Marie Theresa Wannowius

MOLEKULARE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES CALCIUMREGULATORS SLC10A7



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen Printed in Germany





STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890 email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

MOLEKULARE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES CALCIUMREGULATORS SLC10A7

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MARIE THERESA WANNOWIUS

Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2022

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Joachim Geyer |
|---------------|-------------------------|
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Martin Diener |

Tag der Disputation:04. August 2022

| Prüfungskommission: | Prof. Dr. Joachim Geyer |
|---------------------|-------------------------------|
| | Prof. Dr. Martin Diener |
| | Prof. Dr. Christine Wrenzycki |

Meinen Eltern

I. ERKLÄRUNG ZUR SELBSTSTÄNDIGEN ANFERTIGUNG DER DISSERTATIONSSCHRIFT

Ich erkläre hiermit die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

"Molekulare und funktionelle Charakterisierung des Calciumregulators SLC10A7"

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Marie Theresa Wannowius

"Die Welt ist das, wofür wir sie halten."

Thorsten Havener

(Mentalkünstler, *1972)



Homer Simpson



Giraffe mit Mutation (V235F)



Der Schrei

"Ja Kalzium, das ist alles."

Otto Loewi, 1959

(Nobelpreisträger für Medizin, * 1873 - † 1961)

INHALTSVERZEICHNIS

| I. | Erklärun | g zur selbstständigen Anfertigung der DissertationsschriftIV |
|-----|----------|---|
| 11. | Abbildu | ngsverzeichnis IX |
| . | Tabeller | iverzeichnisX |
| IV. | Abkürzu | ngsverzeichnisXI |
| V. | Referen | znummernXIV |
| VI. | Kurzeinl | eitung in das ThemaXV |
| 1 | Literatu | rübersicht 1 |
| 1 | l.1 Tra | nsportproteine |
| 1 | L.2 Die | Solute Carrier Superfamilie 1 |
| | 1.2.1 | Einteilung und Nomenklatur 1 |
| | 1.2.2 | Funktion und Substrate 2 |
| | 1.2.3 | Lokalisation und Struktur |
| | 1.2.4 | Regulation 4 |
| 1 | L.3 Die | SLC10 Familie |
| 1 | l.4 SLC | C10A7 |
| | 1.4.1 | Geschichte: von C4orf13 zu SLC10A7 6 |
| | 1.4.2 | Krankheitsbild bei SLC10A7-Defizienz |
| | 1.4.2. | 1 Skelettale Dysplasie |
| | 1.4.2. | 2 Amelogenesis imperfecta |
| | 1.4.2. | 3 Humane SLC10A7-defiziente Patienten 10 |
| | 1.4.3 | Informationen aus Datenbanken 13 |
| | 1.4.3. | 1 Phylogenie |
| | 1.4.3. | 2 Genomische Organisation 15 |
| | 1.4.3. | 3 Proteinstruktur |
| | 1.4.3. | 4 Gewebeexpression |
| | 1.4.3. | 5 Zelluläre Lokalisation 20 |
| | 1.4.4 | Ungeklärte Funktion |
| 1 | 5 Zel | luläre Calciumregulation |
| | 1.5.1 | Bedeutung von Calcium für die Zelle |
| | 1.5.2 | On- und Off-Reaktion |
| | 1.5.2. | 1 Calciumfreisetzung durch die PLC-IP ₃ Signaltransduktionskaskade |
| | 1.5.2. | 2 Calciumeintritt über speichergesteuerte Kanäle 28 |
| | 1.5 | .2.2.1 SOCE durch STIM und ORAI |
| | 1.5.2. | 3 Senkung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration durch SERCA 29 |
| 1 | .6 Glv | kosvlierung |

| | 1.6. | 1 | N-Glykosylierung | 33 |
|---|--------|------------------|---|----|
| | 1.6. | 2 | Angeborene Glykosylierungsstörungen | 38 |
| 2 | Pub | likatio | onen und Eigenanteil | 41 |
| | 2.1 | Publ | likation #1 | 41 |
| | 2.1. | 1 | Darstellung des Eigenanteils | 42 |
| | 2.1. | 2 | Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben durch die Coautoren | 42 |
| | 2.2 | Publ | likation #2 | 43 |
| | 2.2. | 1 | Darstellung des Eigenanteils | 44 |
| | 2.2. | 2 | Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben durch die Coautoren | 44 |
| 3 | Disk | ussio | n | 45 |
| | 3.1 | Ziels | etzung | 45 |
| | 3.2 | Met | hodik | 47 |
| | 3.2. | 1 | Existierende Modelle | 47 |
| | 3 | .2.1.1 | Hefemodelle | 47 |
| | 3 | .2.1.2 | Tiermodelle | 48 |
| | | 3.2.2 | 1.2.1 Zebrabärbling (D. rerio) | 48 |
| | | 3.2.2 | 1.2.2 Mausmodell | 49 |
| | 3.2. | 2 | Zellkulturmodell | 52 |
| | 3 | .2.2.1 | SLC10A7-Knockout-Zelllinie: Hap1-KOP7 | 54 |
| | 3 | .2.2.2 | SLC10A7-überexprimierende Zelllinie: HekP7+Tet. | 55 |
| | 3.2. | 3 | Auf das Zellmodell angewandte Methoden | 57 |
| | 3 | .2.3.1 | Western Blot | 57 |
| | 3 | .2.3.2 | Immunfluoreszenz | 60 |
| | 3 | .2.3.3 | Transiente Transfektion | 60 |
| | 3 | .2.3.4 | Proteintags | 60 |
| | 3 | .2.3.5 | Colokalisationsstudien | 64 |
| | 3 | .2.3.6 | Fluo-4 AM | 66 |
| | 3.3 | Die l | Rolle von SLC10A7 im Calciumstoffwechsel | 70 |
| | 3.3. | 1 | Effekte von SLC10A7 auf die Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom | 70 |
| | 3 | .3.1.1 | Durch Ionomycin ausgelöste Effekte | 70 |
| | 3 | .3.1.2 | Durch Thapsigargin ausgelöste Effekte | 71 |
| | 3 | .3.1.3 | Durch ATP + Carbachol ausgelöste Effekte | 73 |
| | 3 | .3.1.4 | Durch BTP-2 ausgelöste Effekte | 73 |
| | 3 S | .3.1.5 LC10/ | Aufhebung der durch SLC10A7-Defizienz ausgelösten Effekte via transienter A7-Überexpression in Hap1-KOP7 Zellen. | 74 |
| | 3 C | .3.1.6 alciur | Negative Korrelation zwischen SLC10A7-Expression und zellulärer nkonzentration | 74 |

| | | 3.3.1.7 | Colokalisation mit ORAI/ STIM/ SERCA | |
|---|-----|---------|--|-----|
| | | 3.3.1.8 | Zusammenfassung der Effekte | |
| | | 3.3.1.9 | Hypothesen zur Regulation des SOCE durch SLC10A7 | 75 |
| | 3 | .3.2 | Patientenmutationen im SLC10A7-Gen | |
| | | 3.3.2.2 | SIFT | 83 |
| | | 3.3.2.2 | PolyPhen | 85 |
| | | 3.3.2.3 | SLC10A7-Mutanten im Zellkulturmodell | 85 |
| | 3.4 | Der | Einfluss von SLC10A7 auf die N-Glykosylierung | 89 |
| | 3 | .4.1 | Effekte auf die Glykosylierung bei SLC10A7-Defizienz | 89 |
| | 3 | .4.2 | Hypothesen zu den Ursachen der veränderten Glykosylierung | |
| | | 3.4.2.2 | Erhöhung der mannosereichen Strukturen | |
| | | 3.4.2.2 | Erhöhung an Glykanen, denen GlcNAc fehlt | |
| | | 3.4.2.3 | Verminderte Sialylierung der Glykanstrukturen | |
| | 3.5 | Ver | nüpfung des Calciumstoffwechselwegs mit der N-Glykosylierung | |
| | 3 | .5.1 | Gemeinsame Phänotypen bei unterschiedlichem Genotyp | |
| | 3 | .5.2 | Vergleich mit TMEM165 | |
| | 3 | .5.3 | Bedeutung und Interpretation der Veränderungen für SLC10A7 | |
| | 3.6 | Zus | itzliche Experimente in Bezug auf die N-Glykosylierung | |
| | 3 | .6.1 | RT-PCR | |
| | 3 | .6.2 | Quantitative PCR (qPCR) | |
| | 3 | .6.3 | Western Blot | 101 |
| 4 | A | usblick | | 105 |
| 5 | Z | usamm | enfassung | 108 |
| | 5.1 | Deu | tsch | |
| | 5.2 | Eng | lisch | |
| 6 | R | eferenz | liste | |
| | 6.1 | Fac | nzeitschriften und Fachbücher | 110 |
| | 6.2 | We | oseiten | 120 |
| 7 | D | anksag | Ing | 121 |
| 8 | A | nhang. | | |

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| Abbildung 1 [*] | Schematische Übersicht über Transportproteine in der Plasmamembran | 2 |
|---------------------------|--|------------|
| Abbildung 2 | Verwandtschaftsdiagramm der SLC10-Carrier SLC10A1-SLC10A7 | 5 |
| Abbildung 3 ⁺ | Zeitlicher Fortschritt der SLC10A7-Forschung | 8 |
| Abbildung 4 [‡] | Schematische Übersicht zu SLC10A7-Transkription und -Translation | 16 |
| Abbildung 5 [§] | Übersicht zum Calciumsignaling | 24 |
| Abbildung 6 [*] | N-Glykosylierung | 33, 35, 36 |
| Abbildung 7** | Phänotypisches Bild bei SLC10A7-Defizienz | 50 |
| Abbildung 8 | SLC10A7-mRNA Level verschiedener Zelllinien | 53 |
| Abbildung 9 | Exemplarischer SLC10A7-Proteinnachweis im Western Blot | 58 |
| Abbildung 10 | Sortingverhalten getaggter STIM-, ORAI- und SLC10A7-Proteine | 63 |
| Abbildung 11* | Schematische Übersicht zu Fluo-4 und Fluo-4 AM | 68, 69 |
| Abbildung 12 | Colokalisation von ORAI-GFP mit STIM- bzw. SLC10A7-mScarlet | 78 |
| Abbildung 13 [*] | Schematische Übersicht zu den untersuchten SLC10A7-Mutationen | 80 |
| Abbildung 14 | Multispeziesalignment der SLC10A7-Proteinsequenzen | 84 |
| Abbildung 15 | Colokalisation von STIM-GFP mit SLC10A7-mScarlet (Mutanten/ WT) | 88 |
| Abbildung 16 | Zusammenhang verschiedener Genotypen und Phänotypen | 94 |
| Abbildung 17 | Semiquantitative PCR der Glykosylierungsenzyme | 100 |
| Abbildung 18 | Western Blot glykosylierter Proteine aus verschiedenen Zelllysaten | 103, 104 |

^{*} Created with BioRender.com

[†] Adapted from "Timeline (7 Segments, Horizontal) 2", by BioRender.com (2021). Retrieved from "https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5faadf428a991000a8ce0732-timeline-7-segments-horizontal-2".

[‡] Adapted from "mRNA Splicing Types", by BioRender.com (2021). Retrieved from "https://app.biorender.com/biorender-templates/t-6196bfa863e22700a765f6cc-mrna-splicing-types".

⁵ Adapted from "Activation of Protein Kinase C (PKC)" by BioRender.com (2021). Retrieved from "https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5c8c7ba9d4f2ef3300632942/t-5fac3e4834fa7b00a383dcd7activation-of-protein-kinase-c-pkc".

Adapted from "Circulatory System with Callouts (Layout)", by BioRender.com (2021). Retrieved from "https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5c65c5eebce1963300935370/t-6174300ecfd32300ad13cedccirculatory-system-with-callouts-layout".

III. TABELLENVERZEICHNIS

| Tabelle 1 | Phänotypisches Erscheinungsbild SLC10A7-defizienter Patienten | 12 |
|------------|--|-----|
| Tabelle 2 | SLC10A7/Slc10a7-Proteinsequenzidentitäten verschiedener Spezies | 14 |
| Tabelle 3 | Übersicht zu bekannten SLC10A7-Transkriptvarianten | 17 |
| Tabelle 4 | Gewebeexpression von SLC10A7 | 20 |
| Tabelle 5 | Übersicht zur subzellulären Lokalisation unterschiedlich getaggter SLC10A7- | 22 |
| | Proteine | |
| Tabelle 6 | Physiologisches und pathologisches Erscheinungsbild von D.rerio nach slc10a7 | 49 |
| | morpholino Knockdown | |
| Tabelle 7 | Pathologisches Erscheinungsbild der Slc10a7 ^{-/-} -Mäuse | 51 |
| Tabelle 8 | Getestete kommerzielle SLC10A7-Primärantikörper im Western Blot | 59 |
| Tabelle 9 | Verwendete Fluoreszenztags und ihre Eigenschaften | 62 |
| Tabelle 10 | Übersicht zu den beschriebenen Patientenmutationen und ihre Auswirkung auf | 82 |
| | das SLC10A7-Protein | |
| Tabelle 11 | Enzyme, die Calcium als Cofaktor nutzen und während der Glykosylierung eine | 97 |
| | Rolle spielen | |
| Tabelle 12 | Semiquantitative PCR spezifisch ausgewählter Gene | 100 |

IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| Abkürzung | Bedeutung |
|-------------|--|
| 2D | zweidimensional |
| 3D | dreidimensional |
| ACR3 | Arsenical resistance carrier |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AI | Amelogenesis imperfecta |
| AM | Acetoxymethylester |
| AS | Aminosäure |
| ASBT | Apical sodium-dependent bile acid transporter |
| ASN | Asparagin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B4GALT1 | Galactosyltransferase I |
| Вр | Basenpaare |
| BTP-2 | N-(4-(3,5-bis(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)-4-methyl-1,2,3- |
| | thiadiazol-5-carboxamid |
| C. albicans | Candida albicans |
| CDG | Congenital disorder of glycosylation |
| cDNA | complementary DNA |
| CICR | Calcium-induced calcium release |
| CMP | Cytidinmonophosphat |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CRAC | Calcium release-activated channel |
| CRACR2A | CRAC channel regulator 2A |
| CRISPR | Clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| D. rerio | Danio rerio |
| DAG | Diacylglycerol |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| Dol | Dolichol |
| Dol-P | Dolicholphosphat |
| DPAGT1 | Dolichylphosphat-N-Acetylglucosaminphosphotransferase 1 |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| Ex | Exon |
| EZR | Extrazellularraum |
| EZS | extrazelluläre Schleife |
| Fam. | Familie |
| FKBP12 | FK506 binding protein 12 kDa |
| for | Vorwärtsprimer |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| Fuc | Fucose |
| GAG | Glukosaminoglykan |
| Gal | Galactose |
| GalNAc | N-Acetylgalactosamin |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GFP | Green fluorescent protein |
| ggr. | geringgradig |

| Glc | Glucose |
|------------------|--|
| GlcNAc | N-Acetylglucosamin |
| GlcNAc-1-P | N-Acetylglucosamin-1-phosphat |
| GPCR | G protein-coupled receptor |
| GS | Gallensalz |
| HEK | Human embryonic kidney |
| HGNC | HUGO Gene Nomenclature Committee |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HUGO | Human Genome Organization |
| i.u. | intrauterin |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| IF | Immunfluoreszenz |
| In | Intron |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| IP₃R | Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor |
| IRBIT | IP ₃ R binding protein released with inositol trisphosphate |
| IZS | intrazelluläre Schleife |
| k.A. | keine Angabe |
| kDa | Kilodalton |
| LAMP2 | Lysosomal associated membrane protein 2 |
| LC-MS | Flüssigchromatographie-MS |
| Μ | Marker |
| Man | Mannose |
| MAN | Mannosidase |
| ManNAc | N-Acetylmannosamin |
| ManNAc-6-P | N-Acetylmannosamin-6-phosphat |
| MCU | Mitochondrial calcium uniporter |
| MGAT | GlcNAc-Transferase |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| MSR | Makrophagen-Scavenger-Rezeptor |
| Na | Natrium |
| NANS | N-Acetylneuraminic acid synthase |
| NCX | Natrium-Calcium-Austauscher |
| Neu5Ac | N-Acetylneuraminsäure |
| NeuAc-9-P | N-Acetylneuraminsäure-9-phosphat |
| NMD | Nonsense-mediated mRNA decay |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| NTCP | Na ⁺ /taurocholate cotransporting polypeptide |
| NX | Normalized expression |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance in Man |
| ORF | Open reading frame |
| OST | Oligosaccharyltransferase |
| Pat. | Patient |
| Р | Phosphat |
| p.n. | postnatal |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCC | Pearson's correlation coefficient |

| PCR | Polymerase chain reaction |
|------------------|---|
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PLC | Phospholipase C |
| PM | Plasmamembran |
| PMCA | Plasmamembrane calcium ATPase |
| PNGase F | Peptid-N-Glycosidase F |
| PolyPhen | Polymorphism Phenotyping |
| qPCR | Quantitative PCR |
| rev | Rückwärtsprimer |
| RFP | Red fluorescent protein |
| RIPA-Puffer | Radioimmunpräzipitationspuffer |
| ROC | Receptor-operated channel |
| ROI | Region of interest |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase-PCR |
| RyR | Ryanodin-Rezeptor |
| S. cerevisiae | Saccharomyces cerevisiae |
| SARAF | SOCE-associated regulatory factor |
| SBF | Sodium bile acid symporter family |
| SD | Skelettale Dysplasie |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SERCA | Sarcoplasmic/Endoplasmic reticulum calcium ATPase |
| Sia | Sialinsäure |
| SIFT | Sorting Intolerant From Tolerant |
| SLC | Solute Carrier |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SOAT | Sodium-dependent organic anion transporter |
| SOC | Store-operated channel |
| SOCE | Store-operated calcium entry |
| SPCA | Secretory pathway calcium ATPase |
| SR | Sarcoplasmatisches Reticulum |
| STIM | Stromal interaction molecule |
| TBS-T | Tris-buffered saline with Tween20 |
| Tet. | Tetrazyklin |
| TG | Thapsigargin |
| Th | Thorakalwirbel |
| TMD | Transmembrandomäne |
| TMEM | Transmembran protein |
| TRPC | Transient receptor potential channels |
| TV | Transkriptvariante |
| UDP | Uridindiphosphat |
| VOC | Voltage-operated channel |
| WES | Whole exome sequencing |
| WT | Wildtyp |
| X. laevis | Xenopus laevis |
| Y. frederiksenii | Yersinia frederiksenii |
| ZK | Zellkern |
| λEm | Wellenlänge der Emission |
| λΕχ | Wellenlänge der Exzitation |

V. REFERENZNUMMERN

| | E | Bezeichnung | | Spezies | GenBank Hinter | legungsnummer |
|---------|------|---------------|---------|----------------------------|----------------|-----------------|
| Gen | τv | Protein | Isoform | | Gen | Protein |
| SLC10A1 | k.w. | NTCP | k.w. | Homo sapiens | NM_003049.4 | NP_003040.1 |
| SLC10A2 | k.w. | ASBT | k.w. | Homo sapiens | NM_000452.3 | NP_000443.2 |
| SLC10A3 | 1 | SLC10A3 | 1 | Homo sapiens | NM_019848.5 | NP_062822.1 |
| SLC10A4 | k.w. | SLC10A4 | k.w. | Homo sapiens | NM_152679.4 | NP_689892.1 |
| SLC10A5 | k.w. | SLC10A5 | k.w. | Homo sapiens | NM_001010893.3 | NP_001010893.1 |
| SLC10A6 | k.w. | SLC10A6 | k.w. | Homo sapiens | NM_197965.3 | NP_932069.1 |
| SLC10A7 | 1 | SLC10A7/ RCAS | - | Homo sapiens | NR_133924.2 | nicht kodierend |
| SLC10A7 | 2 | SLC10A7/ RCAS | b | Homo sapiens | NM_001029998.6 | NP_001025169.1 |
| SLC10A7 | 3 | SLC10A7/ RCAS | С | Homo sapiens | NM_032128.5 | NP_115504.1 |
| SLC10A7 | 4 | SLC10A7/ RCAS | d | Homo sapiens | NM_001300842.3 | NP_001287771.1 |
| SLC10A7 | 5 | SLC10A7/ RCAS | e | Homo sapiens | NM_001317816.2 | NP_001304745.1 |
| SLC10A7 | 6 | SLC10A7/ RCAS | f | Homo sapiens | NM_001317817.2 | NP_001304746.1 |
| SLC10A7 | 7 | SLC10A7/ RCAS | g | Homo sapiens | NM_001317818.2 | NP_001304747.1 |
| SLC10A7 | X1 | SLC10A7 | X1 | Bos taurus | XM_010813719.3 | XP_010812021.2 |
| SLC10A7 | X15 | SLC10A7 | X15 | Canis lupus familiaris | XM_038451991.1 | XP_038307919.1 |
| SLC10A7 | X1 | SLC10A7 | X1 | Capra hircus | XM_005691203.3 | XP_005691260.1 |
| SLC10A7 | X2 | SLC10A7 | X2 | Equus caballus | XM_001501818.5 | XP_001501868.1 |
| SLC10A7 | X1 | SLC10A7 | X1 | Felis catus | XM_003984966.5 | XP_003985015.1 |
| SLC10A7 | X1 | SLC10A7 | X1 | Gallus gallus | XM_015276178.3 | XP_015131664.1 |
| SLC10A7 | X1 | SLC10A7 | X1 | Loxodonta africana | XM_003417546.3 | XP_003417594.1 |
| SLC10A7 | X1 | SLC10A7 | X1 | Marmota marmota marmota | XM_015484452.1 | XP_015339938.1 |
| SLC10A7 | k.w. | SLC10A7 | k.w. | Sus scrofa | NM_001137640.1 | NP_001131112.1 |
| Slc10a7 | 1 | SLC10A7 | 1 | Mus musculus | NM_029736.2 | NP_084012.1 |
| Slc10a7 | k.w. | SLC10A7 | k.w. | Rattus norvegicus | NM_001010948.1 | NP_001010948.1 |
| Slc10a7 | k.w. | SLC10A7 | k.w. | Sorex araneus | XM_004606192.1 | XP_004606249.1 |
| slc10a7 | k.w. | Slc10a7 | k.w. | Danio rerio | NM_001003420.1 | NP_001003420.1 |
| slc10a7 | k.w. | Slc10a7 | k.w. | Xenopus laevis | NM_001087260.1 | NP_001080729.1 |

Gene, Proteine und ihre Referenznummern | k.w. = keine weiteren bekannt; TV = Transkriptvariante

VI. KURZEINLEITUNG IN DAS THEMA

Transportproteine wie Solute Carrier ermöglichen im gesamten phylogenetischen Spektrum den Stofftransport über zelluläre Membranen hinweg. Der Orphan Carrier SLC10A7 wurde Anfang der 2000er Jahre erstmals kloniert und ist das siebte Mitglied der Solute Carrier Familie 10. Funktional grenzt er sich von anderen Mitgliedern seiner Familie ab. SLC10A7 ist nicht am Gallensäuren- oder Steroidsulfattransport beteiligt. Stattdessen zeigt sich nach Knockout des Hefe-homologen Gens RCH1 ein gesteigerter Calciumeinstrom und eine erhöhte zytosolische Calciumkonzentration in den Hefen Candida albicans und Saccharomyces cerevisiae. Vor kurzem wurden zudem erstmals zwölf humane Patienten mit homo- oder heterozygoter SLC10A7-Genmutation beschrieben. Die Patienten zeigen klinisch Knochendeformationen in Form von skelettaler Dysplasie und Zahnschmelzhypoplasie. Dieses phänotypische Bild spiegelt sich auch im *Slc10a7-^{/-}-Knockout*-Mausmodell wider. Außerdem werden biallelisch auftretende, angeborene SLC10A7-Genmutationen den Erkrankungen der kongenitalen Glykosylierungsstörungen (CDG) zugeordnet. SLC10A7-CDG Patienten zeigen in untersuchten Blutplasmaproteinen ein verändertes Muster ihrer Glykanstrukturzusammensetzung.

Ein Mechanismus, der auf zellulärer Ebene die physiologische Funktion des SLC10A7-Proteins beschreibt und damit die Ausprägung des phänotypischen Bildes sowie die Veränderung der Glykanstrukturzusammensetzung im pathologischen Fall erklärt, ist jedoch unbekannt. Bisher veröffentlichte Studien weisen auf die Beteiligung des SLC10A7-Proteins im Stoffwechselweg der Calciumhomöostase, der N-Glykosylierung und der Glukosaminoglykansynthese hin.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde deshalb insbesondere die Rolle von SLC10A7 im zellulären Calciumhaushalt mithilfe von humanen SLC10A7-*Knockout*-Zellen und SLC10A7überexprimierenden Zellkulturmodellen untersucht, um die molekulare Funktion dieses putativen *Solute Carriers* zu charakterisieren. Zudem wurde in weiteren, unveröffentlichten Experimenten der Effekt des SLC10A7-Proteins auf den Glykosylierungsprozess untersucht.

1 LITERATURÜBERSICHT

1.1 TRANSPORTPROTEINE

Zellen aller Organismen ist gemein, dass sie ihren Stoffwechsel genauestens kontrollieren und regulieren müssen, um überlebensfähig zu bleiben. Zu diesem Zweck sind in der Zellmembran, die als protektive Lipiddoppelschicht fungiert, Transportproteine eingelagert, die es ermöglichen Moleküle, Metaboliten und Ionen über die lipophile Zellmembran hinweg zu bewegen (Perland and Fredriksson, 2017; Pizzagalli et al., 2021). Infolgedessen wird der Nährstoffgehalt der Zelle ausgeglichen, Abfallprodukte ausgeschieden und das Zellvolumen konstant gehalten (Pizzagalli et al., 2021). Um diesen unterschiedlichen Funktionen nachzukommen, haben sich evolutionär fünf Hauptgruppen an Transportproteinen entwickelt. Diese sind: 1. ABC-Transporter, 2. Ionenpumpen, 3. Ionenkanäle, 4. Aquaporine und 5. *Solute Carrier* [Abb.1A (Wang et al., 2006; Fredriksson et al., 2008; Hediger et al., 2013; Yang and Hinner, 2015)]. Die zahlenmäßig größte Superfamilie dieser membrangebundenen Proteine stellen hierbei die zuletzt genannten *Solute Carrier* dar (Fredriksson et al., 2008). Einer dieser *Solute Carrier* ist Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit: SLC10A7.

1.2 DIE SOLUTE CARRIER SUPERFAMILIE

1.2.1 Einteilung und Nomenklatur

Carrier (SLC; "Transporter löslicher Stoffe") stellen eine Gruppe von Solute membrangebundenen Transportproteinen dar, die für den Austausch von Substanzen über zelluläre Membranen hinweg verantwortlich sind (Liu, 2019). Bis dato sind 458 solcher Transportmoleküle bekannt, die in Anlehnung an ihre Sequenzübereinstimmung in 65 Familien unterteilt werden (Pizzagalli et al., 2021). Dabei muss ein Mitglied der Familie mindestens 20-25 % Sequenzhomologie mit mindestens einem anderen Mitglied der Familie aufweisen, um von der Human Genome Organization (HUGO) zu einer dieser Familien zugeordnet zu werden (Hediger et al., 2013). Eine Arbeitsgruppe der HUGO, das HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), hat für die Benennung neuer SLC-Mitglieder ein Nomenklatursystem eingeführt, bei welchem dem Gensymbol immer die Buchstabenkombination SLC vorangestellt wird, gefolgt von der Nummer der betreffenden SLC-Familie (z.B. SLC10). Um die Ziffern der folgenden einzelnen Transporter von den vorangegangenen Nummern der Familie abzugrenzen, wird der Buchstabe "A" eingefügt (z.B.

SLC10A7 = *Solute Carrier* Familie 10, Mitglied Nummer 7). Einzelne Subfamilien können zusätzlich mit weiteren Buchstaben abgegrenzt werden [z.B. SLC35D2; (Hediger et al., 2004)].

1.2.2 Funktion und Substrate

Biochemisch können die Mitglieder einer Familie unterschiedliche Funktionen besitzen (**Abb.1B**). Zu transportierende Substrate und die Art des Transports sind variabel: Einige *Solute Carrier* ermöglichen beispielsweise den passiven Transport von Molekülen entlang ihres Konzentrationsgradienten über die Zellmembran hinweg, was auch als erleichterte Diffusion



ABBILDUNG 1 | Schematische Übersicht über Transportproteine in der Plasmamembran. (A) Einteilung in fünf Hauptgruppen. (B) Arten der Transportrichtung innerhalb der Superfamilie der *Solute Carrier*. (C) Übersicht zu den Mitgliedern der *Solute Carrier* Familie 10 und ihrer Substratspezifität. Für die Mitglieder SLC10A7 sowie SLC10A3-5 konnte bisher kein Substrat beschrieben werden. Die Transporter NTCP und ASBT transportieren natriumabhängig Gallensalze, um den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren aufrecht zu erhalten. SOAT transportiert natriumabhängig Steroidsulfate. | Pfeile geben die Transportrichtung der Substrate an. GS = Gallensalz; Na⁺ = Natrium. | Quelle (A): in Anlehnung an Hediger et al. (2013). bezeichnet wird (Fredriksson et al., 2008). Andere sind sekundär aktive Transporter, die ein Molekül im Austausch gegen ein anderes, welches selbst seinem Konzentrationsgradienten folgt und somit als Energielieferant dient, durch die Membran schleusen. Erfolgt der Austausch aller Moleküle in dieselbe Richtung, wird von *Symport* gesprochen; erfolgt er in die entgegengesetzte Richtung, wird dies als *Antiport* bezeichnet (He et al., 2009; Perland and Fredriksson, 2017). Primär aktiver Transport, bei dem Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) verbraucht wird, um ein Molekül entgegen seines Konzentrationsgradienten zu transportieren, ist bei den *Solute Carriern* nicht möglich. Dies bleibt anderen Membrantransportern vorenthalten (Hediger et al., 2013; Pizzagalli et al., 2021).

Substrate, die durch SLC-Carrier transportiert werden können, sind beispielsweise Aminosäuren, Glucose und andere Zucker, organische oder anorganische Kationen und Anionen (z.B. Cl⁻, Na⁺, K⁺, Ca²⁺) sowie Gallensalze oder Neurotransmitter (He et al., 2009; Pizzagalli et al., 2021). Jedoch ist bisher nicht von allen Mitgliedern der SLC-Superfamilie ihr entsprechendes Substrat bekannt. Folglich werden bis dato ca. 30 % der SLC-Carrier als sog. *Orphan Carrier* bezeichnet, da ihre molekulare Transportfunktion noch ungeklärt ist (Perland and Fredriksson, 2017). Dies gilt auch für SLC10A7.

1.2.3 Lokalisation und Struktur

SLC-Transporter sind in zellulären Membranen lokalisiert, die meisten davon in der Plasmamembran [PM; (Fredriksson et al., 2008)]. Zusätzlich können sich Transporter in der Membran von Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat, in Vesikeln oder in Peroxisomen befinden (Fredriksson et al., 2008; He et al., 2009). Typisch für die SLC-Transporter ist eine Anzahl von 1-16 Transmembrandomänen (TMD), mit welchen die Proteine in die Plasmamembran eingelagert sind (Pizzagalli et al., 2021). Zudem ist für einige charakterisierte SLC-Transporter bekannt, dass sie pseudosymmetrisch um eine Kern-TMD angeordnet sind (Shi, 2013; Pizzagalli et al., 2021). D.h. dass sich die äußeren TMD symmetrisch um eine Achse winden, die senkrecht zur Membran ausgerichtet ist. *Pseudo* bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Achse nicht zwangsläufig senkrecht angeordnet sein muss, sondern in einem bestimmten Winkel zur Membranebene geneigt vorliegen kann (Forrest, 2013). Eine dreidimensionale (3D) Strukturaufklärung von SLC10-Carriern ist wichtig, um ihre Funktion auf molekularer Ebene besser verstehen zu können und um den Funktionsverlust krankheitsauslösender Mutationen nachvollziehen zu können (Lu et al.,

3

2013). Die 3D-Struktur vieler SLC-Mitglieder ist bisher nicht bekannt und muss deshalb mittels homologer Modelle imitiert werden. Der Hauptgrund dafür ist, dass sich Membranproteine rekombinant schlecht darstellen lassen, was aber die Grundlage ist, um die Struktur über Kristalltechniken oder Cryo-Elektronenmikroskopie aufzuklären. So konnten bisher nur wenige 3D-Strukturen bestimmter SLC-Mitglieder aufgeklärt werden, wie z.B. die der Transporter SLC2A1, SLC2A3, SLC4A1, SLC6A4 und SLC42A3 (Pizzagalli et al., 2021). Für viele andere Mitglieder der SLC-Superfamilie wird versucht, die 3D-Struktur der Transporter anhand von Homologiemodellen auf Grundlage von Strukturmodellen homologer bakterieller Proteine und Computersimulationen herzuleiten. Dabei wird sich auf Sequenzhomologien zwischen bereits bekannten und zu untersuchenden Strukturen gestützt, um räumliche Anordnungen der Aminosäuren vorherzusagen (Schwede et al., 2009; Pizzagalli et al., 2021).

