

Untersuchungen am Sigma-1-Rezeptor hinsichtlich des Lipidmetabolismus und der Autophagie

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktorin der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie,
Geographie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Lisa Hueske

geb. in Mainz

Mainz, 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Der Sigma-1-Rezeptor	6
1.1.1	Struktureller Aufbau des Sigma-1-Rezeptors	6
1.1.2	Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors	8
1.1.3	Die Ligandenbindungsstelle des Sigma-1-Rezeptors	8
1.1.4	Die Funktionen des Sigma-1-Rezeptors	9
1.1.5	Der Sigma-1-Rezeptor im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen	12
1.2	Proteinaggregation	13
1.2.1	Die Bildung von Proteinaggregaten im zellulären System	13
1.2.2	α -Synuclein Aggregate	16
1.3	Autophagie in Säugetierzellen	17
1.4	Lipidtröpfchen und Lipid-Metabolismus	20
1.4.1	Aufbau und Biogenese von Lipid-Tröpfchen	20
1.4.2	Der Metabolismus von Lipid-Tröpfchen in der Zelle	22
1.4.3	Funktionen von Lipid-Tröpfchen im zellulären System	23
1.4.4	Lipid-Tröpfchen im Hinblick auf neurodegenerativen Erkrankungen	25
1.5	<i>Lipid-raft like microdomains</i>	26
1.5.1	Der Aufbau der MAM als <i>Lipid-raft</i> ähnliche Mikrodomäne im ER	26
1.5.2	Die Funktionen der MAM	27
1.5.3	Die MAM im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen	29
1.6	Ziel der Arbeit	30
2	Material	31
2.1	Chemikalien und Kits	31
2.2	Puffer, Nährmedien und Lösungen	33
2.3	Antikörper	36
2.4	Enzyme und ihre Puffer	38
2.5	Plasmide	38
2.6	Oligonukleotide	39
2.7	Zelllinien und Bakterienstämme	40
2.8	Laborgeräte	40
2.9	EDV-Programme	42
3	Methoden	43
3.1	Molekularbiologische Methoden	43
3.1.1	Analytische und Präparative Gelelektrophorese	43

3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
3.1.3	Klonierung	43
3.1.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.1.3.2	Restriktion von Vektor und Insert	44
3.1.3.3	Generation von <i>Blunt Ends</i>	44
3.1.3.4	Ligation	45
3.1.3.5	Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien	45
3.1.3.6	Plasmid-Extraktion aus Bakterienzellen	45
3.1.3.7	Sequenzierung	46
3.1.4	RNA-Aufreinigung aus eukaryotischen Zellen	46
3.1.5	Reverse Transkription und Synthese der cDNA	46
3.1.6	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR Analyse (qPCR)	47
3.2	Zellbiologische Methoden	47
3.2.1	Inkulturnahme und Kultivierung von HeLa und H4 Zellen	47
3.2.2	Herstellung von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	48
3.2.3	Elektroporation	48
3.2.4	Calcium-Phosphat-Präzipitation	49
3.2.5	Behandlung von Zellen	49
3.2.6	Bestimmung der autophagischen Aktivität in eukaryotischen Zellen . .	50
3.3	Proteinanalytik	50
3.3.1	Lysieren von Zellen	50
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.3.4	Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot	51
3.3.5	Detektion der membrangebundenen Proteine	52
3.3.6	Isolation der MAM	52
3.3.7	Isolation einer unlöslichen Fraktion zur Analyse von Proteinaggregaten	53
3.3.8	Proteomics-Analyse	53
3.4	Mikroskopie	54
3.4.1	Immunfluoreszenz-Färbungen	54
3.4.2	Aufnahmen am konfokalen <i>Laser-scanning</i> Mikroskop	54
3.5	Lipidbasierte Methoden	54
3.5.1	Phospholipid-Quantifizierung	54
3.5.2	Cholesterin-Quantifizierung	54
3.6	Statistische Auswertung	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Die Rolle des Sigma-1-Rezeptors bei der Dynamik von Lipid-Tröpfchen	56
4.1.1	Charakterisierung von stabilen Sigma-1-Knockout Zelllinien	56
4.1.2	Der Sigma-1-Rezeptor moduliert den Metabolismus von Lipid-Tröpfchen	57
4.1.2.1	Quantifizierung von Lipid-Tröpfchen in HeLa-Zellen	57

4.1.2.2	Nachweis der Sigma-1-Rezeptor abhängigen Lipid-Tröpfchen Akkumulation	60
4.1.2.3	Charakterisierung des Lipid-Tröpfchen Metabolismus in Sigma- 1-Knockout Zellen	64
4.1.3	Einfluss der Mutanten E102Q und E138Q auf die veränderte Lipid- Tröpfchen Dynamik	67
4.1.4	Einfluss der Cholesterin-Bindedomänen und der Transmembrandomäne auf die veränderte Lipid-Tröpfchen Dynamik	68
4.2	Die Rolle des Sigma-1-Rezeptors bei der Autophagie	75
4.3	Die Rolle des Sigma-1 in der Aggregation von Proteinen	80
4.3.1	Der Sigma-1-Rezeptor und ER-Stress	80
4.3.2	Der Einfluss des Sigma-1-Rezeptors auf die Aggregation von α -Synuclein	83
4.4	Proteomics-Analyse	87
4.4.1	Der Sigma-1-Rezeptor und sein Einfluss auf die MAM	91
5	Diskussion	96
5.1	Der Sigma-1-Rezeptor ist ein Modulator der Lipid-Tröpfchen Dynamik	96
5.1.1	Verlust des Sigma-1-Rezeptors führt zu einer Akkumulation von Lipid- Tröpfchen	96
5.1.2	Auswirkungen von Mutationen und Deletionen des Sigma-1-Rezeptors auf die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen	98
5.2	Genetische oder pharmakologische Inhibition des Sigma-1-Rezeptors beein- flusst die Autophagie	100
5.3	Die Rolle des Sigma-1-Rezeptors hinsichtlich ER-Stress und Proteinaggregation	101
5.4	Genetische Manipulation des Sigma-1-Rezeptors zeigt einen Effekt auf die Ex- pression spezifischer Proteine (Proteomics)	102
5.5	Der Sigma-1-Rezeptor bedingt die Stabilität der MAM	104
6	Zusammenfassung	106
7	Ausblick	107
8	Summary	108
9	Literaturverzeichnis	109
10	Anhang	132
10.1	Abbildungsverzeichnis	132
10.2	Tabellenverzeichnis	134
10.3	Abkürzungsverzeichnis	135
10.4	Plasmidkarten	139

1. Einleitung

1.1 Der Sigma-1-Rezeptor

1.1.1 Struktureller Aufbau des Sigma-1-Rezeptors

Der Sigma-1-Rezeptor besteht aus 223 Aminosäuren und ist ein membrangebundenes Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit Chaperon-Aktivität (Kekuda *et al.*, 1996; Hayashi und Su, 2007). Er zeigt keine Homologie in der Aminosäuresequenz mit einem anderen Protein in Säugetierzellen, auch nicht der C8-C7 Sterol-Isomerase (Aishwarya *et al.*, 2021; Labit-Le Bouteiller *et al.*, 1998). Jedoch ist die Sequenz von Sigma-1 zu 30,3% identisch und zu 66,4% ähnlich zur Hefe spezifischen Erg2 Sterol C8-C7-Isomerase, während der Sigma-1-Rezeptor selbst keine Sterol-Isomerase Aktivität zeigt (Moebius *et al.*, 1997; Hanner *et al.*, 1996; Ossa *et al.*, 2017).

Neueren Studien zufolge besitzt der Sigma-1-Rezeptor eine einfache Transmembrandomäne mit einem kurzen Ende am N-Terminus und einem längeren Ende am C-Terminus. (Schmidt *et al.*, 2016; Mavylutov *et al.*, 2018) Dabei wird die topologische Ausrichtung des N- und C-Terminus kontrovers diskutiert. Innerhalb einer Studie von Schmidt *et al.* wurde mittels Röntgenkristallographie *in vitro* nachgewiesen, dass der N-Terminus ins ER-Lumen und der C-Terminus ins Cytosol zeigt. Im Gegensatz dazu zeigten Mavylutov *et al.* mittels APEX-2-Tag *in vivo*, dass die topologische Ausrichtung entgegengesetzt zu der in der Röntgenstrukturanalyse nachgewiesenen ist.

Der Sigma-1-Rezeptor liegt in der Membran als Homotrimer in einer triangulären Anordnung vor, wobei jedes Protomer am N-Terminus eine einfache Transmembrandomäne besitzt, die innerhalb der Membran räumlich voneinander getrennt sind (Abbildung 1.1; Schmidt *et al.*, 2016). Auf die N-terminale Transmembrandomäne folgen zwei α -Helices, die eine *Hairpin*-Struktur bilden (Ossa *et al.*, 2017). Im Zentrum des Sigma-1-Rezeptors befinden sich zwei antiparallel ausgerichtete β -Sheets, die ein *Cupin-like* β -Barrel bilden, welches von vier α -Helices flankiert wird und aufgrund seines hydrophoben Bereichs mit der Membran assoziiert ist. Der C-Terminus wird durch zwei amphipatische α -Helices abgeschlossen, die ebenfalls mit der Membran assoziiert sind (Schmidt *et al.*, 2016).

Da Sigma-1-Liganden an Erg2 binden können und dessen Sterol-Isomerase Funktion inhibieren können, wurde vermutet, dass die beiden am stärksten konservierten Aminosäuresequenzen zwischen Erg2 und dem Sigma-1-Rezeptor an der Ligandenbindung beteiligt sein könnten (Pal *et al.*, 2007; Moebius *et al.*, 1997; Ossa *et al.*, 2017). Diese Regionen wurden später als *sterol binding domain-like motifs* bezeichnet, (SBDLI) von Aminosäure 91-109 und (SBDLII) von Aminosäure 176-194 (Abbildung 1.2; Pal *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass die beiden Domänen in nächster Nähe zueinander stehen und an der Ligandenbindung sowie an der Modulation von *Lipid rafts* beteiligt sind (Pal *et al.*, 2008; Fontanilla *et al.*, 2008).

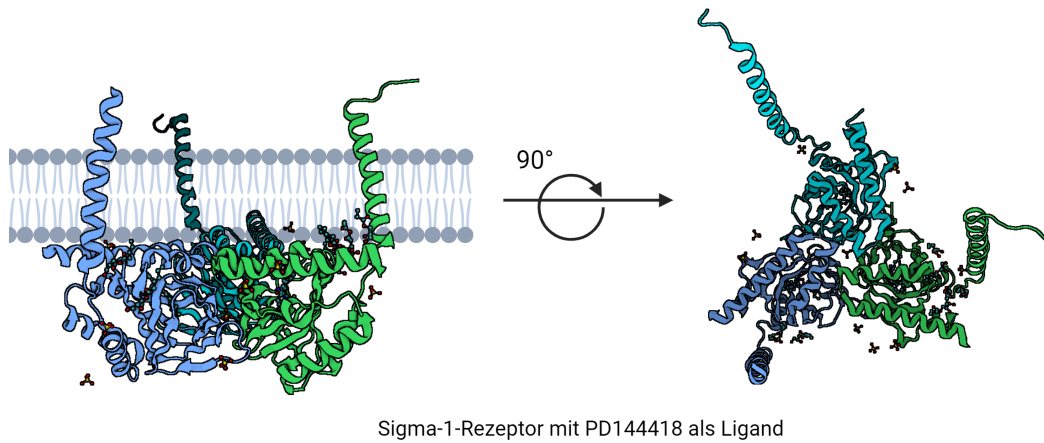


Abbildung 1.1: Struktur des Sigma-1-Rezeptors, bestehend aus drei Monomeren, die ein Homotrimer in der Membran des endoplasmatischen Retikulums bilden. Jedes Monomer bindet dabei den Liganden PD144418. Die α -Helices der Transmembrandomänen sind räumlich voneinander getrennt und die α -Helices, die die β -Barrel Struktur flankieren liegen auf der Membran auf. Eine Drehung der Struktur um 90° zeigt die trianguläre Struktur des Sigma-1-Rezeptors (Schmidt *et al.*, 2016; Ossa *et al.*, 2017). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

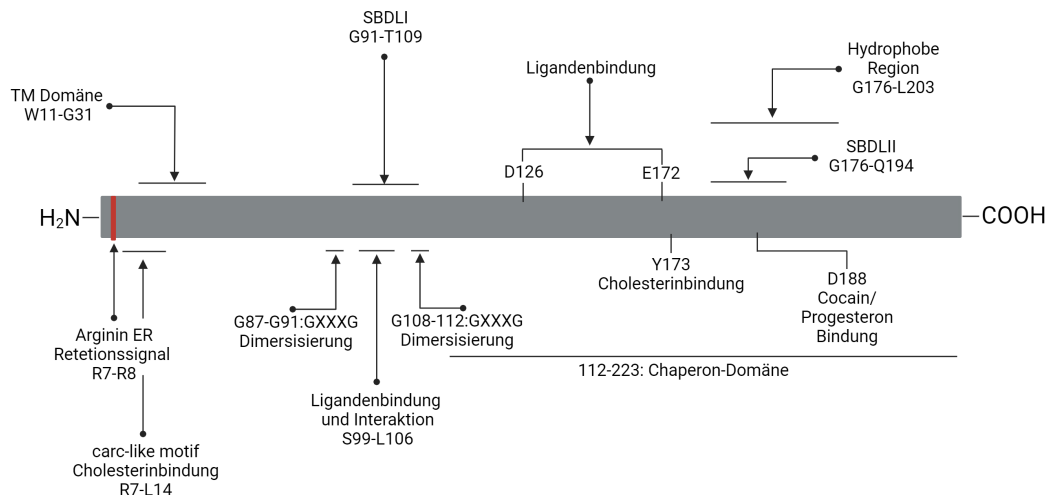


Abbildung 1.2: Aufbau des Sigma-1-Rezeptors mit seinen wichtigsten Domänen. Der Sigma-1-Rezeptor besitzt eine Chaperon-Domäne, die neben der Chaperon-Aktivität auch eine hydrophobe Region mit dem *sterol binding domain-like motif* II (SBDLII) beinhaltet. Für die Bindung an Cholesterin besitzt der Sigma-1-Rezeptor noch das *carc-like motif* und die Aminosäure Tyrosin an Position 173 (Y173). Die *sterol binding domain-like motif* I/II sind an der Ligandenbindung beteiligt, wie auch der Bereich S99-L106 und die Aminosäuren D126 und E172. Die Transmembrandomäne (TM) befindet sich am N-terminalen Ende R7-L14 und beinhaltet das *carc-like motif*. Ebenfalls am N-terminalen Ende ist das ER-Retentionssignal, R7-R8, lokalisiert. Zur Dimerisierung besitzt der Sigma-1-Rezeptor zwei Dimerisierungsmotive GXXXG, G87-G91 und G108-112 (Aishwarya *et al.*, 2021; Zhemkov *et al.*, 2021). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Weiterhin bindet der Sigma-1-Rezeptor auch an Cholesterin und die Domäne SBDLII mit dem konservierten Motiv L/V-X1-5-Y-X1-5-K/R ist nachweislich an der Cholesterinbindung beteiligt (Palmer *et al.*, 2007). Nach neueren Studien besitzt der Sigma-1-Rezeptor noch eine weitere Region für die Bindung von Cholesterin, die als *carc-like motif* bezeichnet wird und

das konservierte Motiv R/K-X1-5-Y/F/W-X1-5-L/V beinhaltet. Das *carc-like motif* kommt im Sigma-1-Rezeptor in der Transmembrandomäne vor und wird dort von Aminosäure R7-L14 gebildet (Abbildung 1.2; Zhemkov *et al.*, 2021).

1.1.2 Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors

Der Sigma-1-Rezeptor ist ubiquitär in den Gewebetypen exprimiert, insbesondere in Herz, Leber, Gehirn, Placenta, Thymus, Lunge, Niere, Magen, Skelettmuskel und Pancreas. Das höchste Expressionslevel zeigt der Sigma-1-Rezeptor im Cerebellum des Gehirns, in der Leber und in der Placenta. Weniger stark exprimiert ist der Sigma-1-Rezeptor im Herz, Skelettmuskel, verschiedenen Drüsen, Pancreas, Lunge, Gastrointestinaltrakt, und der Niere (Aishwarya *et al.*, 2021).

Die subzelluläre Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors wird vor allem durch den Zell- und Organtyp bestimmt. Der Sigma-1-Rezeptor ist unter anderem an der Mitochondrien-ER-assoziierten Membran (MAM), der Plasmamembran, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), der Kernmembran und an Mitochondrien lokalisiert (Hayashi and Su, 2007; Su *et al.*, 2009; Dusossy *et al.*, 1999).

1.1.3 Die Ligandenbindungsstelle des Sigma-1-Rezeptors

Pharmakologische Studien aus dem Jahr 1976 führten zu der Annahme, dass es drei Opioid-Rezeptor Subtypen gibt: μ , κ und σ . Durch Studien mit Radioliganden wurde Sigma-1 als nicht klassischer Opioid-Rezeptor identifiziert, da Sigma-1 nicht an die typischen Opioid-Liganden bindet, wie Naloxon, Etorphin oder (-)-Benzomorphone. Stattdessen zeigt der Sigma-1-Rezeptor eine hohe Affinität für (+)-Benzomorphone (Schmidt und Kruse, 2019).

Die Existenz von oligomeren Formen des Sigma-1-Rezeptors vorliegend als Homodimer und Heterotetramer mit D₂-Rezeptoren und die Abhängigkeit der Oligomerisierung von der Ligandenbindung wurde zunächst von Navarro *et al.* nachgewiesen (Navarro *et al.*, 2013). Die oligomeren Formen werden durch spezielle GXXXG-Motive stabilisiert (Chu *et al.*, 2013). Der Sigma-1-Rezeptor liegt in einem inaktiven Zustand in seiner oligomeren Form in einem Komplex mit Bip/Grp78 an der MAM vor (Abbildung 1.3; Hayashi und Su, 2007). Durch die Bindung von Antagonisten, insbesondere Haloperidol und PD144418, an den Sigma-1-Rezeptor wird die oligomere Form stabilisiert, während Agonisten, wie (+)-Pentazocin und PRE-084, die Dissoziation der Oligomere in Monomere selbst und die Dissoziation von Bip/Grp78 favorisieren (Gromek *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2015; Yano *et al.*, 2018; Schmidt und Kruse, 2019). Eine Reduktion im Calcium-Level des endoplasmatischen Retikulums führt ebenfalls zu einer Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors und zu einer Dissoziation von Bip/Grp78 (Hayashi und Su, 2007).

Innerhalb der β -Sheet Struktur des Sigma-1-Rezeptors befindet sich die Ligandenbindungsstelle, die eine analog zum aktiven Zentrum der *Cupin-like* Metalloenzyme aufgebaute Struktur zeigt. Dabei bindet jeder Ligand an eine einzelne Untereinheit des Trimers und wird umgeben von stabilisierenden Strukturen des Sigma-1-Rezeptors. Dazu zählen die *sterol binding*

domain-like motifs (SBDLI and SBDLII), die vor allem den hydrophoben Teil des Liganden, entsprechend des Pharmakophor-Modells stabilisieren, wobei die SBDLII als Helix auf dem Liganden aufliegt (Pal *et al.*, 2007; Pal *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2016; Ossa *et al.*, 2017).

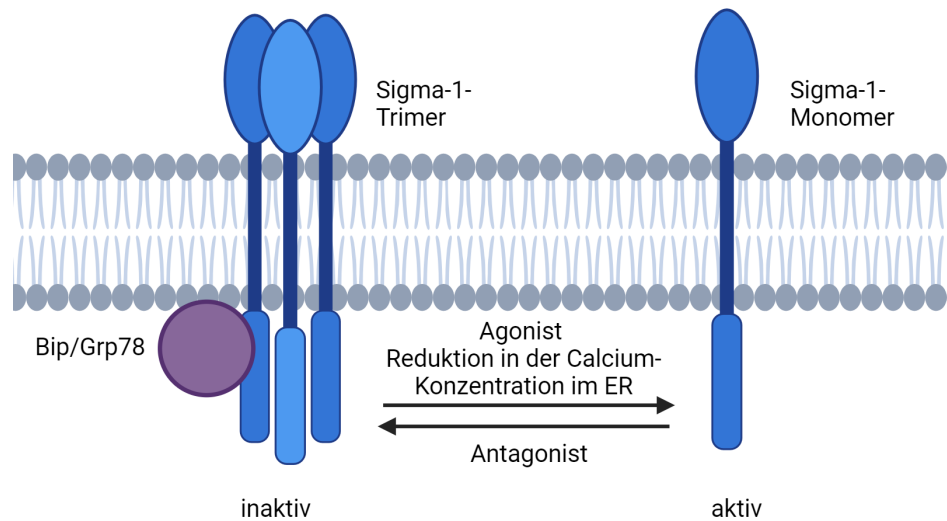


Abbildung 1.3: Oligomerisierung und Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors. Der Sigma-1-Rezeptor liegt in seiner inaktiven Form als Trimer an der MAM vor in einem Komplex mit Bip/Grp78. Eine Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors erfolgt durch die Bindung von Agonisten oder einer Reduktion der Calcium-Konzentration im ER. Nach Aktivierung dissoziiert der Sigma-1-Rezeptor von Bip/Grp78 und transloziert von der MAM zu anderen Kompartimenten in der Zelle und interagiert dort mit diversen Interaktionspartnern. In seiner aktiven Form liegt der Sigma-1-Rezeptor als Monomer vor. Allgemein verschieben Agonisten das Gleichgewicht zur monomeren Form, während Antagonisten die Oligomerisierung begünstigen (Schmidt und Kruse, 2019). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Einer Vielzahl von Liganden ist es möglich an den Sigma-1-Rezeptor zu binden. Die Liganden entsprechen dabei einem Pharmakophor-Modell des Sigma-1-Rezeptors. Das Modell besteht aus einem zentralen positiv geladenen Amin, welches von zwei hydrophoben oder aromatischen Bereichen umgeben wird. Diese besitzen einen Abstand von 6-10 Å beziehungsweise 2,5-3,9 Å zum zentralen Amin (Gennon *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2018). Das positiv geladene Amin bindet an E172 in der Ligandenbindungsstelle (Schmidt *et al.*, 2016; Seth *et al.*, 2001).

1.1.4 Die Funktionen des Sigma-1-Rezeptors

Dem Sigma-1-Rezeptor ist es möglich innerhalb der ER-Membran von der MAM zu anderen Kompartimenten wie der Plasmamembran und dem Zellkern zu translozieren. Die Translokation ist abhängig von der Ligandenbindung (Mavlyutov und Ruoho, 2007; Su *et al.*, 2010). Cocain, als Sigma-1-Rezeptor Agonist, bedingte die Translokation des Sigma-1-Rezeptors vom ER zum Zellkern in NG-108 Zellen und Depletion von Calcium am ER durch Thapsigargin induzierte die Translokation des Sigma-1-Rezeptors von der MAM (Hayashi und Su, 2007; Hayashi und Su, 2003). Der Agonist (+)-Pentazocin führte zu einer Reduktion des Sigma-1-Rezeptors in *Lipid-raft* Fraktionen (Hayashi und Su, 2003). Die Translokation ermöglicht es dem Sigma-1-Rezeptor mit diversen Proteinen zu interagieren, wodurch der Sigma-1-Rezeptor

vor allem an der Regulation von Ionen-Kanälen, dem Lipid-Metabolismus am ER, Autophagie, der mitochondrialen Funktion und der Antwort auf ER-Stress beteiligt ist (Aishwarya *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2010). Im Allgemeinen fungiert der Sigma-1-Rezeptor als molekulares Chaperon, welches vor allem am ER Proteine stabilisiert und so ER-Stress entgegenwirkt (Hayashi und Su, 2007).

Der Sigma-1-Rezeptor ist an der Modulation von Ionen-Kanälen und deren Signalwegen beteiligt, insbesondere dem Calcium-Efflux vom ER zu den Mitochondrien an der MAM. Für den Efflux von Calcium ist der *Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 3* (IP3R3) verantwortlich, der nach Aktivierung durch *Inositol-1,4,5-trisphosphate* (IP3) und anschließendem Calcium-Efflux seine native Proteinkonformation ändert. Die Stabilisierung von IP3R3 durch den Sigma-1-Rezeptor an der MAM gewährleistet den Calcium-Efflux vom ER zu den Mitochondrien und damit verbunden die ATP-Produktion (Hayashi und Su, 2007; Tagashira *et al.*, 2014). Der Sigma-1-Rezeptor moduliert dabei die Bindung von IP3R3 und Ankyrin B220. Durch Interaktion des Sigma-1-Rezeptors mit Ankyrin B220 dissoziiert der Komplex aus Ankyrin B220 und IP3R3 und der Calcium-Efflux wird verlängert (Wu und Bowen, 2008).

Der Sigma-1-Rezeptor wirkt sich nicht nur über die Stabilisierung von IP3R3 auf die Regulation des Calcium-Signaling in der Zelle aus, sondern auch über die Interaktion mit Spannungs-gesteuerten Calcium Kanälen, wie VDCC (*voltage dependent calcium channel*) und STIM1, wobei eine Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors zu einer Reduzierung des Calcium-Influx in die Zelle führt (Strivats *et al.*, 2016; Urani *et al.*, 2002). Der Sigma-1-Rezeptor Agonist SKF10047 induziert dabei die Bindung von STIM1 an den Sigma-1-Rezeptor, was zu einer reduzierten Bindung von STIM1 mit Ora1 führt und damit verbunden den Calcium-Influx reduziert (Strivats *et al.*, 2016). Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors reguliert zudem die Aktivität von verschiedenen Kaliumkanälen, wie zum Beispiel Kv1.2, Kv1.3 und Kv1.4 (Kinoshita *et al.*, 2012; Kourrich *et al.*, 2013; Aydar *et al.*, 2002).

Der Sigma-1-Rezeptor ist zudem an der Aufrechterhaltung der Funktion der Mitochondrien beteiligt. Da der Sigma-1-Rezeptor an der MAM lokalisiert ist, steht er in unvermitteltem Kontakt zu den Mitochondrien und gewährleistet dort den Calcium-Efflux aus dem ER in die Mitochondrien über IP3R3 und die damit verbundene ATP-Produktion (Abbildung 1.4; Hayashi und Su, 2007; Tagashira *et al.*, 2014; Wu und Bowen, 2008). Zudem stabilisiert der Sigma-1-Rezeptor die Konformation von IRE1 α , eines der Sensorproteine für fehlgefaltete Proteine der *Unfolded Protein Response*, welche bei ER-Stress induziert werden. IRE1 α wird durch den Sigma-1-Rezeptor vor allem während ER-Stress stabilisiert, was zu einer Verlängerung des IRE1 α -XBP1 Signalweges führt. Die Assoziation von Sigma-1 mit IRE1 α wird durch die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien reguliert, weshalb eine Lokalisation von IRE1 α vor allem an der MAM von Vorteil ist (Mori *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2017). Ein Knockdown des Sigma-1-Rezeptors in *Chinese hamster ovary* Zellen verstärkte die Wasserstoffperoxid induzierte Apoptose durch die Reduktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Der Sigma-1-Rezeptor inhibiert dabei den NF- κ B vermittelten Signalweg und wirkt so protektiv auf die Zellen (Meunier und Hayashi, 2009).

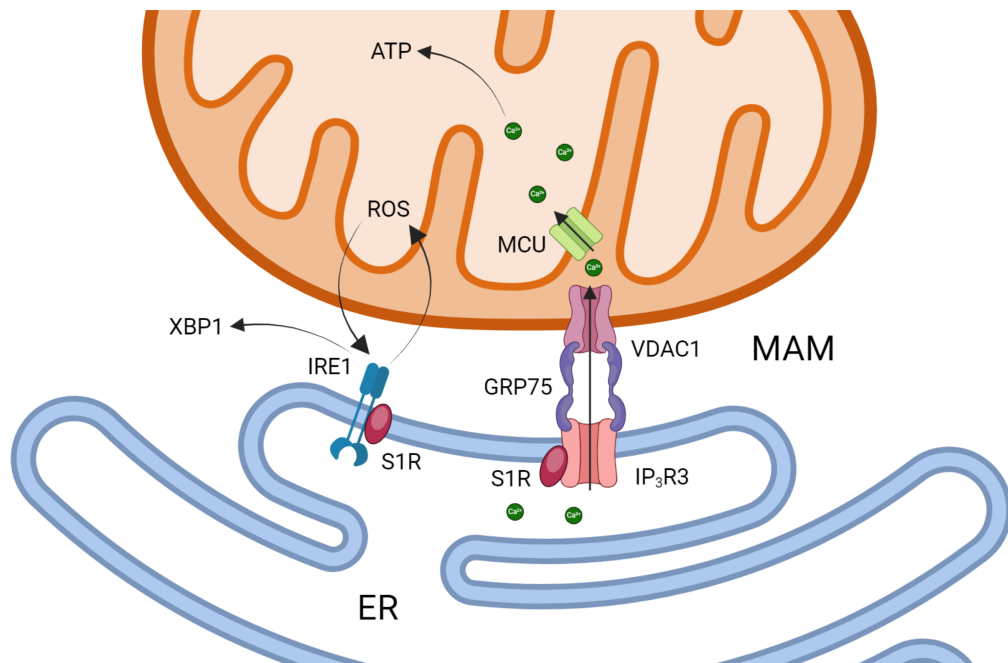


Abbildung 1.4: Die Funktion des Sigma-1-Rezeptors an der MAM. Der Sigma-1-Rezeptor fungiert an der MAM als ER-Chaperon, welches Proteine stabilisiert. Dazu gehören *Inositol requiring enzyme 1 α* (IRE1 α), wodurch der XBP1-Signalweg verlängert wird. Reguliert wird dieser Prozess durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien. Weiterhin stabilisiert der Sigma-1-Rezeptor auch *Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 3* (IP3R3), wodurch der Calcium-Efflux vom ER zu den Mitochondrien gewährleistet wird und damit verbunden die Produktion von ATP (Hayashi, 2015; Hayashi, 2019). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Der Sigma-1-Rezeptor zeigt zudem einen Einfluss auf die Autophagie. So wurde gezeigt, dass ein Sigma-1-Knockdown in HEK293 Zellen und in NSC34 Zellen zu einer Akkumulation von autophagischen Vesikeln gefüllt mit nicht abgebauten autophagischen Substraten führte (Prause *et al.*, 2013; Vollrath *et al.*, 2014). Studien zeigten auch, dass ein Sigma-1-Knockdown und Knockout die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen hemmt, weshalb es zu einer Akkumulation von Autophagosomen kommt (Vollrath *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019). Weitere Studien in Krebszelllinien zeigten ebenfalls, dass eine Inhibition von Sigma-1 mit Antagonisten wie IPAG oder Haloperidol zu einer gesteigerten Autophagosomen Bildung führt, während eine entsprechende Aktivierung von Sigma-1 mit Agonisten wie PRE-084 keinen Effekt auf die Autophagie zeigten (Schrock *et al.*, 2013). Eine Steigerung der Autophagie nach Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors mit ANAVEX2-73 konnte in Krebszelllinien lediglich in einer neueren Studie gezeigt werden (Christ *et al.*, 2019). In klinischen Studien zeigten Sigma-1-Rezeptor Agonisten, wie ANAVEX3-71 jedoch einen positiven Effekt auf die Autophagie (Prasanth *et al.*, 2021).

Der Sigma-1-Rezeptor beeinflusst zudem den Lipidmetabolismus am endoplasmatischen Retikulum und ist nicht nur an der MAM lokalisiert, sondern auch an Lipid-Tröpfchen (Hayashi und Su, 2003). Der Sigma-1-Rezeptor reguliert dort auch die Kompartimentierung und den Transport von im ER synthetisierten neutralen Lipiden (Hayashi und Su, 2003; Hayashi und Fujimoto, 2010; Hayashi *et al.*, 2005). Durch die hohe Konzentration an Ceramiden und Cholesterin an der MAM und an *Lipid-rafts* wird Sigma-1 spezifisch zu diesen Regionen in

zellulären Membransystemen rekrutiert, um mit Proteinkomplexen zu interagieren (Zhemkov *et al.*, 2021). Ob der Sigma-1-Rezeptor an der Synthese von Lipiden direkt beteiligt ist, ist noch nicht genauer erforscht. Jedoch ist bekannt, dass der Sigma-1-Rezeptor die ER-assoziierte Degradation von UDP-Galactose-Ceramid Galactosyltransferase verhindert und so die Bildung von Galactosylceramiden (Hayashi *et al.*, 2012).

1.1.5 Der Sigma-1-Rezeptor im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer, Parkinson, Amyotrophische Laterale Sklerose (ALS) und Huntington, zeichnen sich vor allem durch ein Absterben von Neuronen infolge eines Verlusts der Protein-Homöostase und der damit verbundenen Akkumulation von Proteinaggregaten in Neuronen aus (Penke *et al.*, 2017). Dem liegen häufig ähnliche zelluläre und molekulare pathologische Mechanismen zugrunde. Dazu gehören Excitotoxizität, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Beeinträchtigungen in der Autophagie, im Ubiquitin-Proteasom-System und in der Regulation des Calcium-Signaling sowie Störungen in der Funktion von Mitochondrien, die zu einer reduzierten ATP-Produktion führen (Benarroch, 2018).

Mutanten des Sigma-1-Rezeptors, insbesondere E102Q und E138Q, stehen im Verdacht mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert zu sein. E102Q ist mit ALS und E138Q mit distaler hereditärer Motorneuropathie (dHMN) assoziiert (Al-Saif *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Gregianin *et al.*, 2016). Bei den Mutationen liegt eine Punktmutation von Glutaminsäure zu Glutamin vor. Die Glutaminsäure an Position 102 bildet zwei attraktive Wechselwirkungen. Eine Substitution zu Glutamin würde eine der beiden attraktiven Wechselwirkungen durch eine repulsive Wechselwirkung ersetzen. Dies könnte zu einer Destabilisierung der nativen Konformation des Sigma-1-Rezeptors führen. An Position 138 bildet Glutaminsäure ein Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen. Eine Substitution mit Glutamin an Position 138 könnte zu einer Destabilisierung des Netzwerks aus Wasserstoffbrückenbindungen führen (Schmidt *et al.*, 2016; Schmidt und Kruse, 2019). ALS wird charakterisiert durch ein Absterben von Motorneuronen bedingt durch eine Anreicherung von fehlgefalteten Proteinen und der damit verbundenen Bildung von Proteinaggregaten (Tandan und Bradley, 1985; Dreser *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2021). Überexpression der Mutante E102Q führte in MCF-7 Zellen zu einer Bildung von Sigma-1-E102Q Aggregaten, welche die Autophagie beeinträchtigten und zu einer Bildung von ALS assoziierten Proteinaggregaten von RNA bindenden Proteinen führten (Dreser *et al.*, 2017). Auch die Bildung von Sigma-1-Rezeptor Oligomeren wurde durch die Mutante E102Q reduziert (Abramyan *et al.*, 2020). dHMN wird charakterisiert durch die Degeneration von unteren Motoneuronen. Die Mutante E138Q führte zu einer veränderten Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors in Neuroblastom-Zellen SH-SY5Y und zu einer Anreicherung von Autophagie-Marker Proteinen, insbesondere LC3 und p62 (Gregianin *et al.*, 2016).

Im Rückenmark von Mäusen wurde der Sigma-1-Rezeptor insbesondere in Motoneuronen des Ventralhorns nachgewiesen (Mavlyutov *et al.*, 2013). Der Sigma-1-Rezeptor ist in Motoneuronen vor allem an postsynaptischen Bereichen in der Nähe des muskarinischen Acetylcholinrezeptors M2 (mAChR M2) lokalisiert. Der Sigma-1-Rezeptor ist dabei hauptsächlich

in ER-Zisternen angereichert (Mavlyutov *et al.*, 2010). Pharmakologische oder genetische Inaktivierung des Sigma-1-Rezeptors in Mäusen führen zur Degeneration von axonalen Motoneuronen, was verbunden war mit Beeinträchtigungen in der Struktur der MAM, Veränderungen im intrazellulären Calcium-Signaling, ER-Stress und einer veränderten Dynamik der Mitochondrien (Bernard-Marissal *et al.*, 2015). In einer Studie wurde gezeigt, dass der Sigma-1-Rezeptor ein potentiell Target für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen sein könnte. Dabei führte ein Sigma-1-Knockout in ALS-Mäusen (SOD1-Mäuse) zu einer reduzierten Überlebensrate der Mäuse und zu einer erhöhten Erregbarkeit von Motoneuronen, was zuvor als Anzeichen von ALS in Motoneuronen von Mäusen beschrieben wurde (Kuo *et al.*, 2004; Mavlyutov *et al.*, 2013). Der Sigma-1-Rezeptor wurde zudem in diversen Studien als neuroprotektiv beschrieben. Behandlung mit Sigma-1-Rezeptor Agonisten führten zu einer Reduktion von β -Amyloid Peptiden in Mäusen und zu einer verbesserten Funktion sowie verlängerten Überlebensrate von Motoneuronen in ALS-Mäusen (Maurice *et al.*, 1998; Meunier *et al.*, 2006; Mancuso *et al.*, 2012).

1.2 Proteinaggregation

1.2.1 Die Bildung von Proteinaggregaten im zellulären System

Proteinaggregation entsteht durch den Verlust der Aufrechterhaltung der Proteostase und wird häufig durch das Alter der Zellen beeinflusst (Wolff und Dillin, 2006; Taylor und Dillin, 2011; Cohen *et al.*, 2006). Das endoplasmatische Retikulum spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Proteostase einer Zelle, da hier hauptsächlich die Synthese, die korrekte Faltung und Assemblierung von Proteinen stattfinden (Li und Sun, 2021). Agonisten des ATF6 Signalweges führten zum Beispiel zu einer Reduktion von cytosolischen Proteinaggregaten (Plate *et al.*, 2016). Um die Proteostase aufrechtzuerhalten, besitzt das ER ein Qualitätskontrollsystem bestehend aus Chaperon-Proteinen und Signalwegen, wie der *Unfolded Protein Response*, dem ERAD-System und ER-Phagie (Abbildung 1.5; Araki und Nagata, 2011). Aufgrund von genetischen Anomalien, fehlerhafter Proteinfaltung oder posttranslationalen Modifikationen sowie Defekten in der Protein-Qualitätskontrolle kommt es zur Anreicherung von toxischen Proteinaggregaten (Needham *et al.*, 2019). Die gebildeten Proteinaggregate führen unter anderem zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und zu Beeinträchtigungen der Calcium Homöostase, der Proteinbiosynthese sowie der Funktion von Lysosomen. Zudem können Schäden an Membransystemen sowie DNA-Schäden entstehen (Wen *et al.*, 2023).

Chaperon-Proteine im endoplasmatischen Retikulum helfen neu synthetisierten Proteinen bei der Proteinfaltung in ihre native Konformation (Whittemore *et al.*, 2022). Zudem werden sie durch posttranslationalen Modifikationen reguliert (Cloutier und Coloumbe, 2013). Zu den wichtigsten ER-Chaperonen zählen Calnexin und Calreticulin, aber auch *Binding immunoglobulin protein* (Bip/Grp78) und der Sigma-1-Rezeptor, welche vom ER zum Nukleus translozieren können (Liu *et al.*, 2023; Hayashi und Su, 2007; Schürch *et al.*, 2022; Bloemeke *et al.*, 2022; Mavlyutov und Ruoho *et al.*, 2007).

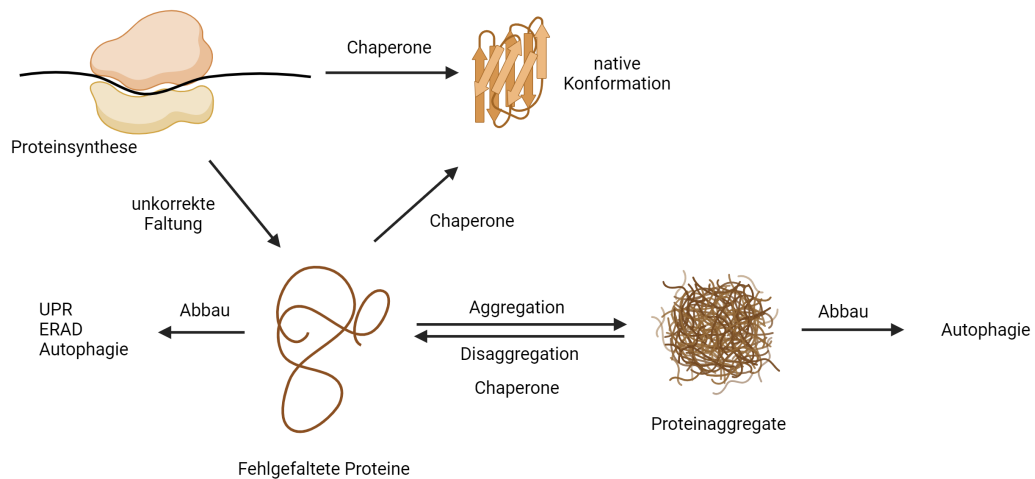


Abbildung 1.5: Bildung von Proteinaggregaten und Verlust der Proteostase. Nach der Synthese von Proteinen müssen diese in ihre funktionale native Konformation gefaltet werden. Für die korrekte Faltung sind Chaperone verantwortlich. Durch unkorrekte Faltung entstehen fehlgefaltete Proteine, die wiederum über Chaperone in ihre native Konformation gefaltet werden können. Die Zelle besitzt Qualitätskontrollsysteme, die dem Abbau von fehlgefalteten Proteinen dienen. Dazu gehören UPR, ERAD und Autophagie. Fehlgefaltete Proteine können aber auch Proteinaggregate bilden, die aufgrund ihrer Größe nur über Autophagie abgebaut werden können (Whittemore, *et al.* 2022). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Fehlgefaltete Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum von den drei Stress-Sensoren, *Inositol-requiring protein 1 α* (IRE1 α), *Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase* (PERK) und *Activating transcription factor 6* (ATF6) erkannt (Abbildung 1.6; Schröder und Kaufmann, 2005; Taylor und Dillin, 2011). Durch die damit verbundene Aktivierung der *Unfolded Protein Response* kommt es zur Expression von Genen, die maßgeblich an der Faltung und dem Abbau von Proteinen, dem Metabolismus von Aminosäuren, Autophagie, antioxidativen Prozessen, Calcium-Transport und *ER associated protein degradation* (ERAD) beteiligt sind. ER-Phagie und ERAD werden demnach durch UPR induziert (Li und Sun, 2021; Yang *et al.*, 2021; Hetz, 2012). Nährstoffmangel induziert Autophagie über den ATF4 Signalweg unabhängig von PERK und ER-Stress induziert Autophagie über den PERK/eIFP2 α /ATF4 Signalweg (B’chir *et al.*, 2013). Die Aktivierung der *Unfolded Protein Response* induziert die Transkription von Genen des ERAD-Systems (Travers *et al.*, 2000). Induktion von ER-Stress führte zur ATF4 vermittelten Induktion von ER-Phagie (Zielke *et al.*, 2021).

Der Prozess, der die Erkennung, die Retrotranslokation von Proteinen aus dem ER ins Cytosol, deren Ubiquitinierung und deren proteasomalen Abbau beschreibt, wird als ERAD bezeichnet. Viele Chaperone, insbesondere Bip/Grp78 und Proteindisulfidisomerasen (PDI), sind an der Assoziation von fehlgefalteten Proteinen an das ERAD System beteiligt (Needham *et al.*, 2019). Da der Transport von Proteinen über ein Translocon in der ER-Membran während der Retrotranslokation aufgrund der Proteingröße limitiert ist oder fehlgefaltete Proteine nicht immer entfaltet werden können, können nicht alle Proteine über das ERAD-System abgebaut werden. Solche Proteine oder geschädigte Teile des endoplasmatischen Retikulus können über ER-Phagie abgebaut werden. ER-Phagie wird über ER-Phagie Rezeptoren vermittelt, die spezifisch ER-Subdomänen mit LC3 oder GABARAP assoziieren (Li und Sun,

2021; Chino und Mizushima, 2020).

Der Sigma-1-Rezeptor moduliert die Regulation der UPR Sensorproteine. In Abhängigkeit von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien stabilisiert der Sigma-1-Rezeptor IRE1 α und unterstützt so den XBP1-Signalweg (Mori *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2017). Der Sigma-1-Rezeptor beeinflusst aber auch den PERK/eIFP2 α /ATF4 Signalweg. Überexpression des Sigma-1-Rezeptors inhibierte die Expression von p-PERK und die Expression des Sigma-1-Rezeptors wird über den PERK/eIFP2 α /ATF4 Signalweg durch ER-Stress induziert (Hayashi und Su, 2007; Mitsuda *et al.*, 2011). Der Sigma-1-Rezeptor Agonist (+)-Pentazocin reduzierte die Expression der UPR Sensorproteine PERK, IRE1 α , ATF6 und ATF4 nach oxidativem Stress (Ha *et al.*, 2011).

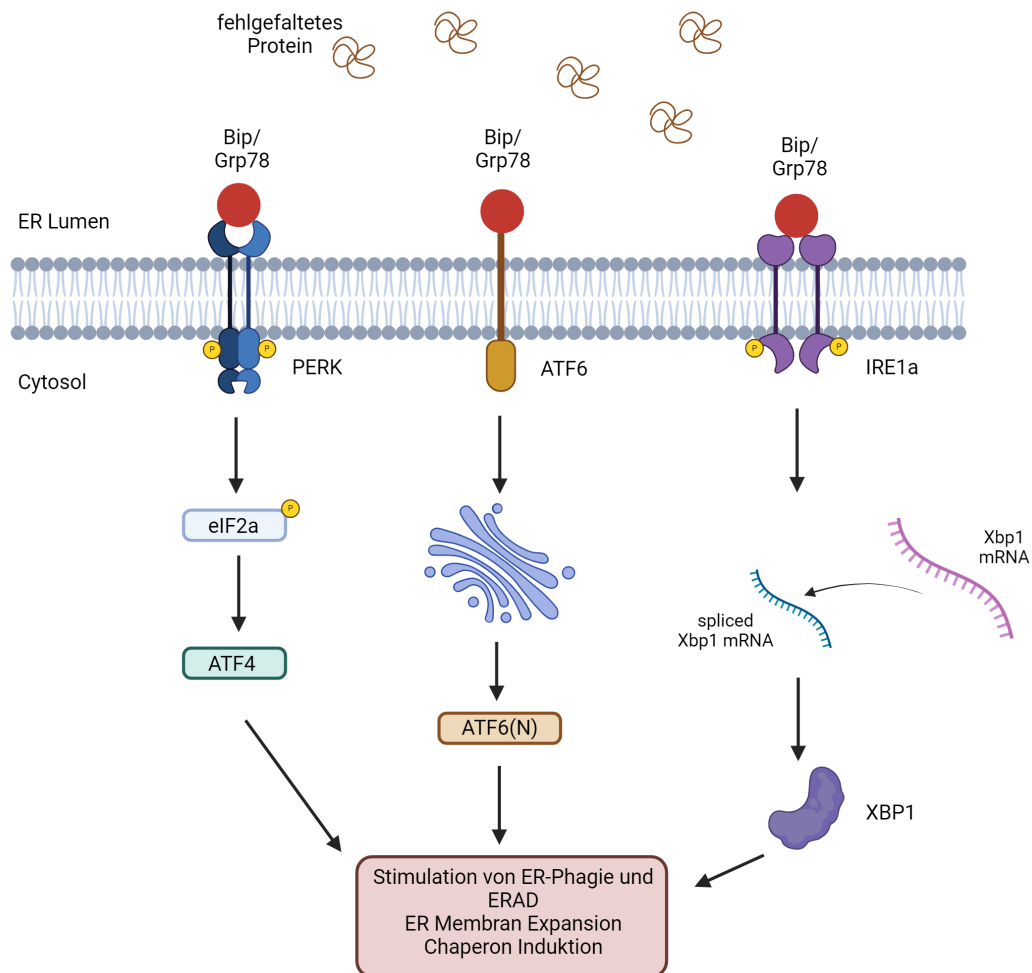


Abbildung 1.6: Regulation von ER-Phagie und ERAD durch UPR. Eine Anreicherung von fehlgefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum führt zur Induktion der ER-Stress Sensoren PERK, ATF6 und IRE1 α , welche zur UPR gehören, und zur Dissoziation der ER-Stress Sensoren von Bip/Grp78. PERK phosphoryliert daraufhin eIFP2 α , welches ATF4 induziert. ATF6 transloziert zum Golgi-Apparat und wird dort proteolytisch gespalten. IRE1 α induziert das *Splicing* der mRNA von XBP1. Durch die Induktion von ATF4 sowie die Bildung von ATF6(N) und XBP1 kommt es zur Stimulation von ER-Phagie, Chaperonen und ERAD, sowie der Expansion der ER Membran (Li und Sun, 2021). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Das Expressionslevel von der gespaltenen Form von ATF6 (ATF6(N)) konnte durch den Sigma-1-Rezeptor Antagonisten NE-100 in HT22-Zellen unter Tunicamycin induziertem ER-Stress gesteigert werden (Ono *et al.*, 2013). Zudem ist der Sigma-1-Rezeptor auch an der ERAD vermittelten Regulation des Abbaus von UDP-Galactose-Ceramid Galactosyltransferase beteiligt (Hayashi *et al.*, 2012).

1.2.2 α -Synuclein Aggregate

α -Synuclein hat ein Molekulargewicht von circa 14 kDa und besteht aus 140 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ist charakterisiert durch einen amphipatischen Lysin-reichen N-Terminus, der an der Membranbindung von α -Synuclein beteiligt ist (Lashuel *et al.*, 2015). α -Synuclein kommt in hohem Maße im Gehirn vor allem in präsynaptischen Bereichen vor (Goedert, 2001). Seine physiologische Rolle ist noch nicht genauer erforscht, wobei vermutet wird, dass α -Synuclein den SNARE-Komplex und damit die Ausschüttung von Neurotransmittern an der Synapse reguliert (Bendor *et al.*, 2013). Veränderungen im Gen für α -Synuclein, wie Triplikation oder die Mutanten A53T und A30P, sind mit der Akkumulation von α -Synuclein und einem erhöhten Risiko für Parkinson verknüpft (Singleton *et al.*, 2003; Jo *et al.*, 2002; Spira *et al.*, 2001).

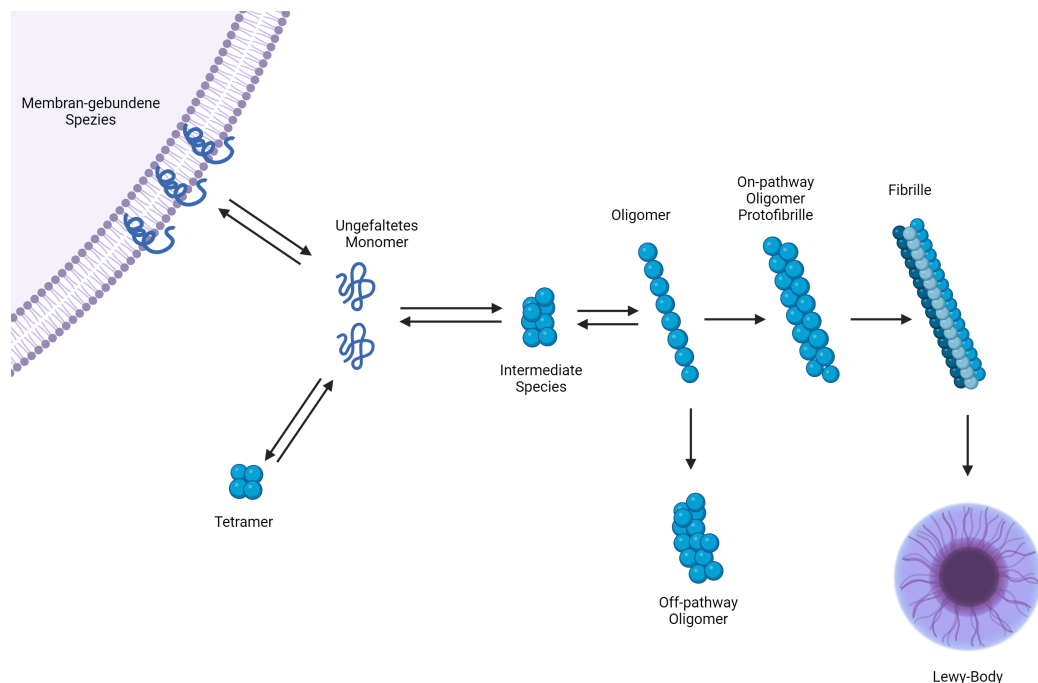


Abbildung 1.7: Bildung von α -Synuclein Aggregaten. α -Synuclein liegt in einem Gleichgewicht vor aus cytosolischer und membrangebundener Form. Störungen des Gleichgewichts, insbesondere durch den Verlust der Proteostase, führen zur Bildung von oligomeren Strukturen. Dabei können sich *on-pathway* Oligomere bilden, die Fibrillen und daraufhin *Lewy-Bodies* formen können oder *off-pathway* Oligomere. *off-pathway* Oligomere können keine Fibrillen und *Lewy-Bodies* formen (Du *et al.*, 2020; Burre *et al.*, 2015). Abbildung erstellt mit Biorender.com.

α -Synuclein liegt unter physiologischen Bedingungen als Monomer in einem Equilibrium zwischen cytosolischer und membrangebundener Form vor. Wenn das Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von α -Synuclein gestört ist, bilden sich aus den löslichen Monomeren α -Synuclein Oligomere, die zu Vorläufer-Fibrillen und anschließend zu Fibrillen aggregieren können. Aus den Fibrillen werden wiederum *Lewy Bodies* gebildet, die bei Parkinson als pathologische Strukturen gelten (Abbildung 1.7; Du *et al.*, 2020; Burre *et al.*, 2015; Tofaris, 2022).

α -Synuclein wurde 1998 als Hauptkomponente von *Lewy Bodies* bei Parkinson identifiziert (Spillantini *et al.*, 1998). Die Struktur von *Lewy Bodies* wurde als Proteinkern beschrieben, der von Proteinfilamenten umgeben ist (Arima *et al.*, 1998; Goedert, 2015). Zudem sind auch weitere Proteine in die Bildung von *Lewy Bodies* involviert, insbesondere mitochondriale Proteine, Autophagie assoziierte Proteine und Proteine des Ubiquitin-Proteasom Systems (Wakabayashi *et al.*, 2012). Neuere Studien konnten zeigen, dass *Lewy-Bodies* nicht hauptsächlich aus Proteinen aufgebaut sind. Vielmehr bestanden die analysierten *Lewy-Bodies*, entnommen aus der *Substantia nigra* von Parkinson-Patienten, aus Lipiden, die mit Proteinen, Membranfragmenten, Vesikeln, Lysosomen und beschädigten Mitochondrien angereichert waren. Dies führte zu der Hypothese, dass überschüssiges α -Synuclein Membranen beschädigt und so die Bildung von Lipid-assoziierten *Lewy-Bodies* fördert (Shahmoradian *et al.*, 2019).

α -Synuclein Aggregate wirken zytotoxisch durch die Beeinträchtigung des mitochondrialen Komplexes I, was zur Bildung von mitochondrialen Lipid-Peroxiden führt (Ludtmann *et al.*, 2018). Zudem führt eine Anreicherung von α -Synuclein Aggregaten zu ER-Stress durch die Überforderung der Mechanismen des endoplasmatischen Retikulums für Protein-Faltung und Qualitätskontrolle (Colla *et al.*, 2012). Weitere zytotoxische Mechanismen von α -Synuclein Oligomeren liegen in der Inhibition der Proteasom-Aktivität, der SNARE-Komplex Bildung, der Freisetzung von Dopamin sowie der Störung der Funktion von Lysosomen (Du *et al.*, 2020). Weiterhin beeinflusst α -Synuclein auch den Lipid-Metabolismus und die Akkumulation von Lipid-Tröpfchen. Eine Überexpression von α -Synuclein fördert die Bildung von Triacylglyceriden und die Akkumulation von Lipid-Tröpfchen durch die Stimulierung der Acyl-CoA-Synthetase Aktivität (Alza *et al.*, 2019).

1.3 Autophagie in Säugetierzellen

Autophagie ist ein Prozess in der Zelle zur Degradation von Proteinen und Zellkomponenten (Yang und Klionsky, 2010). Daher steht Autophagie im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen, die vor allem Neurodegeneration, Krebs, die Leber, das Herz, Infektionskrankheiten und Alterungsprozesse betreffen (Mizushima *et al.*, 2008). In Säugetierzellen gibt es drei Arten von Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon vermittelte Autophagie (Parzych *et al.*, 2014; Grasso *et al.*, 2018; Galluzzi *et al.*, 2017). Bei der Makroautophagie werden die Zielkomponenten in Vesikel eingeschlossen, die als Autophagosomen bezeichnet werden, und mit Lysosomen fusioniert, während bei der Mikroautophagie Einstülpungen in der Membran der Lysosomen genutzt werden, um Zielkomponenten aufzunehmen (Yang und Klionsky, 2010; Marzella *et al.*, 1981; Sahu *et al.*, 2011). Chaperon

vermittelte Autophagie nutzt Chaperone um Zielkomponenten zu identifizieren. Die Zielproteine werden entfaltet und direkt über die Membran der Lysosomen transportiert (Kaushik und Cuervo, 2012). Da für die folgende Arbeit vor allem die Makroautophagie von Bedeutung ist, wird im Folgenden ausschließlich auf diese näher eingegangen.

Makroautophagie, im Weiteren als Autophagie bezeichnet, dient vor allem der Degradation von Zellorganellen, Proteinaggregaten und Pathogenen Partikeln und wird hauptsächlich durch Proteine der ATG-Familie reguliert, *Autophagy related genes* (Bento *et al.*, 2016). Dabei kommt es zur *de-novo* Synthese eines Phagophors im Cytosol, welches die Zielkomponenten aufnimmt. Das Phagophor besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht (Yorimitsu und Klionsky, 2005). Woher die dafür notwendigen Phospholipide stammen ist nicht eindeutig geklärt, mögliche Quellen könnten das ER, die Mitochondrien, der Golgi-Apparat, die Endosomen aber auch Lipid-Tröpfchen sein (Biazik *et al.*, 2015; Dupont *et al.*, 2014; Yla-Anttila *et al.*, 2009). Ein Phagophor kann dabei mehrere Membranquellen besitzen, wobei immer Kontakt zum ER besteht (Biazik *et al.*, 2015). Für die Bildung des Phagophor ist ein Initiationskomplex aus ULK1/2, ATG13, FIP200 und ATG101 verantwortlich, der assoziiert ist mit MTORC1, mTOR-Komplex 1 (Mercer *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2015). Unter Nährstoffmangel dissoziiert der Initiationskomplex von MTORC1 und es kommt zur Initiation der Phagophor-Bildung (Abbildung 1.8; Hosokawa *et al.*, 2009).

Die Aktivität von ULK1 phosphoryliert Beclin 1, welches Teil des Klasse III PI3K Komplexes 1 ist, mit den zusätzlichen Proteinkomponenten PIK3C3/VPS34 (Phosphatidylinositol-PI3-kinase catalytic subunit 3), VPS15, Beclin1 und ATG14 und aktiviert die VPS34 Kinase Aktivität (Russell *et al.*, 2013). Der Komplex ist an der Bildung der Autophagosomen beteiligt und produziert Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) an der Phagophor-Membran (Petiot *et al.*, 2000). Dadurch können PI3P bindende Proteine wie WIPI1/2 an die Membran rekrutiert werden (Polson *et al.*, 2010; Koyoma-Honda *et al.*, 2013). WIPI2 rekrutiert ATG16L1, welches in einem Komplex mit ATG5 und ATG12 vorliegt (Dooley *et al.*, 2015; Fujita *et al.*, 2008). Der ATG16L1-ATG5-ATG12 Komplex vermittelt die Rekrutierung von LC3-I an die Phagophor-Membran und das Konjugat aus ATG5 und ATG12 besitzt zudem eine $\epsilon 3$ ähnliche Enzymaktivität, um LC3-I an Phosphatidylethanolamin zu konjugieren, welches in seiner lipidierten Form als LC3-II bezeichnet wird (Hanada *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2008). LC3 wird dabei durch ein Ubiquitin ähnliches Konjugationssystem aktiviert, welches dadurch die Lipidierung von LC3 reguliert (Fujita *et al.*, 2008; Ichimura *et al.*, 2000). Die ATG8 Proteine, insbesondere LC3, sind an der Expansion des Phagophors beteiligt (Xie *et al.*, 2008; Weidberg *et al.*, 2010). GABARAP ist vermutlich an der Membranschließung des Phagophors beteiligt (Weidberg *et al.*, 2010). Für die Membranschließung des Phagophors zum Autophagosom sind zudem ATG2A und ATG2B verantwortlich (Velikkakath *et al.*, 2012) ATG2A wird vermutlich von WIPI1 an die Phagophor-Membran rekrutiert (Itakura und Mizushima, 2010).

Nach der Elongation und Reifung der Autophagosomen erfolgt die Fusion mit den Lysosomen. Es wird vermutet, dass der Prozess zum einen durch den Klasse III PI3K Komplex 2 reguliert wird, der statt ATG14 das Protein UVRAG enthält (Bento *et al.*, 2016; Liang *et*

al., 2008). Die Fusion von Lysosomen oder Endosomen mit Autophagosomen wird aber auch durch SNARE-Proteine reguliert, insbesondere VAMP3, VAMP7 und VAMP8 (Fader *et al.*, 2009; Furuta *et al.*, 2010). Syntaxin 17 wurde als SNARE Protein auf Autophagosomen identifiziert und steht zudem im Verdacht mit dem Sigma-1-Rezeptor zu interagieren, welcher an der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen beteiligt sein soll (Itakura *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019). Auch ATG14 ist an der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen beteiligt und interagiert dabei mit Syntaxin 17 und SNAP29 (Diao *et al.*, 2015).

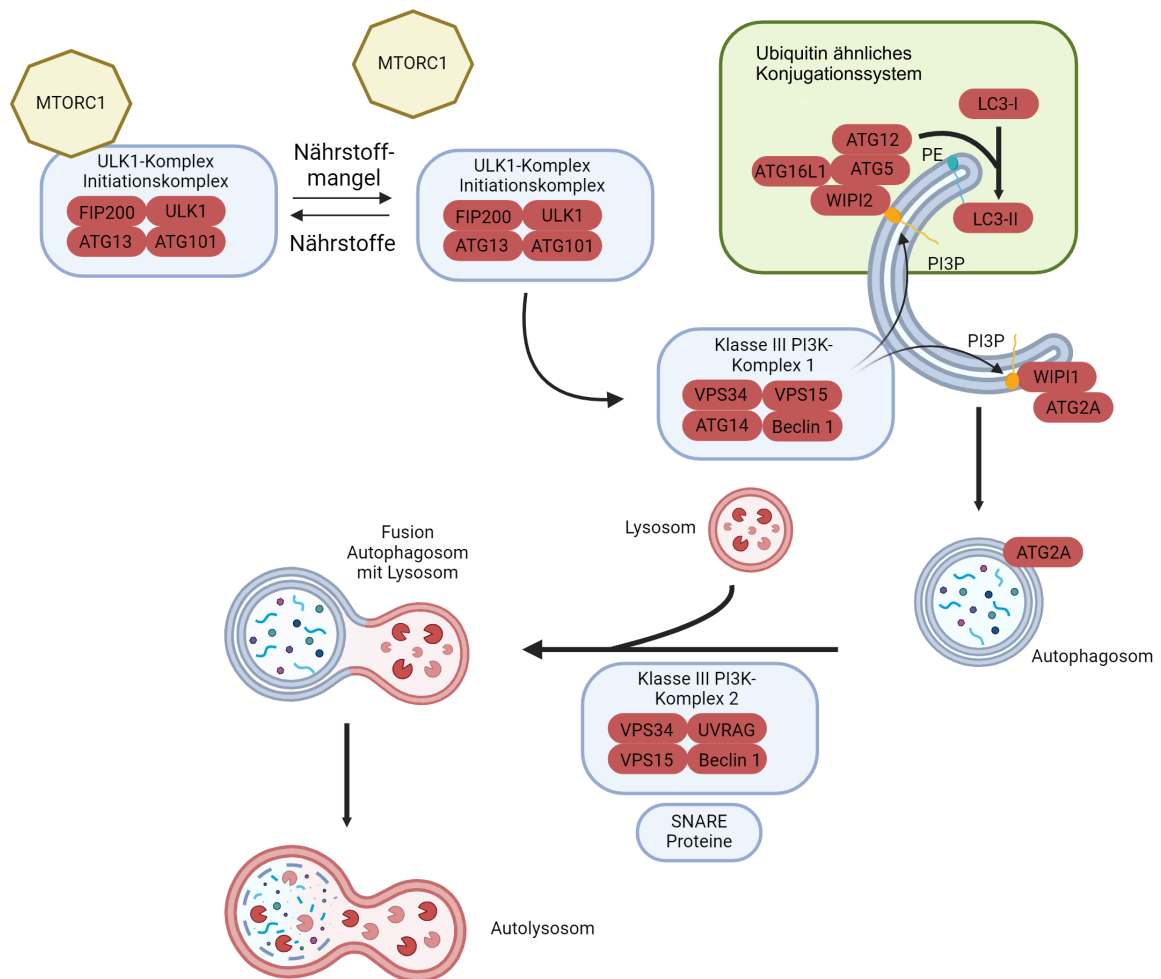


Abbildung 1.8: Autophagie in Säugetierzellen. Autophagie in Säugetierzellen wird reguliert durch den MTORC1-Komplex und den ULK1-Komplex, die zunächst assoziiert in der Zelle vorliegen. Durch Nährstoffmangel kommt es zur Dissoziation der beiden Komplexe und zur Initiation der Phagophor-Bildung, welches die Cargo-Moleküle einschließt. Der ULK1-Komplex rekrutiert den Klasse III-PI3K-Komplex 1, welcher PI3P in der Phagophor-Membran synthetisiert. Durch die Bildung von PI3P können PI3P bindende Proteine an das Phagophor rekrutiert werden, wie WIPI1/2. WIPI2 rekrutiert einen Komplex aus ATG16L1, ATG5 und ATG12, der an der Bindung von LC3-I an Phosphatidylethanolamin (PE) beteiligt ist. Lipidiertes LC3-I (LC3-II) fördert die Expansion des Phagophors. WIPI1 rekrutiert ATG2A, welches die Membran des Phagophor schließt. Für die Fusion des Phagophor mit Lysosomen sind vermutlich SNARE-Proteine und der Klasse III-PI3K Komplex 2 verantwortlich. Nach der Fusion von Autophagosom mit Lysosom bildet sich ein Autolysosom und es kommt zum lysosomalen Abbau der Cargo-Moleküle (Bento *et al.*, 2014; Parzych *et al.*, 2014). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Die Regulation der Autophagie erfolgt hauptsächlich über die Proteine mTOR und AMPK (Kim *et al.*, 2011). AMPK wird durch AMP aktiviert und führt zu einer Aktivierung der Autophagie über Phosphorylierung von Ulk1 (Xiao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011). Eine Aktivierung von AMPK führt weiterhin zu einer Inhibition von mTOR, welches durch ein niedriges Verhältnis von AMP zu ATP aktiviert wird und die Autophagie hemmt (Kim *et al.*, 2011; Gwinn *et al.*, 2008; Hahn-Windgassen *et al.*; 2005).

