikant hochregulierten Transkripte nach Inkubation mit TM oder TH zeigt eine Anreicherung von Komponenten der UPR
- 3.10 Repräsentative Sucrose Gradienten von LN308 und HEK293 zur Auftrennung von 80S-Monosomen für das Ribosome Profiling
- 3.11 Herstellung einer repräsentativen RiboProf Library
- 3.12 Änderungen der RPF Abundanz nach Induktion der UPR in LN308- Zellen
- 3.13 Die Behandlung von LN308- Zellen zeigt eine zeit- und substanzabhängige Anpassung der Translation an ER Stress
- 3.14 Scatter Plots zeigen die Änderungen der RPFs nach Induktion der UPR
- 3.15 Scatter Plot der Abundanzänderungen von RPFs nach Induktion der UPR
- 3.16 GO-Term Analyse der koregulierten RPFs nach Induktion der UPR
- 3.17 Globale Analyse der UPR-vermittelten translationalen Regulation
- 3.18 Die ribosomale Beladung von mRNAs wird durch die Induktion der UPR verringert
- 3.19 IGV-Analyse der ATF4 mRNA
- 3.20 Zeitabhängiger Vergleich der Veränderungen regulierter Proteine nach UPR Induktion
- 3.21 Vergleich der regulierten Proteine nach UPR Induktion durch TM und TH
- 3.22 Scatter Plot regulierter Proteine nach UPR Induktion durch TM und TH
- 3.23 Die Expression von SLFN5 ist in Gliomen erhöht und korreliert negativ mit der Überlebensrate von Patienten
- 3.24 ER Stress induziert SLFN5
- 3.25 Der PERK-Signalweg der UPR induziert SLFN5 bei ER Stress
- 3.26 SLFN5 wird durch die Phosphorylierung von eIF2 α induziert
- 3.27 Der Transkriptionsfaktor ATF4 induziert die Expression von SLFN5
- 3.28 Schematische Darstellung des Serin Biosynthese Signalwegs und des mitochondrialen 1C-Metabolismus
- 3.29 ER Stress induziert MTHFD2 und SHMT2
- 3.30 MTHFD2 und SHMT2 werden durch den PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg der UPR reguliert

- 3.31 Die UPR führt zur Resistenz von Zellen gegen Antifolate
- 3.32 Die Induktion der UPR führt zur Resistenz von Flp-In T-REx 293 Zellen gegen Antifolate

Tabellenverzeichnis

- 5.1 Genereller PCR-Ansatz für Phusion High Fidelity (HF) oder Taq-DNA Polymerase
- 5.2 Schema für die PCR mit Phusion High Fidelity oder Taq-DNA Polymerase
- 5.3 Zusammensetzung 2x FA-Puffer
- 5.4 Zusammensetzung RIPA-Puffer
- 5.5 Zusammensetzung SDS-PAGE Komponenten
- 5.6. Zusammensetzung Stripping Puffer
- 6.1 Auflistung der fertigen Kits und Lösungen sowie deren Hersteller
- 6.2 Auflistung der verwendeten, selbstgemachten Puffer und Lösungen und die Zusammensetzung
- 6.3 Auflistung der benutzten Laborgeräte und deren Hersteller
- 6.4 Auflistung der DNA Oligonukleotide für die molekulare Klonierung mit Angabe des Restriktionsenzym
- 6.5 Auflistung der DNA Oligonukleotide für qRT-PCR Versuche und Splicing von XBP1 mit Angabe des Restriktionsenzym
- 6.6 Auflistung der DNA Oligonukleotide für Sequenzierungen
- 6.7 Auflistung der DNA Oligonukleotide bei der Herstellung der Ribosome Profiling Libraries
- 6.8 Auflistung der verwendeten Plasmide mit Anmerkungen
- 6.9 Verwendete Primäantikörper für Western Blot
- 6.10 Verwendete Bakterienstämme
- 6.11 Verwendete Medien
- 6.12 Verwendete Säugetierzellkulturen
- 6.13 Verwendete Medien für die Kultivierung der Säugetierzelllinien

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bZIP	Basic Leucin Zipper
cDNA	komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
cm	Zentimeter
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERSE	ER Stress response element
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FBS	fetales Rinderserum
FS	First Strand
g	Gramm
G	Gewichtskraft
GDP	Guanosindiphosphat
GLS	Golgi Translokationsstellen
GO	Gene Ontology
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HF	High Fidelity
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobase
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IGV	Integrated Genome Viewer
l	Liter
LB	lysogeny broth
lncRNA	long non-coding RNA
M	molar
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minute
miRNA	micro RNA
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Massenspektrometrie

MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
NaOAc	Natriumacetat
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
nt	Nukleotid
ORF	Open Reading Frame
PAA	Polyacrylamid
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIC	Prä-Initiations Komplex
PNK	Polynukleotidkinase
qRT	quantitativ real-time
REMBRANDT	REpository of Molecular BRAin Neoplasia Data
RiboProf	Ribosome Profiling
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPFs	ribosomal geschützte mRNA Fragmente (ribosome protected fragments)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SERCA	Ca ²⁺ ATPase des sarko/endoplasmatischen Retikulums
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
Ssc	Natriumchlorid/Natriumcitrat
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Threonin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris-gepuffertes Kochsalzlösung mit Tween20
TC	tertiäre Komplex
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
TH	Thapsigargin
TM	Tunicamycin
tRNAiMet	Initiator Methionyl-tRNA
U	Enzymeinheit
üN	über Nacht
uORF	upstream Open Reading Frame
UPR	Unfolded Protein Response
UTR	untranslatierte Region

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

Literatur

- ACOSTA-ALVEAR, D., ZHOU, Y., BLAIS, A., TSIKITIS, M., LENTS, N. H., ARIAS, C., LENNON, C. J., KLUGER, Y. & DYNLACHT, B. D. 2007. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell*, 27, 53-66.
- ADACHI, Y., YAMAMOTO, K., OKADA, T., YOSHIDA, H., HARADA, A. & MORI, K. 2008. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct*, 33, 75-89.
- ADAMS, C. M. 2007. Role of the transcription factor ATF4 in the anabolic actions of insulin and the anti-anabolic actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*, 282, 16744-53.
- AGUIRRE-GHISO, J. A. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*, 7, 834-46.
- AMBERGER, V. R., HENSEL, T., OGATA, N. & SCHWAB, M. E. 1998. Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin in vitro is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity. *Cancer Res*, 58, 149-58.
- AMIN-WETZEL, N., SAUNDERS, R. A., KAMPHUIS, M. J., RATO, C., PREISLER, S., HARDING, H. P. & RON, D. 2017. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell*, 171, 1625-1637.e13.
- ANDERS, S., PYL, P. T. & HUBER, W. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 166-9.
- ANDREEV, D. E., O'CONNOR, P. B., FAHEY, C., KENNY, E. M., TERENIN, I. M., DMITRIEV, S. E., CORMICAN, P., MORRIS, D. W., SHATSKY, I. N. & BARANOV, P. V. 2015. Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *Elife*, 4, e03971.
- ANSAR, M., SANTOS-CORTEZ, R. L., SAQIB, M. A., ZULFIQAR, F., LEE, K., ASHRAF, N. M., ULLAH, E., WANG, X., SAJID, S., KHAN, F. S., AMIN-UD-DIN, M., SMITH, J. D., SHENDURE, J., BAMSHAD, M. J., NICKERSON, D. A., HAMEED, A., RIAZUDDIN, S., AHMED, Z. M., AHMAD, W. & LEAL, S. M. 2015. Mutation of ATF6 causes autosomal recessive achromatopsia. *Hum Genet*, 134, 941-50.
- ARSLAN, A. D., SASSANO, A., SALEIRO, D., LISOWSKI, P., KOSCIUCZUK, E. M., FISCHIETTI, M., ECKERDT, F., FISH, E. N. & PLATANIAS, L. C. 2017. Human SLFN5 is a transcriptional co-repressor of STAT1-mediated interferon responses and promotes the malignant phenotype in glioblastoma. *Oncogene*, 36, 6006-6019.
- ASHBURNER, M. 1970. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatments. *Chromosoma*, 31, 356-76.
- ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M. & SHERLOCK, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25, 25-9.
- AUF, G., JABOUILLE, A., GUERIT, S., PINEAU, R., DELUGIN, M., BOUCHECAREILH, M., MAGNIN, N., FAVEREAUX, A., MAITRE, M., GAISER, T., VON DEIMLING, A., CZABANKA, M., VAJKOCZY, P., CHEVET, E., BIKFALVI, A. & MOENNER, M. 2010. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15553-8.
- AVIVAR-VALDERAS, A., SALAS, E., BOBROVNIKOVA-MARJON, E., DIEHL, J. A., NAGI, C., DEBNATH, J. & AGUIRRE-GHISO, J. A. 2011. PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment. *Mol Cell Biol*, 31, 3616-29.
- AXTEN, J. M., MEDINA, J. R., FENG, Y., SHU, A., ROMERIL, S. P., GRANT, S. W., LI, W. H.,

- HEERDING, D. A., MINTHORN, E., MENCKEN, T., ATKINS, C., LIU, Q., RABINDRAN, S., KUMAR, R., HONG, X., GOETZ, A., STANLEY, T., TAYLOR, J. D., SIGETHY, S. D., TOMBERLIN, G. H., HASSELL, A. M., KAHLER, K. M., SHEWCHUK, L. M. & GAMPE, R. T. 2012. Discovery of 7-methyl-5-(1-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem*, 55, 7193-207.
- AYER, D. E., KRETZNER, L. & EISENMAN, R. N. 1993. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell*, 72, 211-22.
- BACK, S. H., SCHEUNER, D., HAN, J., SONG, B., RIBICK, M., WANG, J., GILDERSLEEVE, R. D., PENNATHUR, S. & KAUFMAN, R. J. 2009. Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. *Cell Metab*, 10, 13-26.
- BAI, Q. L., HU, C. W., WANG, X. R., SHANG, J. X. & YIN, G. F. 2017. MiR-616 promotes proliferation and inhibits apoptosis in glioma cells by suppressing expression of SOX7 via the Wnt signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21, 5630-5637.
- BALSA, E., SOUSTEK, M. S., THOMAS, A., COGLIATI, S., GARCIA-POYATOS, C., MARTIN-GARCIA, E., JEDRYCHOWSKI, M., GYGI, S. P., ENRIQUEZ, J. A. & PUIGSERVER, P. 2019. ER and Nutrient Stress Promote Assembly of Respiratory Chain Supercomplexes through the PERK-eIF2alpha Axis. *Mol Cell*, 74, 877-890.e6.
- BAO, S., WU, Q., MCLENDON, R. E., HAO, Y., SHI, Q., HJELMELAND, A. B., DEWHIRST, M. W., BIGNER, D. D. & RICH, J. N. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444, 756-60.
- BARBOSA-TESSMANN, I. P., CHEN, C., ZHONG, C., SCHUSTER, S. M., NICK, H. S. & KILBERG, M. S. 1999. Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J Biol Chem*, 274, 31139-44.
- BARTKOWIAK, K., KWIATKOWSKI, M., BUCK, F., GORGES, T. M., NILSE, L., ASSMANN, V., ANDREAS, A., MULLER, V., WIKMAN, H., RIETHDORF, S., SCHLUTER, H. & PANTEL, K. 2015. Disseminated Tumor Cells Persist in the Bone Marrow of Breast Cancer Patients through Sustained Activation of the Unfolded Protein Response. *Cancer Res*, 75, 5367-77.
- BARTOSZEWSKA, S., KOCHAN, K., MADANECKI, P., PIOTROWSKI, A., OCHOCKA, R., COLLAWN, J. F. & BARTOSZEWSKI, R. 2013. Regulation of the unfolded protein response by microRNAs. *Cell Mol Biol Lett*, 18, 555-78.
- BAUD, V., LIU, Z. G., BENNETT, B., SUZUKI, N., XIA, Y. & KARIN, M. 1999. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev*, 13, 1297-308.
- BAUMEISTER, P., LUO, S., SKARNES, W. C., SUI, G., SETO, E., SHI, Y. & LEE, A. S. 2005. Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol*, 25, 4529-40.
- BELLUCCI, A., NAVARRIA, L., ZALTIERI, M., FALARTI, E., BODEI, S., SIGALA, S., BATTISTIN, L., SPILLANTINI, M., MISSALE, C. & SPANO, P. 2011. Induction of the unfolded protein response by alpha-synuclein in experimental models of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 116, 588-605.
- BELMONT, P. J., TADIMALLA, A., CHEN, W. J., MARTINDALE, J. J., THUERAUF, D. J., MARCINKO, M., GUDE, N., SUSSMAN, M. A. & GLEMBOTSKI, C. C. 2008. Coordination of growth and endoplasmic reticulum stress signaling by regulator of calcineurin