1.2.4 Regulation

Solute Carrier können durch post-translationale Modifikation in ihrer Transportaktivität reguliert werden. Dies ist durch intrazelluläre Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung oder extrazelluläre Modifikationen wie Glykosylierung möglich (Czuba et al., 2018). Dies hat Auswirkungen auf die Transportrate, die Transportaktivität und die Substrataffinität des jeweiligen SLC-Transportproteins (Pizzagalli et al., 2021). Zusätzlich werden SLC-Transporter über intermolekulare Interaktionen zu anderen Proteinen oder durch intramolekulare Interaktion mit eigenen Domänen reguliert (Pizzagalli et al., 2021).

1.3 DIE SLC10 FAMILIE

Die Solute Carrier Familie 10 (SLC10) wird seit den 1990er Jahren als sodium bile acid cotransporter family bezeichnet, wobei ihre beiden zuerst beschriebenen Mitglieder SLC10A1 und SLC10A2 aufgrund ihrer Gallensäuretransportfunktion namensgebend waren (Geyer et al., 2006). Dabei sorgen das Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP; Gensymbol: SLC10A1) und der Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter (ASBT, Gensymbol: SLC10A2) dafür, dass die physiologische Zirkulation der Gallensäuren zwischen Leber und Darm, der sogenannte enterohepatische Kreislauf, aufrechterhalten wird (Anwer and Stieger, 2014). Der Transport der Gallensalze ist dabei natriumabhängig und erfolgt im Symport über die PM von extrazellulär nach intrazellulär [**Abb.1C**; (Hagenbuch and Meier, 1994; Balakrishnan and Polli, 2006)].

4

Nach der Jahrtausendwende wurden fünf weitere Mitglieder der Familie entdeckt, so dass die SLC10-Familie mittlerweile sieben Transporter umfasst. Jedoch zeigen die neuentdeckten Mitglieder SLC10A3 - SLC10A7 im Gegensatz zu NTCP und ASBT keine Transportaktivität für Gallensalze. Stattdessen transportiert beispielsweise der *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* SOAT (Gensymbol: *SLC10A6*) natriumabhängig Steroidsulfate (Geyer et al., 2004; Geyer et al., 2007; Geyer et al., 2017). Für alle anderen Mitglieder ist bis heute – rund zwanzig Jahre nach ihrer Sequenzidentifizierung – kein Substrat bekannt, weshalb diese weiterhin als *Orphan Carrier* bezeichnet werden müssen.



ABBILDUNG 2 | Verwandtschaftsdiagramm der humanen SLC10-Carrier SLC10A1-SLC10A7. Phylogenetischer Baum, der die Proteinsequenzübereinstimmung der einzelnen SLC10-Mitlgieder untereinander darstellt. SLC10A7 ist phylogenetisch am weitesten von allen anderen Mitgliedern der Familie entfernt. | Die Grafik wurde mithilfe der MEGA-Software (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, Version 11.0.10) im Dezember 2021 erstellt.

Die sieben Carrier SLC10A1-SLC10A7 werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie (**Abb.2**) einer gemeinsamen Familie (SLC10) zugeordnet. Kennzeichnend für diese Protein-Familie ist das Strukturmotiv der SBF-Domäne (*Sodium Bile Acid Symporter Family Domain*), welches zunächst für NTCP und ASBT beschrieben wurde (Godoy et al., 2007). Diese Domäne umfasst eine über 180 Aminosäuren lange Sequenz, die recht konserviert in zahlreichen SBF-Proteinen

sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten vorkommt. Transporter in Hefen und Bakterien, welche die SBF-Domäne beinhalten, gehören der Familie der ACR3 *Carrier* (*Arsenical Resistance Carrier*) an (Godoy et al., 2007).

1.4 SLC10A7

1.4.1 Geschichte: von C4orf13 zu SLC10A7

Das jüngste Mitglied der SLC10 Familie ist SLC10A7 (auch "P7" oder "C4orf13" genannt). Es wurde Anfang der 2000er Jahre zeitgleich in verschiedenen Institutionen bei Sequenzanalysen entdeckt. Der zugehörige vorausgesagte *open reading frame* (ORF) wurde zunächst als *C4orf13* beschrieben und von einer chinesischen Arbeitsgruppe unter diesem Namen publiziert [**Abb.3**; (Zou et al., 2005)]. Zeitgleich erfolgte die Charakterisierung dieses neuen *Orphan Carriers* am Gießener Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Im Zuge dessen erfolgte die Kontaktaufnahme mit dem HGNC. Trotz der recht geringen Sequenzhomologie von nur 12-16 % mit den übrigen sechs Mitgliedern der SLC10-Familie (*SLC10A1-SLC10A6*), sollte demnach die Nomenklatur "SLC10A7" verwendet werden. Entsprechend wurden die Daten aus der Gießener Gruppe folgend mit dem Gennamen *SLC10A7* publiziert (Godoy et al., 2007). Die Nomenklatur ist seitdem unverändert und bis heute gültig.

Funktional ließ sich SLC10A7 jedoch nicht den typischen Gallesäuretransportern zuordnen, da keine Transportaktivitäten für die Gallensäuren Taurocholat, Cholat und Chenodesoxycholat gezeigt werden konnten. Auch für die typischen SOAT-Substrate Östron-3-Sulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat konnten keine Transportaktivitäten gemessen werden (Godoy et al., 2007).

Fünf Jahre später (2012) konnten Jiang et al. bei Versuchen in *Candida albicans* (*C. albicans*) mittels des Hefehomologs CaRch1p einen Eingriff des Proteins in den Calciumstoffwechsel der Hefezelle zeigen. Demnach zeigten Hefen mit *Knockout* im *CaRCH1*-Gen einen gesteigerten Calciuminflux und erhöhte zytosolische Calciumlevel, was sich in einer Überempfindlichkeit gegenüber hohen extrazellulären Calciumkonzentrationen äußerte. Das von *CaRCH1* codierte Protein wurde daher als neuer, negativer *"regulator of calcium homeostasis* (Rch1p)" beschrieben (Jiang et al., 2012; Alber et al., 2013). Zhao et al. zeigten 2016 im Wesentlichen die gleiche Funktion für das homologe Protein in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), welches entsprechend als ScRch1p, codiert vom *ScRCH1*-Gen, bezeichnet wurde (Zhao et al., 2016).

6

Kurze Zeit später, 2018, wurde ein neuer Meilenstein für die Forschung an SLC10A7 erreicht, als zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander erstmals den Phänotypen humaner Patienten mit Genmutationen im *SLC10A7*-Gen beschrieben. Das Ziel der Studie von Dubail et al. war es dabei, für eine Gruppe von Patienten mit den gleichen angeborenen Missbildungen, ein gemeinsames Gen zu identifizieren, das durch Mutation für den pathologischen Phänotyp der Patienten verantwortlich war. Mithilfe von *Whole Exome Sequencing* (WES) gelang es der Arbeitsgruppe für sechs von über 200 Patienten mit Chondrodysplasie und Dislokationen großer Gelenke (Schulter-, Ellbogen-, Hand-, Hüft-, Knie- und Sprunggelenk) homozygote Mutationen im *SLC10A7*-Gen zu identifizieren (Dubail et al., 2018). Die sechs Patienten wurden alle mit Knochendeformationen (skelettale Dysplasie, SD) und Zahnschmelzdefekten (Amelogenesis imperfecta, AI) vorstellig. Interessanterweise ließ sich dieses pathologische Bild in einem *Slc10a7-Knockout*-Mausmodell der Arbeitsgruppe nachbilden (Dubail et al., 2018) – was zuvor durch die Arbeitsgruppe um Robert Brommage 2014 weniger detailliert beschrieben wurde (Brommage et al., 2014). Die Mäuse zeigten ebenso SD und AI. Lediglich Dislokationen der Gelenke konnten in diesem Modell nicht detektiert werden.

Ashikov et al. publizierten im selben Jahr vier Fälle von insgesamt 99 unter angeborener Glykosylierungsstörung (*Congenital Disorder of Glycosylation*, CDG) leidenden Patienten, die im Rahmen einer Studie auf gemeinsame Glykosylierungsmuster hin untersucht wurden, um ein diagnostisches Tool für CDG-Erkrankungen zu entwickeln. Übereinstimmend mit der Beschreibung durch Dubail et al., zeigten auch diese Patienten jeweils eine Mutation im *SLC10A7*-Gen bei vergleichbaren klinischen Symptomen (Ashikov et al., 2018). Zusätzlich zeigte ein von der Arbeitsgruppe entwickeltes Modell am Zebrabärbling (*Danio rerio, D. rerio*) ähnliche Auswirkungen auf die skelettale Entwicklung. Nach *Knockdown*, d.h. nach Herunterregulierung des *slc10a7*-Gens, kam es zu Störungen in der Knorpel- und Knochenentwicklung der genmodifizierten Fische (Ashikov et al., 2018).

Sensibilisiert durch die vorangegangenen Studien beschrieben Laugel-Haushalter et al. 2019 den Fall einer Patientin mit *SLC10A7*-Gendefekt, die im Rahmen einer WES auffiel. Diese zeigte ebenfalls SD und AI – dies jedoch im Vergleich zu den anderen Patienten mit milderen Symptomen und einem weniger drastisch ausgeprägten Phänotyp. So kam es bei dieser Patientin nicht zu einer Dislokation großer Gelenke, Schmerzen oder einer Bewegungseinschränkung der großen Gelenke – ähnlich wie es zuvor im Mausmodell von Dubail et al. beschrieben wurde (Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019).

7

Auf zellulärer Ebene konnten die oben genannten Arbeitsgruppen verschiedene Stoffwechselwege benennen, die durch SLC10A7-Defizienz verändert werden. In Hefemodellen und in Versuchen mit Patientenfibroblasten zeigte sich eine beeinflusste Calciumhomöostase (Dubail et al., 2018). Dies passt zu der zuvor im Hefemodell beschriebenen Funktion von SLC10A7/RCH1p (Jiang et al., 2012; Alber et al., 2013; Zhao et al., 2016). Durch Untersuchungen getrockneter Blutproben der Patienten konnte zudem die N-Glykansynthese als beeinflusster Stoffwechselweg identifiziert werden (Dubail et al., 2018), was in zusätzlichen massenspektrometrischen (MS) Analysen von Ashikov et al. inhaltlich unterstützt wurde (Ashikov et al., 2018). Die histologische Untersuchung des Knorpelgewebes von *Slc10a7-/*-Mäusen und die Untersuchung von Patientenfibroblasten ergab außerdem Hinweise auf eine veränderte Glukosaminoglykansynthese (GAG-Synthese) bei SLC10A7-Defizienz (Dubail et al., 2018).



ABBILDUNG 3 | Zeitlicher Fortschritt der SLC10A7-Forschung. Dargestellt ist die zeitliche Abfolge veröffentlichter Studien in der SLC10A7-Forschung sowie deren Autoren. Zu jeder Veröffentlichung sind in kurzen Stichpunkten die Hauptthesen beschrieben.

Bis dato ist ungeklärt, welche Funktion das humane SLC10A7-Protein auf zellulärer Ebene innehat, welches Substrat SLC10A7 als möglicher Transporter besitzt und welche Stoffwechselwege durch das Protein sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Zustand moduliert werden. Durch die bisher erschienenen Publikationen gibt es zwar erste Hinweise auf die beeinflussten Stoffwechselwege (Calciumhomöostase, Glykan- und GAG-Synthese), jedoch ist nicht geklärt, ob diese beschriebenen Effekte voneinander abhängig sind, ob ein veränderter Weg ursächlich für den anderen ist oder ob ein ganz anderer bisher unbekannter Faktor zusätzlich eine Rolle spielt. Im folgenden Teil der Einleitung soll deshalb zunächst zusammenfassend dargestellt werden, was für SLC10A7 bereits aus der Literatur sowie aus allgemeinen Datenbanken bekannt ist, um einen Überblick über das Protein und seine Eigenschaften zu erhalten.

1.4.2 Krankheitsbild bei SLC10A7-Defizienz

Alle bisher beschriebenen Fallberichte von Patienten mit biallelischer Mutation im *SLC10A7*-Gen zeigen klinisch ein ähnliches Erscheinungsbild. Es äußert sich in Knochendeformationen in Form von SD mit Al (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019).

1.4.2.1 Skelettale Dysplasie

Das Krankheitsbild der SD zeichnet sich mit ca. 450 verschiedenen Unterformen durch Fehlbildungen des Skeletts, insbesondere in Bezug auf eine abnorme Knochenform, -dichte und -größe aus sowie durch neurologische Störungen und Störungen des Knorpelwachstums (Bonafe et al., 2015). Die häufigste Ausprägungsform ist hierbei die Achondrodysplasie (Pauli, 2019). Symptomatisch zeigen Patienten Missbildungen der Wirbelsäule in Form von Kyphose, spinaler Stenose und Instabilitäten der Halswirbelsäule. Zusätzlich können Kleinwuchs, verkürzte Arme und Beine, Gelenkschmerzen und Hörverlust auftreten (Ranza et al., 2017). Mit einer Prävalenz von ca. 2,33/10.000 Geburten zählt die Erbkrankheit der SD weltweit zu den selteneren Erkrankungen und betrifft gleichermaßen das weibliche, wie das männliche Geschlecht (Orioli et al., 1986; Rasmussen et al., 1996). Ätiologisch kommen hetero- wie auch homozygote Mutationen verschiedenster Gene in Betracht, v.a. derer, die am komplexen Geschehen der Knochengewebsbildung beteiligt sind (Bonafe et al., 2015). Eine Heilung ist nicht möglich.

1.4.2.2 Amelogenesis imperfecta

Die AI, auch Zahnschmelzhypoplasie, ist eine ursächlich genetisch bedingte Erkrankung, bei der es zu einer unvollständigen Ausbildung des Zahnschmelzes kommt. Es gibt mehr als 13

9

verschiedene Klassifikationssysteme, nach denen die Al mit ihren unterschiedlichen Ausprägungsformen eingeteilt werden kann: nach Phänotyp (Hypoplastischer Typ, Hypomaturationstyp, Hypokalzifikationstyp), nach Vererbung (autosomal dominant, autosomal rezessiv, X-chromosomal-rezessiv, spontane Mutation), nach molekularen Defekten und nach biochemischer Analyse (Ortiz et al., 2019). Der Großteil aller AI Fälle beruht jedoch auf einer Störung von Genen, die für die Zahnschmelzmatrixproteine Enamelin, Amelogenin und Ameloblastin kodieren. Diese Proteine sind für die Zahnschmelzbildung des Milchzahns als auch der bleibenden Zähne von entscheidender Bedeutung (Abd Alraheam and Donovan, 2020). Die Al unterscheidet sich je nach Bevölkerungsgruppe in ihrer Prävalenz: Die Prävalenz einer nordschwedischen Population wird auf 1,4/1.000 und die einer US-Population auf 0,06-0,07/1.000 geschätzt (Ortiz et al., 2019). Symptomatisch zeigen die Patienten – je nach Klassifikationstyp – sehr dünnen bis fehlenden rau oder fleckig erscheinenden harten Zahnschmelz (Hypoplastischer Typ), weicheren sowie gelblich-braunen Zahnschmelz (Hypokalzifikationstyp) oder relativ harten, weiß- bis gelblichen Zahnschmelz, der röntgenologisch kaum Kontrast zum darunterliegenden Dentin aufweist (Sabandal and Schäfer, 2016).

1.4.2.3 Humane SLC10A7-defiziente Patienten

Bei SLC10A7-defizienten Patienten äußert sich die SD in prä- und postnatalem Kleinwuchs, Dislokationen großer Gelenke bei nahezu allen Patienten, fortgeschrittener Verknöcherung der Handwurzelknochen, Verformung der proximalen Femora (*Monkey Wrench, Swedish Key*), pathologisch geformten Wirbeln, Luxation oder Laxheit der Knie mit Genua valga (X-Beine), Hyperlordose (Hohlkreuz) oder Kyphoskoliose (dorsal und seitlich gerichtete Verkrümmung der Wirbelsäule) und verkleinerten Epiphysen (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019). Die Al äußert sich im hypomineralisierten Al-Typ, der in Form von gelbbraunem Zahnschmelz mit rauer Oberfläche auftritt, und von kurzen, weit auseinander stehenden Zahnkronen begleitet wird (Dubail et al., 2018).

Zusätzlich zur SD und Al treten bei Patienten mit *SLC10A7*-Mutation unterschiedlich ausgeprägte Gesichtsanomalien auf. Diese äußern sich entweder durch Pierre-Robin-Syndrom (Mikrognathie, Glossoptose, Gaumenspalte), oder durch alleinige Mikrognathie sowie durch ein flaches Gesicht (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019). Weitere Symptome, die nicht zwangsläufig bei allen Patienten auftreten sind: Herzfehler, Schwerhörigkeit, Fettleibigkeit und geringgradig eingeschränkte intellektuelle Entwicklung. Auch Pedes planovalgi (Knick-Senkfüße), Inguinalhernie (Leistenbruch) oder ein verlängertes Philtrum werden beschrieben [**Tab. 1**; (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019)]. Zusätzlich wurden bei Eltern, die beide eine homozygote Mutation im *SLC10A7*-Gen tragen, Aborte während der Schwangerschaft und Tod des Neugeborenen aufgrund von Atemnot beschrieben (Dubail et al., 2018).

| | | | | Ashikov et al. (2018) |
|-----------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------|---|
| Patient | Nationalität | Alter während | Geschlecht | Symptome, die nicht bei allen Patienten gleichermaßen auftreten und im Laufe verschiedener |
| | | der letzten Untersuchung | | Untersuchungen diagnostiziert wurden. |
| Pat. 33 | k.A. | 33 Jahre | weiblich | Pedes planovalgi, mandibuläre Hypoplasie, Inguinalhernie, verringerte Knochendichte des proximalen Femurkopfes und Femurhalses |
| Pat. 17 | k.A. | 31 Jahre | männlich | Prognathismus, Pedes planovalgi, Myopia gravis, Strabismus convergens, unilaterale Ptosis |
| Pat. 39 | k.A. | 8 Jahre | männlich | Entwicklungsverzögerung, Zahnengstand, Schluckbeschwerden, chronische Malabsorption, bilaterale Coxa valga, hypoplastische erste Rippe, Stirnbuckel, Dolichocephalie, flacher und breiter Nasenrücken, langes und glattes Philtrum, dünne Oberlippe, Atemwegsinfektionen mit Sepsis |
| Pat. 24 | k.A. | 24 Jahre | männlich | Inguinalhernie, Entwicklungsstörungen, Gelenkshypermobilität, Klumpfuß, Phimose, Schalskrotum, Glaukom, trockenes und brüchiges Haar, langes Philtrum, dünne Oberlippe, Pterygium colli, zervikale Stenose, Pectus excavatum |
| Pat. _{Neu} | k.A. | 12 Monate | männlich | Fütterungsschwierigkeiten, Inguinalhernie, Gelenkshypermobilität, verkürzter Nacken, rundes Gesicht, Hypertelorismus der Augen, langes Philtrum, Einbuchtungen an mehreren Lendenwirbelkörpern, grobmotorische Verzögerung |
| | | | | Laugel-Haushalter et al. (2019) |
| Pat. | algerisch | 9 Jahre | weiblich | Brachvdaktvlie der Hände und Füße, laxe Gelenke ohne Dislokationen. Gelenkseinschränkungen oder |
| |) | | | Schmerzen, vorangeschrittene Ossifikation des Tarsus, abnorme Ausdehnung der Wirbelkörper, horizontales Acetabulum, große Oberschenkelhälse, große Darmbeinflügel und große Schlüsselbeine, keine meta- oder epiphysäre Anomalien, blaue Skleren |
| | | | | Dubail et al. (2018) |
| Fam. 1 | türkisch | 5 Jahre | männlich | rundlich erscheinendes Gesicht, fortgeschrittenes Knochenalter, verkürzte Metacarpi und Phalangen, irregulär geformte Wirbelkörper, weite Metaphysen, Coxa valga, Fettleibigkeit, Agenesie verschiedener Zähne |
| Fam. 2 | türkisch | 4 Jahre | männlich | perinatale Atemnot, rundlich erscheinendes Gesicht, flacher Nasenrücken, hoher Gaumen, vorangeschrittene Verknöcherung des Carpus, irregulär geformte Wirbelkörper, Vorhofseptumdefekt |
| Fam. 3 | türkisch | 4 Jahre | weiblich | perinatale, vorrübergehende Atemnot, fortgeschrittenes Knochenalter des Carpus, Stammesfettleibigkeit, Verzögerung in der sprachlichen Entwicklung |
| Fam. 4 | niederländisch | 10 Jahre | männlich | Rundlich erscheinendes Gesicht, vorangeschrittene Verknöcherung des Carpus und Tarsus, Schmetterlingswirbel in Th11 und Th12, horizontales Acetabulumdach, hochgradige Valgusstellung der Kniegelenke, Hüftkontrakturen |
| Fam. 5 | niederländisch | 9 Jahre | weiblich | perinatale Ateminsuffizienz, vorangeschrittene Verknöcherung des Carpus, irreguläre geformte Wirbelkörper und frontale Wirbelspalten, Agenesie verschiedener Zähne, gemischter Hörverlust |
| Fam. 6 | iranisch | 12 Jahre | männlich | perinatale Atemnot, vorangeschrittene Verknöcherung des Carpus, verkürzte Metacarpi der Finger 4 und 5, Stammesfettleibigkeit, Instabilität der Kniescheibe, Agenesie verschiedener Zähne, sensineuraler Hörverlust, verminderte Sehschärfe |
| TABELLE Erscheinu | Phänotypisch ingsbilder, die nic | hes Erscheinungs cht gleichermaßen | bild SLC10A7- bei allen beso | defizienter Patienten, die durch die genannten Autoren beschrieben wurden. Gelistet sind diejenigen :hriebenen Patienten auftraten Fam. = Familie; k.A. = keine Angabe; Pat. = Patient; Th = Thorakalwirbel. |

1.4.3 Informationen aus Datenbanken

In öffentlichen Datenbanken (wie bspw. NCBI⁶, ENSEMBL⁷, Proteinatlas⁸ oder Genecards⁹) lassen sich Informationen zu bekannten Nukleotid- und Proteinsequenzen einsehen. Für SLC10A7 sind folgende Daten bezüglich seiner Phylogenie, genomischen Organisation, Proteinstruktur und Gewebeexpression aufgeführt, die durch diverse Publikationen aufgegriffen oder inhaltlich unterstützt werden:

1.4.3.1 Phylogenie

Im Vergleich zu den anderen Mitgliedern seiner SLC10-Familie, kommt SLC10A7 nicht nur in Vertebraten, sondern auch hochkonserviert in Hefen, Bakterien und Pflanzen vor und scheint deshalb phylogenetisch eine wichtige Rolle zu spielen (Godoy et al., 2007). Die Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies stimmen zu einem hohen prozentualen Anteil mit der des humanen Proteins (Isoform b) überein (**Tab. 2**). Die höchste Übereinstimmung zeigt die humane SLC10A7-Proteinsequenz zu der des Hauspferdes *Equus caballus* (98,2 %), gefolgt von der des Murmeltiers (*Marmota marmota marmota*, 97,3 %), der des Haushundes (*Canis lupus familiaris*, 97,0 %) und der der Hauskatze (*Felis catus*, 96,7 %). Hervorzuheben ist die vergleichsweise hohe Sequenzidentität zu verwandten SLC10A7-Proteinen von Wirbeltieren anderer Klassen, wie dem Krallenfrosch [*Xenopus laevis* (*X. laevis*), 87,8 %] oder dem Zebrabärbling (*D. rerio*, 75,6 %). Es ist jedoch zu beachten, dass die Berechnungen zur Sequenzidentität auf vorläufigen Proteinsequenzdaten beruhen, die von den einschlägigen Sequenzdatenbanken nicht final validiert wurden¹⁰.

⁶ www.ncbi.nlm.nih.gov

⁷ www.ensembl.org

⁸ www.proteinatlas.org

⁹ www.genecards.org

¹⁰ www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC10A7&keywords=slc10a7

TABELLE 2 | SLC10A7/Slc10a7-Proteinsequenzidentitäten verschiedener Spezies | * Durch NCBI vorhergesagte Proteinsequenz; ** nicht validierte Proteinsequenz.

1.4.3.2 Genomische Organisation

Das humane *SLC10A7*-Gen liegt auf Chromosom 4q31.22 und ist in einer 12-Exon-Struktur organisiert (**Abb. 4A**). Durch alternatives Spleißen werden bis zu sieben verschiedene mRNA-Transkriptvarianten (TV) gebildet, die gewebespezifisch vorkommen [**Abb. 4B** (Zou et al., 2005; Godoy et al., 2007)]. Die mRNAs verschiedener TV können unterschiedliche regulatorische Eigenschaften besitzen (z.B. in Bezug auf Lokalisation, Stabilität und Translationseffizienz) und zur Bildung verschiedener Proteinisoformen führen, die unterschiedliche Funktionen und Strukturen innehaben (Raabe and Brosius, 2015; Park et al., 2018a). Die Bedeutung der existierenden TV für *SLC10A7* und mögliche divergente Funktionen und Einflüsse auf den zellulären Stoffwechsel sind bis dato jedoch nicht bekannt.

TV 2 wird in den meisten humanen Geweben gebildet und wird deshalb als Referenzvariante bzw. Wildtypvariante angegeben. Sie beinhaltet die Exons 1-12 und ihr offenes Leseraster besteht aus 1023 Basenpaaren, was zur Bildung eines Proteins mit 340 Aminosäuren führt. Sie unterscheidet sich von der am zweithäufigsten vorkommenden TV 4 nur in einem nicht vorhandenen Exon 11', welches in TV 4 zusätzlich enthalten ist. Alle TV besitzen gleichermaßen die Exons 1 und 2. Sie unterscheiden sich im Weiteren in der Anzahl und Länge ihrer kodierenden Exons und daraus resultierender Proteingrößen (**Abb. 4B; Tab. 3**). Als Besonderheit sei TV 1 erwähnt: Dieser TV fehlen die Exons 8 und 9. Dadurch wird ein anderes Startcodon für die Translation verwendet. Folglich verschiebt sich der Leserahmen während der Proteintranslation und die gebildete mRNA codiert für ein frühzeitiges Stopcodon. Dies führt zum *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD), einem Zerfall der mRNA, weshalb ferner kein intaktes Protein gebildet werden kann (Karousis and Muhlemann, 2019).

Zusätzlich werden von Gen-Datenbanken (wie NCBI RefSeq) zehn weitere, vorläufige *SLC10A7*-Transkripte mittels virtueller Berechnungen vorhergesagt. Die Datenbanken beziehen ihre Informationen von Genomsequenzen, die unterschiedliche Homologiestufen zu bekannten Transkripten und Proteinen aufweisen. Bei der Simulation können jedoch Sequenzvariationen auftreten, die entweder echte Polymorphismen, Fehler oder Lücken in der verfügbaren Genomsequenz widerspiegeln. Sie gelten deshalb als nicht validiert¹¹.

¹¹ www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK50679/#!po=20.4545



ABBILDUNG 4 | Schematische Übersicht zu *SLC10A7*-Transkription und -Translation. (A) 12-Exonstruktur des *SLC10A7*-Gens auf DNA/RNA-Ebene. (B) Übersichtliche Darstellung der NCBIvalidierten SLC10A7 Transkriptvarianten (TV), die durch alternatives Spleißen gebildet werden. Je TV sind die Länge in Basenpaaren (Bp) und die vorhandenen Exons abgebildet. Die verschiedenen mRNA-Transkripte kodieren für die entsprechenden SLC10A7-Proteinisoformen b-g. Bei TV 1 führt die Deletion der Exons 8 und 9 zum NMD. Nach Translation werden unterschiedlich große Proteine gebildet, die in maximal 10 TMD organisiert sind. N- und C-Terminus liegen bei der Wildtyp-Isoform b intrazellulär. Unterschiedliche Farben entsprechen den unterschiedlichen Exons. Mit ' markierte Exons weisen eine ähnliche, aber abweichende Sequenz zum Referenzexon aus TV 2 auf. **(C)** 3D-Struktur des SLC10A7-Proteins in der Seitenansicht (links) und der Aufsicht (rechts). Die Struktur wurde basierend auf dem Homologiemodell aus *Y. frederiksenii* erstellt (PDB: 4n7w). | 2D = zweidimensional; 3D = dreidimensional; AS = Aminosäuren; Bp = Basenpaare; EZR = Extrazellularraum; NMD = Nonsense-mediated mRNA Decay; PM = Plasmamembran; TMD = Transmembrandomäne; TV = Transkriptvariante.

| TV Nummer | ursprüngliche Bezeichnung durch Godoy et al. | enthaltene Exons | fehlende Exons | Anzahl Exons | ORF Länge (Bp) | Protein- isoform | Proteinlänge (AS) | Besonderheit |
|--------------|--|---------------------|-------------------|-----------------|----------------------|---------------------|----------------------|--------------|
| 1 | 2 | 1-7, 10-12 | 8, 9 | 10 | - | - | - | NMD |
| 2 | 1 | 1-12 | - | 12 | 1023 | b | 340 | Referenz-TV |
| 3 | | 1, 2, 3, 4, 4' | 5-12 | 5 | 480 | С | 159 | |
| 4 | 3 | 1-12 + 11' | - | 13 | 1077 | d | 358 | |
| 5 | 4 | 1-4, 6-12 | 5 | 11 | 984 | e | 327 | |
| 6 | | 1, 2, 4, 4' | 3, 5-12 | 4 | 258 | f | 85 | |
| 7 | | 1, 2, 2' | 3-12 | 3 | 195 | g | 64 | |

 TABELLE 3 | Übersicht zu bekannten SLC10A7-Transkriptvarianten inklusive ihrer Exon- und

 Proteinstruktur | AS = Aminosäuren; Bp = Basenpaare; NMD = Nonsense-mediated mRNA Decay; ORF

 = Open Reading Frame; TV = Transkriptvariante.

1.4.3.3 Proteinstruktur

Entsprechend der TV kodiert *SLC10A7* für sechs unterschiedliche Proteine mit einer Länge von 64 - 358 Aminosäuren (**Tab. 3**). Der Name des Proteins leitet sich anhand seiner Transkriptnummer ab: Die Nummer der TV entspricht der Nummer des Buchstaben im Alphabet und wird der Bezeichnung *Isoform* angefügt (beispielsweise entspricht TV 2 Isoform b). Die molekulare Masse des Referenzproteins mit 340 Aminosäuren beträgt ca. 37 kDa¹².

Für das SI C10A7-Protein humane konnte bis dato keine Struktur mittels Proteinkristallographie (Röntgenstrukturanalyse, Neutronenbeugung und NMR-Spektroskopie) oder mittels Kryoelektronenmikroskopie aufgeklärt werden. Deshalb ist es derzeit nur über bakterielle Homologiemodelle möglich, das menschliche Protein zu rekonstruieren. Als Grundlage für das Modell dient die homologe Proteinsequenz von ASBT (SLC10A2) aus dem Bakterium Yersinia frederiksenii (Y. frederiksenii), die als Seguenz mit der

¹² www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC10A7&keywords=slc10a7
höchsten verfügbaren Übereinstimmung zu SLC10A7 für die Modellierung des Proteins herangezogen wird¹³ (Zhou et al., 2014). Basierend auf dem Homologiemodell und basierend auf der Anordnung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren, wird für SLC10A7 angenommen, dass es in zellulären Membranen lokalisiert und in zehn TMD organisiert ist (**Abb. 4B,C**). C- und N-Terminus sind intrazellulär gelegen (Godoy et al., 2007). Posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, werden – entgegen der Erstbeschreibung durch Zou et al., die für C4orf13 an Position 119 eine O-Glykosylierungsstelle vorhersagten – für SLC10A7 nicht vorausgesagt¹⁴ (Zou et al., 2005).