1.4 Lipidtröpfchen und Lipid-Metabolismus

1.4.1 Aufbau und Biogenese von Lipid-Tröpfchen

Lipid-Tröpfchen dienen der Speicherung von Lipiden und Cholesterin und sind daher essenziell für den Lipid-Metabolismus von Zellen (Walter und Farese, 2009; Walther *et al.*, 2017). Sie bestehen aus einem Kern, der gefüllt ist mit neutralen Lipiden, wie Triacylglyceriden und Cholesterinestern (Fujimoto und Parton, 2011; Czabany *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009). Lipidomics-Analysen von Lipid-Tröpfchen in kortikalen Neuronen aus Mäusen zeigten vor allem eine Erhöhung von Triacylglyceriden in Lipid-Tröpfchen im Vergleich zum Gesamtlisat der Neuronen (Kumar *et al.*, 2023). Mittels Raman-Spektroskopie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Lipid-Tröpfchen vor allem aus Triacylglyceriden und Cholesterinestern bestehen (Samuel *et al.*, 2020). Der neutrale Kern der Lipid-Tröpfchen ist umgeben von einer Phospholipid-Einzelschicht (Abbildung 1.9; Tauchi-Sato *et al.*, 2002).

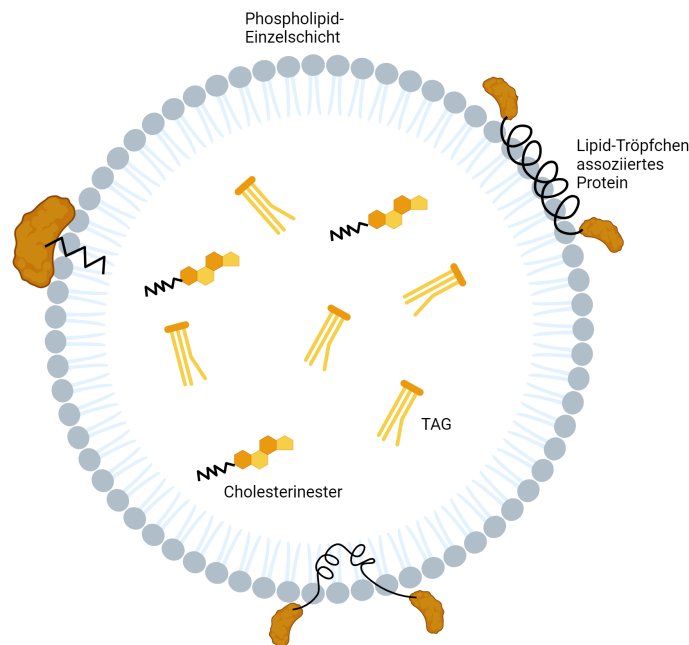


Abbildung 1.9: Aufbau eines Lipid-Tröpfchens, bestehend aus einem lipophilen Kern gefüllt mit TAG und Cholesterinestern umgeben von einer Phospholipideinzelschicht, die mit spezifischen Proteinen assoziiert ist. Dazu gehören Proteine mit amphipatischen Helices, *Hairpin*-Strukturen und Fettsäuremodifikationen (Olzmann und Carvalho, 2019). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Aufgrund der Phospholipid-Monolayer können nur spezielle Proteine mit der Membran von Lipid-Tröpfchen assoziieren. Dazu gehören Proteine mit hydrophoben *Hairpin*-Bereichen, amphipatischen Helices und Fettsäuremodifikationen (Hodges und Wu, 2010; Walter und Farese, 2012). Die mit Lipid-Tröpfchen assoziierten Proteine werden im Allgemeinen in zwei Gruppen aufgeteilt: Klasse-1 und Klasse-2 Proteine. Während Klasse-1 Proteine zwischen dem ER und Lipid-Tröpfchen diffundieren, werden Klasse-2 Proteine direkt aus dem Cytosol zu den Lipid-Tröpfchen rekrutiert (Olzmann und Carvalho, 2019; Olarte *et al.*, 2021).

Die Synthese von Lipid-Tröpfchen beginnt mit der Synthese von Triacylglyceriden, deren biochemische Reaktionen das erste Mal 1960 beschrieben wurden (Abbildung 1.10; Weiss *et al.*, 1960). Die Enzyme der Triacylglycerid-Synthese befinden sich vorwiegend am ER (Kumari *et al.*, 2023; Buhman *et al.*, 2001). Glycerol-3-Phosphat wird dabei durch Bindung einer aktivierten Fettsäure mittels Glycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase 3 (GPAT3) zunächst zu Lysophosphatidsäure (LPA) umgewandelt (Sukumaran *et al.*, 2009). LPA wird durch Bindung einer weiteren aktivierten Fettsäure mittels des Enzyms Acylglycerin-3-phosphat-O-Acyltransferase (AGPAT) zu Phosphatidsäure umgesetzt, die durch Abspaltung eines Phosphatrests mit Hilfe von Phosphatidat-Phosphatase (PAP) zu Diacylglycerid umgewandelt wird (Eberhardt *et al.*, 1999; Hooks *et al.*, 1998). DGAT1/2 katalysieren den letzten Schritt der TAG-Synthese, die Bildung von Triacylglyceriden aus Diacylglyceriden (Cases *et al.*, 1998; Cases *et al.*, 2001). DGAT2 interagiert zudem mit MGAT2, um Monoacylglycerid-abhängige DAG in Triacylglyceride umzusetzen (Jin *et al.*, 2014). Auch die Bildung von Cholesterinestern fördert die Biogenese von Lipid-Tröpfchen am endoplasmatischen Retikulum. Für die Veresterung von Cholesterin sind die Enzyme ACAT1/2 (Acyl-CoA:Cholesterin-O-Acyltransferase) verantwortlich, welche aktivierte Fettsäuren an Cholesterin binden (Chang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1993).

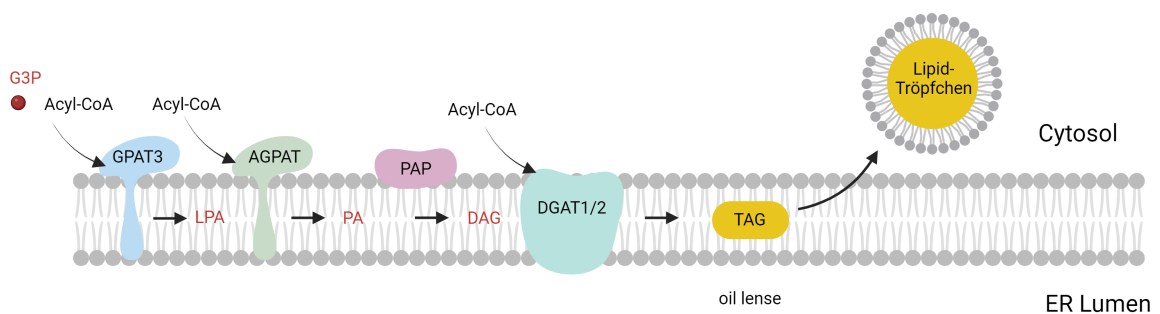


Abbildung 1.10: Biogenese der Lipid-Tröpfchen. Die Biogenese der Lipid-Tröpfchen beginnt mit der Bildung von Triacylglyceriden. Durch die Anreicherung von TAG in der Membran des ER bildet sich eine *oil lense*, die durch weitere Expansion als Lipid-Tröpfchen ins Cytosol abgespalten werden kann. Die Synthese der TAG beginnt mit G3P, welches durch GPAT3 zu Lysophosphatidsäure (LPA) umgewandelt wird. LPA wird durch AGPAT zu Phosphatidsäure (PA), welche durch PAP zu Diacylglycerid (DAG) umgesetzt wird. Durch DGAT1/2 werden die Diacylglyceride zu Triacylglyceriden umgewandelt (Jarc und Petan, 2019). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Einige Studien belegen die Bildung von einer Triacylglycerid *oil lense* in Vesikeln und Membranen (Hamilton *et al.*, 1983; Hamilton und Small, 1981). Gesteigerte Konzentrationen an Triacylglyceriden in multilamellaren Vesikeln führten zudem zur Bildung von *oil domains*

(Duelund *et al.*, 2013). Die Bildung von einer TAG *oil lense* findet an tubulären Strukturen des ER statt (Kassan *et al.*, 2013; Jacquier *et al.*, 2011). Akkumulation von Triacylglyceriden in der ER-Membran führt zur Bildung von Lipid-Tröpfchen, welche am ER residieren oder ins Cytosol abgespalten werden können (Jacquier *et al.*, 2011; Wilfling *et al.*, 2013).

1.4.2 Der Metabolismus von Lipid-Tröpfchen in der Zelle

Lipid-Tröpfchen unterliegen einem Zyklus von Biogenese, Expansion durch erneute Veresterung von freien Fettsäuren und Abbau durch Lipolyse oder Autophagie (Abbildung 1.11; Walter und Farese, 2012; Welte und Gould, 2017; Khor *et al.*, 2013). Die Synthese der Lipid-Tröpfchen findet dabei am ER statt und beginnt mit der Synthese von Triacylglyceriden (Murphy und Vance, 1999; Brasaemle *et al.*, 1997; Blanchette-Mackie *et al.*, 1995). Nach der Synthese am ER können Lipid-Tröpfchen vom ER zum Cytosol abgespalten werden. Der Prozess wird vor allem durch *fat storage-inducing transmembrane proteins* (FIT) und Seipin reguliert (Choudhary *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2022). Viele Lipid-Tröpfchen bleiben auch mit dem ER in Kontakt um den Transport von Proteinen und Lipiden zwischen dem ER und Lipid-Tröpfchen selbst zu ermöglichen. Der Kontakt zwischen Lipid-Tröpfchen und dem ER wird durch Seipin reguliert (Jacquier *et al.*, 2011; Salo *et al.*, 2016). Die Proteine der Triacylglycerid-Synthese befinden sich nicht nur am ER, sondern wurden in Zellen auch auf Lipid-Tröpfchen nachgewiesen. Dabei wurden GPAT4, GPAT3, ACSL1 und ACSL3 auf Lipid-Tröpfchen gefunden. Die Lokalisation von GPAT4 auf Lipid-Tröpfchen ist zudem verantwortlich für die Bildung von großen Lipid-Tröpfchen (Wilfling *et al.*, 2013). Große Lipid-Tröpfchen können auch durch die Fusion von Lipid-Tröpfchen miteinander entstehen (Murphy *et al.*, 2010).

Lipid-Tröpfchen stehen zudem in Kontakt zu Mitochondrien, um Fettsäuren für die β -Oxidation bereitzustellen. Die Assoziation von Lipid-Tröpfchen mit Mitochondrien wird durch Perilipin 5 induziert (Li *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Barbosa und Siniossoglou, 2017). Perilipin 5 stabilisiert dabei die Lipid-Tröpfchen und fördert zunächst die Speicherung von freien Fettsäuren in Lipid-Tröpfchen. Stimulation von Zellen mit Forskolin, welches die Adenylatcyclase aktivierte, führte zu einer Freisetzung von freien Fettsäuren zu Mitochondrien und einer gesteigerten β -Oxidation (Wang *et al.*, 2011). Knockout von Perilipin 5 führte zudem zu einer gesteigerten Oxidation von Ölsäure (Li *et al.*, 2012). Die Isolation von Lipid-Tröpfchen assoziierten Mitochondrien (LDM) und cytosolischen Mitochondrien (CM) aus der Leber von Ratten zeigte für LDM eine höhere Rate für die Oxidation von Fettsäuren, während für CM bei Anwesenheit von Glutamat und Succinat eine gesteigerte CO_2 Rate nachgewiesen wurde. (Talari *et al.*, 2023). Isolation von Lipid-Tröpfchen assoziierten Mitochondrien aus plurivakuolärem Fettgewebe von Mäusen zeigte, dass LDM im Vergleich zu CM eine reduzierte β -Oxidation aufwies. Der Kontakt von Lipid-Tröpfchen zu Mitochondrien konnte zudem durch eine thermische Induktion der β -Oxidation reduziert werden und die Assoziation von Mitochondrien mit Lipid-Tröpfchen durch eine Überexpression von Perilipin 5 förderte die Synthese von Triacylglyceriden. Der Kontakt von Lipid-Tröpfchen zu Mitochondrien diente hier dazu das von den Mitochondrien bereitgestellte ATP für die Synthese von Triacylglyceriden zu nutzen (Benador *et al.*, 2018).

Der Abbau von Lipid-Tröpfchen erfolgt über Lipolyse oder Lipophagie (Welte und Gould, 2017). Lipolyse wird durch PLIN1 reguliert, welches mit Lipasen wie HSL oder Coaktivatoren von Lipasen, insbesondere CGI-58 als Coaktivator von ATGL, interagiert (Yang *et al.*, 2013). Der erste Schritt der Lipophagie beginnt mit dem Abbau der LD assoziierten Perilipine, insbesondere Perilipin 2/3 durch Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA). Eine Blockade der Chaperon vermittelten Autophagie führte zu einer reduzierten Assoziation von ATGL und Lipophagie beteiligten Proteinen mit Lipid-Tröpfchen und damit verbunden zu einer Akkumulation von Lipid-Tröpfchen (Kaushik und Cuervo, 2015).

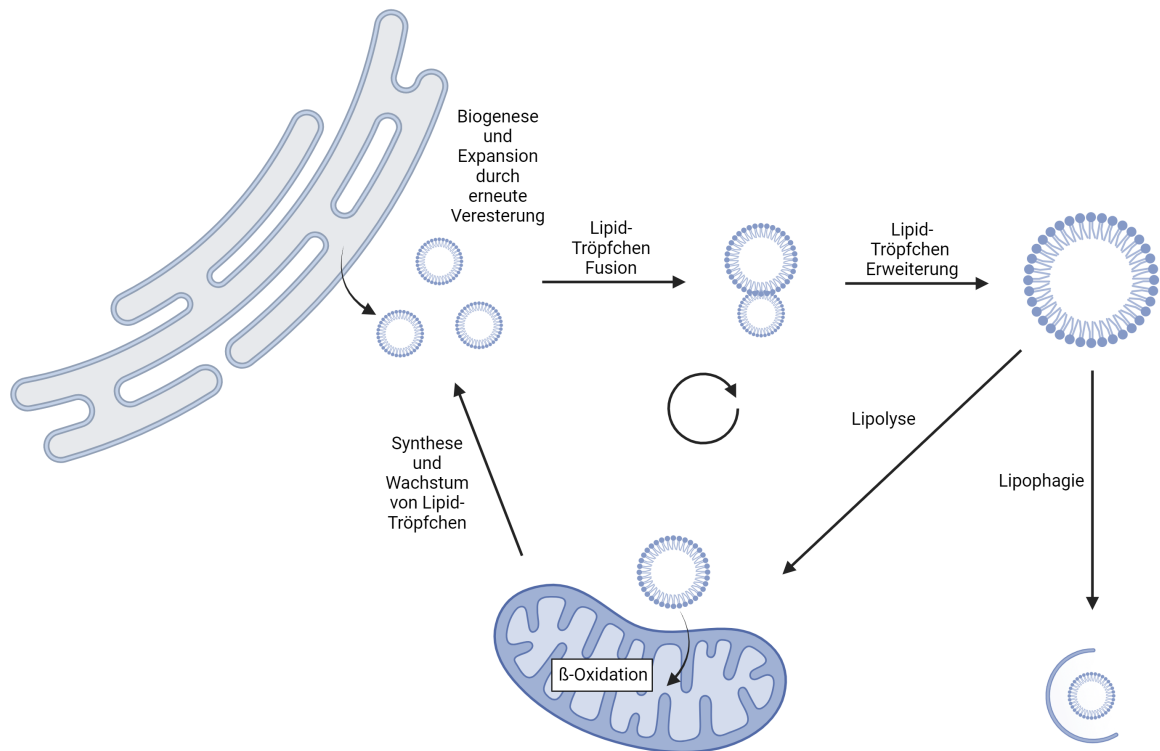


Abbildung 1.11: Metabolismus von Lipid-Tröpfchen. Lipid-Tröpfchen werden am ER synthetisiert und können durch Fusion miteinander Lipid-Tröpfchen expandieren. Lipid-Tröpfchen können über Lipophagie und Lipolyse abgebaut werden. Sie unterliegen einem Zyklus aus Lipolyse, wobei sie mit Mitochondrien assoziieren, um Lipide für die β -Oxidation bereitzustellen, und Expansion am ER (Khor *et al.*, 2013). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

1.4.3 Funktionen von Lipid-Tröpfchen im zellulären System

Die primäre Aufgabe von Lipid-Tröpfchen ist die Mobilisierung von Fettsäuren durch Lipolyse oder Lipophagie (Autophagie von Lipid-Tröpfchen) als Energielieferant für die Biogenese von Membranen und Signalmolekülen (Jarc und Petan, 2019). Lipid-Tröpfchen schützen die Zelle zudem auch vor Lipotoxizität, indem sie überschüssige freie Fettsäuren aufnehmen. (Nguyen und Olzmann, 2017).

Vor allem während Nährstoffmangel induzierter Autophagie werden freie Fettsäuren durch den Abbau von Membranen aus Zellorganellen freigesetzt (Rambold *et al.*, 2015). Während Nährstoffmangel wird der Metabolismus von Zellen umgestellt von der Energiegewinnung durch Glykolyse zum Abbau von Fettsäuren über die β -Oxidation in den Mitochondrien

(Finn und Dice, 2006). Überschüssige freigesetzte freie Fettsäuren aus abgebauten Membranen werden während erhöhter autophagischer Aktivität in neuen Lipid-Tröpfchen gespeichert (Rambold *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2017). Die dabei geformten Lipid-Tröpfchen stehen in Kontakt zu Mitochondrien, um den Transport von freien Fettsäuren zu fördern und diese so vor Schäden zu schützen (Nguyen *et al.*, 2017). Der letzte Schritt in der Synthese von Triacylglyceriden wird durch die Enzyme DGAT1 und DGAT2 bestimmt. Unter Nährstoffmangel ist eine Inhibition von DGAT1 ausreichend, um die Biogenese der Lipid-Tröpfchen zu hemmen. Eine Inhibition von DGAT1 unter Nährstoffmangel führt zudem zur Anreicherung von Acylcarnitin, was zu einer veränderten Funktion der Mitochondrien führt, insbesondere der Umsetzungsrate von Sauerstoff und des Membranpotenzials der Mitochondrien. Die Biogenese von Lipid-Tröpfchen unter Nährstoffmangel zum Schutz der Zelle vor Lipotoxizität ist demnach DGAT1 abhängig (Nguyen *et al.*, 2017). In Kardiomyozyten konnte eine Palmitinsäure induzierte Lipotoxizität durch eine gesteigerte Biogenese von Lipid-Tröpfchen mittels Überexpression von PPAR γ reduziert werden (Bosma *et al.*, 2014).

Lipid-Tröpfchen akkumulieren in Folge von Behandlungen von Zellen mit ER-Stressoren, was vermuten lässt, dass Lipid-Tröpfchen induziert werden, um ER Stress zu reduzieren (Lee *et al.*, 2012; Fei *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2012). Behandlung mit Thapsigargin und Tunicamycin in Krebszellen führte zu einer Akkumulation von Lipid-Tröpfchen (Lee *et al.*, 2012). Knockout von ATGL in Mäusen und Krebszellen führte zu einer Reduktion des ER-Stress nach der Behandlung mit Tunicamycin (Fuchs *et al.*, 2012). Komplexierung von freien Fettsäuren in Lipid-Tröpfchen konnte ER-Stress reduzieren (Bosma *et al.*, 2014; Chitraju *et al.*, 2017). Lipid-Tröpfchen können zudem auch Proteinaggregate komplexieren, um ihren Abbau über Lipophagie zu ermöglichen (Long *et al.*, 2022). Eine weitere Hypothese ist, dass Lipid-Tröpfchen fehlgefaltete Proteine bis zur Faltung in ihre native Konformation speichern. Eine Proteomics-Analyse von Lipid-Tröpfchen aus *Drosophila* Fliegen konnte zeigen, dass Proteine auf Lipid-Tröpfchen gespeichert werden können (Cermelli *et al.*, 2006). Nach Hitzestimulation transloziert das Chaperon Hsp70 zu Lipid-Tröpfchen, um dort eventuell die korrekte Faltung von fehlgefalteten Proteinen zu ermöglichen (Jiang *et al.*, 2007). Lipid-Tröpfchen sind zudem am Abbau von Apolipoprotein B über Autophagie und das Proteasom beteiligt (Ohsaki *et al.*, 2006). Auch die Retrotranslokation von ER-residenten Proteinen, wie zum Beispiel der HMG-CoA Reduktase, wird durch Lipid-Tröpfchen vermittelt (Hartman *et al.*, 2010; Olzmann *et al.*, 2013).

Eicosanoide, wie Prostaglandine, Leukotriene und Lipoxin sind Signalmoleküle, die aus Arachidonsäure gebildet werden und vor allem bei Immunreaktionen eine Rolle spielen (Yaqoob, 2003). Lipid-Tröpfchen können Arachidonsäure in Form von Triacylglyceriden speichern und für die Synthese von Eicosanoiden und Prostaglandinen zur Verfügung stellen (Dvorak *et al.*, 1983; Weller *et al.*, 1989; Bozza *et al.*, 1997; Accioly *et al.*, 2008). Eine gestörte Lipolyse in Neutrophilen führte zu einer reduzierten Freisetzung an Arachidonsäure (Schlager *et al.*, 2015).

1.4.4 Lipid-Tröpfchen im Hinblick auf neurodegenerativen Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, zeigen Veränderungen im Lipid Metabolismus (Farmer *et al.*, 2020; Hamilton *et al.*, 2007). Das Gehirn besitzt neben dem Fettgewebe den höchsten Anteil an Lipiden mit bis zu 50% seines Trockengewichts und speichert bis zu 20% des körpereigenen Cholesterins (Morell und Toews, 1996; Björkhem und Meany, 2004). Veränderungen in der Lipid-Zusammensetzung in Zellen des Zentralnervensystems beeinflussen die Funktion der Zelle, insbesondere die Bildung von synaptischen Vesikeln, die durch eine Vielzahl von Lipid-bindenden Proteinen reguliert wird (Puchkov und Haucke, 2013).

Die bei Parkinson gebildeten pathologischen Strukturen, *Lewy Bodies*, bestehen aus Lipiden, Zellorganellen und Proteinen, insbesondere α -Synuclein (Shahmoradian *et al.*, 2019; Spillantini *et al.*, 1998). α -Synuclein akkumuliert auch auf Lipid-Tröpfchen und reduziert dort die Lipolyse der Lipid-Tröpfchen (Cole *et al.*, 2002). Die Mutanten A30P und A53T zeigten eine reduzierte Lipolyse in neuronalen Zellen im Vergleich zum Wildtyp α -Synuclein (Cole *et al.*, 2002). In Hefen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von α -Synuclein WT und der Mutante A53T, nicht aber eine Überexpression der Mutante A30P zu einer Akkumulation von Lipid-Tröpfchen führte (Outeiro und Lindquist, 2003). Weitere Analysen in Hefen zeigten zudem, dass vor allem Gene, die am Lipid Metabolismus und vesikulären Transport beteiligt sind, einen großen Effekt auf die Bildung von toxischen α -Synuclein Aggregaten haben (Scherzer und Feany, 2004).

In Mausmodellen für Alzheimer konnte in Ependymzellen eine Akkumulation von neutralen Lipiden festgestellt werden, die sich auf die Proliferation von neuronalen Stammzellen auswirkt. Die neutralen Lipide wurden mittels Massenspektrometrie als Ölsäure angereicherte Triglyceride identifiziert (Hamilton *et al.*, 2015). In myeloiden Zellen aus Gehirnen von Alzheimer Patienten wurde ebenfalls eine Akkumulation von Lipid-Tröpfchen und zusätzlich eine Erhöhung des Proteins Diaphanus 1 (DIAPH1) festgestellt, welches an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist. Eine Korrelation zwischen Lipid-Tröpfchen Akkumulation und entzündlichen Reaktionen lässt eine Funktion von Lipid-Tröpfchen bei der cerebralen Immunantwort vermuten (Derk *et al.*, 2018). Einer der stärksten genetischen Risikofaktoren für Alzheimer ist das $\epsilon 4$ Allel von APOE. Astrocyten, die das $\epsilon 4$ Allel exprimieren, akkumulieren und benötigen Lipid-Tröpfchen (Farmer *et al.*, 2019). In Gliazellen konnten durch die Expression von $\epsilon 4$ oder $\epsilon 3$ Allelen von APOE vor allem Veränderungen in Genen festgestellt werden, die den Metabolismus und Transport von Lipiden betreffen. Zusätzlich wurde sowohl intrazellulär als auch extrazellulär eine Akkumulation von Cholesterin in den Gliazellen festgestellt. Der veränderte Metabolismus könnte mit neurodegenerativen Erkrankungen verknüpft sein (Lin *et al.*, 2018). Zugabe von konditioniertem Medium von Astrocyten, die das Allel $\epsilon 4$ tragen, führte zudem zu einer Akkumulation von Lipid-Tröpfchen in anderen Zelltypen (Tambini *et al.*, 2016).

Studien zeigten auch einen Einfluss von Lipid-Tröpfchen auf Motoneuronen und dadurch eine Verbindung zu ALS (Pennetta und Welte, 2018). Überexpression von ALS assoziiertem TDP-43 in Mäusen führte zu neurologischen Symptomen, motorischen Defiziten und einer

gesteigerten Akkumulation von Lipiden (Stallings *et al.*, 2013). Eine weitere Studie zeigte, dass Mutationen im Lipid-Tröpfchen assoziierten Protein Seipin in Mäusen zu Symptomen von Krankheiten führen, die mit einem Verlust an Motoneuronen assoziiert sind (Yagi *et al.*, 2011). In einem Hefe spezifischen Modell für ALS konnte zudem die TDP-43 vermittelte Toxizität gesteigert werden durch die Depletion von Seipin (Armakola *et al.*, 2012).

1.5 *Lipid-raft like microdomains*

1.5.1 Der Aufbau der MAM als *Lipid-raft* ähnliche Mikrodomäne im ER

Zur Generation von spezifischen Reaktionsräumen werden intrazelluläre Membranen in der Zelle in Mikrodomänen organisiert, die in ihrem Aufbau *Lipid rafts* ähneln. *Lipid-raft like Microdomains* sind unlöslich in Detergenzien, wie Triton X-100 bei 4 °C, wodurch sie sich charakteristisch von anderen Membranbereichen abheben und als *detergent resistant microdomains bezeichnet* (DRM) wurden (Hopper *et al.*, 1999; Brown und Rose, 1992; Simons und Ikonen, 1997). *Lipid rafts* bilden 10-200 nm große, spezialisierte Kompartimente innerhalb der Plasmamembran, die angereichert sind mit Cholesterin und Sphingolipiden (Abbildung 1.12; Pike, 2006; Brown und Rose, 1992). Studien zeigten zudem, dass Liposomen, die mit Sphingolipiden und Cholesterin angereichert waren, einen höheren Schmelzpunkt besaßen und unlöslich waren in Triton X-100 bei 37 °C im Vergleich zu Liposomen, die mit Proteinen angereichert waren (Schroeder *et al.*, 1994).

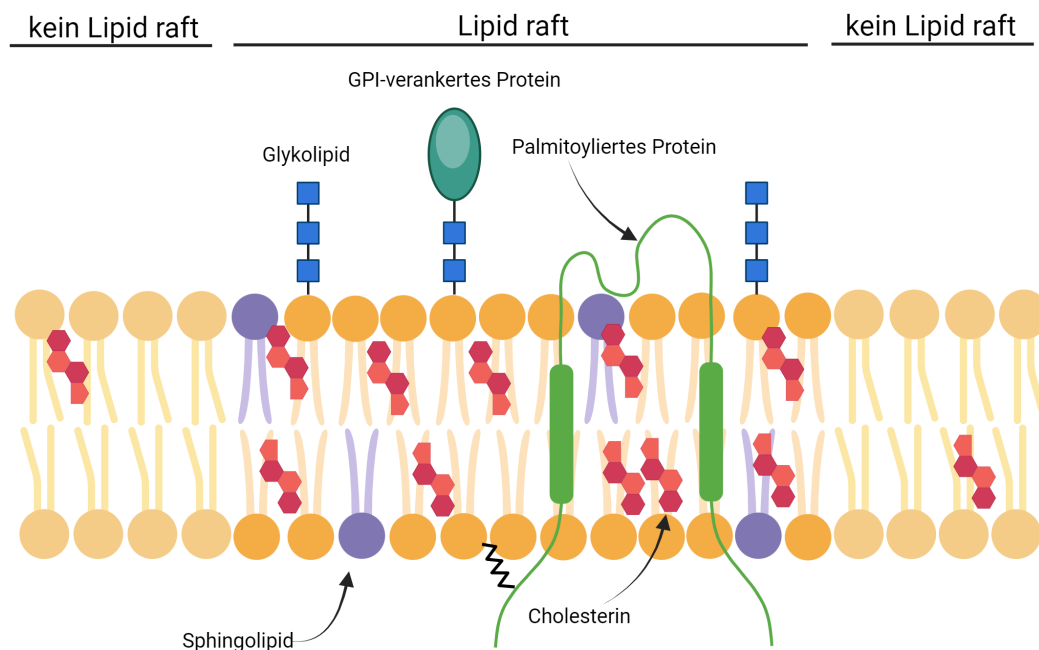


Abbildung 1.12: Aufbau einer *Lipid-raft* Mikrodomäne. Lipid rafts sind geprägt durch ihre *liquid ordered phase*, die durch den hohen Gehalt an gesättigten Phospholipiden, Cholesterin und Sphingolipiden geprägt sind. Dadurch können die Phospholipide mit Cholesterin dichter gepackt werden. Durch die Struktur der *Lipid rafts* befinden sich dort vor allem GPI verankerte Proteine, palmitoylierte Proteine und Proteine mit einer Cholesterinbindedomäne (Ripa *et al.*, 2021). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

Lipiddoppelschichten besitzen bei Temperaturen über ihrem Schmelzpunkt eine hohe Fluidität und liegen als *liquid-disordered phase* vor. Durch den hohen Gehalt an Cholesterin wird die Fluidität von Lipiddoppelschichten verringert und es kommt zur Bildung einer verdickten *liquid-ordered phase* (Ipsen *et al.*, 1987; Samsonov *et al.*, 2001). Ein hoher Gehalt an Cholesterin ändert zudem die Struktur von Lipiddoppelschichten. Durch die starre Struktur von Cholesterin kommt es zu einer dichteren Packung der Acylketten der Phospholipide, wodurch die Permeabilität der Membran für kleine Moleküle verringert wird (Korlach *et al.*, 1999; Munro, 2003). Gesättigte Acylketten fördern dabei die Bildung einer *liquid-ordered phase*, welche auch durch die polare Gruppe der Phospholipide beeinflusst wird (Samsonov *et al.*, 2001; Ramstedt und Slotte, 1999). Die laterale Diffusion von Proteinen und Lipiden innerhalb der Membran bleibt dabei weitestgehend unverändert (Munro, 2003; Smith *et al.*, 1980; Owicki und McConnel, 1980). Durch die spezifischen Lipide in den Mikrodomänen sind nur bestimmte Proteine, wie zum Beispiel GPI-Ankerproteine und lipidierte, vor allem palmitoylierte Proteine, mit den Mikrodomänen assoziiert (Schroeder *et al.*, 1998; Levental *et al.*, 2010). Viele Proteine, die in *detergent resistant microdomains* identifiziert werden besitzen gesättigte Acylketten, insbesondere GPI gekoppelte Proteine (Samsonov *et al.*, 2001).

Elektronenmikroskopische Analysen zeigten eine Verbindung zwischen den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum, wobei circa 80% der Mitochondrien in Kontakt standen zum rauen ER (Copeland und Dalton, 1959; Montisano *et al.*, 1982; Pickett *et al.*, 1980). Die Distanz zwischen ER zu Mitochondrien beträgt dabei 10-30 nm (Csordas *et al.*, 2006). Die MAM ist angereichert mit Cholesterin und Ceramiden und wurde als *detergent resistant microdomain* beschrieben (Hayashi und Fujimoto, 2010; Fujimoto *et al.*, 2012). Eine Depletion von Cholesterin in subzellulären Membranen von CHO Zellen führte zu einer reduzierten Assoziation von Mitochondrien mit dem endoplasmatischen Retikulum (Fujimoto *et al.*, 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Sigma-1-Rezeptor durch das hohe Cholesterinlevel der MAM an die MAM rekrutiert werden konnte (Zhemkov *et al.*, 2021; Fujimoto *et al.*, 2012; Hayashi und Su, 2010). Durch einen Proteinase-K-Assay konnte gezeigt werden, dass die Struktur der MAM auch durch Proteine stabilisiert wird (Csordas *et al.*, 2006). Mitofusin 2, welches am ER lokalisiert ist, interagiert mit mitochondrialem Mitofusin 1/2, verbindet damit das ER mit den Mitochondrien und gewährleistet einen effizienten Calcium-Efflux zwischen dem ER und den Mitochondrien (de Brito *et al.*, 2008; Merkwirth *et al.*, 2008). VAPB ist ein ER Membranprotein und interagiert mit dem Protein PTPIP51 der äußeren Mitochondrienmembran (De Vos *et al.*, 2012). Auch der Komplex aus VDAC, IP3R3 und Grp75 stabilisiert die MAM und bedingt den Efflux von Calcium von ER zu den Mitochondrien (Szabadkai *et al.*, 2006). Der Komplex wird zusätzlich stabilisiert durch den Sigma-1-Rezeptor (Hayashi und Su, 2007).

1.5.2 Die Funktionen der MAM

Die Funktionen der MAM werden durch die mit der MAM assoziierten Proteine bestimmt. Proteomics-Analysen von MAM-Fraktionen zeigten, dass die identifizierten Proteine zu 28,2% an Mikrosomen, insbesondere dem ER, dem Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen und Vesikeln und zu 25,5% an Mitochondrien lokalisiert sind (Zhang *et al.*, 2011). Eine weitere Proteomics-Analyse konnte zeigen, dass 48,17% der in der MAM-Fraktion identifizierten

Proteine am ER und an den Mitochondrien lokalisiert sind. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich Proteine des Zitratzyklus, des Fettsäuremetabolismus, der Glykolyse und Gluconeogenese, der oxidativen Phosphorylierung, des intrazellulären Transports und der Bindung von Proteinen (Wang *et al.*, 2018).

Durch den geringen Abstand von Mitochondrien zum endoplasmatischen Retikulum an der MAM entsteht dort ein Reaktionsraum, der von der hydrophilen Umgebung des Cytosols geschützt ist. Daher eignet sich die MAM insbesondere für die Synthese und den Transport von Lipiden (Rusinol *et al.*, 1994; Annunziata *et al.* 2018). Eine Isolation der MAM aus Leberzellen von Ratten zeigte, dass vor allem Proteine an der MAM angereichert sind, die an der Synthese von Phospholipiden und neutralen Lipiden beteiligt sind (Rusinol *et al.*, 1994). An der MAM ist zum Beispiel ACSL4 lokalisiert, welches an der Synthese von Triacylglyceriden beteiligt ist (Lewin *et al.*, 2002). Weitere Proteine, die am Metabolismus von Lipiden beteiligt und an der MAM lokalisiert sind, sind PSS1 und PSS2, PEMT2, ACAT1 und DGAT2 (Rusinol *et al.*, 1994; Stone und Vance, 2000; Vance *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2014). Die Phosphatidylserin-Synthasen PSS1 und PSS2 sind an der Synthese von Phosphatidylserin aus Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin durch Basen-Austausch in einem Calcium abhängigen Prozess beteiligt (Rusinol *et al.*, 1994; Stone und Vance, 2000; Vance und Steenbergen, 2005). Phosphatidylserin wird zudem über die MAM als Kontaktstelle vom ER zu den Mitochondrien transportiert (Vance, 1991; Shiao *et al.*, 1995; Simbeni *et al.*, 1991). ACAT1 ist an der Synthese von Cholesterinestern und DGAT2 an der Synthese von Triacylglyceriden beteiligt (Cases *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 1998). PEMT2 ist ebenfalls an der Synthese von Phospholipiden beteiligt (Zou *et al.*, 2002). Zudem wurden in Hefen Proteinkomplexe gefunden, die am Transport von Phospholipiden zwischen dem ER und Mitochondrien beteiligt sind, insbesondere der ERMES-Komplex und der EMC-Komplex, welcher in Hefen primär Phosphatidylserin in die Mitochondrien transportiert. Bisher ist unklar, ob ein solcher Komplex auch in Säugetierzellen existiert (Kornmann *et al.*, 2009; Lahiri *et al.*, 2014).

Weiterhin dient die MAM als Plattform für den regulierten Transport von Calcium vom ER zu den Mitochondrien, die Calcium zur Synthese von Adenosintriphosphat benötigen (Bravo *et al.*, 2011; Filippin *et al.*, 2003). Für den Calcium-Transport an der MAM ist der Komplex aus VDAC1-Grp75-IP3R3 und der Calcium Transporter MCU verantwortlich. Der Komplex aus VDAC1-Grp75-IP3R3 reguliert den Transport von Calcium über die äußere mitochondriale Membran, während MCU für den Transport über die innere mitochondriale Matrix verantwortlich ist (Szabadkai *et al.*, 2006; Gincel *et al.*, 2001; Rapizzi *et al.*, 2002; De Stefani *et al.*, 2011). Der Calcium Transport wird zudem durch den Komplex aus VAPB und PTPIP51 an der MAM unterstützt (De Vos *et al.*, 2012). Auch der Sigma-1-Rezeptor ist an dem Prozess beteiligt, indem er IP3R3 stabilisiert und so den Calcium-Efflux über einen längeren Zeitraum aufrecht hält (Hayashi und Su, 2007).

Die MAM ist auch an der Initiation der Autophagie beteiligt. So wird ATG14 als Komponente des für die Autophagosomen-Bildung relevanten PI3K-Komplexes bei Nährstoffmangel zur MAM rekrutiert. Strukturschäden an der MAM führen dazu, dass ATG14 nicht an die

MAM rekrutiert werden kann und die Autophagosomen-Bildung bei Nährstoffmangel deutlich reduziert ist (Hamasaki *et al.*, 2013).

Mehrere der an der MAM lokalisierten Proteine sind zudem mit der *Unfolded Protein Response* assoziiert. VAPB interagiert mit ATF6 und moduliert dessen Aktivität (Gkogkas *et al.*, 2008). Mitofusin 2 reguliert die Aktivität von UPR über die Repression von PERK (Munoz *et al.*, 2013). Zudem sind mehrere Chaperone an der MAM lokalisiert wie der Sigma-1-Rezeptor, Bip78, Calnexin und Calreticulin (Hayashi und Su, 2007; Myhill *et al.*, 2008; Wieckowski *et al.*, 2009).

1.5.3 Die MAM im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer, Parkinson und ALS teilen Eigenschaften, die mit einer Destruktion der MAM einhergehen, insbesondere mitochondriale Schäden, Änderungen in der Calcium-Homöostase, dem Lipid-Metabolismus und der Autophagie sowie eine Aktivierung der *Unfolded protein response* (Pailluson *et al.*, 2016). Die präsynaptische Membran ist zudem angereichert mit Sphingolipiden (Davletov und Montecucco, 2010). Cholesterin und Sphingolipide bilden an der präsynaptischen Membran vermutlich Cholesterin angereicherte Lipid-Mikrodomänen. Eine Proteomics-Analyse identifizierte vor allem präsynaptische Proteine in DRM aus primären Neuronen, die an Endocytose und Exocytose beteiligt sind. Die Bildung von synaptischen Vesikeln wird demnach vermutlich durch Cholesterin und Sphingolipide beeinflusst (Jia *et al.*, 2006).

Die bei Alzheimer gebildeten β -Amyloid Plaques entstehen durch die Spaltung des Amyloid Precursor Protein (APP) durch Presenilin 1/2, welche zum γ -Secretase Komplex gehören (Haas *et al.*, 2011; De Stropper, 2003). Presenilin 1/2 sind zudem an der MAM angereichert (Area-Gomez *et al.*, 2009). Mutationen von Presenilin führen zu einem veränderten Verhältnis zwischen A β 42 Peptiden zu A β 40 Peptiden und sind assoziiert mit der Bildung von Alzheimer (Borchert *et al.*, 1996; Scheuner *et al.*, 1996). Auch APP und seine Metaboliten sind an der MAM lokalisiert und beeinflussen dort die Funktionen des ER (Del Prete *et al.*, 2017). Das Allel ϵ 4 von Apolipoprotein E steigert zudem die Aktivität der MAM und Patienten, die das Allel für ApoE tragen, besitzen ein höheres Risiko für Alzheimer (Tambini *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2013).

Die Bildung von *Lewy-Bodies* bei Parkinson, die zur Degeneration von dopaminergen Neuronen führt, wird reguliert durch die Expression von α -Synuclein. *Lewy-Bodies* bestehen dabei nicht nur aus Proteinen, sondern auch aus Lipiden und Zellorganellen (Shahmoradian *et al.*, 2019; Spillantini *et al.*, 1998). α -Synuclein ist zudem an der MAM lokalisiert (Guardia-Laguarta *et al.*, 2014). Eine Überexpression von α -Synuclein führt zur Denaturierung des VAPB-PTPIP51 Komplexes und damit zu einer reduzierten Stabilität der MAM und zu einer verringerten ATP-Produktion (Pailluson *et al.*, 2017). Eine Mutation von VAPB kommt zudem bei ALS vor (Nishimura *et al.*, 2004). Überexpression von Wildtyp TDP-43 und dessen Mutanten, welches assoziiert ist mit ALS, unterbricht die Interaktion von VAPB mit PTPIP51, reduziert die Assoziation und damit verbunden den Calcium Transport vom ER zu den Mitochondrien (Stoica *et al.*, 2014).

1.6 Ziel der Arbeit

Der Sigma-1-Rezeptor ist ein Protein mit vielfältiger Funktion im zellulären System, insbesondere der Regulation von Ionenkanälen, der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion und dem Einfluss auf den Lipid-Metabolismus sowie die Autophagie (Hayashi und Su, 2007; Su *et al.*, 2010; Strivats *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019; Hayashi und Su, 2003). Durch seine subzelluläre Lokalisation beeinflusst der Sigma-1-Rezeptor vor allem die zellulären Prozesse an der Mitochondrien-ER assoziierten Membran (Hayashi und Su, 2007; Tagashira, 2023).

Neurodegenerative Erkrankungen liegen der Verlust der Proteostase und die Anreicherung von Proteinaggregaten zugrunde, die durch pathologische molekulare Prozesse ausgelöst werden. Wichtige zelluläre Prozesse sind dabei die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, welche zu einer Reduktion der ATP-Produktion führt (Penke *et al.*, 2017; Benarroch, 2018). Der Sigma-1-Rezeptor selbst stabilisiert als ER assoziiertes Chaperon sowohl IP3R3 als auch IRE1 α an der MAM und wirkt sich dadurch auf die Funktion der Mitochondrien und die Antwort der Zelle auf ER-Stress aus (Hayashi und Su, 2007; Tagashira *et al.*, 2014; Mori *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2017). Mutanten des Sigma-1-Rezeptors wurden in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie ALS entdeckt (Al-Saif *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Gregianin *et al.*, 2016). Aufgrund seiner hohen Konzentration in Motoneuronen, liegt ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Funktion des Sigma-1-Rezeptors und dem Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen nahe (Mavlyutov *et al.*, 2013; Mavlyutov *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2015).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle des Sigma-1-Rezeptors in Bezug auf den Metabolismus von Lipid-Tröpfchen, Autophagie und die Aggregation von Proteinen zu untersuchen. Da Autophagie ein wichtiger zellulärer Prozess ist zum Abbau von Proteinaggregaten in Zellen, sollte hier zudem auch ein Zusammenhang zwischen einer Sigma-1-Rezeptor abhängigen Aggregation von Proteinen und einer Beeinträchtigung der Autophagie gezeigt werden (Gao *et al.*, 2019; Simonsen und Wollert, 2022; Lamark und Johansen, 2012). Lipid-Tröpfchen wurden zudem als Quelle für die Bildung von Autophagosomen identifiziert, weshalb auch ein Zusammenhang zwischen Autophagie und der Dynamik von Lipid-Tröpfchen untersucht wurde (Dupont *et al.*, 2014). Das Gehirn ist das Organ mit dem zweitgrößten Gehalt an Lipiden im menschlichen Organismus und eine Veränderung im Lipid-Metabolismus wurde bei neurodegenerativen Erkrankungen entdeckt, die Motoneuronen betreffen und im Zusammenhang stehen mit dem Sigma-1-Rezeptor, insbesondere ALS (Farmer *et al.*, 2020; Armakola *et al.*, 2012; Morell und Toews, 1996; Al-Saif *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Gregianin *et al.*, 2016). Daher sollte vor allem ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Sigma-1-Rezeptor und der Dynamik von Lipid-Tröpfchen untersucht werden. Da der Sigma-1-Rezeptor an der MAM lokalisiert ist und dort einen erheblichen Anteil zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion beiträgt und die MAM zudem als funktionale Plattform für den Metabolismus von Lipiden und Autophagie dient, wird in der vorliegenden Arbeit auch auf die Veränderungen an der MAM durch einen Verlust des Sigma-1-Rezeptors eingegangen (Hayashi und Su, 2007; Rusinol *et al.*, 1994; Hamasaki *et al.*, 2013).

2. Material

2.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 2.1: verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid	Sigma
Adenosintrisphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
ANAVEX2-73	Life Science Corp.
Antibiotikum-Antimykotikum (ABAM)	Sigma
Bacto-Agar	BD
Bafilomycin	Toronto Research Chemical
BD-1047	Sigma/Merck
Beta-Mercaptoethanol	Carl Roth
Bodipy 493/503	Life Technologies
Bromphenolblau	Bio-Rad
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Carl Roth
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Calbiochem
Dimethylsulfoxid	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Desoxy-Nukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix), PCR Grade	Qiagen
Doxycyclin	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline	Invitrogen
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)	Thermo Fisher Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N,N-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco
FCS tetracyclin frei	PAN Biotech
Fluoromount G Befestigungsmedium	Thermo Fisher
Gel Loading Dye 6x	<i>New England Biolabs</i> (NEB)

Name	Hersteller
Genitacin (G418)	Calbiochem
Glucose	Carl Roth
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth
Hefeextrakt	BD
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
Hygromycin B	Thermo Fisher
Igepal	Sigma
Immobilon Western	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kanamycinsulfat	Carl Roth
Luminol	Sigma
Magermilchpulver	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Magnesiumsulfat	Sigma
Mannitol	Fluka
Mass Ruler, DNA-Ladder Mix	Thermo Fisher
Methanol	VWR
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumazid	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	Bio-Rad
Natriumfluorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	Gibco
Oligo dT 15 Primer	Promega Karbinett
Ölsäure an BSA gebunden	Sigma
Opti-MEM (Minimal Essential Medium)	Thermo Fisher
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	VWR
Percoll	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma
Phosphatase-Inhibitor	Roche
Phosphatgepufferte Formaldehydlösung	Carl Roth
Ponceau	Sigma
PRE-084	Tocris
Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Roche

Name	Hersteller
Proteinmarker	Thermo Fisher
RNAasin plus RNase Inhibitor	Promega
Saccharose	Carl Roth
Salzsäure	Merck
SensiMixSYBR- und fluorescein	Bioline
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Thapsigargin	Sigma-Aldrich
Transfer-Puffer 5x	Bio-Rad
Tris-Base	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X-100	Sigma
Trypton	BD
Tunicamycin	Sigma-Aldrich
Tween	Carl Roth
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich

Tabelle 2.2: verwendete Kits

Name	Hersteller
Phospholipid Quantification Assay Kit	Sigma Aldrich
Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay	Promega
Absolutely RNA Miniprep Kit	Agilent
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Mini-Kit for Plasmid DNA	Macherey-Nagel
Maxi-Kit for Plasmid DNA	Macherey-Nagel
QIAquick Gel extraction kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Omniscript RT Kit	Qiagen
SilverXpress Silver Staining Kit	Invitrogen

2.2 Puffer, Nährmedien und Lösungen

Tabelle 2.3: verwendete Puffer für Nährmedien und Bakterienkulturen

Name	Komponenten	Konzentration
Luria Bertani (LB)-Medium (pH 7,0)	Trypton	1% (w/v)
	Hefeextract	0,5% (w/v)
	Natriumchlorid	0,5% (w/v)

Name	Komponenten	Konzentration
LB-Agar (pH 7,0)	Trypton	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	Natriumchlorid	0,5% (w/v)
	Bacto-Agar	0,5% (w/v)
Antibiotika	Kanamycin	50 µg/ml

Tabelle 2.4: verwendete Puffer für Zellkultur-Arbeiten

Name	Komponenten	Konzentration
Komplettmedium (HeLa-Zellen)	DMEM	
	FCS	10% (v/v)
	ABAM	100 µg/ml
	Natriumpyruvat	100 U/ml
Komplettmedium (H4-Zellen)	OptiMeM	
	FCS (Tetracyclin frei)	10% (v/v)
	Natriumpyruvat	100 U/ml
	Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml
	Geneticin (G418)	200 µg/ml
	Hygromycin B	200 µg/ml
Kryokonservierungs- medium	Komplettmedium	90% (v/v)
	Dimethylsulfoxid	10% (v/v)
Elektroporationspuffer (pH 7,2-7,4)	Kaliumchlorid	135 mM
	Calciumchlorid	0,2 mM
	Magnesiumchlorid	2 mM
	EGTA	5 mM
	HEPES	10 mM
	FCS	25% (v/v)
2x HEPES buffered saline (HBS)	Natriumchlorid	280 mM
	HEPES	50 mM
	Dinatriumhydrogen- phosphat	1,5 mM

Tabelle 2.5: verwendete Puffer für Protein- und DNA-Analytik

Name	Komponenten	Konzentration
3x Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Lysispuffer (pH 6,8)	Tris-HCl	187,5 mM
	SDS	6% (w/v)
	EDTA	3 mM
	Saccharose	30% (w/v)
Protease-Inhibitor-Cocktail	2 Tabletten in 4 ml Wasser	25x
	1 Tablette in 1 ml Triton Basis Puffer	10x

Name	Komponenten	Konzentration
Phosphatase-Inhibitor Phosphostop	1 Tablette in 0,5 ml Wasser	20x
1x SDS-Lysispuffer (pH 6,8)	PIC 25x Phosphostop 20x 3x Lysispuffer Destilliertes Wasser	40 µl 50 µl 333 µl 577 µl
Triton Basispuffer	Triton X-100 Natriumchlorid HPES EDTA Magnesiumchlorid Glycerin	1% (v/v) 150 mM 25 mM 1 mM 1,5 mM 10% (v/v)
Triton Lysispuffer	PIC 10x Natriumfluorid Natriumorthovanadat Phenylmethylsulfonylfluorid Triton Basis Puffer	100 µl 500 mM 200 mM 0,1 M Auffüllen auf 1 ml
4x Probenpuffer (pH 8,8)	Tris-HCl SDS Bromphenolblau Glycerin Beta-Mercaptoethanol	250 mM 4% (w/v) 0,2% (w/v) 30% (v/v) 250 µl/ml
4x Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris-HCl SDS	0,6 M 0,4% (w/v)
4x Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris-HCl SDS	1,5 M 0,4% (w/v)
Tris-Glycin-Laufpuffer	Glycin Tris SDS	0,192 M 25 mM 0,1% (w/v)
Tris-Glycin-Blotpuffer	Glycin Tris Methanol	0,25 M 25 mM 20% (v/v)
Trans-Blot Turbo Blotpuffer	Wasser Ethanol 5x Transfer Puffer (Bio Rad)	600 ml 200 ml 200 ml
Enhanced Chemilumineszenz-Lösung (ECL)	Lösung A (pH 8,6) Tris Luminol Lösung B p-Cumarsäure in DMSO Wasserstoffperoxid	0,1 M 0,0025% (w/v) 6,7 mM 30% (v/v)

Name	Komponenten	Konzentration
Ponceau	Ponceau Essigsäure	0,2% (w/v) 5% (v/v)
Tris-buffered saline mit Tween20 (TBS-T)	Natriumchlorid Kaliumchlorid Tris-Base Tris-HCl Tween	137 mM 2,7 mM 2,8 mM 22 mM 0,05% (v/v)
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	Tris-Base EDTA Natriumacetat	40 mM 1 mM 20 mM

Tabelle 2.6: verwendete Puffer für die Isolation der MAM

Name	Komponenten	Konzentration
Phosphate Buffer Saline (PBS) mit Calcium und Magnesium (pH 7,4)	Calciumchlorid Kaliumchlorid Magnesiumchlorid Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat	0,9 mM 2,7 mM 0,5 mM 0,14 M 0,015 M
Starting Buffer 2 (SB2)	Mannitol Saccharose Tris-HCl pH 7,4	225 mM 75 mM 30 mM
Starting Buffer 1 (SB1)	Mannitol Saccharose Tris-HCl pH 7,4 EGTA	225 mM 75 mM 30 mM 0,1 mM
MRB (mitochondria resuspending buffer)	Mannitol HEPES EGTA	250 mM 5mM 0,5 mM
Percoll-Medium	Mannitol HEPES pH7,4 EGTA Percoll	225 mM 25 mM 1 mM 30% (v/v)

2.3 Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind mit ihren Verdünnungen in der folgenden Tabelle dargestellt. Eine Verwendung in der Western Blot Analyse wurde dabei mit WB gekennzeichnet, eine Verwendung in der Immunfluoreszenz mit IF.

Tabelle 2.7: verwendete Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Artikel-nummer
Primärantikörper				
ACSL4/FACSL4	Kaninchen	1:1000 (WB)	Thermo Fisher scientific	A305-358A
Act	Kaninchen	1:1000 (WB)	Sigma	A5060
aSyn	Maus	1:1000 (WB)	BD Transduction Laboratories	610786
aSyn Aggregate MJFR-14-6-4-2	Kaninchen	1:1000 (WB)	abcam	ab209538
ATL3	Kaninchen	1:1000 (WB)	Proteintech	16921-1-AP
Bip/Grp78	Maus	1:1000 (WB)	BD Biosciences	610978
CNX	Kaninchen	1:1000 (WB)	Abcam	ab133615
Cyt c	Maus	1:1000 (WB)	Novusbio	F LC3
eIFP2a	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling	9722
FAM134B	Kaninchen	1:1000 (WB)	Proteintech	21537-1-AP
Flag-M2	Maus	1:1000 (WB)	Sigma Aldrich	F1804
GFP	Maus	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich	G6539
H4	Maus	1:1000 (WB)	Cell Signaling	2935
IRE1a	Kaninchen	1:1000 (WB)	Thermo Fisher Scientific	MA5-14991
LC3b I+II	Kaninchen	1:1000 (WB)	Sigma	L7543
peIFP2a	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling	9721
Sec62	Kaninchen	1:1000 (WB)	Invitrogen	PA5-53119
Sigma-1	Maus	1:200 (IF) 1:500 (WB)	Thermo Fisher scientific	42-3300
Sigma-1 poly-klonal	Kaninchen	1:1000 (WB)	santa cruz	sc-137075
SOD1	Kaninchen	1:5000 (WB)	abcam	ab51254
TEX264	Kaninchen	1:1000 (WB)	Proteintech	25858-1-AP
TOM20	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:200 (IF)	Cell Signaling	42406S
Tub α DM1A	Maus	1:1000 (WB)	Sigma	T9026
Ubiquitin P4D1	Maus	1:1000 (WB)	Cell Signaling	3936S
Sekundärantikörper				
Cy3-Anti-Maus	Esel	1:200 (IF)	Jackson-Immuno Research	715-165-151
Cy5-Anti-Kaninchen	Esel	1:200 (IF)	Jackson-Immuno Research	711-175-152

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Artikel-nummer
HRP-Kaninchen IgG	Esel	1:10000 (WB)	Jackson-Immuno Research	711-035-152
HRP-Maus IgG	Esel	1:10000 (WB)	Jackson-Immuno Research	715-035-151

2.4 Enzyme und ihre Puffer

Tabelle 2.8: verwendete Enzyme und ihre Puffer

Name	Hersteller
NotI-HF	NEB
BamHI-HF	NEB
Cutsmart 10x	NEB
Phusion HF DNA Polymerase	NEB
HF Phusion Puffer 5x	NEB
T4 DNA Ligase	NEB
Ligationspuffer 10x	NEB
T4 DNA Polymerase	NEB
NEB-Puffer 10x	NEB

2.5 Plasmide

Tabelle 2.9: verwendete Plasmide

Name	Hersteller
pCMV6-entry-Sigma-1-Myc-Flag	Origene
pCMV6-Sigma-1-E102Q-Myc-Flag	hergestellt in der Doktorarbeit von einem/r Mitarbeiter/in
pCMV6-Sigma-1-E138Q-Myc-Flag	hergestellt in der Doktorarbeit von einem/r Mitarbeiter/in
pCMV6-Sigma-1-d176-223-Myc-Flag	hergestellt in der vorliegenden Arbeit
pCMV6-Sigma-1-d2-29-Myc-Flag	hergestellt in der vorliegenden Arbeit
pCMV6-Sigma-1-d91-109-Myc-Flag	hergestellt in der vorliegenden Arbeit
pEX-K248-Sigma-1-d91-109	eurofins
pEGFP-N1	Addgene
pEGFP-aSynWT-N1	hergestellt in der Doktorarbeit von einem/r Mitarbeiter/in
pEGFP-aSynA53T-N1	hergestellt in der Doktorarbeit von einem/r Mitarbeiter/in

2.6 Oligonukleotide

Tabelle 2.10: verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'
PCR-Primer	
Sigma1-d176-223 for	TAACTAATGTGCGGCCGCAGGGTCC TGGCCAAAGAGGTA
Sigma1-d176-223 rev	TAACTAATGTGCGGCCGCGTACGCG TCCGCCGTACTCCACCATGTG
Sigma1-d2-29 for	TAACTAATGTGGATCCATGCTGGGT ACGCAGAGCTTCGTC
Sigma1-d2-29 rev	TAACTAATGTGCGGCCGCGTACGCG TAGGGTCCTGGCCAAAGAGGTA
Sigma1-d91-109 for	TAACTAATGTGCGGCCGCAGGGTCC TGGCCAAAGAGGTA
Sigma1-d91-109 rev	TAACTAATGTGCGGCCGCGTACGCG TAGGGTCCTGGCCAAAGAGGTA
Sequenzierungsprimer	
VP1.5 for	GGACTTTCCAAAATGTGCG
XL39 rev	ATTAGGACAAGGCTGGTGGG
q-PCR Primer	
ACTB for	ACAGAGCCTCGCCTTTGCC
ACTB rev	GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG
Sigma1-Exon 3 for	GGCGCTACTGGGCTGAGAT
Sigma1-Exon 3 rev	TGTACTACCGTCTCCCCTGG
ACAT1 for	GAAGGATGTGATGGTGGCAG
ACAT1 rev	GCGTCCTGTTTCATTTCTGTC
ACAT2 for	GATGGAACGGGAACAGTCAC
ACAT2 rev	TCTTCCAGTGACCAACCTGC
ACTB for	GATGGAACGGGAACAGTCAC
ACTB rev	TCTTCCAGTGACCAACCTGC
GPAT3 for	CTACGAGGAAGGGACTTTGAGC
GPAT3 rev	CACCATAGTGAGCCGCAGAC
AGPAT for	GCGTCTAATTGCTGCTCCAC
AGPAT rev	TGAAGATGACTCCTGCCAGC
DGAT1 for	CTTCAGCAACTACCGTGGCATC
DGAT1 rev	CAACCTGGAATGCAGCCAC
DGAT2 for	CAGCACAGAGGCCACAGAAG
DGAT2 rev	GTGACTGCATTCTTGCCAGG
PLPP2 for	GCTCTATTCTCGCTCGGACTTC
PLPP2 rev	GCACATAGACCGAGCAGTTGAC
PNPLA2 for	GTATCTAAAGAGGCCCGGAAGC

Name	Sequenz 5' → 3'
PNPLA2 rev	GCTCGTCCTTGGAGTTGAAGTG
LIPE for	CCGACTGAATCTACGTCCCAAG
LIPE rev	TGGCTGGAGAATCTGTGTCTG
LIPA for	CTTCCGTCGCCTTCTGTACTAG
LIPA rev	GTTCCAGCAGGAGAATGTGTTG
siRNA	
siRNA-Sigma-1-1	ACACAUGGAUGGUGGAGUA
siRNA-Sigma-1-2	GAUCUCGGAUACCAUCAUC
siRNA-Sigma-1-1-scr	GGAGGACGUGC UAAGAU AU
siRNA-Sigma-1-2-scr	GGUACCCUCAACGUUACUA

2.7 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 2.11: verwendete Zelllinien

Zelllinien	Hersteller
HeLa-Zellen	American Type Culture Collection, Manassas USA
HeLa-Sigma-1-Knockout Zelllinien Ac3, Ac9, Af8, Ag11, Bb6, Bd4, Bd5, Bd8, Bf8, Bf9, Bf10, Bg5, Bg6, Bg7	Hergestellt in der Doktorarbeit von einem/r Mitarbeiter/in
H4 Neurogliom-Zellen	Seebauer <i>et al.</i> , 2022, Zellen erhalten von einem/r Kooperationspartner/in
<i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	NEB

2.8 Laborgeräte

Tabelle 2.12: verwendete Laborgeräte

Name	Hersteller
Absaugsystem VacuSafe	Integra, Fernwald
Bakterieninkubator	Memmert, Schwabach
Bakterienschüttler	n-Biotek, Asbach
Bakterienschüttler Certamat R HK	Sartorius, Göttingen
Elektroporator Nucleofactor 2b	Lonza, Köln
Feinwaage Quintix 124-1S	Sartorius, Göttingen
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Kirchdorf
Gefrierschränke (-80°C)	Heraeus
Geldokumentationsscanner	Intas Science Imaging, Göttingen
Gelelektrophorese-Netzteil	Biometra, Göttingen
Gelsystem Mini S	VWR (PEQ-LAB), Erlangen
Homogenisator Potter S	Sartorius, Göttingen
Inversmikroskop CKX31	Olympus, Shinjuku (Japan)

Name	Hersteller
Kühlschränke 4°C	Liebherr, Kirchdorf
<i>Laser-scanning</i> Mikroskop LSM 710	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer, RCT	Ikamag
Mikroliterzentrifuge MicroStar 17	VWR, Radnor (USA)
Mikroliterzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Mikrotiterplatten-Scanner, Varioskan LUX	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Mikrowelle	Progress, Nürnberg
Mini-Protean Tetra Cell System	Bio-Rad, München
Mini-Trans-Blot-Cell-System	Bio-Rad, München
Netzteil, Power Pac Basic	Bio-Rad, München
PCR-Platten Zentrifuge	VWR (PEQ-LAB), Erlangen
pH-Elektrode Blue Line	SI Analytics, Mainz
pH-Meter CG820	Schott, Mainz
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
qPCR Detektionssystem CFX Connect	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank Herasafe 2030i	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Spektrophotometer Beckmann Coulter	Beckmann, München
Spektrophotometer Nanodrop 1000	VWR (PEQ-LAB), Erlangen
Thermocycler	Bio-Rad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad, München
Ultraschallgerät HTU Soni 130	Heinemann, Schwänisch Gmünd
Ultraschallgerät, UP50H	Hielscher, Teltow
Ultrazentrifuge Optima L-100K	Beckmann, München
UV Transilluminator	Intas Science Imaging, Göttingen
Vortexer	Scientific Industries, New York (USA)
Waage B2 6100	Sartorius, Göttingen
Waage P2 1200	Mettler, Gießen
Waage PG503	Mettler Toledo, Columbus (USA)
Wärmeschrank	Bachofer, Weilheim
Wasserbad WBT22	Carl Roth, Karlsruhe
Zählkammer Neubauer Improved	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Zellinkubator	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, Multifuge 3S-R	Heraeus
Zentrifuge Sorvall RC-5B Superspeed	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

2.9 EDV-Programme

Tabelle 2.13: verwendete EDV-Programme

Name	Verwendung
Ape V5	Primerdesign
Corel Draw 2022	Grafikdesign
Fiji Image J 64 V5	Bildbearbeitung
Image Studio Light V5.2	Densitometrische Auswertung
Graph Pad Prism 10	Statistische Auswertung und Grafikdesign
SkanIT 6.0.2	Aufnahmen der Messwerte VarioSkan
ZEN 2011 SP2 V.8.0	Aufnahmen <i>Laser-scanning</i> Mikroskop

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Analytische und Präparative Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Gelelektrophorese angewendet. Dafür wurden sowohl für analytische als auch für präparative Analysen 1% (w/v) Agarose-Gele gegossen. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst und mit einer 0,07%-igen Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Nach Polymerisation des Gels in der Gießvorrichtung wurden die Proben aufgetragen und die Proben bei 100 V für 1 h aufgetrennt. Es wurde jeweils 5 µl DNA-Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet und die Proben wie folgt angesetzt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Pipettierschema der PCR-Proben

	analytisches Gel Plasmid	analytisches Gel PCR-Produkt	präparatives Gel
Probe	2 µl	10 µl	50 µl
Wasser	8 µl	-	-
Loading Dye 6x	2 µl	2 µl	10 µl

Mittels UV-Geldokumentationsscanner (Intas) wurden die Banden im Gel sichtbar gemacht und dokumentiert. Die Banden der präparativen Gele wurden auf einem UV-Transilluminator (Intas) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Spatels ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte anschließend mittels des Gelextraktionskits von Qiagen nach den Angaben des Protokolls.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels Spektralphotometer (Beckmann) oder Nano-Drop Mikrovolumen Spektralphotometer (VWR) gemessen. Dazu wurde die Absorption bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen gemessen. Eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA und 40 ng/µl RNA. Aus dem Quotient $A_{260/280}$ wurde die Reinheit der DNA bestimmt (Desjardins und Conklin, 2011).