- (RCAN1), a novel ATF6-inducible gene. *J Biol Chem*, 283, 14012-21.
- BERENDES, H. D. 1968. Factors involved in the expression of gene activity in polytene chromosomes. *Chromosoma*, 24, 418-37.
- BERLANGA, J. J., VENTOSO, I., HARDING, H. P., DENG, J., RON, D., SONENBERG, N., CARRASCO, L. & DE HARO, C. 2006. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *Embo j*, 25, 1730-40.
- BERTOLOTI, A., ZHANG, Y., HENDERSHOT, L. M., HARDING, H. P. & RON, D. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2, 326-32.
- BETTIGOLE, S. E., LIS, R., ADORO, S., LEE, A. H., SPENCER, L. A., WELLER, P. F. & GLIMCHER, L. H. 2015. The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. *Nat Immunol*, 16, 829-37.
- BLAZANIN, N., SON, J., CRAIG-LUCAS, A. B., JOHN, C. L., BREECH, K. J., PODOLSKY, M. A. & GLICK, A. B. 2017. ER stress and distinct outputs of the IRE1alpha RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 9900-9905.
- BLOND-ELGUINDI, S., CWIRLA, S. E., DOWER, W. J., LIPSHUTZ, R. J., SPRANG, S. R., SAMBROOK, J. F. & GETHING, M. J. 1993a. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, 75, 717-28.
- BLOND-ELGUINDI, S., FOURIE, A. M., SAMBROOK, J. F. & GETHING, M. J. 1993b. Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J Biol Chem*, 268, 12730-5.
- BOBROVNIKOVA-MARJON, E., GRIGORIADOU, C., PYTEL, D., ZHANG, F., YE, J., KOUMENIS, C., CAVENER, D. & DIEHL, J. A. 2010. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*, 29, 3881-95.
- BOBROVNIKOVA-MARJON, E., PYTEL, D., RIESE, M. J., VAITES, L. P., SINGH, N., KORETZKY, G. A., WITZE, E. S. & DIEHL, J. A. 2012. PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to generate phosphatidic acid, mediate Akt activation, and promote adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 32, 2268-78.
- BOLGER, A. M., LOHSE, M. & USADEL, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-20.
- BOMMIASAMY, H. & POPKO, B. 2011. Animal models in the study of the unfolded protein response. *Methods Enzymol*, 491, 91-109.
- BOUMAN, L., SCHLIERF, A., LUTZ, A. K., SHAN, J., DEINLEIN, A., KAST, J., GALEHDAR, Z., PALMISANO, V., PATENGE, N., BERG, D., GASSER, T., AUGUSTIN, R., TRUMBACH, D., IRRCHER, I., PARK, D. S., WURST, W., KILBERG, M. S., TATZELT, J. & WINKLHOFER, K. F. 2011. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ*, 18, 769-82.
- BOYCE, M., BRYANT, K. F., JOUSSE, C., LONG, K., HARDING, H. P., SCHEUNER, D., KAUFMAN, R. J., MA, D., COEN, D. M., RON, D. & YUAN, J. 2005. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, 307, 935-9.
- BRENNAN, C. W., VERHAAK, R. G., MCKENNA, A., CAMPOS, B., NOUSHMEHR, H., SALAMA, S. R., ZHENG, S., CHAKRAVARTY, D., SANBORN, J. Z., BERMAN, S. H., BEROUKHIM, R., BERNARD, B., WU, C. J., GENOVESE, G., SHMULEVICH, I., BARNHOLTZ-SLOAN, J., ZOU, L., VEGESNA, R., SHUKLA, S. A., CIRIELLO, G., YUNG, W. K., ZHANG, W., SOUGNEZ, C., MIKKELSEN, T., ALDAPE, K., BIGNER, D. D., VAN MEIR, E. G., PRADOS, M., SLOAN, A., BLACK, K. L., ESCHBACHER, J., FINOCCHIARO, G., FRIEDMAN, W., ANDREWS, D. W., GUHA, A., IACOCCA, M., O'NEILL, B. P., FOLTZ, G., MYERS, J., WEISENBERGER, D. J., PENNY, R., KUCHERLAPATI, R., PEROU, C. M., HAYES, D.

- N., GIBBS, R., MARRA, M., MILLS, G. B., LANDER, E., SPELLMAN, P., WILSON, R., SANDER, C., WEINSTEIN, J., MEYERSON, M., GABRIEL, S., LAIRD, P. W., HAUSSLER, D., GETZ, G. & CHIN, L. 2013. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155, 462-77.
- BROUSTAS, C. G., ROSS, J. S., YANG, Q., SHEEHAN, C. E., RIGGINS, R., NOONE, A. M., HADDAD, B. R., SEILLIER-MOISEWITSCH, F., KALLAKURY, B. V., HAFFTY, B. G., CLARKE, R. & KASID, U. N. 2010. The proapoptotic molecule BLID interacts with Bcl-XL and its downregulation in breast cancer correlates with poor disease-free and overall survival. *Clin Cancer Res*, 16, 2939-48.
- BROZZI, F., GERLO, S., GRIECO, F. A., NARDELLI, T. R., LIEVENS, S., GYSEMANS, C., MARSELLI, L., MARCHETTI, P., MATHIEU, C., TAVERNIER, J. & EIZIRIK, D. L. 2014. A combined "omics" approach identifies N-Myc interactor as a novel cytokine-induced regulator of IRE1 protein and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 289, 20677-93.
- BRUNTZ, R. C., LINDSLEY, C. W. & BROWN, H. A. 2014. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Rev*, 66, 1033-79.
- BURKHART, J. M., SCHUMBRUTZKI, C., WORTELKAMP, S., SICKMANN, A. & ZAHEDI, R. P. 2012. Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *J Proteomics*, 75, 1454-62.
- BURNETT, H. F., AUDAS, T. E., LIANG, G. & LU, R. R. 2012. Herpes simplex virus-1 disarms the unfolded protein response in the early stages of infection. *Cell Stress Chaperones*, 17, 473-83.
- CABRERA, E., HERNANDEZ-PEREZ, S., KOUNDRIOUKOFF, S., DEBATISSE, M., KIM, D., SMOLKA, M. B., FREIRE, R. & GILLESPIE, D. A. 2017. PERK inhibits DNA replication during the Unfolded Protein Response via Claspin and Chk1. *Oncogene*, 36, 678-686.
- CALFON, M., ZENG, H., URANO, F., TILL, J. H., HUBBARD, S. R., HARDING, H. P., CLARK, S. G. & RON, D. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415, 92-6.
- CAO, S. S. & KAUFMAN, R. J. 2013. Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease. *Expert Opin Ther Targets*, 17, 437-48.
- CASAS-TINTO, S., ZHANG, Y., SANCHEZ-GARCIA, J., GOMEZ-VELAZQUEZ, M., RINCON-LIMAS, D. E. & FERNANDEZ-FUNEZ, P. 2011. The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity. *Hum Mol Genet*, 20, 2144-60.
- CHANG, T. K., LAWRENCE, D. A., LU, M., TAN, J., HARNOSS, J. M., MARSTERS, S. A., LIU, P., SANDOVAL, W., MARTIN, S. E. & ASHKENAZI, A. 2018. Coordination between Two Branches of the Unfolded Protein Response Determines Apoptotic Cell Fate. *Mol Cell*, 71, 629-636.e5.
- CHEN, B. P., WOLFGANG, C. D. & HAI, T. 1996. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol Cell Biol*, 16, 1157-68.
- CHEN, C. Y., MALCHUS, N. S., HEHN, B., STELZER, W., AVCI, D., LANGOSCH, D. & LEMBERG, M. K. 2014a. Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u. *Embo j*, 33, 2492-506.
- CHEN, D., RAUH, M., BUCHFELDER, M., EYUPOGLU, I. Y. & SAVASKAN, N. 2017a. The oxidometabolic driver ATF4 enhances temozolamide chemo-resistance in human gliomas. *Oncotarget*, 8, 51164-51176.
- CHEN, J., MCKAY, R. M. & PARADA, L. F. 2012. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell*, 149, 36-47.
- CHEN, J., WILLINGHAM, T., MARGRAF, L. R., SCHREIBER-AGUS, N., DEPINHO, R. A. &

- NISEN, P. D. 1995. Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells. *Nat Med*, 1, 638-43.
- CHEN, X., HU, Y., WANG, S. & SUN, X. 2017b. The regulator of calcineurin 1 (RCAN1) inhibits nuclear factor kappaB signaling pathway and suppresses human malignant glioma cells growth. *Oncotarget*, 8, 12003-12012.
- CHEN, X., ILIOPOULOS, D., ZHANG, Q., TANG, Q., GREENBLATT, M. B., HATZIAPOSTOULOU, M., LIM, E., TAM, W. L., NI, M., CHEN, Y., MAI, J., SHEN, H., HU, D. Z., ADORO, S., HU, B., SONG, M., TAN, C., LANDIS, M. D., FERRARI, M., SHIN, S. J., BROWN, M., CHANG, J. C., LIU, X. S. & GLIMCHER, L. H. 2014b. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1alpha pathway. *Nature*, 508, 103-107.
- CHENG, G., FENG, Z. & HE, B. 2005. Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2alpha dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein. *J Virol*, 79, 1379-88.
- CHEVALIER, M., RHEE, H., ELGUINDI, E. C. & BLOND, S. Y. 2000. Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J Biol Chem*, 275, 19620-7.
- CHEVET, E., HETZ, C. & SAMALI, A. 2015. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov*, 5, 586-97.
- CHITNIS, N. S., PYTEL, D., BOBROVNIKOVA-MARJON, E., PANT, D., ZHENG, H., MAAS, N. L., FREDERICK, B., KUSHNER, J. A., CHODOSH, L. A., KOUMENIS, C., FUCHS, S. Y. & DIEHL, J. A. 2012. miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner. *Mol Cell*, 48, 353-64.
- CNOP, M., LADRIERE, L., HEKERMAN, P., ORTIS, F., CARDOZO, A. K., DOGUSAN, Z., FLAMEZ, D., BOYCE, M., YUAN, J. & EIZIRIK, D. L. 2007. Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis. *J Biol Chem*, 282, 3989-97.
- COMPANIONI NAPOLES, O., TSAO, A. C., SANZ-ANQUELA, J. M., SALA, N., BONET, C., PARDO, M. L., DING, L., SIMO, O., SAQUI-SALCES, M., BLANCO, V. P., GONZALEZ, C. A. & MERCHANT, J. L. 2017. SCHLAFEN 5 expression correlates with intestinal metaplasia that progresses to gastric cancer. *J Gastroenterol*, 52, 39-49.
- CORMENIER, J., MARTIN, N., DESLE, J., SALAZAR-CARDOZO, C., POURTIER, A., ABBADIE, C. & PLUQUET, O. 2018. The ATF6alpha arm of the Unfolded Protein Response mediates replicative senescence in human fibroblasts through a COX2/prostaglandin E2 intracrine pathway. *Mech Ageing Dev*, 170, 82-91.
- COURTOIS, G. & GILMORE, T. D. 2006. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, 25, 6831-43.
- COX, J. S., SHAMU, C. E. & WALTER, P. 1993. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 73, 1197-206.
- COX, J. S. & WALTER, P. 1996. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 87, 391-404.
- CRAIG, R. & BEAVIS, R. C. 2004. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics*, 20, 1466-7.
- CREDLE, J. J., FINER-MOORE, J. S., PAPA, F. R., STROUD, R. M. & WALTER, P. 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18773-84.
- CROFT, A., TAY, K. H., BOYD, S. C., GUO, S. T., JIANG, C. C., LAI, F., TSENG, H. Y., JIN, L., RIZOS, H., HERSEY, P. & ZHANG, X. D. 2014. Oncogenic activation of MEK/ERK primes melanoma cells for adaptation to endoplasmic reticulum stress. *J Invest Dermatol*, 134, 488-497.

- CUBILLOS-RUIZ, J. R., SILBERMAN, P. C., RUTKOWSKI, M. R., CHOPRA, S., PERALES-PUCHALT, A., SONG, M., ZHANG, S., BETTIGOLE, S. E., GUPTA, D., HOLCOMB, K., ELLENSON, L. H., CAPUTO, T., LEE, A. H., CONEJO-GARCIA, J. R. & GLIMCHER, L. H. 2015. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell*, 161, 1527-38.
- CUDDAPAH, V. A., ROBEL, S., WATKINS, S. & SONTHEIMER, H. 2014. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*, 15, 455-65.
- CUEVAS, E. P., ERASO, P., MAZON, M. J., SANTOS, V., MORENO-BUENO, G., CANO, A. & PORTILLO, F. 2017. LOXL2 drives epithelial-mesenchymal transition via activation of IRE1-XBP1 signalling pathway. *Sci Rep*, 7, 44988.
- CULLINAN, S. B. & DIEHL, J. A. 2004. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 279, 20108-17.
- CULLINAN, S. B. & DIEHL, J. A. 2006. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 317-32.
- CULLINAN, S. B., ZHANG, D., HANNINK, M., ARVISAIS, E., KAUFMAN, R. J. & DIEHL, J. A. 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*, 23, 7198-209.
- CUNNEA, P. M., MIRANDA-VIZUETE, A., BERTOLI, G., SIMMEN, T., DAMDIMOPOULOS, A. E., HERMANN, S., LEINONEN, S., HUIKKO, M. P., GUSTAFSSON, J. A., SITIA, R. & SPYROU, G. 2003. ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *J Biol Chem*, 278, 1059-66.
- DAI, L., HUANG, C., CHEN, L., SHAN, G. & LI, Z. 2015. Altered expression of microRNAs in the response to ER stress | SpringerLink. *Science Bulletin*, 60, 202-209.
- DEANGELIS, L. M. 2001. Brain tumors. *N Engl J Med*, 344, 114-23.
- DELEPINE, M., NICOLINO, M., BARRETT, T., GOLAMAULLY, M., LATHROP, G. M. & JULIER, C. 2000. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet*, 25, 406-9.
- DENG, J., HARDING, H. P., RAUGHT, B., GINGRAS, A. C., BERLANGA, J. J., SCHEUNER, D., KAUFMAN, R. J., RON, D. & SONENBERG, N. 2002. Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr Biol*, 12, 1279-86.
- DENNIS, G., JR., SHERMAN, B. T., HOSACK, D. A., YANG, J., GAO, W., LANE, H. C. & LEMPICKI, R. A. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 4, P3.
- DENOYELLE, C., ABOU-RJAILY, G., BEZROOKOVE, V., VERHAEGEN, M., JOHNSON, T. M., FULLEN, D. R., POINTER, J. N., GRUBER, S. B., SU, L. D., NIKIFOROV, M. A., KAUFMAN, R. J., BASTIAN, B. C. & SOENGAS, M. S. 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol*, 8, 1053-63.
- DENZEL, M. S., STORM, N. J., GUTSCHMIDT, A., BADDI, R., HINZE, Y., JAROSCH, E., SOMMER, T., HOPPE, T. & ANTEBI, A. 2014. Hexosamine pathway metabolites enhance protein quality control and prolong life. *Cell*, 156, 1167-1178.
- DEVER, T. E., FENG, L., WEK, R. C., CIGAN, A. M., DONAHUE, T. F. & HINNEBUSCH, A. G. 1992. Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell*, 68, 585-96.
- DOBIN, A., DAVIS, C. A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, C., JHA, S., BATUT, P., CHAISSON, M. & GINGERAS, T. R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15-21.