1.4.3.4 Gewebeexpression

Die verschiedenen SLC10A7 TV werden in fast allen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. In Bezug darauf existieren in der Literatur verschiedene Angaben (Tab. 4). Zou et al. zeigten 2005 mittels Reverser-Transkriptase-PCR (RT-PCR) an humanen cDNA-Gewebeplatten die höchste Expression für C4orf13 (ungeachtet der TV) in Lunge und Leber, eine moderate Expression in Plazenta, Niere, Milz und Thymus sowie eine niedrige Expression in Herz, Prostata und Hoden (Zou et al., 2005). Godoy et al. beschrieben anhand humaner cDNA Panels und RT-PCR die höchste Gewebeexpression für SLC10A7 in Leber und Hoden, zeigten aber ebenfalls eine breite Verteilung in vielen weiteren Geweben (Prostata, Plazenta, Ovarien, Niere, Herz, Thymus, Colon, Milz, Gehirn und Dünndarm). Mittels anschließender Sequenzierung zeigte sich, dass es sich hauptsächlich um die TV 2 und TV 4 handelte. Für Ratten- und Mäuse-Slc10a7 wurde gleichermaßen ein breites Expressionsspektrum mittels konventioneller RT-PCR von isolierter RNA aus Organproben nachgewiesen (Herz, Gehirn, Colon, Dünndarm, Lunge, Leber, Nebenniere). Lediglich in Skelettmuskelzellen war kein Slc10a7 für Mäuse und Ratten zu detektieren. In einer vierten Spezies, dem Frosch, konnte die Arbeitsgruppe eine Slc10a7-Expression nur in Dünndarm, Milz und Skelettmuskel beobachten (Godoy et al., 2007).

Dubail et al. untersuchten rund zehn Jahre später die Gewebeexpression des *Slc10a7*-Gens mittels *in-situ*-Hybridisierung an embryonalen und juvenilen Mäusen. Dabei konnte in allen Entwicklungsstadien der Tiere das *Slc10a7*-Transkript detektiert werden. Im Gestationsalter von 12,5 Tagen war die *Slc10a7*-mRNA hauptsächlich in Herztrabekeln und knorpeligen Anteilen der Wirbel zu sehen. Zwei Tage später zeigte sich eine erhöhte Expression in weiteren

¹³ www.swissmodel.expasy.org/templates/4n7w.1

¹⁴ www.genecards.com

knorpeligen Strukturen wie der Mandibula, an sich entwickelnden Fingern, der Wirbelsäule und in der Lunge. Am Tag der Geburt ließ sich die *Slc10a7*-Expression in der papillären Schicht der Mundschleimhaut, unterhalb des Gaumens sowie in der Ameloblastenschicht der sich entwickelnden Zähne nachweisen. Zehn Tage postnatal war die Expression in den Wachstumsfugen langer Knochen am höchsten (Finger des Vorderfußes, Tarsalknochen, Humerus). Zusätzlich ergaben Untersuchungen an humanen Embryonen vergleichbare Ergebnisse: im Gestationsalter von 8 Wochen war eine Expression der *SLC10A7*-mRNA hauptsächlich im Herzen und an Wirbeln zu beobachten; im Gestationsalter von 9 Wochen v.a. im Knorpel langer Röhrenknochen (Dubail et al., 2018).

Laugel-Haushalter et al. führten 2019 zusätzliche *in-situ*-Hybridisierungs-Studien an fetalen Mäusen durch, um das Expressionsmuster des *Slc10a7*-Gens im Gewebe, insbesondere an sich entwickelnden Zähnen, zu untersuchen. Sie machten dabei ähnliche Beobachtungen wie Dubail et al. und beschrieben eine *Slc10a7*-Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien der Zähne sowie in ossifizierenden Knochen und Wirbeln [Humerus, Femur; (Laugel-Haushalter et al., 2019)].

| Methode | RT-PCR | | | in-situ-Hybridisierung | | | | |
|-----------------------|--|--|---|--|--|--|---|---|
| Autor | Zou et al. (2005) Mensch | G Mensch | odoy et al. (200) Ratte/ Maus | 7) Frosch | Mensch (i.u.) | Dubail et al. (201 Maus (i.u.) | 8) Maus (p.n.) | Laugel- Haushalter et al. (2019) Maus |
| Spezies | 个 | 个 | 5 | - | P | 52 | * | 5 |
| Expressions- level | Leber Lunge Milz Niere Plazenta Thymus Herz Hoden Prostata | Hoden Leber Dünndarm Gehirn Herz Milz Niere Ovarien Plazenta Prostata Thymus | Colon Dünndarm Gehirn Herz Leber Lunge Nebenniere | Dünndarm Milz Skelett- muskel | Herz lange Röhren- knochen Wirbel | Herztrabekel knorpelige Anteile der Wirbel andere knorpelige Strukturen an Mandibula, sich entwickelnden Fingern, der Wirbelsäule und Lunge | Papilläre Schicht der Mundschleim- haut unterhalb des Gaumens Ameloblasten- schicht sich entwickelnder Zähne Wachstumsfugen langer Knochen | Knochen Wirbel Zähne |
| Keine Expression | | | Skelett- muskel | | | | | |

 TABELLE 4 | Gewebeexpression von SLC10A7, aufgeteilt nach Untersuchungsmethode, Autor, Spezies und Expressionslevel | i.u. = intrauterin; p.n. = postnatal.

1.4.3.5 Zelluläre Lokalisation

Um Hinweise auf mögliche Substrate und die Funktion eines Transporters zu bekommen, ist es nötig, die zelluläre Lokalisation des Proteins zu untersuchen. Die exakte subzelluläre Lokalisation des SLC10A7-Proteins zu beschreiben, gestaltet sich bis heute schwierig, da keine geeigneten Antikörper existieren, um das native Protein zu detektieren. Infolgedessen ist es nur möglich, SLC10A7 mittels synthetisch erzeugter Protein-*Tags*, d.h. bestimmter etablierter Aminosäuresequenzen, zu markieren und so indirekt über intakte *Tag*-Antikörper zu lokalisieren. Aufgrund der vielfach möglichen Zellmodelle, in denen unterschiedlich *getaggtes* Protein exprimiert werden kann, existieren verschiedene, zum Teil kontroverse Hypothesen über die zelluläre Lokalisation (**Tab. 5**):

Godoy et al. zeigten in der Immunfluoreszenz (IF) mittels Flag- (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) oder HA-Flag-*Tag* markierter Proteine, dass die SLC10A7/Slc10a7-Proteine von Mensch und Ratte in die PM embryonaler Nierenzellen (HEK293) und *X. laevis* Oozyten sortiert

werden. Zusätzlich colokalisierte eine Teilmenge des Proteins mit dem ER-Marker Calnexin, was auf eine intrazelluläre Lokalisation schließen lässt (Godoy et al., 2007). Darüber hinaus zeigten Studien von Bijsmans et al. eine intrazelluläre Lokalisierung von V5-markiertem (V5tag: GKPIPNPLLGLDST) SLC10A7 in U2OS-Osteosarkomzellen (Bijsmans et al., 2012). Ergänzend hierzu veröffentlichten Ashikov et al. 2018, dass ein V5-markiertes SLC10A7-Protein in Hela-Zellen hauptsächlich im Golgi-Apparat zu finden ist. Sie zeigten auch eine Golgi-Lokalisierung in menschlichen Fibroblasten nach lentiviraler Transfektion eines SLC10A7-V5-Konstrukts (Ashikov et al., 2018). Im Gegensatz dazu beschreiben Noppes et al., dass ein mScarlet-markiertes SLC10A7-Protein in HEK293 Zellen in intrazellulär-vesikulären Strukturen zu finden ist (Noppes et al., 2019). Für das *C. albicans* Homolog CaRch1p wird berichtet, dass das Protein in die PM sortiert wird (Jiang et al., 2012).

1.4.4 Ungeklärte Funktion

In Bezug auf die Entwicklung des phänotypischen Bildes, die Bedeutung der TV und die subzelluläre Lokalisation gibt es zusammenfassend keine klaren Aussagen. Auch ein mögliches Transportsubstrat für das SLC10A7-Protein sowie dessen exakte Rolle für den Stoffwechsel in humanen Zellen konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Es lassen sich jedoch über Studien an Patienten mit *SLC10A7*-Genmutationen sowie verschiedene *Knockout*-Modelle (Hefe, Maus, Zebrafisch) Rückschlüsse auf die Stoffwechselwege ziehen, die durch einen Mangel an SLC10A7 beeinflusst werden. Im folgenden Teil der Einleitung soll deshalb insbesondere ein Überblick über die Stoffwechselwege der zellulären Calciumhomöostase und der N-Glykosylierung geschaffen werden. Dabei wird jeweils nur auf Teilgebiete eingegangen, die sich während der Untersuchungen als relevant erwiesen. Auf den Prozess der GAG-Synthese wird – auch wenn er in Bezug auf SLC10A7 interessant erscheint – nicht eingegangen, da keine Versuche in der vorliegenden Doktorarbeit zu diesem Thema durchgeführt wurden.

| Drotain | Drotoin- | Tag-1 okalication | Zallmodall | Nachwaism at hod a | l okalisation | Autor (Jahr) |
|-------------|-------------|--------------------|-------------------------------|---|---------------------------|----------------------|
| Spezies | Tag | | | | | |
| Mensch | Flag | C-terminal | X. laevis Oozyten | IF mittels anti-Flag-Antikörper | Oozyten-PM, subplasma- | Godoy et al. (2007) |
| | | | | | membranäre Bereiche | |
| Mensch & | HA-Flag | HA: vor TMD 10 | Transfektion in HEK293 Zellen | IF mittels anti-HA- und anti-Flag-Antikörpern | PM | Godoy et al. (2007) |
| Ratte | | Flag: C-terminal | | | | |
| Mensch & | Flag | C-terminal | Transfektion in HEK293 Zellen | IF mittels anti-Flag-Antikörper, Colokalisation mittels | PM und ER | Godoy et al. (2007) |
| Ratte | | | | ER-Organellenmarker (Calnexin) | | |
| Mensch | V5 | C-terminal | Transfektion in U2OS Zellen | IF mittels anti-V5-Antikörper ohne Verwendung eines | intrazellulär, mit Golgi- | Bijsmans et al. |
| | | | | Organellen markers | Apparat ähnlicher | (2012) |
| | | | | | Verteilung | |
| Mensch | V5 | C-terminal | Transfektion in Hela Zellen | IF mittels anti-V5-Antikörper, Colokalisation mittels cis-, | cis-, medial-, trans- | Ashikov et al. |
| | | | | <i>medial-</i> und <i>trans-</i> Golgi-Apparat Organellenmarker | Golgi-Apparat | (2018) |
| Mensch | V5 | C-terminal | lentivirale Infektion in | IF mittels anti-V5-Antikörper, Colokalisation mittels | Golgi-Apparat | Ashikov et al. |
| | | | humane Fibroblasten | Organellen marker | | (2018) |
| Mensch | c-Myc | C-terminal | Transfektion in HEK293F, in | IF mittels anti-c-Myc-Antikörper | punktuelle Verteilung, in | Dubail et al. (2018) |
| | | | MG-63 und in COS-1 Zellen | | der Plasmamembran | |
| Mensch | mScarlet | C-terminal | Transfektion in HEK293-MSR | Fluoreszenzmikroskopie | vesikuläre Strukturen | Noppes et al. |
| | | | Zellen | | | (2019) |
| C. albicans | GFP | C-terminal | C. albicans | Fluoreszenzmikroskopie | PM | Jiang et al. (2012) |
| TARFILE 5 | l Übersicht | t zur subzelluläre | on Lokalisation unterschied | lich aetaaater SI C10A7-/ hzw. Ca8ch1n-Proteine | e in verschiedenen Zellmo | dellen: heschriehen |

durch die angegebenen Autoren. | ER = Endoplasmatisches Retikulum; IF = Immunfluoreszenz; k.A. = keine Angabe; MSR = Makrophagen-Scavenger-Rezeptor; 2 2 24 שכותששובו PM = Plasmamembran; TMD = Transmembrandomäne. _

1.5 ZELLULÄRE CALCIUMREGULATION

1.5.1 Bedeutung von Calcium für die Zelle

Calcium ist das am dritthäufigsten vorkommende Metall in der Natur und spielte schon evolutionär bei der Entwicklung vom Einzeller zum Vielzeller eine entscheidende Rolle: Zellen brauchten – aufgrund des ständig herrschenden Selektionsdrucks – ein Mittel, um miteinander zu kooperieren und damit auch ein Mittel, um miteinander zu kommunizieren (Carafoli and Krebs, 2016). Calcium galt in dieser frühen evolutionären Phase durch seine chemischen Eigenschaften und durch sein ubiquitäres Vorkommen als prädestiniert (Brini et al., 2013). So ist es heute, rund zwei Milliarden Jahre später, möglich, dass Calcium durch seine Funktion als second messenger eine Vielzahl an physiologischen Prozessen regelt. Dazu beispielsweise Zellproliferation, Zellteilung, Zelldifferenzierung gehören und Gentranskription. Ebenso werden Muskelkontraktion, programmierter Zelltod oder Neurotransmission durch Veränderungen der intra- und interzellulären Calciumkonzentration gesteuert (Krebs et al., 2015). Diese so unterschiedlichen Prozesse können nur deshalb ablaufen, weil die Zelle mittels räumlich und zeitlich getrennter Calciumsignale agieren kann. Exozytose an synaptischen Vesikeln wird beispielsweise innerhalb von Mikrosekunden ausgelöst, Muskelkontraktionen in wenigen Millisekunden und Prozesse der Gentranskription oder Zellproliferation können Minuten bis Stunden andauern (Berridge, 2012). Diese Vielseitigkeit der Calciumsignale hängt vom Zelltyp ab, in dem das Signal weitergegeben wird: Jede Zelle besitzt ein spezifisches, individuelles Calcium-Toolkit an Proteinen, um Signale zeitlich effizient weiterzuleiten (Berridge et al., 2000).

Gerät die zelluläre Calciumhomöostase aus dem Gleichgewicht, können daraus diverse Krankheitsbilder entstehen. Beispielsweise werden kardiale Erkrankungen, Morbus Alzheimer oder Schizophrenie mit einer Dysregulation der intrazellulären Calciumkonzentration in Verbindung gebracht (Berridge, 2012).

Folglich ist es für die Zelle überlebenswichtig, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration präzise reguliert wird. Im Ruhezustand befindliche Zellen streben eine intrazelluläre Calciumkonzentration von ca. 100 nM an (Atchison and Beierwaltes, 2013; Sukumaran et al., 2021). Aktivierte Zellen, die calciumgesteuerte Prozesse auslösen, sind jedoch durch bis zu zehnmal höhere intrazelluläre Calciumkonzentrationen gekennzeichnet (Berridge et al., 2000).

23



ABBILDUNG 5 | Übersicht zum Calciumsignaling. (A) Löst ein Stimulus ein calciummobilisierendes Signal aus, kommt es zur On-Reaktion. Calcium strömt entweder von außerhalb in die Zelle ein, oder wird aus den intrazellulären Calciumspeichern (ER, SR, Mitochondrien, Endosomen) freigesetzt. Im Zytosol agiert Calcium als Bote für verschiedene calciumsensitive Prozesse. Die anschließende Off-Reaktion sorgt mittels Pumpen und Austauschern für die Entfernung von Calcium aus dem Zytosol und stellt den ursprünglichen Ruhezustand der Zelle wieder her. Quelle: in Anlehnung an Berridge et al. (2000). (B) Schematische Übersicht zu Proteinen, die am Calciumsignaling beteiligt sind. Calcium kann von extrazellulär durch verschiedene Calciumkanäle in die Zelle eintreten. Zu ihnen gehören die spannungsgekoppelten Calciumkanäle (VOC), die hauptsächlich in erregbaren Geweben zu finden sind, die rezeptorgekoppelten Calciumkanäle (ROC), die nach Binden eines Liganden geöffnet werden, die transient receptor potential Kanäle (TRPC), die durch verschiedenste Stimuli geöffnet werden können, und die speichergesteuerten Calciumkanäle (SOC), die nach Entleerung der internen Calciumspeicher aktiviert werden und zu denen ORAI [der zusammen mit STIM den CRAC-Kanal (calcium release-activated channel) bildet] und einige TRP-Kanäle gehören. Die Entleerung der internen Speicher, wie dem ER/SR, wird durch den Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (IP₃R) / Ryanodin-Rezeptor (RyR) vermittelt. Sie lassen Calcium vom Organellenlumen ins Zytoplasma strömen und sorgen so für die zelluläre Calciumfreisetzung. Nachdem der calciumsensitive Prozess umgesetzt wurde, kommt es zur Off-Reaktion, bei der Calcium aus dem Zytoplasma entfernt wird. Dieser Prozess wird durch die drei ATPasen PMCA, SPCA und SERCA vermittelt. Zusätzlich können der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) der PM und der Mitochondriale Uniporter (MCU) des Mitochondriums für die Entfernung von Calcium aus zytoplasmatischen Kompartimenten sorgen. Quelle: in Anlehnung an Azimi et al. (2014). (C) Speichergesteuerter Calciumeintritt (SOCE) über CRAC-Kanäle. 1. Ein Ligand bindet an G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR). 2. Dies führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) spaltet. 3. Es entstehen Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). 4. Letzteres bindet an den IP₃R des ER. 5. Es kommt zur Freisetzung von Calcium aus dem ER ins Zytoplasma. 6a. Durch die Entleerung der ER-Speicher durchläuft das stromal interaction molecule 1 (STIM1) eine Konformationsänderung. 6b, 7. Es kommt zur Interaktion zwischen ORAI- und STIM-Hexameren an ER-PM-Verknüpfungsstellen. 8. Der CRAC-Kanal wird geformt und ORAI bildet die calciumdurchlässige Pore des Kanals, um Calcium von extrazellulär einströmen zu lassen. 9. Anschließend sorgt die Calcium-ATPase SERCA für das Auffüllen der ER-Calciumspeicher. Das Signal wird dann wieder beendet. Quelle: in Anlehnung an Bhardwaj et al. (2016). (D) Schema des Calciumtransportzyklus durch SERCA. Stadien der Pumpe, in denen sie eine hohe Calciumaffinität besitzt, sind in violett dargestellt. Durch die Aufnahme zweier zytoplasmatischer Calciumionen und ATP im E1-Status der SERCA-Pumpe kommt es zu ihrer Phosphorylierung. Dies führt zur Konformationsänderung der Pumpe, wodurch die hohe Calciumaffinität verloren geht. Folglich dissoziiert Calcium aus der Bindungstasche und wird ins Lumen des ER/SR abgegeben. Zwei Protonen gleichen die entstandene negative Ladung an einer Calciumbindungsstelle aus. Es kommt zur Dephosphorylierung der Pumpe, mit anschließender Deprotonierung, wodurch die Rückführung des E2- zu dem des E1-Zustands ermöglicht wird. Quelle: in Anlehnung an Espinoza-Fonseca (2019).

Es muss also fortlaufend dafür gesorgt werden, dass ein Gleichgewicht zwischen aktivierter (*= On-Reaktion*) und ruhender Zelle (*= Off-Reaktion*) hergestellt wird [**Abb. 5A**; (Berridge et al., 2003)]. Nur so kann die Zelle für neueintreffende Calciumsignale empfangsbereit bleiben (Brini et al., 2013). Eine besondere Herausforderung hierbei ist, dass die extrazelluläre Calciumkonzentration um ein Vielfaches höher ist. Sie beträgt physiologischer Weise ca. 2,2-2,6 mM (Atchison and Beierwaltes, 2013). Auch in intrazellulären Calciumspeichern, die überschüssiges Calcium bei Bedarf aufnehmen können, ist die Konzentration im Vergleich zum Zytosol um mehrere Zehnerpotenzen höher als im intrazellulären Milieu. Deshalb hat die Zelle ein System aus Transportern, Austauschern, Sensor- und Puffermolekülen entwickelt, um den Bedürfnissen verschiedener Calciumsignale gerecht zu werden [**Abb. 5B**; (Berridge et al., 2000)]. Einige wenige sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

1.5.2 On- und Off-Reaktion

Während der On-Reaktion eines Calciumsignals kommt es zur Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration. Diese kann entweder durch den Eintritt von Calcium aus extrazellulären Kompartimenten oder durch das Freisetzen von Calcium aus internen Speichern erfolgen. Der Eintritt von extrazellulärem Calcium wird durch Plasmamembrankanäle vermittelt, die sich über die Art, durch die sie aktiviert werden, in drei Gruppen einteilen lassen. Dies sind 1) spannungsabhängige Kanäle (voltage-operated channels, VOCs), 2) rezeptorgesteuerte Kanäle (receptor-operated channels, ROCs) und 3) speichergesteuerte Kanäle [store-operated channels, SOCs; (Brini et al., 2013)]. Zur letztgenannten Gruppe werden historisch gesehen zusätzlich die TRP-Kanäle (Transient Receptor Potential Channels) gerechnet, die aber nach heutigem Wissensstand über verschiedenste, auch SOC-unabhängige, Stimuli aktiviert werden können (Brini et al. 2013). Das Freisetzen von Calcium aus internen Speichern, wie dem ER – oder im Falle von Muskelzellen dem Sarcoplasmatischen Reticulum (SR) -, erfolgt hingegen durch die Wechselwirkung von Botenstoffen Rezeptoren Oberfläche mit an der der Organellenmembranen. Die beteiligten Botenstoffe können beispielsweise Calcium selbst, Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), zyklische ADP Ribose, Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat oder Sphingosin-1-phosphat sein.

Nachdem Calcium ein Signal in der Zelle ausgelöst hat, kommt es zur *Off-Reaktion*, bei der die zytoplasmatische Calciumkonzentrationen gesenkt wird. Dieser einkehrende Ruhezustand wird durch verschiedene Transporter vermittelt, die Calcium aktiv aus der Zelle

26

herausschleusen oder in zelluläre Calciumspeicher pumpen. Die Transporter können entweder in der Organellenmembran oder in der PM lokalisiert sein. Dazu gehören der mitochondriale Uniporter (MCU), die Golgi-ständige *secretory pathway calcium ATPase* (SPCA), die im ER/SR lokalisierte *sarco-/endoplasmatic reticulum calcium ATPase* (SERCA), die in der PM zu findende *plasmamembrane calcium ATPase* (PMCA) und der Natrium-Calcium-Austauscher der PM (NCX).

Im Folgenden soll auf je ein Beispiel der Calciumfreisetzung, des Calciumeintritts (*On-Reaktion*) und der Calciumaufnahme ins ER/SR (*Off-Reaktion*) eingegangen werden, da die angeführten Beispiele in Bezug auf SLC10A7 eine besondere Rolle zu spielen scheinen.

1.5.2.1 Calciumfreisetzung durch die PLC-IP₃ Signaltransduktionskaskade

Die Freisetzung von Calcium aus dem ER wird beispielsweise durch extrazelluläre Signale, wie Hormone vermittelt. Sie sorgen dafür, dass eine Gruppe von Enzymen, die Phospholipasen C (PLC), aktiviert werden. Sie werden über 1) G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren, 2) Tyrosinkinase-gekoppelte-Rezeptoren, 3) eine Erhöhung des intrazellulären Calciums oder 4) über die Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras aktiviert (Berridge et al., 2003; Decrock et al., 2013). Alle PLC haben gemein, dass sie die Spaltung des in der Zellmembran gelegenen Moleküls Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) katalysieren. Bei dieser Reaktion entstehen Diacylglycerol (DAG) und IP₃. Letzteres diffundiert ins Zytosol und bindet dort an die zytoplasmatische Seite des Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors (IP₃R) der ER-Membran. IP₃R ist ein Liganden-aktivierter Calciumkanal (Alzayady et al., 2016), der sich nach Binden des IP₃-Moleküls öffnet. Durch die bis zu 10⁴-fach höhere Calciumkonzentration des ER strömt Calcium entlang seines elektrochemischen Gradienten aus dem ER ins Zytosol. Es kommt zur Entleerung der ER-Calciumspeicher und zur Konzentrationserhöhung von Calcium im Zytosol. Die Dauer der Calciumfreisetzung ist abhängig von der Aktivierungsart der PLC und von dem Gewebetyp, in dem das Signal ausgelöst wird (Berridge et al., 2003).

Die Öffnung des IP₃R im ER ist jedoch nicht obligatorisch an IP₃ selbst gebunden. Zusätzlich können calciumbindende Proteine – unabhängig von IP₃ – durch Interaktion mit dem IP₃R für eine Öffnung des Kanals sorgen (Bootman et al., 2002). Auch pH-Wert, Phosphorylierungsstatus und Calcium- sowie ATP-Konzentrationen spielen bei der Regulation des Kanals eine Rolle (Brini et al., 2013; Decrock et al., 2013). Zusätzlich können Proteine wie Calmodulin, IRBIT (*IP₃R Binding protein released with Inositol Trisphosphate*) und FKBP12

27

(*FK506 Binding Protein 12 kDa*) die Aktivität des Kanals modulieren (Brini et al., 2013; Krebs et al., 2015).

Als strukturelles Homolog (40 % Sequenzhomologie) des IP₃R im ER ist der Ryanodin-Rezeptor (RyR) des in der Muskelzelle gelegenen SR bekannt (Krebs et al., 2015; Santulli et al., 2017). Namensgebend ist für ihn die hohe Affinität für das Pflanzenalkaloid Ryanodin (Van Petegem, 2012). RyR sitzt in der SR-Membran und ist ebenfalls ein für Calciumionen durchlässiger Ionenkanal. Die Öffnung des RyR wird durch eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration erreicht. Hierbei binden Calciumionen an Calciumsensoren im RyR selbst und es kommt zur Calcium-gesteuerten Freisetzung von Calcium ins Zytosol (Van Petegem, 2012). Calcium triggert hier also seine eigene Freisetzung. Dieses Prinzip der Calciumfreisetzung wird als *calcium-induced calcium release* (CICR) bezeichnet (Endo et al., 1970). Steigt die zytoplasmatische Calciumkonzentration im Anschluss über ein inakzeptables Niveau, sorgt Calcium jedoch in gleicherweise für ein Schließen des RyR und damit zur Beendigung seiner eigenen Freisetzung.

1.5.2.2 Calciumeintritt über speichergesteuerte Kanäle

Speichergesteuerte Calciumkanäle (SOC) können sowohl in erregbaren als auch in nichterregbaren Geweben den Eintritt von Calcium ins Zytosol der Zelle ermöglichen (**Abb. 5C**). In nicht-erregbaren Zellen sind sie die Haupteintrittspforte für Calcium (Brini et al., 2013; Nguyen et al., 2018). SOCs werden über die Entleerung der ER/SR-Calciumspeicher aktiviert und sorgen folglich für den speichergesteuerten Calciumeintritt (*store-operated calcium entry*, SOCE) in die Zelle. Wird Calcium aus den internen Speichern entfernt, sinkt die Calciumkonzentration des ER. Folgend wird ein Kanal, der *calcium release-activated calcium* (CRAC)-Kanal, in der PM geformt, der den selektiven Einstrom von Calcium in die Zelle ermöglicht. Er wird durch die beiden Proteine STIM (*stromal interaction molecule*) und ORAI [nach den in der griechischen Mythologie vorkommenden Horen (altgriechisch [°]Ωραι Hōrai) benannt, die das geregelte Leben überwachen sollen] gebildet (Brini et al., 2013; Krebs et al., 2015).

1.5.2.2.1 SOCE durch STIM und ORAI

STIM ist ein mit einer TMD in der ER-Membran verankertes Sensorprotein, das über eine luminale, am N-Terminus gelegene, calciumbindende Domäne, der EF-Hand, den Calciumgehalt des ER messen kann (Enomoto et al., 2020). Das Strukturmotiv der EF-Hand ist eine hochkonservierte Aminosäuresequenz, die erstmals während der Strukturaufklärung von

Parvalbumin entdeckt wurde (Kretsinger and Nockolds, 1973). Das Motiv setzt sich sekundärstrukturell aus zwei alpha-Helices (Helix E und Helix F) zusammen, die über eine Schleife miteinander verbunden sind. Dieser Helix-Loop-Helix Struktur ist es möglich, über ihren relativ hohen Asparagin- und Glutaminsäureanteil, Calciumionen zu binden (Gifford et al., 2007). Kommt es zur Entleerung der Calciumspeicher, dissoziiert Calcium von der EF-Hand des STIM-Moleküls. STIM durchläuft eine Reihe an Konformationsänderungen sowohl im luminalen N-Terminus als auch im zytoplasmatischen C-Terminus (Grabmayr et al., 2020). Dies resultiert in einer Oligomerisation und räumlichen Verlängerung des Proteins (Grabmayr et al., 2020). Folgend kommt es an PM-ER-Kontaktstellen zur Interaktion zwischen STIM und dem membranständigen Protein ORAI. Sechs ORAI-Monomere formen sodann ein ORAI-Hexamer, das den funktionalen ORAI-Kanal bildet, welcher schließlich Calcium selektiv ins Zellinnere strömen lässt (Grabmayr et al., 2020). Calcium wird dann durch die SERCA-Pumpe weiter aktiv ins Lumen des ER gepumpt. Der Calciuminflux über ORAI wird beendet, sobald die ER-Calciumkonzentration ein bestimmtes Level erreicht hat und die EF-Hand des STIM-Moleküls so viel Calcium gebunden hat, dass STIM in die ursprüngliche Ruhezustandskonformation zurückfällt. Folgend kommt es zur Dissoziation der STIM- und ORAI-Oligomere und der Calciumeinstrom ins Zellinnere wird beendet (Parekh, 2017). Zusätzlich kann das Signal durch zwei Mechanismen, die über negative Feedback-Regulation agieren, beendet werden: Bei der schnellen calciumabhängigen Inaktivierung kommt es in Mikrodomänen zur Erhöhung der lokalen Calciumkonzentration. Dadurch bedingt bindet Calcium in einem noch ungeklärten Prozess entweder an den CRAC-Kanal selbst oder in der Nähe des Proteins, wodurch eine schnelle Inaktivierung des Kanals erreicht wird (Parekh, 2017). Die langsame Inaktivierung des Signals wird durch die MCUs vermittelt. Die Calcium-Uniporter des Mitochondriums sorgen für eine zunächst kompensatorische Aufnahme Calciums in die Mitochondrien, so dass durch die vergleichsweise langsamere Entfernung des Calciums aus dem Zytosol der SOCE beendet wird (Parekh, 2017). Dieser Mechanismus ist jedoch zelltypspezifisch (Dagan and Palty, 2021).

Reguliert wird SOCE durch verschiedene Mechanismen wie Protein-Protein-Interaktionen zwischen STIM, ORAI und anderen Proteinen oder posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen (Srikanth et al., 2013).

1.5.2.3 Senkung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration durch SERCA

SERCA ist ein integrales Membranprotein des ER/SR. Sie gehört zu den P-Typ-ATPasen und ist somit dazu in der Lage, Calcium entgegen seinem Konzentrationsgradienten vom Zytosol ins

Lumen des ER/SR zu pumpen. Dies ist durch zwei Konformationen möglich, die das Protein annehmen kann: Einer E1-Konformation und einer E2-Konformation (**Abb. 5D**). Jeder katalytische Zyklus der Pumpe beginnt mit der E1-Konformation, bei der die hochaffinen Calciumbindungsstellen dem Zytosol zugewandt sind. In diesem E1-Status werden zwei Calciumionen gebunden sowie ein ATP-Molekül in die Nukleotidbindungstasche aufgenommen (Aguayo-Ortiz and Espinoza-Fonseca, 2020). Es kommt zur Hydrolyse von ATP und zur Phosphorylierung der SERCA. Dabei entsteht ein Komplex aus der phosphorylierten ATPase, zwei gebundenen Calciumionen und ADP (E1~P-2Ca²⁺-ADP). Dies löst eine Konformationsänderung der SERCA zum E2-Status aus, in dem Calcium nur noch mit niedriger Affinität gebunden werden kann und in dem die Calciumbindungsdomänen dem Lumen des ER/SR zugewandt sind (Vandecaetsbeek et al., 2009). Calcium dissoziiert folglich ins Lumen des ER/SR und zwei Protonen gleichen die entstandene negative Ladung an einer Calciumbindungsstelle aus. Es kommt zur Dephosphorylierung mit anschließender Deprotonierung der Pumpe, um die Rückführung vom E2- zum E1-Zustand zu ermöglichen (Espinoza-Fonseca, 2021).

SERCA wird im Vertebraten durch drei Gene codiert (*ATP2A1-3*). Zusätzlich entstehen durch alternatives Spleißen über zehn verschiedene SERCA-Isoformen (SERCA1a-b, SERCA2a-d, SERCA3a-f), die gewebe- und speziesspezifisch exprimiert werden (Primeau et al., 2018). SERCA1 wird beispielsweise in neonatalen und adulten Skelettmuskelzellen exprimiert, SERCA2a in Herzmuskel-, Skelettmuskel- und glatten Muskelzellen. SERCA3 wird in der Lunge, in Endothelzellen, in Purkinje-Zellen des Gehirns und Beta-Zellen des Pankreas exprimiert. Als einzige Isoform, die ubiquitär in allen Zelltypen vorkommt, zählt die Isoform SERCA2b (Chemaly et al., 2018).