3.1.3 Klonierung

3.1.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient dazu spezifische DNA-Sequenzen ausgehend von einem Template *in vitro* zu amplifizieren. Die PCR diente in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von spezifischen DNA-Sequenzen, die als Insert für die Ligation in einem Vektor im Rahmen einer Klonierung dienen. Dabei wurden spezifische Deletionsmutanten des Sigma-1-Rezeptors aus dem Vektor pCMV6-Sigma-1-Myc-Flag als Template amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 2.10 unter PCR-Primer dargestellt. Für die Amplifikation

der Inserts wurde die *Phusion High Fidelity* Polymerase von *New England Biolabs* verwendet. Es wurde folgender PCR-Ansatz (Tabelle 3.2) und folgendes PCR-Programm (Tabelle 3.3) gewählt.

Tabelle 3.2: Pipettierschema der PCR-Amplifikation

Komponenten	verwendete Mengen
Plasmid-DNA	10 ng
dNTP	1 μ l $\hat{=}$ 200 μ M
DMSO	1,5 μ l
Primer for	2,5 μ l $\hat{=}$ 0,5 μ M
Primer rev	2,5 μ l $\hat{=}$ 0,5 μ M
HF Phusion Polymerase (NEB)	0,5 μ l
HF Phusion Puffer 5x (NEB)	10 μ l
Wasser	Auffüllen bis 50 μ l
Σ	50 μ l

Tabelle 3.3: PCR-Programm zur Herstellung der Inserts

	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	25
Hybridisierung	60 °C	15 s	
Elongation	68 °C	45 s	
Elongation	68 °C	5 min	1

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels analytischer Gelelektrophorese (Abschnitt 3.1.1) analysiert und mit Hilfe des PCR-Reinigungs-Kits von Qiagen aufgereinigt.

3.1.3.2 Restriktion von Vektor und Insert

Mit Hilfe von spezifischen Restriktionsenzymen wurden der Vektor pCMV6-Sigma-1-Myc-Flag und die Inserts der Deletionsmutanten geschnitten. Dazu wurde der Ansatz wie in Tabelle 3.4 aufgeführt gewählt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme wurde der Ansatz anschließend für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Tabelle 3.4: Pipettierschema der Restriktion

Komponenten	analytischer Ansatz	präparativer Ansatz
Plasmid-DNA	300 ng	1500 ng
NotI-HF (NEB)	0,3 μ l	1,5 μ l
BamHI-HF (NEB)	0,3 μ l	1,5 μ l
Cutsmart 10x (NEB)	1 μ l	5 μ l
Wasser	Auffüllen bis 10 μ l	Auffüllen bis 50 μ l
Σ	10 μ l	50 μ l

3.1.3.3 Generation von *Blunt Ends*

Zur Generation von *blunt ends* an einem linearisierten Vektor wurden die *sticky ends* mit Hilfe einer T4 Polymerase (NEB) aufgefüllt. Dazu wurden 750 ng des gereinigten linearisierten

Vektors mit 0,5 µl dNTPs, 5 µl NEB-Puffer 10x (NEB) und 0,5 µl T4 DNA-Polymerase versetzt in einem Gesamtvolumen von 50 µl und 15 min bei 12 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl 0,5 M EDTA zugegeben und der Ansatz 20 min bei 75 °C inkubiert.

3.1.3.4 Ligation

Für die Ligation von Vektor und Insert wurden diese im molaren Verhältnis 1:7 eingesetzt. Zur Berechnung der Mengen wurde Formel 3.1 verwendet. Die Ligation wurde dementsprechend wie folgt angesetzt (Tabelle 3.5).

$$m(\text{Insert}) = \frac{7 \cdot 50 \text{ ng} \cdot bp_{\text{Insert}}}{bp_{\text{Vektor}}} \quad (3.1)$$

Tabelle 3.5: Pipettierschema des Ligationsansatzes

Komponenten	verwendete Mengen
Vektor	50 ng
Insert	berechnet nach Formel (3.1)
Ligationspuffer 2x (NEB)	2 µl
T4 Ligase (NEB)	1 µl
Wasser	Auffüllen bis 20 µl
Σ	20 µl

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz zur Hitzeinaktivierung der Enzyme für 10 min bei 65 °C inkubiert und in chemisch kompetente *E.coli* Bakterien transformiert. Die Ligation wurde auch verwendet um einen linearisierten Vektor mit *blunt ends* zu ligieren. Dazu wurde der Ansatz wie in Tabelle 3.5 gewählt und 2 µl des *Blunt end refill* Ansatzes eingesetzt (Abschnitt 3.1.3.3).

3.1.3.5 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien

Zur Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien mittels Hitzeschock wurden *E.coli* Bakterien des Stammes DH5α (NEB) verwendet. Für die Transformation wurden 25 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 500-1000 ng Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend der Hitzeschock für 30 s bei 42 °C durchgeführt. Nach weiteren 2 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz mit 500 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 1 h unter Sauerstoffzufuhr geschüttelt. Der Ansatz wurde für 3 min bei 90 g zentrifugiert, das Medium verworfen und das Pellet in 100 µl frischem LB-Medium aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde zur Selektion und zum Vereinzeln auf einer mit Antibiotika supplementierten Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.3.6 Plasmid-Extraktion aus Bakterienzellen

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien wurde für eine Minipräparation das Mini-DNA-Kit von Marcherey und Nagel verwendet. Hierfür wurde am Vortag eine Bakterienkultur von 5 ml in mit Antibiotika versetztem LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 1300 rpm geschüttelt. Die Minipräparation wurde weitestgehend nach den Vorgaben des Kits durchgeführt. Bei der Elution wurde 2-fach mit je 25 µl Diethylpyrocarbonat

behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) eluiert, um die Menge an Plasmid-DNA in der Probe zu erhöhen. Für die Midipräparation wurde das Maxi-DNA-Kit von Marchrey und Nagel verwendet. Am Vortag wurde eine Bakterienkultur von 200 ml angesetzt und nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 1300 rpm in einer Standzentrifuge (Thermo Fisher) pelletiert (4 °C, 600 g, 20 min). Die Extraktion erfolgte weitestgehend nach den Vorgaben des Herstellers, wobei das Protokoll um einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt erweitert wurde. Dazu wurden die beim Aufschluss der Zellen ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation (4 °C, 9000 g, 15 min) abgetrennt und die Suspension erst dann auf die Säule gegeben. Bei beiden Kits wurde die Isolation nach den Angaben des Herstellers für ein *low-copy* Plasmid durchgeführt.

3.1.3.7 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 1125 ng DNA in einem Volumen von 15 µl mit 2 µl Sequenzierungsprimer (Tabelle 2.10 unter Sequenzierungsprimer) *forward* oder *reverse* mit einer Konzentration von 10 pmol/µl versetzt. Die Sequenzierung wurde bei eurofins genomics in Auftrag gegeben.

3.1.4 RNA-Aufreinigung aus eukaryotischen Zellen

Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels des RNA-Miniprep Kits von Agilent. Dabei wurde ausschließlich nach den Angaben des Herstellers verfahren. Für die Aufreinigung wurde pro Probe eine 70-80% konfluent bewachsene Schale Zellen eingesetzt.

3.1.5 Reverse Transkription und Synthese der cDNA

Die extrahierte RNA wurde mit Hilfe des Omniscript RT Kits in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde je 1 µg RNA in einem Volumen von 12 µl angesetzt. Die Konzentration der RNA wurde zuvor mittels NanoDrop Mikrovolumen Spektralphotometer (VWR) gemessen (Abschnitt 3.1.2). Für jede Probe wurde auch eine Negativkontrolle, im folgenden als MOCK bezeichnet, für die qPCR vorbereitet. Die Negativkontrolle enthält keine Reverse Transkriptase. Zusätzlich wurde noch eine Nullkontrolle verwendet, die statt cDNA nur Wasser enthält. Die RNA wurde mit DEPC-Wasser aus dem Kit verdünnt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Mastermix für die Reverse Transkription wie in Tabelle 3.6 angesetzt. Zu jeder Probe wurden 8 µl Mastermix gegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 3.6: Pipettierschema des Mastermix für die Reverse Transkription

Komponenten	Proben	MOCK
Reverse Transkriptase Puffer 10x (Qiagen)	2 µl	2 µl
dNTPs (5mM)	2 µl	2 µl
Oligo dT Primer 0,05 µg/µl	2 µl	2 µl
RNAse Inhibitor 40 U/µl	2 µl	2 µl
Wasser	-	1 µl
Reverse Transkriptase (Qiagen)	1 µl	-

3.1.6 Quantitative *Real-time*-PCR Analyse (qPCR)

Die Genexpression spezifischer Gene wurde mit Hilfe einer *Real-Time* PCR (qPCR) quantifiziert. Dabei interkaliert der Farbstoff *SYBR Green* in die doppelsträngige DNA und das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur gebildeten Menge an DNA-Amplifikaten. Der Ct-Wert (*Cycle Threshold*) gibt an ab welcher Zykluszahl an Amplifikationen ein bestimmter Schwellenwert erreicht wird und die Amplifikationskurve in die exponentielle Phase übergeht (Ponchel *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden Lipid-Metabolismus assoziierte Proteine mittels qPCR analysiert und β -Aktin (ACTB) als Referenzgen verwendet. Die dafür eingesetzten Primer sind in Tabelle 2.10 unter qPCR-Primer gelistet. Für jedes untersuchte Gen wurden technische Triplikate in einer 96-well Platte (StarLab) mit einem Gesamtvolumen von 25 μ l angesetzt. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.7 und 3.8 aufgeführt. Die Messung erfolgte mit dem qPCR-Detektionssystem von Bio-Rad. Die Analyse der Ct-Werte und Ermittlung der relativen Expressionslevel erfolgte mit dem *relative expression software tool* (REST 2009) von Qiagen.

Tabelle 3.7: Pipettierschema des qPCR-Ansatzes

Komponenten	Proben	MOCK	Nullkontrolle
cDNA Lösung	1 μ l	1 μ l	-
Primer for 10 pmol/l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
Primer rev 10 pmol/l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
Wasser	10,5 μ l	10,5 μ l	11,5 μ l
SensiMix SYBRGreen	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l

Tabelle 3.8: Reaktionsbedingungen der qPCR

Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
95 °C	3 min	1
95 °C	10 s	1
60 °C	10 s	35
72 °C	30 s	
95 °C	10 s	
65 °C	1 min	1
95 °C	5 s	1

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Inkulturnahme und Kultivierung von HeLa und H4 Zellen

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden HeLa und H4 Zellen kultiviert (Tabelle 2.11). HeLa Zellen sind menschliche Epithelzellen, die vom humanen Papillomvirus 18 befallen waren und entstammen ursprünglich von einem Zervixkarzinom der Patientin Henrietta Lacks (Tang *et al.*, 2021; Laundry *et al.*, 2013). Die verwendeten H4 Zellen sind Epithelzellen aus einem Neurogliom eines Patienten und beinhalten zudem ein *tet-off* System, das der kontrollierten Überexpression von α -Synuclein dient. Um die Überexpression zu stoppen wurden die Zellen

72 h mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin behandelt (Seebauer *et al.*, 2022). Die HeLa-Zellen wurden kontinuierlich mit DMEM kultiviert und bei jeder Passage zentrifugiert, während die H4-Zellen mit OptiMEM kultiviert wurden und nur alle 14 Tage zentrifugiert wurden (Tabelle 2.4).

Zur Inkulturnahme wurden die in Stickstoff eingefrorenen Zellen im Wasserbad zügig aufgetaut und in 6 ml Medium überführt. Nach Zentrifugation (RT, 311 g, 4 min) wurden die Pellets in 5 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine 6 cm Schale überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Zum Passagieren wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen einfach mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin auf den Zellrasen gegeben und die Zellen für 2 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Trypsinwirkung wurde mit Medium abgestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (RT, 311 g, 4 min). Nach anschließender Resuspension des Pellets in neuem Medium wurden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer neuen Schale ausgesät. Die Zellmenge wurde dabei anhand der Fläche der Zellschale und der berechneten Zellzahl bestimmt (Gleichung 3.2).

$$\text{Zellmenge} = \frac{\text{gewünschte Zellzahl} \cdot \text{Fläche in cm}^2}{\text{berechnete Zellzahl}} \quad (3.2)$$

Für die Experimente wurden Zellmengen von $1 \cdot 10^4 - 2,5 \cdot 10^4$ Zellen pro cm² eingesetzt. Für die Proteinanalytik wurden die Zellen auf 6-well Platten oder 6 cm Schalen ausgesät, für die Immunfluoreszenz wurden Deckgläschen in 24-well Platten vorgelegt und die Zellsuspension dazugegeben.

3.2.2 Herstellung von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Für die Kryokonservierung von Zellen wurde eine 70-80% konfluent bewachsene 10 cm Schale trypsiniert, zentrifugiert (RT, 311 g, 4 min) und das Pellet in Konservierungsmedium (90% DMEM (v/v) und 10% DMSO (v/v)) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryogefäße überführt und in Kryoboxen von Thermo Fisher Scientific, welche für eine regulierte Gefriereschwindigkeit mit Isopropanol gefüllt wurden, bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Lagerung unter flüssigem Stickstoff.

3.2.3 Elektroporation

Bei der Transfektion von Zellen mittels Elektroporation wird das Membranpotenzial der Zelle kurzzeitig durch elektrische Impulse gestört, sodass Poren in der Membran entstehen und Nukleinsäuren aufgenommen werden können (DeBruin *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Elektroporation ausschließlich für die Transfektion von siRNA in HeLa- und H4-Zellen verwendet. Für die Elektroporation wurden Elektroporationsküvetten der Marke Sigma-Aldrich verwendet. Pro Küvette wurden 15 μg siRNA und $80 \cdot 10^4 - 100 \cdot 10^4$ Zellen eingesetzt. Die siRNA wurde mit Elektroporationspuffer auf ein Volumen von 200 μl aufgefüllt und in der Küvette vorgelegt. Die entsprechende Menge Zellen wurde nach dem Trypsinieren in 200 μl Elektroporationspuffer (Tabelle 2.4) aufgenommen und zur vorgelegten siRNA in der Küvette gegeben. Die Elektroporation wurde mit dem *Elektroporator Nucleofactor 2b* von Lonza durchgeführt, wobei für HeLa-Zellen

das Programm U-024 und für H4-Zellen das Programm G-013 verwendet wurde. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in der Küvette 8 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine Zellschale mit frischem Medium gegeben und die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator gelagert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 h wurden die Zellen für die Proteinanalytik geerntet oder für Immunfluoreszenz-Färbungen fixiert.

3.2.4 Calcium-Phosphat-Präzipitation

Bei der Calcium-Phosphat Präzipitation werden DNA-Calcium-Phosphat Präzipitate gebildet, die über Endocytose von den Zellen aufgenommen werden (Nature Methods, 2005). Die Methode der Calcium-Phosphat Transfektion wurde in der vorliegenden Arbeit zur Aufnahme von Plasmid-DNA in HeLa-Zellen verwendet. Zur Transfektion wurden die Zellen 24 h im Voraus ausgesät, sodass sie am Folgetag eine Dichte von 60-70% erreichten. Für die Transfektion wurde ein Reaktionsansatz direkt zum Zellrasen gegeben. Ein typischer Reaktionsansatz für die Calcium-Phosphat-Transfektion ist in Tabelle 3.9 dargestellt und die für die Transfektion eingesetzten Volumina in Tabelle 3.10. Dabei wurde 2x HBS (Tabelle 2.4) tropfenweise unter leichtem Schwenken dazugegeben und der Reaktionsansatz vor der Zugabe zu den Zellen 30 min inkubiert, um die Bildung der DNA-Calcium-Phosphat Präzipitate zu ermöglichen. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 h wurden die Zellen für die Proteinanalytik geerntet oder für die Immunfluoreszenz fixiert.

Tabelle 3.9: Reaktionsansatz der Calcium-Phosphat-Transfektion

Komponenten	Menge
Wasser	420 µl
Calciumchlorid 2 M	60 µl
DNA	10 µg
2x HBS	480 µl

Tabelle 3.10: verwendete Volumina für die Calcium-Phosphat-Transfektion

Zellschale	Menge
10 cm	1 ml
6 cm	500 µl
24 well	80 µl

3.2.5 Behandlung von Zellen

Für die Messung der autophagischen Aktivität wurden die Zellen mit Sigma-1 Aktivatoren, ANAVEX2-73 und PRE-084, und einem Inhibitor, BD-1047, behandelt. Dazu wurden die Zellen zunächst 2 h mit 10 µM ANAVEX2-73, PRE-084 oder BD-1047 und anschließend weitere 2 h unter der Zugabe von 2 µM Bafilomycin oder DMSO für die Negativkontrolle behandelt (Christ *et al.*, 2019).

Zur Untersuchung des Wachstums von Lipidtröpfchen wurden Zellen je 3, 6, 9 oder 12 h mit Ölsäure oder EBSS behandelt. Dazu wurde an BSA gekoppelte Ölsäure mit einer Konzentration von 200 µM eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde BSA in der gleichen Menge

verwendet (Bekbulat *et al.*, 2020).

Zur Untersuchung von ER-Stress in Zellen wurden diese mit den ER-Stressoren Tunicamycin und Thapsigargin behandelt. Dabei wurden die Zellen 48 h mit 1 µg/ml Tunicamycin und 24-72 h mit 1 µM Thapsigargin inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen 2 h mit BD1047 vorbehandelt.

3.2.6 Bestimmung der autophagischen Aktivität in eukaryotischen Zellen

Zur Messung der autophagischen Aktivität in eukaryotischen Zellen wurde der LC3b-II Flux ermittelt. Dazu wurden Zellen am Vortag auf 6 cm Schalen ausgesät, sodass sie eine Konfluenz von 70-80% erreichten. Die Zellen wurden zur Anreicherung von LC3b-II mit 2 µM Bafilomycin A1 für 2-4 h behandelt. Die Kontrollschalen erhielten DMSO. Zur Induktion der Autophagie wurde ein zusätzlicher Probensatz mit EBSS sowie Bafilomycin A1 oder DMSO angesetzt. LC3b-II wurde im Western Blot (Abschnitt 3.3.4) nachgewiesen und anschließend die Differenz aus den mit Bafilomycin behandelten Proben und den entsprechenden Kontrollproben ermittelt, um den Umsatz von LC3b-II zu bestimmen. Der sogenannte Flux wurde als Maß für die autophagische Aktivität verwendet (Bekbulat *et al.*, 2020).

3.3 Proteinanalytik

3.3.1 Lysieren von Zellen

Für die Zelllyse von HeLA-Zellen wurden zunächst das Medium abgenommen und der Zellrasen anschließend mit DPBS gewaschen. Für eine 6 cm Schale wurden 80 µl und für eine 10 cm Schale 160 µl 1x SDS-Lysispuffer (Tabelle 2.5) zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Scraper von der Platte entfernt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Ultraschallbehandlung bei 80% Amplitude für dreimal 3 s *on* und *off* wurden die Lyse 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend bei -80 °C gelagert.

Für die Zelllyse von H4-Zellen wurde der 1x Triton-Lysispuffer (Tabelle 2.5) verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen und geerntet. Das Pellet wurde anschließend in 1x Triton-Lysispuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es wurden drei *Freeze-Thaw*-Zyklen durchgeführt. Dazu wurden die Proben im Wechsel jeweils 2 min bei -80 °C und 2 min bei 37 °C gelagert. Nach Zentrifugation (4 °C, 17.000 g, 20 min) wurde der Überstand bei -20 °C gelagert (Seebauer *et al.*, 2022).

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA-Protein-Assay Kit verwendet. Dazu wurde eine Reaktionslösung nach den Angaben des Herstellers angesetzt. In eine transparente 96-well Platte wurden in die benötigten Wells je 199 µl der Reaktionslösung vorgelegt. In die Wells wurden je 1 µl Probe oder Standard dazugegeben und der komplette Ansatz mittels des VarioSkan LUX für 30 s bei 600 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Die Absorption wurde bei 560 nm gemessen. Die Konzentration wurde durch die mittels der Standards erstellte Standardkurve bestimmt. Die Standards wurden als Duplikate und die Proben als Triplikate angesetzt. Tabelle 3.11 zeigt

das Pipettierschema für die verwendeten Standards. Für das Ansetzen der Standards wurde eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt, die dem Kit beigelegt ist.

Tabelle 3.11: Pipettierschema der Standards für die Proteinbestimmung mittels BCA-Test

BSA-Konzentration im well	Wasser	BSA
0	200 µl	-
5	150 µl	50 µL
10	100 µl	100 µL
15	50 µl	150 µl
20	-	200 µL

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden anhand eines SDS-PAGE aufgetrennt. Die dafür verwendeten Gele wurden wie in Tabelle 3.12 aufgeführt angesetzt und ausschließlich als 1,5 mm Gele gegossen. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.5 gelistet. Es wurden 10-20 µg Protein eingesetzt und die Proben mit 4x Probenpuffer versetzt. Nach Erhitzen bei 95 °C für 5 min wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf die Gele aufgetragen. Die Proben wurden zunächst bei 80 V bis zum Erreichen des Trenngels und anschließend bei 130 V aufgetrennt.

Tabelle 3.12: Pipettierschema für die Gelvorbereitung

Komponenten	10%	12%	15%	4%
Wasser	5 ml	4,5 ml	3,75 ml	6,5 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	-	-	2,5 ml
Acrylamid	2,5 ml	3 ml	3,75 ml	750 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

3.3.4 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot

Mittels Western Blot wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde sowohl die Methode des Wet Blot als auch des Trans-Turbo-Blot eingesetzt. Für den Wet Blot wurde Whatman Gel Blotting Papier (Merck) und Tris-Glycin Blot Puffer verwendet (Tabelle 2.5). Die Proteine wurden über Nacht in einem Mini-Trans-Blot-Cell-System (BioRad) bei konstant 30 V auf eine Nitrocellulose-Membran (Sigma) übertragen. Für den Trans-Turbo-Blot wurden *Transfer stacks* und Nitrocellulose-Membranen von Bio-Rad aus dem Trans-Blot Turbo Transfer Kit verwendet. Zum Blotten wurden das Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad) und der Trans-Blot Turbo Blotpuffer (BioRad) verwendet. Der Transfer erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei die Zeit auf 12 statt 10 min angepasst wurde.

3.3.5 Detektion der membrangebundenen Proteine

Die für die Detektion von membrangebundenen Proteinen mittels Chemolumineszenz verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.5 gelistet. Zur Detektion der membrangebundenen Proteine wurde die Membran zunächst 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T inkubiert und anschließend dreifach mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der Primärantikörper wie in Tabelle 2.7 aufgeführt in TBS-T verdünnt und mit 0,02% Natriumazid versetzt. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde erneut dreifach mit TBS-T für jeweils 5 min gewaschen. Die mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper wurden 1:10.000 mit TBS-T verdünnt (Tabelle 2.7) und für 1 h bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Nach erneutem dreifachen Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min wurde die Membran mittels Chemolumineszenz mit dem Armasham Imager entwickelt. Dazu wurde je nach Sensitivität des verwendeten Primärantikörpers entweder die Entwicklerlösung Immobilon Western von Merck oder eine selbst angesetzte ECL-Lösung verwendet, bestehend aus 1 ml Lösung A, 100 µl Lösung B und 1 µl 30%-igem Wasserstoffperoxid.

3.3.6 Isolation der MAM

Zur Isolation der MAM, der Mitochondrien-ER assoziierten Membran, wurde das Protokoll von R. Wieckowski verwendet. Die hierfür verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. Für jede Probe wurden 20 x 15 cm Schalen oder 50 x 10 cm Schalen mit einer Konfluenz von 70-80% eingesetzt. Die Zellen wurden nach Abnehmen des Mediums zweifach mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und die Zellschalen mit DPBS gewaschen. Die übrigen Zellen wurden mit PBS von der Schale abgeschabt und mit den trypsinierten Zellen vereinigt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (RT, 600 g, 5 min), das Medium abgenommen und die Zellen in 20 ml PBS aufgenommen. Der Schritt wurde zweifach wiederholt und die Zellen anschließend in 20 ml *Starting Buffer* 2 resuspendiert.

Die Zellen wurden mittels eines elektronischen Homogenisators nach Potter aufgeschlossen. Es wurde bei 1500 rpm homogenisiert und der Kolben 60 x hoch und- runtergezogen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (RT, 600 g, 5 min) und die Zentrifugation mit dem erhaltenen Überstand wiederholt. Der Überstand wurde anschließend bei 7000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet, die mitochondriale Fraktion, in 20 ml eiskaltem *Starting Buffer* 1 aufgenommen. Der Überstand enthält das Zytosol, die Lysosomen und das endoplasmatische Retikulum. Die Mitochondriale Fraktion wurde erneut zentrifugiert (4 °C, 7000 g, 10 min), das erhaltene Pellet in 20 ml *Starting Buffer* 1 resuspendiert und nochmals zentrifugiert (4 °C, 10.000 g, 10 min). Das gewonnene Pellet wurde anschließend in 2 ml kaltem MRB-Puffer aufgenommen.

Zur Trennung der MAM und der reinen mitochondrialen Fraktion wurde ein Percoll Gradient genutzt. Dazu wurden 8 ml Percoll Medium in ein 14 ml Polyallomer Ultrazentrifugen Gefäß der Firma Beckmann gefüllt. Die unreine mitochondriale Fraktion wurde auf das Percoll-Medium geschichtet und anschließend mit circa 3,5 ml Percoll-Medium überschichtet. Die Proben wurden mit einer L-100 K Ultrazentrifuge von Beckmann bei 95.000 g für 30 min bei 4 °C in einem SW40Ti-Rotor zentrifugiert (Wieckowski *et al.*, 2009).

Anschließend wurde die MAM-Fraktion (obere Fraktion) und die reine mitochondriale Fraktion (untere Fraktion) mit einer 14-Gauge-Kantile (Sterican) gesammelt. Die Fraktionen wurden auf je 15 ml mit MRB-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (4 °C, 6300 g, 10 min). Der Überstand der reinen mitochondrialen Fraktion wurde verworfen, das Pellet in 15 ml frischem MRB-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 200 µl MRB-Puffer aufgenommen. Der Überstand der MAM-Fraktion wurde in ein Polycarbonat Gefäß von Beckmann überführt und in einem 70Ti-Rotor für 1 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 200 µl MRB-Puffer aufgenommen. Die Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert (Wieckowski *et al.*, 2009).

3.3.7 Isolation einer unlöslichen Fraktion zur Analyse von Proteinaggregaten

Für den Proteinaggregationsassay wurde je eine 70-80% konfluente 10 cm Schale eingesetzt. Die Zellen wurden einfach mit DPBS gewaschen und in DPBS durch Zentrifugation (4 °C, 1523 g, 5 min) geerntet. In den weiteren Schritten wurde DPBS mit PIC verwendet. Dazu wurde pro 1 ml DPBS 40 µl 25x PIC zugefügt. Das Zellpellet wurde in 300 µl DPBS resuspendiert und vierfach für je 4 s bei 40% Amplitude sonifiziert. Nach Zentrifugation (4 °C, 17.000 g, 15 min) wurde der Überstand als lösliche Fraktion in neue Reaktionsgefäße überführt. Das Pellet wurde erneut in DPBS aufgenommen, sonifiziert und zentrifugiert (4 °C, 17.000 g, 15 min). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 150 µl 1x SDS-Lysispuffer (Tabelle 2.5) aufgenommen, vierfach für je 10 s sonifiziert und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden bis zur Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Test bei -80 °C gelagert.

3.3.8 Proteomics-Analyse

Die Proteomics-Analyse in der vorliegenden Arbeit wurde von Kooperationspartnern durchgeführt (Perumal *et al.*, 2015). Für die Proteomics-Analyse wurden die Zellpellets in PBS geerntet und im T-PER Tissue Protein Extraktions Reagenz sowie mit Stahlperlen mittels eines Homogenisators homogenisiert. Der Überstand des Zellhomogenats wurde mittels eines 3 kDa Zentrifugalfilters gereinigt und der Puffer substituiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Test bestimmt. Die Proteomics-Analyse wurde mittels eines nano-LC Systems mit der analytischen Säule nanoViper, PePMap RSCL, 75 µm x 25 cm durchgeführt. Für die Flüssigchromatographie wurden die folgenden Lösungsmittel eingesetzt: Lösung A, bestehend aus LC-MS Wasser mit 0,1% Ameisensäure (v/v) und Lösung B, bestehend aus LC-MS Acetonitril mit 20% Wasser (v/v) und 0,1 % Ameisensäure (v/v). Das LC-MS System war direkt an das ESI-LTQ-Orbitrap-XL MS-System gekoppelt mit dem kontinuierlich Massenspektrometer-Daten detektiert wurden. Dabei wurde die positive Ionenspray Ionisierungsmethode mit einer Spannung von 2,15 kV und eine Kapillartemperatur von 220 °C genutzt. Die massenspektrometrischen Daten wurden mittels *MaxQuant computational proteomics* Version 2.2.0.0 analysiert. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit der Perseus Software (Version 2.0.7.0). Für jeden Vergleich wurde dazu ein t-test verwendet, wobei ein p-Wert unter 0,05 als signifikant betrachtet wurde.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Immunfluoreszenz-Färbungen

Zur Färbung von Zellen mit spezifischen Antikörpern wurden diese zunächst fixiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einfach gewaschen und anschließend 20 min bei Raumtemperatur mit einer 4%-igen Phosphat-gepufferten Formaldehydlösung inkubiert. Nach dreifachem Waschen wurden die Zellen mit 0,1% Triton-X100 in DPBS für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut dreifach mit DPBS gewaschen und zum Blockieren 1 h bei Raumtemperatur mit 2% BSA inkubiert. Die Antikörper für die Immunfärbungen wurden entsprechend Tabelle 2.7 mit 10% FCS (v/v) in DPBS verdünnt. Nach erneutem zweifachen Waschen wurden die Zellen 2 h bei Raumtemperatur mit Primärantikörper inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer dreifacher Waschschrift. Die Zellen wurden mit Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde eine Lösung von DAPI 500 µg/ml und Bodipy 493/503 5 µg/ml in DPBS angesetzt und die Zellen damit für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreifachen Waschen wurden die Deckgläschen mit Fluoromount-G auf einem Objektträger angebracht und zusätzlich mit Nagellack fixiert (Schrul und Kopito, 2016). Alle Waschschrift wurden mit DPBS ausgeführt.

3.4.2 Aufnahmen am konfokalen *Laser-scanning* Mikroskop

Für die Mikroskopie-Aufnahmen wurde das konfokale *Laser-scanning* Mikroskop LSM710 der Marke Zeiss mit der *Software* ZEN 2011 SP2 V.8.0 verwendet. Die Aufnahmen wurden bei einer Auflösung von 1024 x 1024 mit Objektiven der Vergrößerung 40-100x durchgeführt. Für die Quantifizierung von Punctae und die Analyse von Kolokalisierungen wurde das Programm Fiji Image J 64 V5 benutzt. Bei Kolokalisierungen wurde dabei mittels des Coloc 2 Tools innerhalb von Image J der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt. Es wurden für jedes Experiment 3-5 biologische Replikate angefertigt und die statistische Auswertung mit Graph Pad Prism 10 durchgeführt.

3.5 Lipidbasierte Methoden

3.5.1 Phospholipid-Quantifizierung

Zur Bestimmung der Phospholipid-Konzentration in den Proben wurde das Phospholipid-Quantification Kit von Sigma-Aldrich verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.5.2 Cholesterin-Quantifizierung

Zur Cholesterin-Bestimmung wurde das Cholesterol/Cholesterol-Ester Glo Assay Kit von Promega verwendet. Mit dem Kit wurde die Menge an freiem Cholesterin in den Proben bestimmt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden je Experiment 3-5 biologische Replikate angefertigt. Zur Bestimmung des p-Wertes wurde der t-test mit Welch-Korrelation für den Vergleich von zwei Proben untereinander verwendet. Bei mehr als zwei Proben wurde der *One-Way* oder *Two-Way* ANOVA Test benutzt. Die statistischen Bestimmungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 10 durchgeführt. Ein ermittelter p-Wert unter 0,05 wurde dabei als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Sigma-1-Rezeptors (Sigma1R) im Lipid-Metabolismus, sowie bei der Autophagie und der damit verbundenen Aggregation von Proteinen untersucht. Da der Sigma-1-Rezeptor an der MAM lokalisiert ist und die MAM eine relevante Plattform in Säugetierzellen für die Funktion der Autophagie und des Lipid-Metabolismus darstellt, wurde zudem ein besonderes Augenmerk auf den Zusammenhang des Sigma-1-Rezeptors und der Funktionsweise der MAM gelegt (Hayashi und Su, 2007; Hamasaki *et al.*, 2013; Rusinol *et al.*, 1994; Vance, 1990; Degechisa *et al.*, 2022). Für die Analysen wurden *in vitro* Experimente an HeLa und H4 Zelllinien durchgeführt, die genetisch und pharmakologisch manipuliert wurden, um die Funktionen des Sigma-1-Rezeptors zu untersuchen.

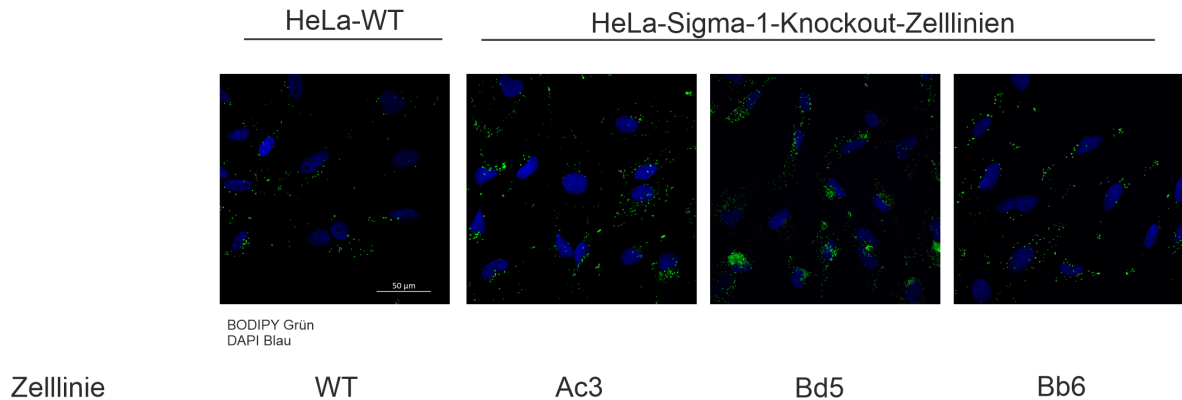
4.1 Die Rolle des Sigma-1-Rezeptors bei der Dynamik von Lipid-Tröpfchen

4.1.1 Charakterisierung von stabilen Sigma-1-Knockout Zelllinien

Zur ersten Charakterisierung der über Crispr/Cas9 generierten Sigma-1-Knockout (Sigma1R-KO) Linien in HeLa Zellen wurde die Dynamik von Lipid-Tröpfchen analysiert. Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Sigma1R-KO Zelllinien wurden innerhalb der Dissertation von einem/r Mitarbeiter/in hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Benennung der Sigma1R-KO Zelllinien wurde von einem/r Mitarbeiter/in eingeführt und für die vorliegende Arbeit beibehalten. Für die Charakterisierung wurden die Zellen mit Bodipy 493/503 gefärbt, welches aufgrund seiner aromatischen Struktur lipophil ist und vor allem in hydrophoben Bereichen innerhalb der Zelle akkumuliert. Da Lipid-Tröpfchen neutrale Lipide enthalten, werden durch Bodipy vor allem die Lipid-Tröpfchen der Zelle gefärbt (Zhu, *et al.* 2023; Kowada *et al.*, 2012). Eine Auswahl der charakterisierten Sigma-1-Knockout Zelllinien und eine Übersicht über die Phänotypen der Sigma-1-Knockout Zelllinien hinsichtlich der Lipid-Tröpfchen ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Insgesamt wurden 14 Sigma1R-KO Zelllinien untersucht, die in Tabelle 2.11 aufgeführt sind. Die Lipid-Tröpfchen Akkumulation wurde dabei anhand von zwei Replikaten bestimmt. Von den insgesamt 14 charakterisierten Sigma1R-KO Zelllinien konnte bei 10 eine Akkumulation in Form einer gesteigerten Anzahl der Lipid-Tröpfchen festgestellt werden (Abbildung 4.1A und B), unter anderem bei den Sigma1R-KO Zelllinien Bd5 und Ac3 (Abbildung 4.1A). Es existierten aber Sigma1R-KO Zelllinien, die keine Akkumulation der Lipid-Tröpfchen zeigten, wie zum Beispiel der Knockout Bb6 (Abbildung 4.1A). Da die Mehrheit der untersuchten Sigma1R-KO Zelllinien eine Akkumulation der Lipid-Tröpfchen zeigte, steht die veränderte Lipid-Tröpfchen Dynamik vermutlich im Zusammenhang mit dem Verlust des Sigma-1-Rezeptors und ist kein klonaler Effekt.

(A)



(B)

Verteilung des Phänotyps der Lipid-Tröpfchen Akkumulation in den Sigma-1-Knockout Zelllinien



Abbildung 4.1: Lipid-Tröpfchen Akkumulation in den Sigma1R-KO Zelllinien. (A) Mikroskopische Aufnahmen der Sigma1R-KO Zelllinien Ac3, Bd5 und Bb6 im Vergleich zum Wildtyp nach Färbung mit Bodipy (Grün) und DAPI (Blau) mit einer 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (B) Verteilung des Phänotyps der Lipid-Tröpfchen Akkumulation in den Sigma1R-KO Zelllinien. Die mikroskopische Analyse von 14 Sigma1R-KO Zelllinien zeigt bei 10 von 14 eine Akkumulation der Lipid-Tröpfchen.

4.1.2 Der Sigma-1-Rezeptor moduliert den Metabolismus von Lipid-Tröpfchen

4.1.2.1 Quantifizierung von Lipid-Tröpfchen in HeLa-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung wurden zwei von 14 Sigma1R-KO Zelllinien hinsichtlich der Anzahl an Lipid-Tröpfchen pro Zelle mit dem Wildtyp verglichen (Abbildung 4.2). Es wurden in der vorliegenden Arbeit stellvertretend die beiden Sigma1R-KO Zelllinien Bd5 und Bf9 untersucht. Nach Färbung mit Bodipy wurde die Anzahl an Lipid-Tröpfchen mittels Image J bestimmt. Um den Zusammenhang zwischen Lipid-Tröpfchen Akkumulation und dem Sigma-1-Rezeptor weiter zu verifizieren, wurde zusätzlich mittels siRNA ein Sigma-1-Knockdown generiert. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit Bodipy gefärbt und die Anzahl an Lipid-Tröpfchen pro Zelle bestimmt (Abbildung 4.3).

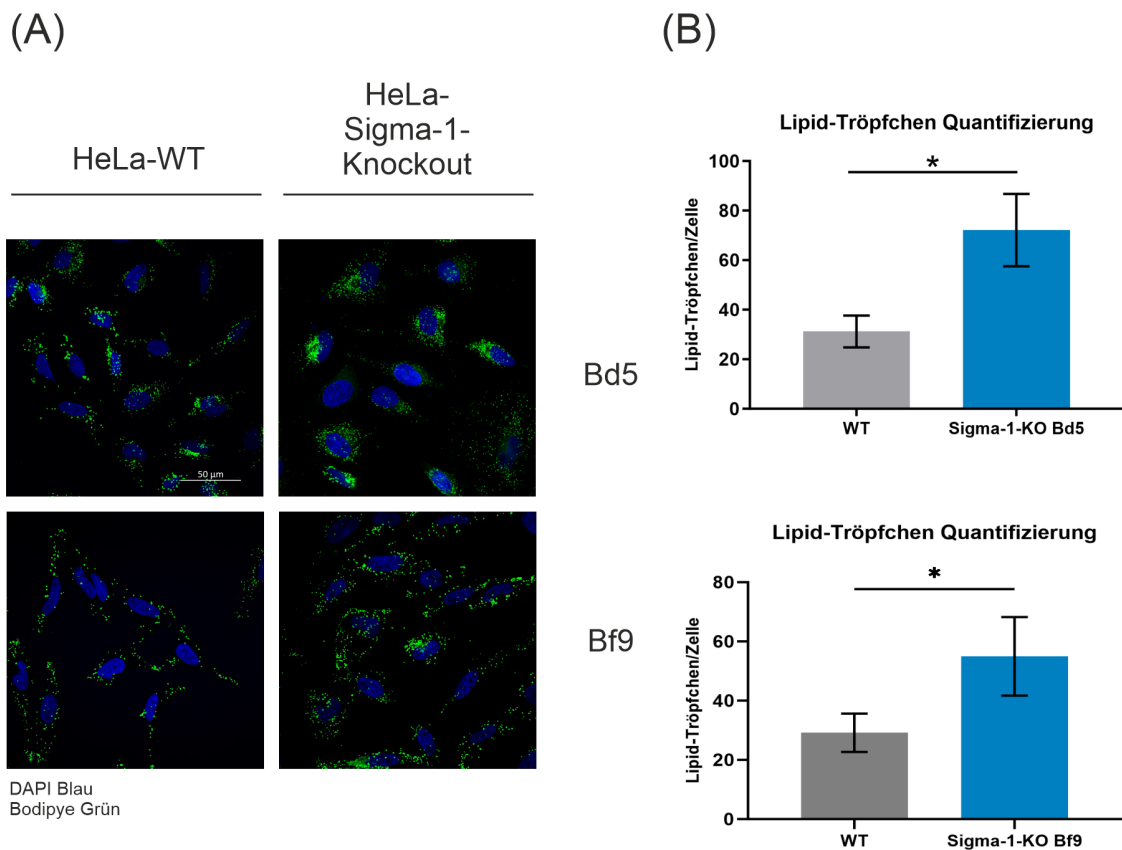


Abbildung 4.2: Lipid-Tröpfchen Quantifizierung in Sigma1R-Knockout Zelllinien. (A) Mikroskopische Aufnahmen der Sigma1R-KO Zelllinien Bd5 und Bf9 nach Färbung mit Bodipy (Grün) und DAPI (Blau) mit einer 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 μm . (B) Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen durchgeführt mit Image J, $*p \leq 0,05$, t-test, $n=3-4$. Die Sigma-1-Knockout Zelllinien Bd5 und Bf9 zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant gesteigerte Anzahl an Lipid-Tröpfchen.

Es konnte in den Sigma-1-Knockout Zelllinien Bd5 und Bf9 eine signifikant erhöhte Anzahl an Lipid-Tröpfchen pro Zelle und somit eine Akkumulation der Lipid-Tröpfchen festgestellt werden (Abbildung 4.2A). Im Sigma1R-KO Bd5 konnten die Lipid-Tröpfchen in ihrer Anzahl um circa 35-40 pro Zelle gesteigert werden, während die Anzahl an Lipid-Tröpfchen im Sigma1R-KO Bf9 um circa 10-20 pro Zelle gesteigert werden konnte (Abbildung 4.2B). Die Ergebnisse aus den Sigma1R-KO Zelllinien Bd5 und Bf9 wurden zur Verifizierung mit denen des generierten Sigma-1-Knockdowns verglichen (Abbildung 4.3). Nach Western-Blot Analyse konnte das relative Expressionslevel des Sigma1R signifikant um circa 70-80% reduziert werden, was eine erfolgreiche Generierung eines Sigma-1-Knockdowns zeigt (Abbildung 4.3A und B). Der Sigma-1-Knockdown zeigte zudem nach Färbung mit Bodipy ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Lipid-Tröpfchen um circa 10-15 pro Zelle relativ zur Kontrolle (Abbildung 4.3C und D).

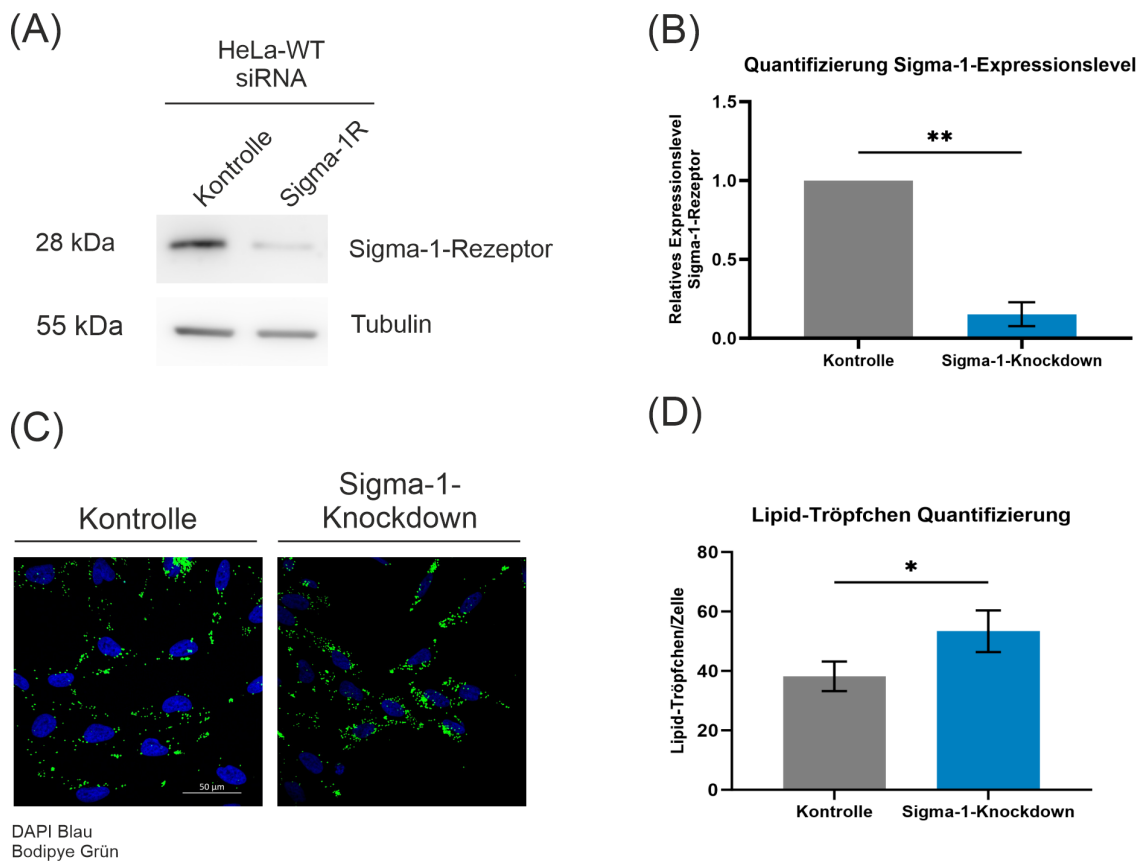


Abbildung 4.3: Lipid-Tröpfchen Quantifizierung nach Knockdown des Sigma-1-Rezeptors in HeLa-Zellen. (A) Western-Blot Analyse des Sigma1R Knockdown in HeLa-WT Zellen 48h nach Transfektion mit siRNA. (B) Quantifizierung des Sigma1R Expressionslevel normiert relativ zur Kontrolle, $** p \leq 0,01$, t-test, $n=3$. Das Expressionslevel des Sigma1R relativ zur Kontrolle konnte um circa 70-80% reduziert werden. (C) Mikroskopische Aufnahmen des Sigma-1-Knockdown im Vergleich zur Kontrolle 48 h nach Transfektion mit siRNA, Färbung mit Bodipy (Grün) und DAPI (Blau), aufgenommen mit 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 μm . (D) Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen durchgeführt mit Image J, $*p \leq 0,05$, t-test, $n=3$. Der Sigma-1-Knockdown zeigt eine signifikant gesteigerte Anzahl an Lipid-Tröpfchen.

Zusätzlich wurde die Anzahl an Lipid-Tröpfchen in Abhängigkeit von der Zelldichte und der Inkubationszeit bestimmt. Diese Analyse wurde ausschließlich im Sigma1R-KO Bd5 durchgeführt. Die Zellen wurden dazu mit verschiedenen Zelldichten ausgesät und für 24 sowie 48 h inkubiert. Nach anschließender Färbung mit Bodipy wurde die Anzahl an Lipid-Tröpfchen mittels Image J quantifiziert (Abbildung 4.4A und B).

Der Phänotyp der Lipid-Tröpfchen Akkumulation in der Sigma-1-Knockout Zelllinie Bd5 zeigte sich über einen weiten Bereich der Zelldichte und nach 24 sowie 48 h konstant (Abbildung 4.4A und B). Die Anzahl an Lipid-Tröpfchen pro Zelle konnte nach 24 h zu allen Bedingungen von circa 20 im Wildtyp auf 40-60 im Sigma1R-KO Bd5 erhöht werden. Nach 48 h Inkubation konnte die Anzahl an Lipid-Tröpfchen pro Zelle von circa 20-30 auf 60-80 erhöht werden. Nach 24 h Inkubationszeit zeigte sich über die verschiedenen Zelldichten hinweg ein geringerer signifikanter Effekt als nach 48 h Inkubationszeit. Besonders stark ausgeprägt ist die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen nach 48 h bei einer Zelldichte von $0,5 \cdot 10^4/\text{cm}^2$

(Abbildung 4.4A und B).

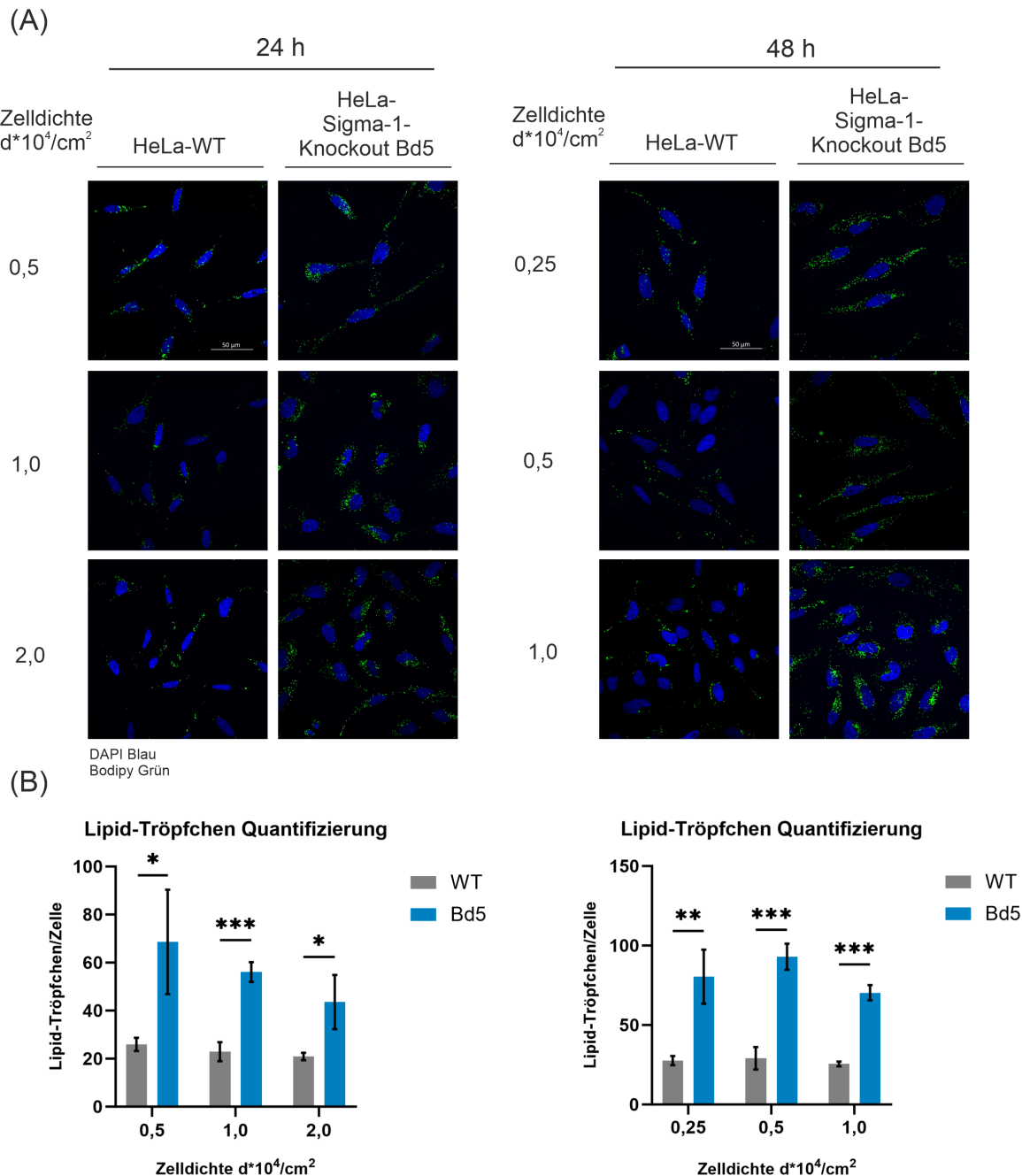


Abbildung 4.4: Lipid-Tröpfchen Akkumulation im Sigma1R-KO Bd5 in Abhängigkeit von der Zelldichte und der Inkubationszeit. (A) Mikroskopische Aufnahmen von HeLa-WT und Sigma1R-KO Zellen Bd5 nach Färbung mit Bodipy (Grün) und DAPI (Blau) mit 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 μm . (B) Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen durchgeführt mit Image J, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, t-test, $n=3$. Die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen blieb im Sigma1R-KO Bd5 in Abhängigkeit von der Dichte und der Zeit erhalten.

4.1.2.2 Nachweis der Sigma-1-Rezeptor abhängigen Lipid-Tröpfchen Akkumulation

Zum Nachweis einer Sigma1R abhängigen Lipid-Tröpfchen Akkumulation wurde ein *Rescue*-Experiment durchgeführt. Dazu wurde der Sigma-1-Rezeptor im Sigma1R-KO Bd5 sowie in

HeLa-WT Zellen mittels Calcium-Phosphat Transfektion überexprimiert und die Anzahl an Lipid-Tröpfchen pro Zelle bestimmt.

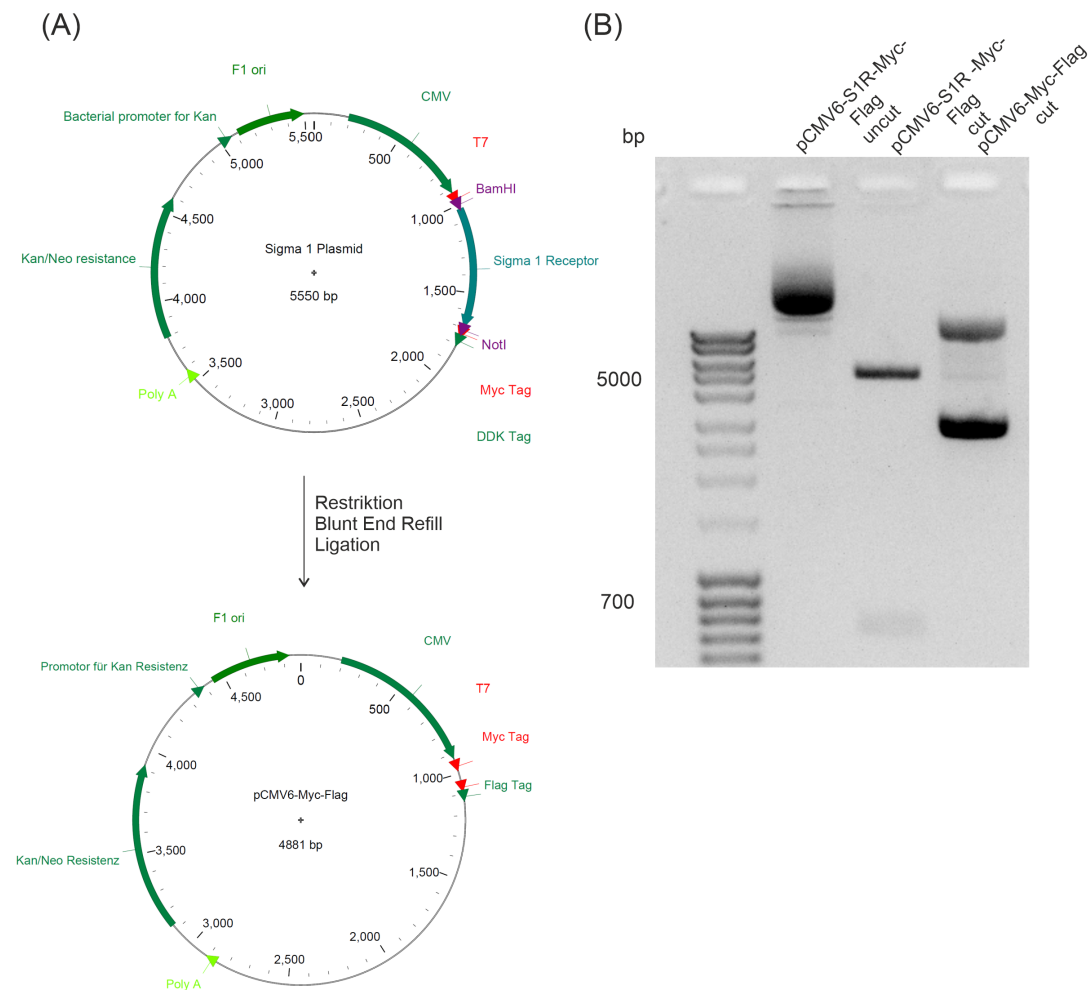


Abbildung 4.5: Generierung des Kontrollplasmids (*Empty Vector*). (A) Plasmidkarten des Vektors pCMV6-Sigma-1-WT-Myc-Flag und des *Empty Vectors* (vergrößerte Darstellung befindet sich im Anhang). Der Vektor wurde mit den Enzymen BamHI und NotI geschnitten und nach *Blunt End* Synthese wieder ligiert. (B) Gelelektrophoretische Analyse der Kontrollrestriktion des synthetisierten *Empty Vectors* im Vergleich zum Plasmid Sigma-1-Flag geschnitten mit den Enzymen BamHI und NotI. Aufgrund der fehlenden Bande bei circa 500 bp im generierten *Empty Vector* war die Generierung des Kontrollplasmids erfolgreich.

Für die Überexpression wurde der Vektor pCMV6-Sigma-1-WT-Myc-Flag (Sigma-1-Flag) sowie das Kontrollplasmid pCMV6-Myc-Flag verwendet, welches im folgenden als *Empty Vector* bezeichnet wird. Der *Empty Vector* enthält im Vergleich zum Konstrukt Sigma-1-Flag keine Sequenz für den Sigma1R. Zur Generierung des *Empty Vector* wurde aus dem Vektor Sigma-1-Flag die Sequenz für Sigma1R ausgeschnitten und nach *Blunt End* Synthese der Vektor wieder ligiert (Abbildung 4.5A). Da die Kontrollrestriktion des generierten *Empty Vectors* keine Bande auf einer Höhe von ungefähr 500 Basenpaaren zeigt für die Sequenz des Sigma1R, war die Generierung des *Empty Vectors* erfolgreich. Es fehlt auch die Bande des linearisierten Plasmids Sigma-1-Flag bei circa 5000 Basenpaaren. Stattdessen zeigt das

geschnittene Kontrollplasmid eine Bande bei circa 4000 Basenpaaren, die den linearisierten *Empty Vector* darstellt. Die obere Bande zeigt vermutlich nicht linearisierte Plasmid-DNA des Kontrollplasmids (Abbildung 4.5B). Eine Sequenzierung bestätigte das Ergebnis zusätzlich.

Für das Rescue-Experiment wurden jeweils in HeLa-Wildtyp (WT) und im Sigma-1-Knockout Bd5 (Sigma1R-KO Bd5) der *Empty Vector* (EV) und der Vektor pCMV6-Sigma-1-WT-Myc-Flag (Sigma-1-Flag) überexprimiert. Die Aufnahme der Plasmide wurde zunächst mittels Western-Blot Analyse untersucht (Abbildung 4.6). Die Anzahl an Lipid-Tröpfchen wurde nach Färbung mit Bodipy und Flag in den Sigma1R (Flag) positiven Zellen bestimmt und mittels Image J quantifiziert (Abbildung 4.7).

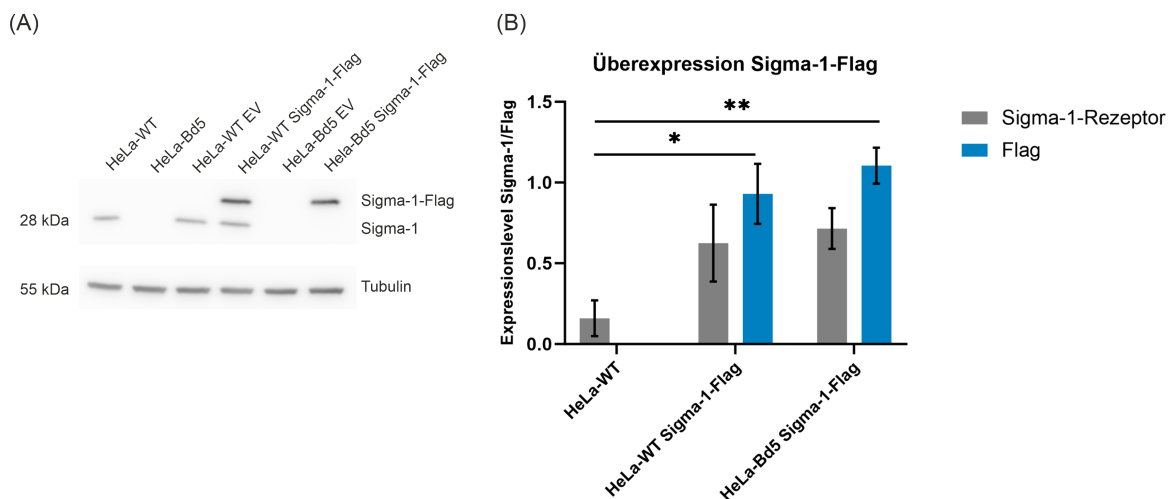


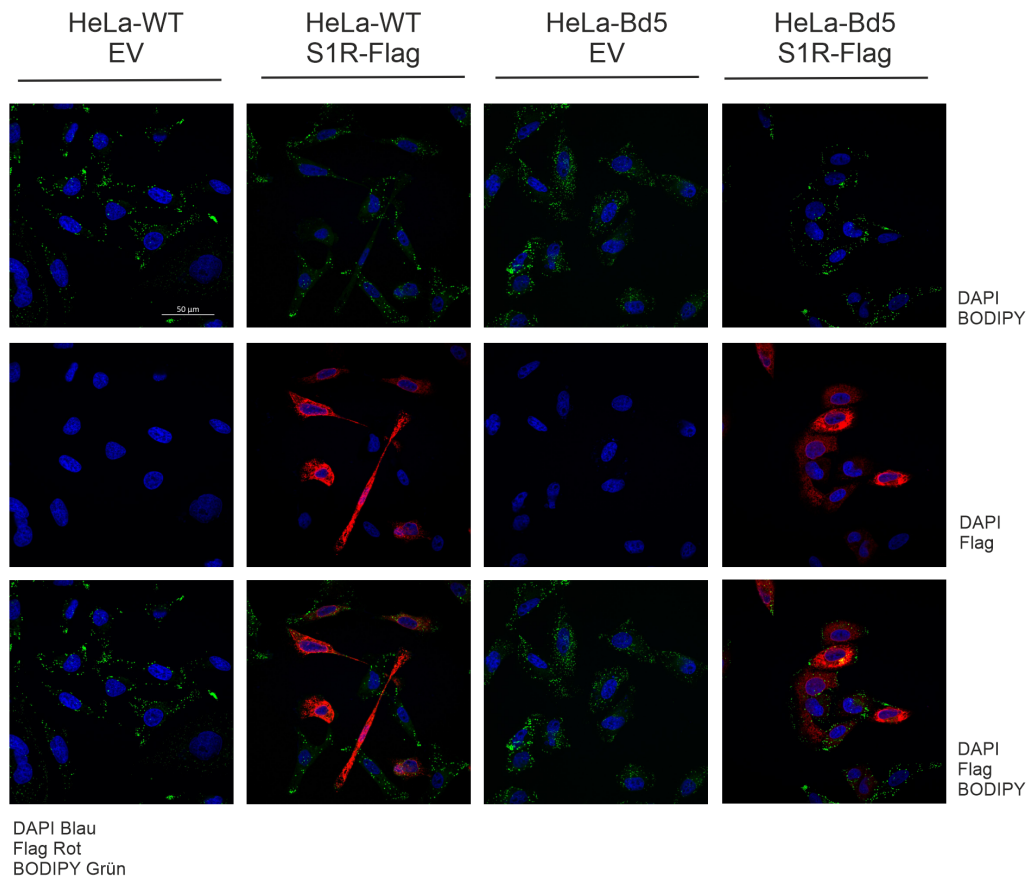
Abbildung 4.6: Überexpression des Sigma-1-Rezeptors in HeLa-WT Zellen und im Sigma-1-Knockout Bd5. (A) Western-Blot Analyse zur Aufnahme des Plasmids Sigma-1-Flag im Vergleich zum *Empty Vector* 48 h nach der Transfektion. (B) Quantifizierung des Western-Blots, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, t-test, $n=3$. Das Sigma-1-Flag Plasmid konnte in Wildtyp und in Sigma1R-KO Zellen Bd5 signifikant aufgenommen werden.