- DONG, J. T. & CHEN, C. 2009. Essential role of KLF5 transcription factor in cell proliferation and differentiation and its implications for human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2691-706.
- DONG, M., BRIDGES, J. P., APSLEY, K., XU, Y. & WEAVER, T. E. 2008. ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Mol Biol Cell*, 19, 2620-30.
- DOYLE, K. M., KENNEDY, D., GORMAN, A. M., GUPTA, S., HEALY, S. J. & SAMALI, A. 2011. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med*, 15, 2025-39.
- DROGAT, B., AUGUSTE, P., NGUYEN, D. T., BOUCHECAREILH, M., PINEAU, R., NALBANTOGLU, J., KAUFMAN, R. J., CHEVET, E., BIKFALVI, A. & MOENNER, M. 2007. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 67, 6700-7.
- DU, K., HERZIG, S., KULKARNI, R. N. & MONTMINY, M. 2003. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*, 300, 1574-7.
- DUENNWALD, M. L. & LINDQUIST, S. 2008. Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Genes Dev*, 22, 3308-19.
- ERAMO, A., RICCI-VITIANI, L., ZEUNER, A., PALLINI, R., LOTTI, F., SETTE, G., PILOZZI, E., LAROCCA, L. M., PESCHLE, C. & DE MARIA, R. 2006. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ*. England.
- FANG, L., GONG, J., WANG, Y., LIU, R., LI, Z., WANG, Z., ZHANG, Y., ZHANG, C., SONG, C., YANG, A., TING, J. P., JIN, B. & CHEN, L. 2014. MICA/B expression is inhibited by unfolded protein response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 33, 76.
- FARBER, S., DIAMOND, L. K., MERCER, R. D., SYLVESTER, R. F. J. & WOLFF, J. A. 1948. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *NEJM*, 238, 787-793.
- FAWCETT, T. W., MARTINDALE, J. L., GUYTON, K. Z., HAI, T. & HOLBROOK, N. J. 1999. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J*, 339 (Pt 1), 135-41.
- FEDER, M. E. & HOFMANN, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*, 61, 243-82.
- FELDHEIM, D., ROTHBLATT, J. & SCHEKMAN, R. 1992. Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol Cell Biol*, 12, 3288-96.
- FENG, Y. X., SOKOL, E. S., DEL VECCHIO, C. A., SANDUJA, S., CLAESSEN, J. H., PROIA, T. A., JIN, D. X., REINHARDT, F., PLOEGH, H. L., WANG, Q. & GUPTA, P. B. 2014. Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2alpha and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Discov*, 4, 702-15.
- FINK, E. E., MOPARTHY, S., BAGATI, A., BIANCHI-SMIRAGLIA, A., LIPCHICK, B. C., WOLFF, D. W., ROLL, M. V., WANG, J., LIU, S., BAKIN, A. V., KANDEL, E. S., LEE, A. H. & NIKIFOROV, M. A. 2018. XBP1-KLF9 Axis Acts as a Molecular Rheostat to Control the Transition from Adaptive to Cytotoxic Unfolded Protein Response. *Cell Rep*, 25, 212-223.e4.
- FLAMMENT, M., HAJDUCH, E., FERRE, P. & FOUFELLE, F. 2012. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 23, 381-90.
- FLYNN, G. C., CHAPPELL, T. G. & ROTHMAN, J. E. 1989. Peptide binding and release by

- proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science*, 245, 385-90.
- FONSECA, S. G., FUKUMA, M., LIPSON, K. L., NGUYEN, L. X., ALLEN, J. R., OKA, Y. & URANO, F. 2005. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 280, 39609-15.
- FONSECA, S. G., GROMADA, J. & URANO, F. 2011. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death. *Trends Endocrinol Metab*, 22, 266-74.
- FONSECA, S. G., ISHIGAKI, S., OSLOWSKI, C. M., LU, S., LIPSON, K. L., GHOSH, R., HAYASHI, E., ISHIHARA, H., OKA, Y., PERMUTT, M. A. & URANO, F. 2010. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest*, 120, 744-55.
- FRANKISH, A., DIEKHANS, M., FERREIRA, A. M., JOHNSON, R., JUNGREIS, I., LOVELAND, J., MUDGE, J. M., SISU, C., WRIGHT, J., ARMSTRONG, J., BARNES, I., BERRY, A., BIGNELL, A., CARBONELL SALA, S., CHRAST, J., CUNNINGHAM, F., DI DOMENICO, T., DONALDSON, S., FIDDES, I. T., GARCIA GIRON, C., GONZALEZ, J. M., GREGO, T., HARDY, M., HOURLIER, T., HUNT, T., IZUOGU, O. G., LAGARDE, J., MARTIN, F. J., MARTINEZ, L., MOHANAN, S., MUIR, P., NAVARRO, F. C. P., PARKER, A., PEI, B., POZO, F., RUFFIER, M., SCHMITT, B. M., STAPLETON, E., SUNER, M. M., SYCHEVA, I., USZCZYNSKA-RATAJCZAK, B., XU, J., YATES, A., ZERBINO, D., ZHANG, Y., AKEN, B., CHOUDHARY, J. S., GERSTEIN, M., GUIGO, R., HUBBARD, T. J. P., KELLIS, M., PATEN, B., REYMOND, A., TRESS, M. L. & FLICEK, P. 2019. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res*, 47, D766-d773.
- FRITZ, J. M., DONG, M., APSLEY, K. S., MARTIN, E. P., NA, C. L., SITARAMAN, S. & WEAVER, T. E. 2014. Deficiency of the BiP cochaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects. *Mol Biol Cell*, 25, 431-40.
- FUJIMOTO, A., KAWANA, K., TAGUCHI, A., ADACHI, K., SATO, M., NAKAMURA, H., OGISHIMA, J., YOSHIDA, M., INOUE, T., NISHIDA, H., TOMIO, K., YAMASHITA, A., MATSUMOTO, Y., ARIMOTO, T., WADA-HIRAIKE, O., ODA, K., NAGAMATSU, T., OSUGA, Y. & FUJII, T. 2016. Inhibition of endoplasmic reticulum (ER) stress sensors sensitizes cancer stem-like cells to ER stress-mediated apoptosis. *Oncotarget*, 7, 51854-51864.
- GALLAGHER, C. M., GARRI, C., CAIN, E. L., ANG, K. K., WILSON, C. G., CHEN, S., HEARN, B. R., JAISHANKAR, P., ARANDA-DIAZ, A., ARKIN, M. R., RENSLO, A. R. & WALTER, P. 2016. Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6alpha branch. *Elife*, 5.
- GAO, J., ISHIGAKI, Y., YAMADA, T., KONDO, K., YAMAGUCHI, S., IMAI, J., UNO, K., HASEGAWA, Y., SAWADA, S., ISHIHARA, H., OYADOMARI, S., MORI, M., OKA, Y. & KATAGIRI, H. 2011. Involvement of endoplasmic stress protein C/EBP homologous protein in arteriosclerosis acceleration with augmented biological stress responses. *Circulation*, 124, 830-9.
- GARDNER, B. M. & WALTER, P. 2011. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*, 333, 1891-4.
- GENESCA, L., AUBAREDA, A., FUENTES, J. J., ESTIVILL, X., DE LA LUNA, S. & PEREZ-RIBA, M. 2003. Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *Biochem J*, 374, 567-75.
- GHOSH, R., LIPSON, K. L., SARGENT, K. E., MERCURIO, A. M., HUNT, J. S., RON, D. & URANO, F. 2010. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One*, 5, e9575.
- GIESE, A. 2003. Glioma invasion--pattern of dissemination by mechanisms of invasion

- and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumorsuppressor p53 and proto-oncogene ETS-1. *Acta Neurochir Suppl*, 88, 153-62.
- GIESE, A., BJERKVIG, R., BERENS, M. E. & WESTPHAL, M. 2003. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol*, 21, 1624-36.
- GIFFORD, J. B., HUANG, W., ZELENIAK, A. E., HINDOYAN, A., WU, H., DONAHUE, T. R. & HILL, R. 2016. Expression of GRP78, Master Regulator of the Unfolded Protein Response, Increases Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*, 15, 1043-52.
- GILBERT, M. R. 2011. Recurrent glioblastoma: a fresh look at current therapies and emerging novel approaches. *Semin Oncol*, 38 Suppl 4, S21-33.
- GLADWYN-NG, I., CORDON-BARRIS, L., ALFANO, C., CREPPE, C., COUDERC, T., MORELLI, G., THELEN, N., AMERICA, M., BESSIERES, B., ENCHA-RAZAVI, F., BONNIERE, M., SUZUKI, I. K., FLAMAND, M., VANDERHAEGHEN, P., THIRY, M., LECUIT, M. & NGUYEN, L. 2018. Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nat Neurosci*, 21, 63-71.
- GLEMBOTSKI, C. C. 2014. Roles for ATF6 and the sarco/endoplasmic reticulum protein quality control system in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 71, 11-5.
- GONEN, N. & ASSARAF, Y. G. 2012. Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat*, 15, 183-210.
- GRANADOS, D. P., TANGUAY, P. L., HARDY, M. P., CARON, E., DE VERTEUIL, D., MELOCHE, S. & PERREAULT, C. 2009. ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol*, 10, 10.
- GREENMAN, C., STEPHENS, P., SMITH, R., DALGLIESH, G. L., HUNTER, C., BIGNELL, G., DAVIES, H., TEAGUE, J., BUTLER, A., STEVENS, C., EDKINS, S., O'MEARA, S., VASTRIK, I., SCHMIDT, E. E., AVIS, T., BARTHORPE, S., BHAMRA, G., BUCK, G., CHOUDHURY, B., CLEMENTS, J., COLE, J., DICKS, E., FORBES, S., GRAY, K., HALLIDAY, K., HARRISON, R., HILLS, K., HINTON, J., JENKINSON, A., JONES, D., MENZIES, A., MIRONENKO, T., PERRY, J., RAINE, K., RICHARDSON, D., SHEPHERD, R., SMALL, A., TOFTS, C., VARIAN, J., WEBB, T., WEST, S., WIDAA, S., YATES, A., CAHILL, D. P., LOUIS, D. N., GOLDSTRAW, P., NICHOLSON, A. G., BRASSEUR, F., LOOIJENGA, L., WEBER, B. L., CHIEW, Y. E., DEFAZIO, A., GREAVES, M. F., GREEN, A. R., CAMPBELL, P., BIRNEY, E., EASTON, D. F., CHENEVIX-TRENCH, G., TAN, M. H., KHOO, S. K., TEH, B. T., YUEN, S. T., LEUNG, S. Y., WOOSTER, R., FUTREAL, P. A. & STRATTON, M. R. 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446, 153-8.
- GROOTJANS, J., KASER, A., KAUFMAN, R. J. & BLUMBERG, R. S. 2016. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 16, 469-84.
- GUAN, D., WANG, H., LI, V. E., XU, Y., YANG, M. & SHEN, Z. 2009. N-glycosylation of ATF6beta is essential for its proteolytic cleavage and transcriptional repressor function to ATF6alpha. *J Cell Biochem*, 108, 825-31.
- HAAS, I. G. & WABL, M. 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, 306, 387-9.
- HAI, T. & CURRAN, T. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3720-4.
- HAI, T. & HARTMAN, M. G. 2001. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*, 273, 1-11.
- HALL, R. K., YAMASAKI, T., KUCERA, T., WALTNER-LAW, M., O'BRIEN, R. & GRANNER, D. K. 2000. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins.