SERCA besitzt zehn TMD mit zytoplasmatischem C-Terminus. Die Ausnahme bildet auch hier SERCA2b: Durch einen 49 Aminosäuren längeren C-Terminus erhält das Protein elf statt zehn TMD. Der C-Terminus verlagert sich so auf die gegenüberliegende, luminale Seite der Organellenmembran, was SERCA2b die höchste Calcium-Affinität aller SERCA-Isoformen verleiht und dieser Isoform gleichzeitig eine regulatorische Einheit zur Verfügung stellt (Zhang et al., 2020; Rathod et al., 2021). Im Gegensatz dazu werden SERCA1a und SERCA2a über kleine regulatorische Transmembran-Untereinheiten reguliert. Zu ihnen gehören die sog. Reguline Phospholamban und Sarcolipin, die gewebespezifisch exprimiert werden. Sie setzen nach Interaktion mit SERCA dessen Calciumaffinität herab, indem sie die Rückführung von der

30

E2- zur E1-Konformation verhindern (durch Phospholamban) oder SERCA in einem intermediären Stadium zwischen E1- und E2-Konformation gefangen halten (durch Sarcolipin). Sie verursachen folglich eine Inhibition der Pumpe. Diese Inhibierung kann erst wieder aufgehoben werden, sobald Phospholamban oder Sarcolipin selbst modifiziert werden. Dies geschieht durch Phosphorylierung der Proteine mittels verschiedener Kinasen (wie PKA, CaMKII, PKB und STK16). Zusätzlich wird die Inhibierung durch erhöhte zytoplasmatische Calciumkonzentrationen aufgehoben, damit SERCA auf eintreffende Stimuli reagieren kann (Gorski et al., 2017; Rathod et al., 2021).

Kürzlich wurden sechs weitere Reguline entdeckt, die die Aktivität von SERCA modulieren können. Dazu zählen *Myoregulin, DWARF open reading frame, Endoregulin* und *Another-Regulin*. Interessanterweise besitzt *DWARF open reading frame* als einziges Transmembranpeptid die Eigenschaft, SERCA zu aktivieren (Rathod et al., 2021).

Alle SERCA-Isoformen haben gemein, dass sie in subnanomolaren bis niedrig nanomolaren Konzentrationen durch das Pflanzenalkaloid Thapsigargin (TG) nicht-kompetitiv spezifisch gehemmt werden (Primeau et al., 2018). TG bindet irreversibel im E2-Zustand der Pumpe und macht es ihr unmöglich, weiteres Calcium zu transportieren. Daraus resultiert eine Entleerung der ER/SR-Calciumspeicher, gekoppelt mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Jaskulska et al., 2020).

Der zelluläre Calciumhaushalt ist also ein hochkomplexer, feinregulierter Prozess, der außer Kontrolle geraten kann, sobald eine der beteiligten Komponenten im unphysiologischen Ausmaß verändert wird. Die Auswirkungen auf die Zelle und beeinflusste Stoffwechselwege sind deshalb immer schwierig *en detail* vorherzusagen.

31

1.6 GLYKOSYLIERUNG

Zu den post- und cotranslationalen Modifikationen im Zuge der Proteinbiosynthese gehört die Glykosylierung, also die Anknüpfung von Kohlenhydratketten an neugebildete Proteine bzw. andere zelluläre Strukturen. Weitere posttranslationale Modifikationen sind beispielsweise die Phosphorylierung, die Sulfatierung oder die Methylierung. Sie lassen sich im gesamten phylogenetischen Spektrum, von Archaeen und Eubakterien bis hin zu hochentwickelten Eukaryoten, wie dem Menschen, finden – und das in jedem vorkommenden Zelltyp (Peanne et al., 2013). Die Glykosylierung (griechisch "glykós" = "süß") ist ein Prozess, bei dem Monooder Polysaccharidketten kovalent an Proteine oder Lipide gebunden werden (Peanne et al., 2013). Durch diesen Prozess entstehen Glykokonjugate (in Form von Glykoproteinen, Glykolipiden, Proteoglykanen oder Glykosylphosphatidylinositol-Ankern), die durch ihre Markierung viele verschiedene physikalische, biologische und biochemische Eigenschaften bekommen (Goreta et al., 2012). Beispielsweise beeinflusst eine Glykosylierung die Lokalisierung eines bestimmten Proteins in der Zelle, schützt vor Proteaseabbau oder trägt zur Regulation der Immunantwort bei (Goreta et al., 2012). Durch diese post- und cotranslationalen Modifikationen ist es einem Organismus möglich, nicht nur Informationen mittels des genetischen Codes weiterzugeben, sondern auch durch Modifikationen der Proteine und ihrer Kohlenhydratketten. Hierfür wurden die Begriffe Proteom bzw. Glykom geprägt (Eichler, 2019; Copoiu and Malhotra, 2020).

Die Glykosylierung von Proteinen ist im Eukaryoten ein zweistufiger Prozess, bei dem in einem ersten Schritt Oligosaccharide an einen Lipidträger in der ER-Membran (Dolicholphosphat, Dol-P) gebunden und diese in einem zweiten Schritt auf einen Aminosäurerest eines Polypeptids übertragen werden (Aebi, 2013). Im Säuger werden verschiedene Unterformen der Glykosylierung differenziert: die N-, O-, C- und P-Glykosylierung (Krieg et al., 1997; Maynard et al., 2016; Caval et al., 2021). An dieser Stelle soll jedoch nur auf die erstgenannte N-Glykosylierung eingegangen werden, da diese für SLC10A7 von Bedeutung zu sein scheint. N- und O-Glykane unterscheiden sich prinzipiell in ihrem Syntheseort, der kovalenten Bindung am Protein und der Verzweigung ihrer Saccharidketten. Glykane erhalten ihren Namen durch die funktionelle Gruppe der Aminosäure, an die sie kovalent gebunden werden. N-Glykane werden deshalb immer an die Amidgruppe (*N*-Atom) der Aminosäure Asparagin geknüpft, sofern in der Proteinsequenz die Sequenzabfolge Asp-X-Ser/Thr vorhanden ist. O-Glykane werden entsprechend an die Hydroxylgruppe (*O*-Atom) der Aminosäuren Serin oder Threonin gebunden (Stanley et al., 2015).

1.6.1 N-Glykosylierung

Mit Hilfe der N-Glykosylierung werden N-Glykane gebildet. Sie stellt die häufigste Form der Glvkosvlierung dar und ist hauptsächlich bei sekretorischen Proteinen und Transmembranproteinen zu finden (Peanne et al., 2013). N-Glykane können aus den Kohlenhydraten Glucose (Glc), Galactose (Gal), Mannose (Man), N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalactosamin (GalNAc), Fucose (Fuc) und Sialinsäure (Sia) aufgebaut sein. Die Bildung der Glykane startet während der Proteintranslation im ER und wird im Golgi-Apparat weitergeführt. Während des Prozesses sind über 200 verschiedene Enzyme beteiligt, wobei Glykosyltransferasen und Glucosidasen den größten Teil ausmachen (Stanley et al., 2015; Schjoldager et al., 2020). Je nach Zelltyp und physiologischem Zustand der Zelle werden verschiedene Glykosylierungsenzyme exprimiert und aktiviert, so dass es der Zelle möglich ist, spezifische Glykanketten situationsbedingt zu synthetisieren (Stanley et al., 2015). Die drei Hauptgruppen an N-Glykanen, die gebildet werden können, sind mannosereiche, Hybrid-Glykane und komplexe Glykane [Abb. 6A (Elbein, 1984)].



ABBILDUNG 6 | N-Glykosylierung. (A) Übersicht zu den drei unterschiedlichen Strukturen der N-Glykane. Alle N-Glykane bestehen aus einer Core-Struktur, die durch eine Kette aus zwei GlcNAc und drei Man gebildet wird. Bei mannosereichen Strukturen wird die Kette ausschließlich mit Man-Resten verlängert. Hybrid-Glykane entstehen, wenn GlcNAcMan₅GlcNAc₂ nicht weiter durch die Enzyme MAN2A1 oder MAN2A2 prozessiert wird. Folglich kann kein GlcNAc an den Man-α1-6-Arm des Glykans angeknüpft werden, was für eine weitere Verlängerung des Arms zur komplexen Struktur nötig wäre. Komplexe Strukturen können bis zu sechs Verzweigungen tragen, die alle an einem GlcNAc-Rest entspringen. | Quelle: in Anlehnung an Stanley et al. (2015). Die Synthese (**Abb. 6B**) aller N-Glykantypen beginnt im Zytosol mit der Übertragung von N-Acetylglucosamin-1-phosphat (GlcNAc-1-P), das von dem aktivierten Nukleotidzucker Uridindiphosphat-GlcNAc (UDP-GlcNAc) stammt, auf einen Dol-P-Anker in der ER-Membran. Es entsteht GlcNAc-P-P-Dol. Dieser erste Schritt wird durch das Enzym Dolichylphosphat-Nacetylglucosaminphosphotransferase 1 (DPAGT1) katalysiert und kann spezifisch durch die Substanz Tunicamycin inhibiert werden, sofern die N-Glykansynthese in Zellen *in vitro* unterdrückt werden soll (Stanley et al., 2015).

Dolichole sind eine Klasse polymerisierter Isopren-Moleküle, die durch ihren lipophilen Charakter in zellulären Membranen sitzen können. Durch ihre funktionelle Hydroxylgruppe, die zur zytoplasmatischen Seite der ER-Membran ragt, können Kondensationsreaktionen ablaufen, die zur Bildung des phosphorylierten Dol-P führen (Welti, 2013).

Die Synthese einer Glykankette wird mit der Übertragung aktivierter Monosaccharide, wie UDP-GlcNAc und Guanosindiphosphat-Man (GDP-Man), durch eine GlcNAc- (ALG13) und diverse Mannosyltransferasen auf GlcNAc-P-P-Dol fortgeführt (Peanne et al., 2013; Schjoldager et al., 2020). Sobald diese Transferasen die Übertragung der Monosaccharide zu dem Vorläufermolekül Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol abgeschlossen haben, kommt es mittels der RFT1-Flippase zur Umlagerung des Moleküls von der zytoplasmatischen Seite zur luminalen Seite der ER-Membran (Peanne et al., 2013). Im Lumen übertragen andere Mannosyl- und Glykosyltransferasen weitere Monosaccharide auf das Vorläufermolekül, bis eine Kette aus Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol entstanden ist. Die hier zur Verfügung gestellten Monosaccharide sind jedoch nicht mehr an Nukleotide gebunden, sondern werden durch Dol-P bereitgestellt. Die Glc₃Man₉GlcNAc₂-Kette wird anschließend cotranslational durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST) en bloc auf den Asparagin-Rest eines Proteins übertragen. Der Dol-P-P-Anker verbleibt dabei in der ER-Membran (Stanley et al., 2015). An dieser Stelle entstehen Glykane des mannosereichen Typs, deren verlängerte Äste nach der Core-Struktur rein aus Man als Kohlenhydrat bestehen. Die weitere Reifung des Glykans zu Hybrid-Strukturen oder komplexen Strukturen findet zunächst im ER statt, wo spezifische Glucosidasen (α -Glucosidase I und II) und eine ER-ständige Mannosidase (MAN1B1) Glc bzw. Man als Monosaccharide von den verzweigten Glykanstrukturen abspalten (Moremen et al., 2014). Es entsteht Man₈GlcNAc₂ (Stanley et al., 2015). Neuere Studien geben jedoch für MAN1B1 an, dass das Enzym hauptsächlich im Golgi-Apparat anstelle des ER lokalisiert ist und dort für die weitere Prozessierung der Glykankette sorgt (Pan et al., 2011; Jin et al., 2018).



ABBILDUNG 6 | N-Glykosylierung. (B) Schematische Übersicht zur N-Glykosylierungskaskade. Sie beginnt auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran und wird im Lumen des ER fortgeführt.



sie folgend weiter prozessiert werden | Quelle: in Anlehnung an Marquardt (2020).

Durch Transportvesikel wird das Protein inklusive seiner noch unreifen Glykanstruktur in das *cis*-Kompartiment des Golgi-Apparats transportiert, bevor es dort durch die Mannosidasen MAN1A1, MAN1A2 und MAN1C1 weiter prozessiert wird, bis eine Intermediärstruktur aus Man₅GlcNAc₂ entstanden ist (Jin et al., 2018). Diese wird im medialen Kompartiment des Golgi-Apparates durch die Enzyme GlcNAc-Transferase I (MGAT1) und MAN2A1 oder MAN2A2 weiter prozessiert, so dass GlcNAcMan₃GlcNAc₂ entsteht. Durch die Aktivität des Enzyms GlcNAc-Transferae II (MGAT2) entsteht die Vorläuferstruktur GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂. Sie ist die Grundstruktur aller komplexen biatennären N-Glykane. Diese können durch weitere Enzyme und die Verknüpfung weiterer Monosaccharide beliebig verlängert werden. Eine der häufigsten Modifikationen ist die Verlängerung der Äste durch Gal, mit Hilfe der Galactosyltransferase I (B4GALT1). Diese lässt sich sowohl bei Glykanen des komplexen als auch des Hybridtyps finden.

Hybrid-Glykane entstehen hingegen, wenn GlcNAcMan₅GlcNAc₂ nicht weiter durch MAN2A1 oder MAN2A2 prozessiert wird (Stanley et al., 2015). Folglich kann kein GlcNAc an den Man- α 1-6-Arm des Glykans angeknüpft werden, was für eine weitere Verlängerung des Arms zur komplexen Struktur nötig wäre. Der durch GlcNAc verlängerte Man- α 1-3-Arm hingegen kann durch weitere Monosaccharidanknüpfungen, ähnlich der komplexen Glykane, verlängert werden.

Als terminales Monosaccharid einer Zuckerkette können hauptsächlich bei komplexen N-Glykanen Sia, Fuc, Gal oder Sulfate hinzugefügt werden (Stanley et al., 2015). Diese werden durch Transferasen auf die entsprechenden Zuckerketten übertragen. Beispielsweise wird Sia, die von der aktivierten Form Cytidinmonophosphat-Sia (CMP-Sia) stammt, durch Sialyltransferasen auf endständige Gal, GalNAc oder andere Sia-Reste übertragen (Hombu et al., 2021). Beim Menschen werden entsprechend der kovalenten Bindungen, die an den Glykanketten gebildet werden, vier Subfamilien an Sialyltransferasen unterschieden [ST3GAL(1-6), ST6GAL(1-2), ST6GALNAC(1-6) und ST8SIA(1-6)]. Anhand des Namens der Sialyltransferasen lässt sich ableiten, welche glykosidische Bindung die Enzyme katalysieren werden: Beispielsweise ist ST3GAL dazu in der Lage, Sia auf die 3. OH-Gruppe von Gal zu transferieren (Hombu et al., 2021). ST6GAL kann entsprechend Sia auf die 6. OH-Gruppe eines Gal-Rests und ST6GALNAC Sia auf die 6.OH-Gruppe von GalNAc übertragen. Durch ST8SIA kann Sia an die 8. OH-Gruppe eines weiteren Sia-Moleküls transferiert werden (Grewal et al., 2021). Folglich entsteht bei komplexen Glykanen eine Vielfalt an Strukturen, die sich in der Anzahl ihrer verzweigten Äste, ihrer Zusammensetzung, ihrer Länge, den Grundstrukturmodifikationen und den terminalen Zuckerresten unterscheiden (Stanley et al., 2015).

Für die Bereitstellung der Monosaccharide, die im Golgi-Apparat benötigt werden, sind verschiedene Membrantransporter verantwortlich. Beispielsweise SLC35C1, SLC35A2 und SLC35A1, die aktivierte Fuc, Gal bzw. Sia zur Verfügung stellen (Hullen et al., 2021; Li and Mukhopadhyay, 2021). Zusätzlich zu den genannten Proteinen spielen weitere Transporter eine entscheidende Rolle für den korrekten Ablauf der Glykosylierung, da sie für die richtige lonenhomöostase und den richtigen pH-Wert während der Glykanprozessierung sorgen. Beispielsweise wurde vor kurzem beschrieben, dass das Transmembranprotein 165 (TMEM165) eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Mangan-Calcium-Homöostase während der Glykosylierung im Golgi-Apparat spielt (Lebredonchel et al., 2019). Ursächlich ist hierbei die Notwendigkeit der Ionen Mangan und Calcium als Cofaktor für diverse Glykosylierungsenzyme, wie B4GALT1 oder B4GALT2 (Houdou et al., 2019).

1.6.2 Angeborene Glykosylierungsstörungen

Angeborene Glykosylierungsstörungen (*Congenital Disorders of Glycosylation*, CDG) sind Erkrankungen, bei denen Synthese oder Anheftung von Glykanen an Proteine oder Lipide gestört sind (Ondruskova et al., 2021). Verursacht wird dieser Effekt durch Mutationen in Genen, die für Glykosyltransferasen, Glykosidasen oder Zuckertransporter kodieren (Peanne et al., 2018). Zusätzlich können eine fehlerhafte Monosaccharidsynthese, ein gestörter vesikulärer Transport, eine gestörte Ionenhomöostase und ein veränderter pH-Wert in Zellorganellen zur CDG führen (Peanne et al., 2018; Ondruskova et al., 2021).

Seit wenigen Jahren existiert ein Nomenklatursystem, bei dem die Benennung der CDG-Erkrankung systematisch erfolgt: Der Genname des defekten Proteins wird der Bezeichnung *CDG* vorangestellt, sodass eindeutig erkennbar ist, um welchen Subtyp der CDG es sich handelt. Historisch gesehen werden die Erkrankungen in zwei Unterkategorien eingeteilt: CDG-I und CDG-II. Sie beziehen sich auf den Zeitpunkt, bis zu welchem das defekte Enzym bzw. Protein während der Glykansynthese eine Rolle spielt. Alle Biosynthesedefekte der Dolverknüpften Glykankette bis einschließlich der Übertragung durch den OST-Komplex werden als CDG-I bezeichnet, alle weiteren als CDG-II (Marquardt, 2020).

38

Bisher sind über 150 verschiedene CDG-Erkrankungen bekannt, von denen die meisten die N-Glykansynthese betreffen (Verheijen et al., 2020). Nichtsdestotrotz können auch die O-Glykosylierung und die Bildung von Glycosphingolipiden und Glykosylphosphatidylinositolankern gestört sein. Insgesamt handelt es sich bei den angeborenen Glykosylierungsstörungen um seltene Erkrankungen, mit nur wenigen Fallberichten pro betroffenem Gen (Peanne et al., 2018; Verheijen et al., 2020). Die Diagnosestellung gestaltet sich nicht nur auf Grund der Seltenheit schwierig, sondern auch aufgrund des breiten klinischen Bildes, mit dem sich die Patienten präsentieren: Multiple Organerkrankungen und die Ausbildung heterogener Phänotypen können auftreten, wobei sich die häufigsten Symptome in erheblichen Wachstums- und psychomotorischen Entwicklungsstörungen äußern (Dulary et al., 2017; Bruneel et al., 2020). Bei Verdacht auf CDG, als vorliegende Erkrankung, werden Zellen oder Blutproben betroffener Patienten auf Biomarker untersucht. Bei auffälligen Befunden wird anschließend das gesamte kodierende Genom auf genetische Defekte gescannt (mittels WES), um einen möglichen Gendefekt in einem der Kandidatengene zu identifizieren (Bruneel et al., 2020). Einer der zu charakterisierenden Biomarker ist beispielsweise Serumtransferrin, welches bei CDG-Erkrankung eine veränderte N-Glykosylierung erkennen lässt. Physiologischerweise besitzt Transferrin zwei N-Glykosylierungsstellen an der Aminosäure Asparagin, die jeweils eine Glykanstruktur des komplexen Typs tragen. Diese schließen terminal mit je zwei negativ geladenen Sia-Resten ab (Tetra-Sialotransferrin). Ist die Glykansynthese aufgrund einer CDG-Erkrankung gestört, kommt es zur prozentualen Abnahme von Tetra-Sialotransferrin. Ist ein Enzym vor der Übertragung des Oligosaccharids auf das Protein betroffen (CDG-I), resultiert dies in Transferrin, das insgesamt nur noch zwei oder gar keine Sia-Reste trägt (2-Sialo- oder Asialotransferrin). Sind die Schritte nach der Übertragung des Glykans durch den OST-Komplex betroffen (CDG-II), können Tri-Sialotransferrin oder Asialotransferrin entstehen (Bruneel et al., 2020). Die unterschiedlich glykosylierten Formen des Transferrins führen durch ihre veränderte Ladung zu einem anderen Verhalten in der isoelektrischen Fokussierung und geringeren Proteinmassen in Western-Blot-Analysen und können folglich eine CDG-Erkrankung detektieren. Zusätzlich zu Transferrin kann Haptoglobin aus Blutproben als diagnostischer Biomarker einer CDG-Erkrankung verwendet werden (Bruneel et al., 2017). Haptoglobin besitzt vier Glykosylierungsstellen und ist aufgrund dieser Komplexität weniger für ladungsbasierte Trennverfahren geeignet als für Trennverfahren, die sich unterschiedliche molekulare Massen zu Nutze machen [Western Blot; (Bruneel et al., 2020)]. Ist eine Veränderung der molekularen Masse von Haptoglobin zu sehen, spricht dies für eine gestörte N-Glykansynthese des Typs CDG-I. Neben den beiden genannten Methoden ist zusätzlich die MS-Analyse von Glykanketten möglich (Chang et al., 2018; Wada, 2020). Diese Methode ist zwar aufgrund der Komplexität der CDG-Erkrankungen noch nicht für die standardmäßige klinische Diagnosestellung etabliert, eignet sich aber in der Forschung für die Untersuchung veränderter Glykosylierungsmuster (Casetta et al., 2020).

Die frühe Diagnosestellung einer CDG-Erkrankung ist insofern von Bedeutung, als dass zumindest einige wenige dieser angeborenen Erkrankungen symptomatisch behandelt werden können (Ondruskova et al., 2021). Beispielsweise können einige Symptome von Patienten mit Phosphomannose-Isomerase-CDG durch Man-Supplementierung ausgeglichen werden. Das Enzym sorgt im physiologischen Zustand der Zelle für die Umwandlung von Fructose-6-phosphat zu Mannose-6-phosphat, bevor dieses für die Synthese der N-Glykane zur Verfügung gestellt wird (Marquardt, 2020). Folglich kann durch Supplementierung des Zuckers Man dieser Mangel ausgeglichen werden. Patienten, die mit oraler Mannosegabe behandelt werden, zeigen verbesserte klinische Symptome in Form von verminderten Koagulopathien, einer Verbesserung gastrointestinaler Beschwerden und einem Ausgleich der Hyperglykämie (Ondruskova et al., 2021). Auch die Veränderungen im Serumtransferrin werden nach Behandlung mit Man ausgeglichen (Peanne et al., 2018).

2 PUBLIKATIONEN UND EIGENANTEIL

Dieser Doktorarbeit liegen die beiden folgenden in englischer Sprache verfassten Publikationen zu Grunde (Volltext siehe Anhang).

2.1 PUBLIKATION #1

The orphan solute carrier SLC10A7 is a novel negative regulator of intracellular calcium signaling

Emre Karakus, Marie Wannowius, Simon Franz Müller, Silke Leiting, Regina Leidolf, Saskia Noppes, Stefan Oswald, Martin Diener, Joachim Geyer

Scientific Reports, volume 10, Article number: 7248 (2020); doi: 10.1038/s41598-020-64006-3

Abstract

SLC10A7 represents an orphan member of the Solute Carrier Family SLC10. Recently, mutations in the human SLC10A7 gene were associated with skeletal dysplasia, amelogenesis imperfecta, and decreased bone mineral density. However, the exact molecular function of SLC10A7 and the mechanisms underlying these pathologies are still unknown. For this reason, the role of SLC10A7 on intracellular calcium signaling was investigated. SLC10A7 protein expression was negatively correlated with store-operated calcium entry (SOCE) via the plasma membrane. Whereas SLC10A7 knockout HAP1 cells showed significantly increased calcium influx after thapsigargin, ionomycin and ATP/carbachol treatment, SLC10A7 knockout cells and lower in the SLC10A7-overexpressing cells. The SLC10A7 protein co-localized with STIM1, Orai1, and SERCA2. Most of the previously described human SLC10A7 mutations had no effect on the calcium influx and thus were confirmed to be functionally inactive. In the present study, SLC10A7 was established as a novel negative regulator of intracellular calcium signaling that most likely acts via STIM1, Orai1 and/or SERCA2 inhibition. Based on this, SLC10A7 is suggested to be named as negative regulator of intracellular calcium signaling (in short: RCAS).

2.1.1 Darstellung des Eigenanteils

Bei dieser Veröffentlichung war ich an der Durchführung der Experimente zur Typisierung der etablierten Zelllinien, insbesondere in Form von PCR und Echtzeit-PCR, beteiligt. Zusätzlich wurden die Versuche zur Gewebeexpression der *SLC10A7*-Transkriptvarianten und das intrazelluläre Calcium-Assay-Kit mit Hilfe von Regina Leidolf bzw. Silke Leiting von mir durchgeführt. Bioinformatische Informationen, wie das Multispezies-Alignment, die Vergleiche der Transkriptvarianten und die Mutationslokalisationen, wurden von mir analysiert und graphisch dargestellt. Bei der Manuskripterstellung war ich am Verfassen des Material- und Methodenteils sowie an der Erstellung des *Supplementary Materials* beteiligt.

2.1.2 Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben durch die Coautoren

Da bereits bei Publikation der Arbeit die Richtigkeit der Angaben von allen Autoren in den *authors' contributions* bestätigt wurde, wird an dieser Stelle auf eine Unterschrift aller Mitwirkenden verzichtet. Stellvertretend bescheinigt hier der Seniorautor Prof. Dr. Joachim Geyer den unter 2.1.1 aufgeführten Eigenanteil an der Publikation.

19.9m/

Prof. Dr. Joachim Geyer

Institut für Pharmakologie und Toxikologie Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen

2.2 PUBLIKATION #2

Functional Analysis of Rare Genetic Variants in the Negative Regulator of Intracellular Calcium Signaling RCAS/SLC10A7

Marie Wannowius, Emre Karakus, Joachim Geyer

Frontiers in Molecular Biosciences. 8:741946; doi: 10.3389/fmolb.2021.741946

Abstract

The solute carrier family 10 member SLC10A7 is a negative regulator of intracellular calcium signaling (RCAS). In cell culture, SLC10A7 expression is negatively correlated with storeoperated calcium entry (SOCE) via the plasma membrane. SLC10A7-deficient cells have significantly increased calcium influx after treatment with thapsigargin for depletion of ER calcium stores, whereas SLC10A7/RCAS overexpression limits calcium influx. Genetic variants in the human SLC10A7 gene are associated with skeletal dysplasia and amelogenesis imperfecta and reveal loss of function on cellular calcium influx. More recently, an additional disease-related genetic variant (P303L) as well as some novel genetic variants (V235F, T221M, I136M, L210F, P285L, and G146S) have been identified. In the present study, these variants were expressed in HEK293 cells to study their subcellular localization and their effect on cellular calcium influx. All variants were properly sorted to the ER compartment and closely co-localized with the STIM protein, a functional component of SOCE. The variants P303L and L210F showed significantly reduced effects on cellular calcium influx compared to the wild type but still maintained some degree of residual activity. This might explain the milder phenotype of patients bearing the P303L variant and might indicate disease potential for the newly identified L210F variant. In contrast, all other variants behaved like the wild type. In conclusion, the occurrence of variants in the SLC10A7 gene should be considered in patients with skeletal dysplasia and amelogenesis imperfecta. In addition to the already established variants, the present study identifies another potential disease-related SLC10A7/RCAS variant, namely, L210F, which seems to be most frequent in South Asian populations.

2.2.1 Darstellung des Eigenanteils

Bei dieser Veröffentlichung war ich am Studiendesign, insbesondere in Bezug auf die Auswahl der analysierten SLC10A7-Varianten, beteiligt. Alle dargestellten Experimente habe ich durchgeführt und mithilfe von Dr. Emre Karakus und Prof. Dr. Joachim Geyer ausgewertet und graphisch dargestellt. Dabei war ich für die Kultivierung der Zellen und die Generierung der neu analysierten Varianten verantwortlich. Bei der Manuskripterstellung war ich insbesondere bei dem Material- und Methodenteil, dem Ergebnisteil und dem Diskussionsteil beteiligt.

2.2.2 Bescheinigung der Richtigkeit der Angaben durch die Coautoren

Da bereits bei Publikation der Arbeit die Richtigkeit der Angaben von allen Autoren in den *authors' contributions* bestätigt wurde, wird an dieser Stelle auf eine Unterschrift aller Mitwirkenden verzichtet. Stellvertretend bescheinigt hier der Seniorautor Prof. Dr. Joachim Geyer den unter 2.2.1 aufgeführten Eigenanteil an der Publikation.

19. gr

Prof. Dr. Joachim Geyer

Institut für Pharmakologie und Toxikologie Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen

3 DISKUSSION

3.1 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, einen Beitrag zur molekularen und funktionellen Charakterisierung des *Orphan Carriers* SLC10A7 zu leisten. Über eine lange Zeitspanne nach der Erstklonierung (Zou et al., 2005) und funktionellen Abgrenzung des Transporters zu anderen Mitgliedern seiner Familie (Godoy et al., 2007) konnte nicht viel zur Beschreibung des Proteins beigetragen werden. Zwar wurde aus Homologiemodellen in den Hefen *C. albicans* und *S. cerevisiae* ein erster Hinweis auf die Calciumhomöostase als beteiligten Stoffwechselweg gezogen (Jiang et al., 2012; Alber et al., 2013; Zhao et al., 2016), jedoch wurde die Charakterisierung des Proteins in humanen Zellen nicht weiterverfolgt. Erst Jahre später wurde das Protein förmlich wiederentdeckt: Dubail et al. und Ashikov et al. beschrieben erstmals den Phänotypen humaner Patienten mit *SLC10A7*-Genmutation (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018). Diese Beschreibung wurde kurze Zeit später durch die Arbeit von Laugel-Haushalter et al. ergänzt (Laugel-Haushalter et al., 2019).

Bis heute ist jedoch nicht vollständig verstanden, was die physiologische Rolle von SLC10A7 im zellulären Stoffwechsel ist sowie was die Auswirkungen der Malfunktion des SLC10A7-Proteins, die aus der Genmutation des *SLC10A7*-Gens resultieren muss, vollumfänglich für die Zelle und den Organismus bedeuten.

Basierend darauf sollte in der vorliegenden Dissertation die Bedeutung von SLC10A7 auf molekularer und zellulärer Ebene geklärt werden. Dafür wurden Zellkulturmodelle entwickelt, mit denen sich ein SLC10A7-Defekt und eine SLC10A7-Überexpression simulieren lassen. Durch Vergleiche der Eigenschaften dieser Zellen lassen sich Rückschlüsse auf die Wildtyp-Funktion des Proteins ziehen. Die Modelle sollten dabei die Ergebnisse von Dubail et al., Ashikov et al. und Laugel-Haushalter et al. aufgreifen und weiterführen, insbesondere Bezug nehmend auf die potenziellen Eingriffe von SLC10A7 in die Stoffwechselwege des Calciumhaushalts und der N-Glykansynthese. Der Stoffwechselweg zur GAG-Synthese sollte aufgrund seiner Komplexität und der nicht umsetzbaren Translation in das verwendete Zellkulturmodell ausgelassen werden.

Dabei sollten in einem ersten Vorhaben (**Publikation #1**) 1) die Hypothesen aus den vorangegangenen Publikationen explizit im humanen Zellkulturmodell bestätigt werden

(erhöhte Calciumkonzentration bei SLC10A7-Defizienz), 2) die beeinflussten Calciumsignalwege mittels spezifischer Inhibitoren identifiziert werden (SOCE) und 3) potenzielle Interaktionspartner genannt werden (STIM, ORAI, SERCA). Zusätzlich sollte 4) der Einfluss, der in Patienten auftretenden Mutationen, in diesem Modell untersucht werden ($\Delta 9$, Δ10, Δ9+10, G112D, L74P, G130R). In einem zweiten Vorhaben (Publikation #2) sollten 5) weitere Schlüsse über die potenziellen Interaktionspartner gezogen werden, um sie ggf. einzugrenzen (STIM, SERCA) oder auszuschließen (ORAI). Zusätzlich sollten 6) weitere Mutationen, die von verschiedenen Datenbanken als funktionell beeinträchtigend eingestuft werden, im Zellmodell untersucht werden. Dies sollte eine prädiktive Aussage über den Phänotypen der Mutationen tragenden Patienten ermöglichen, sobald diese Mutationen biallelisch auftreten (V235F, T221M, I136M, L210F, P285L, G146S, P303L). Außerdem sollte sich 7) erneut der subzellulären Lokalisierung des Proteins sowie dessen Gewebeexpression gewidmet werden, da bisher uneinheitliche Ergebnisse darüber in der Literatur beschrieben wurden. In weiteren unveröffentlichten Versuchen sollten zudem Unterschiede in Zellen mit SLC10A7-Defizienz zu Wildtypzellen in Bezug auf die N-Glykansynthese festgestellt werden.