Die Aufnahme der Plasmide konnte mittels Westen-Blot Analyse gezeigt werden durch das Auftreten der intensiven Bande knapp oberhalb des endogenen Sigma1R bei einer Größe von circa 30-35 kDa (Abbildung 4.6A). Das Plasmid Sigma-1-Flag konnte verglichen zum endogenen Sigma1R Expressionslevel gleichermaßen in HeLa-WT Zellen als auch in die Sigma1R-KO Zellen Bd5 aufgenommen werden (Abbildung 4.6B).

Nach Transfektion der Zellen mit dem *Empty Vector* zeigte der Sigma1R-KO Bd5 trotzdem noch eine deutlich signifikant erhöhte Anzahl von circa 40-50 auf 80-90 Lipid-Tröpfchen pro Zelle im Vergleich zum HeLa-WT (Abbildung 4.7A und B). Der Phänotyp der Lipid-Tröpfchen Akkumulation blieb daher nach der Überexpression mit dem *Empty Vector* erhalten. Während die Überexpression des Konstrukts Sigma-1-Flag keinen Effekt in HeLa-WT Zellen zeigte, konnte die Anzahl an Lipid-Tröpfchen im Sigma1R-KO signifikant von circa 80-90

auf 50-60 pro Zelle reduziert werden, was dem ursprünglichen Level an Lipid-Tröpfchen im WT nach Transfektion mit dem *Empty Vector* entspricht. Der Phänotyp der Lipid-Tröpfchen Akkumulation ist demnach ein Sigma1R abhängiger Prozess.

(A)



(B)

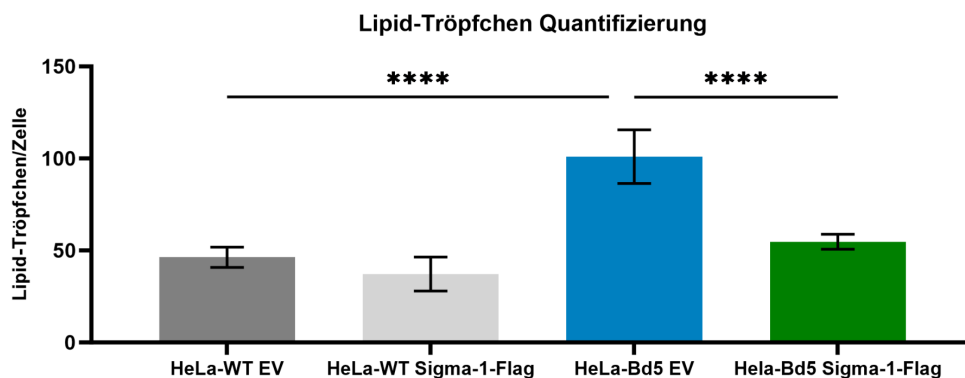
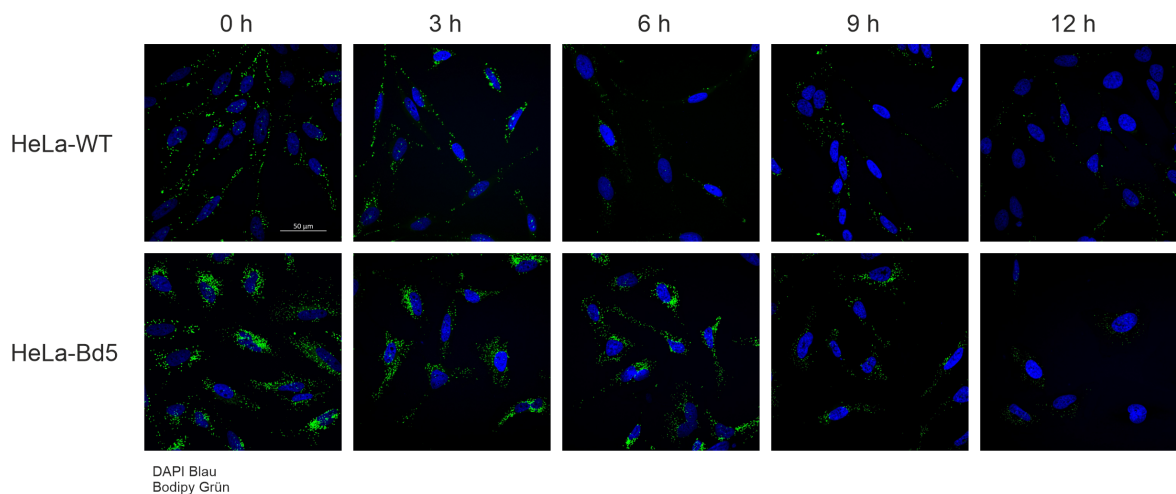


Abbildung 4.7: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Überexpression des Sigma-1-Rezeptors. (A) Mikroskopische Aufnahmen von WT und Sigma1R-KO Bd5 48 h nach Transfektion mit dem Plasmid Sigma-1-Flag gefärbt mit Bodipy (Grün), DAPI (Blau) und Flag (Rot) aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen mit Image J, **** $p \leq 0,0001$, *One-Way* ANOVA, $n=5$. Nach Überexpression des Kontrollplasmids blieb der Phänotyp der Lipid-Tröpfchen Akkumulation erhalten. Überexpression des Sigma-1-Flag Konstrukts in den Sigma1R-KO Bd5 führte zu einer Reduktion der Anzahl an Lipid-Tröpfchen und zeigt die Sigma1R abhängige Veränderung der Lipid-Tröpfchen Dynamik.

4.1.2.3 Charakterisierung des Lipid-Tröpfchen Metabolismus in Sigma-1-Knockout Zellen

Zur weiteren Charakterisierung des Lipid-Tröpfchen Metabolismus wurden Wachstumskurven der Lipid-Tröpfchen in HeLa-WT und in Sigma1R-KO Zellen Bd5 nach Behandlung mit EBSS (Abbildung 4.8) und Ölsäure (Abbildung 4.9) für 3-12 h erstellt. Die Behandlung mit EBSS erzeugt einen Nährstoffmangel und führt zum Abbau der Lipid-Tröpfchen in den Zellen (Bekbulat *et al.*, 2020), während es durch Behandlung mit Ölsäure zu einer Anreicherung der Lipid-Tröpfchen kommt (Nakajima, *et al.* 2019). Dabei sollte vor allem durch die Behandlung mit EBSS ein möglicher Zusammenhang zwischen Autophagie und veränderter Lipid-Tröpfchen Dynamik in den Zellen hergestellt werden (Bekbulat, *et al.* 2020).

(A)



(B)

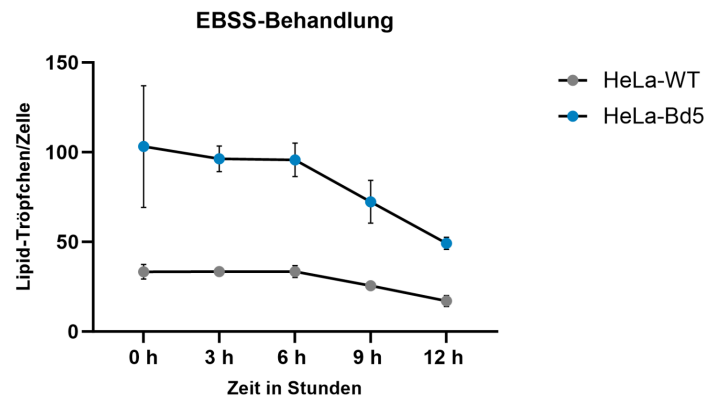


Abbildung 4.8: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach EBSS Behandlung. (A) Mikroskopische Aufnahmen von WT und Sigma1R-KO Bd5 nach Behandlung mit EBSS, gefärbt mit Bodipy (Grün) und DAPI (Blau), aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen mit Image J in Abhängigkeit von der Zeit, n=3. EBSS Behandlung führte im WT und im Sigma1R-KO Bd5 nach 9 h zu einer Reduktion der Lipid-Tröpfchen. Die Lipid-Tröpfchen wurden dabei im Sigma1R-KO schneller abgebaut als im WT.

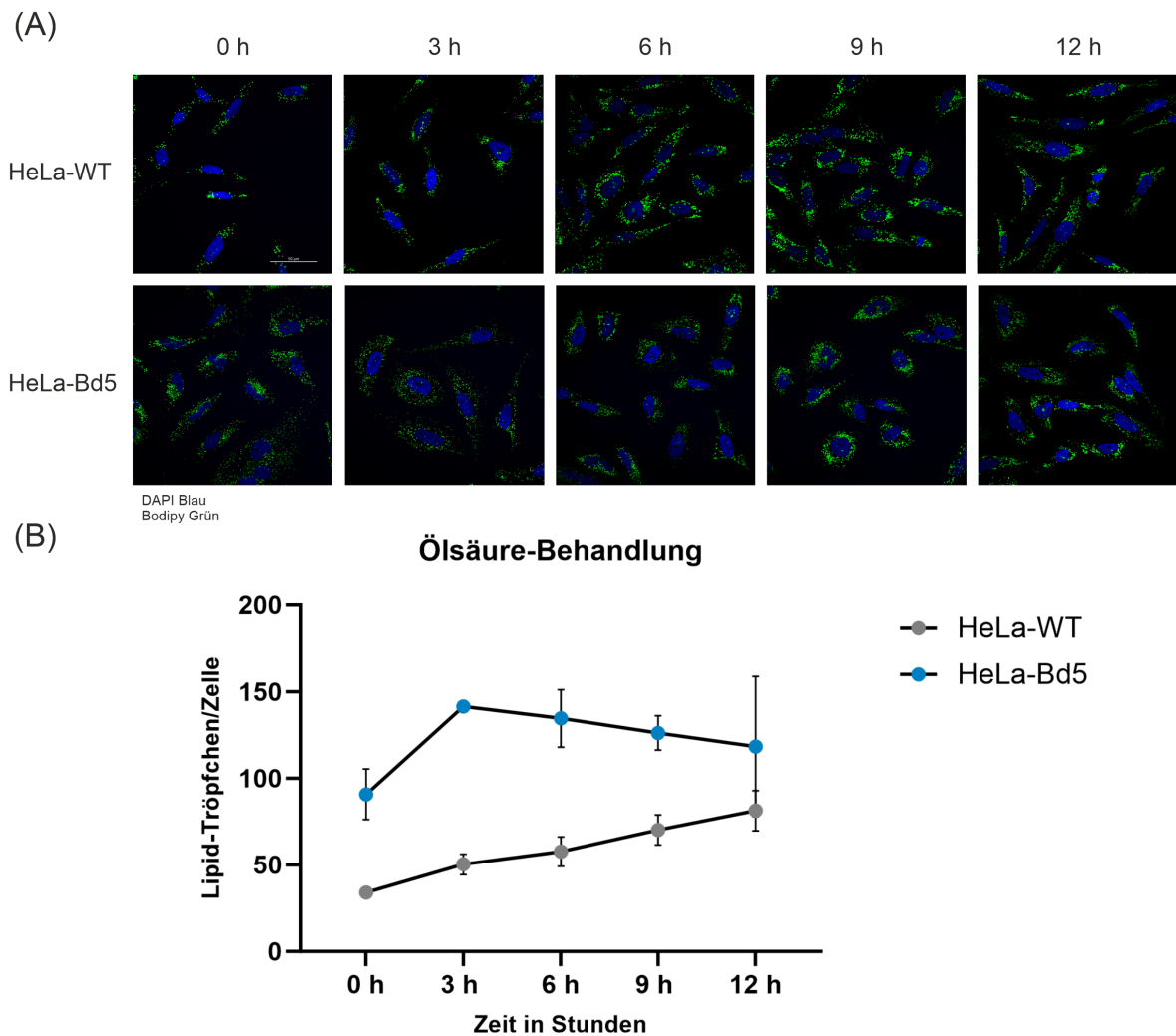


Abbildung 4.9: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Ölsäure Behandlung. (A) Mikroskopische Aufnahmen von WT und Sigma1R-KO Bd5 nach Behandlung mit Ölsäure, gefärbt mit Bodipy (Grün) und DAPI (Blau), aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 μm . (B) Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen mit Image J in Abhängigkeit von der Zeit, $n=3$. Im WT konnte die Anzahl an Lipid-Tröpfchen mittels Ölsäure Behandlung gesteigert werden, während im Sigma1R-KO ein kurzzeitiger Anstieg und eine anschließende tendenzielle Reduktion erfolgte.

Die Behandlung mit EBSS führte in einem zeitlichen Rahmen bis 6 h nicht zu einer deutlichen Veränderung der Anzahl an Lipid-Tröpfchen im Wildtyp. Im Sigma1R-KO Bd5 zeigte sich hier schon eine leichte Reduktion von circa 100 auf 80-90 Lipid-Tröpfchen pro Zelle. Nach 9 h kam es zu einer deutlichen Reduktion der Lipid-Tröpfchen pro Zelle im Sigma1R-KO Bd5 von circa 80-90 auf 50-60 Lipid-Tröpfchen pro Zelle. Im Wildtyp wurde die Anzahl an Lipid-Tröpfchen ab 9 h von circa 30-40 auf 15-20 pro Zelle reduziert. Demnach erfolgte der Abbau der Lipid-Tröpfchen im Sigma1R-KO Bd5 schneller als im Wildtyp (Abbildung 4.8A und B). Nach Ölsäure-Behandlung konnte im Wildtyp eine kontinuierliche Steigerung der Anzahl an Lipid-Tröpfchen festgestellt werden, wobei die Anzahl an Lipid-Tröpfchen von circa 30-40 auf 60-70 pro Zelle erhöht wurde. Im Sigma1R-KO Bd5 stieg die Zahl an Lipid-Tröpfchen zunächst von circa 90-100 auf 140-150 pro Zelle und wurde nach 3 h Behandlung tendenziell kontinuierlich reduziert auf ungefähr das ursprüngliche Level an Lipid-Tröpfchen pro Zelle zum Startzeitpunkt der Messung (Abbildung 4.9A und B). Dies könnte an einem maximalen

Level an Lipid-Tröpfchen pro Zelle liegen.

Um den Phänotyp der Lipid-Tröpfchen Akkumulation weiterhin zu analysieren wurde das Expressionslevel von Enzymen, die den Metabolismus der Lipid-Tröpfchen beeinflussen mittels quantitativer *Real-Time* PCR bestimmt. Die Messungen erfolgten mit unbehandelten Zellen sowie mit Zellen, die für 6 oder 12 h mit EBSS behandelten wurden (Abbildung 4.10), da ein Zusammenhang zwischen Lipid-Tröpfchen Dynamik und Autophagie untersucht werden sollte (Bekbulat *et al.*, 2020).

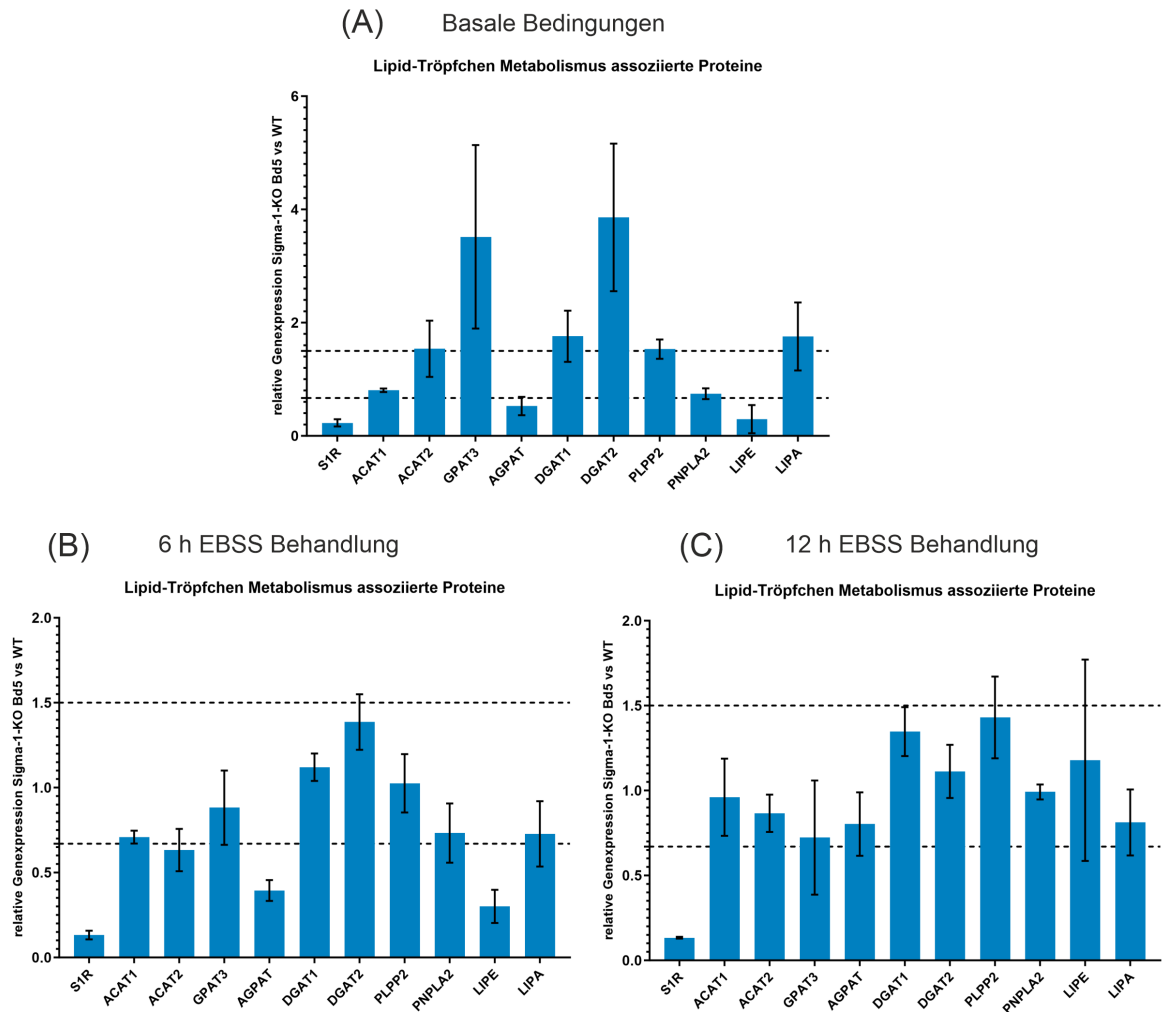


Abbildung 4.10: Lipid-Metabolismus assoziierte Proteine qPCR Analyse von Lipid-Metabolismus assoziierten Proteinen in HeLa-Zellen (A) unter basalen Bedingungen, (B) nach 6 h EBSS Behandlung und (C) nach 12 h EBSS Behandlung, Schwellenwerte für eine signifikante Veränderung liegen bei 1,5 und 0,67, $n=3$. Unter basalen Bedingungen wurde im Sigma1R-KO relativ zum WT eine Erhöhung von GPAT3 und DGAT2 sowie eine Reduktion von LIPE gemessen. Nach 6 h Behandlung mit EBSS zeigte sich eine Reduktion von LIPE und AGPAT, die nach 12 h Behandlung mit EBSS nicht mehr gemessen werden konnte.

Zu den analysierten Proteinen zählen die Enzyme der Triacylglycerid-Synthese, wie GPAT3, AGPAT, PLPP2 und DGAT1/2, sowie der Synthese von Cholesterinestern, wie ACAT1/2 (Cases *et al.*, 1998; Cases *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2009; Eberhardt *et al.*, 1999; Hooks *et al.*, 1998; Olzmann *et al.*, 2019; Sukumaran *et al.*, 2009). Weiterhin wurden diverse Lipasen untersucht, unter anderem PNPLA2 und LIPE, die die Hydrolyse von Triacylglyceriden syn-

thetisieren (Kienesberger *et al.*, 2009; Kaiser *et al.* 2022), oder LIPA, welches dem Abbau von Cholesterinestern und Triacylglyceriden dient (Zhang, 2018). Eine relative Expression im Vergleich zum WT über 1,5 und unter 0,67 wurde dabei als signifikant betrachtet. Zur weiteren Kontrolle wurde zudem die Expression des Sigma1Rs bestimmt, die in allen durchgeführten Analysen signifikant reduziert war. Im Sigma1R-KO Bd5 sind unter basalen Bedingungen die Enzyme DGAT1 und GPAT3 überexprimiert, während LIPE reduziert ist (Abbildung 4.10A). Nach 6 h Behandlung konnte lediglich eine Reduktion von LIPE und AGPAT gemessen werden (Abbildung 4.10B), während das relative Expressionslevel aller anderen Proteine unverändert blieb. Nach insgesamt 12 h Behandlung mit EBSS konnte keine signifikante Änderung im Expressionslevel der betrachteten Enzyme detektiert werden (Abbildung 4.10C).

4.1.3 Einfluss der Mutanten E102Q und E138Q auf die veränderte Lipid-Tröpfchen Dynamik

Um einen Einfluss der Mutanten E102Q und E138Q, von denen vermutet wird im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen zu stehen (Al-Saif *et al.*, 2011; Gregianin *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015), auf die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen zu untersuchen, wurde das *Rescue*-Experiment mit den Mutanten E102Q und E138Q durchgeführt. Dabei wurde zunächst in einer Western-Blot Analyse (Abbildung 4.11) die Aufnahme der Konstrukte überprüft und anschließend die Anzahl an Lipid-Tröpfchen bestimmt (Abbildung 4.12). Die Mutanten wurden innerhalb der Dissertation von einem/r Mitarbeiter/in hergestellt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

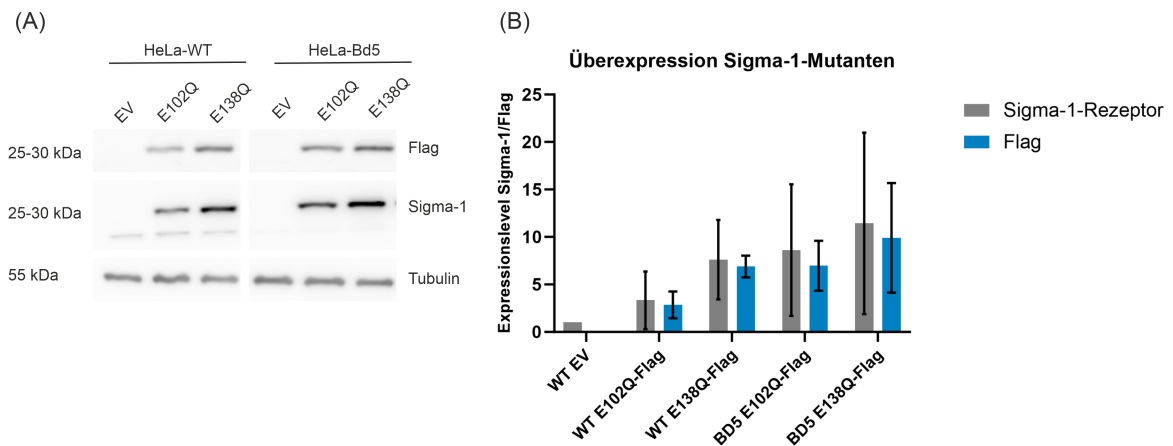


Abbildung 4.11: Überexpression von Mutanten des Sigma-1-Rezeptors. (A) Western-Blot Analyse zur Aufnahme der Mutanten E102Q und E138Q 48 h nach der Transfektion in HeLa WT und Sigma1R-KO Bd5. (B) Quantifizierung des Western Blots, n=3. Die Western Blot Analyse zeigt die Aufnahme der Konstrukte in WT und Sigma1R-KO Bd5 Zellen.

Die Konstrukte pCMV6-Sigma-1-E102Q-Myc-Flag (E102Q) und pCMV6-Sigma-1-E138Q-Myc-Flag (E138Q) konnten innerhalb der Western-Blot Analyse in die Zelllinien HeLa-WT und HeLa-Bd5 aufgenommen werden, erkennbar an der intensiven Bande oberhalb des endogenen Sigma1R bei circa 30-35 kDa (Abbildung 4.12A). Tendenziell wurden die Konstrukte

E102Q und E138Q im Sigma1R-KO Bd5 stärker exprimiert als im HeLa-WT (Abbildung 4.12B). Aufgrund der starken Heterogenität kann keine signifikante Aussage getroffen werden.

Die Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen nach Färbung mit Bodipy zeigte erneut den Erhalt der Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Transfektion der Zellen mit dem *Empty Vector*. Die Anzahl an Lipid-Tröpfchen liegt im WT bei circa 40-50 pro Zelle und im Sigma1R-KO Bd5 bei circa 90-100 pro Zelle, was einer ungefähren Verdopplung der Lipid-Tröpfchen nach Transfektion mit dem *Empty Vector* entspricht. Eine Überexpression der Mutanten E102Q und E138Q führte im Wildtyp zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl an Lipid-Tröpfchen, während im Sigma1R-KO Bd5 die Anzahl an Lipid-Tröpfchen nach Transfektion mit den Konstrukten E102Q und E138Q im Vergleich zur Kontrolle (HeLa Bd5 EV) signifikant von circa 90-100 auf 50-60 pro Zelle reduziert werden konnte, was der Anzahl an Lipid-Tröpfchen im HeLa-WT transfiziert mit dem *Empty Vector* entspricht (Abbildung 4.12 A und B).

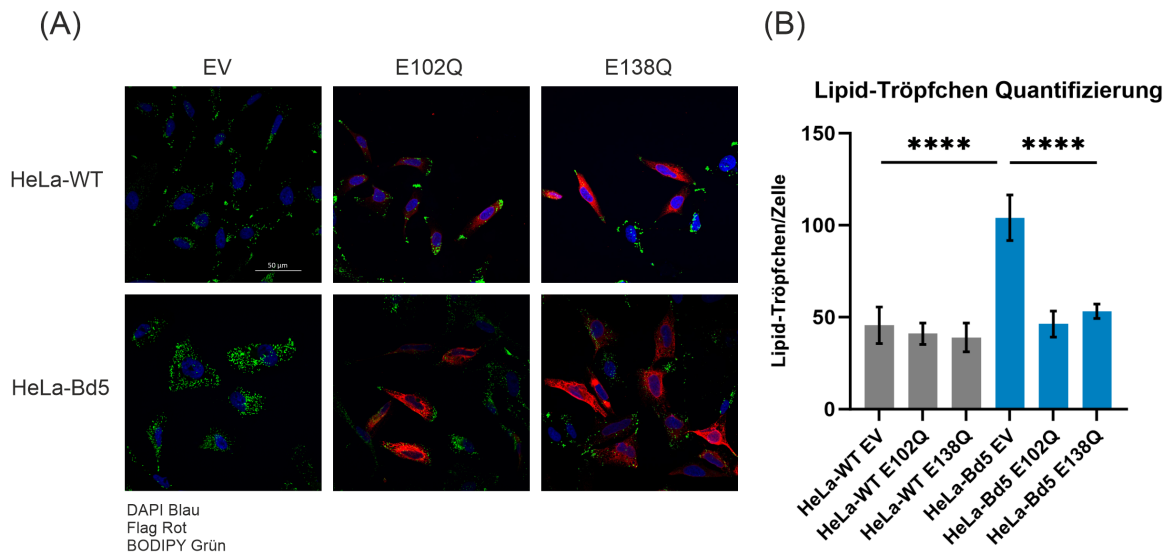


Abbildung 4.12: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Überexpression der Sigma-1-Mutanten E102Q und E138Q. (A) Mikroskopische Aufnahmen von WT und Sigma1R-KO Bd5 Zellen 48 h nach Transfektion mit den Mutanten gefärbt mit Bodipy (Grün), DAPI (Blau) und Flag (Rot), aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen mit Image J, **** $p \leq 0,0001$, One way ANOVA, $n=5$. Nach Überexpression des *Empty Vector* blieb der Phänotyp der Lipid-Tröpfchen Akkumulation im Sigma1R-KO Bd5 verglichen zum WT erhalten. Überexpression der Mutanten E102Q und E138Q im Sigma1R-KO Bd5 führte zu einer Reduktion der Anzahl an Lipid-Tröpfchen.

4.1.4 Einfluss der Cholesterin-Bindedomänen und der Transmembrandomäne auf die veränderte Lipid-Tröpfchen Dynamik

Um den Zusammenhang zwischen Lipid-Tröpfchen Akkumulation und der Struktur des Sigma-1-Rezeptors zu untersuchen, wurden drei Deletionskonstrukte hergestellt, denen jeweils eine der *sterol binding domain-like motif* SBLDII (d176-223) sowie SBDLI (d91-109) und die Transmembrandomäne sowie das ER-Retentionssignal (d2-29) (Hayashi und Su, 2003) fehlen (Abbildung 4.13A). Die Konstrukte wurden als pCMV6-Sigma-1-d176-223-Myc-Flag (d176-

223), pCMV6-Sigma-1-d2-29-Myc-Flag (d2-29) und pCMV6-Sigma-1-d91-109-Myc-Flag (d91-109) bezeichnet. Die benötigten Inserts wurden über PCR aus dem Konstrukt Sigma-1-Flag sowie PEX-K248-Sigma-1-d91-109 generiert und mit dem linearisierten Vektor Sigma-1-Flag ligiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde PCR-Kontrolle und eine Kontrollrestriktion durchgeführt (Abbildung 4.13B).

Die Generierung der Inserts konnte anhand der Banden bei einer Größe von 400-500 Basenpaaren nachgewiesen werden, welche den PCR-Produkten entsprechen. Die erfolgreiche Klonierung zeigte sich durch das Auftreten von zwei Banden nach der Kontrollrestriktion, die bei einer Größe von 400-500 Basenpaaren dem Insert entsprechen und bei einer Größe von circa 5000 Basenpaaren dem linearisierten Vektor (Abbildung 4.13B). Eine zusätzliche Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Klonierung. Die Deletionskonstrukte wurden anschließend in HeLa-WT und in Sigma1R-KO Zellen Bd5 überexprimiert (Abbildung 4.14) und die Anzahl an Lipid-Tröpfchen bestimmt (Abbildung 4.15).

Die Western-Blot Analyse zeigt die Überexpression der Truncation-Konstrukte in HeLa-WT und Sigma1R-KO Bd5 Zellen durch das Auftreten der zusätzlichen Sigma1R und Flag positiven Banden, die dem erwarteten Größenverhältnis entsprechen (Abbildung 4.14A). Die Deletion d176-223 wird von WT und Sigma1R-KO Bd5 Zellen gleichermaßen aufgenommen, während die Deletionen d2-29 und d91-109 tendenziell im Sigma1-KO Bd5 besser aufgenommen werden. Aufgrund der starken Heterogenität kann keine signifikante Aussage getroffen werden. Im *Rescue*-Experiment zeigte sich erneut der Erhalt der Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Transfektion mit dem *Empty Vector* im Sigma1R-KO im Vergleich zum WT. Die Lipid-Tröpfchen sind dabei um circa 30 pro Zelle erhöht. Die Überexpression der Deletionskonstrukte zeigte im Wildtyp keine Veränderung in der Anzahl der Lipid-Tröpfchen. Nach Überexpression der Deletionsmutanten d91-109 und d176-223 wurde im Sigma-1-Knockout Bd5 im Vergleich zur Kontrolle (HeLa-Bd5 EV) eine signifikante Reduktion der Anzahl an Lipid-Tröpfchen von 80-90 auf 40-60 pro Zelle quantifiziert, während die Überexpression der Deletionsmutante d2-29 die Anzahl an Lipid-Tröpfchen im Vergleich zur Kontrolle nicht reduzieren konnte (Abbildung 4.15A und B).

Zudem zeigte sich nach Überexpression der Deletionsmutante d2-29 eine deutliche Veränderung im Flag-Signal (Sigma1R-Konstrukt). Von einer ER ähnlichen Färbung, die vor allem im perinukleären Bereich auftritt, kam es zu einer Detektion von Punctae, die in der Nähe von Lipid-Tröpfchen auftraten. Daher wurde eine Kolokalisierungsanalyse der Deletionsmutanten mit den Lipid-Tröpfchen angefertigt. Da der Sigma1R Oligomere bilden kann (Mishra, 2015), wurde die Kolokalisierungsanalyse in HeLa-WT (Abbildung 4.16) und in Sigma-1-Knockout Zellen durchgeführt (Abbildung 4.17) durchgeführt und mit dem Konstrukt Sigma-1-Flag verglichen. Dazu wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Korrelation des Flag-Signals mit Bodipy mittels der Coloc 2 Analyse von Image J bestimmt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient reicht von -1 bis 1 für eine perfekte inverse Korrelation zu einer perfekten direkten Korrelation. Ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 0 steht für keine Kolokalisierung (Mukaka, 2012).

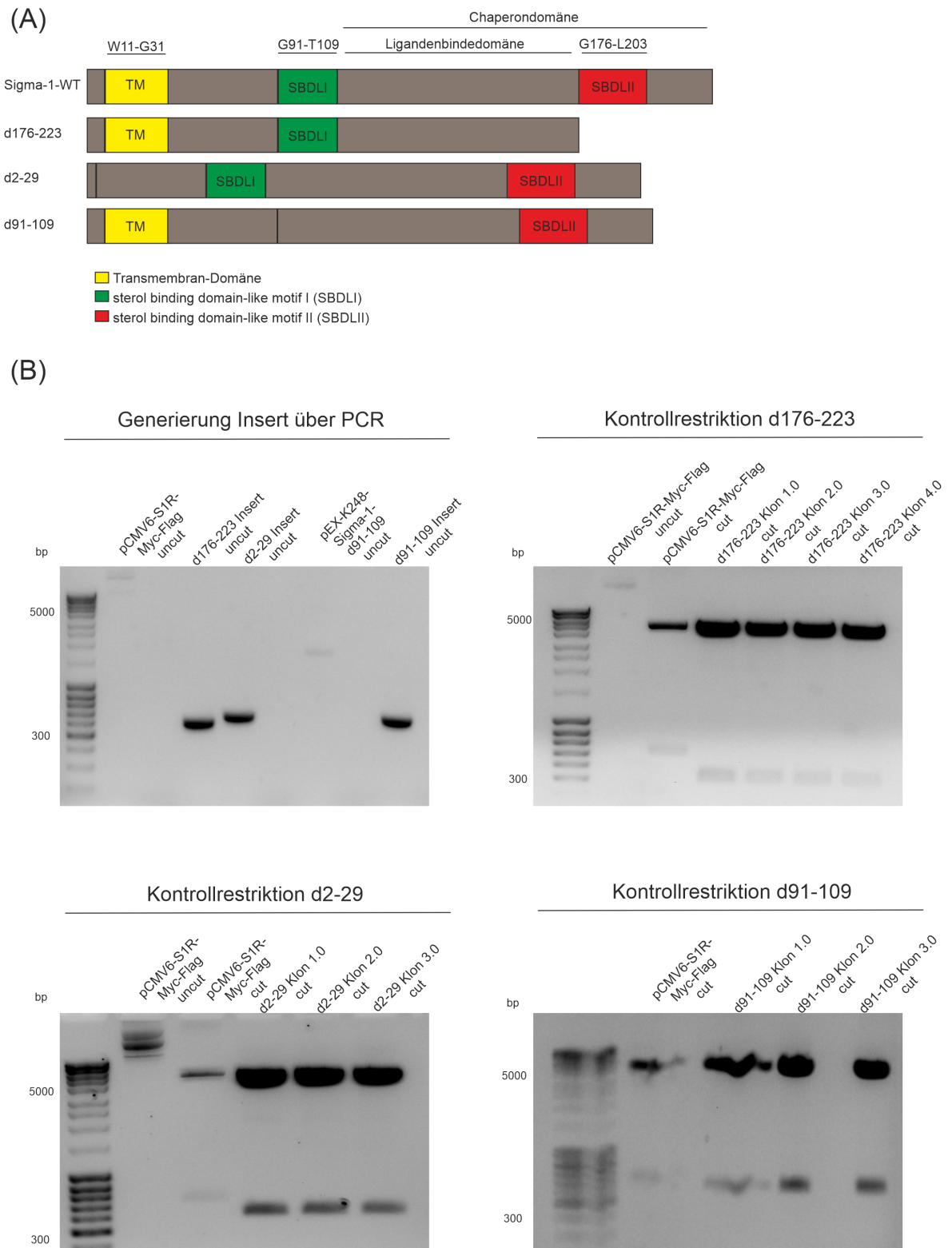


Abbildung 4.13: Generierung der Deletionsmutanten. (A) Darstellung der Deletionsmutanten mit ihren relevanten Domänen; Deletion d176-223 fehlt die SBDLII-Domäne sowie ein Teil des C-terminalen Endes, d2-29 fehlt die Transmembrandomäne und das ER-Retentionssignal, d91-109 fehlt die SBDLI-Domäne. (B) Gelelektrophoretische Analyse zur Generierung der Inserts über PCR sowie der Kontrollrestriktionen. Nach PCR-Amplifikation zeigte sich für jede Deletionsmutante eine deutliche Bande auf der Höhe des entsprechenden PCR-Produkts (Insert bei 400-500 Basenpaaren). Die Kontrollrestriktionen zeigten jeweils zwei Banden, eine auf der Höhe der generierten Inserts bei 400-500 Basenpaaren und eine bei circa 5000 Basenpaaren für den linearisierten Vektor.

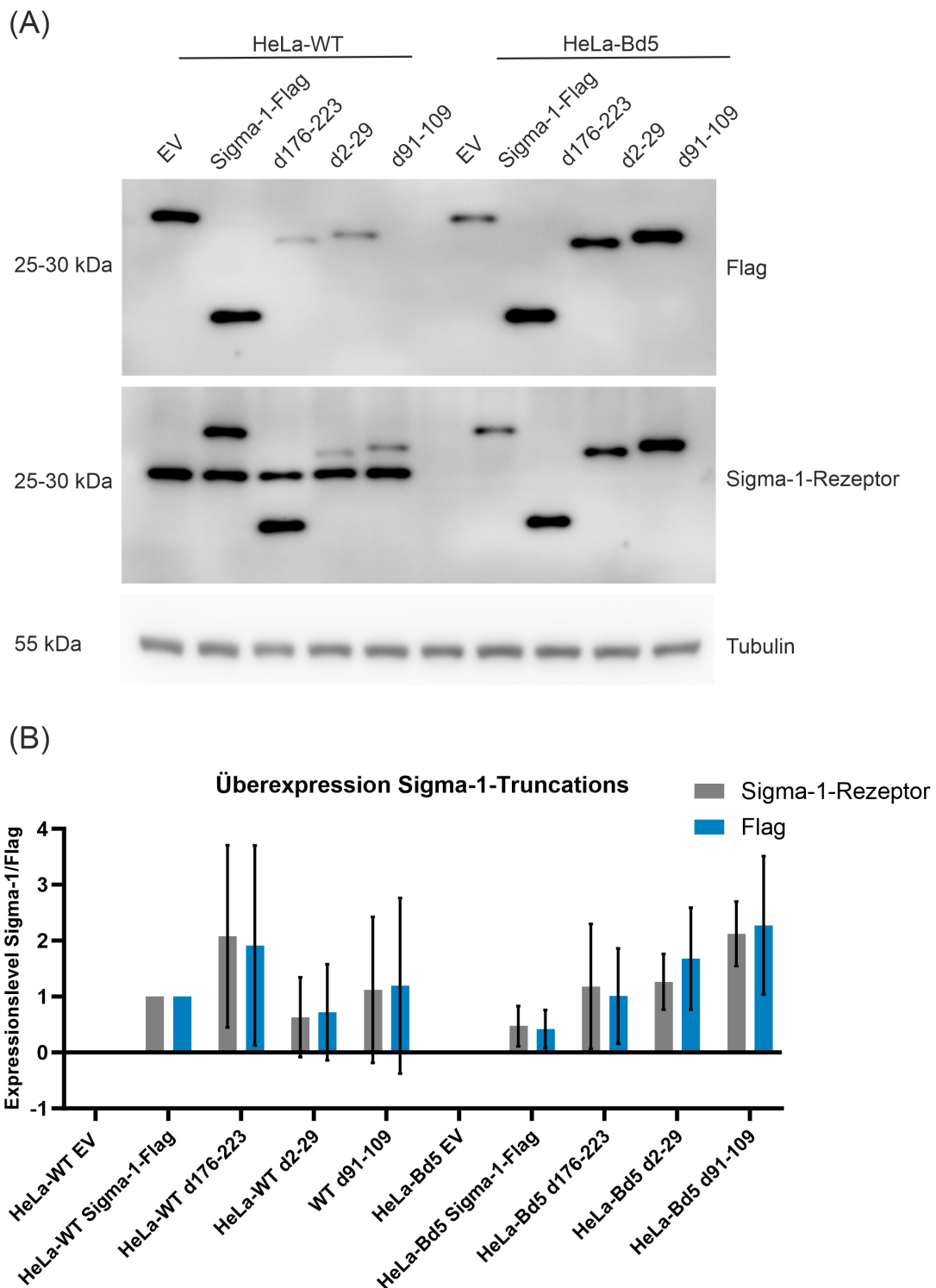


Abbildung 4.14: Überexpression von Deletionen des Sigma-1-Rezeptors. (A) Western-Blot Analyse zur Aufnahme der Deletionen des Sigma1R. (B) Quantifizierung des Western-Blots, n=3. Die Deletionsmutanten konnten in WT und Sigma1R-KO Bd5 Zellen aufgenommen werden.

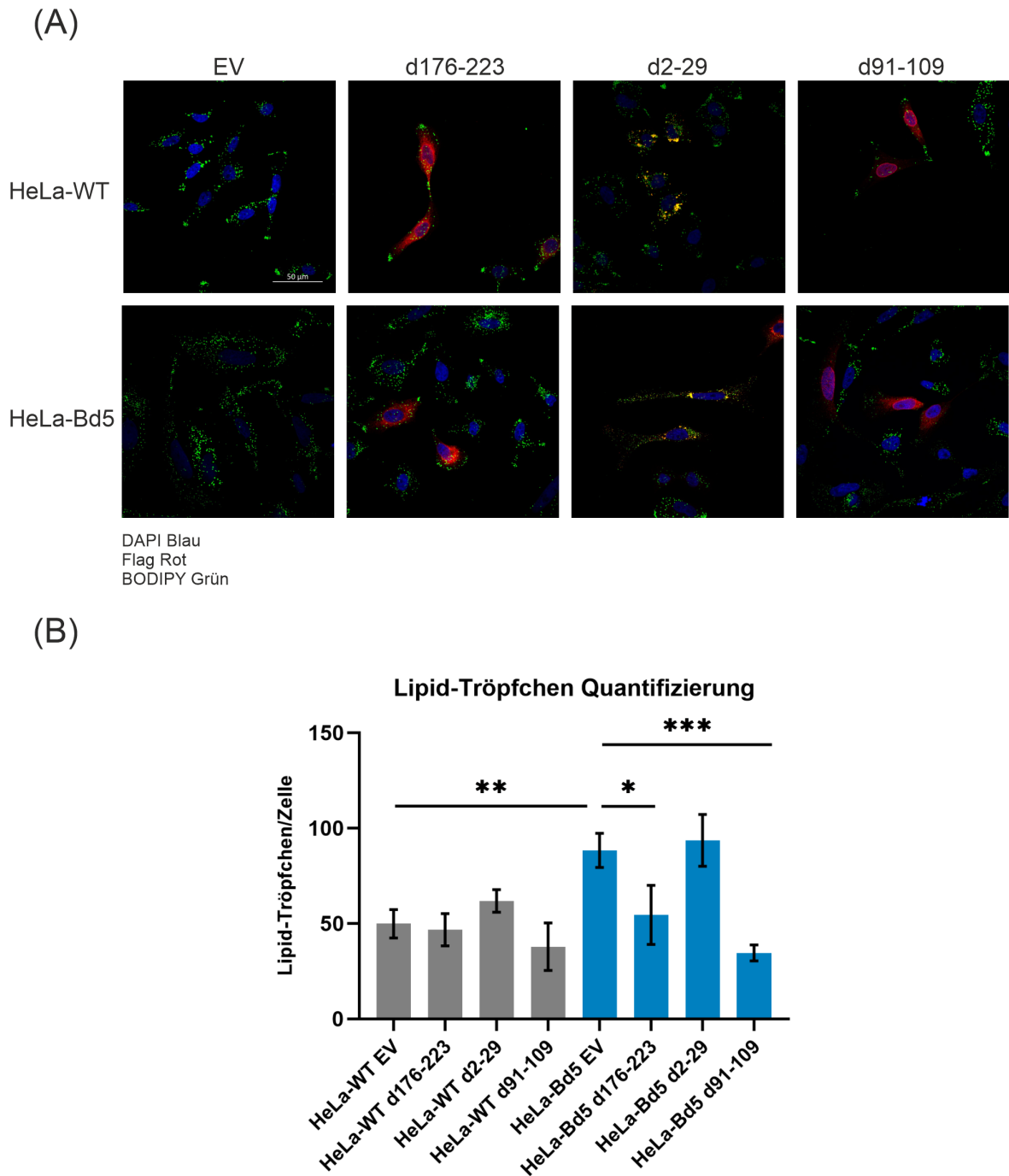
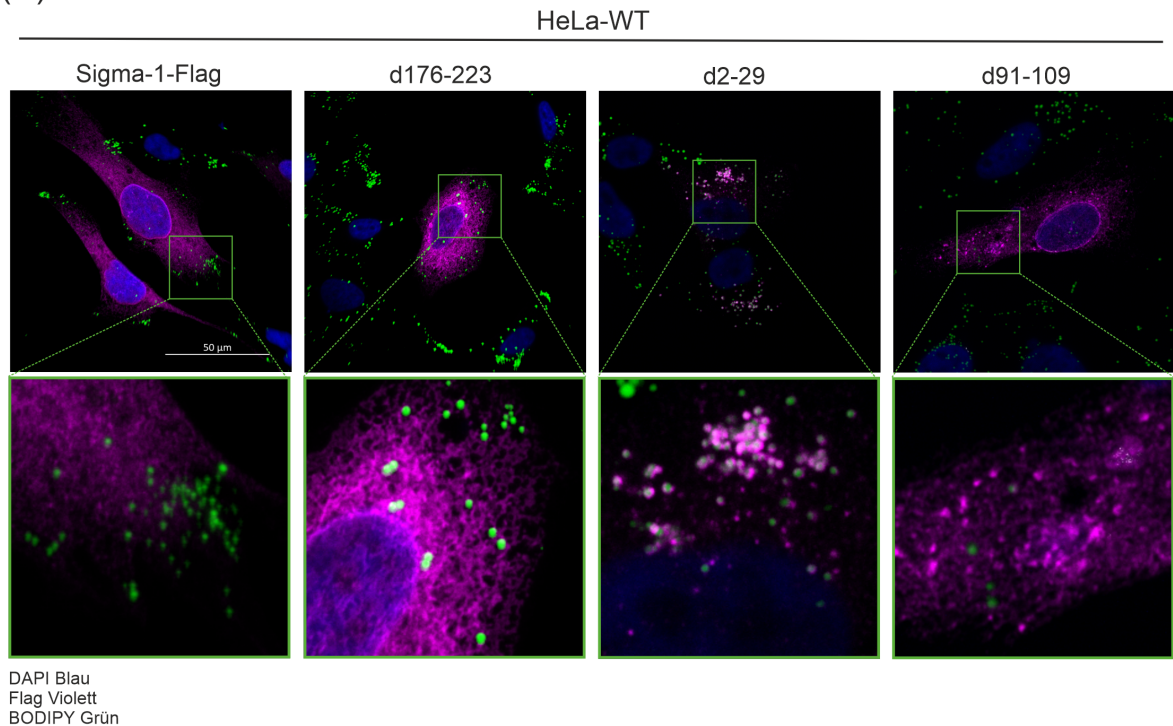


Abbildung 4.15: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Überexpression der Deletionsmutanten. (A) Mikroskopische Aufnahmen von WT und Sigma1R-KO Bd5 Zellen 48 h nach Transfektion mit den Deletionsmutanten gefärbt mit Bodipy (Grün), DAPI (Blau) und Flag (Rot), aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen mit Image J, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, *One-way* ANOVA, $n=3$. Nach Überexpression des *Empty Vectors* blieb der Phänotyp der Lipid-Tröpfchen Akkumulation im Sigma1R-KO Bd5 verglichen zum WT erhalten. Überexpression der Deletionsmutanten d176-223 und d91-109 im Sigma1R-KO Bd5 führte zu einer Reduktion der Anzahl an Lipid-Tröpfchen und zeigte keinen Einfluss der Mutanten auf die Sigma1R abhängige Veränderung der Lipid-Tröpfchen Dynamik. Nach Überexpression der Deletionsmutante d2-29 im Sigma1R-KO Bd5 konnte die Anzahl an Lipid-Tröpfchen nicht reduziert werden. Die Deletion d2-29 zeigt demnach einen Einfluss auf die Sigma1R abhängige Akkumulation der Lipid-Tröpfchen.

(A)



(B)

Kolokalisierung Sigma-1-Rezeptor mit Lipid-Tröpfchen

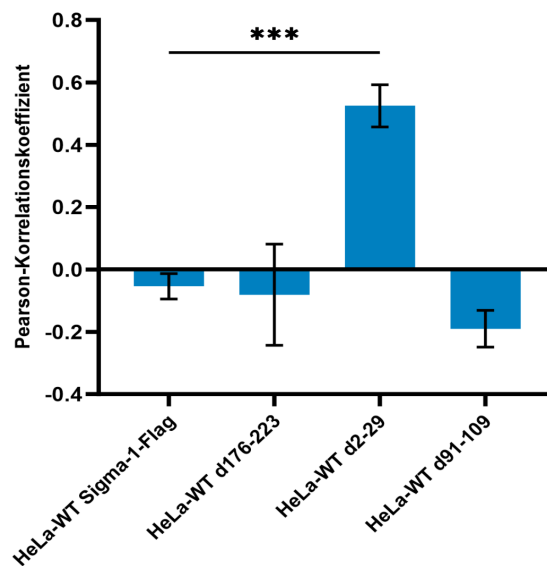
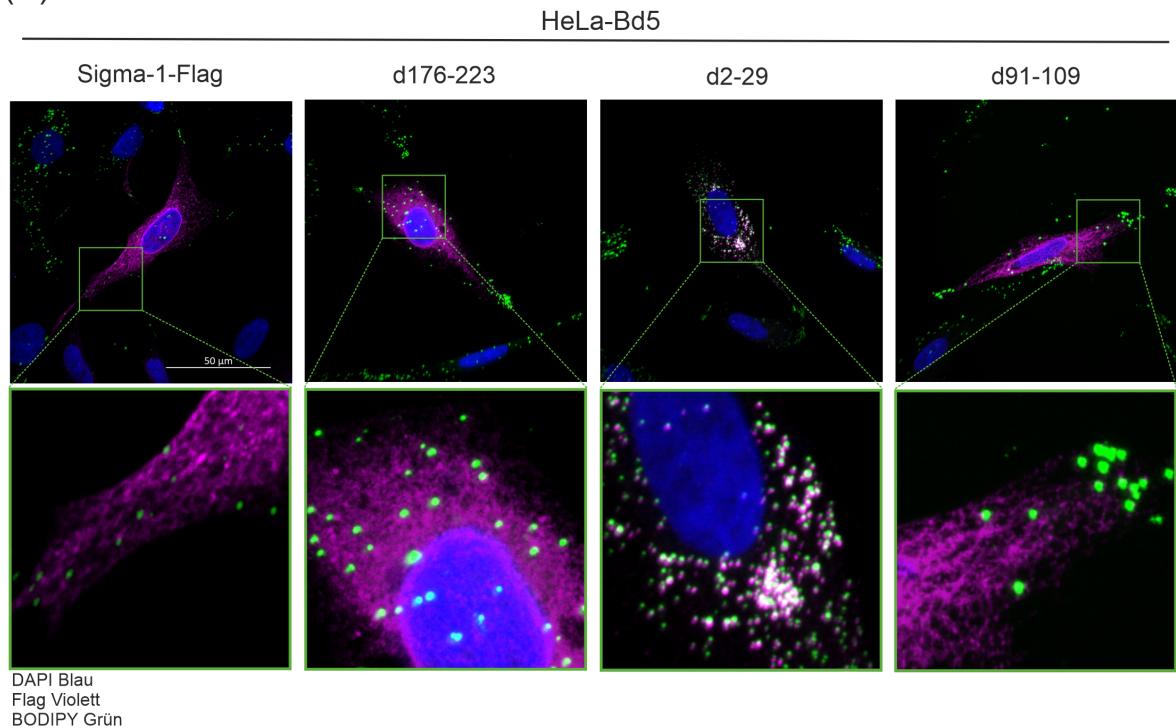


Abbildung 4.16: Kolokalisierung der Deletionsmutanten mit Lipid-Tröpfchen in WT Zellen. (A) Mikroskopische Aufnahmen (obere Reihe) mit einer Vergrößerung eines Bildausschnitts (untere Reihe) von WT Zellen 48 h nach Transfektion mit den Deletionen gefärbt mit Bodipy (Grün), DAPI (Blau) und Flag (Violett) aufgenommen mit einer 60x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (B) Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten mittels Image J, $***p \leq 0,001$, *One-way* ANOVA, $n=3$. Die bestimmten Korrelationskoeffizienten zeigen mit den Konstrukten Sigma-1-Flag, d176-223 und d91-109 keine Kolokalisierung von Sigma1R mit den Lipid-Tröpfchen. Die Deletion der Transmembrandomäne d2-29 zeigt eine Erhöhung des Koeffizienten im Vergleich zum Sigma-1-Flag Konstrukt um circa 0,5, was einer moderaten Kolokalisierung mit den Lipid-Tröpfchen entspricht.

(A)



(B)

Kolokalisierung Sigma-1-Rezeptor mit Lipid-Tröpfchen

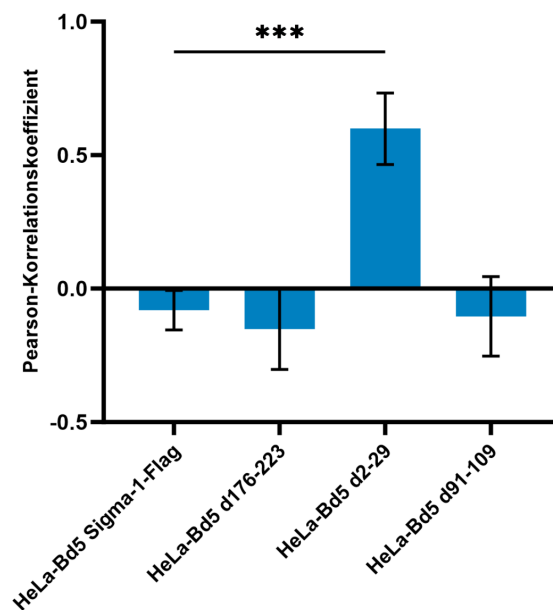


Abbildung 4.17: Kolokalisierung der Deletionsmutanten mit Lipid-Tröpfchen in Sigma1R-KO Bd5 Zellen. (A) Mikroskopische Aufnahmen (obere Reihe) mit einer Vergrößerung eines Bildausschnittes (untere Reihe) von Sigma1R-KO Bd5 Zellen 48 h nach Transfektion mit den Deletionen gefärbt mit Bodipy (Grün), DAPI (Blau) und Flag (Violett), aufgenommen mit einer 60x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (B) Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten mittels Image J, $***p \leq 0,001$, *One-way* ANOVA, $n=3$. Die bestimmten Korrelationskoeffizienten zeigen mit den Konstrukten Sigma-1-Flag, d176-223 und d91-109 keine Kolokalisierung von Sigma1R mit den Lipid-Tröpfchen. Die Deletion der Transmembrandomäne d2-29 zeigt eine Erhöhung des Koeffizienten im Vergleich zum Sigma-1-Flag Konstrukt um circa 0,5, was einer moderaten Kolokalisierung mit den Lipid-Tröpfchen entspricht.

In den Kolokalisierungsanalysen zeigen sich keine deutlichen Veränderungen in der ER ähnlichen Färbung der Deletionskonstrukte d176-223 und d91-109 im Vergleich zum Sigma-1-Flag Knostrukt. Deutlich zu erkennen ist die Änderung des Flag-Signals in der Deletionsmutante d2-29 von einer ER ähnlichen Färbung zu Punctae, die in der Nähe von Lipid-Tröpfchen auftreten (Abbildung 4.16A und 4.17A). Der Pearson-Korrelationskoeffizient liegt für das Sigma-1-Flag Konstrukt im Wildtyp bei $-0,05 \pm 0,03$ und im Sigma1R-KO Bd5 bei $-0,08 \pm 0,06$. Eine Oligomerisierung von Sigma1R wirkt sich daher vermutlich nicht auf die Kolokalisierungsanalyse aus. Auch die Koeffizienten der Deletionsmutanten d176-223 und d91-109 sind in den beiden Zelllinien vergleichbar. Nach Transfektion mit der Deletionsmutante d2-29 konnte im Wildtyp ein erhöhter Pearson-Korrelationskoeffizient von $0,52 \pm 0,05$ bestimmt werden (Abbildung 4.16B). Auch im Sigma1R-KO Bd5 konnte im Vergleich zur Kontrolle Sigma-1-Flag eine signifikant erhöhter Pearson-Korrelationskoeffizient von $0,6 \pm 0,1$ der Deletionsmutante d2-29 bestimmt werden (Abbildung 4.17B). Das Ergebnis entspricht im WT als auch im Sigma1R-KO Bd5 einer moderaten Kolokalisierung der Deletionsmutante mit den Lipid-Tröpfchen (Mukaka, 2012).

4.2 Die Rolle des Sigma-1-Rezeptors bei der Autophagie

Zur Untersuchung der Rolle des Sigma1R auf die Autophagie wurde die autophagische Aktivität wie schon zuvor beschrieben anhand der Veränderungen des Autophagosomen-Markers LC3b-II bestimmt (Christ *et al.*, 2019). Da eine Anreicherung von LC3b-II sowohl für einen reduzierten Abbau der Autophagosomen als auch für eine gesteigerte Autophagosomen Biogenese stehen könnte, wurde die Differenz der auf Tubulin normierten LC3b-II Menge nach Anreicherung der Autophagosomen mit Bafilomycin und der unbehandelten Probe bestimmt (Yang *et al.*, 2019). Der im Folgenden als autophagische Flux bezeichnete Wert wurde nach genetischer und pharmakologischer Inhibition des Sigma1R miteinander verglichen. Zur Induktion der Autophagie wurden die Zellen durch die Behandlung mit EBSS zusätzlichem Nährstoffmangel ausgesetzt (Bekbulat *et al.*, 2020). Es wurde zunächst die autophagische Aktivität in den beiden Sigma1-KO Zelllinien Bf9 und Bd5 in Vergleich mit dem Wildtyp analysiert (Abbildung 4.18).

Nach Behandlung der Zellen mit EBSS zeigte sich im Wildtyp eine Induktion der Autophagie, erkennbar durch die erhöhte Expression von LC3b-II in der mit Bafilomycin behandelten Probe und in einer Erhöhung des autophagischen Fluxes um das 2-3-fache (Abbildung 4.18B und D). Dies zeigt eine Reaktion des zellulären Systems auf die Induktion der Autophagie mittels EBSS und damit die Funktionalität des Assays. In den beiden Sigma1R-KO Zelllinien Bd5 und Bf9 wurde unter basalen Bedingungen keine Änderung im autophagischen Flux im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Unter Nährstoffmangel wurde eine Tendenz zur Reduktion des autophagischen Fluxes in beiden Sigma1R-KO Zelllinien verglichen mit dem Wildtyp bestimmt (Abbildung 4.18A-D). Der Flux wurde hier zwar induziert, erreichte aber keine Erhöhung um das 2-3-fache, sondern lediglich um das ungefähr 1,5-fache (Abbildung 4.18A-D). Da es sich hierbei auch nur um einen klonalen Effekt handeln könnte, wurde das Ergebnis mittels pharmakologischer und genetischer Manipulation durch die Generation eines Sigma1R-Knockdown verifiziert.

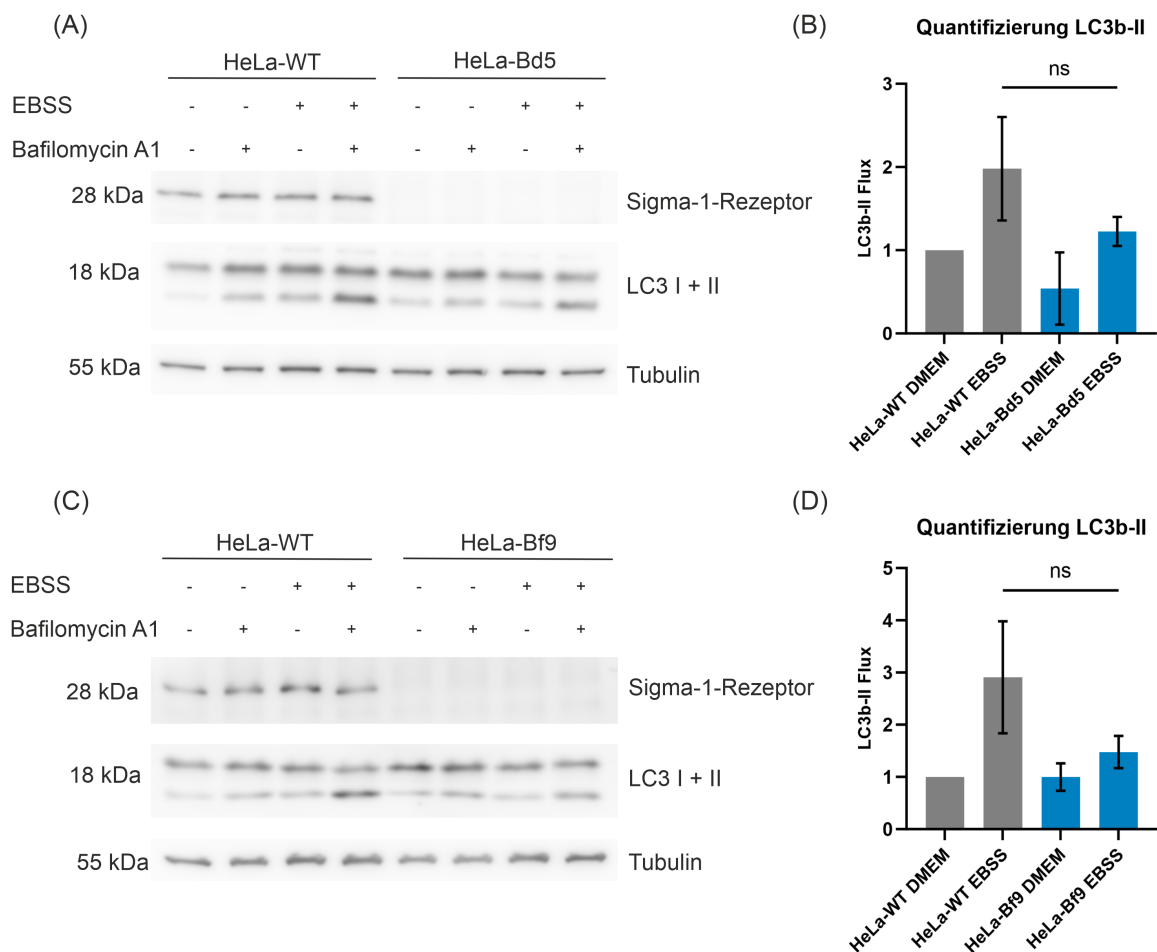


Abbildung 4.18: Messen der Autophagischen Aktivität in Sigma1R-KO Zellen. (A) Western-Blot Analyse zur Messung der autophagischen Aktivität im Sigma1R-KO Bd5. (B) Quantifizierung des Western-Blots unter (A), *One-way* ANOVA, $n=5$. (C) Western-Blot Analyse zur Messung der autophagischen Aktivität im Sigma1R-KO Bf9. (D) Quantifizierung des Western-Blots unter (C), *One-way* ANOVA, $n=3$. Nach Behandlung mit EBSS konnte der autophagische Flux im WT induziert werden. In den Sigma1R-KO Zellen Bd5 und Bf9 konnte der Flux nach Behandlung mit EBSS auch leicht induziert werden, ist im Vergleich zum WT aber reduziert. Die Reduktion ist jedoch nicht signifikant.