- J Biol Chem*, 275, 30169-75.
- HAN, D., LERNER, A. G., VANDE WALLE, L., UPTON, J. P., XU, W., HAGEN, A., BACKES, B. J., OAKES, S. A. & PAPA, F. R. 2009. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*, 138, 562-75.
- HAN, J., BACK, S. H., HUR, J., LIN, Y. H., GILDERSLEEVE, R., SHAN, J., YUAN, C. L., KROKOWSKI, D., WANG, S., HATZOGLOU, M., KILBERG, M. S., SARTOR, M. A. & KAUFMAN, R. J. 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*, 15, 481-90.
- HARDING, H. P., NOVOA, I., ZHANG, Y., ZENG, H., WEK, R., SCHAPIRA, M. & RON, D. 2000a. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, 6, 1099-108.
- HARDING, H. P., ZENG, H., ZHANG, Y., JUNGRIES, R., CHUNG, P., PLESKEN, H., SABATINI, D. D. & RON, D. 2001. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell*, 7, 1153-63.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y., BERTOLOTTI, A., ZENG, H. & RON, D. 2000b. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*, 5, 897-904.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y. & RON, D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397, 271-4.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y., SCHEUNER, D., CHEN, J. J., KAUFMAN, R. J. & RON, D. 2009. Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 1832-7.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y., ZENG, H., NOVOA, I., LU, P. D., CALFON, M., SADRI, N., YUN, C., POPKO, B., PAULES, R., STOJDL, D. F., BELL, J. C., HETTMANN, T., LEIDEN, J. M. & RON, D. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11, 619-33.
- HARDY, J. 1997. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 20, 154-9.
- HART, L. S., CUNNINGHAM, J. T., DATTA, T., DEY, S., TAMEIRE, F., LEHMAN, S. L., QIU, B., ZHANG, H., CERNIGLIA, G., BI, M., LI, Y., GAO, Y., LIU, H., LI, C., MAITY, A., THOMAS-TIKHONENKO, A., PERL, A. E., KOONG, A., FUCHS, S. Y., DIEHL, J. A., MILLS, I. G., RUGGERO, D. & KOUMENIS, C. 2012. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Invest*, 122, 4621-34.
- HASHEMI GORADEL, N., NAJAFI, M., SALEHI, E., FARHOOD, B. & MORTEZAEI, K. 2019. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol*, 234, 5683-5699.
- HASHIDA, K., KITAO, Y., SUDO, H., AWA, Y., MAEDA, S., MORI, K., TAKAHASHI, R., IINUMA, M. & HORI, O. 2012. ATF6alpha promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One*, 7, e47950.
- HATZIKIROU, H., BASANTA, D., SIMON, M., SCHALLER, K. & DEUTSCH, A. 2012. 'Go or grow': the key to the emergence of invasion in tumour progression? *Math Med Biol*, 29, 49-65.
- HAZE, K., YOSHIDA, H., YANAGI, H., YURA, T. & MORI, K. 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 10, 3787-99.
- HE, Y., BEATTY, A., HAN, X., JI, Y., MA, X., ADELSTEIN, R. S., YATES, J. R., 3RD, KEMPHUES, K. & QI, L. 2012. Nonmuscle myosin IIB links cytoskeleton to IRE1alpha signaling during ER stress. *Dev Cell*, 23, 1141-52.
- HECKMAN, K. L. & PEASE, L. R. 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc*, 2, 924-32.
- HELLMAN, R., VANHOVE, M., LEJEUNE, A., STEVENS, F. J. & HENDERSHOT, L. M. 1999. The

- in vivo association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. *J Cell Biol*, 144, 21-30.
- HELMKE, C., BECKER, S. & STREBHARDT, K. 2016. The role of Plk3 in oncogenesis. *Oncogene*, 35, 135-47.
- HENSEN, S. M. M., HELDENS, L., VAN ENCKEVORT, C. M. W., VAN GENESEN, S. T., PRUIJN, G. J. M. & LUBSEN, N. H. 2012. Heat shock factor 1 is inactivated by amino acid deprivation. *Cell Stress Chaperones*.
- HERSHEY, J. W. B., AND MERRICK, W. C. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: SONENBERG, N., HERSHEY, J. W. B. & MATHEWS, M. B. (eds.) *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- HERTZ, R., LI, M. C. & SPENCER, D. B. 1956. Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. *Proc Soc Exp Biol Med*, 93, 361-6.
- HETZ, C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 89-102.
- HETZ, C., CHEVET, E. & HARDING, H. P. 2013. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 703-19.
- HETZ, C., LEE, A. H., GONZALEZ-ROMERO, D., THIELEN, P., CASTILLA, J., SOTO, C. & GLIMCHER, L. H. 2008. Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 757-62.
- HETZ, C. & PAPA, F. R. 2018. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*, 69, 169-181.
- HETZ, C. & SAXENA, S. 2017. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol*, 13, 477-491.
- HETZ, C., THIELEN, P., MATUS, S., NASSIF, M., COURT, F., KIFFIN, R., MARTINEZ, G., CUERVO, A. M., BROWN, R. H. & GLIMCHER, L. H. 2009. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev*, 23, 2294-306.
- HIGA, A., TAOUJI, S., LHOMOND, S., JENSEN, D., FERNANDEZ-ZAPICO, M. E., SIMPSON, J. C., PASQUET, J. M., SCHEKMAN, R. & CHEVET, E. 2014. Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6alpha requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Mol Cell Biol*, 34, 1839-49.
- HINNEBUSCH, A. G. 2000. Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In: SONENBERG, N., HERSHEY, J. W. B. & MATHEWS, M. B. (eds.) *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- HINNEBUSCH, A. G. 2017. Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation. *Trends Biochem Sci*, 42, 589-611.
- HINNEBUSCH, A. G., IVANOV, I. P. & SONENBERG, N. 2016. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science*, 352, 1413-6.
- HOLLIEN, J., LIN, J. H., LI, H., STEVENS, N., WALTER, P. & WEISSMAN, J. S. 2009. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*, 186, 323-31.
- HOLLIEN, J. & WEISSMAN, J. S. 2006. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*, 313, 104-7.
- HOMBACH-KLONISCH, S., MEHRPOUR, M., SHOJAEI, S., HARLOS, C., PITZ, M., HAMAI, A., SIEMIANOWICZ, K., LIKUS, W., WIECHEC, E., TOYOTA, B. D., HOSHYAR, R., SEYFOORI, A., SEPEHRI, Z., ANDE, S. R., KHADEM, F., AKBARI, M., GORMAN, A. M., SAMALI, A., KLONISCH, T. & GHAVAMI, S. 2018. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacol Ther*, 184, 13-41.
- HONG, M., LUO, S., BAUMEISTER, P., HUANG, J. M., GOGIA, R. K., LI, M. & LEE, A. S. 2004. Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded

- protein response. *J Biol Chem*, 279, 11354-63.
- HOOZEMANS, J. J., VAN HAASTERT, E. S., EIKELENBOOM, P., DE VOS, R. A., ROZEMULLER, J. M. & SCHEPER, W. 2007. Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 354, 707-11.
- HOOZEMANS, J. J., VAN HAASTERT, E. S., NIJHOLT, D. A., ROZEMULLER, A. J., EIKELENBOOM, P. & SCHEPER, W. 2009. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol*, 174, 1241-51.
- HOOZEMANS, J. J., VEERHUIS, R., VAN HAASTERT, E. S., ROZEMULLER, J. M., BAAS, F., EIKELENBOOM, P. & SCHEPER, W. 2005. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 110, 165-72.
- HUANG, X., SHI, Z., WANG, W., BAI, J., CHEN, Z., XU, J., ZHANG, D. & FU, S. 2007. Identification and characterization of a novel protein ISOC2 that interacts with p16INK4a. *Biochem Biophys Res Commun*, 361, 287-93.
- HUBER, A. L., LEBEAU, J., GUILLAUMOT, P., PETRILLI, V., MALEK, M., CHILLOUX, J., FAUVET, F., PAYEN, L., KFOURY, A., RENNO, T., CHEVET, E. & MANIE, S. N. 2013. p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol Cell*, 49, 1049-59.
- HYRSKYLUOTO, A., BRUELLE, C., LUNDH, S. H., DO, H. T., KIVINEN, J., RAPPOU, E., REIJONEN, S., WALTIMO, T., PETERSEN, A., LINDHOLM, D. & KORHONEN, L. 2014. Ubiquitin-specific protease-14 reduces cellular aggregates and protects against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of the proteasome and ER stress-activated kinase IRE1alpha. *Hum Mol Genet*, 23, 5928-39.
- INGOLIA, N. T., BRAR, G. A., ROUSKIN, S., MCGEACHY, A. M. & WEISSMAN, J. S. 2012. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc*, 7, 1534-50.
- INGOLIA, N. T., GHAEMMAGHAMI, S., NEWMAN, J. R. & WEISSMAN, J. S. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, 324, 218-23.
- ITOH, K., WAKABAYASHI, N., KATOH, Y., ISHII, T., IGARASHI, K., ENGEL, J. D. & YAMAMOTO, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13, 76-86.
- IWAKOSHI, N. N., PYPAERT, M. & GLIMCHER, L. H. 2007. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med*, 204, 2267-75.
- IWAWAKI, T., HOSODA, A., OKUDA, T., KAMIGORI, Y., NOMURA-FURUWATARI, C., KIMATA, Y., TSURU, A. & KOHNO, K. 2001. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol*, 3, 158-64.
- JIANG, H. Y., WEK, S. A., MCGRATH, B. C., LU, D., HAI, T., HARDING, H. P., WANG, X., RON, D., CAVENER, D. R. & WEK, R. C. 2004. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol*, 24, 1365-77.
- JOUSSE, C., OYADOMARI, S., NOVOA, I., LU, P., ZHANG, Y., HARDING, H. P. & RON, D. 2003. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol*, 163, 767-75.
- KAKIUCHI, C., IWAMOTO, K., ISHIWATA, M., BUNDO, M., KASAHARA, T., KUSUMI, I., TSUJITA, T., OKAZAKI, Y., NANKO, S., KUNUGI, H., SASAKI, T. & KATO, T. 2003. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet*, 35, 171-5.
- KANEKO, M., NIINUMA, Y. & NOMURA, Y. 2003. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull*, 26, 931-5.

- KARIN, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 270, 16483-6.
- KASER, A., LEE, A. H., FRANKE, A., GLICKMAN, J. N., ZEISSIG, S., TILG, H., NIEUWENHUIS, E. E., HIGGINS, D. E., SCHREIBER, S., GLIMCHER, L. H. & BLUMBERG, R. S. 2008. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*, 134, 743-56.
- KATAYAMA, T., IMAIZUMI, K., SATO, N., MIYOSHI, K., KUDO, T., HITOMI, J., MORIHARA, T., YONEDA, T., GOMI, F., MORI, Y., NAKANO, Y., TAKEDA, J., TSUDA, T., ITOYAMA, Y., MURAYAMA, O., TAKASHIMA, A., ST GEORGE-HYSLOP, P., TAKEDA, M. & TOHYAMA, M. 1999. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 1, 479-85.
- KATSOULIDIS, E., MAVROMMATIS, E., WOODARD, J., SHIELDS, M. A., SASSANO, A., CARAYOL, N., SAWICKI, K. T., MUNSHI, H. G. & PLATANIAS, L. C. 2010. Role of interferon {alpha} (IFN{alpha})-inducible Schlafen-5 in regulation of anchorage-independent growth and invasion of malignant melanoma cells. *J Biol Chem*, 285, 40333-41.
- KAUFMAN, R. J. 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 110, 1389-98.
- KE, P. Y. & CHEN, S. S. 2011. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest*, 121, 37-56.
- KEBACHE, S., CARDIN, E., NGUYEN, D. T., CHEVET, E. & LAROSE, L. 2004. Nck-1 antagonizes the endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of translation. *J Biol Chem*, 279, 9662-71.
- KIM, J. K., KANG, K. A., PIAO, M. J., RYU, Y. S., HAN, X., FERNANDO, P. M., OH, M. C., PARK, J. E., SHILNIKOVA, K., BOO, S. J., NA, S. Y., JEONG, Y. J., JEONG, S. U. & HYUN, J. W. 2016. Endoplasmic reticulum stress induces 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 44, 128-33.
- KIM, P. S. & ARVAN, P. 1995. Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 128, 29-38.
- KIM, Y. S., NAKANISHI, G., LEWANDOSKI, M. & JETTEN, A. M. 2003. GLIS3, a novel member of the GLIS subfamily of Kruppel-like zinc finger proteins with repressor and activation functions. *Nucleic Acids Res*, 31, 5513-25.
- KITADA, T., ASAKAWA, S., HATTORI, N., MATSUMINE, H., YAMAMURA, Y., MINOSHIMA, S., YOKOCHI, M., MIZUNO, Y. & SHIMIZU, N. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392, 605-8.
- KOHL, S., ZOBOR, D., CHIANG, W. C., WEISSCHUH, N., STALLER, J., GONZALEZ MENENDEZ, I., CHANG, S., BECK, S. C., GARCIA GARRIDO, M., SOTHILINGAM, V., SEELIGER, M. W., STANZIAL, F., BENEDICENTI, F., INZANA, F., HEON, E., VINCENT, A., BEIS, J., STROM, T. M., RUDOLPH, G., ROOSING, S., HOLLANDER, A. I., CREMERS, F. P., LOPEZ, I., REN, H., MOORE, A. T., WEBSTER, A. R., MICHAELIDES, M., KOENEKOOP, R. K., ZRENNER, E., KAUFMAN, R. J., TSANG, S. H., WISSINGER, B. & LIN, J. H. 2015. Mutations in the unfolded protein response regulator ATF6 cause the cone dysfunction disorder achromatopsia. *Nat Genet*, 47, 757-65.
- KORENNYKH, A. V., EGEA, P. F., KOROSTELEV, A. A., FINER-MOORE, J., ZHANG, C., SHOKAT, K. M., STROUD, R. M. & WALTER, P. 2009. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature*, 457, 687-93.
- KOUMENIS, C., NACZKI, C., KORITZINSKY, M., RASTANI, S., DIEHL, A., SONENBERG, N., KOROMILAS, A. & WOUTERS, B. G. 2002. Regulation of protein synthesis by hypoxia