3.2 METHODIK

Als ein erster Punkt, um sich der Zielsetzung dieser Doktorarbeit zu widmen, galt die Entwicklung und Etablierung eines geeigneten Modells, mit dem spätere Versuche geplant und durchgeführt werden konnten. Als geeignetes Tool kristallisierte sich die Zellkultur heraus. Durch Modifikationen von Wildtypzellen (wie z.B. durch *Knockout, Knockdown* oder Mutation des Zielgens) lassen sich Vergleiche zwischen Wildtyp- und modifizierten Zellen anstellen, die durch unterschiedliche zelluläre Eigenschaften, Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des Zielproteins zulassen. Deshalb wurden während dieser Doktorarbeit Hap1- und HEK293-Zellmodelle etabliert, die durch *Knockout* bzw. Überexpression des *SLC10A7*-Gens modifiziert und auf ihr Verhalten in der Calciumhomöostase und der Glykosylierung hin untersucht wurden.

Durch die hohe Konservierung von SLC10A7 im gesamten phylogenetischen Spektrum ist es jedoch möglich, nicht nur das humane Protein, sondern auch homologe Proteinverwandte aus anderen Spezies, wie Mäusen oder Zebrabärblingen, zu untersuchen, um Rückschlüsse auf deren Funktion zu ziehen. Auch Organsimen wie Hefen eignen sich zur Charakterisierung des homologen Proteins. Im Folgenden werden deshalb kurz die bereits vorhandenen SLC10A7-Modelle aus *C. albicans, S. cerevisiae*, Mäusen und Zebrabärblingen beschrieben, bevor auf das während dieser Doktorarbeit entwickelte Zellkulturmodell eingegangen wird.

3.2.1 Existierende Modelle

3.2.1.1 Hefemodelle

Jiang et al. bedienten sich der Möglichkeit der funktionellen Aufklärung von SLC10A7 näherzukommen, in dem sie Versuche an einem homologen Protein der Pilzzelle (CaRch1p) durchführten. Im Hefemodell mit *C. albicans* konnten sie funktionelle Unterschiede zwischen Wildtyp- und *CaRCH1-Knockout*-Zellen zeigen. Demnach kam es bei *CaRCH1*-defizienten Hefen zu einer erhöhten Calciumaufnahme und damit einhergehend zu erhöhten zytoplasmatischen Calciumkonzentrationen verbunden mit einer Überempfindlichkeit gegenüber erhöhten extrazellulären Calciumkonzentrationen (Jiang et al., 2012). Gleiches ließ sich für das Hefehomolog ScRch1p in *S. cerevisiae* beschreiben (Zhao et al., 2016). Vorteil dieser Modelle ist, dass Hefen leicht kultivierbar sind, da sich ihr Wachstum und ihre Teilungsrate durch spezifische Kulturbedingungen anpassen lassen. Ihr Genom ist vollständig entschlüsselt und in virtuellen Datenbanken online einsehbar (Mager and Winderickx, 2005). Dass sich Hefemodelle gut für die Charakterisierung unerforschter Gene eignen, zeigte bereits eine Studie von 1997, die für ca. 30 % krankheitsassoziierter Gene des Menschen, ein entsprechendes funktionelles Ortholog in der Hefe *S. cerevisiae* beschreibt (Foury, 1997). Außerdem lassen sich schnell und einfach Modifikationen wie Genmutationen oder Genmarkierungen in Hefezellen einbringen. Da aber die Möglichkeiten der Hefemodelle durch die Arbeit von Jiang et al. und Zhao et al. in Hinblick auf diese Doktorarbeit bereits ausgeschöpft erschienen, war nicht zu erwarten, dass grundlegend neue Erkenntnisse mithilfe dieser Methode für die Charakterisierung von SLC10A7 im Menschen zu gewinnen wären.

3.2.1.2 Tiermodelle

3.2.1.2.1 Zebrabärbling (D. rerio)

Fortführend sind in der Wissenschaft *in vivo* Modelle für die Erforschung unbekannter Gene gut etabliert. So z.B. für den Zebrabärbling *D. rerio*. Dieser eignet sich als *in vivo* Modell für Versuche besonders gut aufgrund seiner geringen Größe, seiner optischen Transparenz und dem unproblematischen Einfügen genetischer Modifikationen (Busse et al., 2020). Für den Zebrabärbling werden 82 % krankheitsassoziierter Gene des Menschen mit einem entsprechenden funktionellen Ortholog beschrieben (Howe et al., 2013). Er besitzt trotz seiner Zughörigkeit zur Klasse der Knochenfische eine vergleichsweise hohe Sequenzidentität seiner Proteinsequenz (75,6 %) zum homologen humanen Protein. Die Arbeitsgruppe um Angel Ashikov konnte durch einen *morpholino Knockdown* von *slc10a7* im Zebrabärbling Auswirkungen auf die Entwicklung des Skeletts zeigen und spiegelte in diesem Modell den Phänotypen des Menschen wider (Ashikov et al., 2018).

Bei einem *morpholino Knockdown* werden Oligonukleotide designt und eingesetzt, die spezifisch an die mRNA-Sequenz des Zielproteins während der Proteintranslation oder des Spleißvorgangs binden und so die Proteinsynthese verhindern (Bill et al., 2009). So ist es auch durch unterschiedlich eingesetzte Oligonukleotidkonzentrationen möglich, unterschiedlich stark ausgeprägte Erscheinungsbilder der Morphanten zu erzeugen: Zebrabärblinge mit einem geringfügigen *morpholino Knockdown* für *slc10a7* (8 ng/nL) zeigen bereits verschiedene pathologische Auswirkungen auf die Entwicklung ihres Skeletts, besitzen jedoch noch physiologisch geformte anatomische Strukturen (**Tab. 6**). Ein *morpholino Knockdown* in höheren Konzentrationen (12 ng/nL) führt jedoch zur kompletten Missbildung des Embryos in Bezug auf seine Knorpel- und Knochenentwicklung (Ashikov et al., 2018). Die beschriebenen Veränderungen deuten auch hier – wie im humanen Patienten – auf eine essenzielle Funktion des Slc10a7-Proteins in der Knorpelentwicklung und Knochenmineralisation hin.

| | 8 ng/nL | 12 ng/nL |
|------------------|--|----------------------------------|
| physiologisches | physiologische Anzahl der | |
| Erscheinungsbild | Keratobranchien (c1-c5) | |
| | physiologisch geformte | |
| | Flossenknospenknorpel | |
| pathologisches | abwärtsgebogene Zahnknorpel | Ödeme im gesamten Körper |
| Erscheinungsbild | verkürzter oder fehlender | • verkleinerter Kopf und Augen |
| | Gaumenknorpel | eingerollter Körper |
| | fehlender Kiemendeckel | verkleinerter Meckels-Knorpel |
| | verbreitertes Gaumenskelett | • Fehlen des Keratobranchiums c4 |
| | • reduziertes Cleithrum | |
| | reduziertes Notochord | |

TABELLE 6 | Physiologisches und pathologisches Erscheinungsbild von *D.rerio* (nach *slc10a7 morpholino Knockdown* mit Oligonukleotidkonzentrationen von 8 bzw. 12 ng/nL) in Bezug auf die Knorpel- und Knochenentwicklung (Ashikov et al., 2018).

3.2.1.2.2 Mausmodell

Da die Ergebnisse aus den Studien mit mutierten Zebrabärblingen weiterhin einen Zusammenhang zwischen Slc10a7-Defizienz und verursachtem Phänotyp vermuten ließen, erscheint es sinnvoll diesen Zusammenhang auch in einer Säugerspezies, der Maus, zu bestätigen. *Knockout*-Mausmodelle eigenen sich gut, um v.a. für uncharakterisierte Proteine Phänotypen zu beschreiben. Beispielsweise wurden diese Modelle bereits für andere Mitglieder der SLC10-Familie angewendet. Für die SLC10-*Orphan-Carrier* Slc10a4-5 sowie für Soat gibt es entsprechende *Knockout*-Mausmodelle, über die die Funktion der Proteine *in vivo* geklärt werden soll^{15; 16; 17}.

Brommage et al. und Dubail et al. untersuchten dementsprechend *Slc10a7-Knockout*-Mäuse prä- und postnatal in Hinblick auf deren phänotypisches Erscheinungsbild [**Tab. 7**; (Brommage et al., 2014; Dubail et al., 2018)]. Interessanterweise spiegelte sich auch hier das Erscheinungsbild humaner Patienten wider: *Slc10a7^{-/-}* - Mäuse zeigten das gleiche pathologische Bild in Form von Knochenmissbildungen und Veränderungen des Zahnschmelzes. Diese äußerten sich bei beiden Spezies in Kleinwuchs,

¹⁵ http:/geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2015/11768/

¹⁶ http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2020/15338/

¹⁷ http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2018/13719/

Zahnschmelzveränderungen, Dysmorphologie des Schädels oder Gesichtsschädels, pathologisch geformten Wirbeln oder pathologischer Form der Wirbelsäule, Verformungen der Femora, fortgeschrittenen Verknöcherungen des Carpus und verkleinerten Epiphysenfugen (**Abb. 7**). Einer der wenigen festgestellten Unterschiede äußerte sich darin, dass Mäuse keine Dislokation ihrer großen Gelenke zeigten, wie es im humanen Patienten der Fall ist.



ABBILDUNG 7 | Phänotypisches Bild bei SLC10A7-Defizienz: Schematischer Vergleich des phänotypischen Bildes von Patienten mit Mutationen im *SLC10A7*-Gen mit *Slc10a7^{-/-}-Knockout*-Mäusen. Die meisten veränderten Merkmale lassen sich bei beiden Spezies identifizieren (blaue Kreise). Die Dislokation großer Gelenke ist nur bei der hochgradigen Ausbildung des Phänotyps im Menschen zu finden (roter Kreis); sie ist im Mausmodell nicht zu erkennen.

| MERKMAL | PATHOLOGISCHES BILD DER <i>Slc10a7^{-/-}-</i> MÄUSE |
|---------------|---|
| Größe | kleiner, leichter |
| Schädel | • runder Kopf durch verkürzten Nasal-, Occipital- und Frontalknochen |
| | verkürzte naso-occipitale Länge |
| | • weiterer Winkel zwischen den Hemimandibeln (bedingt durch schmalere Parietal- |
| | und Occipitalknochen) |
| | reduziertes Volumen der Mandibula |
| | ggr. verkürzte Parietal- und Interparietalknochen |
| | ggr. deformierter Nasalknochen |
| Gliedmaßen | • verkürzte Gliedmaßen: Stylopod (Femur und Humerus), Zeugopod (Tibia und |
| | Radius) und Autopod (Vorder- und Hinterfuß) |
| | • pathologisch geformte Femora: Swedish-Key-Erscheinungsbild (vergrößerte distale |
| | Kondylen, prominentere proximale Trochanter, verkürzte Knochenhälse) und |
| | dreieckiger anstatt ellipsoider Querschnitt der Femurmetaphysen |
| Knochenaufbau | fortgeschrittene Ossifikation des Metatarsus, Tarsus und der Phalangen |
| | verkürzte Diaphysen, verkleinerte Epiphysen |
| | Weitung der proximalen Metaphysen |
| | Reduktion des Knochen- zu Totalvolumens durch verringerte Dicke der |
| | Knochentrabekel |
| Knorpel | Reduktion der sulfatierten GAG-Ketten in den Epiphysenfugen |
| | • undeutliche Trennung der verschiedenen Zonen der Knorpelschicht (Reserve-, |
| | Proliferations-, prähypertrophe und hypertrophe Zone) |
| | dünnere proliferative Zone des Knorpels |
| | höherer Kollagenfaseranteil in Wachstumsfugen |
| Zahn | reduziertes Volumen der Incisivi und Molaren |
| | fehlende aprismatische Schicht des Zahnschmelzes |
| | • multiple, hypoplastische Stellen innerhalb der mittleren Schicht (externe |
| | prismatische) des Enamels der Incisivi |
| | • pathologisch veränderte Stäbchenstruktur der innersten Schicht des Enamels |
| | (interne prismatische Schicht) durch verschmolzen erscheinende Stäbchen mit |
| | ungewöhnlichen Strukturen zwischen den Stäbchen |

TABELLE 7 | Pathologisches Erscheinungsbild der *Slc10a7^{-/-}*-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtypwurfgeschwistern (Brommage et al., 2014; Dubail et al., 2018). | GAG = Glukosaminoglykan; ggr. = geringgradig.

3.2.2 Zellkulturmodell

Da bereits *Knockdown*-Modelle für den Zebrabärbling und *Knockout*-Modelle für die Maus existieren und im Rahmen des 3R-Prinzips der Versuchstierkunde (*Replace, Reduce, Refine*) Tierexperimente wenn möglich vermieden werden sollten (De Angelis et al., 2019), erschien die Etablierung eines Tiermodells für das Vorhaben dieser Doktorarbeit ungeeignet. Es fehlte also bis dato an einem Modell, das einfach zu handhaben ist und bei dem das untersuchte Protein, dem des Menschen strukturell sehr nahe kommt. Kultivierte Zellen, die verschieden Ursprungs sein können, eigenen sich für *in vitro* Versuche besonders gut, da sie 100 % Sequenzidentität zu dem *in vivo* vorkommenden Protein besitzen. Zudem lassen sich über verschiedene Methoden Zellmodelle generieren, bei denen das gewünschte Protein nicht mehr oder über das physiologische Maß hinaus synthetisiert wird. Auf diese Art und Weise lassen sich Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des Proteins ziehen.

Da eine Vielzahl an möglichen Zelllinien existiert, ist es nötig, für geplante Versuchsvorhaben geeignete Zelllinien ein- und ungeeignete Zelllinien auszuschließen. Die *perfekte* Zelllinie lässt sich einfach händeln (hohe Teilungsraten, hohe Transfektionseffizienz, einfache Zusammensetzung des Kulturmediums) und besitzt nativ eine ausreichende Proteinexpression des Zielproteins. In **Abb. 8** sind *SLC10A7*-mRNA-Expressionslevel für in der Wissenschaft etablierte Zelllinien dargestellt. Für die vorliegende Doktorarbeit wurden die hier gelisteten Hap1- und HEK293-Zelllinien ausgewählt.



ABBILDUNG 8 | *SLC10A7*-mRNA Level verschiedener Zelllinien. Hap1 Zellen bilden vergleichsweise viel *SLC10A7*-mRNA im Gegensatz zu HEK293 Zellen. | Datenquelle: *Human Protein Atlas* [www.proteinatlas.org (Daten exportiert im November 2021)]; NX = Normalized Expression.
3.2.2.1 SLC10A7-Knockout-Zelllinie: Hap1-KOP7

Für die Untersuchung bisher uncharakterisierter Proteine eignen sich Zellen mit haploidem Chromosomensatz besonders gut, da sie nur eine einzige Kopie des Genoms enthalten und somit die Auswirkungen von Mutationen, die bei +/- Heterozygoten auftreten könnten, nicht maskiert werden (Beigl et al., 2020). Haploide Zellen können beispielsweise bei der Tumorgenese entstehen. Ende der 1980er Jahre wurden solche Zellen aus einem Patienten, der an myeloischer Leukämie erkrankte, gewonnen (Andersson et al., 1987). Durch Isolation und anschließende Kultivierung dieser Zellen wurde zunächst die Vorläuferzelllinie KBM7 erhalten, bei der alle Chromosomen bis auf Chromosom 8 haploid vorkamen (Andersson et al., 1987). Von dieser Vorläuferzelllinie wurde ein Subklon gewonnen, bei dem nicht mehr Chromosom 8, sondern Chromosom 15 diploid vorkam und der entgegen dem KBM7-Klon adhärent wuchs und die hämatopoetischen Marker verlor (Kotecki et al., 1999; Beigl et al., 2020). Dieser Subklon erhielt den Namen Hap1. Seitdem werden Hap1 Zelllinien von der Firma Horizon Discovery kommerziell verkauft, mit der Option über CRISPR/Cas Gen-Knockouts einzufügen. CRISPR/Cas (*Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats*) ist ein aus dem Immunsystem von Bakterien übernommenes und modifiziertes System, das in der Forschung dazu genutzt wird, um DNA mittels eines Enzyms (Cas9) gezielt zu editieren [Geninsertion, Gendeletion, Gen-Knockout; (Savic and Schwank, 2016)]. So auch für SLC10A7 in Hap1 Zellen. Um den humanen SLC10A7-defizienten Patienten "in der Petrischale nachzubilden", wurde diese Knockout-Zelllinie während dieser Doktorarbeit etabliert.

Hap1 Zellen mit einem SLC10A7-CRISPR/Cas-Knockout (folgend als Hap1-KOP7 bezeichnet) sind nicht mehr dazu in der Lage, intaktes SLC10A7-Protein zu bilden. Sie eignen sich deshalb besonders gut, um funktionelle Studien durchzuführen, bei denen Unterschiede zwischen unveränderten Wildtypzellen und Gen deletierten Knockout-Zellen dargestellt werden sollen. Der Knockout äußert sich bei den Zellen in einer 23 Basenpaardeletion in Exon 2, die sich mittels genomischer PCR in einem schmalen Schift der PCR-Amplifikate im Agarosegel zeigt und die durch Sequenzierung der DNA nachgewiesen werden konnte (**Publikation #1**). Zusätzlich führt die Gendeletion in diesen Zellen zu einer verminderten Bildung der *SLC10A7*mRNA, was sich in vergleichenden quantitativen PCR-Analysen der entsprechenden Zellen darstellen ließ (**Publikation #1**). Dass sich der Gen-Knockout auch auf die Proteinebene auswirkt, kann prinzipiell über Flüssigchromatographie-MS (LC-MS) Proteomanalysen oder immunologische Methoden (Western Blot, Immunhistochemie) nachgewiesen werden. Bei LC-MS-Proteomanalysen werden spezifische Aminosäuresequenzen des Zielproteins in einer Probe quantifiziert. Dabei wird das Probenmaterial in einem ersten Schritt mittels spezifischer Enzyme verdaut, so dass einzelne Proteinbruchstücke entstehen. Für jedes Protein ergibt sich so, ähnlich dem individuellen Fingerabdruck des Menschen, ein proteineigenes Aminosäurensequenzmuster. In einem zweiten Schritt der Methode wird eine spezifische Sequenz des "Aminosäure-Cocktails" in der MS quantifiziert und mit der Sequenz eines Referenzpeptids, das als protein- und speziesspezifisch gilt, verglichen. Entspricht die analysierte Sequenz der des Referenzpeptids, ist davon auszugehen, dass das Zielprotein in der Probe vorhanden ist (Oswald et al., 2013). Für die Hap1-KOP7 Zellen konnte mittels dieser Proteomanalysen der Gen-*Knockout* und die damit verbundene Nullexpression von SLC10A7 eindeutig auf Proteinebene bestätigt werden [Referenzpeptid: TEELTSALVHLK; (**Publikation #1**)].

3.2.2.2 SLC10A7-überexprimierende Zelllinie: HekP7+Tet.

Um ein Protein in Zellen dauerhaft im Überschuss zur Verfügung zu stellen (Überexpression), ist es möglich, DNA des Zielgens mithilfe eines Plasmids in die Zelle einzubringen, wodurch es zur gesteigerten Expression und damit zur gesteigerten Translation des Zielproteins kommt. Durch eine stabile Transfektion wird ein Zielgen dauerhaft in das Genom einer Zelle eingebracht, ohne dass diese als Fremd-DNA erkannt und wieder aus der Zelle ausgeschleust wird. In einem ersten Schritt wird dabei eine Signalsequenz (*FRT-Site*) mittels eines Vektors an eine zufällige Stelle in das Genom der Zellen eingefügt. Diese Sequenz dient in einem zweiten Schritt als Erkennungssequenz für einen Vektor, der die Sequenz des Zielgens und die komplementäre Sequenz zur Erkennungssequenz trägt. Auf diese Weise ist es möglich, Gensequenzen, die für ein bestimmtes Protein kodieren, gezielt in das Genom kultivierter Zellen zu bringen. Für SLC10A7 gelang dies in humanen embryonalen Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney Cells, HEK293 Zellen*), wodurch es möglich war, ein zweites Zellmodell zu etablieren, bei dem *SLC10A7* nicht *ausgeknockt*, sondern überexprimiert wird.

HEK293 Zellen wurden in den 1970er Jahren aus der Niere eines abgetriebenen, menschlichen Embryos isoliert und mittels Adenovirus 5 DNA transformiert, um die Zellzykluskontrolle zu modifizieren und damit die Apoptose der Zellen zu umgehen (Lin et al., 2014). So ist es möglich, dass diese Zellen über mehrere dutzend Passagen kultiviert werden können. Sie sind für *in vitro* Studien besonders gut geeignet, da sie einfach zu handhaben sind, eine hohe Transfektionsrate besitzen und sich demgemäß für stabile Transfektionen und damit die stabile Überexpression bestimmter Proteine gut nutzen lassen – dementsprechend auch für die stabile Überexpression von *SLC10A7* in HEK293 Zellen.

Diese Überexpression lässt sich in den etablierten HEK293 Zellen zudem über ein Tool gezielt steuern: Durch eine dem *SLC10A7*-Gen vorgeschaltete CMV-Promotorsequenz, die ein Tetrazyklin reguliertes Operon enthält, kann die Expression gezielt reguliert werden. Im inaktivierten Zustand der Zelle binden Tetrazyklin-Repressoren, die zuvor mittels Transfektion eines kodierenden Plasmids in das Genom der Zelle eingebracht wurden, an die Tetrazyklin-Operatoren. Es kommt zur Unterdrückung der *SLC10A7*-Expression. Erst nach Tetrazyklin-Behandlung, bindet dieses an den Repressor, welcher eine Konformationsänderung durchläuft und so den CMV-Promotor freigibt, damit das Gen abgelesen werden kann und es somit zur Bildung des *SLC10A7*-Transkripts und nachgeschaltet auch zur Bildung des SLC10A7-Proteins kommt ¹⁸. Die überexprimierende Zelllinie wird deshalb als HekP7+Tet. (plus Tetrazyklin) bezeichnet; die entsprechenden unbehandelten Zellen als HekP7-Tet. (minus Tetrazyklin).

Für HekP7+Tet. und HekP7-Tet. Zellen ließ sich – wie für die Hap1 Zellen – die *SLC10A7*-mRNAbzw. Proteinexpression mittels qPCR- und Proteomanalysen ermitteln (**Publikation #1**). Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Folglich war ein zweites Zellmodell geschaffen, mit dem sich Vergleiche zwischen SLC10A7-Wildtypzellen und SLC10A7-überexprimierenden Zellen anstellen ließen.

An diesem Punkt soll kurz erläutert werden, weshalb nicht für alle Experimente konsequent die gleiche Hap1 Zelllinie verwendet wurde – sowohl für *Knockout*-Experimente als auch für die Überexpression des *SLC10A7*-Gens. Dies lässt sich durch die Tatsache begründen, dass Hap1 Zellen in den durchgeführten Experimenten eine niedrige Transfektionseffizienz, also die Fähigkeit fremde DNA aufzunehmen, besaßen. Folglich gelang es trotz immensen Aufwandes und vielfacher Versuche nicht, eine stabil-SLC10A7-überexprimierende Hap1 Zelllinie zu generieren. Deshalb musste auf die von Natur aus wenig SLC10A7 exprimierende und einfach zu handhabende HEK293 Zelle zurückgegriffen werden.

¹⁸ www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-andanalysis/protein-expression-protocol/inducible-protein-expression-using-the-trex-system.html

3.2.3 Auf das Zellmodell angewandte Methoden

3.2.3.1 Western Blot

Bis heute war es nicht möglich, SLC10A7 mittels immunologischer Methoden, wie dem Western Blot oder der IF nachzuweisen. Grundprinzip dieser beiden Methoden ist die Bindung spezifischer primärer Antikörper an das Zielprotein, was anschließend den Nachweis eines chemilumineszierenden oder fluoreszierenden Signals ermöglicht, welches durch einen sekundären Antikörper ausgelöst wird (Oswald et al., 2013). Grund für den fehlenden Nachweis ist, dass bis dato keine geeigneten Antikörper existieren, die spezifisch an das SLC10A7-Protein binden. Zwar werden kommerzielle Antikörper für die Detektion von SLC10A7 angeboten, jedoch resultieren diese im Western Blot immer in unspezifischen Anfärbungen oder zeigen gar keine Reaktivität. In Tabelle 8 und Abbildung 9 sind die fehlgeschlagenen Western-Blot-Ergebnisse und ihre Versuchsbedingungen aufgelistet. Mögliche Ursachen für unspezifische Banden können mangelnde Qualität oder zu hohe Konzentrationen des eingesetzten Antikörpers oder die Unspezifität des angesprochenen Epitops im Protein sein. Zusätzlich können diverse Fehler z.B. während der Proteinisolation. der Proteinauftrennung [z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS) im Laufpuffer] oder der Blockierung der Membran auftreten und zu ungewollten Ergebnissen führen¹⁹. Durch verschieden eingesetzte Antikörperkonzentrationen, verschiedene Zelllysispuffer und unterschiedliche Blockierlösungen sollte versucht werden, diese Probleme zu beseitigen. Jedoch gelang es trotz aller Versuche nicht, SLC10A7 zu detektieren. Als Schlussfolgerung kann festgehalten werden, dass keiner der kommerziellen Anti-SLC10A7-Antikörper für Western-Blot-Analysen geeignet ist. um das SLC10A7-Protein nachzuweisen.

Alternativ zu kommerziell erwerblichen Primärantikörpern lassen sich eigens designte und anschließend in einer Tierart generierte Antikörper herstellen²⁰. Dies gestaltet sich bei Membranproteinen, wie SLC10A7, jedoch sehr aufwendig, da die erfolgreiche Antikörperproduktion von der geeigneten Auswahl des Epitops, der geeigneten Auswahl der Tierart und des Individuums abhängt, in der die Antikörper generiert werden sollen. Individuelle Immunantworten könnten so zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen²¹ und wurden deshalb in diesem Ansatz nicht weiterverfolgt.

¹⁹ www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/troubleshooting-western-blots-with-western-blotdoctor?ID=MIW4HR15

²⁰ www.eurogentec.com/en/custom-antibodies

²¹ www.eurogentec.com/en/pre-immune-selection



ABBILDUNG 9 | Exemplarischer SLC10A7-Proteinnachweis im Western Blot. Er resultiert in unspezifischen Banden. Mit TG unbehandelte und behandelte (2 μ M) Hap1- (WT und KOP7) und HekP7 Zellen (-Tet. und +Tet.) wurden in 400 µL RIPA-Lysispuffer + Proteaseinhibitor auf Eis geerntet und lysiert. Die Proteinlysate wurden mithilfe des BCA-Protein-Assay-Kits (Merck) und des Nanodrop One (Thermo Scientific) quantifiziert und auf 30 µg Protein normiert. Die Proben wurden je mit Lämmli-Puffer versetzt, für 10 min bei 95 °C gekocht, auf Eis gestellt und auf ein 12 % Acrylamid-Trenngel (3 % Sammelgel) aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteinproben wurden anschließend bei 400 mA auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membran wurde im Anschluss für 1 h entweder mit 5 % Milchpulver in TBS-T oder in 10 % Milchpulver in TBS-T inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Primärantikörperinkubation (Produktnummer in Klammern) erfolgte bei 4 °C über Nacht in den angegebenen Konzentrationen (Tab. 8). Nach 16 h wurde die Membran mit TBS-T für 1 × 15 min und 3 × 5 min gewaschen. Die Sekundärantikörperinkubation mit dem Anti-Kaninchen-Antikörper (1:5000) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut gewaschen und die Chemilumineszenz der HRP-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Rotiluminlösung und Röntgenfilm detektiert. (A) Die Verwendung des Primärantikörpers 39465 der Firma Invitrogen

resultiert in unspezifischen Banden aller Proben. Für SLC10A7 wäre ein Molekulargewicht von ca. 37 kDa zu erwarten. **(B)** Auch die Verwendung des Primärantikörpers SAB2102163 der Firma Sigma Aldrich resultierte in unspezifischen Banden aller Proben. **(C)** Die Verwendung des Primärantikörpers SAB4503317 der Firma Sigma Aldrich resultierte in zu groß erscheinenden Proteinbanden aller Proben. | kDa = Kilodalton; M = Marker; TG = Thapsigargin; WT = Wildtyp.

| Angaben zum | Immunogen | Verwendete | Primärantikörper- | Problem | Abb. 9 |
|--------------------|---------------|-------------|-------------------|---------------|--------------|
| Primärantikörper | | Zelllinie | Konzentration | | Nummer |
| 39465 (Invitrogen) | interne | Hap1-WT, | 1:750 | unspezifische | beispielhaft |
| generiert in | Regionen des | Нар1-КОР7, | | Banden | in Abb. 9A |
| Kaninchen, | humanen | HekP7-Tet., | | | |
| polyklonal, gegen | Proteins | HekP7+Tet. | | | |
| Mensch, Maus, | | | | | |
| Ratte | | | | | |
| SAB2102163 | Aminosäure- | Hap1-WT, | 1:1000 | unspezifische | beispielhaft |
| (Sigma-Aldrich) | positionen | Hap1-KOP7, | | Banden | in Abb. 9B |
| generiert in | 216-265 | HekP7-Tet., | | | |
| Kaninchen, | (Ex 8-10; | HekP7+Tet. | | | |
| polyklonal, gegen | TMD 7, EZS 4, | | | | |
| Hund, Mensch, | TMD 8, IZS 5) | | | | |
| Kaninchen, Ratte, | | | | | |
| Pferd, Maus | | | | | |
| SAB4503317 | Aminosäure- | Hap1-WT, | 1:1000, 1:500, | Banden | beispielhaft |
| (Sigma-Aldrich) | positionen | Hap1-KOP7, | 1:250, 1:100 | erschienen zu | in Abb. 9C |
| generiert in | 168-217 | HekP7-Tet., | | groß | |
| Kaninchen, | (Ex 7-8; | HekP7+Tet. | | | |
| polyklonal, gegen | TMD 6, IZS 4, | HepG2 | | | |
| Hund, Mensch, | TMD 7) | | | | |
| Maus, Ratte | | | | | |

TABELLE 8 | Getestete kommerzielle SLC10A7-Primärantikörper im Western Blot. Mittels Western Blot sollte das SLC10A7-Protein in verschiedenen Zelllysaten nachgewiesen werden. Dafür wurden von verschiedenen Firmen drei SLC10A7-spezifische Antikörper bezogen, die in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt wurden. Bei keiner der angefertigten Immunoblots ließ sich eine spezifische Bande bei 37 kDa für das Protein detektieren. Auch war bei allen Antikörpern die Negativkontrolle (Hap1-KOP7) gefärbt. | Ex = Exon; EZS = extrazelluläre Schleife; IZS = intrazelluläre Schleife; Tet. = Tetrazyklin; TMD = Transmembrandomäne; WT = Wildtyp.

3.2.3.2 Immunfluoreszenz

Kommerzielle Antikörper, die für den Western Blot verfügbar sind, eignen sich sehr häufig auch für die Detektion von Proteinen mittels IF. Bei dieser Nachweismethode werden Peptide mittels primärer Antikörper gebunden. Diese können wiederrum von sekundären Antikörpern detektiert werden. Sekundäre Antikörper in der IF sind durch einen *Fluoreszenztag* markiert. Diese sind dazu in der Lage, Photonen spezifischer Wellenlänge aufzunehmen, indem sie sich kurzfristig auf ein energetisch höheres Niveau begeben. Sobald diese Energie in Form von Licht längerer Wellenlänge abgegeben, sprich emittiert wird, fluoreszieren die Moleküle (Lichtman and Conchello, 2005). Das Fluoreszenzsignal wird im Weiteren mittels geeigneter Fluoreszenzmikroskope optisch sichtbar gemacht, wodurch qualitative Aussagen über das Vorhandensein und die Lokalisation des Proteins getroffen werden können. Jedoch ließ sich das SLC10A7-Protein mit den kommerziellen Antikörpern auch mit dieser Methode weder in Hap1 Zellen noch in HEK293 Zellen nativ nachweisen.

3.2.3.3 Transiente Transfektion

Eine weitere Methode neben der stabilen Transfektion, um ein Protein funktionell zu charakterisieren, ist die transiente, d.h. zeitlich begrenzte, Transfektion von Zellen mit einem Plasmid, das die Sequenz des entsprechenden Zielgens enthält. Sie ist im Vergleich zur stabilen Transfektion deutlich einfacher und schneller durchzuführen. Es lassen sich aber analog Vergleiche von überexprimierenden Zellen zu Wildtypzellen ziehen. Bei der transienten Transfektion nehmen Zellen das Plasmid nicht dauerhaft in ihr Genom, sondern nur für wenige Tage in den Nukleus, auf, bevor das Plasmid wieder aus der Zelle ausgeschleust wird, oder die Zelle den programmierten Zelltod aufgrund von Fremd-DNA einleitet (Kim and Eberwine, 2010). Nachteil dieser Methode ist, dass – im Gegensatz zur stabilen Transfektion, bei der ein einzelner Zellklon selektioniert wird – nicht angenommen werden kann, dass jede Zelle gleichviel Protein exprimiert. Es muss immer von dem Risiko ausgegangen werden, dass eine Zelle gegebenenfalls kein Plasmid aufgenommen hat und das zu untersuchende Protein nicht exprimiert wird. Deshalb ist es notwendig, das über transiente Transfektion gebildete Protein mittels geeigneter Methoden, wie z.B. der Markierung durch *Proteintags*, nachzuweisen.