Zur pharmakologischen Inhibition des Sigma1R wurde der Sigma-1-Antagonist BD1047 eingesetzt (Zhu *et al.*, 2015). Auch hier wurde mittels Nährstoffmangel Autophagie induziert und damit zusätzlich die Funktionalität des Systems überprüft. Behandlung mit EBSS führte zu einer Erhöhung der Expression von LC3b-II in der mit Bafilomycin behandelten Probe und damit verbunden zu einer Erhöhung des autophagischen Fluxes um das 3-4-fache (Abbildung 4.19B und D). Nach pharmakologischer Inhibition des Sigma1R mittels des Sigma-1-Antagonisten BD1047 zeigte sich unter basalen Bedingungen keine Veränderung im autophagischen Flux. Nach Induktion der Autophagie konnte der Flux zwar auf das 1,5-2-fache induziert werden, nicht aber auf das 3-4-fache wie in unbehandelten Zellen (Abbildung 4.19A und B).

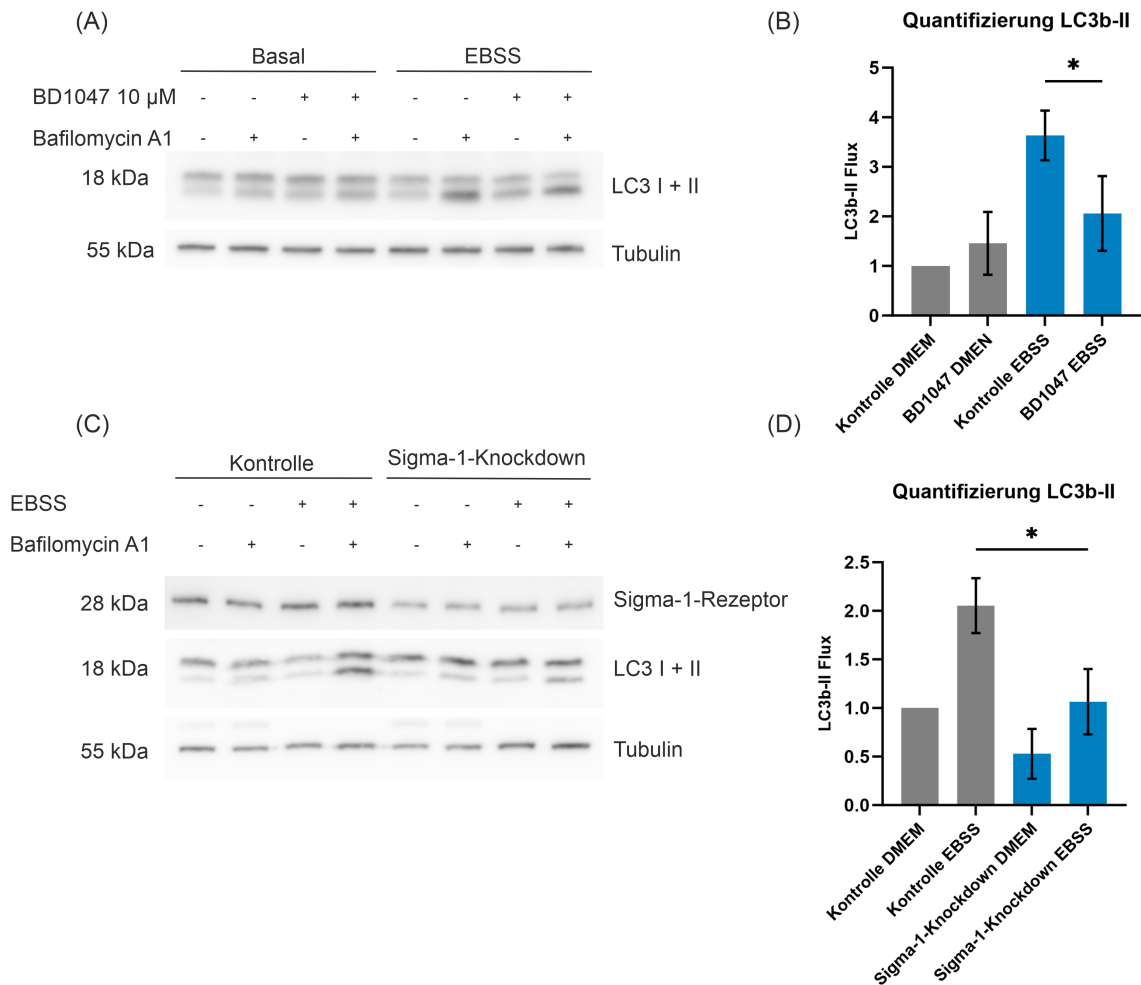


Abbildung 4.19: Messen der Autophagischen Aktivität nach pharmakologischer und genetischer Manipulation des Sigma-1-Rezeptors. (A) Western-Blot Analyse zur Messung der autophagischen Aktivität nach pharmakologischer Inhibition des Sigma1R mit BD1047 10 μ M für 4h. (B) Quantifizierung des Western-Blots unter (A), *One-way* ANOVA, n=3. Nach Behandlung mit dem Sigma1R-Inhibitor BD1047 zeigte sich eine Reduktion des autophagischen Fluxes nach Induktion der Autophagie mit EBSS im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. (C) Western-Blot Analyse zur Messung der autophagischen Aktivität im Sigma1R-Knockdown 48 h nach Transfektion mit siRNA (Kontrolle $\hat{=}$ *scrambled* siRNA, Sigma1R-Knockdown $\hat{=}$ Sigma1R-siRNA). (D) Quantifizierung des Western-Blots unter (C), *One-way* ANOVA, n=3. Nach Knockdown des Sigma1R in WT Zellen zeigte sich eine Reduktion des autophagischen Fluxes nach Induktion der Autophagie mit EBSS.

Zur genetischen Manipulation des Sigma1R wurde ein Knockdown mittels siRNA generiert. Das Sigma1R Expressionslevel konnte nach Transfektion mit Sigma1R-siRNA reduziert werden (Abbildung 4.19C). Zudem zeigte eine Behandlung mit EBSS auch nach der Transfektion eine Induktion des autophagischen Fluxes in der Kontrolle (*scrambled* siRNA) um das 2-3-fache (Abbildung 4.19C und D), was eine Funktionalität des Systems auch nach der Transfektion zeigt. Im Sigma1R-Knockdown zeigte sich ebenfalls eine Induktion des autophagischen Fluxes, aber nicht im gleichen Maße wie in der Kontrolle, weshalb der autophagische Flux im Knockdown im Vergleich zur Kontrolle nach Induktion der Autophagie um circa 50% reduziert ist (Abbildung 4.19C und D). Insgesamt konnte der autophagische Flux nach pharmakologischer und genetischer Inhibition des Sigma1R nach Induktion der Autophagie

reduziert werden. Die ermittelten Ergebnisse entsprechen den in den Sigma1R-KO Zelllinien gemessenen Tendenzen zur Reduktion des autophagischen Fluxes nach Induktion mittels Nährstoffmangel und verifizieren so die beobachteten Ergebnisse der Sigma1R-KO Zelllinien Bd5 und Bf9.

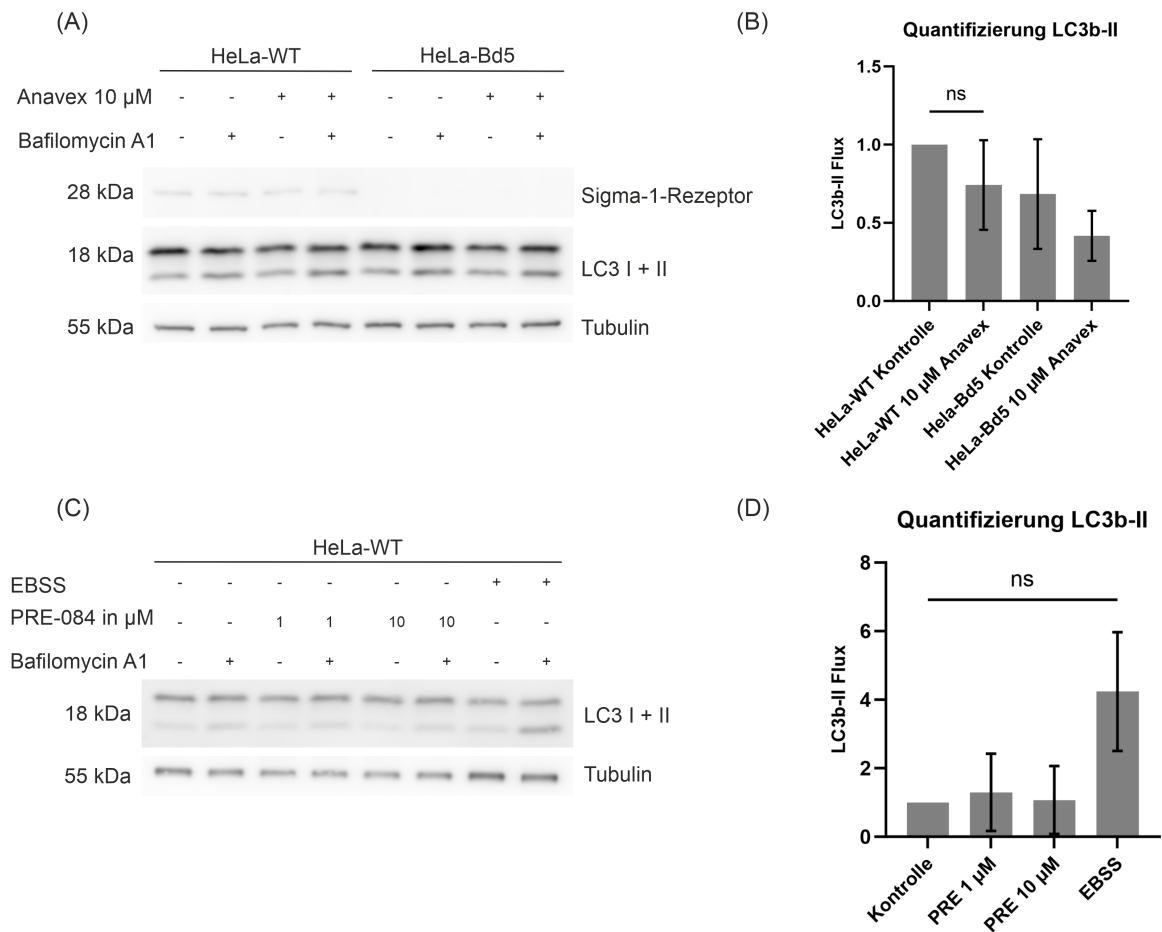


Abbildung 4.20: Messen der Autophagischen Aktivität nach pharmakologischer Manipulation des Sigma-1-Rezeptors. (A) Western-Blot Analyse zur Messung der autophagischen Aktivität nach pharmakologischer Aktivierung des Sigma1R mit ANAVEX2-73, 10 μ M für 4 h. (B) Quantifizierung des Western-Blots unter (A), *One-way* ANOVA, n=3. Nach Behandlung mit ANAVEX2-73 zeigte sich in WT und in Sigm1R-KO Bd5 Zellen keine Veränderung im autophagischen Flux. (C) Western-Blot Analyse zur Messung der autophagischen Aktivität nach pharmakologischer Aktivierung des Sigma1R mit PRE-084, 1 und 10 μ M für 4 h. (D) Quantifizierung des Western-Blots unter (C), *One-way* ANOVA, n=3. Nach Behandlung mit PRE-084 zeigte sich keine Veränderung im autophagischen Flux in WT Zellen.

Zudem wurde der Sigma1R wie zuvor beschrieben mittels ANAVEX2-73 und PRE-084 aktiviert und anschließend erneut der autophagische Flux bestimmt (Abbildung 4.20; Christ *et al.*, 2019). Die Aktivierung mittels ANAVEX2-73 wurde in HeLa-WT und zum Nachweis einer Sigma1R Abhängigkeit in Sigma1R-KO Bd5 Zellen durchgeführt. Nach Aktivierung mittels ANAVEX2-73 (10 μ M) zeigte sich im WT wie auch im Sigma1-KO Bd5 keine Veränderung im autophagischen Flux im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (Abbildung 4.20 A und B). Bei der Behandlung mit dem Sigma1R-Agonisten PRE-084 wurde zusätzlich der autophagische Flux nach Induktion mittels Nährstoffmangel durch die Behandlung mit EBSS gemessen,

um die Funktionalität zu überprüfen. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Konzentrationen getestet (PRE-084 1 μ M und 10 μ M; Abbildung 4.20C und D). Die Behandlung mit EBSS zeigte eine Induktion der Autophagie um das 2-4-fache und damit verbunden die erwartete Reaktion des zellulären Systems. In den mit den verschiedenen Konzentrationen von PRE-084 behandelten Proben zeigte sich keine Veränderung des autophagischen Fluxes im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 4.20C und D). Insgesamt zeigten die Behandlungen mit den Sigma1R-Agonisten keine Induktion der Autophagie in HeLa-Zellen.

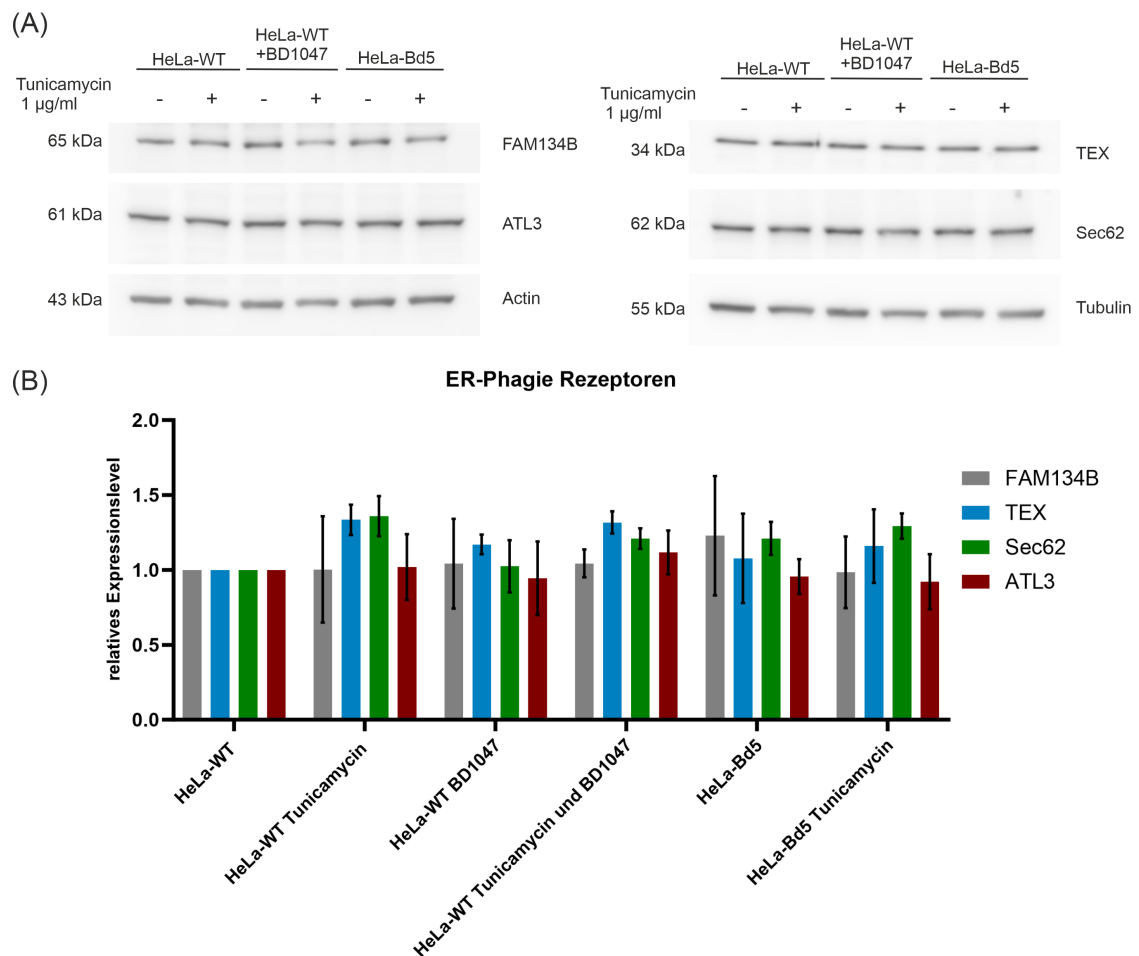


Abbildung 4.21: Expression der ER-Phagie-Rezeptoren in HeLa-Zellen. (A) Western-Blot Analyse der ER-Phagie Rezeptoren im WT, in mit dem Antagonisten BD1047 behandelten WT Zellen, 10 μ M 2 h Vorbehandlung, und im Sigma1R-KO Bd5 nach Induktion von ER-Stress mittels Tunicamycin-Behandlung, 1 μ g/ml für 48 h. (B) Quantifizierung des Western-Blots unter (A), keine signifikante Änderung *Two-Way* ANOVA, $n=3$. Es zeigte sich keine Veränderung in den Expressionsleveln der ER-Phagie Rezeptoren im Sigma1R-KO Bd5 und in den mit BD1047 behandelten Zellen im Vergleich zum WT. Auch in den Tunicamycin behandelten Zellen zeigte sich keine Veränderung in den Expressionsleveln der ER-Phagie Rezeptoren im Sigma1R-KO Bd5 und in mit BD1047 behandelten Zellen.

Da der Sigma1R am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und eine Rolle des Sigma1R an Autophagie vermutet wird (Yang *et al.*, 2019), wurde überprüft, ob im Sigma1R-KO und durch pharmakologische Inhibition des Sigma1R das Expressionslevel von ER-Phagie-

Rezeptoren kompensatorisch ansteigt. Dafür wurde zusätzlich ER-Stress durch Tunicamycin in den Zellen induziert und das Expressionslevel von ER-Phagie Rezeptoren bestimmt (Abbildung 4.21; Osowski und Urano, 2011).

Es wurde das relative Expressionslevel der ER-Phagie Rezeptoren FAM134B, TEX264, Sec62 und ATL3 bestimmt. Im Sigma1-KO Bd5 und nach pharmakologischer Inhibition des Sigma-1-Rezeptors durch BD-1047 konnte keine Veränderung der ER-Phagie Rezeptoren unter basalen Bedingungen bestimmt werden (Abbildung 4.21A und B). Nach Induktion mit dem ER-Stressor Tunicamycin wurde im WT eine tendenziell erhöhte Expression der ER-Phagie Rezeptoren TEX264 und Sec62 gemessen. In den mit BD1047 behandelten Zellen und im Sigma1R-KO zeigte sich jedoch keine Veränderung nach Induktion mit ER-Stress. Zudem konnte keine signifikante Veränderung zum Expressionslevel der ER-Phagie Rezeptoren in mit Tunicamycin behandelten WT Zellen gemessen werden (Abbildung 4.21A und B).

4.3 Die Rolle des Sigma-1 in der Aggregation von Proteinen

4.3.1 Der Sigma-1-Rezeptor und ER-Stress

Um die Bedeutung des Sigma1R auf die Antwort der Zelle auf ER-Stress zu analysieren, wurde in den Zellen mittels verschiedener ER-Stressoren ER-Stress induziert. Unter anderem wurde Tunicamycin verwendet, welches die Glykoprotein-Synthese am endoplasmatischen Retikulum inhibiert, was zu einer Anreicherung von ungefalteten Glykoproteinen im ER und damit zu ER-Stress führt (Osowski und Urano, 2011). Dafür wurden HeLa-Zellen für 48 h mit Tunicamycin behandelt und das Expressionslevel des Sigma1R bestimmt (Abbildung 4.22). Als ER-Stress Marker wurde Bip/GRP78 verwendet (Lee, 2005). Da der Sigma1R ein molekulares ER-Chaperon ist (Hayashi und Su, 2007; Tsai *et al.*, 2009), wurde zusätzlich das Expressionslevel von Ubiquitin in HeLa-Bd5 und in mit dem Sigma1R-Inhibitor BD1047 behandelten Zellen verglichen zum WT untersucht. HeLa-WT Zellen wurden dafür mit 10 μ M BD-1047 für insgesamt 24 h behandelt.

Die Erhöhung des ER-Stressors Bip/Grp78 in den mit Tunicamycin behandelten Proben zeigt, dass ER-Stress induziert werden konnte (Abbildung 4.22A und B). Zudem konnte das Expressionslevel des Sigma1R in Wildtyp-Zellen nach Behandlung mit Tunicamycin auf das 2-3-fache erhöht werden im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Nach Behandlung mit dem Sigma1R-Inhibitor BD1047 wurde das Sigma1R Expressionslevel nach Behandlung mit Tunicamycin nicht signifikant gesteigert, was an der leichten Steigerung des Sigma1R Expressionslevels nach Behandlung mit BD1047 liegen könnte und einer kompensatorischen Reaktion der Zellen entspricht (Abbildung 4.22A und B). Das Expressionslevel von Ubiquitin ist zwar nach Behandlung der HeLa-WT Zellen mit Tunicamycin sowie im Knockout Bd5 tendenziell erhöht, es konnte aber keine signifikante Veränderung festgestellt werden (Abbildung 4.22A und B).

Da der Sigma1R in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration im endoplasmatischen Retikulum aktiviert wird (Hayashi und Su, 2007), wurden die Zellen in einer weiteren Analyse mit Thapsigargin behandelt. Thapsigargin inhibiert die Calcium-ATPase SERCA und führt

dadurch zu einer Depletion von Calcium im endoplasmatischen Retikulum (Osowski und Urano, 2011). Dafür wurden Wildtyp und Sigma1R-KO Zellen Bd5 24-72 h mit Thapsigargin behandelt und das Expressionslevel von Proteinen untersucht, die an der *Unfolded Protein Response* beteiligt sind, wie IRE1 α , eIFP2 α und peIFP2 α (Abbildung 4.23; Read, 2021).

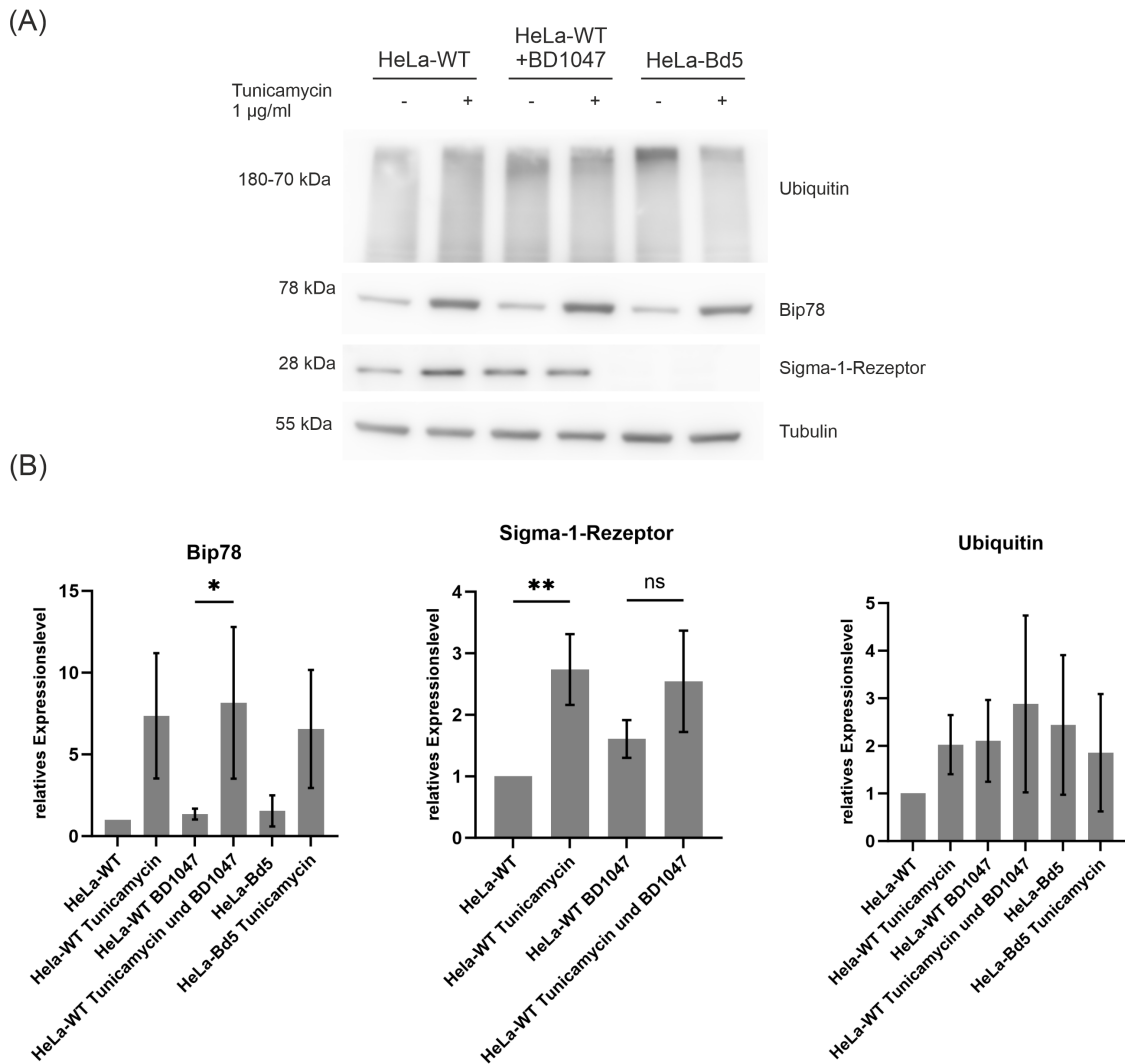


Abbildung 4.22: Induktion von ER-Stress in HeLa-Zellen. (A) Western-Blot Analyse von HeLa-Zellen nach der Behandlung mit 1 μ g/ml Tunicamycin für 48 h und 2 h Vorbehandlung mit BD1047. (B) Quantifizierung des Western-Blots unter (A), $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, *One-way* ANOVA, $n=4$. Für die Expression von Ubiquitin wurden keine signifikanten Änderungen festgestellt. Bip/Grp78 diente als Marker für die Induktion von ER-Stress, welcher durch eine Erhöhung von Bip in den mit Tunicamycin behandelten Zellen zu sehen ist. Behandlung der Zellen mit Tunicamycin für 48 h zeigte eine Erhöhung des Sigma1R in WT Zellen. Das Ubiquitin-Level der Zellen konnte im WT leicht erhöht werden, zeigte im Sigma1R-KO und in mit BD1047 behandelten Zellen jedoch keine Veränderung.

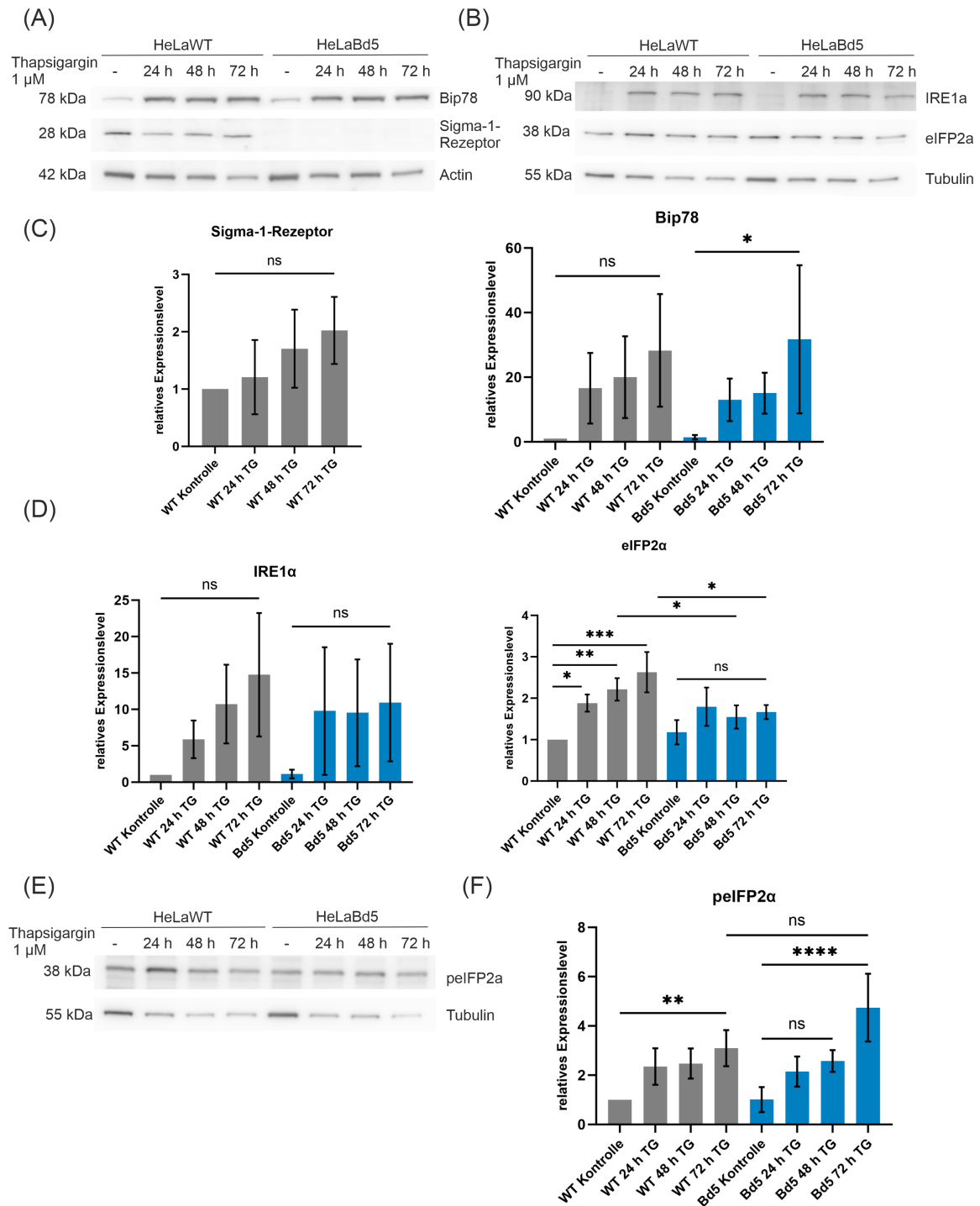


Abbildung 4.23: Induktion von UPR in HeLa-Zellen. (A) Western-Blot Analyse von HeLa-Zellen nach Behandlung mit 1 μM Thapsigargin für 24-72 h, dargestellt sind Bip/Grp78 und Sigma1R. (B) Western-Blot Analyse von HeLa-Zellen nach Behandlung mit 1 μM Thapsigargin für 24-72 h, dargestellt sind IRE1α und eIFP2α. (C) Quantifizierung der Western-Blots unter (A). (D) Quantifizierung des Western-Blots unter (B). (E) Western-Blot Analyse von HeLa-Zellen nach Behandlung mit 1 μM Thapsigargin für 24-72 h, dargestellt ist pEIFP2α. (F) Quantifizierung des Western-Blots unter (E), $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$, *One-way* ANOVA, $n=4$. Bip/Grp78 diente als Marker für ER-Stress und wurde nach Behandlung mit Tunicamycin erhöht, was eine Induktion von ER-Stress zeigt. Die Expression des Sigma1R konnte in WT Zellen tendenziell erhöht werden. Es zeigte sich keine Veränderung in der Expression von IRE1α in WT und Sigma1R-KO Bd5 nach Behandlung mit Tunicamycin. eIFP2α konnte nach 72 h nicht gleichermaßen im Sigma1R-KO Bd5 wie im WT erhöht werden. Die phosphorylierte Form pEIFP2α wurde nach 72 h Behandlung im Sigma1-KO Bd5 tendenziell stärker erhöht als im WT.

Bip/Grp78 wurde als Marker für ER-Stress verwendet. Die Behandlung mit dem ER-Stressor Thapsigargin führte zu einer Induktion von Bip/Grp78 in WT und Sigma1R-KO Zellen Bd5, was die Induktion von ER-Stress bestätigt (Abbildung 4.23A und C). Durch die Behandlung mit Thapsigargin wurde das Expressionslevel des Sigma1R im Wildtyp tendenziell auf das zweifache gesteigert (Abbildung 4.23A und C). IRE1 α wurde im Wildtyp wie auch im Sigma1R-KO Bd5 tendenziell erhöht (Abbildung 4.23B und D). eIFP2 α zeigte im Wildtyp eine zeitabhängige Steigerung, die nach 72 h auf das 3-fache angestiegen ist, während im Sigma1R-KO Bd5 nur eine Steigerung auf das 1,5-fache erreicht wurde. Dadurch ist das Expressionslevel von eIFP2 α nach 48 und 72 h im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (Abbildung 4.23B und D). Die phosphorylierte Form von eIFP2 α wurde im Wildtyp wie auch im Sigma1R-KO Bd5 durch Behandlung mit Thapsigargin auf das 2-3-fache erhöht. Im Sigma1R-KO Bd5 konnte nach 72 h ein höheres Expressionslevel von peIFP2 α auf das 4-5-fache erreicht werden. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zum Expressionslevel von peIFP2 α in WT Zellen festgestellt werden (Abbildung 4.23E und F).

4.3.2 Der Einfluss des Sigma-1-Rezeptors auf die Aggregation von α -Synuclein

Da der Sigma1R im Zusammenhang mit Proteinaggregation und neurodegenerativen Erkrankungen stehen soll (Nguyen, 2015), wurde der Zusammenhang zwischen α -Synuclein Aggregation und Sigma1R untersucht. Dazu wurden α -Synuclein Überexpressionskonstrukte mittels Calcium-Phosphat Transfektion im Wildtyp und im Knockout Bd5 überexprimiert. α -Synuclein ist dabei an *Green Fluorescent Protein* (GFP) gekoppelt und wurde einmal als Wildtyp-Konstrukt (aSynWT-GFP) und als Mutante A53T (aSynA53T-GFP) verwendet. Die Zellen wurden nach dem Ernten mittels des Proteinaggregationsassays in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt und das Expressionslevel der unlöslichen im Verhältnis zur löslichen Fraktion bestimmt (Abbildung 4.24).

Die erfolgreiche Fraktionierung der Zellen in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion wurde mittels Histon H4 als Kernprotein für die unlösliche Fraktion und SOD-1 für die lösliche Fraktion überprüft. Die Anwesenheit von Histon H4 in der unlöslichen Fraktion, nicht aber in der löslichen Fraktion und die Anwesenheit von SOD-1 in der löslichen, nicht aber in der unlöslichen Fraktion zeigt die erfolgreiche Fraktionierung der Zellen (Abbildung 4.24A). Wird das α -Synuclein-WT Konstrukt in den Zellen überexprimiert, wird das Verhältnis zwischen unlöslicher und löslicher Fraktion im Sigma1R-KO Bd5 im Verhältnis zum Wildtyp auf das 1,5-fache signifikant erhöht. In der Mutante A53T zeigt sich kein Unterschied im Verhältnis von unlöslicher zu löslicher Fraktion im Knockout Bd5 im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 4.24B und C).

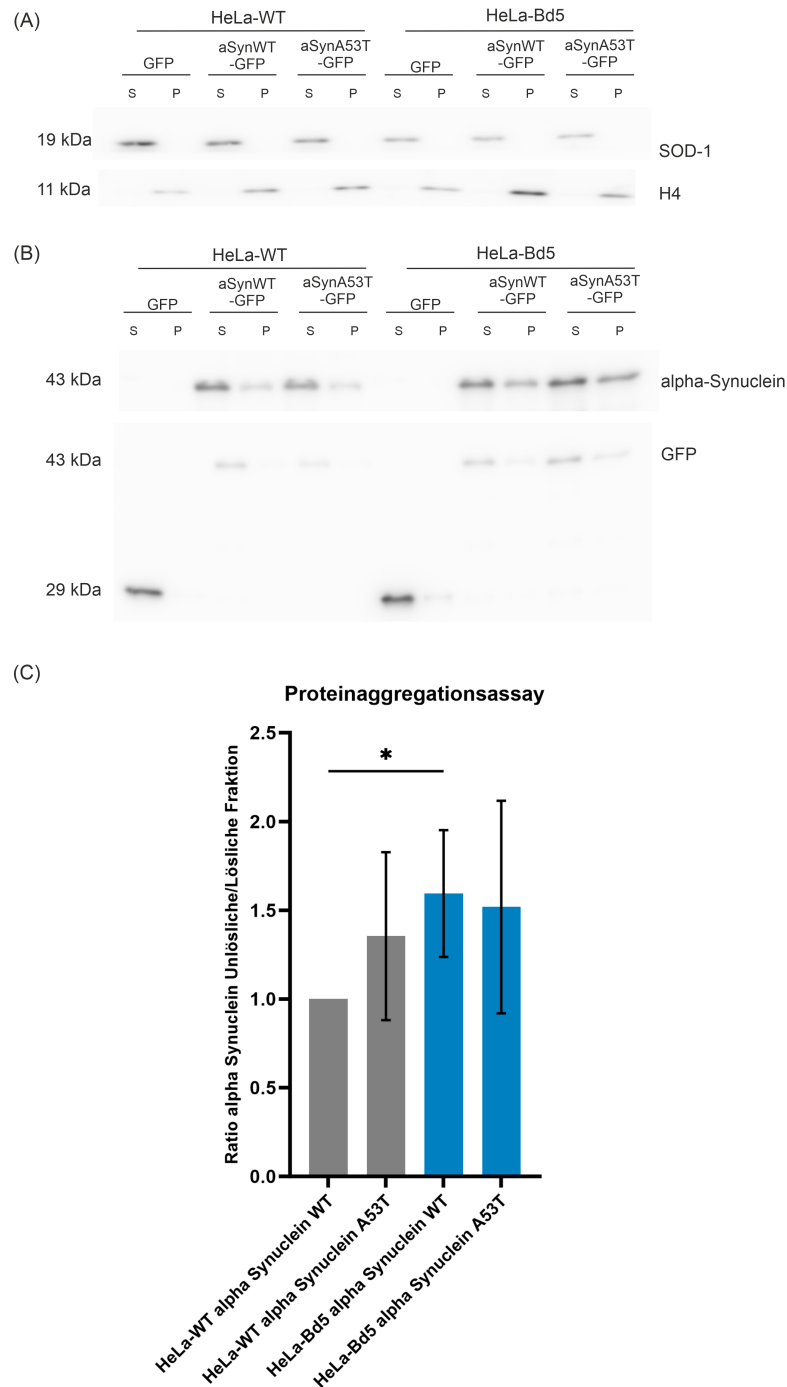


Abbildung 4.24: Proteinaggregationsassay in HeLa-Zellen nach Transfektion mit α -Synuclein-Konstrukten. (A) Qualitätskontrolle des Proteinaggregationsassays zum Erhalt einer löslichen und einer unlöslichen Fraktion. Als Marker wurden SOD-1 für die lösliche Fraktion (S, *Soluble*) und H4 für die unlösliche Fraktion (P, *Pellet*). (B) Western-Blot Analyse der löslichen und unlöslichen Fraktion von HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion mit α -Synuclein Konstrukten. (C) Quantifizierung des Western-Blots unter (B), angegeben ist das Verhältnis von α -Synuclein in unlöslicher zu löslicher Fraktion relativ zur Kontrolle, $*p \leq 0,05$, t-test, $n=4$. Es zeigte sich ein erhöhtes Verhältnis von unlöslicher zu löslicher Fraktion des α -Synuclein WT in Sigma1R-KO Bd5 im Vergleich zum WT. Die Überexpression der Mutante aSynA53T zeigte keine Veränderung.

Zudem wurden H4-Neurogliom Zellen verwendet, die α -Synuclein *tet-off* abhängig überexprimieren, um die α -Synuclein Expression in Abhängigkeit vom Sigma1R zu untersuchen. Zunächst wurde das *tet-off* System durch Behandlung der Zellen mit Doxycyclin für 48 und 72 h überprüft (Abbildung 4.25A und B). Die α -Synuclein Expression konnte durch die Behandlung mit Doxycyclin signifikant auf das 0,5-0,6-fache reduziert werden, während das Expressionslevel des Sigma1R durch die Behandlung nicht verändert wurde (Abbildung 4.25A und B).

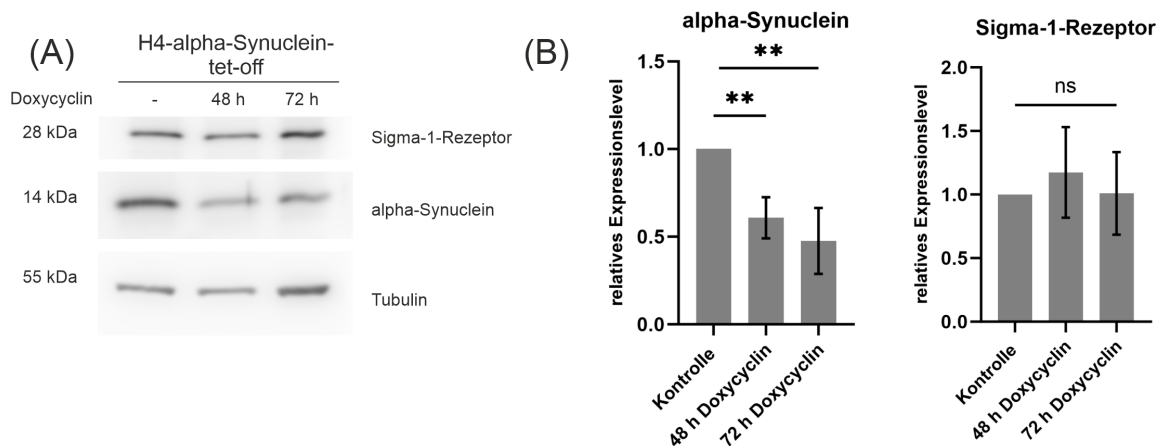


Abbildung 4.25: Doxycyclin-Behandlung eines α -Synuclein-*tet-off* Systems in H4-Zellen. (A) Western-Blot Analyse nach Behandlung mit 1µg/ml Doxycyclin für 48-72 h. (B) Quantifizierung des Western Blots unter (A), $**p \leq 0,01$, *One-way* ANOVA, $n=5$. Behandlung mit Doxycyclin zeigt die Funktionsweise des *tet-off*-Systems. Nach Behandlung mit Doxycyclin konnte die Menge an α -Synuclein signifikant reduziert werden. Das Expressionslevel von Sigma1R änderte sich dadurch nicht.

Zur Untersuchung der Bildung von α -Synuclein Aggregaten wurde ein spezieller Antikörper (MJFR) im Dot Blot eingesetzt, der mit einer höheren Präferenz α -Synuclein Oligomere als Monomere erkennt (Kumar *et al.*, 2020). Die Aggregatbildung wurde in Abhängigkeit vom Sigma1R untersucht durch Generierung eines Sigma-1-Knockdowns in den H4 Zellen (Abbildung 4.26A-D). In der Western-Blot Analyse wurde zunächst der Sigma-1-Knockdown und das totale α -Synuclein Expressionslevel überprüft. Durch die Transfektion mit siRNA konnte das Expressionslevel des Sigma1R auf das 0,5-fache reduziert werden. α -Synuclein konnte in den für 72 h mit Doxycyclin behandelten Zellen auch nach der Transfektion auf das circa 0,4-0,5-fache in der Kontrolle (scrambled siRNA) und im Sigma-1-Knockdown signifikant reduziert werden (Abbildung 4.26A und B). Der Sigma-1-Knockdown zeigte jedoch keine signifikante Veränderung im Expressionslevel von α -Synuclein. Im Dot Blot konnte nach der Behandlung mit Doxycyclin ebenfalls eine signifikante Reduktion des α -Synuclein Expressionslevels auf das 0,6-0,7-fache in den Kontrollproben (scrambled siRNA) bestimmt werden. Im Sigma1R-Knockdown konnte jedoch nur eine Tendenz zur Reduktion des α -Synuclein Expressionslevels auf das 0,6-0,7-fache erreicht werden. Die α -Synuclein überexprimierenden Zellen, die nicht mit Doxycyclin behandelt wurden, zeigen nach Sigma1R-Knockdown keine Veränderung des mit dem Antikörper MJFR detektierten Signals (Abbildung 4.26C und D).

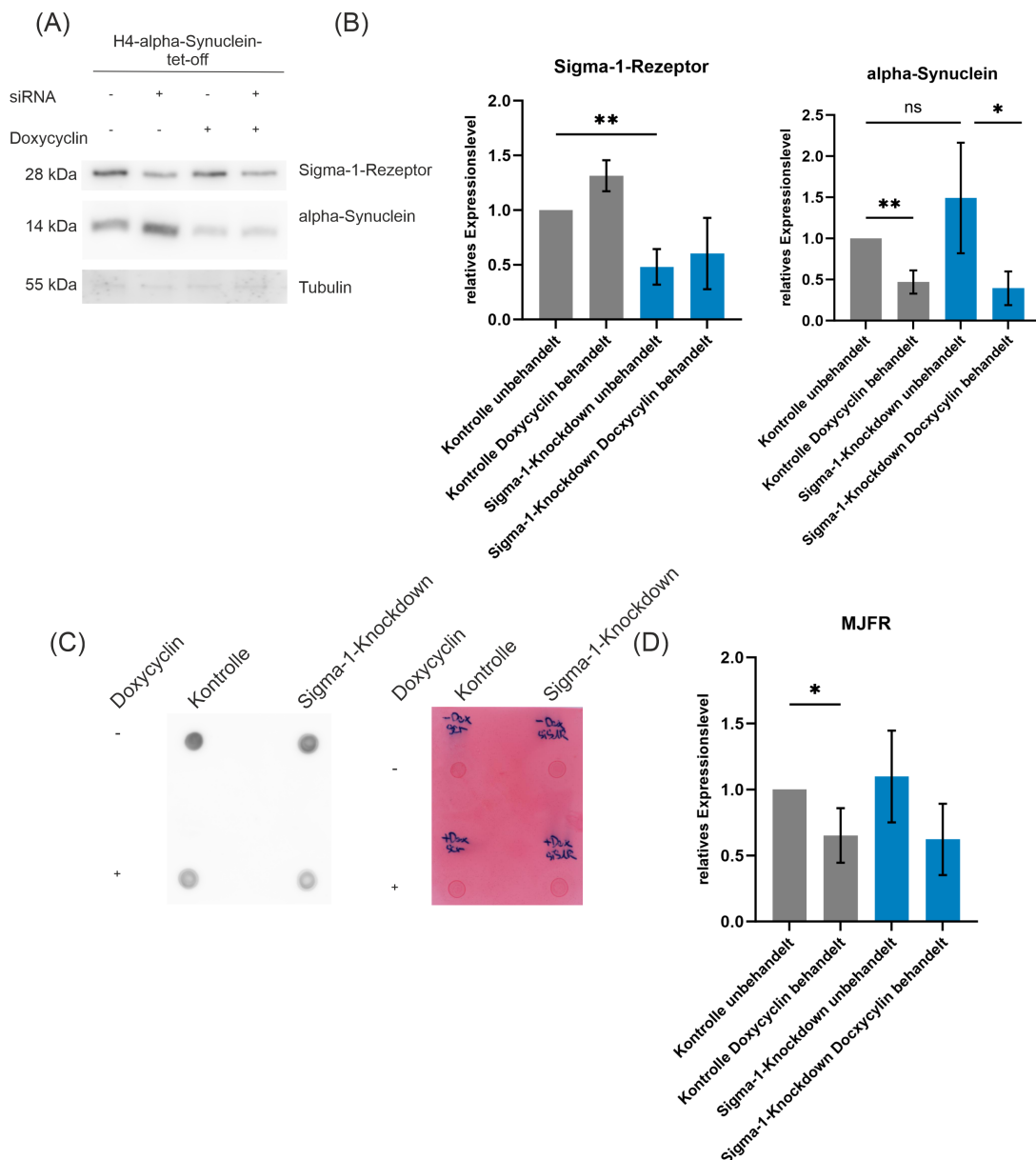


Abbildung 4.26: Genetische Manipulation des Sigma-1-Rezeptors in H4-Zellen mit α -Synuclein-tet-off System. (A) Western-Blot Analyse der totalen Menge an α -Synuclein normiert auf Tubulin nach Knockdown des Sigma1R, 48 h nach Transfektion mit siRNA. (B) Quantifizierung des Western-Blots unter (A), $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, *One-way* ANOVA, $n=5$. Die Expression des Sigma1R konnte nach Transfektion mit siRNA signifikant reduziert werden. Die Behandlung mit Doxycyclin zeige die erwartete Reduktion von α -Synuclein auch nach der Transfektion. Ein Knockdown des Sigma1R zeigte keine Änderung im totalen Level von α -Synuclein im Vergleich zur Kontrolle. (C) Dot-Blot Analyse einer aggregierten Form von α -Synuclein mittels des Antikörpers MJFR und Ponceau-Färbung. (D) Quantifizierung des Expressionslevels von MJFR normiert auf Ponceau aus dem Dot-Blot unter (C), $*p \leq 0,05$, *One-way* ANOVA, $n=4$. MJFR ist ein Antikörper für α -Synuclein, der eine Präferenz für die aggregierte Form von α -Synuclein zeigt. In der Kontrolle (Transfektion mit *scrambled* siRNA) zeigte sich nach Behandlung mit Doxycyclin die erwartete Reduktion von α -Synuclein durch das *tet-off*-System. Im Knockdown konnte die Expression von α -Synuclein nur tendenziell reduziert werden nach Behandlung mit Doxycyclin und es zeigte sich keine Veränderung im detektierten Signal für MJFR im Vergleich zur Kontrolle (Transfektion mit *scrambled* siRNA) in unbehandelten Zellen.

4.4 Proteomics-Analyse

Zur weiteren Analyse der Rolle des Sigma1R in zellbiologischen Prozessen, insbesondere dem Lipid-Metabolismus und der Autophagie, wurden Proteomics-Analysen durchgeführt. Die Proteomics Analysen wurden von Kooperationspartnern durchgeführt. Dazu wurden Gesamtllysate der Zellen des Sigma1R-KO Bd5 im Vergleich zum Wildtyp untersucht sowie der Sigma-1-Knockdown relativ zu seiner Kontrolle (*scrambled* siRNA). Die Tendenzen von Sigma1R-KO Bd5 zu Wildtyp sowie Knockdown zu Kontrolle wurden miteinander verglichen. Zunächst wurden dafür die Proben generiert und mittels Western-Blot Analyse eine Qualitätskontrolle der Proben hinsichtlich des Sigma1R Expressionslevels durchgeführt (Abbildung 4.27).

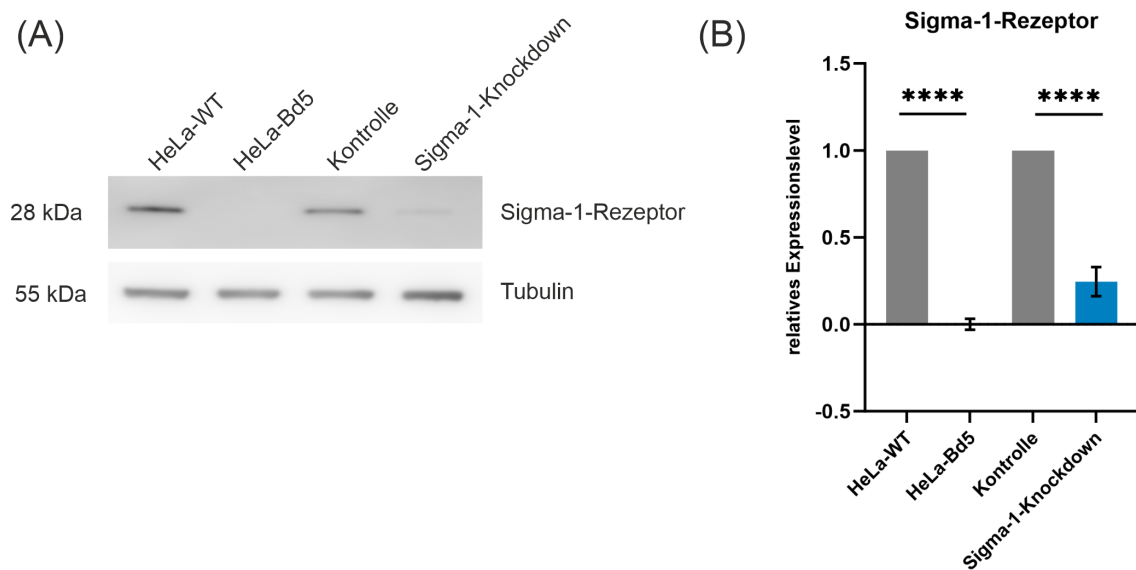


Abbildung 4.27: Qualitätskontrolle der Proben für Proteomics-Analyse. (A) Western-Blot Analyse zur Qualitätskontrolle der Proben WT, Sigma1R-KO Bd5, Kontrolle (WT Zellen transfiziert mit *scrambled* siRNA) und Sigma1R-Knockdown (WT-Zellen transfiziert mit Sigma1R-siRNA), 48 h nach Transfektion. (B) Quantifizierung des Western Blots unter (A), **** $p \leq 0,0001$, One-way ANOVA, $n=4$. Es zeigte sich deutlich die Qualität der Proben durch die nicht vorhandene Bande für den Sigma1R im Knockout und die deutliche Reduktion des Sigma1R-Expressionslevels im Knockdown.

Da das Expressionslevel des Sigma1R im Sigma-1-Knockdown auf das 0,2-fache im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert werden konnte und für den Sigma1-KO Bd5 kein Signal in der Western-Blot Analyse vorhanden war, war die Qualitätskontrolle erfolgreich und die Proben wurden für die weitere Proteomics-Analyse eingesetzt (Abbildung 4.27A und B). Zunächst wurde dabei der Sigma1R-KO Bd5 mit dem Wildtyp verglichen und der Sigma-1-Knockdown mit der Kontrollprobe (Abbildung 4.28).

Innerhalb der Proteomics-Analyse konnten 1304 Proteine detektiert werden, von denen 137 im Sigma1R-KO Bd5 im Vergleich zum WT und 178 Proteine im Knockdown im Vergleich zur Kontrolle verändert waren. Gleiche Proteinrelationen zeigten sich dabei bei 34 der veränderten Proteine. Die Proteomics-Analyse des Sigma1R-KO Bd5 im Vergleich zum Wildtyp zeigte vor allem Änderungen in den Bereichen Proteinbiosynthese und DNA-Replikation sowie in

den Proteinen des Zytoskeletts, von denen angenommen wird, dass es sich um unspezifische Signale handelt. Es zeigen sich aber auch Veränderungen im Lipid-Metabolismus, der Protein-Faltung und dem Protein-Abbau sowie in der Immunantwort (Abbildung 4.28B). Stark erhöht ist LRP4, welches zur Familie der Lipoprotein Rezeptoren gehört und am Abbau von Amyloid- β Plaques bei Alzheimer beteiligt ist, mit einer *log2 difference* von circa 5 (Zhang *et al.*, 2020). Weniger stark erhöht sind Rab10, CAPNS1, TGM2 und Caveolin 1 mit einer *log2 difference* von 1-2, stark erniedrigt ist unter anderem HSPA6 mit einer *log2 difference* von -4 (Abbildung 4.28A). Rab10 ist involviert in den Transport von Proteinen von frühen Endosomen zum trans-Golgi Netzwerk und auch in den retrograden Transport von Proteinen zum trans-Golgi Netzwerk, wodurch auch Amyloid- β und APP über Exocytose aus der Zelle transportiert werden können (Babbey *et al.*, 2006; Tavana *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016). CAPNS1 gehört zur Familie der Calpain Proteine und fungiert in diversen biologischen Prozessen, unter anderem Apoptose, Adhäsion, Sekretion und Autophagie (Cataldo *et al.*, 2013). Transglutaminase (TGM2) ist ein Enzym, welches verschiedene Reaktionen katalysiert, unter anderem Transamidierungen, Protein-Disulfidisomerase Aktivität und die Hydrolyse von Guanin- und Adeninnucleotiden. Zu seinen Substraten zählen unter anderem NF- κ B und Cytochrom c (Gundemir *et al.*, 2012). HSPA6 ist ein molekulares Chaperon, welches vor allem bei Stress induziert wird (Ramirez *et al.*, 2014). Da der Sigma1R ein Calcium-abhängiges Protein ist, wurden die detektierten Proteine zudem nach ihrer Calcium-Abhängigkeit eingeteilt, wobei ein geringer Teil der detektierten Proteine eine Calcium-Abhängigkeit zeigte (Abbildung 4.28B). Insgesamt sind hier vor allem die Proteine LRP4 und Rab10 von Interesse, da sie am Abbau von Amyloid- β beteiligt sind und somit einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Verlust des Sigma-1-Rezeptors und der Aggregation von Proteinen zeigen.

Im Sigma1R-Knockdown sind im Vergleich zur Kontrolle vor allem Änderungen bei Proteinen im Bereich Proteinbiosynthese, DNA-Replikation und in Proteinen des Zytoskeletts. Wie im Knockout Bd5 finden sich aber auch Änderungen im Lipid-Metabolismus, in der Protein-Faltung und dem Protein-Abbau, der Immunantwort sowie in mitochondrialen Proteinen und der Apoptose (Abbildung 4.28D). Schwach erhöht sind unter anderem Ubiquilin 2 (UBQLN2), GLUT1 (SLC2A1) und Annexin A1 mit einer *log2 difference* von 1-2, während HSPA6 stark erniedrigt ist mit einer *log2 difference* von -4 (Abbildung 4.28C). Ubiquilin 2 fungiert als Protein des Ubiquitin-Proteasom Systems und ist auch am Abbau von Proteinen über Autophagie beteiligt (Zhang *et al.*, 2014). GLUT1 ist ein Transporter für die Aufnahme von Glucose in Zellen (Pragallapati und Manyam, 2019) und Annexin A1 ist ein Calcium-abhängiges Phospholipid bindendes Protein, welches an der Proliferation und Differenzierung von Zellen, Apoptose und an Entzündungsreaktionen beteiligt ist (Shao *et al.*, 2019). Auch im Sigma1R-Knockdown im Vergleich zur Kontrolle ist ein geringer Anteil der detektierten Proteine Calcium-abhängig (Abbildung 4.28D). Hier steht vor allem Ubiquilin 2 im Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten zellulären Prozesse.

Der Vergleich von Tendenzen im Sigma1R-KO Bd5 und im Sigma1R-Knockdown relativ zu den Kontrollproben zeigt vor allem wieder Veränderungen in Proteinen der Proteinbiosynthese, des Zytoskeletts und der DNA-Synthese. Auch hier sind Proteine des Lipid-Metabolismus,

des Metabolismus von Zellen zum Energieerhalt und Annexin-Proteine verändert. Vor allem reduziert ist das Protein HSPA6 und erhöht ist unter anderem TGM2 sowie Annexin A1. In Bezug auf den Metabolismus von Lipiden ist NCEH1 (*neutral cholesterol ester hydrolase*) und Caveolin 1 erhöht. LRP4 ist im Sigma1R-Knockdown nicht verändert.

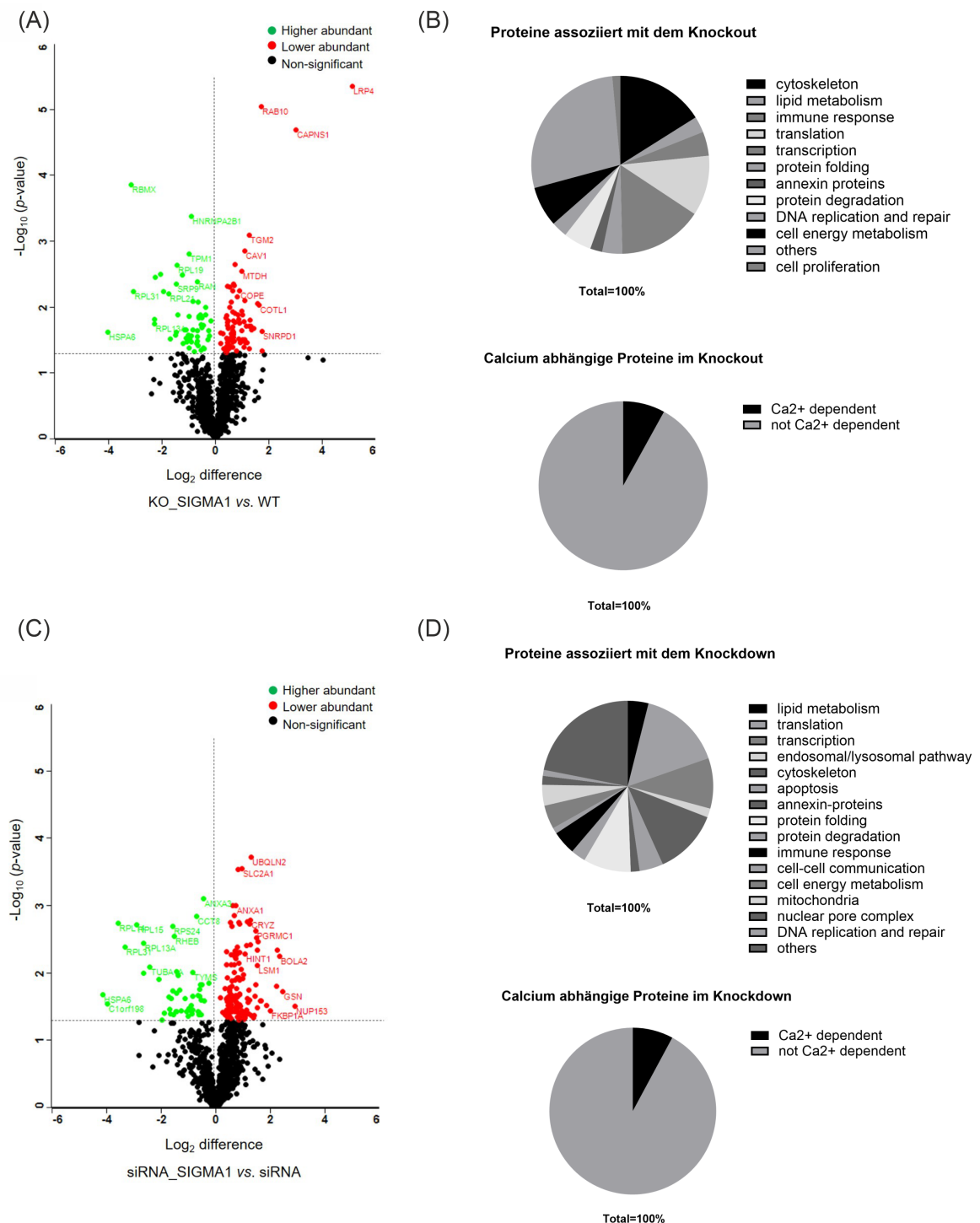
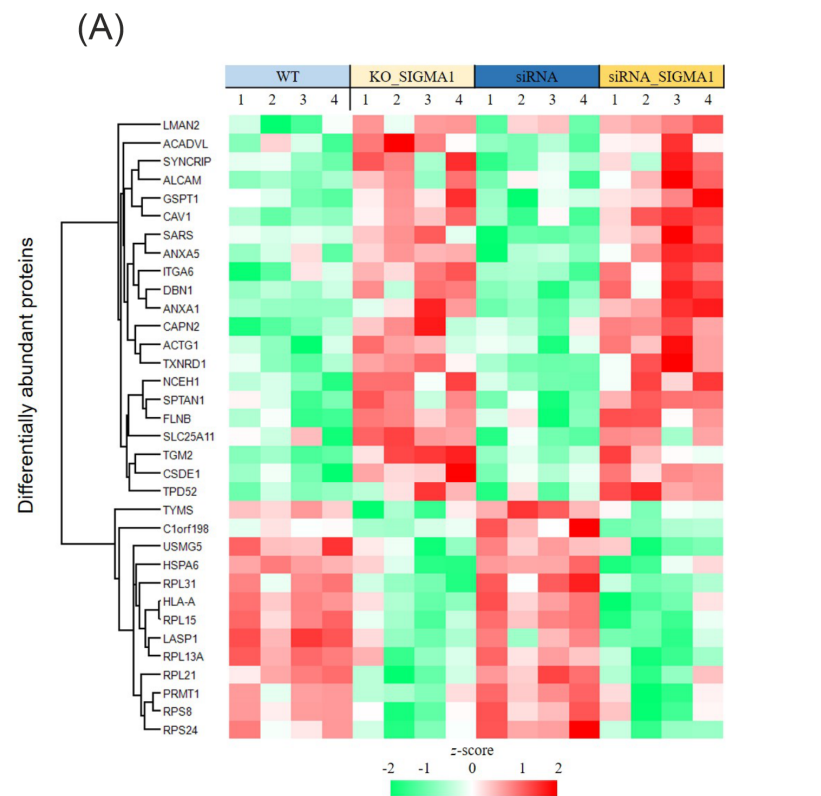
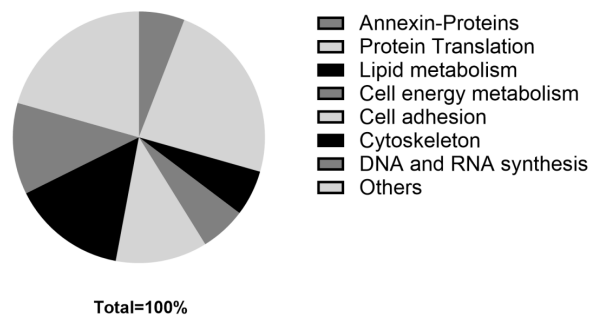


Abbildung 4.28: Proteomics-Analyse nach Knockout und Knockdown des Sigma-1-Rezeptors. (A) Volcano-Plot der veränderten Expressionslevel im Sigma-1-Knockout Bd5 relativ zum Wildtyp, n=4. (B) Verteilung der veränderten Proteine entsprechend ihrer Funktion und Abhängigkeit von Calcium im Knockout Bd5. (C) Volcano-Plot der veränderten Expressionslevel im Sigma-1-Knockdown relativ zur Kontrolle, n=4. (D) Verteilung der veränderten Proteine entsprechend ihrer Funktion und Abhängigkeit von Calcium im Knockdown.