- via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *Mol Cell Biol*, 22, 7405-16.
- KOZUTSUMI, Y., SEGAL, M., NORMINGTON, K., GETHING, M. J. & SAMBROOK, J. 1988. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332, 462-4.
- KRAYWINKEL, K. & SPIX, C. 2019. Epidemiologie primärer Hirntumoren bei Kindern und Erwachsenen in Deutschland | SpringerLink. *Der Onkologe*, 25, 5-9.
- KRISHNAN, N., FU, C., PAPPIN, D. J. & TONKS, N. K. 2011. H₂S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci Signal*, 4, ra86.
- KUDO, T., OKUMURA, M., IMAIZUMI, K., ARAKI, W., MORIHARA, T., TANIMUKAI, H., KAMAGATA, E., TABUCHI, N., KIMURA, R., KANAYAMA, D., FUKUMORI, A., TAGAMI, S., OKOCHI, M., KUBO, M., TANII, H., TOHYAMA, M., TABIRA, T. & TAKEDA, M. 2006. Altered localization of amyloid precursor protein under endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 344, 525-30.
- LATREILLE, M. & LAROSE, L. 2006. Nck in a complex containing the catalytic subunit of protein phosphatase 1 regulates eukaryotic initiation factor 2 α signaling and cell survival to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 281, 26633-44.
- LAWSON, W. E., CROSSNO, P. F., POLOSUKHIN, V. V., ROLDAN, J., CHENG, D. S., LANE, K. B., BLACKWELL, T. R., XU, C., MARKIN, C., WARE, L. B., MILLER, G. G., LOYD, J. E. & BLACKWELL, T. S. 2008. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294, L1119-26.
- LEE, A. H., HEIDTMAN, K., HOTAMISLIGIL, G. S. & GLIMCHER, L. H. 2011a. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 α and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 8885-90.
- LEE, A. H., IWAKOSHI, N. N. & GLIMCHER, L. H. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 23, 7448-59.
- LEE, A. H., SCAPA, E. F., COHEN, D. E. & GLIMCHER, L. H. 2008. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*, 320, 1492-6.
- LEE, D. Y., LEE, K. S., LEE, H. J., KIM, D. H., NOH, Y. H., YU, K., JUNG, H. Y., LEE, S. H., LEE, J. Y., YOUN, Y. C., JEONG, Y., KIM, D. K., LEE, W. B. & KIM, S. S. 2010a. Activation of PERK signaling attenuates A β -mediated ER stress. *PLoS One*, 5, e10489.
- LEE, J., SUN, C., ZHOU, Y., GOKALP, D., HERREMA, H., PARK, S. W., DAVIS, R. J. & OZCAN, U. 2011b. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. *Nat Med*, 17, 1251-60.
- LEE, J. H., WON, S. M., SUH, J., SON, S. J., MOON, G. J., PARK, U. J. & GWAG, B. J. 2010b. Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. *Exp Mol Med*, 42, 386-94.
- LEE, K., TIRASOPHON, W., SHEN, X., MICHALAK, M., PRYWES, R., OKADA, T., YOSHIDA, H., MORI, K. & KAUFMAN, R. J. 2002. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev*, 16, 452-66.
- LEE, M. W., CHANDA, D., YANG, J., OH, H., KIM, S. S., YOON, Y. S., HONG, S., PARK, K. G., LEE, I. K., CHOI, C. S., HANSON, R. W., CHOI, H. S. & KOO, S. H. 2010c. Regulation of hepatic gluconeogenesis by an ER-bound transcription factor, CREBH. *Cell Metab*, 11, 331-9.
- LEE, Y. Y., CEVALLOS, R. C. & JAN, E. 2009. An upstream open reading frame regulates

- translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation. *J Biol Chem*, 284, 6661-73.
- LEENDERS, H. J. & BERENDES, H. D. 1972. The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in *Drosophila*. I. The induction of gene activity. *Chromosoma*, 37, 433-44.
- LENAZ, G. & GENOVA, M. L. 2012. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol*, 748, 107-44.
- LHOMOND, S., AVRIL, T., DEJEANS, N., VOUTETAKIS, K., DOULTSINOS, D., MCMAHON, M., PINEAU, R., OBACZ, J., PAPADODIMA, O., JOUAN, F., BOURIEN, H., LOGOTHETI, M., JEGOU, G., PALLARES-LUPON, N., SCHMIT, K., LE RESTE, P. J., ETCHEVERRY, A., MOSSER, J., BARROSO, K., VAULEON, E., MAUREL, M., SAMALI, A., PATTERSON, J. B., PLUQUET, O., HETZ, C., QUILLIEN, V., CHATZIOANNOU, A. & CHEVET, E. 2018. Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO Mol Med*, 10.
- LI, G., MONGILLO, M., CHIN, K. T., HARDING, H., RON, D., MARKS, A. R. & TABAS, I. 2009. Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol*, 186, 783-92.
- LI, M., BAUMEISTER, P., ROY, B., PHAN, T., FOTI, D., LUO, S. & LEE, A. S. 2000. ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF- κ B and YY1. *Mol Cell Biol*, 20, 5096-106.
- LI, W. W., SISTONEN, L., MORIMOTO, R. I. & LEE, A. S. 1994. Stress induction of the mammalian GRP78/BiP protein gene: in vivo genomic footprinting and identification of p70CORE from human nuclear extract as a DNA-binding component specific to the stress regulatory element. *Mol Cell Biol*, 14, 5533-46.
- LI, X. X., ZHANG, H. S., XU, Y. M., ZHANG, R. J., CHEN, Y., FAN, L., QIN, Y. Q., LIU, Y., LI, M. & FANG, J. 2017. Knockdown of IRE1 α inhibits colonic tumorigenesis through decreasing beta-catenin and IRE1 α targeting suppresses colon cancer cells. *Oncogene*, 36, 6738-6746.
- LI, Z., ZHANG, C., WANG, Z., SHEN, J., XIANG, P., CHEN, X., NAN, J. & LIN, Y. 2019. Lipofectamine 2000/siRNA complexes cause endoplasmic reticulum unfolded protein response in human endothelial cells. *J Cell Physiol*, 234, 21166-21181.
- LIPSON, K. L., FONSECA, S. G., ISHIGAKI, S., NGUYEN, L. X., FOSS, E., BORTELL, R., ROSSINI, A. A. & URANO, F. 2006. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab*, 4, 245-54.
- LISBONA, F., ROJAS-RIVERA, D., THIELEN, P., ZAMORANO, S., TODD, D., MARTINON, F., GLAVIC, A., KRESS, C., LIN, J. H., WALTER, P., REED, J. C., GLIMCHER, L. H. & HETZ, C. 2009. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1 α . *Mol Cell*, 33, 679-91.
- LIU, F., ZHOU, P., WANG, Q., ZHANG, M. & LI, D. 2018. The Schlafen family: complex roles in different cell types and virus replication. *Cell Biol Int*, 42, 2-8.
- LIU, G., YUAN, X., ZENG, Z., TUNICI, P., NG, H., ABDULKADIR, I. R., LU, L., IRVIN, D., BLACK, K. L. & YU, J. S. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, 67.
- LIU, S. Y., WANG, W., CAI, Z. Y., YAO, L. F., CHEN, Z. W., WANG, C. Y., ZHAO, B. & LI, K. S. 2013. Polymorphism -116C/G of human X-box-binding protein 1 promoter is associated with risk of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*, 19, 229-34.
- LOCASALE, J. W. 2013. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*, 13, 572-83.
- LOGUE, S. E., MCGRATH, E. P., CLEARY, P., GREENE, S.,

- MNICH, K., ALMANZA, A., CHEVET, E., DWYER, R. M., OOMMEN, A., LEGEMBRE, P., GODEY, F., MADDEN, E. C., LEUZZI, B., OBACZ, J., ZENG, Q., PATTERSON, J. B., JAGER, R., GORMAN, A. M. & SAMALI, A. 2018. Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nat Commun*, 9, 3267.
- LOUIS, D. N., PERRY, A., REIFENBERGER, G., VON DEIMLING, A., FIGARELLA-BRANGER, D., CAVENEE, W. K., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., KLEIHUES, P. & ELLISON, D. W. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131, 803-20.
- LOVE, M. I., HUBER, W. & ANDERS, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15, 550.
- LU, G., OTA, A., REN, S., FRANKLIN, S., RAU, C. D., PING, P., LANE, T. F., ZHOU, Z. H., REUE, K., LUSIS, A. J., VONDRISKA, T. & WANG, Y. 2013. PPM1I encodes an inositol requiring-protein 1 (IRE1) specific phosphatase that regulates the functional outcome of the ER stress response. *Mol Metab*, 2, 405-16.
- LU, Y., LIANG, F. X. & WANG, X. 2014. A synthetic biology approach identifies the mammalian UPR RNA ligase RtcB. *Mol Cell*, 55, 758-70.
- LYNCH, J. M., MAILLET, M., VANHOUTTE, D., SCHLOEMER, A., SARGENT, M. A., BLAIR, N. S., LYNCH, K. A., OKADA, T., ARONOW, B. J., OSINSKA, H., PRYWES, R., LORENZ, J. N., MORI, K., LAWLER, J., ROBBINS, J. & MOLKENTIN, J. D. 2012. A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell*, 149, 1257-68.
- MA, K., VATTEM, K. M. & WEK, R. C. 2002. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 277, 18728-35.
- MA, S., CHAN, Y. P., KWAN, P. S., LEE, T. K., YAN, M., TANG, K. H., LING, M. T., VIELKIND, J. R., GUAN, X. Y. & CHAN, K. W. 2011. MicroRNA-616 induces androgen-independent growth of prostate cancer cells by suppressing expression of tissue factor pathway inhibitor TFPI-2. *Cancer Res*, 71, 583-92.
- MA, T., TRINH, M. A., WEXLER, A. J., BOURBON, C., GATTI, E., PIERRE, P., CAVENER, D. R. & KLANN, E. 2013. Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat Neurosci*, 16, 1299-305.
- MADDEN, E., LOGUE, S. E., HEALY, S. J., MANIE, S. & SAMALI, A. 2019. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biol Cell*, 111, 1-17.
- MADHAVAN, S., ZENKLUSEN, J. C., KOTLIAROV, Y., SAHNI, H., FINE, H. A. & BUETOW, K. 2009. Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research. *Mol Cancer Res*, 7, 157-67.
- MAHADEVAN, N. R., ANUFREICHIK, V., RODVOLD, J. J., CHIU, K. T., SEPULVEDA, H. & ZANETTI, M. 2012. Cell-extrinsic effects of tumor ER stress imprint myeloid dendritic cells and impair CD8(+) T cell priming. *PLoS One*, 7, e51845.
- MAJMUNDAR, A. J., WONG, W. J. & SIMON, M. C. 2010. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 40, 294-309.
- MALZER, E., DALY, M. L., MOLONEY, A., SENDALL, T. J., THOMAS, S. E., RYDER, E., RYOO, H. D., CROWTHER, D. C., LOMAS, D. A. & MARCINIAK, S. J. 2010. Impaired tissue growth is mediated by checkpoint kinase 1 (CHK1) in the integrated stress response. *J Cell Sci*, 123, 2892-900.
- MAO, T., SHAO, M., QIU, Y., HUANG, J., ZHANG, Y., SONG, B., WANG, Q., JIANG, L., LIU, Y., HAN, J. D., CAO, P., LI, J., GAO, X., RUI, L., QI, L. & LI, W. 2011. PKA phosphorylation couples hepatic inositol-requiring enzyme 1 α to glucagon signaling in glucose

- metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 15852-7.
- MARCHAND, A., TOMKIEWICZ, C., MAGNE, L., BAROUKI, R. & GARLATTI, M. 2006. Endoplasmic reticulum stress induction of insulin-like growth factor-binding protein-1 involves ATF4. *J Biol Chem*, 281, 19124-33.
- MARCINIAK, S. J. & RON, D. 2006. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*, 86, 1133-49.
- MARCINIAK, S. J., YUN, C. Y., OYADOMARI, S., NOVOA, I., ZHANG, Y., JUNGREIS, R., NAGATA, K., HARDING, H. P. & RON, D. 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 18, 3066-77.
- MARTINON, F., CHEN, X., LEE, A. H. & GLIMCHER, L. H. 2010. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol*, 11, 411-8.
- MATZ, J. M., BLAKE, M. J., TATELMAN, H. M., LAVOI, K. P. & HOLBROOK, N. J. 1995. Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am J Physiol*, 269, R38-47.
- MAUREL, M. & CHEVET, E. 2013. Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304, C1117-26.
- MAUREL, M., CHEVET, E., TAVERNIER, J. & GERLO, S. 2014. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci*, 39, 245-54.
- MAVROMMATIS, E., FISH, E. N. & PLATANIAS, L. C. 2013. The Schlafen Family of Proteins and Their Regulation by Interferons. *J Interferon Cytokine Res*.
- MCCULLOUGH, K. D., MARTINDALE, J. L., KLOTZ, L. O., AW, T. Y. & HOLBROOK, N. J. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21, 1249-59.
- MCKAY, D. B. 1993. Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. *Adv Protein Chem*, 44, 67-98.
- MCMAHON, M., SAMALI, A. & CHEVET, E. 2017. Regulation of the unfolded protein response by noncoding RNA. *Am J Physiol Cell Physiol*, 313, C243-c254.
- MELNICK, J., DUL, J. L. & ARGON, Y. 1994. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 370, 373-5.
- MERCADO, G., VALDES, P. & HETZ, C. 2013. An ERcentric view of Parkinson's disease. *Trends Mol Med*, 19, 165-75.
- MEUSSER, B., HIRSCH, C., JAROSCH, E. & SOMMER, T. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, 7, 766-72.
- MI, H. & THOMAS, P. 2009. PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods Mol Biol*, 563, 123-40.
- MILHAVET, O., MARTINDALE, J. L., CAMANDOLA, S., CHAN, S. L., GARY, D. S., CHENG, A., HOLBROOK, N. J. & MATTSON, M. P. 2002. Involvement of Gadd153 in the pathogenic action of presenilin-1 mutations. *J Neurochem*, 83, 673-81.
- MISQUITTA, C. M., MACK, D. P. & GROVER, A. K. 1999. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium*, 25, 277-90.
- MOLINARI, M., CALANCA, V., GALLI, C., LUCCA, P. & PAGANETTI, P. 2003. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science*, 299, 1397-400.
- MOORE, K. J. & TABAS, I. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145, 341-55.
- MORENO, J. A., RADFORD, H., PERETTI, D., STEINERT, J. R., VERITY, N., MARTIN, M. G., HALLIDAY, M., MORGAN, J., DINSDALE, D., ORTORI, C. A., BARRETT, D. A., TSAYTLER, P., BERTOLOTI, A., WILLIS, A. E., BUSHELL, M. & MALLUCCI, G. R. 2012. Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature*, 485, 507-11.