3.2.3.4 Proteintags

Da für SLC10A7 keine geeigneten nativen Antikörper existieren, ist es nötig, *getaggte* Proteine zu verwenden. Diese Markierung äußert sich in Aminosäuresequenzen, die dem Protein entweder C- oder N-terminal vorangestellt bzw. angefügt werden. Dies geschieht durch Vektoren, die sowohl die DNA-Sequenz für das Zielgen beinhalten als auch die DNA-Sequenzen für die entsprechenden *Tags*. *Tags* können einige wenige bis hin zu mehreren hundert Aminosäuren beinhalten. Detektiert werden können sie durch spezifisch bindende Antikörper oder durch die Fluoreszenz des *Tags* selbst (**Tab. 9**).

Als einer der bekanntesten *Tags* ist das grünfluoreszierende Protein GFP (*Green Fluorescent Protein*) bekannt. Es wurde erstmals 1962 durch Osamu Shimomura beschrieben und stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*. Das Protein fluoresziert grün nach Anregung mit blauem Licht und wird in der Molekularbiologie verwendet, um Proteine zu markieren, damit diese in Zellmodellen auf ihre räumliche und zeitliche Verteilung hin untersucht werden können (Tsien, 1998). Ähnlich dem GFP existiert ein rotfluoreszierendes Protein *mScarlet*, das eine synthetische Weiterentwicklung der rotfluoreszierenden Proteine (RFP) aus Blumentieren (*Anthozoa*) darstellt. Es besitzt die Eigenschaft im Gegensatz zu seinen Vorläuferproteinen Monomere (<u>m</u>Scarlet = "monomeres Scharlachrot") anstelle von Tetrameren zu bilden und fluoresziert stärker und länger als andere vergleichbare RFPs wie mCherry oder mApple (Bindels et al., 2017).

Besitzen zwei *Fluoreszenztags* Emissionsmaxima unterschiedlicher Wellenlängen, können sie in Kombination dazu verwendet werden, um zwei transient transfizierte Proteine in der Zelle zu untersuchen – wie auch für die Colokalisationsstudien zwischen STIM und SLC10A7 oder ORAI in **Publikation #2**. Vorteil der Detektion des Proteins über *Fluoreszenztags* ist, dass sich diese nicht nur an fixierten Zellen, sondern auch an lebenden, unfixierten Zellen untersuchen lassen und sich so Dynamiken im zeitlichen Verlauf darstellen lassen können (z.B. nach Behandlung mit TG). Nachteil der *getaggten* Proteine ist jedoch, dass sie nicht mehr nativ, d.h. in natürlicher Form vorliegen. Sie können deshalb von der Zelle durch potenziell veränderte Ladungen, veränderte Größe oder andere Faltungen anders *gesortet*, d.h. an andere Stellen in der Zelle gebracht oder von der Zelle schneller als normal degradiert werden. Folglich muss bei *Tag*-markierten Proteinen immer das Risiko miteinbezogen werden, dass der dargestellte Effekt nicht durch die Überexpression des Proteins selbst, sondern durch den *Tag* oder die verwendeten Transfektionsmedien ausgelöst wird (Jacobsen et al., 2009).

61

| <i>Tag-</i> Bezeichnung | Anzahl Aminosäuren | λEx/λEm | Fluoreszenz Farbe | TABELLE 9 Verwendete |
|----------------------------|--------------------|---------|----------------------|-------------------------------|
| GFP | 240 | 488/507 | grün | Fluoreszenztags und ihre |
| mScarlet | 232 | 569/594 | rot | Eigenschaften ²² . |

Eine Möglichkeit, mit der überprüft werden kann, ob der Proteintag die Lokalisation und das Sorting des nativen Proteins tatsächlich beeinflusst, ist die Messung der Cofluoreszenz zweier Zielproteine, die unterschiedliche Proteintags besitzen. Dabei müssen die Tags oder die Sekundärantikörper, mit denen sie detektiert werden, unterschiedliche Exzitations- und Emissionsmaxima besitzen, um in zwei verschiedenen Settings am Mikroskop detektiert und aufgenommen zu werden (beispielsweise mScarlet- und GFP-Tag oder mScarlet- und Flag-Tag). Gibt es keine Abweichung der Rot- und Grünpunkte, sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass das Protein aufgrund des Tags falsch gesortet wird. Bei **Publikation #2** wurde dieses Prinzip angewandt, indem die Lokalisation eines mScarlet-markierten SLC10A7-Proteins mit der eines Flag-markierten SLC10A7-Proteins verglichen wurde. Ergebnis war, dass die beiden Proteine trotz ihrer unterschiedlichen Proteintags keine Abweichungen in ihrer zellulären Lokalisation zeigten. In vorangegangenen Versuchen mit SLC10A7-GFP und SLC10A7-mScarlet konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden (Abb. 10). Folglich wird für das GFP-markierte Protein angenommen, dass es durch den über 240 Aminosäure großen Proteintag falsch gesortet und anschließend degradiert wird. Für die Proteine STIM und ORAI, die jeweils mit GFP- und mScarlet markiert wurden, konnte die Überlagerung der jeweiligen Rot- und Grünsignale eines Proteins überprüft und verifiziert werden (Abb. 10). Folglich ist es zwar unwahrscheinlich, dass der Tag das Verhalten der untersuchten Proteine aus Publikation #1 und #2 beeinflusst, aber vollkommen ausgeschlossen ist dies nicht. Es besteht nichtsdestotrotz die Möglichkeit, dass die Ergebnisse der Untersuchungen nur scheinbare Effekte des Proteins darstellen. Dies gilt vor allem für die durchgeführten Colokalisationsstudien mit den Proteinen STIM, SERCA und ORAI (Publikation #2) und für die Colokalisationsstudien zur subzellulären Lokalisation (Publikation #2), über die es bis dato verschiedene Auffassungen in der Literatur gibt. Für SLC10A7-mScarlet ergibt sich durch Vergleiche mit fluoreszierenden Organellenmarkern die wahrscheinlichste Lokalisation des Proteins im ER, da sich hier die höchsten Werte für den PCC (s.u.) ergeben. Lokalisieren getaggte Proteine im ER, kann dies jedoch immer ein Hinweis für die frühzeitige Degradierung des markierten Proteins sein, da Proteintranslation als auch die Degradation im ER initiiert werden (Hwang and Qi, 2018).

²² www.fpbase.org



ABBILDUNG 10 | Sortingverhalten getaggter STIM-, ORAI- und SLC10A7-Proteine: Überprüfung des Sortingverhaltens der Proteine STIM, ORAI und SLC10A7 nach Fluoreszenztagmarkierung mit GFP und mScarlet mittels Cofluoreszenz (Methodik siehe Publikation #2). Hohe örtliche Übereinstimmungen der Rot- und Grünsignale erscheinen bei Überlagerung der Bilder gelb bzw. weiß (Punktintensität). (A) Exemplarische Fluoreszenzbilder der angegebenen transient transfizierten Konstrukte in HEK293 Zellen. Die Proteine STIM und ORAI erscheinen in den für sie beschriebenen ER- bzw. plasmamembranären Strukturen. Für SLC10A7-GFP und -mScarlet ergeben sich bereits auf den ersten Blick Abweichungen der Rot- und Grünpunkte. (B) Dies spiegelt sich auch im Korrelationskoeffizient nach Pearson (PCC) der Rot- und Grünsignale wider. Er liegt für SLC10A7 vergleichsweise niedrig (PCC = 0,77); im Gegensatz zu den Konstrukten für STIM bzw. ORAI (PCC = 0,97; bzw. PCC = 0,90). Weshalb ein falsches Sorting für eines der SLC10A7-Konstrukte angenommen werden muss. Durch die in einem zweiten Experiment durchgeführte Colokalisationsstudie mit SLC10A7-Flag und SLC10A7-mScarlet stellte sich heraus, dass das mScarlet-Konstrukt mit dem Flag-Tag colokalisiert, weshalb SLC10A7-GFP als falsch gesortetes Protein angenommen wird. Alle weiteren SLC10A7-Fluoreszenzstudien wurden deshalb mit dem mScarlet-Konstrukt durchgeführt. Für SERCA gelang es nicht, ein GFP-getaggtes Konstrukt zu synthetisieren, weshalb die Überprüfung des mScarlet-Tags für SERCA nicht vorgenommen werden konnte. Der Graph gibt den PCC für die Colokalisation zwischen den GFP- und mScarlet-Konstrukten an. Jeder Punkt repräsentiert den PCC einer Einzelzelle. Für STIM wurden 49 Einzelzellen ausgewertet, für ORAI 46 und für SLC10A7 40. Die Balken geben die Mittelwerte der PCCs sowie deren Standardabweichung für das durchgeführte Experiment an.

3.2.3.5 Colokalisationsstudien

Fluoreszenzstudien werden in der Molekularbiologie dazu verwendet, um Hinweise auf die räumliche Verteilung von Proteinen und somit deren Funktion zu bekommen. Es können auch Hinweise auf Abhängigkeiten von Proteinen zueinander gewonnen werden (Dunn et al., 2011). Colokalisationsstudien bewerten die Korrelation zweier Bildpunkte, die durch zwei verschiedene Farbkanäle mikroskopisch aufgenommen werden (Lagache et al., 2015). Diese Korrelation berücksichtigt die räumliche Verteilung zweier Bildpunkte sowie deren voneinander abhängiges Vorkommen in der Zelle oder in Zellkompartimenten (Dunn et al., 2011). Mit anderen Worten gibt sie die Beziehung zweier Fluoreszenzsignale zueinander an. Heißt: Ist die Korrelation zweier Signale hoch, wird sich das Farbsignal x eines Kanals mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Nähe des Farbsignals y eines anderen Kanals aufhalten.

Ein Maß der wechselseitigen Beziehung zweier Bildpunkte stellt der Korrelationskoeffizient nach Pearson dar (*Pearson's correlation coefficient*, PCC). Mathematisch gesehen gibt er die Kovarianz zwischen den Bildern zweier Kanäle an, normiert durch das Produkt ihrer Standardabweichungen (Aaron et al., 2018):

$$PCC = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$x = \text{Intensität des ersten Farbsignals (z.B. grün)}$$

$$\bar{x} = \text{durchschnittliche Pixelintensität der Farbe x}$$

$$y = \text{Intensität des zweiten Farbsignals (z.B. rot)}$$

$$\bar{y} = \text{durchschnittliche Pixelintensität der Farbe y}$$

$$i=\text{Pixel}$$

Die Werte des PCC reichen von +1 bis -1. Werte nahe +1 oder nahe -1 bedeuten, dass die Intensität der Farbe x nahezu perfekt aus der entsprechenden Intensität der Farbe y abgeleitet werden kann und umgekehrt. Werte nahe Null zeigen an, dass der prädiktive Wert zwischen den Bildern gering ist und dass die beiden abgebildeten Signale nicht eindeutig korrelieren. Das Vorzeichen des PCC gibt die ,Richtung' der Beziehung zwischen Farbe x und Farbe y an, wobei ein positives Vorzeichen bedeutet, dass bei zunehmender Intensität von Farbe x die Farbe y proportional zunimmt, was auf eine molekulare Anziehung hindeuten kann. Ein negatives Vorzeichen bedeutet das Gegenteil und deutet auf molekulare Abstoßung hin (Aaron et al., 2018). Werte des PCC weisen jedoch immer nur auf solche Zusammenhänge hin, sind aber nie ein Beweis für molekulare Interaktionen.

Dies ist allein durch die physikalischen Limitationen dieser Methode begründet: Die Auflösung konventioneller Mikroskope ist selbst bei maximaler 630-facher Vergrößerung auf die Hälfte der Wellenlänge des emittierten Lichts begrenzt – also auf ca. 250 nm (Dunn et al., 2011; Aaron et al., 2018). Typische Interaktionsdistanzen betragen jedoch unter 10 nm, weshalb es durch standardmäßige Fluoreszenzmikroskope nicht möglich ist, die exakte Lokalisation eines Proteins anzugeben (Aaron et al., 2018). Zuverlässigere Aussagen können optisch mithilfe anderer Techniken wie dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) getroffen werden (Algar et al., 2019).

Umso wichtiger ist es für Colokalisationsstudien, dass Bilder optimal eingestellt und ausgewählt werden. Dabei ist u.a. Folgendes zu berücksichtigen (Dunn et al., 2011):

- Die Auswahl der Bilder muss repräsentativ für das Fluoreszenzsignal sein.
- Das Bild muss möglichst frei von Hintergrundrauschen und Fluoreszenzartefakten sein.
- Das Durchscheinen des Fluoreszenzsignals des anderen Kanals muss vorab durch die Auswahl passender Fluorophore, die sich nicht in Emission- und Exzitationsspektra überschneiden, vermieden werden.

Für die Colokalisationsstudien mit SLC10A7 (**Publikation #1** und **#2**) bedeutet dies, dass alle Aussagen zu den möglichen Interaktionspartnern STIM, SERCA und ORAI auf dieser optischen Methode beruhen und deshalb immer kritisch betrachtet werden müssen, solange sie nicht durch weitere Methoden, wie FRET, Coimmunopräzipitation oder anderen Methoden zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktion bestätigt wurden.

3.2.3.6 Fluo-4 AM

Da die Zielsetzung dieser Arbeit auf eine funktionelle Untersuchung des SLC10A7-Proteins abzielt, musste eine Methode gefunden werden, mit der es möglich ist, Unterschiede im Calciumflux der Zellen zu messen; insbesondere in Bezug auf die ersten Hinweise durch die Versuche in *C. albicans* und Patientenfibroblasten (Jiang et al., 2012; Dubail et al., 2018).

Eine Methode, die dies ermöglicht, ist die Fluoreszenz-Intensitätsmessung calciumsensitiver Fluorophore. Fluorophore sind Moleküle, die dazu in der Lage sind, Photonen spezifischer Wellenlänge aufzunehmen, indem sie sich kurzfristig auf ein energetisch höheres Niveau begeben. Die folgende Abgabe dieser Energie äußert sich in der Fluoreszenz des Moleküls. Ein in der Wissenschaft etabliertes Fluorophor ist Fluo-4 [**Abb. 11A**; (Gee et al., 2000)]. Wird Fluo-4 mit blauem Licht einer Wellenlänge von 494 nm angeregt, gibt es selbst grünes Licht einer anderen Wellenlänge von 506 nm wieder ab ²³. Dass Fluo-4 die Eigenschaften eines calciumsensitiven Fluorophors erhält, ist durch die vier funktionellen Carboxylgruppen des Stoffes bedingt, die unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) je einfach negativ geladen vorliegen²⁴. Tritt Fluo-4 in Kontakt mit Calcium, wird dieses durch die vierfach negative Ladung eines Fluo-4-Moleküls komplexiert. Folgend wird die Absorption des blauen Lichts und die Emission des grünen Lichts bis um den Faktor 100 gesteigert²³. D.h. je höher das detektierte Fluoreszenzsignal des grünen Lichts ist, desto höher muss die zytoplasmatische Calciumkonzentration der untersuchten Zelle sein.

Um das Prinzip dieser Methode nutzen zu können, muss Fluo-4 folglich in die zytoplasmatischen Kompartimente der Zelle gelangen. Zu diesem Zweck ist es nötig, dass das Molekül die lipophile Zellmembran überwindet. Dies ist durch seine vierfach negative Ladung und die damit verbundene Hydrophilie unmöglich. Deshalb wird in der Wissenschaft eingesetztes Fluo-4 verestert (Paredes et al., 2008). Dies geschieht durch die chemische Reaktion der Carboxylgruppen des Fluo-4 mit den Alkoholgruppen mehrerer Hydroxymethylacetat-Moleküle. Durch die Reaktion entsteht ein Fluo-4-<u>A</u>cetoxy<u>m</u>ethylester (Fluo-4 AM). Dieser ist ladungsneutral und kann folgend die Zellmembran permeieren. Sobald Fluo-4 AM in die Zelle gelangt ist, wird es durch unspezifische Esterasen des Zytoplasmas gespalten, sodass erneut die negativ geladene Form des Moleküls vorliegt (Paredes et al., 2008). Diese kann die Zellmembran nicht mehr passieren und kann deshalb für die Messung des intrazellulären

²³ www.thermofisher.com/order/catalog/product/F14201

²⁴ https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25058176

Calciumgehalts genutzt werden. In **Abbildung 11B** ist der Versuchsablauf für eine solche intrazelluläre Calciummessung schematisch dargestellt.

Verschiedene Faktoren können jedoch während der Calciummessung mittels Fluo-4 zu Störsignalen der detektierten Fluoreszenz und damit einhergehend zu falsch interpretierten Ergebnissen führen. In Abbildung 11C sind mögliche Einflussfaktoren, negative Auswirkungen und Lösungsansätze für die auftretenden Probleme dargestellt. Beispielsweise ist Fluo-4 dazu in der Lage, nicht nur Calciumionen zu komplexieren, sondern kann ebenso andere, zweiwertige Kationen aufnehmen, die sich im Medium befinden. Diese sorgen zwar während einer Messung für einen prozentual niedrigeren Fluoreszenzsignalanstieg, tragen aber trotzdem einen Teil zum Anstieg des Signals bei. Deshalb ist während der Messung darauf zu achten, dass verwendete Puffer keine zweiwertigen Kationen enthalten²³. Außerdem kann zytoplasmatisches Fluo-4 von unspezifischen Anionentransportern aus der Zelle geschleust werden. Somit sinkt die zytoplasmatische Fluo-4-Konzentration mit der Zeit. Deshalb ist während einer Messung unbedingt darauf zu achten, dass die Versuchszeit so gering wie möglich gehalten wird (Paredes et al., 2008) und verschiedene Messungen (Vergleiche zu Zelllinien, Inhibitoren, etc.) randomisiert durchgeführt werden. Zusätzlich kann, um den Risikofaktor Zeit zu minimieren, Probenecid, als Anionentransporter-Inhibitor eingesetzt werden (Di Virgilio et al., 1990; Li et al., 2008; Liao et al., 2021). Dadurch bleibt Fluo-4 länger in der Zelle enthalten.

Vorteil der Fluo-4-Methode ist, dass sie kostengünstig und schnell durchzuführen ist. Zudem lassen sich nicht nur Grünsignale des Fluo-4 während der Messung darstellen, sondern auch die Fluorophore *getaggter* Proteine, sofern diese andere Emissionsmaxima besitzen. Beispielsweise können so mScarlet-*getaggte* Proteine zeitgleich zur Calciummessung untersucht werden (wie in **Publikation #1** und **Publikation #2** geschehen).



ABBILDUNG 11 | Schematische Übersicht zu Fluo-4 und Fluo-4 AM. (A) Molekulare Struktur des Fluorophors Fluo-4 in der ionisierten Form, die intrazellulär dazu in der Lage ist, zweiwertige Kationen wie Calciumionen zu komplexieren (links). Die ungeladene Form Fluo-4 AM ermöglicht den Eintritt in die Zelle, ist aber nicht dazu in der Lage Calcium zu binden (Mitte). Nach Anregung mit blauem Licht gibt Fluo-4 Energie in Form von grünem Licht wieder ab (rechts). Quelle: Strukturformeln in Anlehnung an NCBI Pubchem (Compound/25058176). (B) Schematischer Versuchsaufbau einer Fluo-4 AM Calciummessung. (C) Negativbeispiel einer Fluo-4 AM Calciummessung. Vier potenziell auftretende Störfaktoren, ihr Effekt auf die Messung und Vermeidungsstrategien sind gelistet. (D) Schematische Abbildung des Zusammenhangs zwischen der Änderung des Fluoreszenzsignals über die Zeit hinweg in Abhängigkeit von der relativen SLC10A7-Expression (nach Behandlung mit SOCE-anregenden Substanzen). | AM = Acetoxymethylester; ROI = Region Of Interest; λ Em = Wellenlänge der Emission; λ Ex = Wellenlänge der Exzitation



3.3 DIE ROLLE VON SLC10A7 IM CALCIUMSTOFFWECHSEL

3.3.1 Effekte von SLC10A7 auf die Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom

In **Publikation #1** ließ sich mittels der etablierten Zellkulturmodelle und der funktionellen Fluo-4-AM-Messung ein Unterschied zwischen Hap1-Wildtyp (Hap1-WT) und Hap1-KOP7 sowie zwischen HekP7-Tet. und HekP7+Tet. Zellen zeigen. Dabei war zu sehen, dass SLC10A7defekte Zellen eine signifikant höhere <u>Calciumfreisetzung</u> aus zellulären Calciumspeichern, nach Ionomycinbehandlung, TG-Behandlung und ATP + Carbacholbehandlung zeigen (schematisch in **Abb. 11D**). Äquivalentes war für die HekP7-Tet. Zellen im Vergleich zu den SLC10A7 stabil überexprimierenden HekP7+Tet. Zellen zu sehen (erster Peak des F/F₀-Zeit-Graphen). Zusätzlich zeigte sich in Hap1-KOP7 Zellen ein erhöhter <u>Calciumeinstrom</u> im Vergleich zu WT-Zellen nach Zugabe von extrazellulärem Calcium. Ein signifikant niedrigerer Calciumeinstrom war in SLC10A7-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu WT-Zellen zu beobachten.

3.3.1.1 Durch lonomycin ausgelöste Effekte

Mithilfe von Ionomycin lassen sich regulatorische Eigenschaften von Calcium in zellulären Prozessen untersuchen²⁵. Ionomycin stammt aus dem Bakterium *Streptomyces conglobatus* und gehört zur Gruppe der Ionophore (Bennett et al., 1979). Ionophore können Poren innerhalb von Membranen bilden und so das Passieren von Ionen über Lipiddoppelschichten ermöglichen (Bennett et al., 1979). Ionomycin sorgt sowohl für den Einstrom von extrazellulärem Calcium, als auch für die Freisetzung von Calcium aus allen intrazellulären Calciumspeichern (Morgan and Jacob, 1994; Nusse et al., 1997; Decuypere et al., 2013). Da Zellen mit weniger oder gar keinem SLC10A7-Protein nach der Behandlung mit Ionomycin sowohl eine höhere Calciumfreisetzung als auch einen höheren Calciumkonzentration und der Expression von SLC10A7 zu bestehen. Durch dieses Experiment kann folglich auch im humanen Zellkulturmodell ein Zusammenhang zwischen SLC10A7 und dem Calciumhaushalt beschrieben werden (**Publikation #1**).

Zusätzliche Experimente mit Ionomycin und EGTA, das als Calciumchelator verwendet wird, um extrazelluläres Calcium abzufangen, zeigen, dass SLC10A7-defiziente Zellen mehr Calcium aus intrazellulären Speichern nach Ionomycinbehandlung freisetzen können als ihre

²⁵ www.thermofisher.com/order/catalog/product/l24222

entsprechenden Kontrollzellen (**Publikation #1**). Dass die Calciumkonzentrationserhöhung tatsächlich durch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern erfolgt und es nicht zur Aufnahme von extrazellulärem Calcium kommt, wurde durch den gleichzeitigen Einsatz von EGTA sichergestellt.

3.3.1.2 Durch Thapsigargin ausgelöste Effekte

Mithilfe von TG lässt sich der SOCE als spezifischer Calciumsignalweg untersuchen. TG wird aus der Wurzel und den Früchten der Pflanze *Thapsia garganica* gewonnen und gehört zur Stoffklasse der Sesquiterpenlactone, die der Pflanze durch deren extrem hohe Toxizität als Schutz vor Fraßfeinden dienen (Andersen et al., 2015). Auf zellulärer Ebene ist TG ein in der Forschung etablierter Inhibitor der SERCA-Pumpe. In nanomolaren bis subnanomolaren Konzentrationen bindet es irreversibel an den Calcium-freien-E2-Status des Proteins und blockiert den Transport von Calcium ins Lumen des ER (Brini et al., 2012; Jaskulska et al., 2020; Christensen et al., 2021). Folglich kommt es zur Depletion der ER-Calciumspeicher und damit zur Dissoziation von Calcium von der EF-Hand des STIM-Moleküls. Es kommt zur Interaktion von STIM mit ORAI. ORAI ermöglicht folgend den Eintritt von extrazellulärem Calcium in die Zelle. Die Kaskade des SOCE wird also mithilfe von TG in Gang gesetzt – das Auffüllen der ER-Calciumspeicher jedoch verhindert.

Da signifikante Unterschiede im Calciumflux während der Fluo-4 Messung zwischen Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen sowie zwischen HekP7-Tet. und HekP7+Tet. Zellen nach der Behandlung mit TG zu sehen waren, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass SLC10A7 einen Einfluss auf SOCE hat. Zudem wäre eine Interaktion mit einer der bei diesem Stoffwechselweg beteiligten Proteine – STIM, ORAI oder SERCA – denkbar.

In passenden Kontrollexperimenten, bei denen ebenfalls Fluo-4 Messungen durchgeführt wurden, ohne dass die Zellen mit TG vorbehandelt wurden, waren keine Unterschiede zwischen Hap1-WT und Hap1-KOP7 oder zwischen HekP7-Tet. und HekP7+Tet. Zellen zu sehen. Diese Experimente unterstützen deshalb die oben dargestellte Hypothese (**Publikation #1**).

TG besitzt in höheren Konzentrationen einen zusätzlichen, inhibitorischen Effekt auf andere Calcium-ATPasen der Zelle. Beispielsweise wird die SPCA des Golgi-Apparates ebenfalls durch TG irreversibel gehemmt, auch wenn dies erst in maßgeblich höheren TG-Konzentrationen passiert als für SERCA (Brini et al., 2012; Christensen et al., 2021). Für die durchgeführten

Experimente bedeutet dies, dass der ausgelöste Effekt des Calciumeinstroms und der Calciumfreisetzung hauptsächlich durch die Hemmung von SERCA ausgelöst wird, jedoch eine Beteiligung von SPCA an diesem Prozess nicht zu einhundert Prozent ausgeschlossen werden kann. Die SPCA ist in der Membran des Golgi-Apparates lokalisiert und kann sowohl Calciumionen als auch Magnesiumionen vom Zytosol ins Lumen des Golgi-Apparates transportieren. Durch die extrem hohe Affinität zu Calcium, gewährleistet die Pumpe jederzeit, dass genug Calcium in den Golgi-Vesikeln zur Verfügung steht, damit wichtige Glykosylierungsenzyme, die Calcium und Magnesium als Cofaktoren benötigen, arbeiten können (Brini et al., 2013). Die durch TG induzierte Hemmung von SPCA könnte also die Entleerung der Golgi-Calciumspeicher mit sich führen, was sich ebenfalls in einer Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration äußern würde (Chen et al., 2017). Der Calciumeinstrom durch die Entleerung der Golgi-Speicher wird interessanterweise durch ORAI, jedoch STIM und SOCE unabhängig, vermittelt (Feng et al., 2010). In der Literatur wird beschrieben, dass SPCA direkt mit dem intrazellulären C-Terminus von ORAI interagiert und folgend den Calciumeinstrom ermöglicht (Feng et al., 2010; Srikanth et al., 2013). Da die Hemmung der SPCA jedoch erst in bis zu fünf Größenordnungen höheren Konzentrationen im Vergleich zu SERCA gehemmt wird (Brini et al., 2013) und die in diesen Versuchen eingesetzten TG-Konzentrationen eine Hemmung von SPCA nicht ermöglichen würden, wird ein potenzieller Einfluss der SPCA auf die durchgeführten Experimente in Bezug auf SLC10A7 ausgeschlossen.

Neben TG existieren weitere Calcium-ATPase-Inhibitoren (siehe **Kasten**). Diese besitzen jedoch weniger spezifische, inhibitorische Eigenschaften. Beispielsweise hemmen Lanthan und Orthovanadat alle zellulären Calcium-ATPasen (PMCA, SPCA, SERCA). Die Stoffe Curcumin, Cyclopiazonsäure und 2,5-Di-tert-butylhydrochinon besitzen bereits spezifischere Eigenschaften, teilen aber eine niedrigere Affinität für SERCA und binden nur reversibel an die Pumpe (Brini et al., 2012). Mit TG wurde deshalb der bis dato spezifischste bekannte Inhibitor der SERCA-Pumpe ausgewählt, um SOCE in den Versuchen anzusprechen.

Lanthan, Orthovanadat > Curcumin > Cyclopiazonsäure, 2,5-Di-tert-butylhydrochinon > Thapsigargin

3.3.1.3 Durch ATP + Carbachol ausgelöste Effekte

Ein anderer Weg, um die Entleerung der ER-Speicher zu verursachen, ist der Einsatz von Carbachol in Kombination mit ATP. Carbachol ist in der Medizin als Parasympathomimetikum bekannt und stellt ein Strukturanalogon des Neurotransmitters Acetylcholin dar (Pakala et al., 2021). ATP und Carbachol interagieren mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (ATP: purinerge Rezeptoren; Carbachol: muskarinerge Rezeptoren) an der Zellmembran und sorgen im Weiteren für die Entleerung der ER-Calciumspeicher durch Aktivierung des IP₃R-gekoppelten Calciumsignalwegs (Salter and Hicks, 1995; Palty et al., 2012; Decuypere et al., 2013).

Durch Inkubation der Hap1-WT und der Hap1-KOP7 Zellen mit den beiden Stoffen zeigte sich zwischen den Zellen ein signifikanter Unterschied sowohl in der Calciumfreisetzung als auch im Calciumeinstrom (**Publikation #1**). Hap1-KOP7 Zellen scheinen sowohl mehr Calcium nach ATP + Carbachol-Behandlung freizusetzen, als auch mehr Calcium aus extrazellulären Quellen aufzunehmen. Äquivalentes gilt für die HekP7-Tet. bzw. HekP7+Tet. Zellen. Mithilfe dieser Experimente lässt sich zeigen, dass der durch IP₃ und IP₃R regulierte Calciumsignalweg durch SLC10A7 angesprochen wird und dass freigesetztes Calcium aus den ER-Speichern, und nicht beispielsweise aus den Golgi-Speichern, stammen muss. Sie schließen deshalb zusätzlich den oben beschriebenen Effekt in Bezug auf die SPCA und TG aus.

3.3.1.4 Durch BTP-2 ausgelöste Effekte

Als Inhibitor von ORAI und damit von SOCE ist BTP-2 bekannt (Sweeney et al., 2009; Bogeski et al., 2010). BTP-2 gehört zur chemischen Gruppe der Pyrazole und blockiert ORAI, sodass kein Eintritt von Calciumionen, nach der Entleerung des ER durch TG, aus dem Extrazellularraum möglich ist. Sowohl Hap1-WT als auch Hap1-KOP7 mit BTP-2 vorbehandelte Zellen zeigen geringere Fluo-4 Signale nach TG-Behandlung und nach Addition von extrazellulärem Calcium (**Publikation #1**). Dies ist durch die ORAI-Inhibierung ausgelösten niedrigeren zytosolischen Calciumlevel begründet, die gleichzeitig ein weniger starkes Auffüllen der ER-Calciumspeicher durch SERCA ermöglichen. Interessanterweise sinken die zellulären Calciumkonzentrationen während der Calciumfreisetzung als auch während des Calciumeinstroms von Hap1-KOP7 BTP-2 behandelten Zellen auf das Level der Hap1-WT BTP-2-unbehandelten Zellen ab. Der durch SLC10A7-Defizienz ausgelöste Effekt in den Zellen wird hier aufgehoben. Dieser Zusammenhang legt deshalb weiterhin einen Einfluss von SLC10A7 auf SOCE nahe.

Für BTP-2 wird beschrieben, dass es nicht nur ORAI inhibiert, sondern ebenfalls dazu in der Lage ist, TRP-Kanäle zu blockieren (Schleifer et al., 2012). Einige Unterklassen der sehr vielfältigen TRP-Kanäle ermöglichen ebenfalls einen speichergesteuerten Calciumeinstrom, nachdem die IP₃R-Signalkaskade initiiert wurde. Nach Entleerung der ER-Speicher sorgen sie für den Einstrom von extrazellulärem Calcium. Dies kann in einer STIM-gekoppelten und STIMunabhängigen Art und Weise passieren. Wobei letztere in der Literatur umstritten ist (Choi et al., 2014). Für die durchgeführten Experimente bedeutet dies, dass durch BTP-2 auch TRP-Kanäle trotz ihrer im Vergleich zu ORAI höheren IC₅₀-Werte blockiert werden könnten, was neue Signaltransduktionswege aufgeben würde, die durch SLC10A7 beeinflusst werden könnten. Dies müsste in weiteren Experimenten, mittels spezifischerer Inhibitoren wie z.B. dem Pyrazolderivat Pyr6 (Schleifer et al., 2012) ausgeschlossen werden.