(B)

Proteine assoziiert mit dem Knockout und Knockdown



Calcium abhängige Proteine im Knockout und Knockdown

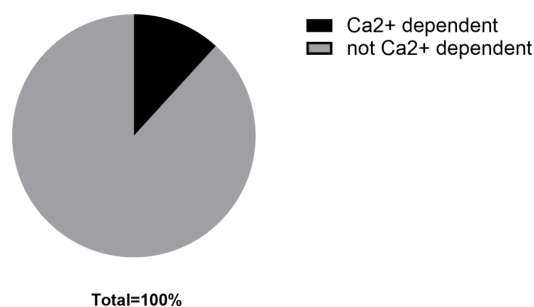


Abbildung 4.29: Vergleich der Proteomics-Analyse nach Knockout und Knockdown des Sigma-1-Rezeptors. (A) Vergleich der veränderten Expressionslevel im Knockout Bd5 und im Knockdown des Sigma1R. (B) Verteilung der veränderten Proteine entsprechend ihrer Funktion und Abhängigkeit von Calcium im Knockout Bd5 und im Knockdown des Sigma1R.

4.4.1 Der Sigma-1-Rezeptor und sein Einfluss auf die MAM

Da der Sigma1R an der MAM lokalisiert ist und die MAM Funktionen vereint, die auch dem Sigma1R zugesprochen werden, insbesondere Autophagie, Lipid-Metabolismus und Calcium-Signaling, wurde zusätzlich zur Analyse des Gesamtlysats die MAM isoliert (Abbildung 4.32), um davon eine Proteomics-Analyse durchzuführen (Hayashi und Su, 2007; Degechisa *et al.*, 2022). Zudem wurden Kolokalisierungsanalysen mit den Sigma-1-Konstrukten und einem ER-Marker und einem Mitochondrien-Marker durchgeführt. Als ER-Marker wurde wie zuvor beschrieben Sec62 (Abbildung 4.30) und als Mitochondrien Marker TOM20 (Abbildung 4.31) eingesetzt (Zhemkov *et al.*, 2021). Die Kolokalisierungsanalysen wurden in HeLa-WT Zellen und im Sigma1R-KO Bd5 durchgeführt, um eine Beeinträchtigung der Analyse durch die Bildung von Oligomeren des Sigma1R auszuschließen (Schmidt *et al.*, 2019).

Zur Analyse der Kolokalisierung wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt. Insgesamt zeigte das Kontrollkonstrukt Sigma-1-Flag eine moderate Kolokalisierung in HeLa-WT und Sigma1R-KO Bd5 Zellen mit Sec62 (Abbildung 4.30A und B) und TOM20 (Abbildung 4.31A und B) mit Pearson-Koeffizienten im Bereich 0,5-0,7. Dies zeigt keine vollständige Kolokalisierung des Sigma1Rs mit den Mitochondrien oder dem ER, aber eine teilweise Kolokalisierung, was die Lokalisation des Sigma1R an der MAM bestätigt (Zhemkov, *et al.* 2021). Für den ER-Marker Sec62 konnte in HeLa-WT und im Sigma1R-KO Bd5 keine signifikante Änderung des Pearson-Korrelationskoeffizienten für die Mutanten E102Q, E138Q und die Deletionsmutanten d176-223 und d91-109 festgestellt werden (Abbildung 4.30A und B). Auffällig ist die Reduktion des Koeffizienten nach Überexpression des Konstruktes d2-29 von circa 0,3 auf 0,2 im WT und 0,5-0,6 auf 0,1-0,2 im Sigma1R-KO Bd5, welches wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben eine moderate Kolokalisation mit Lipid-Tröpfchen zeigt. In den mikroskopischen Aufnahmen zeigt sich deutlich die zuvor beschriebene Veränderung des Sigma-1-Signals von einer im ER verbreiteten, vor allem perinukleären Färbung zu Punctae, die sowohl am Kern als auch in der Peripherie der Zelle vorkommen (Abbildung 4.30A). Auch in der Kolokalisierungsanalyse mit dem mitochondrialen Marker TOM20 zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Pearson-Koeffizienten in den Mutanten E102Q, E138Q und den Deletionsmutanten d176-223 und d91-109 im Vergleich zur Kontrolle Sigma-1-Flag in Wildtyp-Zellen und im Sigma1R-KO Bd5 (Abbildung 4.31A und B). Lediglich die Deletionsmutante d2-29 zeigte erneut eine Reduktion des Pearson-Koeffizienten von 0,3-0,4 auf 0-0,1 im WT und 0,4-0,6 auf 0,1-0,2 im Sigma1R-KO Bd5 aufgrund der Bildung von Punctae anstatt der üblichen ER verbreiteten Färbung (Abbildung 4.31A). Insgesamt konnte die Lokalisation des Sigma1R an der MAM verifiziert werden, welche durch die Deletion der Transmembrandomäne sowie des ER-Retentionssignals des Sigma1R vermutlich reduziert wird und der Sigma1R mit Lipid-Tröpfchen assoziiert (Abbildung 4.16 und 4.17).

Die Isolation der MAM wurde vor der Proteomics-Analyse der MAM-Fraktion mittels entsprechender Marker-Proteine in einer Western-Blot Analyse kontrolliert. Dazu wurden die Marker ACSL4 als MAM-Marker, Calnexin als ER-Marker und Cytochrom c als Mitochondrialer Marker verwendet (Abbildung 4.32A; Wieckowski *et al.*, 2009). Zur Qualitätskontrolle wurde eine unreine Mitochondrien-Fraktion untersucht. Sie enthält die reine Mitochondrien-Fraktion und die reine MAM-Fraktion, die anschließend durch Zentrifugation aufgetrennt

wurden. Der MAM-Marker ACSL4 tritt dabei hauptsächlich in der unreinen Mitochondrien-Fraktion und in der reinen MAM-Fraktion auf, ähnlich zum ER-Marker Calnexin, während der Mitochondrien-Marker Cytochrom c, welcher in der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist (Chen *et al.*, 2023), ausschließlich in der unreinen und in der reinen Mitochondrien-Fraktion vorkommt. Zudem wurde die qualitative Expression des Sigma1R in den Fraktionen überprüft. Dabei ist eine schwache Bande in der ER- und cytosolischen Fraktion, eine etwas stärkere Bande in der unreinen Mitochondrien-Fraktion und eine stark angereicherte Bande in der reinen MAM-Fraktion zu sehen. Dies zeigt deutlich die Lokalisation des Sigma1R an der MAM.

Da ein wichtiger Bestandteil der MAM der hohe Gehalt an Cholesterin ist, wurde in den reinen MAM-Fraktionen die Menge an freiem Cholesterin bestimmt (Abbildung 4.32B). Die Menge an freiem Cholesterin wurde dabei auf die Menge an Phospholipiden in den Fraktionen normiert und relativ zum HeLa-WT angegeben. Dabei konnte im Sigma-1-Knockout eine signifikante Reduktion des freien Cholesteringehalts an der MAM auf das ungefähr 0,7-0,8-fache bestimmt werden.

Die Proteomics Analyse der MAM wurde ebenfalls von Kooperationspartnern durchgeführt. Da der Sigma1R-KO Bd5 im Vergleich zum WT einen sehr hohen Lipid-Gehalt an der MAM aufwies, konnten mittels Proteomics nur die WT-Proben gemessen werden. Ein Vergleich der Proteinzusammensetzung der MAM-Proben ist an dieser Stelle daher nicht möglich. Es konnten bei der Analyse der MAM-Proben des WT insgesamt weniger Proteine detektiert werden als in der Gesamtanalyse (415 statt 1304), allerdings konnten für die MAM spezifische Proteine detektiert werden. Da die Analyse nicht abgeschlossen werden konnte, fehlen die Darstellungen im Volcano-Plot. Daher werden an dieser Stelle nur die wichtigsten MAM-spezifischen Proteine erwähnt. Detektiert wurden unter anderem VDAC1, GRP75 und VAPB, die Teil von Proteinkomplexen an der MAM sind und die MAM so stabilisieren (Szabadkai *et al.*, 2006; Stoica *et al.*, 2014; Liu und Zhu, 2017; Degechisa *et al.*, 2022). Zudem wurden einige Lipid-Metabolismus assoziierte Proteine detektiert. Darunter sind unter anderem ACSL3, ACAT1, FASN und ACLS4, welche am Metabolismus von Lipiden und an der Synthese von aktivierten Fettsäuren beteiligte Enzyme darstellen (Bu *et al.*, 2009; Kuwata und Hara, 2019; Jensen-Ursated und Semenkovich, 2012; Cases *et al.*, 1998). Für eine genauere Analyse wäre es nötig die Proteine zu fällen und anschließend wieder in Lösung zu bringen, um sie so von den Lipiden abzutrennen. Dazu könnte eine Fällung mit Trichloressigsäure verwendet werden, die schon erfolgreich eingesetzt wurde, um Lipid-Tröpfchen assoziierte Proteine zu fällen und anschließend für ein SDS-PAGE mit darauffolgender Proteomics-Analyse aufzubereiten (Schrul und Kopito, 2016; Zhang *et al.*, 2011).

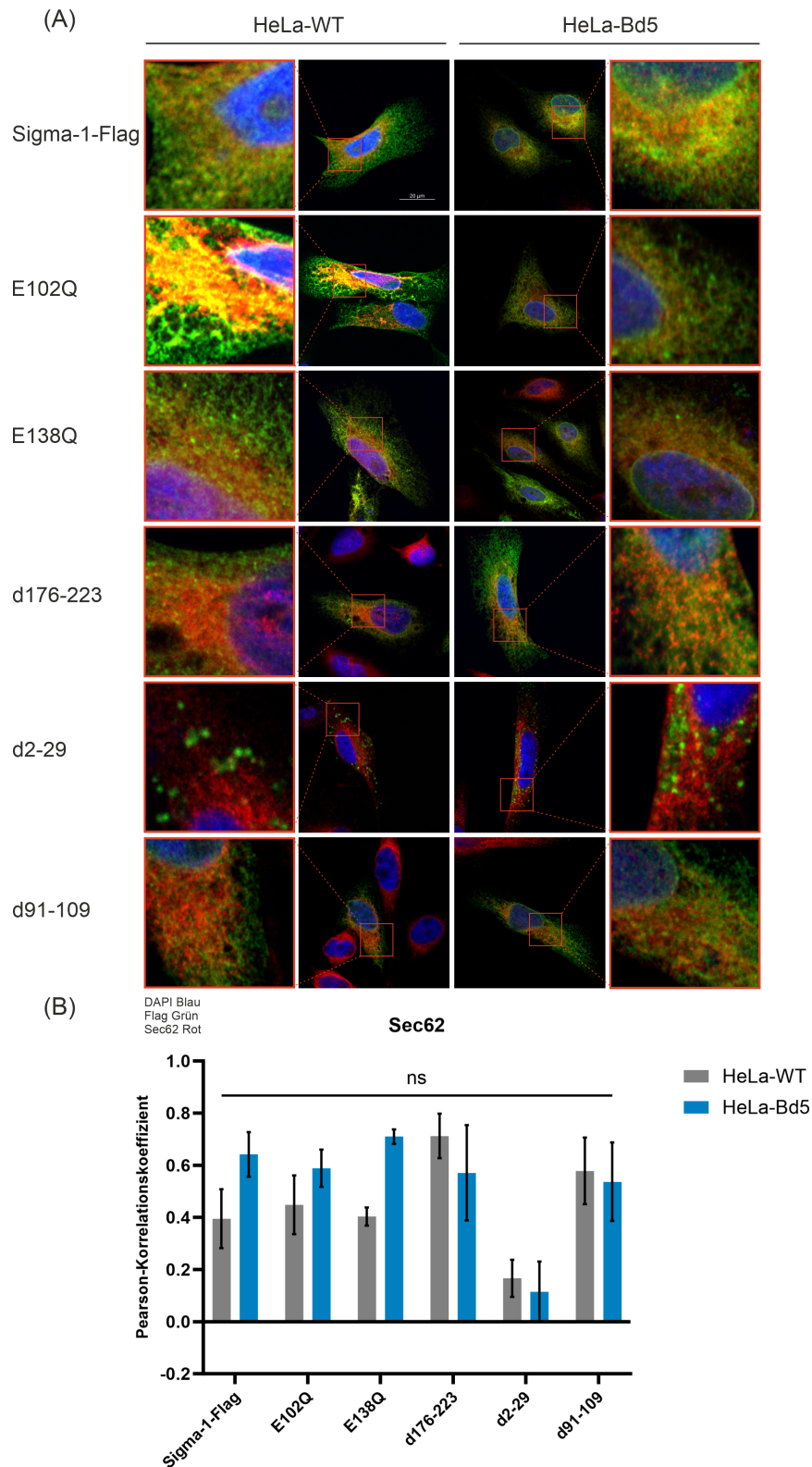


Abbildung 4.30: Kolokalisation verschiedener Konstrukte des Sigma-1-Rezeptors mit Sec62. (A) Mikroskopische Aufnahmen der Sigma-1-Konstrukte überexprimiert in HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion (mittlere Spalten) mit einem vergrößerten Bildausschnitt (äußere Spalten), gefärbt mit DAPI (Blau), Flag (Grün) und Sec62 (Rot), aufgenommen mit einer 100x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 20 μm . (B) Bestimmung des Pearson-Korrelations-Koeffizienten mittels Image J, $n=3$, *Two-Way* ANOVA. Sec62 ist ein ER-Marker. Das Konstrukt Sigma-1-Flag zeigt im WT und in Sigma1R-KO Bd5 eine moderate Kolokalisierung mit dem ER-Marker Sec62. Die Mutanten zeigen keine signifikante Veränderung. Die Mutante d2-29 zeigt eine Reduktion der Korrelationskoeffizienten, die aber nicht signifikant ist.

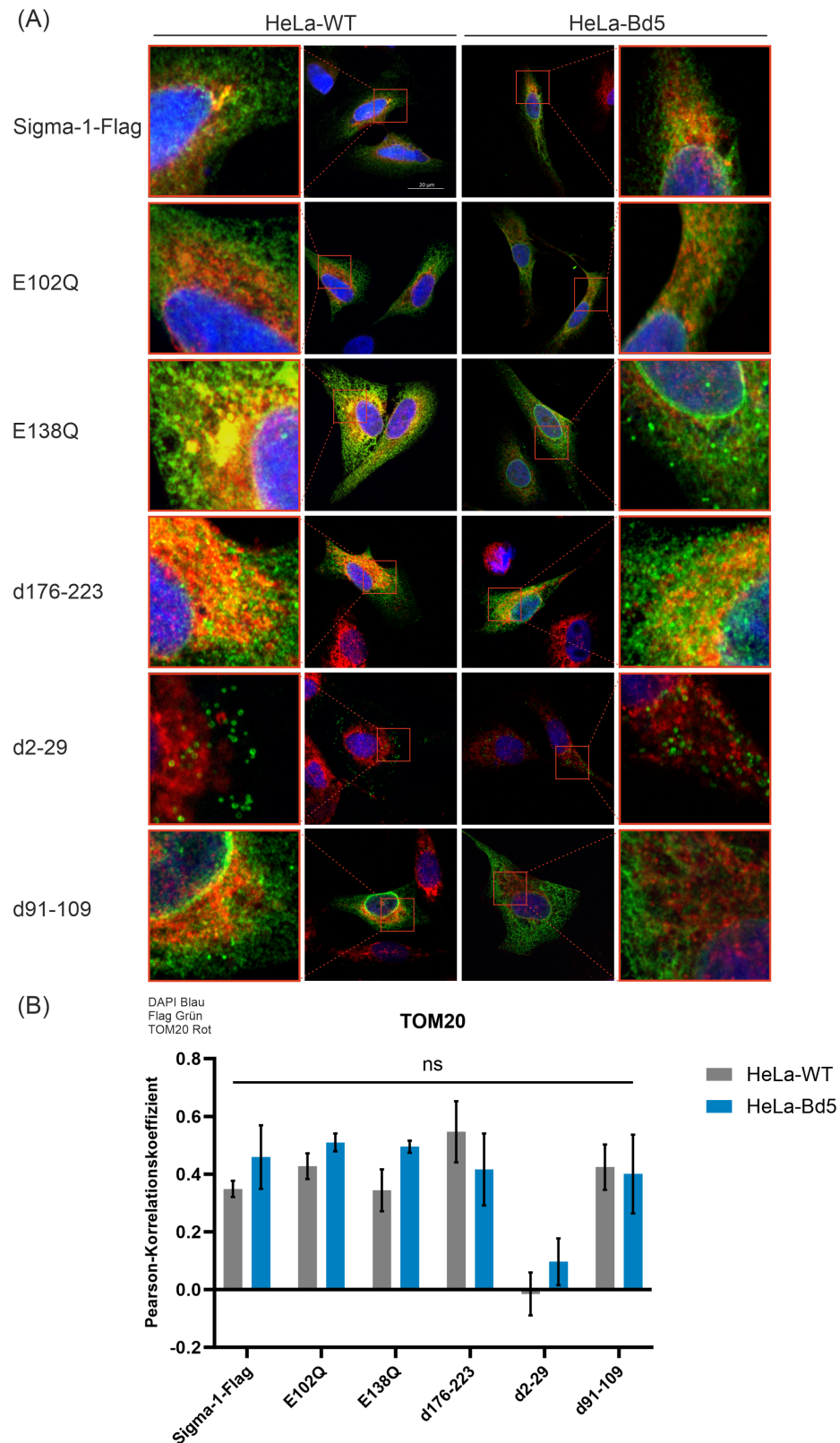


Abbildung 4.31: Kolokalisation verschiedener Konstrukte des Sigma-1-Rezeptors mit TOM20. (A) Mikroskopische Aufnahmen der Sigma-1-Konstrukte überexprimiert in HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion (mittlere Spalte) mit vergrößertem Bildausschnitt (äußere Spalte), gefärbt mit DAPI (Blau) Flag (Grün) und TOM20 (Rot), aufgenommen mit einer 100x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. (B) Bestimmung des Pearson-Korrelations-Koeffizienten mittels Image J, $n=3$, *Two-Way* ANOVA. TOM20 ist ein Mitochondrien-Marker. Das Konstrukt Sigma-1-Flag zeigt im WT und in Sigma1R-KO Bd5 eine moderate Kolokalisierung mit dem ER-Marker TOM20. Die Mutanten zeigen keine signifikante Veränderung. Die Mutante d2-29 zeigt eine Reduktion der Korrelationskoeffizienten, die aber nicht signifikant ist.

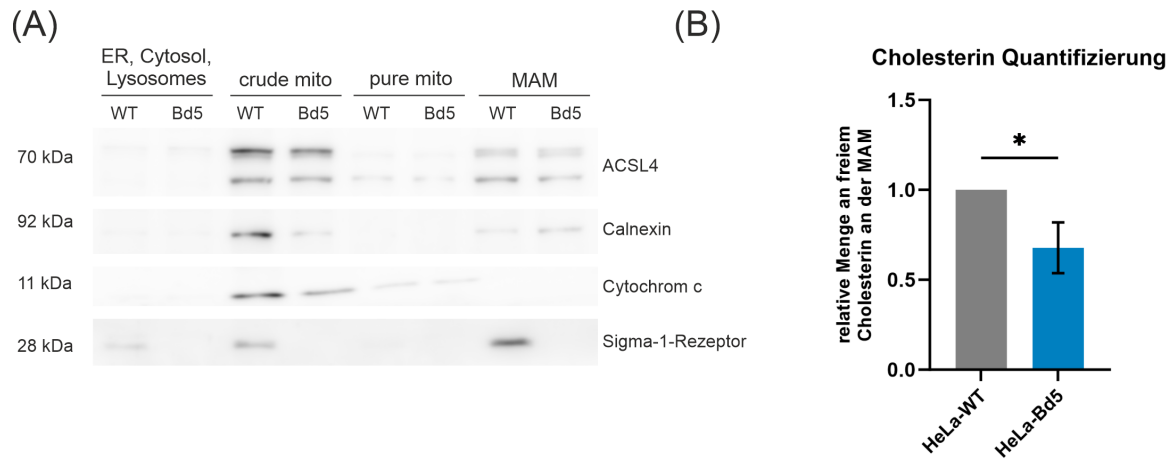


Abbildung 4.32: Isolation der Mitochondrien-ER assoziierten Membran aus HeLa-Zellen. (A) Western-Blot Analyse zur Qualitätskontrolle der Isolation der MAM. Es wurde ACSL4 als MAM-Marker, Calnexin als ER-Marker und Cytochrom c als Mitochondrien-Marker verwendet. Zusätzlich wurde die Expression von Sigma1R qualitativ bestimmt. (B) Bestimmung der relativen Menge an freiem Cholesterin in der MAM-Fraktion normiert auf den Gehalt an Phospholipiden, $*p \leq 0,05$, t-test, $n=4$. Es zeigte sich eine Reduktion an freiem Cholesterin im Sigma1R-KO Bd5 normiert auf den Gehalt an Phospholipiden in der MAM relativ zum WT.

5. Diskussion

5.1 Der Sigma-1-Rezeptor ist ein Modulator der Lipid-Tröpfchen Dynamik

5.1.1 Verlust des Sigma-1-Rezeptors führt zu einer Akkumulation von Lipid-Tröpfchen

Der Sigma-1-Rezeptor steht im Verdacht am Lipid-Metabolismus des endoplasmatischen Retikulums von Säugetierzellen beteiligt zu sein. Zudem soll er nicht nur am endoplasmatischen Retikulum sondern auch an Lipid-Tröpfchen lokalisiert sein und formt *Lipid-raft* ähnliche Mikrodomänen im ER (Hayashi und Su, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Sigma-1-Rezeptors auf den Metabolismus von Lipid-Tröpfchen untersucht. Durch die Charakterisierung der Sigma-1-Knockout Zelllinien konnte zunächst vermutet werden, dass ein Verlust des Sigma-1-Rezeptors in HeLa-Zellen zu einer Akkumulation in Form einer gesteigerten Anzahl an Lipid-Tröpfchen führt (Abbildung 4.1 und 4.2). Die Abhängigkeit der beobachteten Lipid-Tröpfchen Akkumulation von der Funktion des Sigma-1-Rezeptors konnte durch die Überexpression des Sigma-1-Rezeptors im Sigma-1-Knockout gezeigt werden (Abbildung 4.7). Ein zusätzlicher Knockdown des Sigma-1-Rezeptors in HeLa-Zellen verifizierte die Sigma-1 abhängige Lipid-Tröpfchen Akkumulation (Abbildung 4.3).

Der Sigma-1-Knockout Bd5 zeigt zudem ein erhöhtes Expressionslevel der Proteine GPAT3 sowie DGAT2 und eine Reduktion von LIPE (Abbildung 4.10A). Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT3) synthetisiert den ersten Schritt der Triacylglycerid-Synthese, wobei Glycerol-3-Phosphat (G3P) zu Lysophosphatidinsäure (LPA) umgewandelt wird (Sakumaran *et al.*, 2009; Zadoorian *et al.*, 2023). Dies führt zu einer gesteigerten Synthese von Lipid-Tröpfchen (Quiroga *et al.*, 2021). GPAT3 spielt zudem eine entscheidende Rolle in der LPA-vermittelten Immunantwort (Fan *et al.*, 2023; Quiroga *et al.*, 2021). Erhöhte GPAT3 Level in Kupffer-Zellen führten zu proinflammatorischen Prozessen durch die Bildung von LPA sowie die Induktion des PERK Signalwegs und einer Akkumulation von Lipid-Tröpfchen (Fan *et al.*, 2023). Ein gesteigertes LPA Level führt zudem zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion durch ein reduziertes Membranpotential (Abbildung 5.1; Fan *et al.*, 2023).

Ob das LPA-Level im Sigma-1-Knockout Bd5 verändert ist, müsste mittels Lipidomics nachgewiesen werden. Zudem könnte überprüft werden, wie sich ein GPAT3 Knockdown auf die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen auswirkt. Auch eine Analyse des Membranpotentials (JC-1 Farbstoff als Indikator für das Membranpotential) und der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (MitoSox Farbstoff) über Durchflusszytometrie (FACS) wäre in diesem Zusammenhang sinnvoll (Fan *et al.*, 2023). Zusätzlich könnte der letzte Schritt der Synthese von Lipid-Tröpfchen durch den Knockdown der Enzyme DGAT1/2 und ACAT1/2 blockiert werden, wie zuvor in Hefen *Deletion-Strains* der Proteine DGA1, LRO1, ARE1 und ARE2

generiert wurden (Sandager *et al.*, 2002) und anschließend die Auswirkungen auf das Membranpotential und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien im Sigma-1-Knockout Bd5 im Vergleich zum WT analysiert werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob die Akkumulation von Lipid-Tröpfchen einer Komplexierung von überschüssigen und toxischen Lipidspezies wie LPA dient.

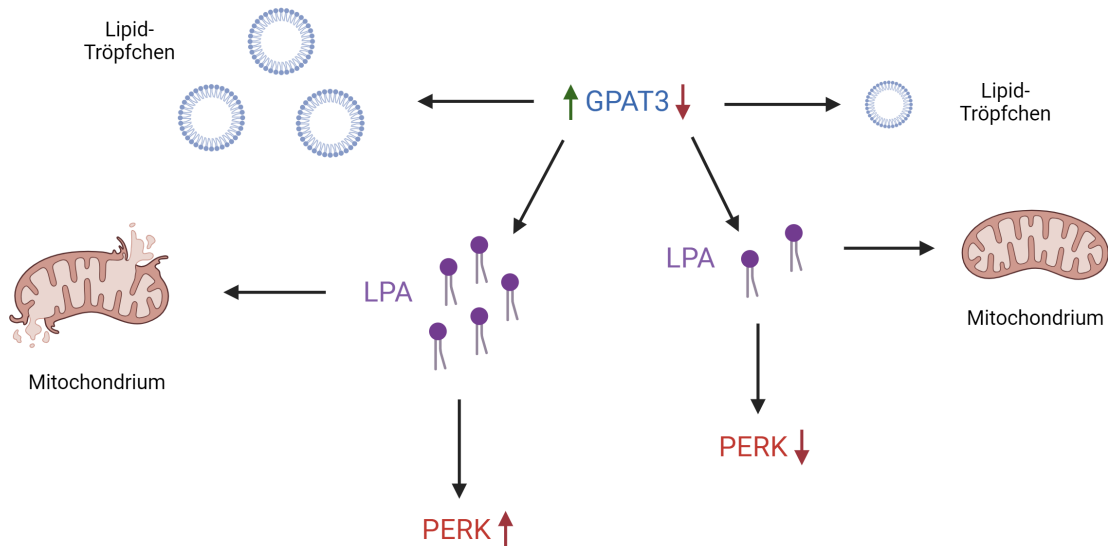


Abbildung 5.1: GPAT3 induziert die Bildung von Lipid-Tröpfchen. Induktion von GPAT3 führt zur Bildung von Lipid-Tröpfchen und zur Anreicherung von Lysophosphatidsäure (LPA), welche schädigend für die Struktur der Mitochondrien ist und zur Induktion des PERK/eIFP2a/ATF4 Signalwegs führt (Fan *et al.*, 2023). Die Abbildung wurde mit *Bio-render.com* erstellt.

Diacylglycerol-O-acyltransferase 2 (DGAT2) synthetisiert mit DGAT1 den letzten Schritt der TAG-Synthese, wobei Diacylglycerin in Triacylglyceride umgewandelt wird (Cases *et al.*, 2001; Zadoorian *et al.*, 2023). Obwohl DGAT1 und DGAT2 dieselbe Reaktion katalysieren sind ihre zellulären Funktionen nicht redundant. Während DGAT2 vor allem an der *de-novo* Synthese von Triacylglyceriden beteiligt ist, fungiert DGAT1 in der Bildung von Triacylglyceriden aus exogenen Lipidquellen wie Ölsäure und der Veresterung von freien Fettsäuren, die durch eine erhöhte Lipolyse oder Autophagie freigesetzt werden, wodurch DGAT2 vorgeschaltet zu DGAT1 arbeitet (Wurie *et al.*, 2012). Die Hormon sensitive Lipase Typ E (LIPE) hydrolysiert Triacylglyceride aber vor allem Diacylglycerin (Rodriguez *et al.*, 2010).

Die Lipid-Tröpfchen Akkumulation im Sigma-1-Knockout Bd5 kann durch die vorliegenden Ergebnisse durch eine gesteigerte Synthese sowie einen verminderten Abbau von Triacylglyceriden erklärt werden. Da DGAT2 erhöht ist, handelt es sich vermutlich um eine gesteigerte *de-novo* Synthese von Triacylglyceriden. Eine Behandlung mit Ölsäure zeigte im Sigma-1-Knockout zudem nur eine geringe Steigerung der Anzahl an Lipid-Tröpfchen, während im Wildtyp die Anzahl an Lipid-Tröpfchen deutlich gesteigert werden konnte (Abbildung 4.9). In diesem Zusammenhang wäre es interessant die Rate der Fettsäuren-Oxidation (β -Oxidation) und der ATP-Synthese in den Mitochondrien zu untersuchen und die Kolokalisierung von Lipid-Tröpfchen mit Mitochondrien. Die geringe Steigerung der Anzahl an Lipid-Tröpfchen im

Sigma-1-Knockout Bd5 nach Behandlung mit Ölsäure könnte auf eine gesteigerte Oxidation der Fettsäuren in den Mitochondrien aber auch auf ein zelluläres Maximum an Lipid-Tröpfchen zurückzuführen sein und die Tatsache, dass die Synthesemachinerie der Lipid-Tröpfchen ausgeschöpft ist. Zudem müsste hier auch die Größe und die Fläche der Lipid-Tröpfchen pro Zelle in Betracht gezogen werden. Zusätzlich könnten die Zellen auch mit Palmitinsäure behandelt werden, welche im Vergleich zu Ölsäure die Bildung von Lipid-Tröpfchen in einem geringeren Maße steigert, dafür aber primär die Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien steigert und dadurch zu einer Fragmentierung der Mitochondrien führt (Eynaudi *et al.*, 2021). Durch die Quantifizierung der Lipid-Tröpfchen und die Messung der Rate der Fettsäure-Oxidation in WT und Sigma-1-Knockout Bd5 nach Behandlung mit Ölsäure und Palmitinsäure könnten Rückschlüsse auf den Transport und Umsatz von Lipiden in den Zellen gezogen werden (Schenkel und Bakovic, 2014; Cohen *et al.*, 2015; Eynaudi *et al.*, 2021).

Wie zuvor von Bekbulat *et al.* anhand von Rab18 beschrieben, wurde der Zusammenhang zwischen Autophagie und der Lipid-Tröpfchen Akkumulation im Sigma-1-Knockout Bd5 analysiert (Bekbulat *et al.*, 2020). Während die Lipid-Tröpfchen im Rab18-Knockout durch Nährstoffmangel nicht mobilisiert werden konnten für die Bildung von Autophagosomen (Bekbulat *et al.*, 2020), konnten die Lipid-Tröpfchen im Sigma-1-Knockout Bd5 bei Nährstoffmangel abgebaut werden (Abbildung 4.8). Ein Zusammenhang zwischen Lipid-Tröpfchen Akkumulation und Autophagie besteht daher vermutlich nicht. Zudem änderte sich das unter basalen Bedingungen beobachtete Expressionslevel von Lipid-Metabolismus assoziierten Proteinen im Sigma-1-Knockout Bd5. Die Expression der Enzyme GPAT3 und DGAT2 war nach 6 h nicht mehr erhöht sowie AGPAT zusätzlich reduziert und nach 12 h war die Expression von LIPE auch nicht mehr reduziert (Abbildung 4.10 B und C). Dies zeigt, dass die Zellen in der Lage sind Lipid-Tröpfchen zu mobilisieren und sich dabei den äußeren Begebenheiten anzupassen.

Eine gesteigerte Lipid-Tröpfchen Akkumulation tritt zudem auch bei erhöhter Induktion der Autophagie auf, wobei die Biogenese der Lipid-Tröpfchen die Zelle dann vor Lipotoxizität schützt und abhängig ist von DGAT1 (Nguyen *et al.*, 2017). Da das Expressionslevel von DGAT1 im Sigma-1-Knockout jedoch nicht erhöht ist (Abbildung 4.10) und die Autophagie nicht induziert ist (Abbildung 4.18), besteht auch hier kein Zusammenhang zwischen Autophagie und Lipid-Tröpfchen Akkumulation.

5.1.2 Auswirkungen von Mutationen und Deletionen des Sigma-1-Rezeptors auf die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen

Die Mutanten E102Q und E138Q stehen im Verdacht neurodegenerative Erkrankungen auszulösen, wobei E102Q in ALS und E138Q in distale hereditäre Motorneuropathie involviert ist (Al-Saif *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Gregianin *et al.*, 2016). Bei ALS-Patienten konnte zudem ein Zusammenhang zwischen Lipid-Tröpfchen Dynamik und der Bildung von Lipid-Peroxiden festgestellt werden (Simpson *et al.*, 2014). In Glia-Zellen aus *Drosophila* Larven konnte gezeigt werden, dass die Biogenese von Lipid-Tröpfchen in Folge von oxidativem Stress die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren reduziert (Bailey *et al.*, 2015). Eine Depletion von Seipin in einem Hefe spezifischen ALS Modell führte zudem zu einer gesteigerten TDP-43 vermittelten Toxizität (Armakola *et al.*,

2012). Da die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen durch die Überexpression der Mutanten reduziert werden konnte, konnte jedoch kein Einfluss der Mutanten auf die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen festgestellt werden. Die Mutante E102Q liegt zwar im *sterol binding domain-like motif* (SBDLI, G91-T109), dem aber eine zentrale Rolle in der Liganden-Bindung des Sigma-1-Rezeptors zukommt. Die Mutation E138Q befindet sich in der Chaperondomäne des Sigma-1-Rezeptors, Aminosäure 112-223, weshalb hier ein Zusammenhang zum veränderten Lipid-Metabolismus aufgrund der Position eher unwahrscheinlich erscheint (Aishwarya *et al.*, 2021).

Den *sterol binding domain-like motifs* des Sigma-1-Rezeptors werden unterschiedliche Funktionen zugesprochen. Zum einen wird von einer Rekrutierung des Sigma-1-Rezeptors an die MAM durch die Cholesterinbindestellen ausgegangen (Zhemkov *et al.*, 2021). Die *sterol binding domain-like motifs* sollen aber auch maßgeblich für die Ligandenbindung des Sigma-1-Rezeptors sein. In der gefalteten Form des Sigma-1-Rezeptors stehen die beiden Domänen nahe beieinander und umhüllen die gebundenen Liganden in der Ligandenbindestelle. Sie interagieren dabei vor allem mit den hydrophoben Bereichen des Liganden. Dabei liegt SBDLII auf dem Liganden auf und interagiert auch mit der Membran (Pal *et al.*, 2007; Pal *et al.*, 2008; Ossa *et al.*, 2017). Sogar innerhalb der Transmembrandomäne des Sigma-1-Rezeptors wurde eine Cholesterinbindestelle identifiziert, *carc-like motif*. Es konnte sogar gezeigt werden, dass Mutationen im *carc-like motif*, die die Cholesterinbindung schwächen zu einer Verteilung des Sigma-1-Rezeptors im ER und zu einer reduzierten Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors an der MAM führen (Zhemkov *et al.*, 2021).

Die generierten Deletionsmutanten der Domänen SBDLI und SBDLII zeigten im Rescue-Experiment keinen Einfluss auf die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen (Abbildung 4.15). Durch die Deletion der Transmembrandomäne blieb die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen im Rescue erhalten (Abbildung 4.15). Auch war die subzelluläre Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors nach Deletion der Transmembrandomäne beeinträchtigt (Abbildung 4.30 und Abbildung 4.31). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Funktion des Sigma-1-Rezeptors in der Dynamik der Lipid-Tröpfchen durch die Transmembrandomäne und subzelluläre Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors bestimmt wird. Es könnte ein Zusammenhang zur neu identifizierten Cholesterinbindestelle innerhalb der Transmembrandomäne, dem *carc-like motif* und der Lokalisation an der MAM bestehen (Zhemkov *et al.*, 2021). Für einen eindeutigen Nachweis an dieser Stelle fehlen aber noch weitere Analysen mit spezifischeren Mutationen in der Transmembrandomäne. Dazu könnten die in der Literatur erwähnten Mutationen des *carc-like motifs* eingesetzt werden (Zhemkov *et al.*, 2021).

Der Sigma-1-Rezeptor soll nicht nur an der MAM, sondern auch an ER-assoziierten Lipid-Tröpfchen lokalisiert sein. Es konnte dabei eine Kolokalisation des Sigma-1-Rezeptors mit cytosolischen Lipid-Tröpfchen nach Deletion der Aminosäuren 2-29 festgestellt werden. Der Effekt trat auch bei der Deletion des ER-Retentionssignals d2-28 auf, war aber nicht so deutlich wie nach Deletion der Transmembrandomäne und des ER-Retentionssignals d2-29 (Hayashi und Su, 2003). Eine Kolokalisation des Sigma-1-Rezeptors mit den Lipid-Tröpfchen konnte durch Kolokalisierungsanalysen und die Bestimmung des Pearson-Koeffizienten

nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17). Auch die Deletionsmutanten d176-223 und d91-109 zeigten keine Kolokalisierung mit den Lipid-Tröpfchen. Lediglich durch die Deletion der Transmembrandomäne konnte eine Assoziation des Sigma-1-Rezeptors mit den Lipid-Tröpfchen beobachtet werden. Die Kolokalisierung der Deletionsmutante d2-29 mit den Lipid-Tröpfchen könnte im Zusammenhang mit dem Einfluss der Mutante auf die Lipid-Tröpfchen Akkumulation stehen, könnte aber auch in den hydrophoben Bereichen des Sigma-1-Rezeptors begründet sein. Da der Sigma-1-Rezeptor nicht mehr an die ER-Membran gebunden ist, assoziiert er vermutlich mit hydrophoben Bereichen in der Zelle. Um den Zusammenhang zwischen Lipid-Tröpfchen Akkumulation und Kolokalisation in der Deletionsmutante d2-29 zu zeigen, müssten weitere Analysen durchgeführt werden. Dazu könnten weitere Mutanten generiert werden, denen sowohl die Transmembrandomäne als auch die hydrophoben Bereiche des Sigma-1-Rezeptors fehlen und hinsichtlich der Lipid-Tröpfchen Akkumulation und der Kolokalisierung mit Lipid-Tröpfchen analysiert werden.

5.2 Genetische oder pharmakologische Inhibition des Sigma-1-Rezeptors beeinflusst die Autophagie

Der Sigma-1-Rezeptor beeinflusst die Autophagie in Säugetierzellen. Ein Knockout des Sigma-1-Rezeptors in neuronalen Zellen führte zu einer Reduktion des autophagischen Fluxes durch Inhibition der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen (Yang *et al.*, 2019). Die Behandlung des Sigma-1-Rezeptors mit Liganden in Bezug auf Autophagie wird kontrovers diskutiert. Oftmals führt eine Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors zur Induktion der Autophagie mittels diverser Agonisten, wie ANAVEX2-73 und PRE-084 sowie AF710B und T-817 MA (Christ *et al.*, 2019; Prasanth *et al.*, 2021). In dem Zusammenhang wird der Sigma-1-Rezeptor auch als mögliches Target für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert (Prasanth *et al.*, 2021). Es wird aber auch beschrieben, dass Sigma-1-Antagonisten die Autophagie induzieren im Zusammenhang mit ER-Stress und der Induktion der *Unfolded Protein Response* (Kim *et al.*, 2010). Auch wurde eine Aktivierung der Autophagie nach Inhibition des Sigma-1-Rezeptors gezeigt, wobei eine Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors keinen Effekt auf die Autophagie zeigte (Schrock *et al.*, 2013).

Eine Tendenz zur Reduktion der Autophagie konnte in mehreren Sigma-1-Knockout Zelllinien Bd5 und Bf9 gezeigt werden (Abbildung 4.18). Ein Knockdown des Sigma-1-Rezeptors in HeLa-Zellen reduziert den autophagischen Flux signifikant (Abbildung 4.19). Die generierten Ergebnisse entsprechen daher den Erwartungen der Literatur (Yang *et al.*, 2019). Auch durch den Inhibitor BD-1047 konnte die autophagische Aktivität signifikant reduziert werden (Abbildung 4.19), was im Gegensatz steht zur Induktion der Autophagie nach Inaktivierung des Sigma-1-Rezeptors (Kim *et al.*, 2010). Insgesamt führt ein Verlust der Sigma-1-Rezeptor Funktion zu einer Reduktion der Autophagie unter Nährstoffmangel. Dass in den Sigma-1-Knockout Zelllinien nur eine Tendenz zur Reduktion der Autophagie gemessen werden konnte, könnte an kompensatorischen Effekten liegen. Eine Aktivierung mit PRE-084 und ANAVEX2-73 zeigte keine Änderung in der autophagischen Aktivität (Abbildung 4.20). Der Sigma-1-Rezeptor zeigte jedoch in klinischen Studien einen positiven Effekt auf die Autophagie nach Behandlung mit Sigma-1-Agonisten und stellt daher ein potentielles Target für

die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen dar (Prasanth *et al.*, 2021). Unter Umständen wäre eine Analyse des autophagischen Fluxes nach Behandlung mit Sigma-1-Agonisten in neuronalen Zellen erfolgreich, da der Sigma-1-Rezeptor vor allem im Kleinhirn exprimiert wird (Aishwarya *et al.*, 2021).

ER-Phagie ist eine selektive Form der Autophagie, die dem Erhalt der ER-Homöostase dient und wird durch spezifische ER-Phagie Rezeptoren vermittelt (Chino und Mizushima, 2020). Zu den untersuchten ER-Phagie Rezeptoren zählen FAM134B, der neben einer LC3 Domäne auch eine *Reticulon-Homology Domain* besitzt zur Krümmung der ER-Membran und Sec62 sowie Tex264, welche eine LC3 Domäne besitzen (Bhaskara *et al.*, 2019; Chino *et al.*, 2019; Fumagalli *et al.*, 2016). Weiterhin wurde ATL3 untersucht, welches vor allem an GABARAP bindet (Chen *et al.*, 2019). Da der Sigma-1-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und einen Effekt auf die Autophagie zeigt (Hayashi und Su, 2007; Yang *et al.*, 2019; Christ *et al.*, 2019), wurde eine Funktion des Sigma-1-Rezeptors als ER-Phagie Rezeptor und eine durch den Knockout des Sigma-1-Rezeptors kompensatorische Steigerung bekannter ER-Phagie Rezeptoren vermutet. Eine Induktion gängiger ER-Phagie Rezeptoren konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.21). Vermutlich ist der Sigma-1-Rezeptor demnach kein ER-Phagie Rezeptor.

5.3 Die Rolle des Sigma-1-Rezeptors hinsichtlich ER-Stress und Proteinaggregation

Der Sigma-1-Rezeptor ist ein Calcium-abhängiges Protein am endoplasmatischen Retikulum, welches dort als Chaperon fungiert und dadurch eine protektive Funktion für das zelluläre System besitzt (Hayashi und Su, 2007; Mitsuda *et al.*, 2011). Sigma-1-Rezeptor Liganden zeigten in diversen Studien zudem eine neuroprotektive Funktion (Peviani *et al.*, 2014; Penke *et al.*, 2017). ER-Stress induzierte das Expressionslevel des Sigma-1-Rezeptors nach Behandlung mit Tunicamycin und Thapsigargin (Hayashi und Su, 2007). Der Sigma-1-Rezeptor ist zudem auch an der Regulation der *Unfolded Protein Response* beteiligt (Shi *et al.*, 2021). IRE1 α wird durch den Sigma-1-Rezeptor *in vitro* stabilisiert und Überexpression des Sigma-1-Rezeptors in Kardiomyocyten steigerte die Expression von phosphoryliertem IRE1 α und XBP1 (Mori *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2017).

PERK ist einer der ER-Stress Sensoren der UPR, welcher durch fehlgefaltete Proteine und Störungen im Gleichgewicht von Lipiden aktiviert wird (Volmer *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). PERK ist zudem an der MAM angereichert (Verfaillie *et al.*, 2012). Überexpression des Sigma-1-Rezeptors führte zu einer Inhibition der Expression von p-PERK und der Sigma-1-Rezeptor Agonist (+)-Pentazocin reduzierte die Expression von PERK unter ER-Stress in *retinal ganglion cells 5* (Hayashi und Su, 2007; Ha *et al.*, 2011). Eine Induktion der Proteinexpression des Sigma-1-Rezeptors in Folge von ER-Stress über den PERK/eIFP2 α /ATF4 Signalweg konnte ebenfalls gezeigt werden (Mitsuda *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte das Expressionslevel des Sigma-1-Rezeptors nach lang anhaltendem ER-Stress tendenziell induziert werden (Abbildung 4.22 und 4.23). Durch Thapsi-

gargin Behandlung, die eine Calcium-Depletion des ER bedingt und dadurch vermutlich eine Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors, konnte der Faktor eIFP2 α reduziert werden und eine tendenzielle Steigerung der phosphorylierten Form peIFP2 α gemessen werden. Dies lässt im Hinblick auf die Ergebnisse aus der Literatur eine modulierende Funktion des Sigma-1-Rezeptors auf den PERK/eIFP2 α /ATF4 Signalweg vermuten. Zusätzlich könnte der Sigma-1-Rezeptor überexprimiert oder die Zellen mit Agonisten behandelt werden, um so die Ergebnisse aus der Literatur zu verifizieren.

Neurodegenerative Erkrankungen sind geprägt von der Anreicherung von Proteinaggregaten bedingt durch Stress oder Alterungsprozesse (Penke *et al.*, 2017). Der Sigma-1-Rezeptor als molekulares ER-Chaperon und Effektor der *Unfolded Protein Response* moduliert vermutlich den Abbau von fehlgefalteten Proteinen (Hayashi und Su, 2007; Mori *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2017). Sigma-1-Rezeptor Agonisten führten zu einem Abbau von Protein Aggregaten und der Reduktion von ER-Stress in Fibroblasten von ALS-Patienten und in SOD-1 Mäusen (Prause *et al.*, 2013; Mancuso *et al.*, 2012). Ein Sigma-1-Knockout führt in Mäusen zu einer gesteigerten α -Synuclein Aggregation in dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra (Hong *et al.*, 2017).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer genetischen Manipulation des Sigma-1-Rezeptors auf die Aggregation von α -Synuclein untersucht. Ein erhöhtes Expressionslevel von unlöslichem α -Synuclein konnte dabei nur nach Überexpression des α -Synuclein Wildtyp Konstrukts gezeigt werden, während die Überexpression der Mutante A53T keine Veränderungen im Sigma-1-Knockout Bd5 im Vergleich zum Wildtyp zeigte (Abbildung 4.24). Möglich wäre eine Komplexierung der fehlgefalteten Proteine durch die Lipid-Tröpfchen in der Zelle, insbesondere im Sigma-1-Knockout Bd5 (Vevea *et al.*, 2015; Moldavski *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2005; Jarc und Petan, 2019). Auch hier wäre eine Blockierung der Lipid-Tröpfchen Biogenese und eine anschließende Analyse der gebildeten Proteinaggregate sinnvoll.

Ein Sigma-1-Knockdown führte in H4 Neurogliom Zellen zu keiner induzierten α -Synuclein Aggregatbildung. Dies könnte an kompensatorischen Effekten liegen, da die Zellen dauerhaft α -Synuclein überexprimieren und ihr zelluläres System auf die gegebene Situation angepasst haben. Ob eine Reduktion des Sigma-1-Rezeptors im zellulären System eine Anreicherung von Protein Aggregaten in Hinblick auf neurodegenerativen Erkrankungen bedingt, bedarf weiterer Analysen, eventuell in einem *tet-on* statt *tet-off* System oder in Zellen aus Patientenmaterial wie in zuvor aufgeführter Studie (Prause *et al.*, 2013).

5.4 Genetische Manipulation des Sigma-1-Rezeptors zeigt einen Effekt auf die Expression spezifischer Proteine (Proteomics)

Um gemeinsame Unterschiede im Sigma-1-Knockout verglichen mit dem Sigma-1-Knockdown zu finden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Proteomics Analyse der Gesamtllysate der in Abbildung 4.27 aufgeführten Proben durchgeführt. Es konnten insbesondere Proteine des Zytoskeletts, der Proteinbiosynthese und der DNA-Replikation detektiert werden. Vermutlich

handelt es sich hierbei um unspezifische Veränderungen, die aus der hohen Konzentration der Proteine in den Zellen resultieren. Es konnten aber auch einige Proteine detektiert werden, die im Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten zellulären Prozessen stehen.

Im Sigma-1-Knockout Bd5 war vor allem LRP4 fast 10-fach erhöht, welches am Abbau von Amyloid- β in Astrozyten beteiligt ist. Bei Alzheimer Patienten konnte ein reduziertes Level von LRP4 im Gehirn festgestellt werden (Zhang *et al.*, 2020). Im Sigma-1-Knockdown ist LRP4 jedoch unverändert. Es könnte sich dabei demnach um einen klonalen Effekt handeln, der durch die Selektion der Zellen entsteht. LRP4 könnte aber auch kompensatorisch induziert werden. Ein Knockdown von LRP4 und eine anschließende Analyse von Proteinaggregaten wäre an dieser Stelle sinnvoll.

Auch im Sigma-1-Knockout aber nicht im Sigma-1-Knockdown erhöht war Rab10, welches am retrograden Transport und der Exocytose von Amyloid- β aus dem zellulären System beteiligt ist. Auch hier könnte es sich um einen klonalen Effekt oder einen kompensatorischen Effekt handeln. Dennoch ist eine Erhöhung von Proteinen, die am Abbau von Amyloid- β beteiligt sind auffällig und könnte auch hier mittels eines Knockdowns von Rab10 genauer untersucht werden.

In Bezug auf den Metabolismus von Lipiden waren die Proteine NCEH1 und ACADVL signifikant erhöht im Sigma-1-Knockout Bd5 sowie im Sigma-1-Knockdown verglichen zu ihren Kontrollen. NCEH1 ist eine neutrale Cholesterinesterhydrolase, die vor allem mit LIPE die Bildung von Schaumzellen in Makrophagen verhindert. Ein Knockdown von NCEH1 in Makrophagen führte zu einem reduzierten Cholesterin-Efflux aus den Zellen, sodass überschüssiges Cholesterin in Form von Cholesterinestern in Lipid-Tröpfchen gespeichert wurde (Sekiya *et al.*, 2009). Die Erhöhung könnte ein kompensatorischer Effekt der Zellen sein auf die Reduktion von LIPE, die zumindest im Sigma-1-Knockout mittels qPCR gemessen werden konnte. ACADVL ist das Enzym, das den ersten Schritt der β -Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien katalysiert (Goetzmann *et al.*, 2007). Fettsäuren für die β -Oxidation in den Mitochondrien werden von Lipid-Tröpfchen bereitgestellt (Talari *et al.*, 2023). Überschüssige langkettige Fettsäuren fördern die Bildung von Lipid-Tröpfchen (Fujimoto *et al.*, 2006) und Schäden der Mitochondrien steigern die β -Oxidation der Mitochondrien für eine schnelle Generierung von ATP und NADH (Audano *et al.*, 2019). Ein Verlust des Sigma-1-Rezeptors steht im Zusammenhang mit einer funktionalen Störung der Mitochondrien (Crouzier *et al.*, 2021; Tagashira *et al.*, 2023). Hypothetisch wäre eine kompensatorische Steigerung der β -Oxidation aufgrund eventueller Schäden der Mitochondrien denkbar, müsste aber in weiteren Experimenten verifiziert werden.

Weiterhin ist das Protein Caveolin-1 erhöht, welches ein multifunktionales Membranprotein an *Lipid rafts* ist und an der Regulation der Endocytose, der Signaltransduktion, der Stressantwort von Zellen und dem Transport von Cholesterin beteiligt ist (Yang *et al.*, 2022; Vizio *et al.*, 2008). Caveolin-1 kommt zudem auf der Oberfläche von Lipid-Tröpfchen vor und reguliert dort den Lipid-Metabolismus und die Bildung von Lipid-Tröpfchen (Kuo *et al.*, 2018;

Robenek *et al.*, 2004). Ein Knockout von Caveolin-1 in Endothelzellen führte zu einer Reduktion von Lipid-Tröpfchen durch eine gesteigerte Lipolyse (Kuo *et al.*, 2018). Caveolin-1 befindet sich auch an den Kontaktstellen von Lipid-Tröpfchen mit Mitochondrien und fördert so den Transport von Fettsäuren von den Lipid-Tröpfchen zu den Mitochondrien für die β -Oxidation. Knockdown und Knockout von Caveolin-1 in humanen Fibroblasten führt zu einer reduzierten mitochondrialen Respiration und in Adipocyten konnten durch einen Caveolin-1 Knockout die Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Lipid-Tröpfchen reduziert werden (Cohen *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2022). Zudem reguliert Caveolin-1 auch den Cholesterin-Transport zwischen ER und Mitochondrien (Quest *et al.*, 2018). Cholesterin induziert auch eine Akkumulation von Caveolin-1 auf Lipid-Tröpfchen (Lay *et al.*, 2006). Ob es einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Caveolin-1 Level, der Bildung von *Lipid-raft* ähnlichen Mikrodomänen, der eventuellen β -Oxidation und der Akkumulation von Lipid-Tröpfchen gibt, müsste in weiteren Analysen untersucht werden.

5.5 Der Sigma-1-Rezeptor bedingt die Stabilität der MAM

Der Sigma-1-Rezeptor ist an der Bildung und Modulierung von *Lipid-raft* ähnlichen Mikrodomänen im endoplasmatischen Retikulum beteiligt (Hayashi und Su, 2003; Palmer *et al.*, 2007; Zhemkov *et al.*, 2021). Die *Lipid rafts* sind angereichert mit Cholesterin, welches zur Rekrutierung spezifischer Proteine führt (Zhemkov *et al.*, 2021). Der Sigma-1-Rezeptor selbst besitzt mehrere Cholesterinbindestellen (Zhemkov *et al.*, 2021; Pal *et al.*, 2008). Vermutlich fungiert der Sigma-1-Rezeptor auch in der Bindung und Insertion von Cholesterin in Lipidmembranen (Palmer *et al.*, 2011). Ein Knockdown des Sigma-1-Rezeptors reduzierte den Cholesterin-Gehalt und den Sigma-1- β -Integrin Komplex in *Lipid-rafts*, was eine Stabilisierung der *Lipid rafts* durch den Sigma-1-Rezeptor zeigt (Palmer *et al.*, 2011). Die Interaktion des Sigma-1-Rezeptors mit Cholesterin bedingt die Bildung der Cholesterin-reichen Mikrodomänen im ER (Zhemkov *et al.*, 2021). Zudem bedingt ein Sigma-1-Knockdown eine vergrößerte Distanz der Mitochondrien zum endoplasmatischen Retikulum und reduziert damit die Stabilität der MAM (Tagashira *et al.*, 2023).

Die Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors an der MAM konnte mittels Kolokalisierung mit den Marker-Proteinen Sec62 und TOM20, wie zuvor beschrieben (Zhemkov *et al.*, 2021) analysiert werden. Es konnte eine teilweise Kolokalisierung des Sigma-1-Rezeptors mit den beiden Markern gezeigt werden, was die subzelluläre Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors an der MAM verdeutlicht (Abbildung 4.30 und 4.31). Zudem war der Sigma-1-Rezeptor deutlich in der isolierten MAM-Fraktion angereichert (Abbildung 4.32). Die Mutanten E102Q und E138Q, sowie die Deletion der *sterol binding domain-like motifs* SBDLI und SBDLII zeigten keinen Einfluss auf die Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors. Nach Deletion der Transmembrandomäne verlor der Sigma-1-Rezeptor seine typische ER-ähnliche Färbung im perinukleären Bereich und bildete punktuelle Strukturen in der Zelle, die mit den Lipid-Tröpfchen kolokalisieren (Abbildung 4.16 und 4.17). Die Transmembrandomäne ist daher essentiell für die subzelluläre Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors an der MAM. Es ist ein Zusammenhang möglich zwischen der neu identifizierten Cholesterinbindedomäne und der Rekrutierung des Sigma-1-Rezeptors an die MAM (Zhemkov *et al.*, 2021). Um einen Zusammenhang herzustellen

len müssten jedoch weitere Analysen durchgeführt werden, insbesondere die Charakterisierung spezifischerer Mutationen innerhalb der Transmembrandomäne.

Nach erfolgreicher Isolierung der MAM aus HeLa-Zellen konnte eine Reduktion der Cholesterinmenge im Sigma-1-Knockout Bd5 relativ zum Wildtyp bestimmt werden. Dies unterstützt die These der Funktion des Sigma-1-Rezeptors in der Stabilität von *Lipid-raft* ähnlichen Mikrodomänen und in der Bindung von Cholesterin an spezifischen Mikrodomänen im ER (Palmer *et al.*, 2007; Tagashira *et al.*, 2023). Die MAM ist eine Plattform mit spezifischer Funktion, zu denen insbesondere Autophagie und Calcium-Signaling gehören (Hamasaki *et al.*, 2013; Arasaki *et al.*, 2015; Colombi *et al.*, 2011; Rizzuto *et al.*, 1998). Vor allem aber gilt sie als Zentrum für die Synthese von Lipiden (Rusinol *et al.*, 1994; Cui *et al.*, 1993; Vance, 1990). Durch die Veränderungen im Cholesteringehalt an der MAM im Sigma-1-Knockout Bd5 könnte sich auch deren Proteingehalt und eventuell auch die Expression von Proteinen des Lipid Metabolismus ändern. Daher sollte eine Proteomics-Analyse der isolierten MAM-Fraktionen durchgeführt werden. Aufgrund des hohen Lipid-Gehalts in den MAM-Fraktionen im Sigma-1-Knockout Bd5 konnte die Messung nicht durchgeführt werden und es ist an dieser Stelle keine Aussage über die Veränderung in der Proteinzusammensetzung möglich. Zur weiteren Charakterisierung müssten hier die Proteine gefällt, mittels SDS-PAGE getrennt und extrahiert werden (Schrul und Kopito, 2016; Zhang *et al.*, 2011).

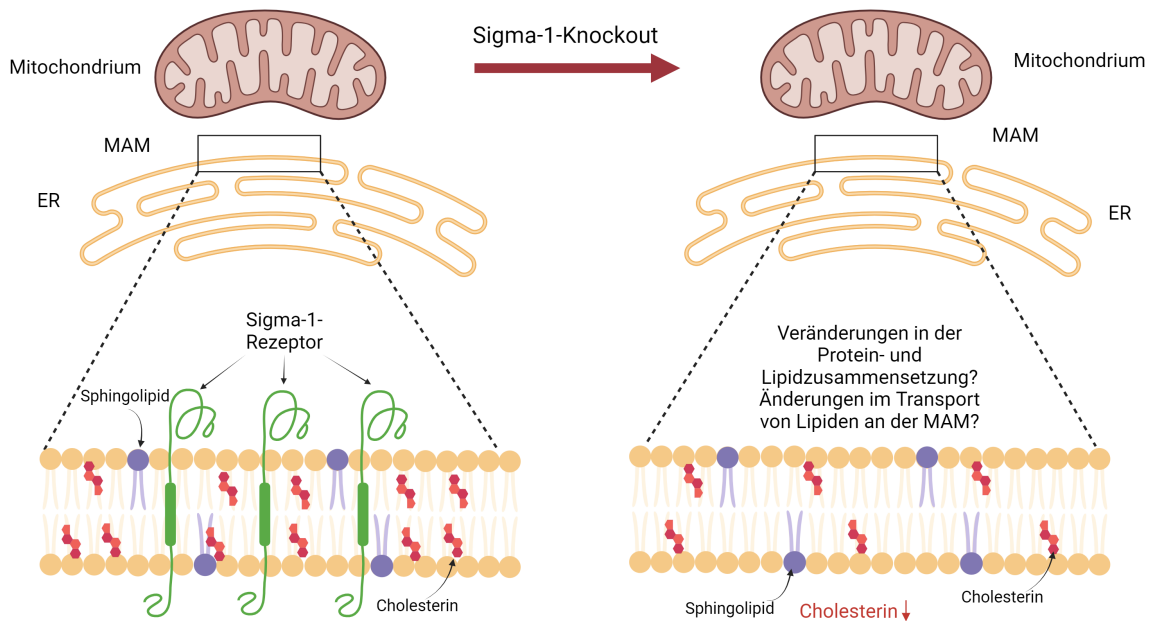


Abbildung 5.2: Hypothese zum Einfluss des Sigma-1-Rezeptors auf die Stabilität der MAM. Ein Knockout des Sigma-1-Rezeptors an der MAM führt zu einer Reduktion des Cholesterin-Levels an der MAM. Theoretisch wäre ein *Clustering* von Cholesterin an der MAM durch den Sigma-1-Rezeptor möglich. Durch die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung könnte es auch zu Änderungen in der Proteinzusammensetzung kommen, die den Metabolismus und Transport von Lipiden beeinflussen (Palmer *et al.*, 2007; Zhemkov *et al.*, 2021). Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel die Rolle des Sigma-1-Rezeptors im Lipid-Metabolismus sowie in der Autophagie, bei der Regulation des ER-Stress und bei der damit verbundenen Aggregation von Proteinen zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust und eine reduzierte Funktion des Sigma-1-Rezeptors in Säugetierzellen zu einer Akkumulation von Lipid-Tröpfchen führt. Die erhöhte Anzahl an Lipid-Tröpfchen begründete sich dabei in einer gesteigerten Synthese und einem verminderten Abbau von Triacylglyceriden und Diacylglyceriden. Zudem konnte die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen auf einen strukturellen Bereich des Sigma-1-Rezeptors eingeschränkt werden. Da ein Verlust der Transmembrandomäne, nicht aber der *sterol binding domain-like motifs*, einen Einfluss auf die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen zeigte, wird die Regulation der Lipid-Tröpfchen Dynamik vermutlich maßgeblich durch die Transmembrandomäne des Sigma-1-Rezeptors bestimmt. In der Transmembrandomäne konnte in einer vorherigen Studie eine neue Cholesterinbindedomäne identifiziert werden und die Deletion der Transmembrandomäne führte in der vorliegenden Arbeit zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors von der MAM zu den Lipid-Tröpfchen der Zelle (Zhemkov *et al.*, 2021).

Die subzelluläre Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors an der MAM konnte verifiziert werden. Knockout des Sigma-1-Rezeptors führte zu einer Reduktion der relativen Menge an freiem Cholesterin an der MAM, was die Hypothese unterstützt, dass der Sigma-1-Rezeptors als Cholesterin bindendes Protein in *Lipid-raft* ähnlichen Mikrodomänen fungiert (Palmer *et al.*, 2011; Zhemkov *et al.*, 2021). Vermutlich fungiert der Sigma-1-Rezeptor auch als stabilisierendes Element an der MAM und beeinflusst eventuell so die Homöostase von Lipiden und dadurch die Akkumulation der Lipid-Tröpfchen (Tagashira, 2023; Palmer *et al.*, 2011).