- MORI, K., MA, W., GETHING, M. J. & SAMBROOK, J. 1993. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*, 74, 743-56.
- MORI, K., SANT, A., KOHNO, K., NORMINGTON, K., GETHING, M. J. & SAMBROOK, J. F. 1992. A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *Embo j*, 11, 2583-93.
- MORITA, S., VILLALTA, S. A., FELDMAN, H. C., REGISTER, A. C., ROSENTHAL, W., HOFFMANN-PETERSEN, I. T., MEHDIZADEH, M., GHOSH, R., WANG, L., COLON-NEGRON, K., MEZA-ACEVEDO, R., BACKES, B. J., MALY, D. J., BLUESTONE, J. A. & PAPA, F. R. 2017. Targeting ABL-IRE1alpha Signaling Spares ER-Stressed Pancreatic beta Cells to Reverse Autoimmune Diabetes. *Cell Metab*, 25, 883-897.e8.
- MUNRO, S. & PELHAM, H. R. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, 46, 291-300.
- MYOISHI, M., HAO, H., MINAMINO, T., WATANABE, K., NISHIHARA, K., HATAKEYAMA, K., ASADA, Y., OKADA, K., ISHIBASHI-UEDA, H., GABBIANI, G., BOCHATON-PIALLAT, M. L., MOCHIZUKI, N. & KITAKAZE, M. 2007. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*, 116, 1226-33.
- NADANAKA, S., OKADA, T., YOSHIDA, H. & MORI, K. 2007. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 27, 1027-43.
- NADERI, A. 2019. Molecular functions of brain expressed X-linked 2 (BEX2) in malignancies. *Exp Cell Res*, 376, 221-226.
- NAGATA, T., ILIEVA, H., MURAKAMI, T., SHIOTE, M., NARAI, H., OHTA, Y., HAYASHI, T., SHOJI, M. & ABE, K. 2007. Increased ER stress during motor neuron degeneration in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*, 29, 767-71.
- NAKAE, J., BIGGS, W. H., 3RD, KITAMURA, T., CAVENEE, W. K., WRIGHT, C. V., ARDEN, K. C. & ACCILI, D. 2002. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet*, 32, 245-53.
- NAKAMURA, T., FURUHASHI, M., LI, P., CAO, H., TUNCMAN, G., SONENBERG, N., GORGUN, C. Z. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2010. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell*, 140, 338-48.
- NAKANISHI, K., KAMIGUCHI, K., TORIGOE, T., NABETA, C., HIROHASHI, Y., ASANUMA, H., TOBIOKA, H., KOGE, N., HARADA, O., TAMURA, Y., NAGANO, H., YANO, S., CHIBA, S., MATSUMOTO, H. & SATO, N. 2004. Localization and function in endoplasmic reticulum stress tolerance of ERdj3, a new member of Hsp40 family protein. *Cell Stress Chaperones*.
- NAKANISHI, K., SUDO, T. & MORISHIMA, N. 2005. Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J Cell Biol*, 169, 555-60.
- NAMBA, T., ISHIHARA, T., TANAKA, K., HOSHINO, T. & MIZUSHIMA, T. 2007. Transcriptional activation of ATF6 by endoplasmic reticulum stressors. *Biochem Biophys Res Commun*, 355, 543-8.
- NGUYEN, C. D. L., MALCHOW, S., REICH, S., STELTGENS, S., SHUVAEV, K. V., LOROCH, S., LORENZ, C., SICKMANN, A., KNOBBE-THOMSEN, C. B., TEWS, B., MEDENBACH, J. & AHRENDTS, R. 2019. A sensitive and simple targeted proteomics approach to quantify transcription factor and membrane proteins of the unfolded protein response pathway in

- glioblastoma cells. *Sci Rep*, 9, 8836.
- NISHIKAWA, S. & ENDO, T. 1997. The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion. *J Biol Chem*, 272, 12889-92.
- NOVOA, I., ZENG, H., HARDING, H. P. & RON, D. 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*, 153, 1011-22.
- OBERKOFER, H., PFEIFENBERGER, A., SOYAL, S., FELDER, T., HAHNE, P., MILLER, K., KREMLER, F. & PATSCH, W. 2010. Aberrant hepatic TRIB3 gene expression in insulin-resistant obese humans. *Diabetologia*, 53, 1971-5.
- OHGAKI, H. & KLEIHUES, P. 2013. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19, 764-72.
- OHOKA, N., YOSHII, S., HATTORI, T., ONOZAKI, K. & HAYASHI, H. 2005. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *Embo j*, 24, 1243-55.
- OISHI, Y., MANABE, I., TOBE, K., TSUSHIMA, K., SHINDO, T., FUJII, K., NISHIMURA, G., MAEMURA, K., YAMAUCHI, T., KUBOTA, N., SUZUKI, R., KITAMURA, T., AKIRA, S., KADOWAKI, T. & NAGAI, R. 2005. Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab*, 1, 27-39.
- OLIVIER-VAN STICHELEN, S., GUINEZ, C., MIR, A. M., PEREZ-CERVERA, Y., LIU, C., MICHALSKI, J. C. & LEFEBVRE, T. 2012. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of beta-catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302, E417-24.
- OSLOWSKI, C. M. & URANO, F. 2011. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol*, 490, 71-92.
- OZAWA, K., KUWABARA, K., TAMATANI, M., TAKATSUJI, K., TSUKAMOTO, Y., KANEDA, S., YANAGI, H., STERN, D. M., EGUCHI, Y., TSUJIMOTO, Y., OGAWA, S. & TOHYAMA, M. 1999. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J Biol Chem*, 274, 6397-404.
- OZCAN, U., CAO, Q., YILMAZ, E., LEE, A. H., IWAKOSHI, N. N., OZDELEN, E., TUNCMAN, G., GORGUN, C., GLIMCHER, L. H. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306, 457-61.
- OZCAN, U., YILMAZ, E., OZCAN, L., FURUHASHI, M., VAILLANCOURT, E., SMITH, R. O., GORGUN, C. Z. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2006. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313, 1137-40.
- PAKOS-ZEBRUCKA, K., KORYGA, I., MNICH, K., LJUJIC, M., SAMALI, A. & GORMAN, A. M. 2016. The integrated stress response. *EMBO Rep*, 17, 1374-1395.
- PALAM, L. R., BAIRD, T. D. & WEK, R. C. 2011. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J Biol Chem*, 286, 10939-49.
- PAPANDREOU, I., DENKO, N. C., OLSON, M., VAN MELCKEBEKE, H., LUST, S., TAM, A., SOLOW-CORDERO, D. E., BOULEY, D. M., OFFNER, F., NIWA, M. & KOONG, A. C. 2011. Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*, 117, 1311-4.
- PARK, S. W., ZHOU, Y., LEE, J., LU, A., SUN, C., CHUNG, J., UEKI, K. & OZCAN, U. 2010. The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nat Med*, 16, 429-37.
- PARSONS, D. W., JONES, S., ZHANG, X., LIN, J. C., LEARY, R. J., ANGENENDT, P., MANKOO, P., CARTER, H., SIU, I. M., GALLIA, G. L., OLIVI, A., MCLENDON, R., RASHEED, B. A., KEIR, S., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., BUSAM, D. A., TEKLEAB, H., DIAZ, L. A., JR.,

- HARTIGAN, J., SMITH, D. R., STRAUSBERG, R. L., MARIE, S. K., SHINJO, S. M., YAN, H., RIGGINS, G. J., BIGNER, D. D., KARCHIN, R., PAPADOPOULOS, N., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., VELCULESCU, V. E. & KINZLER, K. W. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321, 1807-12.
- PAVITT, G. D. & RON, D. 2012. New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- PENNUTO, M., TINELLI, E., MALAGUTI, M., DEL CARRO, U., D'ANTONIO, M., RON, D., QUATTRINI, A., FELTRI, M. L. & WRABETZ, L. 2008. Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron*, 57, 393-405.
- PERKINS, D. J. & BARBER, G. N. 2004. Defects in translational regulation mediated by the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 inhibit antiviral activity and facilitate the malignant transformation of human fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 24, 2025-40.
- PFaffenbach, K. T., GENTILE, C. L., NIVALA, A. M., WANG, D., WEI, Y. & PAGLIASSOTTI, M. J. 2010. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298, E1027-35.
- PFaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PHAM, K., CHAUVIERE, A., HATZIKIROU, H., LI, X., BYRNE, H. M., CRISTINI, V. & LOWENGRUB, J. 2012. Density-dependent quiescence in glioma invasion: instability in a simple reaction-diffusion model for the migration/proliferation dichotomy. *J Biol Dyn*, 6 Suppl 1, 54-71.
- POWERS, E. N. & BRAR, G. A. 2018. m(6)A and eIF2alpha- Team Up to Tackle ATF4 Translation during Stress. *Mol Cell*, 69, 537-538.
- PURI, P., MIRSHAHI, F., CHEUNG, O., NATARAJAN, R., MAHER, J. W., KELLUM, J. M. & SANYAL, A. J. 2008. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134, 568-76.
- PUTHALAKATH, H., O'REILLY, L. A., GUNN, P., LEE, L., KELLY, P. N., HUNTINGTON, N. D., HUGHES, P. D., MICHALAK, E. M., MCKIMM-BRESCHKIN, J., MOTOYAMA, N., GOTOH, T., AKIRA, S., BOUILLET, P. & STRASSER, A. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129, 1337-49.
- PYRKO, P., SCHONTHAL, A. H., HOFMAN, F. M., CHEN, T. C. & LEE, A. S. 2007. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res*, 67, 9809-16.
- QIU, Y., MAO, T., ZHANG, Y., SHAO, M., YOU, J., DING, Q., CHEN, Y., WU, D., XIE, D., LIN, X., GAO, X., KAUFMAN, R. J., LI, W. & LIU, Y. 2010. A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1alpha activation in pancreatic beta cells. *Sci Signal*, 3, ra7.
- QUIROS, P. M., PRADO, M. A., ZAMBONI, N., D'AMICO, D., WILLIAMS, R. W., FINLEY, D., GYGI, S. P. & AUWERX, J. 2017. Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *J Cell Biol*, 216, 2027-2045.
- RACHED, M. T., KODE, A., XU, L., YOSHIKAWA, Y., PAIK, J. H., DEPINHO, R. A. & KOUSTENI, S. 2010. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell Metab*, 11, 147-60.
- RASHEED, Z. & HAQQI, T. M. 2012. Endoplasmic reticulum stress induces the expression of COX-2 through activation of eIF2alpha, p38-MAPK and NF-kappaB in advanced glycation end products stimulated human chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 2179-89.
- RAZ, S., SHEBAN, D., GONEN, N., STARK, M., BERMAN, B. & ASSARAF, Y. G. 2014. Severe

- hypoxia induces complete antifolate resistance in carcinoma cells due to cell cycle arrest. *Cell Death Dis*, 5, e1067.
- REIMOLD, A. M., IWAKOSHI, N. N., MANIS, J., VALLABHAJOSYULA, P., SZOMOLANYI-TSUDA, E., GRAVALLESE, E. M., FRIEND, D., GRUSBY, M. J., ALT, F. & GLIMCHER, L. H. 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 412, 300-7.
- RESENDE, R., FERREIRO, E., PEREIRA, C. & OLIVEIRA, C. R. 2008. ER stress is involved in Abeta-induced GSK-3beta activation and tau phosphorylation. *J Neurosci Res*, 86, 2091-9.
- RESENDEZ, E., JR., WOODEN, S. K. & LEE, A. S. 1988. Identification of highly conserved regulatory domains and protein-binding sites in the promoters of the rat and human genes encoding the stress-inducible 78-kilodalton glucose-regulated protein. *Mol Cell Biol*, 8, 4579-84.
- REYES-DEL VALLE, J., CHAVEZ-SALINAS, S., MEDINA, F. & DEL ANGEL, R. M. 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol*, 79, 4557-67.
- RITOSSA, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP indrosophila. *Experientia*, 18, 571-573.
- ROMERO-RAMIREZ, L., CAO, H., NELSON, D., HAMMOND, E., LEE, A. H., YOSHIDA, H., MORI, K., GLIMCHER, L. H., DENKO, N. C., GIACCIA, A. J., LE, Q. T. & KOONG, A. C. 2004. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res*, 64, 5943-7.
- RON, D. & HABENER, J. F. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, 6, 439-53.
- RON, D. & WALTER, P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-29.
- ROUSSEL, B. D., KRUPPA, A. J., MIRANDA, E., CROWTHER, D. C., LOMAS, D. A. & MARCINIAK, S. J. 2013. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol*, 12, 105-18.
- ROWLANDS, A. G., MONTINE, K. S., HENSHAW, E. C. & PANNIERS, R. 1988. Physiological stresses inhibit guanine-nucleotide-exchange factor in Ehrlich cells. *Eur J Biochem*, 175, 93-9.
- ROY, B. & LEE, A. S. 1995. Transduction of calcium stress through interaction of the human transcription factor CBF with the proximal CCAAT regulatory element of the grp78/BiP promoter. *Mol Cell Biol*, 15, 2263-74.
- ROY, B., LI, W. W. & LEE, A. S. 1996. Calcium-sensitive transcriptional activation of the proximal CCAAT regulatory element of the grp78/BiP promoter by the human nuclear factor CBF/NF-Y. *J Biol Chem*, 271, 28995-9002.
- ROYBAL, C. N., YANG, S., SUN, C. W., HURTADO, D., VANDER JAGT, D. L., TOWNES, T. M. & ABCOUWER, S. F. 2004. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem*, 279, 14844-52.
- SADO, M., YAMASAKI, Y., IWANAGA, T., ONAKA, Y., IBUKI, T., NISHIHARA, S., MIZUGUCHI, H., MOMOTA, H., KISHIBUCHI, R., HASHIMOTO, T., WADA, D., KITAGAWA, H. & WATANABE, T. K. 2009. Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1. *Brain Res*, 1257, 16-24.
- SAKABE, I., HU, R., JIN, L., CLARKE, R. & KASID, U. N. 2015. TMEM33: a new stress-inducible endoplasmic reticulum transmembrane protein and modulator of the unfolded protein