3.3.1.5 Aufhebung der durch SLC10A7-Defizienz ausgelösten Effekte via transienter SLC10A7-Überexpression in Hap1-KOP7 Zellen.

Dass die dargestellten Effekte auf den Calciumhaushalt in Hap1-KOP7 Zellen tatsächlich aus einer SLC10A7-Defizienz resultieren, wurde mit einem Experiment bestätigt, in dem SLC10A7mScarlet transient in Hap1-KOP7 Zellen überexprimiert wurde (Publikation #1). Dies führte zu einer Aufhebung des durch den Knockout ausgelösten Effekts auf den Calciumhaushalt. Auch in Wildtypzellen kam es durch die transiente Überexpression von SLC10A7-mScarlet zur Senkung des grün-Fluoreszenzsignals und damit zur Abnahme des Calciumeinstroms in die WT-Zellen. Folglich ist es naheliegend, dass der ausgelöste Effekt tatsächlich aus der Malfunktion des SLC10A7-Proteins resultiert. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei dem transfizierten Protein um ein getaggtes Protein handelt, dessen Eigenschaften durch den Tag selbst oder durch verwendete Transfektionsmedien verändert sein könnte. Bei einer funktionellen Calciummessung wäre es deshalb für weitere Experimente sinnvoll, Negativkontrollen, in Form von Leervektoren, die keine proteinkodierende Sequenz enthalten. in den Versuchsaufbau miteinzubeziehen und unterschiedliche Transfektionsmethoden zu verwenden, um potenzielle Off-Target Effekte zu detektieren oder auszuschließen (Stepanenko and Heng, 2017).

3.3.1.6 Negative Korrelation zwischen SLC10A7-Expression und zellulärer Calciumkonzentration

Durch ein Experiment, bei dem die Gesamtcalciumkonzentration über ein kolorimetrisches Calcium-Assay gemessen wird, konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Calciumgehalt in Hap1-KOP7 Zellen deutlich höher liegt als in Hap1-WT Zellen (**Publikation #1**). Der entsprechende umgekehrte Effekt war in SLC10A7-überexprimierenden Zellen zu sehen und bestätigt die Korrelation zwischen SLC10A7-Expression und negativer Korrelation der zellulären Calciumkonzentration.

3.3.1.7 Colokalisation mit ORAI/STIM/SERCA

Zusätzlich zeigte sich durch die durchgeführten Colokalisationsstudien (**Publikation #2**), dass SLC10A7-mScarlet am wahrscheinlichsten im ER zu finden ist. Außerdem konnten die Colokalisationsstudien mit STIM und ORAI, STIM als möglichen Interaktionspartner für SLC10A7 herauskristallisieren (**Publikation #2**). Im Gegensatz dazu konnte ORAI als möglicher Interaktionspartner für SLC10A7 ausgeschlossen werden (**Abb. 12**). Für ORAI und SLC10A7 scheint es keine Korrelation für ihre zelluläre Verteilung zu geben. Für SERCA lassen sich keine validierten Aussagen zu möglichen Colokalisationen mit SLC10A7 treffen, da es nicht möglich war, beide Proteine mit validierten, unterschiedlichen *Fluoreszenztags* zu klonieren. SERCA käme deshalb trotzdem als möglicher Interaktionspartner in Frage, da es genau wie SLC10A7 und STIM im ER zu finden ist (**Publikation #2**). Dies müsste jedoch in zusätzlichen Experimenten bestätigt werden.

3.3.1.8 Zusammenfassung der Effekte

Zusammenfassend lässt sich für die Funktion von SLC10A7 beschreiben, dass das Protein einen Einfluss auf den Calciumhaushalt der Zelle haben muss. Bei SLC10A7-Defizienz kommt es zur erhöhten Calciumfreisetzung aus zellulären Calciumspeichern. Am wahrscheinlichsten gilt hier die Freisetzung aus dem ER. Zusätzlich kommt es zu einem erhöhten Calciumeinstrom über die PM. Als Hauptkomponente dieses Effekts scheint der SOCE, der durch die Proteine STIM, SERCA und ORAI vermittelt wird, eine Rolle zu spielen. Dabei kommen STIM und SERCA am ehesten als potenzielle Interaktionspartner in Frage.

3.3.1.9 Hypothesen zur Regulation des SOCE durch SLC10A7

Eine Hypothese, die sich aufgrund der durchgeführten Experimente mit Ionomycin, TG und ATP + Carbachol ergibt, ist, dass humanes SLC10A7 den Calciumeinstrom durch die Beeinflussung der CRAC-Kanäle (STIM-ORAI) negativ reguliert (**Publikation #1**). Als Erklärung dieses Szenarios sind verschiedene Optionen möglich:

- SLC10A7 könnte durch direkte Interaktion mit den an SOCE beteiligten Proteinen den Calciumeinstrom negativ regulieren.
- Durch die Colokalisationsstudien wurde untersucht, ob es erste Hinweise auf STIM oder ORAI als direkte Interaktionspartner f
 ür SLC10A7 gibt. Durch die begrenzte optische

Auflösung der Methode und die damit verknüpfte eingeschränkte Aussagekraft, ist es nur möglich, ORAI als direkten Interaktionspartner für SLC10A7 auszuschließen, da weder vor noch nach Aktivierung des SOCE durch TG eine Colokalisierung zwischen ORAI und SLC10A7 detektiert werden konnte (Abb. 12). Infolgedessen scheint es aufgrund der räumlichen Verteilung der Proteine unwahrscheinlich, dass SLC10A7 eine Protein-Protein-Interaktion mit ORAI eingeht und so zu einer direkten Beeinflussung des Proteins führt. Auch erscheint es unwahrscheinlich, dass SLC10A7 als Regulatorprotein der STIM-ORAI-Interaktion fungiert, wie dies für Junctophilin, Mitsugumin oder Sarcolumenin gezeigt wurde, die an den PM-ER-Verknüpfungsstellen vorgeformte Bereiche bilden, in denen sich STIM und ORAI gruppieren (Srikanth et al., 2013). Zumindest wurde SLC10A7 während der Versuche dieser Doktorarbeit in diesen Kompartimenten nicht detektiert. Für ORAI gibt es zahlreiche, in der Literatur beschriebene Interaktionspartner wie Calmodulin, Calveolin, SPCA oder CRACR2A (CRAC Channel regulator 2A). CRACR2A interagiert beispielsweise calciumkonzentrationsabhängig mit dem N-Terminus von ORAI. Wobei es bei niedrigen zytosolischen Calciumkonzentrationen die Interaktion zwischen STIM und ORAI fördert und bei höheren Calciumkonzentration dessen Dissoziation (Srikanth et al., 2013). Auch diese Möglichkeit wird aufgrund der fehlenden Korrelation zwischen der Verteilung der ORAI- und SLC10A7-Proteine in den Colokalisationsstudien ausgeschlossen.

b. STIM hingegen kommt als direkter Interaktionspartner für SLC10A7 in Frage, da beide Proteine im ER zu finden sind und der PCC der detektierten *Proteintags* vergleichsweise hoch liegt (**Publikation #2**). Jedoch transloziert SLC10A7 nach der Anregung des SOCE durch TG nicht zur PM, wie es für STIM beschrieben wird. Denkbar wäre deshalb eine Interaktion der beiden Proteine im ER, wo SLC10A7 die physiologische Funktion von STIM reguliert. SLC10A7 könnte beispielsweise die Oligomerisation oder die Verlängerung des STIM Proteins zu ORAI behindern, wodurch es zu einer gedrosselten Interaktion von STIM mit ORAI und damit einem kontrollierten Calciumeinstrom via SOCE kommen würde. Diese Hypothese müsste jedoch durch weitere Methoden, wie Coimmunopräzipitation oder FRET, bestätigt werden. Zusätzlich wären geeignete SLC10A7-Antikörper, die sich für die Detektion des nativen SLC10A7-Proteins eignen, wünschenswert, so dass die tatsächliche Lokalisation des nativen Proteins aufgeklärt werden könnte. Wenn die tatsächliche Struktur des SLC10A7-Proteins aufgeklärt werden könnte, würde dies eine Reihe an weiteren Untersuchungen ermöglichen, mit denen die Funktion und mögliche Interaktion des Proteins mit STIM hergeleitet werden könnte. Beispielsweise wird für das Protein Juctate beschrieben, dass dieses – abhängig von der ER-Calciumkonzentration – STIM regulieren kann (Srikanth et al., 2013). Als ein weiterer regulatorischer Faktor für STIM gilt SARAF (*SOCE-associated regulatory factor*). SARAF ist ein Single-Pass-Transmembranprotein, dessen C-Terminus im Zytoplasma gelegen ist und der mit STIM interagiert. Nach der ER-Calciumspeicherentleerung transloziert SARAF zu den PM-ER-Verknüpfungsstellen und erleichtert dort die Dissoziation des STIM-Proteins von ORAI, so dass der SOCE negativ reguliert wird (Srikanth et al., 2013). Eine ähnliche Rolle scheint für SLC10A7 nicht denkbar, da es nach TG-Behandlung zu keiner veränderten Lokalisation des Proteins kommt – weshalb für die Interaktion von SLC10A7 mit STIM neue, alternative Modelle und Theorien gefunden werden müssten.

- c. SERCA ist zwar keine direkte Komponente des CRAC-Kanals, ist aber durch die Wiederauffüllung der ER-Calciumspeicher an SOCE beteiligt. SERCA kommt deshalb auch für direkte oder indirekte Interaktion mit SLC10A7 in Frage, v.a. da Unterschiede im Calciumflux nach TG-Behandlung in SLC10A7-*Knockout* und überexprimierenden Zellen zu sehen waren. Da es im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich war, GFP-markiertes SERCA zu klonieren, konnte SERCA als möglicher Interaktionspartner für SLC10A7 nicht weiter untersucht werden. Da jedoch beide Proteine im ER zu finden sind, wäre eine mögliche Interaktion nicht auszuschließen und muss deshalb über andere Techniken überprüft werden.
- SLC10A7 muss keine direkte Interaktion mit STIM, SERCA oder ORAI eingehen, sondern kann eine indirekte Rolle für den SOCE spielen, indem es Regulatorproteine, wie z.B. SARAF oder CRACR2A, beeinflusst. Durch eine indirekte Beeinflussung von SOCE durch SLC10A7 ergeben sich zahlreiche, weitere denkbare Szenarien, die durch weitere Experimente untersucht werden müssten.



ABBILDUNG 12 | Colokalisation von ORAI-GFP mit STIM- bzw. SLC10A7mScarlet (Methodik siehe Publikation #2). Hohe örtliche Übereinstimmungen der Rot- und Grünsignale erscheinen bei Überlagerung der Bilder gelb, bzw. weiß (Punktintensität). Fluoreszenzbilder (A) Exemplarische der angegebenen transient transfizierten Konstrukte in HEK293 Zellen vor und nach Behandlung mit TG. Die getaggten Proteine ORAI und STIM erscheinen in den für sie beschriebenen ERbzw. plasmamembranären Bereichen. An den ER-PM-Verknüpfungsstellen kommt es zur Interaktion zwischen den Proteinen. Durch die Behandlung mit TG erhöht sich der Grad der Colokalisation. Für ORAI und SLC10A7 hingegen kann rein optisch keine Korrelation der Lokalisation detektiert werden. (B) Dies spiegelt sich auch im durchschnittlichen PCC wider, bei dem ORAI-GFP und SLC10A7-mScarlet PCC-Werte von maximal 0,45 erreichen. Eine Änderung der PCC-Werte nach TG-Behandlung kann deshalb nicht als relevant bewertet werden - auch wenn die Ergebnisse statistisch einen

signifikanten Unterschied ergeben. Für getaggtes ORAI und STIM hingegen erhöht sich der PCC (PCC = 0,46 \rightarrow PCC = 0,78) nach TG-Behandlung, wie es in der Literatur beschrieben wird. Für die Kombination aus ORAI und STIM wurden unbehandelt 58 Zellen untersucht, nach TG-Behandlung 41. Für ORAI und SLC10A7 wurden 67 unbehandelte Einzelzellen und 33 behandelte Zellen untersucht. Jeder Punkt gibt den PCC einer Einzelzelle an. | Die Balken geben die Mittelwerte der PCCs sowie deren Standardabweichung für das durchgeführte Experiment an. * Statistisch signifikant im *Student's t-Test* mit p < 0,05.

3.3.2 Patientenmutationen im SLC10A7-Gen

Aus Patientenbeschreibungen ist bekannt, dass bestimmte homo- oder heterozygot auftretende *SLC10A7*-Mutationen zur Ausprägung eines pathologischen Phänotyps im Menschen führen. Die Nachahmung dieser Mutationen im Zellkulturmodell zeigte, dass diese in der etablierten Fluo-4 Messung zu einer Auflösung des SLC10A7-Wildtyp-Effekts auf den zellulären Calciumhaushalt führen (**Publikation #1 und #2**). Im Folgenden sollen deshalb die beschriebenen Patientenmutationen erläutert werden.

Durch Dubail et al., Ashikov et al. und Laugel-Haushalter et al. wurden insgesamt zwölf verschiedene Patienten mit angeborenen genetischen Defekten im *SLC10A7-*Gen beschrieben. Diese Defekte äußerten sich in Mutationen der kodierenden (Exons) und nicht kodierenden Abschnitte (Introns) des Gens oder in einem kompletten Fehlen der mRNA und damit dem Fehlen des entsprechenden SLC10A7-Proteins (**Abb. 13, Tab. 10**).

Die beschriebenen Mutationen waren über das gesamte Protein verteilt. Alle Mutationen, die in Exons auftraten, äußerten sich in einer Punktmutation verschiedener Aminosäuren (Missense-Mutation; Fam. 3, Fam. 6, Pat. 33, Pat. 17, Pat.) oder dem Einbau eines frühzeitigen Stopcodons (Nonsense-Mutation; Fam. 4, Fam. 5). Es wurde keine Mutation beschrieben, bei der Deletionen oder Insertionen innerhalb der kodierenden Abschnitte auftauchten.

Es lagen insgesamt fünf Mutationen in Spleißakzeptor- oder Spleißdonorstellen. Spleißdonorstellen liegen am Beginn (5'-Ende) der Introns, Spleißakzeptorstellen liegen am Ende (3'-Ende) der Introns und bilden gemeinsam die Erkennungsstelle für das Spleißosom, einem RNA-Protein-Komplex, der während der Proteinbiosynthese für das richtige Herausschneiden der Intronsequenzen sorgt (Stamm et al., 2005; Kelemen et al., 2013). Werden diese hochkonservierten Spleißstellen aufgrund von Mutationen nicht erkannt, kann es zur Synthese fehlerhafter mRNA kommen, die zur Bildung eines *nonsense*-Proteins, einem fehlerhaften Protein oder einem vorzeitigen Kettenabbruch während der Translation führen kann (Arnemann, 2019).

Bei vier Patienten traten Mutationen in Spleißakzeptor- oder Spleißdonorstellen der Introns 8 oder 9 auf, wodurch es zur Deletion der Exons 9 und/oder 10 während des Prozesses des alternativen Spleißens kam (Fam. 1, Fam. 2, Pat. 33, Pat. 17). Die Deletion von Exon 9 resultierte in einer Verschiebung des Leserahmens, was zum Einbau eines frühzeitigen

79



ABBILDUNG 13 | Schematische Übersicht zu den untersuchten SLC10A7-Mutationen. (A) Lokalisation der Mutationen in der Referenztranskriptvariante 2. Verschiedenfarbige Rechtecke mit Nummern stellen Exons dar. Pfeile geben die Stelle in der Sequenz an, bei der es zur Punktmutation kommt. (B) Transmembrandomänenmodell und Lokalisation der Mutationen im 2D-Modell. Große Nummern bezeichnen die Transmembrandomäne (TMD). Kleine Nummern geben die Aminosäureposition an, bei der es zum Wechsel von TMD zu intra- bzw. extrazellulärer Schleife kommt. Die Mutationen sind über die gesamte Struktur verteilt. **(C)** 3D-Struktur des Proteins und Lokalisation der Mutationen (schwarze Markierung). Links: Seitenansicht, rechts: Aufsicht. | 2D = zweidimensional; 3D = dreidimensional; AS = Aminosäure; Bp = Basenpaare; TV = Transkriptvariante; Δ = Deletion des Exons.

Stopcodons während der Proteintranslation und damit zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese führte. Gleiches galt für die Deletion von Exon 10. Kam es zur Deletion beider Exons (Δ 9 und Δ 10), blieb der Leserahmen erhalten, was jedoch zur Deletion von 42 Aminosäuren in der Proteinsequenz führte. Nichtsdestotrotz kann es bei jeder dieser Variationen zum NMD kommen.

Für einen durch Ashikov et al. neu beschriebenen Patienten kam es zusätzlich zur Mutation in der Spleißakzeptorstelle des Introns 2 (Pat. _{Neu}). Welche Auswirkung diese Mutation auf das Protein hat, wurde jedoch in der Publikation nicht weiter thematisiert.

Bei zwei der durch Ashikov et al. beschriebenen Patienten (Pat. 32 und Pat. 39) konnte aus Fibroblasten-Probenmaterial weder *SLC10A7*-mRNA noch cDNA nachgewiesen werden, was für diese Patienten einen kompletten Verlust des SLC10A7-Proteins bedeutete.

Bei 7 von 12 Eltern der betroffenen Patienten war der Verwandtschaftsgrad von Mutter und Vater bekannt, wobei die meisten Elternteile Cousins ersten Grades waren. Bei den Studien von Dubail et al. und Laugel-Haushalter et al. wurden ausschließlich Patienten beschrieben, bei denen die *SLC10A7*-Mutation homozygot auftrat. Ashikov et al. beschrieben zwei Geschwister, deren Eltern nicht blutsverwandt waren und die jeweils unterschiedliche heterozygote Mutationen im *SLC10A7*-Gen trugen (Pat. 17, Pat. 33). Auf einem maternalen Allel zeigte sich eine Punktmutation für die Aminosäure Glycin an Position 112 des kodierenden Strangs, die in einem Aminosäureaustausch zu Asparaginsäure resultierte. Das paternale Allel hingegen zeigte eine Mutation in der Spleißakzeptorseite von Intron 8, was zur Deletion des kompletten Exons 9 führte.

Bei allen bisher bekannten Patienten treten in beiden Allelen die Mutationen im *SLC10A7*-Gen auf, was zur Ausbildung des beschriebenen Phänotyps führt. In Online-Datenbanken wie *gnomAD* existieren jedoch zusätzliche Informationen aus Sequenzierungsprojekten, bei denen

| Patient | Verwandtschaftsgrad | Status | SNP-Nr. | Nukleotid Position | Nukleotid Substitution | Genomische Lokalisation | Auswirkung auf mRNA | AS-Austausch | Lokalisation im Protein | Auswirkung auf das Protein |
|---------------------|---|---------------------------|--------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|---|--------------|----------------------------|--|
| | | | | | | Dub | ail et al. | | | |
| Fam. 1 | Gemeinsame Vorfahren der Eltern (Cousins ersten Grades) | homozygot | k.A. | 774-1 | TAG → TAA | 6ul | Δ10; Spleißakzeptorseite betroffen; | | Ē | Frameshift bei T258 und frühzeitiges Stopcodon bei A270; |
| | | | | | | | Δ9+10; Spleißakzeptorseite betroffen | | ц | Inframe Deletion von 42 Aminosäuren |
| Fam. 2 | Gemeinsame Vorfahren der Eltern (Cousins ersten Grades) | homozygot | k.A. | 773+1 | GTA → ATA | 6ul | Δ9 Spleißdonorseite betroffen | | Ē | Frameshift bei 1241 und frühzeitiges Stopcodon bei A270 |
| Fam. 3 | Gemeinsame Vorfahren der Eltern | homozygot | rs1560980659 | 221 | стт → сст | Ex3 | | L74P | 3. TMD | Aminosäureaustausch an Position 74 |
| Fam. 4 | In der 5. Tochtergeneration mit Fam. 5 verwandt | homozygot | rs1376082145 | 514 | CAG → TAG | Ex7 | | Q172* | 6. TMD | frühzeitiges Stopcodon bei Q172 |
| Fam. 5 | In der 5. Tochtergeneration mit Fam. 4 verwandt | homozygot | rs1376082145 | 514 | CAG → TAG | Ex7 | | Q172* | 6. TMD | frühzeitiges Stopcodon bei Q172 |
| Fam. 6 | Gemeinsame Vorfahren der Eltern (Cousins ersten Grades) | homozygot | rs1560973467 | 388 | GGA → AGA | Ex4 | 1 | G130R | 2. IZS | Aminosäureaustausch an Position 130 |
| | | | | | | Ashil | kov et al. | | | |
| Pat. 33 | Schwester zu Pat. 17 | heterozygot (maternal) | rs1560973571 | 335 | GGT → GAT | Ex4 | | G112D | 4. TMD | Aminosäureaustausch an Position 112 |
| | | heterozygot (paternal) | rs773117913 | 722-16 | CAA → CAG | ln8 | Δ9, NMD, Spleißakzeptorseite betroffen | | Ч | Frameshift bei 1241 und frühzeitiges Stopcodon bei A270 |
| Pat. 17 | Bruder zu Pat. 33 | heterozygot (maternal) | rs1560973571 | 335 | GGT → GAT | Ex4 | | G112D | 4. TMD | Aminosäureaustausch an Position 112 |
| | | heterozygot (paternal) | rs773117913 | 722-16 | CAA → CAG | ln8 | Δ9, NMD, Spleißakzeptorseite betroffen | | ų | Frameshift bei 1241 und frühzeitiges Stopcodon bei A270 |
| Pat. 39 | adoptiert | k.A. | k.A. | | | | keine detektierbare mRNA | | | Komplettes Fehlen des SLC10A7-Proteins |
| Pat. 32 | k.A. | k.A. | k.A. | | | | keine detektierbare mRNA | | | Komplettes Fehlen des SLC10A7-Proteins |
| Pat. _{Neu} | k.A. | k.A. | k.A. | 184-1 | CAG → CAA | In2 | Spleißmutation | | Ē | k.A. |
| | | | | | | Laugel-Ha | ushalter et al. | | | |
| Pat. | Gemeinsame Vorfahren der Eltern | homozygot | k.A. | 908 | CCC → CTC | Ex11 | | P303L | 10. TMD | Aminosäureaustausch an Position 303 |

TABELLE 10 | Übersicht zu den beschriebenen Patientenmutationen und ihre Auswirkung auf das SLC10A7-Protein. | AS = Aminosäure; Ex = Exon; Fam. = Familie; In = Intron; IZS = intrazelluläre Schleife; k.A. = keine Angabe; NMD = Nonsense-mediated mRNA Decay; Pat. = Patient; SNP = Single Nucleotide Polymorphism; TMD = Transmembrandomäne; * = Stopcodon. über 650 verschiedene genetische Variationen für SLC10A7 gelistet sind, die nicht zwangsläufig biallelisch in den untersuchten Patienten vorkommen. Die Daten stammen von Projekten, bei denen die Genome von nicht-verwandten Personen im Rahmen krankheitsspezifischer und populationsgenetischer Studien sequenziert wurden²⁶. Mithilfe dieser Daten können folglich Aussagen über Allelhäufigkeiten in unterschiedlichen Populationen getroffen werden.

Für **Publikation #2** sollten aus diesen Datensätzen SLC10A7-Varianten gefiltert werden, die besonders häufig vorkommen und für die – genau wie für die Patientenmutationen – über Online-Tools wie SIFT und PolyPhen vorausgesagt wird, dass sie einen Funktionsverlust des Proteins bewirken können.

3.3.2.1 SIFT

SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) ist ein Online-Tool, mit dem eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob eine genetische Variation (Mutation) zur Malfunktion des entsprechenden Proteins führen wird. Die Bewertung beruht auf Sequenzhomologievergleichen und den physikalischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren²⁷.

Die Analysen des Tools basieren auf der Annahme, dass Aminosäuren, die wichtig für die Proteinfunktion sind, konserviert vorkommen. Wird eine dieser wichtigen Aminosäuren durch eine genetische Variation ausgetauscht, wird dies als nachteilig für das Protein vorhergesagt (Ng and Henikoff, 2003). Die Aminosäure Glycin an Position 130 des SLC10A7-Proteins kommt beispielsweise hochkonserviert in der Maus, dem Zebrabärbling und dem Menschen vor (Abb. 14). Evolutionsbiologisch muss davon ausgegangen werden, dass gegen eine Substitution durch andere Aminosäuren an dieser Stelle selektiert wird und dass Glycin an dieser Position für die Proteinfunktion notwendig ist. Zusätzlich bedingen Aminosäuresubstitutionen mit gegensätzlichem Hydrophilieverhalten einen potenziellen Verlust der Proteinfunktion (Ng and Henikoff, 2003).

SIFT alignt in einem ersten Schritt die gewünschte Zielsequenz mit verwandten Proteinsequenzen. In einem zweiten Schritt wird, basierend auf dem Alignment, die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der eine Aminosäure an einer Position konserviert

²⁶ https://gnomad.broadinstitute.org/about

²⁷ https:/sift.bii.a-star.edu.sg/

| Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus X. laevis D. rerio | 1 MRLLER RK WEIVGIVLALAFAKLEPSIGVNCGPLKPEITVSYIAVATIFFNSGLSLKT 1 MRLLERARKEWEIVGIVLA <mark>I</mark> GAAKLEPSVGVNCGPLKPEITVSYIAVATIFFNSGLSLKT 1 MGLLER RKEWFIAGIALVIAAALLEFAVGVKGGPLKPEITITYIAVSAIFFNSGLSLKT 1 MGLLER RKEWFIYGIILVIAAAKLEFIVGVKGGPLKPEITITYIAVSAIFFNSGLSLKT 1 MGLLAR RKEWFIIGIVLVITFAKLOPSVGVKGGPLHPEITITYIAVSA |
|--|---|
| Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus X. laevis D. rerio | 1174 1G112 61 EELTSALVH KLHLF QIFTLAFFPATIWLFLQLLSITPINEWLLKGLQTVCCMPPPVSS 61 EELTSALVH FLHLF QIFTLAFFPATWLFLQLLSITSINEWLLKGLQTVCCMPPPVSS 61 EELTSALMHVKLHLFVQIFTLVFFPTATWLFLQLLSITPINEWLLKGLQTVCCMPPPVSS 61 EELTNALMHVKLHFVQIFTLVFFPTATWLFLQWLSITPINEWLLKGLQTVCCMPPPVSS 61 EELASALMHVKLHFVQIFTLVFFPTATWLFLQWLSITPINEWLLKGLQTVCCMPPPVSS 61 EELASALMHVKLHF |
| Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus X. laevis D. rerio | IG130 IG146 IQ172* 121 AVILTKAVGONEAAAITENSAFGSFIGIV TPLLLLFLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVP 121 AVILTKAVGONEAAAITENSAFGSFIGIVVTPLLLLFLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVP 121 AVILTKAVGONEAAAITENSAFGSFIGIVVTPLLLLFLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVP 121 AVILTKAVGONEAAAITENSAFGSFIGIVVTPLLLLFLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVP 121 AVILTKAVGONEAAAITENSAFGSFIGIVVTPLLLLFLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVP 121 AVILTKAVGONEAAAITENSAFGSFIGIVVTPLLLLFLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVP 121 AVILTKAVGONEAAAITENSAFGSFIGIVVTPLLLLFLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVP |
| Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus X. laevis D. rerio | 1210 17221 1V235 181 LIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAISS VLMIIYTFCDTFSNPNIDLDKFSLV IFI 181 LIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGVSS VLMIIYTFCDTFSNPNIDLDKFSLV IFI 169 LIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAISSC VLMIIYTFCDTFSNPNIDLDKFSLV IVFI 181 LIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAISSC VLMIIYTFCDTFSNPNIDLDFFSLV IVFI 181 LIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAISSC VLMIIYTFCDTFSNPNIDLDFFSLV IVFI 181 LIIGQICRRFLECLERKPPFGAISSC VLMIIYTFCDTFSNPNIDLDFFSLV IVFI |
| Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus X. laevis D. rerio | 1P285 241 IFSIQLSFMLLTFIFSTENNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLI 241 IVSIQLSFMLLTFIFSTENNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLI 249 IFSIQLSFMELTFIFSTESNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGYEHLSLI 241 IFFIQLAFMLLTFIFSTSNSGFTPADTVAIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGYEHLSLI 241 IFSIQLSFMALIFFISTERNSGFTPADTVAIFCATHKSLTLGIPMLKIVFAGYEHLSLI |
| Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus X. laevis D. rerio | IP303 301 SVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVKLTRPTV 301 SVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVKLTRPTV 289 SVPLLIYHPAQILLGSULVPTIKSWMVSRQKALKLTRQPKVPVKV 301 SVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWM SRQKALKLTRQPKIPL 301 SVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMSGRQKTTPT |

ABBILDUNG 14 | Multispeziesalignment der SLC10A7-Proteinsequenzen zwischen dem Menschen (*Homo sapiens*), der Maus (*Mus musculus*), dem Huhn (*Gallus gallus*), dem Krallenfrosch (*X. laevis*) und dem Zebrabärbling (*D. rerio*). Das Alignment vergleicht die Proteinsequenzen mit der Konsenssequenz aller alignten Sequenzen und bewertet diese (Schwellenwert = 0,5). Schwarze Bereiche stellen komplett konservierte Aminosäuren dar, graue Bereiche zeigen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften in Bezug auf Ladung, Größe und Hydrophobizität an. Weiße Bereiche geben Abweichungen der Proteinsequenz von der Konsenssequenz an. Farbige Rechtecke und Pfeile markieren die mutierte Aminosäureposition in der humanen Sequenz, die entweder aus Fallberichten (rot) oder aus den Datenbanken (orange) stammt. | Die Grafik wurde erstellt mithilfe des Online-Tools "Clustal Omega" von EMBL-EBI (Madeira et al., 2019) und pyBoxshade.

vorkommt. Zusätzlich werden die Wahrscheinlichkeiten des Vorkommens aller anderen 20 Aminosäuren basierend auf ihrem Löslichkeitsverhalten berechnet. Entsprechend wird eine Wahrscheinlichkeitsmatrix für jede Aminosäure an jeder Position bestimmt. Sobald die Wahrscheinlichkeiten für das Vorkommen unterhalb einen bestimmten Wert (SIFT-Score) fallen, wird angenommen, dass die Aminosäuresubstitution für die Proteinfunktion schädlich sein könnte (Kumar et al., 2009).

3.3.2.2 PolyPhen

PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) ist ein zweites Online-Tool, mit dem sich ebenfalls Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen auf die Struktur und die Funktion eines Proteins vorhersagen lassen (Adzhubei et al., 2013). PolyPhen errechnet, genau wie SIFT, Wahrscheinlichkeiten der negativen Auswirkungen dieser Substitutionen. In die Berechnungen werden jedoch neben den phylogenetischen, sequenzbasierten Vergleichen zusätzlich Strukturinformationen homologer 3D-Modelle miteinbezogen (Lopes et al., 2012). Dabei werden genauere Informationen zur Substitutionsstelle berücksichtig: z.B. ob die Position normalerweise in der Nähe funktioneller Untereinheiten liegt, sie als Glykosylierungsoder Phosphorylierungsstelle dient oder sie sich in Transmembranbereichen befindet²⁸. Durch diese Berechnungen ergibt sich ein Score, der, sobald er einen bestimmten Wert unterschreitet, für das Protein als funktionsbeeinträchtigend vorhergesagt wird²⁹.

3.3.2.3 SLC10A7-Mutanten im Zellkulturmodell

Im humanen Zellkulturmodell konnte in den Versuchen aus **Publikation #1** eine Beteiligung von SLC10A7 im Calciumhaushalt der Zelle gezeigt werden. Im folgenden Schritt sollte eine Verknüpfung der beschriebenen Patientenmutationen mit dem Zellkulturmodell erfolgen (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019). Zu diesem Zweck wurde SLC10A7-mScarlet entsprechend der beschriebenen genetischen Polymorphismen (Δ 9, Δ 10, Δ 9+10, L74P, G112D, G130R) mutiert und transient in HEK293 Wildtypzellen transfiziert und damit überexprimiert. Bei der anschließenden funktionellen Fluo-4 AM Calciummessung konnte keines der mutierten SLC10A7-Proteine, außer die Mutante G112D, seiner Funktion nachkommen und führte somit zur Aufhebung des SLC10A7-Effekts auf den Calciumhaushalt. Folglich kann angenommen werden, dass es auch in den Zellen humaner Patienten zu einem gestörten Calciumhaushalt kommt. Da eine Vielzahl an zellulären Prozessen durch Calcium gesteuert und beeinflusst wird, könnte die gestörte Calciumhomöostase ursächlich für die Ausprägung des Phänotyps sein.