In Bezug auf Autophagie konnte eine tendenzielle Reduktion der autophagischen Aktivität bei Nährstoffmangel nach genetischer und pharmakologischer Manipulation der Zellen bestimmt werden. Die Reduktion der Autophagie steht vermutlich nicht im Zusammenhang mit der veränderten Lipid-Tröpfchen Dynamik. Ein eindeutiger Hinweis auf die Rolle des Sigma-1-Rezeptors in Bezug auf ER-Stress und Protein Aggregation konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Es konnten aber Hinweise gefunden werden, die die Theorien der Literatur unterstützen. Nach Induktion von ER-Stress zeigte sich eine Änderung im PERK/eIFP2a/ATF4 Signalweg (Ha *et al.*, 2011; Hayashi und Su, 2007) und Überexpression von α -Synuclein führte partiell zu einer gesteigerten Bildung von vermutlichen Aggregaten im Sigma-1-Knockout (Hong *et al.*, 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss des Sigma-1-Rezeptors auf die Dynamik der Lipid-Tröpfchen gezeigt werden konnte, der vermutlich auf der Bildung von Cholesterin reichen Mikrodomänen im ER, insbesondere der MAM beruht. Für eine eindeutige Aussage sind in diesem Zusammenhang noch weitere Analysen notwendig.

7. Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen dem Sigma-1-Rezeptor und der Dynamik von Lipid-Tröpfchen in HeLa-Zellen sowie eine mögliche Verknüpfung zur Transmembrandomäne des Sigma-1-Rezeptors hergestellt werden. Weiterhin konnte der Sigma-1-Rezeptor als möglicher Stabilisator der Mitochondrien-ER assoziierten Membran und als Modulator der Autophagie charakterisiert werden. Eine Destabilisierung der MAM und eine Veränderung der Lipid-Tröpfchen Dynamik geht auch mit neurodegenerativen Erkrankungen einher, weshalb dem Sigma-1-Rezeptor als mögliches Target in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle zukommt (Paillusson *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017).

Für eine genauere Aussage sind weitere Untersuchungen notwendig. Zum einen könnten spezifischere Deletionen in der Transmembrandomäne generiert werden, insbesondere des *carc-like-motifs*, welches essentiell für die Bindung von Cholesterin ist (Zhemkov *et al.*, 2021), und im *Rescue*-Experiment sowie in Kolkalisierungsanalysen auf einen möglichen Einfluss auf die Lipid-Tröpfchen Akkumulation und die Lokalisation des Sigma-1-Rezeptors untersucht werden. Weiterhin könnte die Biogenese von Lipid-Tröpfchen blockiert werden und anschließend die Bildung von Proteinaggregaten und die Funktionen der Mitochondrien analysiert werden. Eine Aufreinigung der MAM-Proben und anschließende Analyse könnte zudem Aufschluss über die Veränderungen der Proteinzusammensetzung an der MAM geben.

Auch die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der Lipid-Tröpfchen Dynamik und des Sigma-1-Rezeptors in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen wären von gesteigertem Interesse. Vor allem das Allel $\epsilon 4$ von ApoE, welches bei neurodegenerativen Erkrankungen oftmals mit einer Lipid-Tröpfchen Akkumulation verknüpft ist, wäre in diesem Zusammenhang von Interesse, da auch schon ein genetischer Polymorphismus des Sigma-1-Rezeptors und das spezifische Allel $\epsilon 4$ von ApoE als Risikofaktor für die Entwicklung von Alzheimer identifiziert werden konnten (Tambini *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018; Farmer *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2011).

8. Summary

The present thesis aims at investigating the role of the Sigma-1-receptor in lipid metabolism, autophagy, ER-stress and the associated aggregation of proteins.

Studies in this work have shown, that loss and a reduced function of the Sigma-1-receptor in mammalian cells lead to an accumulation of lipid droplets. The increased number of lipid droplets was caused by an increased synthesis and a reduced degradation of triacylglycerides and diacylglycerides. In addition, the accumulation of lipid droplets could be limited to a certain part of the Sigma-1-receptor's structure. Since a loss of the transmembranedomain but not of the cholesterol binding domain, could show an effect to the accumulation of lipid droplets, the regulation of the lipid droplet dynamic is probably essentially influenced by the transmembranedomain of the Sigma-1-receptor. In the transmembranedomain a new cholesterol binding site was identified in a former study and in the present thesis the deletion of the transmembranedomain leads to a changed subcellular localization of the Sigma-1-receptor from the MAM to the lipid droplets (Zhemkov *et al.*, 2021).

The subcellular localization of the Sigma-1-receptor to the MAM could be verified. A Sigma-1-receptor knockout leads to a reduction of free cholesterol at the MAM supporting the hypothesis of Sigma-1 as a cholesterol clustering protein in lipid-raft like microdomains (Palmer *et al.*, 2011; Zhemkov *et al.*, 2021). Presumably, the Sigma-1-receptor functions as an stabilizing element at the MAM, eventually influencing the homeostasis of lipids and thereby the accumulation of lipid droplets (Tagashira, 2023; Palmer *et al.*, 2011).

In the context of autophagy, the autophagic activity under starvation tends to be reduced by genetic and pharmacologic manipulation of the Sigma-1-receptor. The reduction of autophagy is probably not connected to the changed lipid droplet dynamics. A clear indication for the role of the Sigma-1-receptor in ER stress and protein aggregation could not be found in the present work, but there were indications supporting the published results from the literature. Induction of ER stress leads to a change in the PERK/eIFP2a/ATF4 signaling pathway (Ha *et al.*, 2011; Hayashi und Su, 2007) and overexpression of alpha-synuclein tends to a probably increased aggregation of alpha-synuclein in the Sigma-1-Knockout (Hong *et al.*, 2017).

Summing up the present work could show an influence of the Sigma-1-receptor to the dynamic of lipid droplets, which is probably due to the formation of cholesterol rich microdomains in the ER, especially the MAM. For a more detailed statement further studies are necessary.

9. Literaturverzeichnis

- Abramyan, A. M. *et al.*: The Glu102 mutation disrupts higher-order oligomerization of the sigma 1 receptor. 2020, Computational and Structural Biotechnology Journal 18, 199–206.
- Accioly, M. T. *et al.*: Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. 2008, Cancer Res., 68, pp. 1732-1740.
- Aishwarya, R. *et al.*: Sigmar1's Molecular, Cellular, and Biological Functions in Regulating Cellular Pathophysiology. July 2021, Front. Physiol. 12,705575.
- Alam, S. *et al.*: Sigmar1 regulates endoplasmic reticulum stress-induced C/EBP homologous protein expression in cardiomyocytes. 2017, Biosci. Rep. 37:4.
- Al-Saif, A. *et al.*: A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. 2011, Annals of Neurology, Volume 70, Issue 6, 913-919.
- Alza, N. P. *et al.*: Lipids at the Crossroad of a-Synuclein Function and Dysfunction: Biological and Pathological Implications. 2019, Front. Cell. Neurosci. 13:175.
- Annunziata, I. *et al.*: Mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and lysosomal storage diseases. 2018, Cell Death and Disease 9:328.
- Araki, K. and Nagata, K.: Protein Folding and Quality Control in the ER. 2011, Cold Spring Harb Perspect Biol.; 3(11): a007526.
- Arasaki, K. *et al.*: A role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. 2015. Dev. Cell 32 304-317.
- Area-Gomez, E. *et al.*: Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. 2009, Am. J.Pathol. 175, 1810–1816.
- Arima, K. *et al.*: Immunoelectron-microscopic demonstration of NACP/alpha-synuclein-epitopes on the filamentous component of Lewy bodies in Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. 1998, Brain Res.;808(1):93-100.
- Armakola, M. *et al.*: Inhibition of RNA lariat debranching enzyme suppresses TDP-43 toxicity in ALS disease models. Nat Genet.;44:1302–1309.
- Audano, M. *et al.*: Mitochondrial dysfunction increases fatty acidb-oxidationand translates into impaired neuroblast maturation. 2019, FEBS Letters593, 3173–3189.
- Aydar, E. *et al.*: The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. 2002, Neuron 34, 399–410.
- B'chir, W. *et al.*: The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. 2013, Nucleic Acids Res.; 41(16): 7683–7699.
- Babbey, C.M. *et al.*: ab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells. 2006, Mol Biol Cell.;17(7):3156–3175

- Bailey, A. P. *et al.*: Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of drosophila. 2015 Cell.; 163: 340-353.
- Bekbulat, F. *et al.*: RAB18 Loss Interferes With Lipid Droplet Catabolism and Provokes Autophagy Network Adaptations. 2020, Journal of Molecular Biology, 432, 1216-1234.
- Benador, I. Y. *et al.*: Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics That Support Lipid Droplet Expansion. 2019, Cell Metab.; 27(4): 869–885.e6.
- Benarroch, E.: Sigma-1 receptor and amyotrophic lateral sclerosis. 2018 Neurology, 91:743-747.
- Bendor, J. *et al.*: The Function of α -Synuclein. 2013, Neuron. 2013 Sep 18; 79(6): 10.1016.
- Bento, C. F. *et al.*: Mammalian Autophagy: How Does It Work. 2016, Annu. Rev. Biochem., 85:685-713.
- Bernard-Marissal, N. *et al.*: Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. 2015, BRAIN: 138; 875–890.
- Bhaskara, R. M. *et al.*: Curvature induction and membrane remodeling by FAM134B reticulon homology domain assist selective ER-phagy. 2019, Nat. Commun. 10:2370.
- Biazik, J. *et al.*: Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. 2015. Autophagy.; 11(3): 439–451.
- Björkhem, I. und Meany, S.: Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. 2004 Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. Vol. 24, No5.
- Blachette-Mackie, E. J.: Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. 1995, Journal of Lipid Research Volume 36.
- Bloemke, N. *et al.*: Intramembrane client recognition potentiates the chaperone functions of calnexin. 2022 EMBO J.; 41(24): e110959
- Borchert, D. R. *et al.*: Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. 1996, Neuron 17: 1005–1013.
- Bosma, M. *et al.*: Sequestration of fatty acids in triglycerides prevents endoplasmic reticulum stress in an in vitro model of cardiomyocyte lipotoxicity. 2014, Biochim Biophys Acta.; 1841(12):1648–55.
- Bozza, P. T. *et al.*: Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. 1997. J. Exp. Med., 186, pp. 909-920.
- Brasaemle, D. L. *et al.*: Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet associated protein. 1997, Journal of Lipid Research Volume 38, 1997.
- Bravo, R. *et al.*: Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. 2011, J Cell Sci, 124, pp. 2143-2152.

- Brown, D. A. and Rose, J. K.: Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface. 1992, *Cell*, Vol. 68, 533-544.
- Bu, S.Y. *et al.*: Suppression of Long Chain Acyl-CoA Synthetase 3 Decreases Hepatic de Novo Fatty Acid Synthesis through Decreased Transcriptional Activity. 2009, *J Biol Chem.*; 284(44): 30474–30483.
- Buhman, K. K. *et al.*: The Enzymes of Neutral Lipid Synthesis. *J. Biol. Chem.* Volume 276, Issue 44, p40369-40372.
- Burre, J. *et al.*: Definition of a Molecular Pathway Mediating alpha-Synuclein Neurotoxicity. 2015, *The Journal of Neuroscience*, 35(13):5221–5232.
- Cases, S. *et al.*: Cloning of DGAT2, a Second Mammalian Diacylglycerol Acyltransferase, and Related Family Members. 2001. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 276, Issue 42.
- Cases, S. *et al.*: Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. 1998, *Biological Sciences*, 95 (22) 13018-13023.
- Cataldo, F. *et al.*: CAPNS1 regulates USP1 stability and maintenance of genome integrity. 2013, *Mol Cell Biol.*;33(12):2485-96.
- Cermelli, S. *et al.*: The Lipid-Droplet Proteome Reveals that Droplets Are a Protein-Storage Depot. 2006, *Current Biology*, Volume 16, Issue 18, p1783-1795.
- Chang, C. C. *et al.*: Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme a:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. 1993, *J. Biol. Chem.*, 268, pp. 20747-20755.
- Chang, C. C. *et al.*: Recombinant human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) purified to essential homogeneity utilizes cholesterol in mixed micelles or vesicles in a highly cooperative manner. 1998, *J Biol Chem* 273: 35132–35141.
- Chang, T. Y. *et al.*: Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. 2009, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 297(1): E1–E9.
- Chen, J. *et al.*: OPA1, a molecular regulator of dilated cardiomyopathy. *J Cell Mol Med.*; 27(20): 3017–3025.
- Chen, Q. *et al.*: ATL3 is a tubular ER-Phagy receptor for GABARAP-mediated selective autophagy. 2019. *Curr. Biol.* 29 846–855.
- Chino, H. and Mizushima, N.: ER-Phagy: Quality Control and Turnover of Endoplasmic Reticulum. 2020, *Trends in Cell Biology*, Vol. 30, No. 5.
- Chino, H. *et al.*: ATL3 is a tubular ER-Phagy receptor for GABARAP-mediated selective autophagy. 2019 *Curr. Biol.* 29 846–855.
- Chitraju, C. *et al.*: Triglyceride Synthesis by DGAT1 Protects Adipocytes from Lipid-Induced ER Stress during Lipolysis. 2017, *Cell Metab.*;26(2):407-418.
- Choudhary, V. *et al.*: A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet bud-

ding from the ER. 2015, J Cell Biol.;211(2):261-71.

Christ, M. *et al.*: Sigma-1 Receptor Activation Induces Autophagy and Increases Proteostasis Capacity In Vitro and In Vivo. 2019, Cells.,8(3):211.

Chu, U. B. *et al.*: Photoaffinity labeling of the Sigma-1 Receptor with N-(3-(4nitrophenyl)propyl)-N-dodecylamine (4-NPPC12) – Evidence for Receptor Dimers. 2013, Biochemistry.; 52(5): 859–868.

Cloutier, P. and Coloumbe, B. *et al.*: Regulation of molecular chaperones through post-translational modifications: Decrypting the chaperone code. 2013, Biochim Biophys Acta. 1829(5): 443–454.

Cohen A. W. *et al.*: Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation.2004, Diabetes, 53:1261–70.

Cohen, B. C. *et al.*: Regulation of Lipid Droplet Size in Mammary Epithelial Cells by Remodeling of Membrane Lipid Composition—A Potential Mechanism. 2015, Plos One 10(3): e0121645.

Cohen, E. *et al.*: Opposing Activities Protect Against Age-Onset Proteotoxicity. 2006, Science, Vol. 313, No. 5793.

Cole, N. B. *et al.*: Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. 2002, J. Biol. Chem. 277, 6344–6352.

Colla, E. *et al.*: Accumulation of toxic alpha-synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in alpha-synucleinopathy in vivo. 2012, J. Neurosci., 32, 3301–3305.

Colombi, M. *et al.*: Genome-wide shRNA screen reveals increased mitochondrial dependence upon mTORC2 addiction. 2011, Oncogene 30 1551-1565.

Copeland, D. E. and Dalton A. J.: An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. 1959, J. Biophys. Biochem. Cytol., 5, pp. 393-396.

Crouzier, L. *et al.*: Sigma-1 Receptor Is Critical for Mitochondrial Activity and Unfolded Protein Response in Larval Zebrafish. 2021, Int J Mol Sci., 22(20): 11049.

Csordas, G. *et al.*: Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. 2006, J Cell Biol.;174(7):915-921.

Csordas, G. *et al.*: Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. 2006, J Cell Biol.;174(7):915-21.

Cui, Z. *et al.*: Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. 1993. J. Biol. Chem. 268 16655-16663.

Davletov, B. und Montecucco, C.: Lipid function at synapses. 2010. Curr. Opin. Neurobiol., 20, pp. 543-549.

De Brito, O. M. *et al.*: Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. 2008,

Nature.;456(7222):605–610.

DeBruin, K. *et al.*: Modeling Electroporation in a Single Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential. 1999, Biophysical Journal Volume 77 September 1213–1224.

Degechisa S. *et al.*: The mitochondrial associated endoplasmic reticulum membranes: A platform for the pathogenesis of inflammation-mediated metabolic diseases. 2022, Immun Inflamm Dis.;10:e647.

Desjardins, P.R. and Conklin, D.S.: Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. 2011, Current Protocols in Molecular Biology A.3J.1-A.3J.

Du X. *et al.*: The Role of-Synuclein Oligomers in Parkinson’s Disease. 2020, Int. J. Mol. Sci., 21, 8645.

De Stefani, D. *et al.*: A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. 2011, Nature;476:336–340.

De Stropper, B.: Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. 2003, Neuron 38: 9–12.

De Vos, K. J. *et al.*: VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. 2012, Hum Mol Gen.;21(6):1299-1311.

Del Prete, D. *et al.*: Localization and processing of the amyloid- β protein precursor in mitochondria-associated membranes. 2017, J Alzheimer’s Dis.;55(4):1549-1570.

Derk, J. *et al.*: Diaphanous 1 (DIAPH1) is highly expressed in the aged human medial temporal cortex and upregulated in myeloid cells during Alzheimer’s disease. 2018, J. Alzheimers Dis. 64, 995–1007.

Diao, J. *et al.*: ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. 2015, Nature.; 520(7548): 563–566.

Dooley, H. C. *et al.*: WIPI2B links PtdIns3P to LC3 lipidation through binding ATG16L1. 2015, Autophagy 11, 190–191.

Dreser, A. *et al.*: The ALS-linked E102Q mutation in Sigma receptor-1 leads to ER stress-mediated defects in protein homeostasis and dysregulation of RNA-binding proteins. 2017, Cell Death Differ.(10): 1655–1671.

Duelund, L. *et al.*: Composition, structure and properties of POPC-triolein mixtures. Evidence of triglyceride domains in phospholipid bilayers. 2013, Biochim. Biophys. Acta 1828:1909–17.

Dupont N. *et al.*: Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis. 2014, Curr Biol., 24(6): 609–620.

Dusossy, D. *et al.*: Colocalization of sterol isomerase and sigma-1-receptor at endoplasmic reticulum and nuclear envelope level. 1999, Eur J Biochem, 263(2):377-86.

Dvorak, A. M. *et al.*: Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. 1983. J Immunol, 131 (6): 2965–2976.

- Eberhardt, C. *et al.*: cDNA cloning, expression and chromosomal localization of two human lysophosphatidic acid acyltransferases. 1999, *Adv Exp Med Biol.* 469:351-6
- Eynaudi, A. *et al.*: Differential Effects of Oleic and Palmitic Acids on Lipid Droplet-Mitochondria Interaction in the Hepatic Cell Line HepG2. 2021, *Front Nutr.*; 8: 775382.
- Fader, C. M. *et al.*: TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. 2009, *Biochim Biophys Acta* 1793: 1901–1916.
- Fan, G. *et al.*: GPAT3 regulates the synthesis of lipid intermediate LPA and exacerbates Kupffer cell inflammation mediated by the ERK signaling pathway. 2023, *Cell Death and Disease* 14:208.
- Farmer, B. *et al.*: Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. 2020, *Front. Neurosci.* 14:742.
- Fei, W. *et al.*: Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*. 2009, *Biochem J.*;424(1):61–7.
- Filippin, L. *et al.*: Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. 2003, *J. Biol. Chem.* 278:39224–39234.
- Finn, F. D. and Dice F. J.: Proteolytic and lipolytic responses to starvation. 2006, *Nutrition*, Volume 22, Issues 7–8, Pages 830-844.
- Fontanilla *et al.*: Probing the Steroid Binding Domain-like I (SBDLI) of the Sigma-1 Receptor Binding Site Using N-Substituted Photoaffinity Labels. 2008, *Biochemistry*, 47(27), 7205–7217.
- Fuchs, C. D. *et al.*: Absence of adipose triglyceride lipase protects from hepatic endoplasmic reticulum stress in mice. 2012, *Hepatology*;56(1):270–80.
- Fujimoto, M. *et al.*: The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria. 2012, *Biochem Biophys Res Commun.*;417(1):635-9.
- Fujimoto, T. und Parton, R. G.: Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet. 2011, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 3(3): a004838.
- Fujimoto Y. *et al.*: Long-Chain Fatty Acids Induce Lipid Droplet Formation in a Cultured Human Hepatocyte in a Manner Dependent of Acyl-CoA Synthetase. *Biol. Pharm.* 2006, *Bull.* 29(11) 2174—2180.
- Fujita, N. *et al.*: The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. 2008, *Mol Biol Cell.*; 19(5): 2092–2100.
- Fumagalli F. *et al.*: Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery. 2016, *Nat. Cell. Biol.* 18 1173–1184.
- Furuta, N. *et al.*: Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. 2010, *Mol Biol Cell* 21: 1001–1010.

- Gao, J. *et al.*: Autophagy activation promotes clearance of α -synuclein inclusions in fibril-seeded human neural cells. 2019, J Biol Chem.; 294(39): 14241–14256.
- Gao, M. *et al.*: The biogenesis of lipid droplets: Lipids take center stage. 2019, Progress in Lipid Research 75, 100989.
- Gao, P. *et al.*: Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases. 2020, Front Cell Dev Biol.; 8: 604240.
- Gennon, R.A. *et al.*: Structural Features Important for Sigma-1-Receptor Binding. 1994., J.Med.Chem.,37,1214-1219.
- Gincel, D. *et al.*: Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. 2001, Biochem. J. 358:147–155.
- Gkogkas, C. *et al.*: VAPB interacts with and modulates the activity of ATF6. 2008, Hum. Mol. Genet. 17, 1517–1526.
- Goedert, M.: Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. 2001, Nature Reviews Neuroscience volume 2, pages 492–501.
- Goetzmann, E. *et al.*: Expression and Characterization of Mutations in Human Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase using a Prokaryotic System. 2007, Mol Genet Metab., 91(2): 138–147.
- Grasso, D. *et al.*: Initial Steps in Mammalian Autophagosome Biogenesis. 2018, Front. Cell Dev. Biol. 6:146.
- Gregianin, E. *et al.*: Loss-of-function mutations in the SIGMAR1 gene cause distal hereditary motor neuropathy by impairing ER-mitochondria tethering and Ca²⁺ signaling. 2016, Hum Mol Genet.;25(17):3741-3753.
- Gromek, K. A. *et al.*: The Oligomeric States of the Purified Sigma-1Receptor Are Stabilized by Ligands. 2014, The Journal of Biological Chemistry Vol.289,No.29,pp.20333–20344.
- Gundemir, S. *et al.*: Transglutaminase 2: A molecular Swiss army knife. 2012, Biochimica et Biophysica Acta 1823, 406–419.
- Gwinn, D M. *et al.*: AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. 2008, Mol Cell.;30(2):214-26.
- Ha, Y. *et al.*: Sigma receptor 1 modulates endoplasmic reticulum stress in retinal neurons. 2011, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 52, 527–540.
- Haas, C. *et al.*: Trafficking and proteolytic processing of APP. 2011 Cold Spring Harb Perspect Med 10.1101.
- Hahn-Windgassen, A. *et al.*: Akt Activates the Mammalian Target of Rapamycin by Regulating Cellular ATP Level and AMPK Activity. 2005, J. Biol. Chem. Volume 280, Issue 37, p 32081-32089.
- Hamasaki, M. *et al.*: Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. 2013, Na-

ture volume 495, pages389–393.

Hamilton, J. A. *et al.*: Brain Uptake and Utilization of Fatty Acids, Lipids and Lipoproteins: Application to Neurological Disorders. 2007, J Mol Neurosci 33, 2–11.

Hamilton, J. A. *et al.*: Solubilization of triolein and cholesteryl oleate in egg phosphatidylcholine vesicles. 1983, J Biol Chem.;258(21):12821-6.

Hamilton, J. A. und Small, D. M.: Solubilization and localization of triolein in phosphatidylcholine bilayers: a ^{13}C NMR study. 1981, PNAS 78:6878–82.

Hamilton, L. K. *et al.*: Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer’s Disease. 2015, Cell Stem Cell.;17(4):397-411.

Hanada, T. *et al.*: The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. 2007, J. Biol. Chem. Volume 282, Issue52, p37298-37302.

Hanner, F. *et al.*: Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma-binding site. 1996, Pharmacology Vol. 93, pp. 8072-8077.

Hartman, I. Z. *et al.*: Sterol-induced dislocation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from endoplasmic reticulum membranes into the cytosol through a subcellular compartment resembling lipid droplets. 2010, J. Biol. Chem., 285 (25), pp. 19288-19298.

Hayashi T., Su, T. P.: Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. 2003, J. Pharmacol. Exp. Ther. 306, 718–725.

Hayashi, T. and Su, T. P.: Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER Mitochondrion Interface Regulate Ca^{2+} Signaling and Cell Survival. 2007, Cell 131, 596–610.

Hayashi, T. *et al.*: Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. 2011, Expert Opin The Targets, 15(5): 557–577.

Hayashi, T. *et al.*: The Lifetime of UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is controlled by a distinct endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) regulated by sigma-1 receptor chaperones. 2012, J. Biol. Chem. 287, 43156–43169.

Hayashi, T. *et al.*: The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: Implication for drug abuse. 2005, Life Sciences 77 1612–1624.

Hayashi, T., Fujimoto, M.: Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum mitochondria junction. 2010, Mol. Pharmacol. 77, 517–528.

Hayashi, T.: Sigma-1-receptor:The novel intracellular target of neuropsychotherapeutic drugs. 2015, Journal of Pharmacological Sciences 127,2e5.

Hayashi, T.: The Sigma-1-Receptor in Cellular Stress Signaling. 2019, Front. Neurosci. 13:733.

Hetz, C.: The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. 2012, Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 13, pages89–102.

Hodges, B. D. M. und Wu, C. C.: Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. 2010, *J Lipid Res.*; 51(2): 262–273.

Hong, J. *et al.*: Sigma-1 receptor knockout increases α -synuclein aggregation and phosphorylation with loss of dopaminergic neurons in substantia nigra. 2017 *Neurobiology of Aging* 59 171-183.

Hooks, S.B. *et al.*: Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform. 1998. FEBS Press, Volume 427, Issue 2, 188-192.

Hopper, N.: Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveola. 1999, *Molecular Membrane Biology*, 16, 145-156.

Hosokawa, N. *et al.*: Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. 2009, *Mol Biol Cell* 20:1981–1991.

Huang, Y. *et al.*: Genetic Polymorphisms in Sigma-1 Receptor and Apolipoprotein E Interact to Influence the Severity of Alzheimers Disease. 2011, *Current Alzheimer Research*, Volume 8, Issue 7, 765-770.

Ichimura, Y. *et al.*: A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. 2000, *Nature* volume 408, pages488–492.

Ipsen, J. H. *et al.*: Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. 1987 *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 905, Issue 1, Pages 162-172.

Itakura, E. *et al.*: The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. 2012, *Cell* 151: 1256–1269.

Itakura, E. und Mizushima, N.: Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. 2010, *Autophagy*;6:764–776.

Jacquier, N. *et al.*: Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. 2011, *J. Cell Sci.* 124:2424–37.

Jarc, E. and Petan, T. *et al.*: Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. 2019, *YALE Journal of Biology and Medicine* 92, pp.435-452.

Jensen-Ursated, A.P.L. and Semenkovich, C.F.: Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? 2012, *Biochim Biophys Acta.*; 1821(5): 747–753.

Jia, J. Y. *et al.*: Quantitative proteomics analysis of detergent-resistant membranes from chemical synapses: evidence for cholesterol as spatial organizer of synaptic vesicle cycling. 2006, *Mol. Cell. Proteomics*, 5, pp. 2060-2071.

Jiang, H. *et al.*: Heat shock protein 70 is translocated to lipid droplets in rat adipocytes upon heat stimulation. 2007. *Biochim. Biophys. Acta*, 1771 , pp. 66-74.

Jin, Y. *et al.*: Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2) and Monoacylglycerol Acyltransferase-2 (MGAT2) Interact to Promote Triacylglycerol Synthesis. 2014, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 289, No. 41, pp. 28237–28248.

- Kaiser, C. *et al.*: Biogenesis and Breakdown of Lipid Droplets in Pathological Conditions. 2022, *Front. Cell Dev. Biol.* 9:826248.
- Karanasios, E. *et al.*: Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. 2013, *J Cell Sci* 126 (22): 5224–5238
- Kassan, A. *et al.*: Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. 2013, *J. Cell Biol.* 203:985–1001.
- Kaushik, S. and Cuervo, A. M.: Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. 2012, *Trends Cell Biol.*; 22(8): 407–417.
- Kaushik, S. und Cuervo, A. M.: Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. 2015, *Nat Cell Biol.*; 17(6): 759–770.
- Kekuda, R. *et al.*: Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 553–558.
- Khor, V. *et al.*: Lipid Droplet Metabolism. 2013, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*; 16(6): 632–637.
- Kienesberger, P. *et al.*: Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. 2009, , *JLR Papers in Press*.
- Kikuchi, K. *et al.*: BODIPY-based probes for fluorescence imaging of biomolecules in living cells. 2013, *J. Name.*, 00, 1-3.
- Kim, F. J. *et al.*: Autophagy as a survival response to sigma receptor ligand-induced endoplasmic reticulum stress. 2010, *The FASEB Journal*, Volume 24, Issue S1, p485:11.
- Kim, J. *et al.*: AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. 2011, *Nat Cell Biol.*; 13(2): 132–141.
- Kim, S. *et al.*: Seipin transmembrane segments critically function in triglyceride nucleation and lipid droplet budding from the membrane. 2022, *eLife.*; 11: e75808. Kinoshita, M. *et al.*: Sigma-1 receptor alters the kinetics of Kv1.3 voltage gated potassium channels but not the sensitivity to receptor ligands. 2012, *Brain Res.* 1452, 1–9.
- Korlach, J. *et al.*: Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. 1999, *Biophysics and Computational Biology.* 96,(15), 8461-8466.
- Kornmann, B. *et al.*: An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. 2009, *Science.*; 325(5939): 477–481.
- Kourrich, S. *et al.*: Dynamic interaction between sigma-1 receptor and Kv1.2 shapes neuronal and behavioral responses to cocaine. 2013, *Cell* 152, 236–247.
- Koyoma-Honda I. *et al.*: Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. 2013, *Autophagy*, 9:10, 1491-1499.
- Kumar, M. *et al.*: Isolation and Lipidomic Profiling of Neuronal Lipid Droplets: Unveiling the Lipid Landscape for insights into Neurodegenerative Disorders. 2023, Version 1. *bioRxiv*.

Preprint

Kumar, S. *et al.*: How specific are the conformation-specific α -synuclein antibodies? Characterization and validation of 16 α -synuclein conformation-specific antibodies using well-characterized preparations of α -synuclein monomers, fibrils and oligomers with distinct structures and morphology. 2020, *Neurobiology of Disease* 146, 105086.

Kumari, R. M. *et al.*: Concept of lipid droplet biogenesis. 2023 *J. Cell Biology*, Volume 102, Issue 4, 151362

Kuo, A. *et al.*: Caveolin-1 regulates lipid droplet metabolism in endothelial cells via autocrine prostacyclin-stimulated ,cAMP-mediated lipolysis. 2018, *J.Biol.Chem.* 293(3)973–983.

Kuo,J. J. *et al.*: Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. 2004, *J Neurophysiol.*;91:571–575.

Kuwata, H. and Hara, S.: Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. 2019, *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, Volume 144, 106363.

Labit-Le Bouteiller, C. *et al.*: Antiproliferative effects of SR31747A in animal cell lines are mediated by inhibition of cholesterol biosynthesis at the sterol isomerase step. 1998, *Eur. J.Biochem.* 256, 342–349.

Lahiri, S. *et al.*: A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. 2014, *PLoS Biol.*;12(10):e1001969.

Lamark, T. and Johansen, T.: Aggrephagy: Selective Disposal of Protein Aggregates by Macroautophagy. 2012, *Int J Cell Biol*; 2012: 736905.

Lashuel, H. *et al.*: The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. 2013, *Nat Rev Neurosci.*; 14(1): 38–48.

Laundry, J.J.M. *et al.*: The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. 2013, *G3 (Bethesda)*. 3(8): 1213–1224.

Lavental, I. *et al.*: Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. 2010, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;107:22050–22054.

Lay, S. L. *et al.*: Cholesterol-Induced Caveolin Targeting to Lipid Droplets in Adipocytes: A Role for Caveolar Endocytosis. 2006, *Traffic*, Volume 7, Issue 5, p549-561.

Lee, A.: The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. 2005, *Methods* 35, 373–381.

Lee, J. S. *et al.*: Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. 2012, *Am J Transl Res.*; 4(1): 102–113.

Lewin, T. M. *et al.*: Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. 2002, *Arch. Biochem. Biophys.*, 404, pp. 263-270.

Li, H. and Sun, S.: Protein Aggregation in the ER: Calm behind the Storm. 2021, *Cells*,

10, 3337.

Li, X. *et al.*: A SIGMAR1 splice-site mutation causes distal hereditary motor neuropathy. 2015, *Neurology*;84(24):2430-7.

Liang, C. *et al.*: Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. 2008, *Nat Cell Biol.*; 10(7): 776–787.

Lin, Y., T. *et al.*: APOE4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with Alzheimer’s disease phenotypes in human iPSC-derived brain cell types. 2018, *Neuron*. 98, 1141–1154.e1147.

Liu, C. C. *et al.*: Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. 2013, *Nat. Rev. Neurol.* 9, 106–118.

Liu, Y. and Zhu, X.: Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases. 2017 *Transl Neurodegener.*; 6: 21.

Liu, Z. *et al.*: ER chaperone GRP78/BiP translocates to the nucleus under stress and acts as a transcriptional regulator. 2023, *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 120(31): e2303448120.

Long, L. *et al.*: Visualizing the Interplay of Lipid Droplets and Protein Aggregates During Aging via a Dual-Functional Fluorescent Probe. 2022. *Anal. Chem.*, 94, 6, 2803–2811.

Mancuso, R. *et al.*: Sigma-1R Agonist Improves Motor Function and Motoneuron Survival in ALS Mice. 2012, *Neurotherapeutics*(2012)9:814–826.

Marzella, L. *et al.*: Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. 1981, *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*;36(2-3):219-34.

Maurice, T. *et al.*: Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B2535-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. 1998, *Neuroscience*; 83(2):413–428.

Mavlyutov, T. A. *et al.*: APEX2-tagging of Sigma 1-receptor indicates subcellular protein topology with cytosolic N-terminus and ER luminal C-terminus. 2018, *Protein Cell*, 9(8):733–737.

Mavlyutov, T. .A. *et al.*: Lack of Sigma-1-Receptor exacerbates ALS progression in mice. 2013, *Neuroscience.*; 240: 129–134.

Mavlyutov, T. A. *et al.*: The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. 2010, *Neuroscience* 167, 247–255.

Mavylutov, T. A. und Ruoho, A. E.: Ligand-dependent localization and intracellular stability of sigma-1 receptors in CHO-K1 cells. 2007, *J Mol Signal.*; 2: 8.

Mercer, C. A. *et al.*: A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. 2009, *Autophagy* 5, 649–662.

Merkwirth, C. *et al.*: Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. 2008, *Cell.*;135(7):1165–7.

Meunier, J. *et al.*: The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid

beta25–35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the signal receptor. 2006, *Br J Pharmacol.*; 149(8):998–1012.

Meunier, J. and Hayashi, T.: Sigma-1Receptors Regulate Bcl-2Expression by Reactive Oxygen Species-Dependent Transcriptional Regulationof NuclearFactor KB. 2010, *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 332:388–397.

Mishra, A. K. *et al.*: The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. 2015, *Biochem J.*, 466(2): 263–271.

Mitsuda, T. *et al.*: Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2a/ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. 2011, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415, 519–525.

Mizushima, N. *et al.*: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. 2008, *Nature.*; 451(7182): 1069–1075.

Moebius, F. *et al.*: High affinity of sigma1-binding sites for sterol isomerization inhibitors: evidence for a pharmacological relationship with the yeast sterol C8-C7 isomerase. 1997, *British Journal of Pharmacology* 121, 1-6.

Moldavski, O. *et al.*: Lipid Droplets Are Essential for Efficient Clearance of Cytosolic Inclusion Bodies. 2015 *Dev. Cell.*;33:603–610.

Montisano, D. F. *et al.*: Association between mitochondria and rough endoplasmic reticulum in rat liver. 1982, *Anat. Rec.*, 203, pp. 441-450.

Morell, T. und Towes, A. D.: *Biochemistry of Lipids*. 1996, In Moser, H. W. (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 22 (66): *Neurodystrophies and Neurolipidoses* (pp. 33–49). Amsterdam: Elsevier.

Mori, T. *et al.*: Sigma-1-Receptor Chaperone at the ER-Mitochondrion Interface Mediates the Mitochondrion-ER-Nucleus Signaling for Cellular Survival. 2013, *PLoS ONE*8(10):e76941.

Mukaka, M. M.: *Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research*. 2012, *Malawi Medical Journal*; 24(3): 69-71.

Munoz, J. P. *et al.*: Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. 2013, *EMBO J.* 32, 2348–2361.

Munro, S.: Lipid Rafts: Elusive or Illusive. 2003, *Cell*, Vol. 115, 377–388.

Murphy, D. J. und Vance, J.: Mechanisms of lipid-body formation. 1999. *Trends in Biochemical Science*. Volume 24, Issue 3, p109-115.

Murphy, S. *et al.*: Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens. 2010, *PLoS One.*;5:e15030.

Nakajima, S. *et al.*: Oleic acid is a potent inducer for lipid droplet accumulation through ist esterification to glycerol by diacylglycerol acyltransferase in primary cortical astrocytes. 2019 *Brain Research* 1725, 146484.

Nature Methods: Calcium phosphate-mediated transfection of eukaryotic cells. 2005 *Nat*

Methods 2, 319–320.

Navarro, G. *et al.*: Cocaine Inhibits Dopamine D2 Receptor Signaling via Sigma-1-D2 Receptor Heteromers. 2013, PLoS One.; 8(4): e61245.

Nguyen T. B., *et al.*: DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy. 2017, Developmental Cell 42, 9–21.

Nguyen, L. *et al.*: Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. 2015, Journal of Pharmacological Sciences 127, 17-29.

Nguyen, T. B. and Olzmann, J.: Lipid droplets and lipotoxicity during autophagy. 2017, Autophagy, Vol. 13, No. 11, 2002–2003.

Nguyen, T. *et al.*: DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy. 2017, Developmental Cell 42, 9–21.

Nishimura, A. L. *et al.*: A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. 2004, Am J Hum Genet.;75:822–831.

Ohsaki, Y. *et al.*: Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B. 2006, Mol. Biol. Cell, 17, pp. 2674-2683.

Olarte, M. J. *et al.*: The CYTOLD and ERTOLD pathways for lipid droplet–protein targeting. 2021, Trends in Biochemical Science, Volume 47, Issue 1, p39-51.

Olzmann, J. and Carvalho, P.: Dynamics and functions of lipid droplets. 2019, Nature Reviews, Nat Rev Mol Cell Biol.;20(3):137-155.

Olzmann, J. A. *et al.*: Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. 2013, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 110 (4), pp. 1345-1350.

Ono, Y. *et al.*: A sigma-1 receptor antagonist (NE-100) prevents tunicamycin-induced cell death via GRP78 induction in hippocampal cells. 2013, Biochem. Biophys. Res. Commun. 434 904–909.

Osowski, C. und Urano, F.: Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. 2011, Methods Enzymol., 490: 71–92.

Ossa, F. *et al.*: A Review of the Human Sigma-1 Receptor Structure. 2017, Springer book: Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets. page: 15-29.

Outeiro, T. F. und Lindquist, S.: Yeast cells provide insight into alphasynuclein biology and pathobiology. 2003. Science 302, 1772–1775.

Owicki, J. C. and McConnell, H. M.: Lateral diffusion in inhomogeneous membranes. Model membranes containing cholesterol. 1980, funcBiophys.J. 30, 383–397.

Paillusson, S. *et al.*: α -Synuclein binds to the ER-mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial ATP production. 2017, Acta Neuropathol.;134(1):129-149.

- Paillusson, S. *et al.*: There's Something Wrong with my MAM; the ER–Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. 2016, Trends in Neurosciences, Vol. 39, No. 3.
- Pal, A. *et al.*: Identification of regions of the sigma-1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe. 2007. Mol Pharmacol 72:921–933.
- Pal, A. *et al.*: Juxtaposition of the Steroid Binding Domain-like I and II Regions Constitutes a Ligand Binding Site in the Sigma-1 Receptor. 2008, The Journal of Biological Chemistry Vol. 283, No. 28, pp. 19646–19656.
- Palmer *et al.*: Sigma-1 Receptors Bind Cholesterol and Remodel Lipid Rafts in Breast Cancer Cell Lines. 2007, Cancer Research ;67: (23).
- Parzych, K. R. and Klionsky, K. J.: An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. 2014, Antioxidants and Redox Signaling Volume 20, Number 3.
- Penke, B. *et al.*: β -Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. 2017, Molecules ,22,1692.
- Pennetta, G. und Welte, M. A.: Emerging Links between Lipid Droplets and Motor Neuron Diseases. 2018, Dev Cell.; 45(4): 427–432.
- Perumal, N. *et al.*: Characterization of human reflex tear proteome reveals high expression of lacrimal proline-rich protein 4 (PRR4). 2015, Proteomics, 15, 3370-3381.
- Petiot, A. *et al.*: Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in HT-29 Cells. 2000, J. Biol. Chem. Volume 275, Issue 2, p992-998.
- Peviani M. *et al.*: Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. 2014, Volume 62, February, Pages 218-232.
- Pickett, C. B. *et al.*: The physical association between rat liver mitochondria and rough endoplasmic reticulum. I. Isolation, electron microscopic examination and sedimentation equilibrium centrifugation analyses of rough endoplasmic reticulum–mitochondrial complexes. 1980, Exp. Cell Res., 128, pp. 343-352.
- Pike, L. J.: Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. 2006, J. Lipid Res. 47: 1597–1598.
- Plate, L. *et al.*: Small molecule proteostasis regulators that reprogram the ER to reduce extracellular protein aggregation. 2016, eLife. 2016; 5: e15550.
- Polson, H. E. J. *et al.*: Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. 2010, Autophagy 6:4, 506-522.
- Ponchel, F. *et al.*: Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. 2003, BMC Biotechnol.; 3: 18.
- Pragallapati, S. and Manyam, R.: Glucose transporter 1 in health and disease. 2019, J Oral Maxillofac Pathol.; 23(3): 443–449.

- Prasanth, M. I. *et al.*: The emerging role of the sigma-1 receptor in autophagy: hand-in-hand targets for the treatment of Alzheimer's. 2021, book: Expert Opinion on therapeutic targets, Volume 25, 2021 - Issue 5, Pages 401-414.
- Prause, J. *et al.*: Altered localization, abnormal modification and loss of function of Sigma receptor-1 in amyotrophic lateral sclerosis. 2013, Human Molecular Genetics, Vol.22, No.8.
- Puchkov, D. und Haucke, V.: Greasing the synaptic vesicle cycle by membrane lipids. 2013, Trends in Cell Biology, Vol. 23, No. 10.
- Quest, A. F. *et al.*: Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. 2008, J. Cell Mol. Med. 12 1130-1150.
- Quiroga, I. Y. *et al.*: Triacylglycerol synthesis directed by glycerol-3-phosphate acyltransferases-3 and-4 is required for lipid droplet formation and the modulation of the inflammatory response during macrophage to foam cell transition. 2021, Atherosclerosis,316: 1–7.
- Rambold, A. S. *et al.*: Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. 2015, Dev Cell.;32(6):678-92.
- Ramirez, V.P. *et al.*: Basal and stress-inducible expression of HSPA6 in human keratinocytes is regulated by negative and positive promoter regions. 2015, Cell Stress Chaperones.; 20(1): 95–107.
- Ramstedt, B. and Slotte, J. P.: Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length. 1999, Biophys. J. 76:908-915.
- Rapizzi, E. *et al.*: Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. 2002, J. Cell Biol. 159:613–624.
- Read, A. and Schröder, M.: The Unfolded Protein Response: An Overview. 2021, Biology, 10, 384.
- Ripa, I. *et al.*: Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. 2021, Front. Microbiol. 12:631274.
- Rizzuto, R. *et al.*: Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. 1998. Science, Vol 280, Issue 5370.
- Robenek, M. J. *et al.*: Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. 2004, FASEB J., 18, pp. 866-868.
- Rodriguez, J. A. *et al.*: In vitro stereoselective hydrolysis of diacylglycerols by hormone-sensitive lipase. 2010, Volume 1801, Issue 1, Pages 77-83.
- Rusinol, A. E. *et al.*: A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. 1994, J Biol Chem.;269(44):27494-502.
- Russell, R. C. *et al.*: ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. 2013, Nature Cell Biology, volume 15, pages741–750.

- Sahu, R. *et al.*: Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. 2011, Dev Cell.; 20(1): 131–139.
- Salo, V. T. *et al.*: Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. 2016, EMBO J., 35, pp. 2699-2716.
- Samsonov, A. V. *et al.*: Characterization of Cholesterol-Sphingomyelin Domains and Their Dynamics in Bilayer Membranes. 2001, Biophysical Journal Volume 81, 1486-1500.
- Samuel, A. Z. *et al.*: Molecular profiling of lipid droplets inside HuH7 cells with Raman micro-spectroscopy. 2020, Communications Biology volume 3, Article number: 372.
- Sandager, L. *et al.*: Storage Lipid Synthesis Is Non-essential in Yeast. 2002, Journal of Biological Chemistry, Volume 277, Issue 8, Pages 6478-6482.
- Schenkel, L. C. and Bakovic, M.: Palmitic Acid and Oleic Acid Differentially Regulate Choline Transporter-Like 1 Levels and Glycerolipid Metabolism in Skeletal Muscle Cells. 2014, Lipids 49, 731–744.
- Scherzer, C. R. und Feany, M. B.: Yeast genetics targets lipids in Parkinson’s disease. 2004. Trends Genet. 20, 273–277.
- Scheuner, D. *et al.*: Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer’s disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer’s disease. 1996, Nat Med 2: 864–870.
- Schlager, S. *et al.*: Adipose triglyceride lipase acts on neutrophil lipid droplets to regulate substrate availability for lipid mediator synthesis. 2015, J. Leukoc. Biol. 98, 837–850.
- Schmidt, H. R. and Kruse, A. C.: The molecular function of σ receptors: past, present, and future. 2019, Trends Pharmacol Sci, 40(9): 636–654.
- Schmidt, H. R. *et al.*: Crystal structure of the human $\sigma 1$ receptor. 2016, Nature, 532(7600), 527–530.
- Schmidt, H. R. *et al.*: Structural basis for $\sigma 1$ receptor ligand recognition. 2018, Nat Struct Mol Biol.; 25(10): 981–987.
- Schrock, J. M. *et al.*: Sequential Cytoprotective Responses to SignalLigand–Induced Endoplasmic Reticulum Stress. 2013, Mol Pharmacol 84:751–762.
- Schroeder, R.J. *et al.*: Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosyl- phosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. 1998, J Biol Chem.; 273(2):1150-7.
- Schroeder, R. *et al.*: Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. 1994, Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 91, pp. 12130-12134.
- Schröder, M. and Kaufmann, R.: The Mammalian Unfolded Protein Response. 2005, Annu. Rev. Biochem. 74:739–89.

- Schrul, B. and Kopito, R.: Peroxin-Dependent Targeting of a Lipid Droplet-Destined Membrane Protein to ER-subdomains. 2016, *Nat Cell Biol.*; 18(7): 740–751.
- Schürch, P. M. *et al.*: Calreticulin mutations affect its chaperone function and perturb the glycoproteome. 2022, *Cell Rep.*;41(8):111689.
- Seebauer, L. *et al.*: Interaction of Alpha Synuclein and Microtubule Organization Is Linked to Impaired Neuritic Integrity in Parkinson’s Patient-Derived Neuronal Cells. 2021, *Neuronal Cells. Int. J. Mol. Sci.*,23, 1812.
- Sekiya, M. *et al.*: Ablation of Neutral Cholesterol Ester Hydrolase 1 Accelerates Atherosclerosis. 2009, *Cell Metabolism* 10, 219–228.
- Seth, P. *et al.*: Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand-binding domain of the receptor. 2001, *Biochim Biophys Acta* 1540:59–67.
- Shahmoradian, S. H. *et al.*: Lewy pathology in Parkinson’s disease consists of crowded organelles and lipid membranes. 2019, *Nat Neurosci.*;22(7):1099-1109.
- Shao, G. *et al.*: Advancements of Annexin A1 in inflammation and tumorigenesis. 2019, *Onco Targets Ther.*; 12: 3245–3254.
- Shi, M. *et al.*: Activation of Sigma-1 Receptor Alleviates ER-Associated Cell Death and Microglia Activation in Traumatically Injured Mice. 2022, *J. Clin. Med.*, 11, 2348.
- Shi, M. *et al.*: Sigma-1 Receptor: A Potential Therapeutic Target for Traumatic Brain Injury. 2021, *Front. Cell. Neurosci.* 15:685201.
- Singleton, A. *et al.*: α -Synuclein locus triplication causes Parkinsons disease. 2003, *Science*, 302, 841.
- Simons, K. and Ikonen, E.: Functional rafts in cell membranes. 1997, *Nature*. 387:569–572.
- Simonsen, A. and Wollert, T.: Don’t forget to be picky – selective autophagy of protein aggregates in neurodegenerative diseases. 2022, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 75, 102064.
- Smith, L. M. *et al.*: Lateral diffusion of M-13 coat protein in mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. 1980, *Biochemistry* 19, 5907–5911.
- Spillantini, M. G. *et al.*: alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson’s disease and dementia with lewy bodies. 1998, *Proc Natl Acad Sci USA.*;95(11):6469-73.
- Spira, P. J. *et al.*: Clinical and pathological features of a parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr α -synuclein mutation. 2001, *Ann. Neurol.*, 49, 313-319.
- Stallings, N. R. *et al.*: TDP-43, an ALS linked protein, regulates fat deposition and glucose homeostasis. 2013, *PLoS One*. 2013;8:e71793.
- Stoica, R. *et al.*: ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. 2014, *Nat Commun.*:5:3996.

- Stone, S. J. and Vance J. E.: Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, pp. 34534-34540.
- Strivats, S. *et al.*: Sigma1 receptors inhibit store-operated Ca^{2+} entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1. 2016, *J. Cell Biol.* Vol. 213 No. 1 65–79.
- Su, T. P. *et al.*: Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in the Living System. 2016, *Trends Pharmacol Sci.*, 37(4): 262–278.
- Su, T. P. *et al.*: The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. 2010, *Trends Pharmacol Sci.*, 31(12): 557–566.
- Su, T. P. *et al.*: When the Endogenous Hallucinogenic Trace Amine N,N Dimethyltryptamine meets the Sigma-1 Receptor. 2009, *Sci Signal.* ; 2(61): pe12.
- Sukumaran S. *et al.*: Functional characterization of the human 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase isoform 10/glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform 3. 2009, *J Mol Endocrinol.*; 42(6): 469–478.
- Suzuki, H. *et al.*: Structure of the Atg101-Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in autophagy initiation. 2015, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 572–580.
- Szabadkai, G. *et al.*: Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels. 2006, *J Cell Biol.*;175(6):901-11.
- Tagashira, H. *et al.*: Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca^{2+} transport and ATP production through sigma(1)-receptor in hypertrophic cardiomyocytes. 2014. *Life sciences.*;95:89–100.
- Tagashira, H. *et al.*: Sigma-1 receptor is involved in modification of ER-mitochondria proximity and Ca^{2+} homeostasis in cardiomyocytes. 2023, *Journal of Pharmacological Sciences* 151, 128-133.
- Talari, N. K. *et al.*: Lipid-droplet associated mitochondria promote fatty-acid oxidation through a distinct bioenergetic pattern in male Wistar rats. 2023, *Nat Commun.*;14(1):766.
- Tambini, M. D. *et al.*: ApoE4 upregulates the activity of mitochondria-associated ER membranes. 2015, *EMBO Rep.* 17, 27–36.
- Tandan, R. and Bradley, W. G.: Amyotrophic lateral sclerosis: Part 1. Clinical features, pathology, and ethical issues in management. 1985, *Ann Neurol.*;18(3):271-80.
- Tang, C. *et al.*: Primary ectocervical epithelial cells display lower permissivity to Chlamydia trachomatis than HeLa cells and a globally higher pro-inflammatory profile. 2021, *Scientific Reports* volume 11, Article number: 5848.
- Tavana, J.P. *et al.*: RAB10: an Alzheimer’s disease resilience locus and potential drug target. 2019, *Clin Interv Aging.*; 14: 73–79.
- Taylor, R. and Dillin, A.: Aging as an Event of Proteostasis Collapse. 2011, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*;3:a004440.
- Tofaris, G.: Initiation and progression of α -synuclein pathology in Parkinson’s disease. 2022,

Cellular and Molecular Life Sciences, 79:210.

Travers, K. J. *et al.*: Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation. 2000, Cell, Volume 101, Issue 3, P249-258.

Tsai, S.-T. *et al.*: Sigma-1 Receptor Chaperones and Diseases. 2009, Cent Nerv Syst Agents Med Chem., 9(3): 184–189.

Vance, D. E. *et al.*: Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from liver. 1997, Biochim. Biophys. Acta, 1348, pp. 142-150.

Vance, J. E. and Steenbergen, R.: Metabolism and functions of phosphatidylserine. 2005, Prog. Lipid Res. 44, 207–234.

Vance, J.E.: Phospholipid Synthesis in a Membrane Fraction Associated with Mitochondria. 1990, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 13, Issue of May 5, pp. 7248-7256.

Velikkakath, A. K. G. *et al.*: Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. 2012, Mol Biol Cell.; 23(5): 896–909.

Verfaillie, T. *et al.*: PERK is required at the ER–mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS based ER stress. 2012, Cell Death Differ 2012;19:1880–91.

Vevea, J. D. *et al.*: Role for Lipid Droplet Biogenesis and Microlipophagy in Adaptation to Lipid Imbalance in Yeast. 2015 Dev. Cell.;35:584–599.

Vizio D. *et al.*: Caveolin-1 interacts with a lipid raft-associated population of fatty acid synthase. 2008, Cell Cycle 7:14, 2257-2267.

Vollrath, J. T.: Loss of function of the ALS protein SigR1 leads to ER pathology associated with defective autophagy and lipid raft disturbances. 2015, Citation: Cell Death and Disease, 5, e1290.

Wakabayashi, K. *et al.*: The Lewy Body in Parkinson’s Disease and Related Neurodegenerative Disorders. 2012 Mol Neurobiol.(2):495-508.

Walther, T. and Farese, R.: Lipid Droplets And Cellular Lipid Metabolism. 2012 Annu Rev Biochem. 81: 687–714.

Walther , T. C *et al.*: Lipid Droplet Biogenesis. 2017, Annu Rev Cell Dev Biol.; 33: 491–510.

Wang, P. *et al.*: The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. 2018, J Biol Chem.;293(11):4110-4121.

Wang, X. *et al.*: Systematic In-Depth Proteomic Analysis of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Mouse and Human Testes. 2018, Proteomics, Volume 18, Issue 14.

Weidberg, H. *et al.*: LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. 2010, EMBO J.; 29(11): 1792–1802.

- Weiss, S. B. *et al.*: The enzymatic synthesis of Triglycerides. 1960, J. Biol. Chem. Vol 235, No 1.
- Weller, P. F. *et al.*: Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. 1989. Am. J. Pathol., 135, pp. 947-959.
- Welte, M. and Gould, A.: Lipid droplet functions beyond energy storage. 2017, Biochim Biophys Acta. ; 1862(10 Pt B): 1260–1272.
- Welte, M.: Proteins under new management: lipid droplets deliver. 2007, Trends in Cell Biology Vol.17 No.8.
- Wen, J.-H. *et al.*: Cellular Protein Aggregates: Formation, Biological Effects, and Ways of Elimination. 2023, Int. J. Mol. Sci., 24, 8593.
- Whittemore, S. *et al.*: The Proteostasis Network: A Global Therapeutic Target for Neuroprotection after Spinal Cord Injury. 2022, Cells, 11(21), 3339.
- Wieckowski, M. R. *et al.*: Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. 2009, Nat Protoc.,4(11):1582-90.
- Wilfling, F. *et al.*: Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. 2013, J. Cell Sci. 124:2424–37.
- Wilfling, F. *et al.*: Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. 2013, Dev Cell.; 24(4): 384–399.
- Wolff, S. und Dillin, A.: The trifecta of aging in *Caenorhabditis elegans*. 2006, Experimental Gerontology, Volume 41, Issue 10, Pages 894-903.
- Wu, Z. und Bowen, W. D.: Role of Sigma-1 Receptor C-terminal Segment in Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Activation. 2008, J Biol Chem.; 283(42): 28198–28215.
- Wurie H. R. *et al.*: Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells. 2012, FEBS Journal 279, 3033–3047.
- Xie, Z. *et al.*: Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. 2008, Mol Biol Cell 19: 3290–3298.
- Xu G. *et al.*: Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. 2005 J. Biol. Chem.;280:42841–42847.
- Yang, H. *et al.*: SIGMAR1/Sigma-1 receptor ablation impairs autophagosome clearance. 2019, Autophagy, Vol. 15, No. 9, 1539–1557.
- Yang, M. *et al.*: , Lipid droplet – mitochondria coupling: A novel lipid metabolism regulatory hub in diabetic nephropathy. 2022, Front. Endocrinol. 13:1017387.
- Yang, M. *et al.*: ER-Phagy: A New Regulator of ER Homeostasis. 2021, Front. Cell Dev. Biol., Volume 09.
- Yang, M. *et al.*: Mitochondria-Associated ER Membranes–The Origin Site of Autophagy.

2020, *Front. Cell Dev. Biol.* 8:595.

Yang, X. *et al.*: Distinct mechanisms regulate ATGL-mediated adipocyte lipolysis by lipid droplet coat proteins. 2013, *Mol Endocrinol.*;27(1):116-26.

Yang, Z. and Klionsky, D. J.: Eaten alive: a history of macroautophagy. 2010, *Nat Cell Biol.*; 12(9): 814–822.

Yano, H. *et al.*: Pharmacological profiling of sigma 1 receptor ligands by novel receptor homomer assays. 2018, *Neuropharmacology*. 2018 May 1:133:264-275.

Yaqoob, P.: Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. 2003, *Trends Immunol.*, 24, pp. 639-645.

Yen, C. *et al.*: DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. 2008, *Journal of Lipid Research* Volume 49.

Yla-Anttila, P. *et al.*: 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. 2009, *Autophagy*; 5:1180-5; PMID:19855179.

Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J.: Autophagy: molecular machinery for self-eating. 2005, *Cell Death and Differentiation* volume 12, pages1542–1552.

Yu, D. M. *et al.*: Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction.2017, *Aging Cell* 16:773–84.

Zadoorian, A. *et al.*: Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. 2023, *Nature Reviews Endocrinology*.

Zhang, A. *et al.*: Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection. 2011, *Mol Cell Proteomics.*;10(10).

Zhang, H. *et al.*: A Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 4 (LRP4) in Astrocytic Ab Clearance. 2020, *The Journal of Neuroscience*, 40(28):5347–5361.

Zhang, H.: Lysosomal acid lipase and lipid metabolism: new mechanisms, new questions, and new therapies. 2018, *Curr Opin Lipidol.* 29(3): 218–223.

Zhang, K.Y. *et al.*: Ubiquilin 2: a component of the ubiquitin-proteasome system with an emerging role in neurodegeneration. 2014, *Int J Biochem Cell Biol*:50:123-6.

Zhang, Q. Y. *et al.*: The role of retromer in Alzheimer’s disease. 2016, *Mol Neurobiol.*;53(6):4201–4209.

Zhang, S. *et al.*: The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. 2022, *Cell Death and Disease*,13:132.

Zhang, W. *et al.*: Lipid Droplets, the Central Hub Integrating Cell Metabolism and the Immune System. 2021, *Sec. Lipid and Fatty Acid Research*,Volume 12.

Zhemkov, V. *et al.*: Sigma-1 Receptor (S1R) Interaction with Cholesterol: Mechanisms of S1R Activation and Its Role in Neurodegenerative Diseases. 2021, *Neurodegenerative Diseases. Int. J. Mol. Sci.*, 22, 4082.

Zhemkov, V. *et al.*: The role of sigma 1 receptor in organization of endoplasmic reticulum signaling microdomains. 2021, eLife ;10:e65192.

Zhu, J. *et al.*: BODIPY-based Fluorescent Indicators for Lipid Droplets. 2024, Analysis and Sensing , 4, e202300049.

Zhu, S. *et al.*: Sigma-1 Receptor Antagonist BD1047 Reduces Mechanical Allodynia in a Rat Model of Bone Cancer Pain through the Inhibition of Spinal NR1 Phosphorylation and Microglia Activation. 2015, Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation, Article ID 265056, 11 pages.

Zielke, S. *et al.*: ATF4 links ER stress with reticulophagy in glioblastoma cells. 2021, Autophagy; 17(9): 2432–2448.

Zou, W. *et al.*: Overexpression of PEMT2 downregulates the PI3K/Akt signaling pathway in rat hepatoma cells. 2002, Biochimica et Biophysica Acta. Volume 1581, Issues 1–2, Pages 49–56.

10. Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur des Sigma-1-Rezeptors	7
Abbildung 1.2: Aufbau des Sigma-1-Rezeptors mit seinen wichtigsten Domänen	7
Abbildung 1.3: Oligomerisierung und Aktivierung des Sigma-1-Rezeptors	9
Abbildung 1.4: Die Funktion des Sigma-1-Rezeptors an der MAM	11
Abbildung 1.6: Bildung von Proteinaggregaten und Verlust der Proteostase	14
Abbildung 1.7: Regulation von ER-Phagie und ERAD durch UPR	15
Abbildung 1.8: Bildung von α -Synuclein Aggregaten	16
Abbildung 1.5: Autophagie in Säugetierzellen	19
Abbildung 1.9: Aufbau eines Lipid-Tröpfchens	20
Abbildung 1.10: Biogenese der Lipid-Tröpfchen	21
Abbildung 1.11: Metabolismus von Lipid-Tröpfchen	23
Abbildung 1.12: Aufbau einer <i>Lipid-raft</i> Mikrodomäne	26
Abbildung 4.1: Lipid-Tröpfchen Akkumulation in den Sigma1R-KO Zelllinien	57
Abbildung 4.2: Lipid-Tröpfchen Quantifizierung in Sigma1R-Knockout Zelllinien	58
Abbildung 4.3: Lipid-Tröpfchen Quantifizierung nach Knockdown des Sigma-1-Rezeptors in HeLa-Zellen	59
Abbildung 4.4: Lipid-Tröpfchen Akkumulation im Sigma1R-KO Bd5 in Abhängigkeit von der Zelldichte und der Inkubationszeit	60
Abbildung 4.5: Generierung des Kontrollplasmids (<i>Empty Vector</i>)	61
Abbildung 4.6: Überexpression des Sigma-1-Rezeptors in HeLa-WT Zellen und im Sigma-1-Knockout Bd5	62
Abbildung 4.7: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Überexpression des Sigma-1-Rezeptors	63
Abbildung 4.8: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach EBSS Behandlung	64
Abbildung 4.9: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Ölsäure Behandlung	65
Abbildung 4.10: Lipid-Metabolismus assoziierte Proteine	66
Abbildung 4.11: Überexpression von Mutanten des Sigma-1-Rezeptors	67
Abbildung 4.12: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Überexpression der Sigma-1-Mutanten E102Q und E138Q	68
Abbildung 4.13: Generierung der Deletionsmutanten	70
Abbildung 4.14: Überexpression von Deletionen des Sigma-1-Rezeptors	71
Abbildung 4.15: Lipid-Tröpfchen Akkumulation nach Überexpression der Deletionsmu- tanten	72
Abbildung 4.16: Kolokalisierung der Deletionsmutanten mit Lipid-Tröpfchen in WT Zellen	73
Abbildung 4.17: Kolokalisierung der Deletionsmutanten mit Lipid-Tröpfchen in Sigma1R- KO Bd5 Zellen	74
Abbildung 4.18: Messen der Autophagischen Aktivität in Sigma1R-KO Zellen	76

Abbildung 4.19: Messen der Autophagischen Aktivität nach pharmakologischer und genetischer Manipulation des Sigma-1-Rezeptors	77
Abbildung 4.20: Messen der Autophagischen Aktivität nach pharmakologischer Manipulation des Sigma-1-Rezeptors	78
Abbildung 4.21: Expression der ER-Phagie-Rezeptoren in HeLa-Zellen	79
Abbildung 4.22: Induktion von ER-Stress in HeLa-Zellen	81
Abbildung 4.23: Induktion von UPR in HeLa-Zellen	82
Abbildung 4.24: Proteinaggregationsassay in HeLa-Zellen nach Transfektion mit α -Synuclein-Konstrukten	84
Abbildung 4.25: Doxycyclin-Behandlung eines α -Synuclein- <i>tet-off</i> Systems in H4-Zellen	85
Abbildung 4.26: Genetische Manipulation des Sigma-1-Rezeptors in H4-Zellen mit α -Synuclein-tet-off System	86
Abbildung 4.27: Qualitätskontrolle der Proben für Proteomics-Analyse	87
Abbildung 4.28: Proteomics-Analyse nach Knockout und Knockdown des Sigma-1-Rezeptors	89
Abbildung 4.29: Vergleich der Proteomics-Analyse nach Knockout und Knockdown des Sigma-1-Rezeptors	90
Abbildung 4.30: Kolokalisation verschiedener Konstrukte des Sigma-1-Rezeptors mit Sec62	93
Abbildung 4.31: Kolokalisation verschiedener Konstrukte des Sigma-1-Rezeptors mit TOM20	94
Abbildung 4.32: Isolation der Mitochondrien-ER assoziierten Membran aus HeLa-Zellen	95
Abbildung 5.1: GPAT3 induziert die Bildung von Lipid-Tröpfchen	97
Abbildung 5.2: Hypothese zum Einfluss des Sigma-1-Rezeptors auf die Stabilität der MAM	105

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: verwendete Chemikalien	31
Tabelle 2.2: verwendete Kits	33
Tabelle 2.3: verwendete Puffer für Nährmedien und Bakterienkulturen	33
Tabelle 2.4: verwendete Puffer für Zellkultur-Arbeiten	34
Tabelle 2.5: verwendete Puffer für Protein- und DNA-Analytik	34
Tabelle 2.6: verwendete Puffer für die Isolation der MAM	36
Tabelle 2.7: verwendete Antikörper	37
Tabelle 2.8: verwendete Enzyme und ihre Puffer	38
Tabelle 2.9: verwendete Plasmide	38
Tabelle 2.10: verwendete Oligonukleotide	39
Tabelle 2.11: verwendete Zelllinien	40
Tabelle 2.12: verwendete Laborgeräte	40
Tabelle 2.13: verwendete EDV-Programme	42
Tabelle 3.1: Pipettierschema der PCR-Proben	43
Tabelle 3.2: Pipettierschema der PCR-Amplifikation	44
Tabelle 3.3: PCR-Programm zur Herstellung der Inserts	44
Tabelle 3.4: Pipettierschema der Restriktion	44
Tabelle 3.5: Pipettierschema des Ligationsansatzes	45
Tabelle 3.6: Pipettierschema des Mastermix für die Reverse Transkription	46
Tabelle 3.7: Pipettierschema des qPCR-Ansatzes	47
Tabelle 3.8: Reaktionsbedingungen der qPCR	47
Tabelle 3.9: Reaktionsansatz der Calcium-Phosphat-Transfektion	49
Tabelle 3.10: verwendete Volumina für die Calcium-Phosphat-Transfektion	49
Tabelle 3.11: Pipettierschema der Standards für die Proteinbestimmung mittels BCA-Test	51
Tabelle 3.12: Pipettierschema für die Gelvorbereitung	51

10.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ABAM	Antibiotika-Antimykotikum
ACADVL	<i>acyl-CoA dehydrogenase very long chain</i>
ACAT	<i>acetyl-CoA acyl transferase</i>
ACSL3	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3</i>
ACSL4/FACL4	<i>acyl-CoA synthetase long chain/ fatty acid coenzym A ligase long-chain 4</i>
Act	Actin
AF710B	ANAVEX3-71
AGPAT	<i>1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase</i>
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP aktivierte Proteinkinase
APEX	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 2</i>
APOE	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARE1	<i>Sterol O-acyltransferase 1</i>
ARE2	<i>Sterol O-acyltransferase 2</i>
α Syn	α -Synuclein
ATF4/6	<i>activating transcription factor 4/6</i>
ATG	<i>autophagy related gene</i>
ATGL	<i>adipose triglyceride lipase</i>
ATL3	<i>Atlantin GTPase 3</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bip	<i>binding immunoglobulin protein</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
C12orf44	<i>Chromosome 12 open reading frame 44</i>
CAPNS1 <i>gene</i>	<i>Calpain small subunit 1 (CSS1)</i>
CGI-58	<i>Comparative gene identification 58</i>
CNX	Calnexin
Cyt c	<i>Cytochrome c</i>
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DAG	<i>diacylglycerol</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGA1	<i>Diacylglycerol O-acyltransferase 1</i>
DGAT1/2	<i>Diacylglycerol-acyltransferase 1/2</i>
DIAPH1 <i>gene</i>	<i>Diaphanous related formin 1 protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>

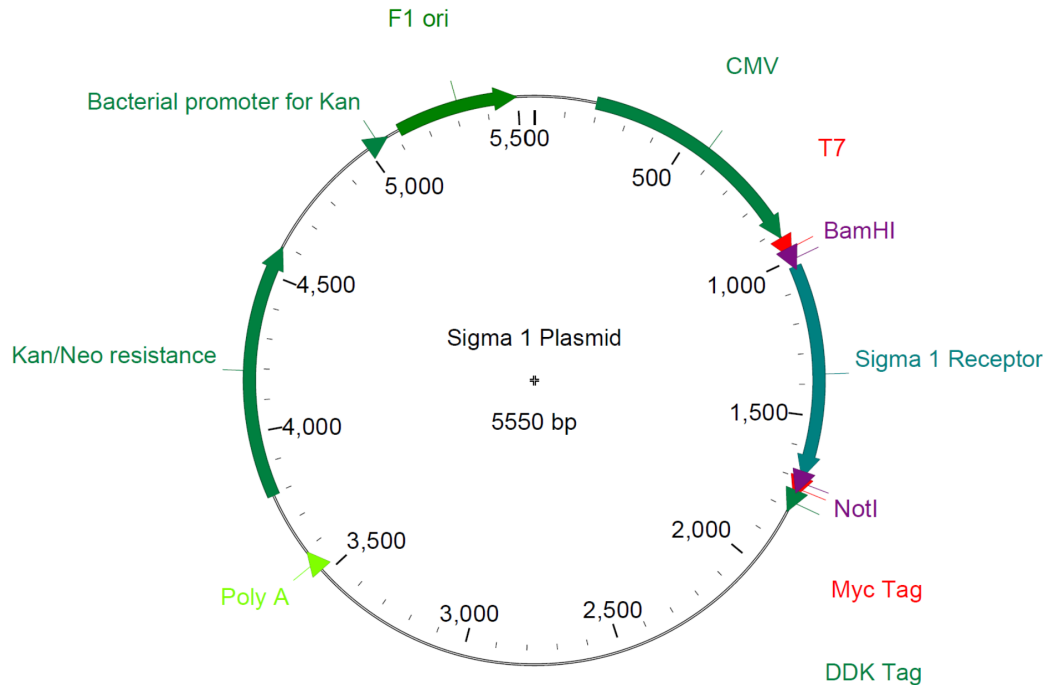
Abkürzung	Bezeichnung
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
eIFP2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A</i>
EMC	<i>endoplasmic reticulum membrane protein complex</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum associated protein degradation</i>
Erg2	<i>C8 sterol isomerase</i>
ERMES	<i>ER-mitochondria encounter structure</i>
EV	<i>empty vector</i>
FAM134B	<i>Family With Sequence Similarity 134 Member B</i>
FASN	<i>Fatty acid synthase (Acyl-carrier-Protein)</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FIP200	<i>FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa</i>
G3P	<i>Glycerol-3-phosphate</i>
GAPARAB	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
GPAT3	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Grp78	<i>Glucose regulated protein 78</i>
HACD3	<i>Very-long-chain-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3</i>
H4	Histon 4
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsc70	<i>Heat shock cognate 70</i>
HSL	Hormon sensitive Lipase
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
HSPA6	<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 6</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP3R3	<i>Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 3</i>
IPAG	<i>1-(4-Iodophenyl)-3-(2-adamantyl)guanidine</i>
IRE1 α	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
LAMP2	<i>Lysosomal associated membrane protein 2</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LD	<i>Lipid droplets</i>
LIPA	<i>Lipase A, lysosomal acid type</i>
LIPE	<i>Lipase E, hormon sensitive type</i>
LIR	<i>LC3 interacting region</i>
LPA	<i>Lysophosphatidic acid</i>
LRO1	<i>Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase</i>

Abkürzung	Bezeichnung
LRP4	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 4</i>
MAM	<i>Mitochondria ER associated membrane</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MCU	<i>Mitochondrial calcium uniporter</i>
Mfn1/2	<i>Mitofusin 1/2</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTORC1	<i>mTOR-complex 1</i>
NCEH1	<i>Neutral cholesterol ester hydrolase 1</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
OMM	<i>Outer mitochondrial membrane</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDI	<i>Protein disulfide-Isomerase</i>
PEMT2	<i>Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase</i>
PERK	<i>Protein Kinase RNA-Like ER Kinase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PIC	<i>Protease inhibitor cocktail</i>
PIK3C3	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3</i>
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PLIN1/3	<i>Perilipin 1/3</i>
PLPP2	<i>Phospholipid Phosphatase 2</i>
PNPLA2	<i>patatin like phospholipase domain containing 2</i>
PSS1/2	<i>Phosphatidyl serine synthase 1/2</i>
PTPIP51	<i>protein tyrosine phosphatase interacting protein 51</i>
Rab10	<i>Ras-related protein 10</i>
RB1CC1	<i>RB1 Inducible Coiled-Coil 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	<i>Raum Temperatur</i>
SBDL	<i>Sterol binding domain-like motifs</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamid Gel Electrophoresis</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SOD-1	<i>Superoxiddismutase-1</i>
STIM1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
TAG	<i>triacylglyceride</i>
TDP-43	<i>Transactive response DNA binding protein 43 kDa</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamin</i>
TGM2	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2</i>
TOM20	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane</i>
Tub	<i>Tubulin</i>
ULK1/2	<i>Unc-51-like autophagy-activating kinases 1/2</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UVRAG	<i>UV radiation resistance-associated gene protein</i>

Abkürzung	Bezeichnung
VAPB	<i>Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C</i>
VDAC1	<i>Voltage-dependent anion-selective channel 1</i>
VDCC	<i>voltage-dependent calcium channels</i>
VPS15/34	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein</i>
WIPI1/2	<i>WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides</i>
XBP1	<i>X box binding protein</i>

TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGGTGTGGTGG
TTACGCGCAGCGTACCGGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCCGACAGTT
CGCGGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAA
AAACTTGATTAGGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCGCTTTGACGTTGGAGTCCACGT
TCTTTAATAGTGACTCTTGTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATTAAGGGATTTT
GCGGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTT

Plasmid pCMV6-Sigma-1-Myc-Flag (Sigma-1-Flag)

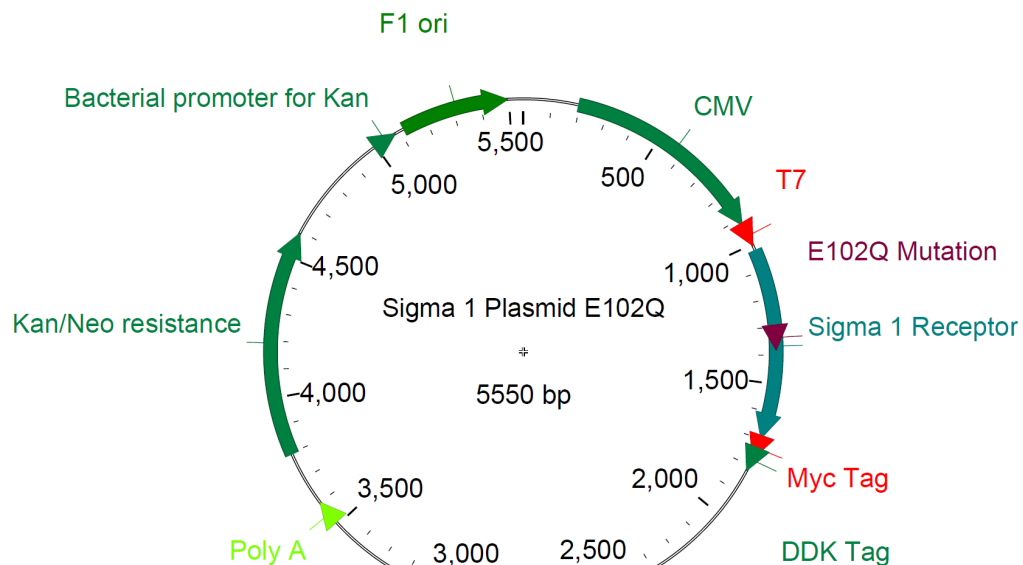


Sequenz:

AACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCCTCTTC
GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCCAGCAGC
TTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAAGCTGATCTATACATTGAATCAATATTGGCAATTAGCCATATTAGTCATTGGTTATATA
GCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAA
TATGACCGCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATG
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAAGTCCGCCCTTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCA
GTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG
CAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
TTTGGCAGAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTGACG
GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAAATTTTGTAAATACGACTCACTATAGGGCGCCGGGAAT
TCGTCGACTGGATCCGGTACCGAGGAGATCTGCGCGCGCGATCGCCATGCAGTGGGCGCTGGGCGCGCGGTGGGCGTGGGC
CGCGCTGCTCCTGGCTGTGCGACGGGTGCTGACCCAGGTGCTGCTGGCTTGGCTGGGTAACGAGAGCTTCGTCTTCCAGCG
CGAAGAGATAGCGCAGTTGGCGCGGCGAGTACGCTGGGCTGGACACGAGCTGGCCTTCTCTGCTGATCGTGGAGCTGCG
GCGGCTGCACCCAGGCCACGTGCTGCGCGACGAGGAGCTGCAGTGGGTGTTTCGTGAATGCGGGTGGCTGGATGGGCGCCAT
GTGCTTCTGACCGCTCGCTGTCGAGTATGTGCTGCTTTCGGCACCGCCTTGGGCTCCGCGGCCACTCGGGGCGCTAC
TGGGCTGAGATCTCGGATACCATCATCTCTGACCTTCCACCAAGTGGAGAGAGGGCACCACAAAAGTGAGGTCTTCTACC
CAGGGGAGACGGTAGTACACGGGCGTGGTGAGGCAACAGCTGTGGAGTGGGGGCCAAACACATGCTGAGTGGAGTACGGCC
GGGCGGTCACTCCCATCCACCTTGGCCTTCCGCTTGGCGCTGCGCGACACTGTCTTTCAGCACCCAGGACTTGCATGGCTCTTATAC
TCTTTCGCTCCTATGCTCGGGGCGCTCCGGCTTGAAGTCAACCACTACCTCTTTGGCCAGGACCCATACGCGTACGCGGCGCGCT
GAGCAGAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGCAGCAATGATATCCTGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGTTTAAACG
GCGGTCGCGGTCTATAGCTGTTTCTGACAGATCGTCCGGGTGGACATCCCTCTGACCCCTCCGAGTGCCTCTCGGCCCTG
GAAAGTTGCCACTCCAGTGCCACAGCCTTGTCTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTGCTGACTAGGTGTCTTCTATA
ATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGG
GAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCCTCGGGTTCAAGCGATTCTCTGCGCTCAGC
CTCCCGAGTTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAAGCTCACTGAATTTTGTGTTTTTGGGTAGAGACGGGGTTTACCAT
ATTGGCCAGGCTGGTCTCCCACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAATTTGCTGGGATTACAGGCGTGA
ACCACTGCTCCTTCCCTGTCTGATTTTAAATAACTATACCAGCAGGAGGACGTCCAGACGATAGGCTACCTG
GCCATGCCCAACCGGTGGGACATTGAGTTGCTGCTTGGCACTGTCTCTCATGCGTTGGGTCCACTCAGTAGATGCGCTGT
TGAATTTGGGTACGCGGCCAGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGCGCGTAAATACGGTTATCCACGAAATCAGGGGATA
ACGCAAGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAAGGCCGGGTGTGCTGGCGTTTTTCCATA
GGTCCGCGCCCGCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTACAGAGGTGGCGAAAACCGGACAGGACTATAAAGATACCA
GGCGTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTCAGGTATAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGTTCGCTTCGCTCAAGCTGGGCTGT
GTGACGAACCCCGCTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCAACCCGCTAAGACACGACT
TATCGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
GGCTAATACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGG
TAGCTCTTGTATCCGGCAAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATACCTTCGCGAGAAAAA
GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTA
ACCTGAGGCTATGCGAGGGGCTCGCGCCCCAGCTTGGCTGCGAGCCCTGGGCGCTTACCCGCAACTTGGGGGGTGGGGTGG
GAAAAGAAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTCCAGCGCTGGGACCGAAG
CCCGCGTTTATGAACAAACGACCCAAACCGGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCGGCTCATAGCGCGGGTTCTTCCGGT
ATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCTTCCCGCTAGGCTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCCGCTGGAGGATCA
TCCAGCGCGGCTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTTATAGAAGGCGCGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCA
GGTTGGGCGCTCGCTTGGTGGGTCTATTTCGAACCCACAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGGCGAT
CGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAGACAGGAAAGCGGTACGCCCATTCGCGGCCAAGCTCTTCAGCAATATC
ACGGGTAGCCAAACGCTATGTCTGATAGCGATCCGCCACACCCAGCGGCCACAGTGCATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTT
TCCACCATGATATTTCGGCAAGCAGGATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCGCTCGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGG

CGAACAGTTGGGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACG
TGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCAATGGGAGGATGCCGATCAAGCGTATGCAGCCGCGCGATTGCTATC
AGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCTGCCCCGCACTTCGCCCAATAGCAGCCA
GTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCCAAGGAACGCCCGTCTGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCC
TCGTCTTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCCGCTTGTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAAC
ACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCAATGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAAGCGCGCGGAGAACCTG
CGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCATCTCTTGTCTTGTATCGATCTTGTCAAAAAGCCTAGCCCTCCAA
AAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCTCGGCTCTGCATAAAATAAAAAAATTAGTCAGCC
ATGGGGCGGAGAAATGGGCGGAAGTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACT
AATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATG
CATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTCCACACCTTAAGTACACACATTCCACAGCTGGTTCTTT
CCGCTCAGGACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATG
TATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
AGCGCGCGGCTGTGTTGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCTTTCGCTTTCTTCC
CTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTTAGTGCTTT
ACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCGATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCGCT
TTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGTCTATTCTT
TGATTTATAAGGGATTTTTCGCGATTTTCGCGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACGCGAATTTT

Plasmid pCMV6-Sigma-1-E102Q-Myc-Flag (E102Q-Flag)

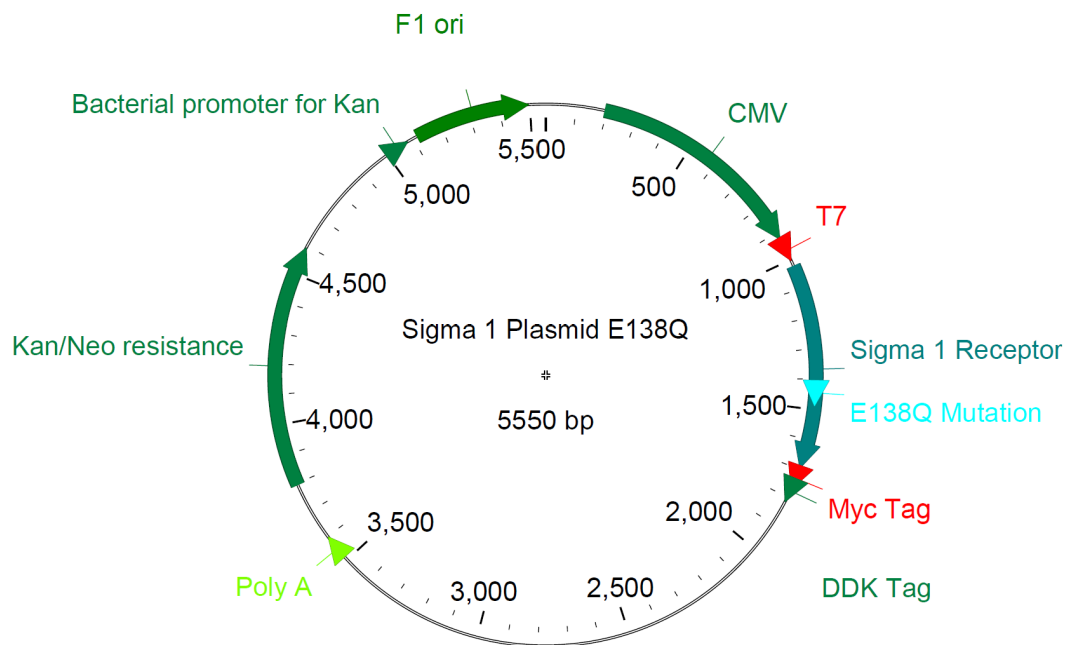


Sequenz:

AACAAAAATTAACGCTTACAATTTCCATTTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTC
GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAACGACG
TTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAAGCTGATCTATACATTGAATCAATATTGGCAATTAGCCATATTAGTCAATTGGTTATATA
GCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGTCATACGTTGTATCTATATCATATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAA
TATGACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTAGCGTCAATAATG
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAATGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTTATGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGCCATTGCCCA
GTACATGACCTTGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTAGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG
CAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCAGCGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT
TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
TGGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGTAACCGGTCAGAAATTTGTAATACGACTCACTATAGGGCGGCGCGGAAT
TCGTCGACTGGATCCCGGTACCGAGGAGATCTGCCCGCGCATCGCCATGCAAGTGGGCGCTGGGCGCGGCTGGGCGTGGG
CGCGCTGCTCCTGCTGTGCGAGCGGTGCTGACCCAGGTGCTGCTGGCTCTGGCTGGGTACGCGAGCTTCGCTCTCCAGCG
CGAAGAGATAGCGCAGTTGGCGCGGCGAGTACGCTGGGCTGGACCACGAGCTGGCCTTCTCTGCTGATCGTGGAGCTGCG
GCGGCTGCACCCAGGCCACGTGCTGCCGACGAGGAGCTGCAAGTGGGTGTTCTGTGAATGCGGGTGGCTGGATGGGCGCCAT
GTGCCTTCTGCACGCCTCGCTGTCCAGTATGTGCTGCTCTTCGGCACCGCCTTGGGCTCCCGCGGCCACTCGGGGCGCTAC
TGGGCTGAGATCTCGGATACCATCATCTCTGACCTTCCACCAAGTGGAGAGAGGGGACCCACCAAAAGTGAGGTCTTCTACC
CAGGGGAGACGCTGATACACGGGCTGGTGAGGCAACAGCTGTGGAGTGGGGGCCAAACACATGGATGGTGAGTACGGCC
GGGCGCTCATCCCATCCACCTGGCCTTCGCGCTGGCCGACACTGTCTTTCAGCACCCAGGACTTCTCACCTCTTCTATAC
TCTTCGCTCCTATGCTCGGGGCTCCGGCTTGAAGTCAACACCTACCTCTTTGGCCAGGACCCTACGCGTACGCGGCGGCTC
GAGCAGAAATCATCTCAGAAGAGGATCTGGCAGCAATGATATCTGGATTACAGGATGACGACGATAAGGTTTAAACG
GCGGCGCGGCTGATAGCTGTTTCTGTAACAGATCCCGGGTGGATCCCTGTGACCCCTCCCAAGTGCCTCTCTGGCCCTG
GAAGTTGCCACTCCAGTGGCCACGAGCCTTGTCTTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCTTCTATA
ATATTATGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGCTTATTGG
GAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGTCACTGCAATCTCCGCTCTGGGTTCAAGCGATTCTCTGCCTCAGC
CTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGATGCATGACCAAGCTCAGCTAAATTTTGTTTTTTGGTAGAGACGGGTTTCCACAT
ATTGGCAGGCTGCTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACTTGGCCTCCCAATTTGCTGGGATTACAGGCGTGA
ACCAGCTGCTCCTTCCCTGTCTTCTGATTTTAAATAACTATACCAGGAGGACGTCAGACACAGCATAGGCTACCTG
GCCATGCCCAACCGGTGGGACATTGAGTTGCTGTGCTGGCACTGTCTCTCATGCGTTGGTCCACTAGTAGATGCCGTG
TGAATTTGGGTACGCGGCGAGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
ACGCAAGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCGCGGTTGCTGGCGTTTTCCTATA
GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAAGGTTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCA
TGGCGTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTTCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCGTGTAGGATATCTCAAGTTCCGTTAGGTGCTTCCGTTCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGAACCCCGCTTACGCGCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCTGCTCTTGTAGTCCAAACCGGTAAGACACGACT
TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTACGAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTTGAAGTGGT
GGCTTAACACGCTACACTAGAAGAAGATTGGTATGTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGG
TAGCTCTTGTATCCGCAAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTTTTTGGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAA
GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGTCAGCCTCAGTGGAAACGAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA

ACCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTACCCGAACTTGGGGGGTGGGGTGG
 GAAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAAC
 CCGCGCTTTATGAACAAACGACCCCAACCGTGGCTTTTATTGTCTCTTTTATTGCGGTCATAGCGCGGGTTCTTCCGGT
 ATTTGTCTCCTTCCGTTGTTTCAAGTTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCA
 TCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGGCGGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCA
 GGTGGGGCGTCCGTTGGTCCGTCATTTCGAACCCCAAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGGCGAT
 GCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAGACAGAGGAAGCGGTACGCCATTCCCGGCCAAGCTCTTCAGCAATATC
 ACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGATCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTT
 TCCACCATGATATTCCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGG
 CGAACAGTTCCGGTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACG
 TGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCGCGATTGCATC
 AGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCCACTTCGCCCAATAGCAGCCA
 GTCCCTTCCCGCTTCACTGACAACGTCGAGCACAGCTGCCAAGGAACGCCGCTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCC
 TCGTCTTGACGTTCACTCAGGGCACCGGACAGGTCCGCTTTGACAAAAAGAACCGGCGCCCTCGCTGACAGCCGGAAC
 ACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAAGCGCGGAGAACCTG
 CGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAA
 AAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGCCGAGCGGCCCTCGGCCCTCGCATATAAATAAATAAATAGTCAGCC
 ATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACCTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACT
 AATTGAGATGCATGCTTTGCACTACTTCTGCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATG
 CATGCTTTGCATACTTCTGCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAAGTACACACATTCCACAGCTGGTTCTTT
 CCGCCTCAGGACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGTAATG
 TATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCATTTCCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGCGCCTGTAGCGGCGCATTA
 AGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCTGCTTTCTTCC
 CTGCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTGCTT
 ACGGCACCTCGACCCCAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACAGTACAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTT
 TTGACGTTGGAGTCCAGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTTCACAACTGGAACAACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTT
 TTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACCGCAATTTT

Plasmid pCMV6-Sigma-1-E138Q-Myc-Flag (E138Q-Flag)

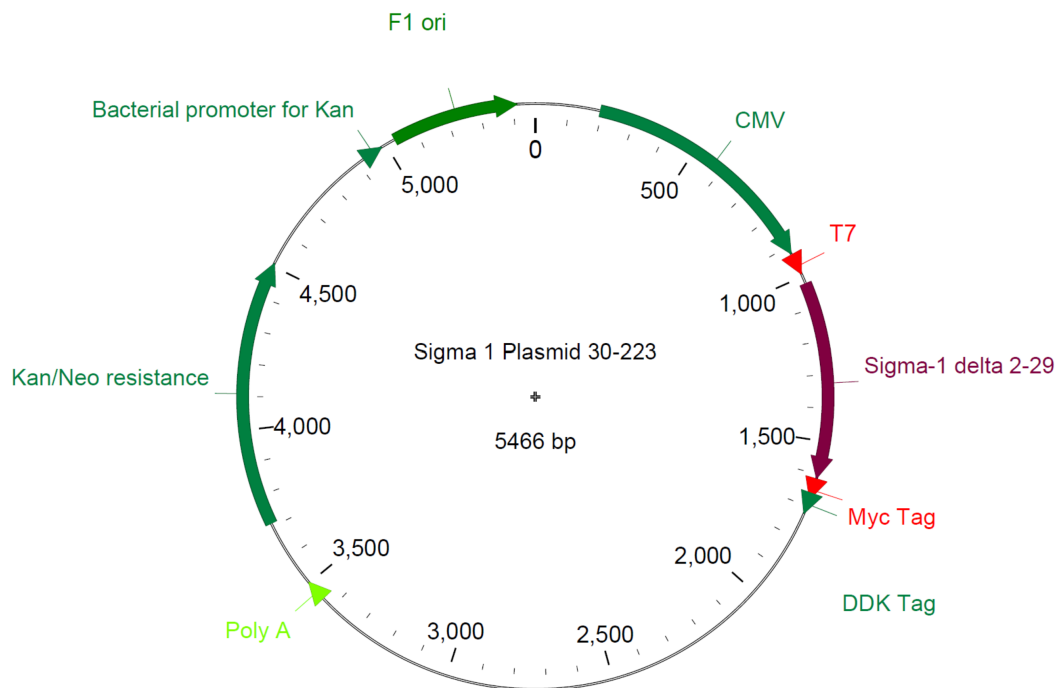


Sequenz:

AACAAAAATTAACGCTTACAATTTCCATTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTC
 GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAACGACG
 TTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAAGCTGATCTATACATTGAATCAATATTGGCAATTAGCCATATTAGTCAATTGGTTATATA
 GCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGGCATACGTTGTATCTATATCATATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAA
 TATGACGCCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATACGGGGCTATTAGTTTCATAGCCCATATAAT
 GGAGTTCCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCGCTTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAACGTTCAATATG
 ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
 CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA
 GTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATTGGTGATGCGGTTTTGG
 CAGTACACCAATAGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGCGGGATTTCACAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT
 TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCGCTTGAACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
 GTGGGAGGTTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAAGATTTGTAATACAGCTCACTATAGGGCGCGCGGGAAT
 TCGTCACTGGATCCGGTACCGAGGAGATCTGCCCGCGCATGCGCATGCAAGTGGGCCGTGGGCGCGGCTGGGCGTGGGCG
 CGCGCTGCTCCTGGCTGTGCGAGCGGTGCTGACCCAGGTCGTCTGGCTCTGGCTGGGTACGCGAGAGCTTCGTCTTCCAGCG
 CGAAGAGATAGCGCAGTTGGCGCGGACGATCGTGGGCTGGAGCACGAGCTGGCCTTCTCTCGTGTATCGTGAGCTGGG
 CGCGCTGACCCAGGCCAGTGTGCCCGACGAGGAGCTGCACTGGGTGTTCTGTAATGCGGTTGGCTGATGGGCGCCAT
 GTGCCCTTCTGACGCGCTCGCTGTCCGAGTATGTGCTGCTCTTCGGGACCGGCTTGGGCTCCCGCGGCCACTCGGGGCGCTAC
 TGGGCTGAGATCTCGGATACCATCATCTCTGGCACCTTCCACCGATGGAGACAGGGCACCAAAAGTGAAGGTCTTCTTACC
 CAGGGGAGACGGTAGTACACGGGCGTGGTGAGGCAACAGCTGTGGAGTGGGGGCCAAACACATGGATGGTGGAGTACGGCC
 GGGCGTCATCCATCCACCTTGGCCTTCCGCTGGCCGACACTGTCTTCAGCACCCAGGACTTCTCACCCTCTTCTATAC
 TCTTCTGCTCTATGCTCGGGGCTCCGGCTTGGCTGAGCTACCCACTACCTCTTTGGCCAGGACCCCTACCGGTACCGGCGCTC
 GAGCAGAAATCATCTCAGAAGAGGATCTGGCAGCAAAATGATATCTGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGTTTAAACG
 GCGGCGCGGCTCATAGCTGTTTCTGAAACAGATCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAAAAGTGAAGGTCTTCTTACC
 GAAGTTGCCACTCCAGTGGCCACGAGCCTTGTCTTAATAAATAAAGTTGATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATA
 ATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCTCGGGGCTCTATTGG
 GAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCTCTGGGTTCAACGATTCTCTGCTCAGC
 CTCGCCAGTTGTTGGGATTCCAGGACATGACAGGCTGACCTAATTTTGTGTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTACCCT
 ATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACTTGGCCCTCCCAAAATGCTGGGATTACAGGCGTGA
 ACCACTGCTCCTTCCCTGTCTTCTGATTTTAAATAAATACATACAGGAGGAGGAGGACGTCAGACAGCATAGGCTACCTG
 GCAATGCCCAACCGGTGGGACATTGAGTTGCTGCTTGGCACTGCTCTCATGCGTTGGGTCCCACTAGTATGCTGCTG
 TGAATTGGGTACGCGGCCAGCGGCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
 ACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCGGCTTTTCCATA

CCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGGCACTCCAGTGGCCACCAGCCTTGCTTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTTGT
 CTGACTAGGTGCTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTA
 GGGCTTGGGGGCTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCGACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCTCCTGGGTTT
 AAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTT
 GTAGAGACGGGGTTTCAACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCAATCTCAAGTGTATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAA
 TTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGCTCTTGAATTTAAATAACTATACCAGCAGGAGGACGCTCC
 AGACACAGCATAGGCTACCTGGCCATGCCAACCGGTGGGACATTGTAGTTGCTTGGCTTGGCTCTCATGCGTTGG
 GTCCACTCAGTAGATGCCTGTTGAATTGGGTACGCGGCCAGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
 TATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCG
 CGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
 GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGA
 TACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCTG
 TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTACGCGGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC
 CAACCGGTAAGACAGCACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCTGCTTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGCGGCTGC
 TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTT
 ACCTTCGGAAGAGATTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGC
 AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTCTTCTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTC
 ACGTTAAGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCTTTTAAATTAATAAGTATTAATAATCA
 ATCTAAAGTATATAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCTTGGCGCCCGACGTTGGCTGGGAGCCCTGGGCTTACCCG
 AACTTGGGGGGTGGGGTGGGGAAGGAAGAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAG
 TGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGGCTTTATGAACAAACGACCCAAACCCGTGGGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCGCTCA
 TAGCGCGGTTCTTCCGGTATTGTCTCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCGCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAG
 ATCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCGCGCTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTTCATAGAAGGCGGCGGTGGA
 ATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTGGGCGTGGCTGGTTCATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAA
 GAAGGCGATAGAAGCGGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCACAGGAGAGCGGTCAGCCCTTCCGCGC
 CAAGCTCTTACGAATATCACGGGTAGCCAAAGCTATGTCTGATAGCATCCGCCACACCCAGCCGCGCCAGTCGATGAA
 TCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCGCTCGGGC
 ATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTCTGTCAGATCATCTGATCGACAAGAC
 CGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCGAATGGGCGAGTAGCCGATCAAGCGTAT
 GCAGCGCGCGCATGTCATCAGCCATGATGGATCTTTCTCGGCAAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCA
 CTTCGCCCCAATAGCAGCGAGTCCCTTCCCGCTTCACTGACACAGTGCAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCGCGCTGCGGCG
 CCAGGATAGCCGCGCTGCGCTGCTTTCAGTTTCATTACGGGACCGGACAGGTGCGTCTTGACAAAAAAGAACCGGGCGCCCC
 TGCGCTGACAGCCGAACACGGCGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCC
 AAGCGGCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTCAATCATGCGCAACGATCCTCATCTCTCTTGTATCGATCTTTGC
 AAAAGCCTAGCCCTCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCGGAGCGGCTCGGCCTCTGCATAAAT
 AAAAAAATTAGTCAGCCATGGGCGGAGAAATGGGCGGAACCTGGGCGGAGTTAGGGCGGAGTTAGGGGCG
 GGAATATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTCGCTACTTCTGCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGT
 TGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTCGCTACTTCTGCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAATGACACACA
 TTCCACAGCTGGTTCTTTCCGCTCAGGACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
 CGGATACATATTTGAATGTATTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGACGCG
 CCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGCGGCTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCC
 GCTCCTTTCCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAG
 GGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAAATGATTAGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCTGCGCCTG
 ATAGACGGTTTTTCGCGCTTTGACGTTGGAGTCCAGCTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAAC
 CCTATCTCGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAA
 AATTTAACGCGAATTTT

Plasmid pCMV6-Sigma-1-d176-223-Myc-Flag (d2-29-Flag)

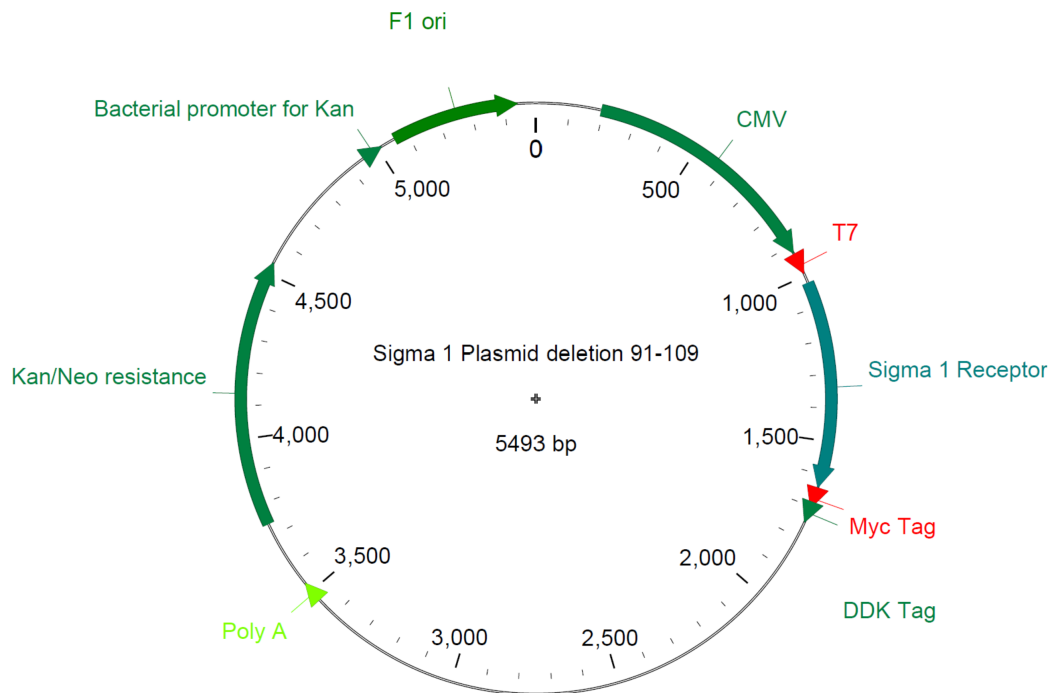


Sequenz:

AACAAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGGCTCTTC
 GCTATTACCGCAAGCTGGCGAAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG
 TTGTAACGACGCGCCAGTGCCAAAGCTGATCTATACATTGAATCAATATTGGCAATTAGCCATATTAGTCAATTGGTTATATA
 GCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGGCATACGTTGTATCTATATCATATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAA
 TATGACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
 GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGCTCAATAATG
 ACGTATTGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTTCCATTGACGTCATTAAGTTGGGTGGAGTATTACGGTAACTGCCCCATTGG
 CAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTCCGCCCTTATTGACGTCATTAAGCGGTAATGGCCCGCTGGCATTTATGCCCA
 GTACATGACCTTACGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG
 CAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATGACGTCATTTGGGAGTTTG
 TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTAC

GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAATTTTGTAAACGACTCACTATAGGGCGGCGGGAA
TTCGTCGACTGGATCCGGTACCGAGGAGATCTGCCGCGCGCATGCCCATGCTGGGTACCGCAGAGCTTCGTCCTCCAGCGCG
AAGAGATAGCGCAGTTGGCGCGGCAGTACGCTGGGCTGGACACAGAGCTGGCCTTCTCTGCTGATCGTGGAGCTGGCGC
GGCTGCACCCAGGCCACGTGCTGCCCGACGAGGAGCTGCAGTGGGTGCTTCGTGAATGCGGGTGGCTGGATGGGCGCCATGT
GCCTTCTGCACGCTCGCTGCTCCGAGTATGTGCTGCTCTTCGGCACCGCCTTGGGCTCCCGCGGCCACTCGGGGCGCTACTG
GGCTGAGATCTCGGATACCATCATCTCTGGCACCTTCCACCAAGTGGAGAGAGGGGCACCAACCAAAAGTGAGGTCTTCTACCCA
GGGAGACGGTAGTACACGGGCTGGTGAAGCAACAGCTGTGGAGTGGGGGCCAAACACATGGTGGAGTACGGCGC
GGGCGTCATCCCATCCACCCTGGCCTTCGCGCTGGCGACACTGTCTTCAGCACCCAGGACTTCCTCACCCCTCTTCTATACT
CTTCGCTCCTATGCTCGGGGCTCCGGCTTGAGCTCACCACTACCTCTTTGGCCAGGACCTACGCGTACGGCGGCGCTCG
AGCAGAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGCAGCAATGATATCCTGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGTTTAAACGG
CCGGCGCGGTCATAGCTGTTTCTGAAACAGATCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAAGTGCCTCTCTGGCCCTGG
AAGTTGCCACTCCAGTGCCCAACAGCCTTGTCTTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCTTCTATAA
TATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCTCGGGGCTCTATTGGG
AACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCTCTGGGTTCAAGCGATTCTCTGCTCAGCC
TCCCGAGTTGTTGGGATTCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATATTTTGTGTTTGGTATAGAGACGGGGTTTACCAT
TTGGCCAGGCTGTCTCCAACCTCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAATTTGCTGGGATTACAGGCGTGAA
CCACTGCTCCCTTCCCTGCTCTGATTTTAAATAACTATACCAAGGAGGACGTCAGACACAGCATAGGCTACCTGG
CCATGCCCCAACGGTGGGACATTTGAGTTGCTTGTCTGGCACTGTCTCTCATGCGTTGGGTCCACTCAGTAGATGCCTGTT
GAATTGGGTACGCGGCCAGCGCGGATATCAGTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAA
CGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTCTGGCGTTTTCCTATAG
GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAG
GGCTTCCCGCTGGAAGCTCCCTGCTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGCGCCTTCTCCCTT
CGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTG
TGCACGAACCCCGGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAATCCAAACCCGGTAAGACACGACT
ATCGCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCAGGATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG
GCTTAACCTACGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAACAAAGAGTTGGT
AGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG
GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACCTCAAGTTAAGGGATTGTTGGTCA
GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTTTAAATCAATGATATATAGTAA
CCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCTTCAACCCGAACCTGGGGGGTGGGGTGGG
GAAAAGGAAGAAACGCGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACC
CGCGTTTTATGAACAAACGACCAACACCGTGCCTTTTATCTGTCTTTTATTGCCGTATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTA
TTGTCTCCTTCGTGTTTTCAGTTAGCCTCCCCCTAGGTTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCAT
CCAGCCGCGCTCCCGGAAAACGATTCGGAAGCCCAACCTTTTATAGAAGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAG
GTTGGGCGTTCGCTTGGTTCGCTCATTTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGCATAGAAGGCGATG
CGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCAGAGGAAGCGGTACGCCATTTCGCCGCAAGCTCTTCAGCAATATCA
CGGGTAGCCAAACGCTATGTCTGATAGCGATCCGCCACACCCAGCCGCGCCAGTTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTT
CCACCATGATATTTCGCAAGCAGGCATCGCATGGGTACGACAGGATCCTCGCCGTCGGGATGCTCGCCTTGAGCCTGGC
GAACAGTTTCGGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGT
GCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCGCATTGTCATCA
GCCATGATGATACTTTCTCGGAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGCGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAG
TCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGCTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCT
CGTCTTGCAGTTCATTTCAGGGCACCGGACAGGTGCGTCTTGACAAAAAAGAACCCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACA
CGCGGCGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTATAGCCCAATAGCCTCTCCACCAAGCGCGCGGAGAACCTCGC
GTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCTGCTCTTGTATCGATCTTTTGCAAGCCCTAGGCCTCCAA
AAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCTCGGCCCTGTCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCA
TGGGGCGGAGAAATGGGCGGAACCTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTA
ATTGAGATGCATGCTTTTGCATACTTCTGCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTTGTGCTGACTAATTGAGATGC
ATGCTTTGCATACTTCTGCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTTAAGTACACACATTCACAGCTGGTTCTTTT
CGCCTCAGGACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGACGGGATACATATTGAATGT
ATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTA
GCGCGGCGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTACCGCTACACTTGCACGCGCCCTAGCGCCGCTCTTTCGCTTTCTTCCC
TTCCCTTTCGCGCACTTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTA
CGGCACCTCGACCCCAAAAAAATTTGATTAGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCGCTT
TGACGTTGGAGTCCAGTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCACAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTT
TGATTTATAAGGATTTTGGCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTT

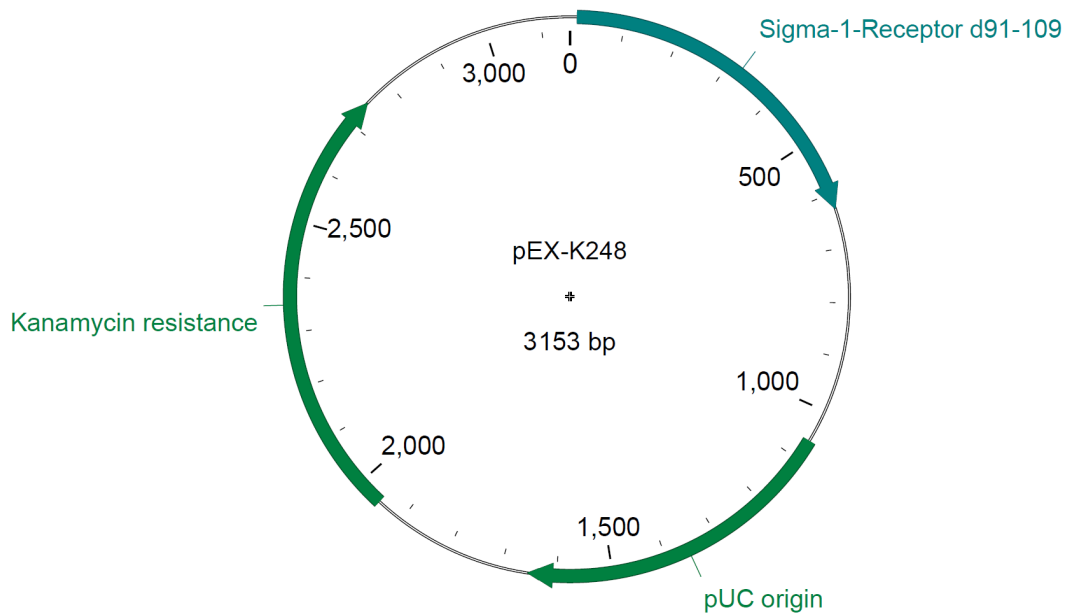
Plasmid pCMV6-Sigma-1-d91-109-Myc-Flag (d91-109-Flag)



Sequenz:

AACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTCGGGGCCTCTTC
GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG
TTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAAGCTGATCTATACATTGAATCAATATTGGCAATTAGCCATATTAGTCATTGGTTATATA
GCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAA
TATGACCGCCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCCATTGACGTCAATAATG
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTTATGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCAATTATGCCCA
GTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGGCGTTTTGG
CAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTTGT
TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAAACCGTCAGAAATTTGTAATACGACTCACTATAGGGCGGGCGGGAAT
TCGTGCACTGGATCCGGTACCGAGGAGATCTGCCGCCGCGATCGCCATGCAGTGGGCCGTGGGCGGCGGTGGGCGTGGGC
CGCGTGTCTGCTGGCTGTGCGCAGCGGTGCTGACCCAGGTGCTGCTGGCTGCTGGCTGGGTACGCGAGAGCTTCGTCTCCAGCG
CGAAGAGATAGCGCAGTTGGCGCGGCGAGTACGCTGGGCTGGACCACGAGCTGGCCTTCTCTGCTGTGATCGTGGAGCTGCG
CGCGTGCACCCAGGACGTTGCTGCCGACGAGCTGCTGAGTGGTTCGTGTAATGCGGTGGCTGGATGGCGCTTGGG
CTCCCGCGGCCACTCGGGGCGCTACTGGGCTGAGATCTCGGATACCATCATCTCTGGCACCTTCCACCATGGAGAGAGGGG
CACCACAAAAGTGAGGTCTTCTACCCAGGGGAGACGGTAGTACACGGGCGTGGTGAGGCAACAGCTGTGGAGTGGGGGCC
AAACACATGGATGGTGGAGTACGGCGGGGCGTCAATCCCATCCACCTGGCCTTCGCGCTACGCGACACTGTCTTCAGCACC
CAGGACTTCTCTACCTCTCTTCTATACTCTTCCGTCTCTATGCTCGGGGCGCTCCGGCTTGGAGCTCACCACCTACCTCTTTGGCC
AGGACCTACGCGTACGCGGCGCTCGAGCAGAACTCTCAGAAAGAGGATCTGGCAGCAAAATGACCATCTGGATGATACA
AGGATGACGACGATAAGGTTTAAACGCCCGGCGCGGTCTATAGCTGTTTCTCTGAACAGATCCCCGGGTGGCATCCCTGTGAC
CCCTCCCCAGTGCTCTCTCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCAACCGCTTGTCTCTAATAAAATTAAGTTGCATCA
TTTTGCTGTAGGTGTCTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAA
CCTGTAGGGCCTCGGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAAGTGCAGTGGGCAACATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCTCTCT
GGGTTCAAGCGATTCTCTCGCTCAGCCTCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGATGCATGACAGGCTAGGCTAATTTTTGTT
TTTTGGTATGACGGGGGTTTTACCATATTGGCCAGGTGGTCTGCCAATCTTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCT
CCCAAAATGGTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTCCCTGCTCTGATTTTTAAATTAACATACAGCAGGAGG
ACGTCCAGACACAGCATAGGCTACCTGGCCATGCCCAACCGGTGGGACATTTGAGTTGCTTGGCTGGCACTGTCTCTCATG
CGTTGGGTCCACTCAGTAGATGCGTGTGAATTTGGGTACCGCGGCCAGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCAGCAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGACGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAACCGTAAAA
AGGCGCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTCGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCCAGAGGTGGCG
AAACCCGACAGGAATAAAGATACCCAGCGTTTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTCGCGCTTCTCCGACCTGCGCTT
ACCGGATACCTTCCGCTTCTCTCCCTTCCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGT
AGTTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTATCCGGTAACCTATCGTCT
TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCGGCACTGGTAACAGGATTAGCAGCGGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA
GCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCAGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTTG
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA
GAAAATCAGTCAAGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTT
TTAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCGGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCC
TTCACCCGAACCTTGGGGGGTGGGGTGGGGAAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATC
GACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAAACCCCGGTTTATGAACAAAACGACCCAAACACCGTGCGTTTATTCTGTCTTTTTATT
GCCGTATAGCGCGGGTTCCCTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTTAGTTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCA
GCATGAGATCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCGCGCTCCCGGAAAAACGATTCCGAAAGCCCCAACCTTTCATAGAAGGCGG
CGGTGGAATCGAAATCTCGTGTATGGCAGGTGGGCGTGGCTTGGTGGTCAATTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAA
CTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCAGAGGAAGCGGTACAGCCA
TTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGTATAGCGATCCGCCACACCCAGCGGCCACAG
TCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACAGACGAGATCCTCGC
CGTCGGGCATGTCTCGCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCCGGTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATC
GACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTTGCTTGGTGGTTCGAATGGGCAAGGTAGCCGGATC
AAGCGTATGCAGCGCGCGCATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTG
CCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTC
GTGGCCAGCCAGGATAGCCGCGCTGCCTGCTTTGACGTTTCACTTACGGGACCCGACAGGTCCGCTTGGACAAAAAGAAC
GGCGCGCTGCGCTGACAGCCGGAAACAGCGCGGATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCAATAGCCGAATAGC
CTCTCCACCCAAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCCTCATCTCTGCTCTTGT
CGATCTTTGCAAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGCGGCCCTCGGCCT
CTGCATAAATAAAAAAATTAGTACGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGA
GTTAGGGGCGGGAATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTT
CCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTA
ACTGACACACATTCACAGCTGGTTCTTTCCGCGCTCAGGACTCTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTAT
TGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC
CACCTGACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCG
CCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGG
CTCCCTTTAGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAACTTGATTAGGGTGTAGGTTACAGTGTAGTGGG
CCATCGCCCTATAGACGTTTTCGCGCTTGGAGTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCACAACTGGAA
CAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGAATTTAAGGGATTTTGGCGATTTCGCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCT
GATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTT

Plasmid pEX-K248-Sigma-1-d91-109



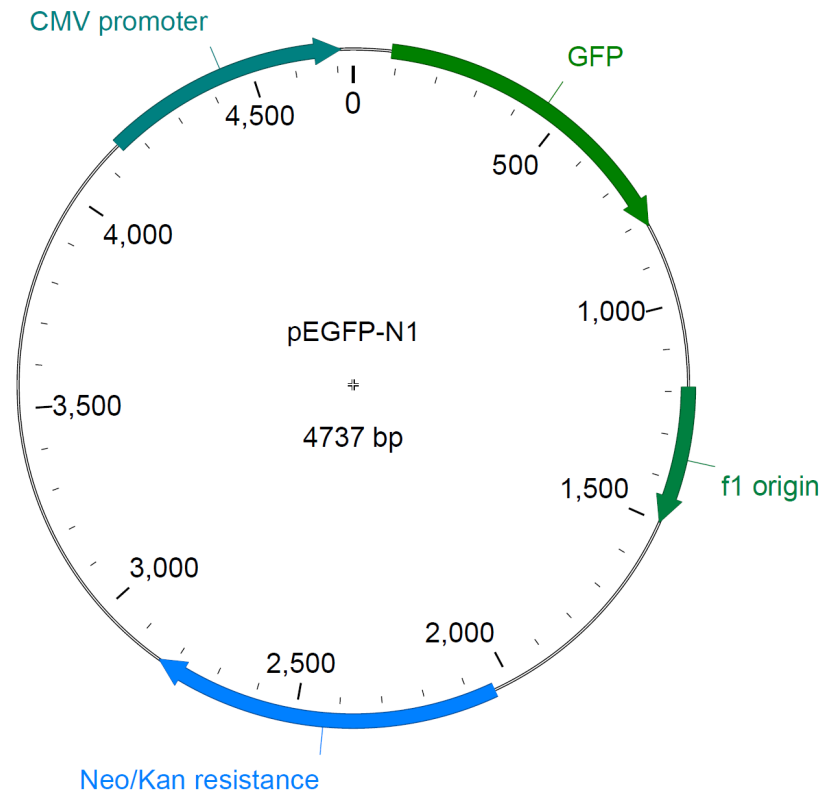
Sequenz:

```

TAACTAATGTGGATCCATGCAGTGGGCGCTGGGCGCGGCTGGGCGCTGGGCGCGCTGCTCCTGGCTGTGCGAGCGGTGCT
GACCCAGGTCGTCTGGCTCTGGCTGGGTACGCAGAGCTTCTGCTCTCCAGCGCGAAGAGATAGCGCAGTTGGCGCGGCAGTA
CGCTGGGCTGGACACGAGCTGGCCTTCTCTGCTGTGATCGTGGAGCTGCGGCGCGCTGCACCCAGGCCACGTGCTGCCCGA
CGAGGAGCTGCAGTGGGTGTTCTGTGAATGCGGGTGGCTGGATGGCCTTGGGCTCCCGCGGCCACTCGGGGCGCTACTGGGC
TGAGATCTCGGATACCATCTCTTGGCACCTTCCACCACTGGAGAGAGGGACACCACAAAAGTGAGGTCTTCTACCCAGGG
GAGACGGTAGTACACGGGCTGGTGAGGCAACAGCTGTGGAGTGGGGGCCAAACACATGGATGGTGGAGTACGGCCGGGG
CGTCATCCCATCCACCTTGGCCTTCGCGCTGGCCGACACTGTCTTCCAGCACCCAGGACTTCCCTACCCCTCTTCTATACTCTT
GCTCCTATGCTCGGGGCTCCGCTTGGAGCTACCACTACCTCTTTGGCCAGGACCTGCGGCGGCTAACTAATGTGTGGG
CGATCGCTCTAGAGCTAGCGAATTCTTTCTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAAACATACGAGCGCGGAAGCATAA
AGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCCGGGAAA
CCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGAGAGGCGGTTTGGGTATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCTC
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGCTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAATAAGGCCGCGTGTGCTG
GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
TATAAAGATACAGGCGTTTTCCCTTGGAAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCGACCCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTC
CGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCC
AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAAGTCCAAACCGG
TAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGT
TCTTGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG
AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCAGCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTAC
GCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAA
GGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAA
GTATATATAGTAAAAATATTCCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGG
ATGGCTTTCTTGGCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATG
ATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCGCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACA
ATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTGTTCCGGCTGTACGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTG
CCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGACGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGGCGAGCTGTGCTCGACG
TTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGCGAGGATCTCCTGTCAATCCCACTTGTCTCCTG
CCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCAACG
GAAACATCGCATCGAGCGAGCAGCTACTCGGATGGAAGCCGCTTGTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG
GCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACCATATGGCGATGC
CTGCTTGGCGCAATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCACTGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA
TCAGGACATAGCGTTGGCTACCGGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGG
TATCGCCGCTCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGAACGAGTTCTTCTGAACCGGTAATATTATTGAAGCA
TTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATT
TCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCC
TTTCTGCTCTCGCGCTTTCCGTGATGACGGTGAACACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
CGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCTGGCTTAACATATGCGGCAT
CAGAGCAGATTGTACTGAGAGTTTCCCAATTGGTTCGACCTCGAGTTAATTAACGTA

```

Plasmid pEGFP-N1



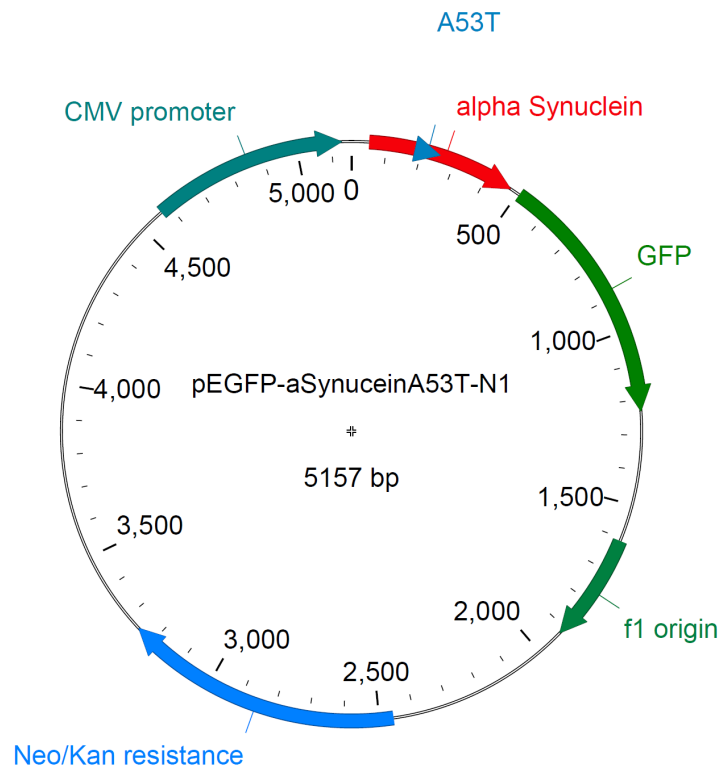
Sequenz:

```

GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCTGCAATTTCTGCAGTCGACTCGAGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACC
GGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGTGGTGCCCATCCTGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAA
CGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
CGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCCTTCAGCCCGCTACCCCGACCAC
ATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCCTCTTCTTCAAGGACGACGGCA
ACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG
AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGA
ACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACAGCAGACAACAC
CCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAG
AAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGC
GGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCAATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTTAAAAAACCCTCCACACCTCCCCCT
GAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGC
ATCAAAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTGCCAACTCATCAATGTATCTTAAGGCG
TAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAA
TCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATT
AAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCATACGTGAACCATCACCCCTAATCA
AGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCGCATTTAGAGCTTGACGGGGAAAG
CCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCT
GCGCGTAACCAACACACCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
AACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGTCTCAATAAT
ATTGAAAAAGGAAGATGCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGTGGAATGTGTGCTAGTTAGGCTGTGGAAGTCCCCAGGCTC
CCAGCAGGCGAGAAGTATGCAAAAGCATGCTCTCAATTAGTCAGCAACCCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC
AGAAGTATGCAAAAGCATGCTCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGC
CCAGTTCGGCCCTTCTCCGCCCTTGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAAGAGCCGAGGCCCGCTCTGAGCT
ATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTTGCAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTC
GCATGATTGAACAAGATGGATTGACGCGAGGTTCTCCGGCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAAC
AGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTGTTCCGGCTGTACGCGCAGGGGCGCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTC
CGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCGAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTTGCGCAGCTGTGCT
CGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTATCTCACTTGC
TCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCAC
CAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATCGGATGGAAGCGGCTCTTGTGCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCAT
CAGGGGCTCGCGCGACCGCACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGGCAGGATCTCGTCTGACCCATGGC
GATGGCTGTCTGCCGAATATCATGGTGGAAAAATGGCGCTTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGAC
CGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTT
TACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGCGGAGCTCTGGGGTT
CGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTC
GGAATCGTTTTCCGGGACGCGCGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAAGTCTTTCGCCACCCCTAGGGG
AGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAGACAGAATAAAACGCAC
GGTGTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCCGTTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTG
GGCAATACGCGCGCTTTCTCTCTTTTCCCCACCCACCCCACTTCCGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCCAACGCTCG
GGCGGACAGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTCAGTTTTTAATTTAAAGGAT
CTAGGTGAAGATCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
GAAAAGATCAAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTCGCGGTAATCTGTGCTTGCATAAAGGACCAACCGCTACCG
CGGTGGTTTGTGTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCGGAAGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATAT
TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGT
TTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGAAGTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAG
CGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAATGAGATACCTACAGCGT
GAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAAGGACCAAGGCGACAGGTATCCGGTAAAGCGGCAAGGTTCGGAACAGGAG
CGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTGTGAGCGTCGA
TTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAATAACGCCAGCAACGCGCGCTTTTACGGTTCTGCTGGCCTTTTGT
GGCTTTTGTCTACATGTTCTTCTGCTGCTATCCCTGATTTCTGTGATAACCGTATTACCGCATGCAATGATTTAAT
AGTAATCAATACCGGGTCAATAGTTTATAGCCATATATGAGGTTCCGCTTACATAACTTACGGTAATGAGCCCGCTGG
CTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGA
CGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG
    
```


GCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACC
 TCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTT
 ACCGGATAAAGGCGCAGCGGTGCGGGTGAACCGGGGGTTCGTGACACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
 GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
 GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGGAAACGCGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTCGCCACCT
 CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
 GTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACGGCC
 ATGCATTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTACATAACTTACG
 GTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
 TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
 AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCT
 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
 GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTT
 TCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
 TGGTTTAGTGAACCGTCAGATCC

Plasmid pEGFP-aSynA53T-N1



Sequenz:

GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCTGAATTTCTGCAGTCGACTCATGGATGTATTTCATGAAAGGACTTTTC
 AAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAAACCAAAAGGGGTGTGGCAGAAAGCAGCAAGGAGGAGG
 TGTCTCTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAGAGCAAGT
 GACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGGATGACCCAGAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAG
 CAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACCAAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAATTTCTGGAAGATATGC
 CTGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCGAGGTACCGC
 GGGCCCGGATCCACCGGTGCGCAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC
 TGGACGGCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA
 AGTTCATCTGCACCAACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGACCCACCTCGTGACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAG
 CCGCTACCCCGACCACTGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCGCGCATGCCGAAGGCTACCTCCAGGAGCGCACTTCTTC
 TTCAAGGACGACGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTTCCAGGGCGACACCTGGTGAACCGGATCGAGCTGAAG
 GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACGCCACAACGCTCTATATCATG
 GCGGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCCTGA
 GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACG
 AGCTGTACAAGTAAAGCGGCGCGACTCTAGATCATATAATGAGCATACCACTTTGTAGAGGTTTACTTGTCTTAAAAAAC
 CTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTT
 ACAATAAAGCAATAGCATACAAAATTTCAAAAATAAAGCAATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCAT
 CAATGTATCTTAAGCGTAAATTTGTAAGCGTTAATATTTTGTGTAATAATTCGCGTTAAATTTTGTGTAATCAAGCTCATTTT
 TAACCAATAGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGTTTGTAGTTGTTTCCAGTTTGG
 AACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCACAGCTCAAAGGGCGAAAAAACCGTCTATCAGCAACCCATGCCCCACTACGT
 GAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCGGTAAAGCACTAAATCGGAACCCATAAAGGGAGCCCCGATTTA
 GAGCTTGACGGGAAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGGCAAGGAGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCA
 AGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCAACACCCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCAAGTGGCACTTTTC
 GGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAAATATGTATCCGCTCATGAGCAATAACCCCTG
 ATAAATGCTTCAATATTGAAAAAGGAAGAGTCTGAGCGCGAAAGAACACAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGT
 GGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGAGAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCGGCTGTGGAAAGTCC
 CAGGCTCCCCAGCAGGAGAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCA
 TCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATTCAGAGGCCGAGGCG
 CGCTCGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTTCAGAAAGTTCATCAAGAGA
 CAGGATGAGGATCGTTTTCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGCGCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCG
 GCTATGACTGGGCAACAGACAAATCGGCTGCTCTGATGCGCGCGTGTTCGGCTGTGACGCGAGGGGCGCCCGGTTCTTT
 TTGTCGAAGACCGACCTGTCCGTGCCCTGAATGAACATGCAAGACGAGGAGCGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGCGGCG
 TTCCTTGGCGAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGAGTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCGCGGCGAGGATC
 TCCTGTCACTCACTTGTCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATGCATGGCTGATGCAATGCGCGCGCTGATACAGCGTTGATCCGCGC
 TACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGAT
 GATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGAT

CTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCC
GGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGGAATGGGCTG
ACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG
ACGCGGACTCTGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCT
ATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCGGGACGCGGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCT
TCGCCCCACCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCGCGCTATGACGGCAATAAAAA
GACAGAATAAAACGCACGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTTCGATACCC
CACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCCGCTTTCTTCTTTTCCCCACCCACCCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGG
GCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCAT
TTTTAATTTAAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACT
GAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA
AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGA
GCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACCGCTACATACC
TCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTTACCGGCTTGGACTCAAGACGATAGTT
ACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGACACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCT
CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCTTGGCCTTTTGTGTCGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCC
ATGCATTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAECTTACG
GTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGAAGTACGCGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTT
TCCAAAATGTCGTAAACAATCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
TGGTTTGTAGTAACCGTCAGATCC