- response signaling. *Breast Cancer Res Treat.*
- SASAKI, S. 2010. Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 346-55.
- SASSANO, A., MAVROMMATIS, E., ARSLAN, A. D., KROCZYNSKA, B., BEAUCHAMP, E. M., KHUON, S., CHEW, T. L., GREEN, K. J., MUNSHI, H. G., VERMA, A. K. & PLATANIAS, L. C. 2015. Human Schlafen 5 (SLFN5) Is a Regulator of Motility and Invasiveness of Renal Cell Carcinoma Cells. *Mol Cell Biol*, 35, 2684-98.
- SCHAFFER, Z. T., GRASSIAN, A. R., SONG, L., JIANG, Z., GERHART-HINES, Z., IRIE, H. Y., GAO, S., PUIGSERVER, P. & BRUGGE, J. S. 2009. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 461, 109-13.
- SCHAGGER, H. & PFEIFFER, K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo j*, 19, 1777-83.
- SCHNEIDER, D., SONG, B., MCEWEN, E., LIU, C., LAYBUTT, R., GILLESPIE, P., SAUNDERS, T., BONNER-WEIR, S. & KAUFMAN, R. J. 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*, 7, 1165-76.
- SCHEWE, D. M. & AGUIRRE-GHISO, J. A. 2008. ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10519-24.
- SCHINDLER, A. J. & SCHEKMAN, R. 2009. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17775-80.
- SCHLENSTEDT, G., HARRIS, S., RISSE, B., LILL, R. & SILVER, P. A. 1995. A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J Cell Biol*, 129, 979-88.
- SCHWARTZBAUM, J. A., FISHER, J. L., ALDAPE, K. D. & WRENSCH, M. 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 494-503; quiz 1 p following 516.
- SHACHAM, T., SHARMA, N. & LEDERKREMER, G. Z. 2019. Protein Misfolding and ER Stress in Huntington's Disease. *Front Mol Biosci*, 6, 20.
- SHAFFER, A. L., SHAPIRO-SHELEF, M., IWAKOSHI, N. N., LEE, A. H., QIAN, S. B., ZHAO, H., YU, X., YANG, L., TAN, B. K., ROSENWALD, A., HURT, E. M., PETROULAKIS, E., SONENBERG, N., YEWDALL, J. W., CALAME, K., GLIMCHER, L. H. & STAUDT, L. M. 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, 21, 81-93.
- SHAMU, C. E. & WALTER, P. 1996. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Embo j*, 15, 3028-39.
- SHEN, J., CHEN, X., HENDERSHOT, L. & PRYWES, R. 2002a. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*, 3, 99-111.
- SHEN, J., SNAPP, E. L., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & PRYWES, R. 2005. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol*, 25, 921-32.
- SHEN, Y. & HENDERSHOT, L. M. 2005. ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol Biol Cell*, 16, 40-50.
- SHEN, Y. & HENDERSHOT, L. M. 2007. Identification of ERdj3 and OBF-1/BOB-1/OCA-B as direct targets of XBP-1 during plasma cell differentiation. *J Immunol*, 179, 2969-78.
- SHEN, Y., MEUNIER, L. & HENDERSHOT, L. M. 2002b. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem*, 277, 15947-56.

- SHERRINGTON, R., ROGAEV, E. I., LIANG, Y., ROGAEVA, E. A., LEVESQUE, G., IKEDA, M., CHI, H., LIN, C., LI, G., HOLMAN, K., TSUDA, T., MAR, L., FONCIN, J. F., BRUNI, A. C., MONTESI, M. P., SORBI, S., RAINERO, I., PINESSI, L., NEE, L., CHUMAKOV, I., POLLEN, D., BROOKES, A., SANSEAU, P., POLINSKY, R. J., WASCO, W., DA SILVA, H. A., HAINES, J. L., PERKICAK-VANCE, M. A., TANZI, R. E., ROSES, A. D., FRASER, P. E., ROMMENS, J. M. & ST GEORGE-HYSLOP, P. H. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375, 754-60.
- SHI, Y., VATTEM, K. M., SOOD, R., AN, J., LIANG, J., STRAMM, L. & WEK, R. C. 1998. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*, 18, 7499-509.
- SHKODA, A., RUIZ, P. A., DANIEL, H., KIM, S. C., ROGLER, G., SARTOR, R. B. & HALLER, D. 2007. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. *Gastroenterology*, 132, 190-207.
- SHOJI, M., GOLDE, T. E., GHISO, J., CHEUNG, T. T., ESTUS, S., SHAFFER, L. M., CAI, X. D., MCKAY, D. M., TINTNER, R., FRANGIONE, B. & ET AL. 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258, 126-9.
- SHOULDERS, M. D., RYNO, L. M., GENEREUX, J. C., MORESCO, J. J., TU, P. G., WU, C., YATES, J. R., 3RD, SU, A. I., KELLY, J. W. & WISEMAN, R. L. 2013. Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep*, 3, 1279-92.
- SIDOLI, M., MUSNER, N., SILVESTRI, N., UNGARO, D., D'ANTONIO, M., CAVENER, D. R., FELTRI, M. L. & WRABETZ, L. 2016. Ablation of Perk in Schwann Cells Improves Myelination in the S63del Charcot-Marie-Tooth 1B Mouse. *J Neurosci*, 36, 11350-11361.
- SIDRAUSKI, C., MCGEACHY, A. M., INGOLIA, N. T. & WALTER, P. 2015. The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2alpha phosphorylation on translation and stress granule assembly. *Elife*, 4.
- SIMIC, M. S., MOEHLE, E. A., SCHINZEL, R. T., LORBEER, F. K., HALLORAN, J. J., HEYDARI, K., SANCHEZ, M., JULLIE, D., HOCKEMEYER, D. & DILLIN, A. 2019. Transient activation of the UPR(ER) is an essential step in the acquisition of pluripotency during reprogramming. *Sci Adv*, 5, eaaw0025.
- SIMON, M. M., REIKERSTORFER, A., SCHWARZ, A., KRONE, C., LUGER, T. A., JÄÄTTELÄ, M. & SCHWARZ, T. 1995. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest*, 95, 926-33.
- SLAWSON, C. & HART, G. W. 2011. O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer*. England.
- SONG, B., SCHEUNER, D., RON, D., PENNATHUR, S. & KAUFMAN, R. J. 2008. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest*, 118, 3378-89.
- SOUTHWOOD, C. M., GARBERN, J., JIANG, W. & GOW, A. 2002. The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron*, 36, 585-96.
- STROM, T. M., HORTNAGEL, K., HOFMANN, S., GEKELER, F., SCHARFE, C., RABL, W., GERBITZ, K. D. & MEITINGER, T. 1998. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolfram) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet*, 7, 2021-8.
- STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDAHN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D.,

- CAIRNCROSS, J. G., EISENHAUER, E. & MIRIMANOFF, R. O. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 987-96.
- SUN, L., LAMONT, S. J., COOKSEY, A. M., MCCARTHY, F., TUDOR, C. O., VIJAY-SHANKER, K., DERITA, R. M., ROTHSCCHILD, M., ASHWELL, C., PERSIA, M. E. & SCHMIDT, C. J. 2015. Transcriptome response to heat stress in a chicken hepatocellular carcinoma cell line. *Cell Stress Chaperones*, 20, 939-50.
- TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. & YAMANAKA, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- TAKEI, D., ISHIHARA, H., YAMAGUCHI, S., YAMADA, T., TAMURA, A., KATAGIRI, H., MARUYAMA, Y. & OKA, Y. 2006. WFS1 protein modulates the free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, 580, 5635-40.
- TAMIMI, A. F. & JUWEID, M. 2017. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: DE VLEESCHOUWER, S. (ed.) *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications Copyright: The Authors. TANJORE, H., CHENG, D. S., DEGRYSE, A. L., ZOZ, D. F., ABDOLRASULNIA, R., LAWSON, W. E. & BLACKWELL, T. S. 2011. Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 286, 30972-80.
- TARDIF, K. D., MORI, K., KAUFMAN, R. J. & SIDDIQUI, A. 2004. Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J Biol Chem*, 279, 17158-64.
- TATU, U. & HELENIUS, A. 1997. Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 136, 555-65.
- THORP, E., LI, G., SEIMON, T. A., KURIAKOSE, G., RON, D. & TABAS, I. 2009. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice lacking CHOP. *Cell Metab*, 9, 474-81.
- THUERAUF, D. J., HOOVER, H., MELLER, J., HERNANDEZ, J., SU, L., ANDREWS, C., DILLMANN, W. H., MCDONOUGH, P. M. & GLEMBOTSKI, C. C. 2001. Sarco/ endoplasmic reticulum calcium ATPase-2 expression is regulated by ATF6 during the endoplasmic reticulum stress response: intracellular signaling of calcium stress in a cardiac myocyte model system. *J Biol Chem*, 276, 48309-17.
- THUERAUF, D. J., MARCINKO, M., BELMONT, P. J. & GLEMBOTSKI, C. C. 2007. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem*, 282, 22865-78.
- THUERAUF, D. J., MORRISON, L. & GLEMBOTSKI, C. C. 2004. Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction. *J Biol Chem*, 279, 21078-84.
- TIRASOPHON, W., WELIHINDA, A. A. & KAUFMAN, R. J. 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*, 12, 1812-24.
- TISSIERES, A., MITCHELL, H. K. & TRACY, U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 84, 389-98.
- TSAYTLER, P., HARDING, H. P., RON, D. & BERTOLOTI, A. 2011. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science*, 332, 91-4.
- UPTON, J. P., WANG, L., HAN, D., WANG, E. S., HUSKEY, N. E., LIM, L., TRUITT, M., MCMANUS, M. T., RUGGERO, D., GOGA, A., PAPA, F. R. & OAKES, S. A. 2012. IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of

- proapoptotic Caspase-2. *Science*, 338, 818-22.
- URANO, F., BERTOLOTTI, A. & RON, D. 2000a. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 113 Pt 21, 3697-702.
- URANO, F., WANG, X., BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y., CHUNG, P., HARDING, H. P. & RON, D. 2000b. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287, 664-6.
- USUI, M., YAMAGUCHI, S., TANJI, Y., TOMINAGA, R., ISHIGAKI, Y., FUKUMOTO, M., KATAGIRI, H., MORI, K., OKA, Y. & ISHIHARA, H. 2012. Atf6alpha-null mice are glucose intolerant due to pancreatic beta-cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism*, 61, 1118-28.
- VALLEJO, M., RON, D., MILLER, C. P. & HABENER, J. F. 1993. C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 4679-83.
- VAN HUIZEN, R., MARTINDALE, J. L., GOROSPE, M. & HOLBROOK, N. J. 2003. P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. *J Biol Chem*, 278, 15558-64.
- VATTEM, K. M. & WEK, R. C. 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11269-74.
- VAUDEL, M., BARSNES, H., BERVEN, F. S., SICKMANN, A. & MARTENS, L. 2011. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics*, 11, 996-9.
- VAUDEL, M., BURKHART, J. M., ZAHEDI, R. P., OVELAND, E., BERVEN, F. S., SICKMANN, A., MARTENS, L. & BARSNES, H. 2015. PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat Biotechnol*. United States.
- VIDAL, R. L., FIGUEROA, A., COURT, F. A., THIELEN, P., MOLINA, C., WIRTH, C., CABALLERO, B., KIFFIN, R., SEGURA-AGUILAR, J., CUERVO, A. M., GLIMCHER, L. H. & HETZ, C. 2012. Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Hum Mol Genet*, 21, 2245-62.
- WALLING, J. 2006. From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. *Invest New Drugs*, 24, 37-77.
- WANG, J., YIN, Y., HUA, H., LI, M., LUO, T., XU, L., WANG, R., LIU, D., ZHANG, Y. & JIANG, Y. 2009a. Blockade of GRP78 sensitizes breast cancer cells to microtubules-interfering agents that induce the unfolded protein response. *J Cell Mol Med*, 13, 3888-97.
- WANG, L., POPKO, B. & ROOS, R. P. 2011. The unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 20, 1008-15.
- WANG, S. & KAUFMAN, R. J. 2012. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol*, 197, 857-67.
- WANG, X. Z., HARDING, H. P., ZHANG, Y., JOLICOEUR, E. M., KURODA, M. & RON, D. 1998. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *Embo j*, 17, 5708-17.
- WANG, X. Z., LAWSON, B., BREWER, J. W., ZINSZNER, H., SANJAY, A., MI, L. J., BOORSTEIN, R., KREIBICH, G., HENDERSHOT, L. M. & RON, D. 1996. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol*, 16, 4273-80.
- WANG, Y., ALAM, G. N., NING, Y., VISIOLI, F., DONG, Z., NOR, J. E. & POLVERINI, P. J. 2012. The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res*, 72, 5396-406.
- WANG, Y., VERA, L., FISCHER, W. H. & MONTMINY, M. 2009b. The CREB coactivator CRTC2

- links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature*, 460, 534-7.
- WANG, Z. V., DENG, Y., GAO, N., PEDROZO, Z., LI, D. L., MORALES, C. R., CRIOLLO, A., LUO, X., TAN, W., JIANG, N., LEHRMAN, M. A., ROTHERMEL, B. A., LEE, A. H., LAVANDERO, S., MAMMEN, P. P. A., FERDOUS, A., GILLETTE, T. G., SCHERER, P. E. & HILL, J. A. 2014. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell*, 156, 1179-1192.
- WEI, Q., CHEN, Z. H., WANG, L., ZHANG, T., DUAN, L., BEHRENS, C., WISTUBA, II, MINNA, J. D., GAO, B., LUO, J. H. & LIU, Z. P. 2016. LZTFL1 suppresses lung tumorigenesis by maintaining differentiation of lung epithelial cells. *Oncogene*, 35, 2655-63.
- WEK, R. C., JIANG, H. Y. & ANTHONY, T. G. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*, 34, 7-11.
- WILD, A. C., MOINOVA, H. R. & MULCAHY, R. T. 1999. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem*, 274, 33627-36.
- WINNAY, J. N., BOUCHER, J., MORI, M. A., UEKI, K. & KAHN, C. R. 2010. A regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase increases the nuclear accumulation of X-box-binding protein-1 to modulate the unfolded protein response. *Nat Med*, 16, 438-45.
- WOO, C. W., CUI, D., ARELLANO, J., DORWEILER, B., HARDING, H., FITZGERALD, K. A., RON, D. & TABAS, I. 2009. Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol*, 11, 1473-80.
- XIE, Q., MITTAL, S. & BERENS, M. E. 2014. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro Oncol*, 16, 1575-84.
- XU, K., WANG, L. & SHU, H. K. 2014. COX-2 overexpression increases malignant potential of human glioma cells through Id1. *Oncotarget*, 5, 1241-52.
- YAMAGUCHI, S., ISHIHARA, H., YAMADA, T., TAMURA, A., USUI, M., TOMINAGA, R., MUNAKATA, Y., SATAKE, C., KATAGIRI, H., TASHIRO, F., ABURATANI, H., TSUKIYAMA-KOHARA, K., MIYAZAKI, J., SONENBERG, N. & OKA, Y. 2008. ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab*, 7, 269-76.
- YAMAMOTO, K., SATO, T., MATSUI, T., SATO, M., OKADA, T., YOSHIDA, H., HARADA, A. & MORI, K. 2007. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*, 13, 365-76.
- YAMANI, L., LATREILLE, M. & LAROSE, L. 2014. Interaction of Nck1 and PERK phosphorylated at Y(5)(6)(1) negatively modulates PERK activity and PERK regulation of pancreatic beta-cell proinsulin content. *Mol Biol Cell*, 25, 702-11.
- YAN, W., FRANK, C. L., KORTH, M. J., SOPHER, B. L., NOVOA, I., RON, D. & KATZE, M. G. 2002. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15920-5.
- YANAGITANI, K., IMAGAWA, Y., IWAWAKI, T., HOSODA, A., SAITO, M., KIMATA, Y. & KOHNO, K. 2009. Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol Cell*, 34, 191-200.
- YANAGITANI, K., KIMATA, Y., KADOKURA, H. & KOHNO, K. 2011. Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA. *Science*, 331, 586-9.
- YANG, Y., CHANG, B. H. & CHAN, L. 2013. Sustained expression of the transcription factor GLIS3 is required for normal beta cell function in adults. *EMBO Mol Med*, 5, 92-104.
- YE, J., RAWSON, R. B., KOMURO, R., CHEN, X., DAVE, U. P., PRYWES, R., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*, 6, 1355-64.
- YOSHIDA, H., HAZE, K., YANAGI, H., YURA, T. & MORI, K. 1998. Identification of the cis-

- acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*, 273, 33741-9.
- YOSHIDA, H., MATSUI, T., YAMAMOTO, A., OKADA, T. & MORI, K. 2001a. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107, 881-91.
- YOSHIDA, H., OKADA, T., HAZE, K., YANAGI, H., YURA, T., NEGISHI, M. & MORI, K. 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 20, 6755-67.
- YOSHIDA, H., OKADA, T., HAZE, K., YANAGI, H., YURA, T., NEGISHI, M. & MORI, K. 2001b. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 21, 1239-48.
- YOSHIDA, H., OKU, M., SUZUKI, M. & MORI, K. 2006. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol*, 172, 565-75.
- YUKAWA, K., TANAKA, T., TSUJI, S. & AKIRA, S. 1999. Regulation of transcription factor C/ATF by the cAMP signal activation in hippocampal neurons, and molecular interaction of C/ATF with signal integrator CBP/p300. *Brain Res Mol Brain Res*, 69, 124-34.
- ZALA, C. A., SALAS-PRATO, M., YAN, W. T., BANJO, B. & PERDUE, J. F. 1980. In cultured chick embryo fibroblasts the hexose transport components are not the 75 000 and 95 000 dalton polypeptides synthesized following glucose deprivation. *Can J Biochem*, 58, 1179-88.
- ZHANG, C., WANG, G., ZHENG, Z., MADDIPATI, K. R., ZHANG, X., DYSON, G., WILLIAMS, P., DUNCAN, S. A., KAUFMAN, R. J. & ZHANG, K. 2012. Endoplasmic reticulum-tethered transcription factor cAMP responsive element-binding protein, hepatocyte specific, regulates hepatic lipogenesis, fatty acid oxidation, and lipolysis upon metabolic stress in mice. *Hepatology*, 55, 1070-82.
- ZHANG, D., ZHOU, P., WANG, W., WANG, X., LI, J., SUN, X. & ZHANG, L. 2016. MicroRNA-616 promotes the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of HCC by targeting PTEN. *Oncol Rep*, 35, 366-74.
- ZHANG, K., SHEN, X., WU, J., SAKAKI, K., SAUNDERS, T., RUTKOWSKI, D. T., BACK, S. H. & KAUFMAN, R. J. 2006a. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, 124, 587-99.
- ZHANG, K., WONG, H. N., SONG, B., MILLER, C. N., SCHEUNER, D. & KAUFMAN, R. J. 2005. The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest*, 115, 268-81.
- ZHANG, W., FENG, D., LI, Y., IIDA, K., MCGRATH, B. & CAVENER, D. R. 2006b. PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab*, 4, 491-7.
- ZHANG, W., HIETAKANGAS, V., WEE, S., LIM, S. C., GUNARATNE, J. & COHEN, S. M. 2013. ER stress potentiates insulin resistance through PERK-mediated FOXO phosphorylation. *Genes Dev*, 27, 441-9.
- ZHONG, Q., ZHOU, B., ANN, D. K., MINOO, P., LIU, Y., BANFALVI, A., KRISHNAVENI, M. S., DUBOURD, M., DEMAIIO, L., WILLIS, B. C., KIM, K. J., DUBOIS, R. M., CRANDALL, E. D., BEERS, M. F. & BOROK, Z. 2011. Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45, 498-509.

- ZHONG, Y., KARALETSOS, T., DREWE, P., SREEDHARAN, V. T., KUO, D., SINGH, K., WENDEL, H. G. & RATSCH, G. 2017. RiboDiff: detecting changes of mRNA translation efficiency from ribosome footprints. *Bioinformatics*, 33, 139-141.
- ZHOU, J., WAN, J., SHU, X. E., MAO, Y., LIU, X. M., YUAN, X., ZHANG, X., HESS, M. E., BRUNING, J. C. & QIAN, S. B. 2018. N(6)-Methyladenosine Guides mRNA Alternative Translation during Integrated Stress Response. *Mol Cell*, 69, 636-647.e7.
- ZHOU, X., XU, X., MENG, Q., HU, J., ZHI, T., SHI, Q. & YU, R. 2013. Bex2 is critical for migration and invasion in malignant glioma cells. *J Mol Neurosci*, 50, 78-87.

Publikationen und Präsentationen

S. Reich, CC.DL Nguyen, C. Has, S. Steltgens, H. Soni, C. Coman, M. Freyberg, A. Bichler, N. Seifert, D. Conrad, C. B. Knobbe-Thomsen, B. Tews, G. Toedt, R. Ahrends, J. Medenbach (2020)
A multi-omics analysis reveals the unfolded protein response regulon and stress-induced resistance to folate-based antimetabolites. *Nat Commun*, under revision, NCOMMS-19-17011B

O. Herdt, S. Reich, J. Medenbach, B. Timmermann, D. Olofsson, M. Preussner, F. Heyd (2020)
The zinc finger domains in U2AF26 and U2AF35 have diverse functionalities and play a role in controlling translation. *RNA Biol*, 1:1-14

C.DL Nguyen, S. Malchow, S Reich, S. Steltgens, S. Loroch, C. Lorenz, A. Sickmann, C. B. Knobbe-Thomsen, B. Tews, J. Medenbach, R. Ahrends (2019)
A sensitive and simple targeted proteomics approach to quantify transcription factor and membrane proteins of the unfolded protein response pathway in glioblastoma cells. *Sci Rep*, 9, 8836

Schneider, T., L. H. Hung, S. Schreiner, S. Starke, H. Eckhof, O. Rossbach, S. Reich, J. Medenbach & A. Bindereif (2016) CircRNA-protein complexes: IMP3 protein component defines subfamily of circRNPs. *Sci Rep*, 6, 31313.

Vortrag „The Unfolded Protein Response in Glioma“
Rabensteiner Kolleg; Pottenstein, Deutschland; 15.-17. Juni 2017

Reich S., Himanshu S., Nguyen C., Steltgens S., Ahrends R., Knobbe-Thomsen C., Tews B., Tödt G., Medenbach J.
Poster „Translational reprogramming under ER stress“
The Biology of RNA-Protein Complexes; SFB960 Konferenz
Regensburg, Deutschland; 11.-14. Oktober 2017

Lebenslauf

Name	Stefan Reich
Nationalität	Deutsch
Geburtsdatum	26.03.1986
Geburtsort	Ochsenhausen

Schulischer Werdegang

09/92-07/96	Grundschule Ochsenhausen
09/96-07/05	Gymnasium Ochsenhausen

Akademischer Werdegang

09/05-02/09	Bachelorstudium an der Hochschule Furtwangen University Studiengang Bio- und Prozesstechnologie Abschlussnote: 1,6
09/09-02/12	Masterstudium an der Exzellenzuniversität Konstanz Studiengang Biological Sciences Abschlussnote: 1,7
06/15-06/19	Doktorand an der Universität Regensburg Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin, Lehrstuhl für Biochemie I, AG Medenbach Thema der Doktorarbeit: Systems Biology of the Unfolded Protein Response in Glioma

Beruflicher Werdegang

03/09-08/09	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH
04/12-08/13	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG Abteilung Nonclinical Drug Safety, Pathology
seit 12/19	Prozessingenieur DSP Entwicklung Rentschler Biopharma SE

Sonstiges

Unterrichten	Betreuung diverser studentischer Praktika Schulbesuche am Gymnasium Kehlheim
Sprachen	Englisch (verhandlungssicher) Französisch (Grundkenntnisse) Spanisch (Grundkenntnisse)
Stipendium	Add-On Fellowship für interdisziplinäre Wissenschaft der Joachim-Herz-Stiftung
Fortbildung	Gentechnikrecht-Fortbildung zur Erlangung der Sachkunde für Projektleiter gentechnischer Arbeiten und Beauftragte für Biologische Sicherheit Fachkundelehrgang „Betriebsbeauftragte für Gewässerschutz“
Hobbies	Fussball, Lesen

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei PD Dr. Jan Medenbach für die großartige Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit im Rahmen des SUPR-G-Projekts in seinem Labor durchführen zu können. Sein Enthusiasmus, seine Hilfe als Ansprechpartner, zielführende Diskussionen, das in mich gesetzte Vertrauen in der Forschungsarbeit und auch seine persönliche Art machte die Erstellung dieser Arbeit erst möglich. Nicht nur in meiner weiteren beruflichen Karriere, sondern auch menschlich, werde ich durch seine Förderung profitieren.

Einen großen Dank möchte ich Prof. Dr. Gunter Meister, Prof. Dr. Wolfgang Seufert, assoz. Prof. Dr. Joachim Griesenbeck und Prof. Dr. Thomas Dresselhaus für die Bereiterklärung als Prüfungskomitee zu fungieren, aussprechen.

Außerdem möchte ich mich bei Gunter Meister für seine Rolle als Mentor an der Universität Regensburg und Grischa Toedt als zusätzlichen Ansprechpartner während meiner Doktorarbeit bedanken. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt dem ganzen Medenbach Lab, bestehend aus Daniela Strauß, Rebecca Moschall, Andrea Eder, Dominik K. Conrad und Andreas H. Horn während dieser Zeit. Neben vielen Diskussionen, Ratschlägen und Hilfestellungen in fachlicher Hinsicht war auch die freundschaftliche Atmosphäre ein ausschlaggebender Punkt für das Gelingen dieser Arbeit. Nicht nur beruflich, sondern auch privat bin ich dankbar, mit euch viele Jahre gemeinsam erlebt zu haben.

Darüber hinaus möchte ich einen weiteren Dank an das gesamte Meister Labor an der Universität Regensburg aussprechen, bei dem ich mich vom ersten Tag an willkommen fühlte. Bei Fragen oder Diskussionen konnte ich immer ein offenes Ohr und hilfreiche Tipps erfahren. Auch für die Unternehmungen und tolle Zeit außerhalb der Universität möchte ich mich bei allen bedanken.

Ein großer Dank für die tolle und hilfreiche Zusammenarbeit sowie vielen Diskussionen geht an das SUPR-G Konsortium: Grischa Toedt und Canan Has für die Auswertungen der Multi-Omics Daten, Chi Nguyen und Robert Ahrends für die Massenspektrometrie, Himanshu Soni und Björn Tews für die Bereitstellung der LN308 Zellen, deren Testung und des ATF6-Inhibitors, sowie Sascha Steltgens und Christiane Knobbe-Thomsen für die Definition der UPR-Behandlung. Durch die gemeinsame Arbeit war es erst möglich, die hier dargestellte komplexe Fragestellung zu bearbeiten.

Bei Dr. Uwe Bamberger möchte ich mich für das detailgenaue Lesen und Korrigieren meiner Dissertation herzlich bedanken.

Einen riesigen Dank möchte ich meinen Eltern sowie meinen beiden Brüdern und ihren Ehefrauen aussprechen. Für eure nie nachlassende Unterstützung, eure aufmunternden Worte, eure Verlässlichkeit, euch als Ansprechpartner in guten wie in schweren Zeiten und Vieles mehr bin ich unheimlich dankbar. Ohne euch als Familie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Leonie bedanken, auch wenn es mir unmöglich ist dies in Worte zu fassen. Das Setzen der Dissertation war nur das i-Tüpfelchen, das du zur Erreichung dieser Arbeit beigetragen hast. Deine Unterstützung in all den Jahren, deine Geduld an langen Arbeitstagen, deine Hilfsbereitschaft, für jeden schönen Moment mit dir und noch tausenden Dingen mehr bin ich unendlich dankbar. Ich bin sehr froh dich zu haben und freue mich mit dir meine Zukunft zu teilen.