²⁸ http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2018/13719/

²⁹ http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/start

Die Mutante Q172* konnte aufgrund des frühzeitigen Stopcodons und der damit verknüpften fehlerhaften Expression des mScarlet-getaggten Proteins nicht für die funktionelle Calciummessung verwendet werden und wurde deshalb nicht weiter charakterisiert. In Publikation #2 wurde zusätzlich die Variante P303L, die bei einer Patientin zu milderen Symptomen führte sowie weitere SLC10A7-Varianten (V235F, T221M, I136M, L210F, G146S, P285L), die aus den beschriebenen Datenbanken ausgewählt wurden, untersucht. Die Varianten P303L und L210F waren im Gegensatz zu den oben beschrieben Patientenvarianten dazu in der Lage, den durch Wildtyp-SLC10A7 ausgelösten Effekt auf den Calciumhaushalt teilweise – aber nicht vollständig – nachzubilden. Sie zeigten während des Zeitpunkts der maximalen Änderung des Fluoreszenzsignals im Gegensatz zu den SLC10A7-Mutationen $\Delta 9$, Δ10, Δ9+10, L74P und G130R eine signifikante und um den Faktor 1,2-1,3-fache Reduktion des Calciumeinstroms in Bezug auf die entsprechenden Wildtypzellen. Sie verhielten sich damit ähnlich zur Variante G112D. Interessanterweise trat die Variante G112D in den Patientengeschwistern (Pat. 17, Pat. 33) in Kombination mit der Exon-9-Deletionsvariante auf, was zur heterozygoten Mutation des SLC10A7-Proteins führte. Die Kombination beider Mutationseffekte könnte deshalb im Patienten zur signifikanten Änderung des Calciumhaushalts führen und ein Grund für die Ausbildung des SLC10A7-Phänotyps sein, der bei einer homozygot auftretenden G112D-Mutation womöglich nicht auftreten würde. Der zu erwartende Funktionsverlust der Variante G112D auf den Calciumhaushalt könnte also durch die Δ9-Mutation im Patienten maskiert werden, wodurch sich auch bei diesen Patienten der Zusammenhang zwischen einem veränderten Calciumhaushalt und der Ausprägung des phänotypischen Bildes erklären lassen würde.

Entgegen den Erwartungen zeigten die restlichen SLC10A7-Varianten (V235F, T221M, I136M, G146S, P285L) während der Fluo-4 AM Calciummessungen den gleichen Effekt wie SLC10A7-Wildtypprotein auf den Calciumeinstrom und konnten deshalb nicht die Funktionsverlust-Vorhersagen der Online-Tools bestätigen. Sie würden anhand der Ergebnisse der **Publikationen #1 und #2** deshalb nicht zur Ausbildung der beschriebenen Phänotypen führen.

Bei der Interpretation der Versuchsergebnisse aus den Calciummessungen muss jedoch immer beachtet werden, dass es sich bei den Proteinen, die in den Zellkulturmodellen überexprimiert wurden um keine nativen, sondern mScarlet-*getaggte* Proteine handelte, die eine Aminosäuremarkierung trugen, die rund 40 % des gesamten synthetischen Proteins ausmachte. Zwar wird die Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Effekt aus der *Tag*-

Markierung resultiert, durch die Ergebnisse aus den Versuchen mit SLC10A7-Wildtyp-mScarlet reduziert, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zellen, die SLC10A7-mScarlet überexprimierten, zeigten in den Versuchen einen verminderten Calciumeinstrom im Vergleich zu Wildtypzellen. Jedoch könnte die gesamte Calciumhomöostase durch die unphysiologisch vorherrschenden Bedingungen während der transienten Transfektion gestört sein. Außerdem können große Protein-Tag-Kombinationen zur frühzeitigen Degradation des Proteins in der Zelle führen und damit auch zum Abbau des Zielproteins. Folgende gemessene Effekte könnten dann durch Fluoreszenz-Artefakte bedingt sein. Ein falsches Sorting sollte zumindest für die mScarlet-Mutanten V235F, T221M, I136M, L210F, P285L und G146S ausgeschlossen sein, da sich diese in den Colokalisationsstudien gleich zum Wildtypprotein verhielten (Publikation #2). Die zusätzlich untersuchten Varianten P303L und L74P (Publikation #2), die beide als Patientenmutation auftraten, zeigten ein anderes Sortingverhalten im Vergleich zum WT-SLC10A7-mScarlet Protein. Gleiches galt für die unveröffentlichten Colokalisationsstudien der Mutanten G112D, G130R, Δ 9, Δ 9+10 und Δ 10 (Abb. 15). Sie zeigten alle einen höheren PCC für die SLC10A7-mScarlet Colokalisation im Vergleich zu WT SLC10A7, was womöglich auf eine Beeinflussung von STIM durch die Mutanten hindeutet.

Die Übersetzung der Patientenmutationen ins Zellkulturmodell zeigt, dass sie einen Unterschied zu WT-SLC10A7 in Bezug auf den Calciumhaushalt aufweisen. Ein Zusammenhang zwischen verändertem Calciumgehalt und Ausbildung des Phänotyps ist folglich denkbar.



ABBILDUNG 15 | Colokalisation von STIM-GFP mit SLC10A7-mScarlet Mutanten-/ Wildtypprotein vor (-TG) bzw. nach Thapsigargin (+TG) Behandlung (Methodik siehe **Publikation #2**). Hohe örtliche Übereinstimmungen der Rot- und Grünsignale erscheinen bei Überlagerung der Bilder gelb, bzw. weiß (Punktintensität). **(A)** Exemplarische Fluoreszenzbilder der angegebenen transient transfizierten Konstrukte in HEK293 Zellen vor und nach Behandlung mit TG. **(B)** Durchschnittliche PCC-Werte sinken nach TG-Behandlung um den Faktor 1,3-1,4 signifikant ab. Jeder Punkt gibt den PCC-Wert einer Einzelzelle an. Für das SLC10A7-Wildtypprotein wurden 67 unbehandelte und 43 mit TG behandelte Zellen untersucht; für die Varianten G112D 35 bzw. 40; für G130R 45 bzw. 40; für Δ 9 43 bzw. 33; für Δ 9+10 25 bzw. 29; für Δ 10 35 bzw. 26. | Die Balken geben die Mittelwerte der PCCs sowie deren Standardabweichung für das durchgeführte Experiment an. # Alle SLC10A7-Varianten unterscheiden sich im *Student's t-Test* signifikant vom Wildtypprotein vor TG-Behandlung. * Statistisch signifikant im *Student's t-Test* (p < 0,05).

3.4 DER EINFLUSS VON SLC10A7 AUF DIE N-GLYKOSYLIERUNG

Durch die Publikationen von Ashikov et al. und Dubail et al. wurde gezeigt, dass sich eine SLC10A7-Defizienz auf den Prozess der N-Glykosylierung auswirkt. Im Folgenden werden diesbezüglich ihre Ergebnisse und Schlussfolgerungen kurz zusammengefasst:

3.4.1 Effekte auf die Glykosylierung bei SLC10A7-Defizienz

- Ashikov et al.: MS-Analysen zeigten veränderte N-Glykanstrukturen der Plasmatotalproteine SLC10A7-defizienter Patienten. Es zeigten sich eine Erhöhung der mannosereichen Glykanstrukturen, eine Erhöhung an Glykanen, denen GlcNAc fehlt, und eine verminderte Sialylierung. Schlussfolgerung: *SLC10A7*-Mutation führt demnach zur CDG (Ashikov et al., 2018).
- Ashikov et al.: Durch metabolisch markierte Zellen ließen sich Unterschiede in der Verteilung sialylierter Glykoproteine von Patienten- zu Kontrollfibroblasten zeigen. Bei der Markierung handelt es sich um alkyl-markierte Sia (SiaNAI), die nach Einbau in neu synthetisierte Glykoproteine, mittels azid-funktionalisierter Fluorophore in der Confokalmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. In der Studie zeigte sich, dass der Hauptanteil markierter sialylierter Glykokonjugate beider Gruppen im Golgi-Apparat zu finden war. Weder Verteilung noch Intensität der Färbung unterschieden sich. Ausnahme waren vesikuläre Strukturen, die bei Patientenfibroblasten in der gesamten Zelle verteilt vorkamen und mit dem frühen Endosomenmarker EEA1 colokalisierten – im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Schlussfolgerung: Ein Teil der sialylierten Glykoproteine muss in vesikulären Strukturen SLC10A7-defizienter Patienten akkumulieren (Ashikov et al., 2018).
- Ashikov et al.: In Pulsmarkierungs-Experimenten, mit denen Biomoleküle markiert und über eine Zeitspanne hinweg untersucht werden, zeigten sich Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Verteilung von SiaNAI. Bei Kontrollfibroblasten zeigte sich zum Startpunkt null eine Färbung des Golgi-Apparates, die sich nach 48 h in plasmamembranäre Bereiche umverteilte. Im Gegensatz dazu zeigten markierte Patientenfibroblasten nach 48 h kein Signal in plasmamembranären Strukturen. Stattdessen ließen sich – ähnlich wie in den vorangegangenen Beschreibungen – nur Fluoreszenzsignale im Golgi-Apparat und in vesikulären Strukturen detektieren. Schlussfolgerung: Durch SLC10A7-Defizienz muss es zu einem gestörten Glykoproteinund GAG-Transport vom Golgi-Apparat zur PM kommen. Daraus resultierend ist die
Bildung der extrazellulären Matrix und dessen Mineralisation gestört (Ashikov et al., 2018).

Dubail et al.: Im elektrophoretischen Profil der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) migrierten die Glykoproteine Orosomucoid und Haptoglobin (aus getrockneten Blutproben) von SLC10A7-defizienten Patienten geringfügig schneller im Acrylamidgel als diejenigen der Kontrollgruppen. Schlussfolgerung: Das Fehlen von SLC10A7 führt zu abnormen, verkürzten Glykanstrukturen und beeinflusst so die N-Glykansynthese (Dubail et al., 2018).

3.4.2 Hypothesen zu den Ursachen der veränderten Glykosylierung

In der Publikation von Ashikov et al. konnte gezeigt werden, dass Patienten mit SLC10A7-Defizienz veränderte Zusammensetzungen ihrer Glykanstrukturen im Vergleich zu Kontrollgruppen und im Vergleich zu anderen untersuchten CDG-Patienten aufwiesen. Im Folgenden werden diesbezüglich mögliche Ursachen diskutiert:

3.4.2.1 Erhöhung der mannosereichen Strukturen

Prinzipiell können sich Intermediärprodukte der Glykanketten immer dann anreichern, wenn ein bestimmtes Enzym während der N-Glykosylierungskaskade seiner Funktion nicht nachkommen kann. Beispielsweise könnte die Anreicherung von mannosereichen Glykanen (z.B. Man₉GlcNAc₂) durch eine verminderte Aktivität der Mannosidase MAN1B1 ausgelöst werden, die normalerweise für die Abspaltung eines α 1-2-verknüpften Man-Rests sorgt, sodass Man₈GlcNAc₂ entsteht. So kommt es bei MAN1B1-CDG-Patienten zu erhöhten mannosereichen und Hybrid-Glykanstrukturen (Saldova et al., 2015; Ashikov et al., 2018). Dass diese Patienten trotzdem dazu in der Lage sind, komplexe und Hybrid-Glykanstrukturen zu bilden, kann durch die überschneidende und ergänzende Substrataktivität der Mannosidase-Enzymisoformen (MAN1A1, MAN1A2, MAN1C1) begründet sein, die Funktionen des MAN1B1-Enzyms übernehmen können (Moremen et al., 2014). Dieser Zusammenhang konnte auch in in vitro Knockout-Modellen in HEK293 Zellen von Jin et al. bestätigt werden, bei dem die Arbeitsgruppe erst durch einen tripple-Knockout der MAN1A1-, MAN1A2- und MAN1B1-Gene in den Zellen mannosereiche Glykane als Haupt-N-Glykanstruktur identifizieren konnten. Der doppel-Knockout von MAN1A1 und MAN1A2 in einem zweiten Zellkulturmodell resultierte zwar in einer Erhöhung der mannosereichen Strukturen, zeigte jedoch immer noch einen hohen Anteil komplexer Glykane. Der alleinige *Knockout* eines einzigen Mannosidase-Gens führte zu gar keiner Änderung der Glykanstrukturzusammensetzung (Jin et al., 2018).

Eine Hypothese ist, dass es bei SLC10A7-defizienten Patienten zu einer verminderten Aktivität einiger, aber nicht aller ER- oder Golgi-ständigen Mannosidasen kommt, die sich in einer Erhöhung der mannosereichen Strukturen (wie z.B. Man₃GlcNAc₂ oder Man₅GlcNAc₂) äußert. Interessanterweise zeigen MAN1B1-CDG erkrankte Patienten eine Überschneidung ihrer auftretenden Symptome zu SLC10A7-CDG erkrankten Patienten. So kommt es durch beide Genmutationen zu Gesichtsdysmorphismen und psychomotorischer Retardierung in betroffenen Patienten (Rymen et al., 2013). Zusätzlich zeigt sich bei MAN1B1-defizienten Patienten eine Stammesfettleibigkeit, die auch bei zwei der SLC10A7-defizienten Patienten beschrieben wird (Rymen et al., 2013; Dubail et al., 2018). Dass allerdings auch Symptome der SD oder Al vorliegen, wird nicht angegeben.

3.4.2.2 Erhöhung an Glykanen, denen GlcNAc fehlt

Die Anheftung von GlcNAc an die vorhandenen Kohlenhydratketten erfolgt durch die Enzyme MGAT1 bzw. MGAT2. Diese benötigen als Substrat Man₅GlcNAc₂ bzw. GlcNAcMan₃GlcNAc₂ (Stanley et al., 2015). Fehlen diese Substrate, können MGAT1 bzw. MGAT2 kein GlcNAc anknüpfen, sodass dies in einer Erhöhung derjenigen Glykane resultiert, die kein GlcNAc tragen. Dieses Szenario ließe sich – wie oben beschrieben – durch eine verminderte Aktivität der Mannosidasen erklären, die den MGAT-Enzymen im Glykosylierungsprozess vorangeschaltet sind. Eine Reduktion der GlcNAc tragenden Strukturen würde folglich sekundär aus der verminderten Aktivität v.a. der Mannosidasen MAN1B1, MAN1A1, MAN1A2 und MAN1C1 resultieren. Dass der beschriebene Effekt hingegen durch die verminderte Aktivität dieser Mannosidasen Voraussetzung für die Bildung aller komplexen, biantennären Glykanstrukturen ist, die jedoch auch in SLC10A7-CDG-Patienten zu finden sind.

Zusätzlich wäre denkbar, dass die Erhöhung der Glykanstrukturen, denen GlcNAc fehlt, aus der verminderten Aktivität der MGAT1 und MGAT2 Enzyme selbst resultiert. Der Ausfall des MGAT1-Enzyms würde jedoch den totalen Verlust von Hybrid- und komplexen Glykanen mit sich bringen. So führte der *Knockout* des *MGAT1*-Gens in einem Mausmodell zu schwerwiegenden Glykosylierungsdefekten und dem embryonalen Versterben der Mäuse (Campbell et al., 1995). Möglicherweise existiert deshalb bis dato kein Fallbericht zu MGAT1-defizienten humanen Patienten (Blackburn et al., 2018). Es ist deshalb für SLC10A7-CDG-

91

Patienten auszuschließen, dass die verminderte Aktivität des MGAT1-Enzyms selbst für die beschriebenen Glykosylierungsdefekte sorgt.

Die verminderte Aktivität des MGAT2-Emzyms würde zur Reduktion aller biantennären Glykane und zur Erhöhung der Hybrid-Glykane führen. Jedoch wird dies für SLC10A7-CDG-Patienten nicht beschrieben. Für MGAT2-CDG-Patienten existieren rund 15 Fallberichte, bei denen die Erkrankung zu neurologischen Störungen, psychomotorischer Behinderung, Hypotonie und früh einsetzender Epilepsie führt (Poskanzer et al., 2021). Biochemische Untersuchungen der Patienten zeigten einen deutlichen Anstieg von abnormal glykosyliertem Serumtransferrin, bei dem die typische Tetra-Sialotransferrinstruktur fehlte und stattdessen monosialyliertes Transferrin detektiert wurde (Poskanzer et al., 2021). Ein direkter Einfluss von SLC10A7 auf die Enzymaktivität der MGAT-Enzyme scheint, aufgrund der Unterschiede zwischen den beschriebenen biochemischen und phänotypischen Veränderungen durch MGAT-Defizienz, unwahrscheinlich.

3.4.2.3 Verminderte Sialylierung der Glykanstrukturen

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Veränderungen kommt es bei SLC10A7-defizienten Patienten zu einer verminderten Sialylierung der N-Glykane (Ashikov et al., 2018). Sia kann durch Sialinsäuretransferasen terminal auf komplexe oder Hybrid-N-Glykane sowie auf O-Glykane übertragen werden (Hombu et al., 2021). Zusätzlich ist eine Übertragung auf andere Sia-Reste möglich. Eine verminderte Aktivität der Sialinsäuretransferasen kann deshalb ein Grund für die Verringerung sialylierter Glykanstrukturen in Patienten sein. Die Ursache hierfür kann multifaktoriell bedingt sein, da ca. 20 verschiedene Sialyltransferasen dazu in der Lage sind, Sia zu übertragen. Bis dato existieren beispielsweise Fallberichte für Sialyltransferasen-CDG in Patienten, die Gendefekte im ST3GAL3- oder ST3GAL5-Gen zeigen. Bei Patienten mit ST3GAL3-CDG treten klinisch Epilepsie, Verzögerung der motorischen Entwicklung, schwere geistige Behinderung und Verhaltensstörungen auf (Khamirani et al., 2021). Bei ST3GAL5-CDG-Patienten äußert sich die Erkrankung in Wachstumsstörungen, schweren Hör-, Seh-, Bewegungs- und kognitiven Beeinträchtigungen sowie Funktionsstörungen der Atmungskette (Indellicato et al., 2019). Überschneidungen zum klinischen Bild in SLC10A7-CDG-Patienten sind hier nur teilweise zu beobachten. Dass Sia jedoch eine Rolle für SLC10A7-CDG spielen könnte, wird neben den MS-Ergebnissen auch durch die Versuche Ashikovs et al. bestätigt, in denen Sia-verknüpfte Strukturen zeitlich und räumlich in Patientenfibroblasten anderes verteilt vorlagen als in Kontrollfibroblasten (Ashikov et al., 2018). Zudem lässt der nur geringgradige Unterschied im Migrationsverhalten der durch Dubail et al. untersuchten Glykoproteine (Dubail et al., 2018) einen Einfluss von SLC10A7 auf die Sialylierung vermuten. Grund dafür ist, dass die molekulare Masse der Sia-Strukturen in Glykanketten den geringsten Anteil der Glykanmasse ausmacht, was gleichzeitig eine nur geringfügig veränderte Masse des Glykoproteins in der SDS-PAGE bedeutet.

Zudem sind für die Bereitstellung von CMP-Sia, das als Substrat der Sialyltransferasen gilt, verschiedene Enzyme beteiligt, die dafür sorgen, dass aus Fructose-6-Phosphat CMP-Neu5Ac synthetisiert wird (Bhide and Colley, 2017). U.a. katalysiert dabei das Enzym NANS (*Nacetylneuraminic acid synthase*) den Schritt, bei dem aus ManNAc-6-P Neu5Ac gebildet wird (**Abb. 6B**). Interessanterweise existieren Fallberichte über Patienten, bei denen es zur biallelischen Mutation des für NANS-codierenden Gens kam (den Hollander et al., 2021). NANS-CDG Patienten zeigten ähnlich zu SLC10A7-defizienten Patienten SD, Kleinwuchs, verkürzte Gliedmaßen, intellektuelle Entwicklungsstörungen, Gesichtsdysmorphismen und neurologische Beeinträchtigungen (den Hollander et al., 2021). Es ist folglich naheliegend, dass SLC10A7 im komplexen Vorgang der Sialylierung eine Rolle spielen könnte – womöglich auch durch die indirekte Beeinflussung des NANS-Proteins.

Zusammenfassend ist es nicht möglich, ein alleiniges Enzym zu benennen, das durch die Malfunktion von SLC10A7 für die beschriebenen Glykosylierungsdefekte verantwortlich sein könnte. Wahrscheinlicher ist es, dass SLC10A7 eine Reihe an verschiedenen Glykosylierungsenzymen reguliert, die bei Ausfall des SLC10A7-Proteins ihrer Funktion nicht nachkommen können.

3.5 VERKNÜPFUNG DES CALCIUMSTOFFWECHSELWEGS MIT DER N-GLYKOSYLIERUNG

3.5.1 Gemeinsame Phänotypen bei unterschiedlichem Genotyp

In online einsehbaren Datenbanken, wie der OMIM-Datenbank (*Online Mendelian Inheritance in Man*), existieren zu jeder beschriebenen genetischen Mutation des Menschen Einträge, die klinische Symptome, Erbgang und Molekulargenetik zusammenfassen³⁰. Für das *STIM*-Gen wird in der Datenbank angegeben, dass es bei Mutation zur Immundefizienz 10 kommen kann, bei der die Patienten T-Zell-Immundysfunktion, autoimmune hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, muskuläre Hypotonie und Zahnschmelzdefekte zeigen (Picard et al.,

³⁰ www.omim.org

2009). Eine STIM-Mutation kann sich auch zusätzlich in angeborenen Myopathien und dem Stormorken Syndrom (Thrombozytopathie, Muskelermüdung, Asplenie, Miosis, Migräne, Legasthenie und Ichthyose) äußern (Stormorken et al., 1985; Bohm et al., 2013). Für *ORAI* wird in den Datenbanken ein ähnliches klinisches Bild bei Mutation beschrieben: Die Patienten zeigen Immundefizienz 9, die durch fehlerhafte T-Zell-Aktivierung und damit einhergehend rezidivierenden Infektionen geprägt ist. Die Mutation kann außerdem zu angeborenen Myopathien mit Muskelschwäche, ektodermaler Dysplasie und weichem Zahnschmelz führen (Feske et al., 2006; Garibaldi et al., 2017). Ein Vergleich mit dem phänotypischen Bild bei *SLC10A7*-Genmutation zeigt, dass es sowohl bei *SLC10A7*-Gendefekt als auch bei *STIM*- und *ORAI*-Genmutation zu Störungen der Zahnschmelzbildung kommt, was den funktionellen Zusammenhang der drei Proteine STIM, ORAI und SLC10A7 nahelegt.



ABBILDUNG 16 | Zusammenhang verschiedener Genotypen und Phänotypen: Schematische Übersicht zu den drei durch SLC10A7-Defizienz ausgelösten Krankheitsbildern. Gene, die bei Mutation die gleiche Erkrankung auslösen, sind in überlappenden Bereichen der Kreise angegeben. Die meisten Genmutationen sind für das Krankheitsbild der skelettalen Dysplasie angegeben, gefolgt von den Genen, die bei Mutation zur CDG führen können und den Genen, die Al verursachen. Für *SLC10A7* und *TMEM165* gibt es die größte Schnittmenge. | Stichworte SD, CDG, Al³⁰.

Der Vergleich gleicher phänotypischer Ausbildungen, durch unterschiedliche die Genmutationen ausgelöst werden, zeigt, dass es möglich ist. Hinweise durch pathologisch veränderte Phänotypen auf die am gleichen Stoffwechselweg beteiligten Proteine 711 erhalten. Mithilfe der OMIM-Datenbank ist es möglich. gezielt nach Genen zu suchen, für die das gleiche klinische Bild beschrieben ist. Für SLC10A7 können SD. Al und CDG als verknüpfende Stichworte gefunden werden. Werden die Datenbanken auf Gene gescreent, die ebenfalls SD, AI

und CDG auslösen, tritt als einziger Vertreter aller Erkrankungen TMEM165 zusätzlich zu

SLC10A7 auf (**Abb. 16**). CDG und SD werden durch die Mutationen der Gene *NANS, ALG9, ATP6V0A2, PMM2, COG4 und ALG12* ausgelöst, AI und SD durch die Mutation von *LTBP3*. Gene, die bei Mutation zu AI und CDG, aber zu keiner SD führen, sind nicht beschrieben. Es erscheint folglich sinnvoll, einen Blick auf das Protein TMEM165 zu werfen und dessen Rolle in der Glykosylierung zu beleuchten.

3.5.2 Vergleich mit TMEM165

TMEM165 ist ein hochkonserviertes, 324 Aminosäuren langes Transmembranprotein des trans-Golgi-Apparates, dessen Funktion kontrovers diskutiert wird (Houdou et al., 2019). Eine TMEM165-Defizienz wird mit einer gestörten Mangan-Homöostase des Golgi-Apparats in Zusammenhang gebracht, die zu Glykosylierungsdefekten im Golgi-Apparat führt (Morelle et al., 2017). Für das Pflanzenortholog PAM71 und das S. cerevisiae Ortholog Gdt1p wird eine Antiporteraktivität für Calcium- und Manganionen beschrieben (Lebredonchel et al., 2019). Dass dies auch in menschlichen Zellen der Fall ist, wurde bisher nicht bewiesen. Im humanen Patienten führen TMEM165-Mutationen zur CDG, die sich in SD, Osteoporose und Kleinwuchs äußert (Foulquier et al., 2012; Zeevaert et al., 2013). Eine der fünf beschriebenen Patienten zeigte zudem klinische Symptome der Al. In der Analyse der Glykanstrukturen ergab sich für alle Patienten eine reduzierte Galactosylierung und eine reduzierte Sialylierung der Glykanketten (Foulquier et al., 2012; Schulte Althoff et al., 2016). Erklären lässt sich dieser Effekt durch die verminderte Bereitstellung von Mangan im Golgi-Apparat durch TMEM165-Defizienz und die damit verknüpfte, verminderte Aktivität spezifischer Transferasen, die Mangan als Cofaktor während des Prozesses der Glykosylierung benötigen. So nutzt beispielsweise die β -1,4-Galactosyltransferase (B4GALT1) Mangan als Cofaktor (Morelle et al., 2017). Das Enzym sorgt physiologischerweise für die Anknüpfung von Gal an GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-Strukturen und damit für die Bereitstellung des Zuckers Gal, der für Sia-Verknüpfungen in komplexen Glykanen notwendig ist. So lässt sich im pathologischen Fall die sekundär resultierende, verminderte Sialylierung der Patientenglykanketten erklären. Dass Mangan essentiell für den ungestörten Ablauf der Glykosylierung ist, zeigt zudem die Ausbildung einer CDG bei SLC39A8-Defizienz, einer Defizienz des Mangan-/Zink-Transporters, der normalerweise für eine ungestörte Manganhomöostase in der Zelle sorgt (Park et al., 2015; Riley et al., 2017; Houdou et al., 2019). Auch hier kommt es zur verminderten Galactosylierung der Patientenserumglykane sowie klinisch zu geistiger Behinderung und Kleinhirnatrophie (Park et al., 2018b; Ondruskova et al., 2021).

95

Interessanterweise ließ sich eine verminderte Galactosylierung durch die Supplementierung von Gal sowohl in HEK293-TMEM165-Knockout-Zellen als auch in TMEM165-defizienten Patienten ausgleichen (Morelle et al., 2017). In HEK293-TMEM165-Knockout-Zellen konnte ein Glykosylierungsdefekt am Migrationsverhalten des N-glykosylierten lysosomalen Proteins LAMP2 (Lysosomal Associated Membrane Protein 2) in der SDS-PAGE gezeigt werden. LAMP2 migrierte in den Knockout-Zellen deutlich schneller als in Kontrollzellen (80 kDa vs. 120 kDa). Durch die Supplementierung von Mangan in Knockout-Zellen als auch durch die Supplementierung von Gal ließ sich der beschriebene Glykosylierungsdefekt im LAMP2-Protein aufheben, was sich in der langsameren Migration des Proteins in der SDS-PAGE äußerte (Morelle et al., 2017). In TMEM165-CDG-Patienten führte die orale Gal-Supplementierung über einen Zeitraum von 18 Wochen zu einer Verbesserung des Allgemeinbefindens und zur verbesserten Galactosylierung der untersuchten N-Glykanstrukturen (Morelle et al., 2017). Eine denkbare Mangansupplementierung war in den Patienten, aufgrund physiologischer Blutmanganwerte und einer potenziell toxischen Wirkung bei Manganüberdosierung, nicht möglich (Morelle et al., 2017). Für SLC39A8-CDG-Patienten zeigte die orale Mangan- oder Gal-Supplementierung ähnliche positive Effekte auf das klinische Bild und die Glykosylierung der Patienten-Glykane im Vergleich zu TMEM165-CDG-Patienten (Park et al., 2018b; Ondruskova et al., 2021).

3.5.3 Bedeutung und Interpretation der Veränderungen für SLC10A7

Durch die Beispiele TMEM165 und SLC39A8 lässt sich folglich zeigen, dass nicht nur Glykosyltransferasen eine CDG-Erkrankung auslösen können, sondern die Erkrankung auch sekundär aus einer Mutation der für Membrantransporter kodierenden Gene resultieren kann (Ondruskova et al., 2021). Für SLC10A7-CDG ließen sich die beschriebenen Glykanketten-Veränderungen durch dieses Szenario erklären: Die bei SLC10A7-Defizienz verursachten Veränderungen der Glykosylierung könnten ihre Ursache in einer gestörten Calciumhomöostase haben. Sie könnte zur Malfunktion bestimmter Glykosylierungsenzyme führen, die Calcium als Cofaktor benötigen (**Tab. 11**). Beispielsweise gilt Calcium als essentieller Cofaktor für verschiedene Mannosidasen³¹. Eine SLC10A7-Defizienz führt zu einer Erhöhung – und keiner Absenkung – der zytoplasmatischen Calciumkonzentration, was sich durch die Vielzahl der existierenden calciumagierenden Moleküle auch auf die Calciumkonzentrationen der an der Glykosylierung beteiligten Organellen, wie dem ER oder

³¹ www.genecards.com

dem Golgi-Apparat, auswirken kann. Denkbar wäre folglich eine gestörte Calciumaufnahme in den Golgi-Apparat oder das ER, was zum Mangel des Cofaktors Calcium führen könnte und folgend zur verminderten Aktivität der gelisteten Mannosidasen. Zusätzlich könnte die gestörte Calciumhomöostase zu einem Ungleichgewicht anderer Ionenhaushalte wie der des Manganhaushalts führen, da Membrantransporter wie die SPCA Calcium und Mangan ins

| Gen | Proteinname | Lokalisation | Funktion | |
|--------|-------------------------------------|-------------------|--|--|
| UGGT1 | UDP-Glucose Glycoprotein | ER | Reglucosyliert selektiv | |
| | Glucosyltransferase 1 | | entfaltete Glykoproteine und | |
| und | und | | ermöglicht so die | |
| | UDP-Glucose Glycoprotein | | Qualitätskontrolle für den | |
| UGGT2 | Glucosyltransferase 2 | | Transport von Glykoproteinen | |
| | | | aus dem ER. | |
| MAN1A1 | Mannosidase Alpha Class 1A Member 1 | Golgi-Apparat | Katalysiert die Hydrolyse von | |
| | | | drei terminalen Man-Resten | |
| | | | aus peptidgebundenen | |
| | | | Man ₉ GlcNAc ₂ -Oligosacchariden. | |
| MAN1B1 | Mannosidase Alpha Class 1B Member 1 | ER/ Golgi-Apparat | Wandelt spezifisch Man ₉ GlcNAc | |
| | | | in Man ₈ GlcNAc-Isomere um. | |
| MAN1A2 | Mannosidase Alpha Class 1A Member 2 | Golgi-Apparat | Prozessiert zusammen mit | |
| | | | anderen Mannosidasen | |
| | | | Man ₉ GlcNAc ₂ zu Man₅GlcNAc ₂ . | |
| MAN1C1 | Mannosidase Alpha Class 1C Member 1 | Golgi-Apparat | Prozessiert zusammen mit | |
| | | | anderen Mannosidasen | |
| | | | Man ₉ GlcNAc ₂ zu Man ₅ GlcNAc ₂ . | |
| EDEM3 | ER Degradation Enhancing Alpha- | ER | Beschleunigt den Abbau von | |
| | Mannosidase Like Protein 3 | | fehlgefalteten Glykoproteinen | |
| | | | im ER. | |

TABELLE 11 | Enzyme, die Calcium als Cofaktor nutzen und während der Glykosylierung eine Rolle spielen^{32,33}.

Lumen des Golgi-Apparats transportieren (He and Hu, 2012). Auch können viele weitere calciumabhängige Prozesse der Glykosylierung, wie beispielsweise die Gentranskription

³² www.uniprot.org

³³ www.genecards.com

verschiedener Glykosylierungsenzyme oder der Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat, durch die *SLC10A7*-Defizienz gestört werden.

Für die oben diskutierten Sialyltransferasen und die MGAT1- und MGAT2-Enzyme wird keine Abhängigkeit von Calcium als Cofaktor beschrieben.

Ein anderes mögliches Szenario ist, dass nicht eine durch SLC10A7-Defizienz ausgelöste gestörte Calciumhomöostase Ursache für die Glykosylierungsdefekte ist, sondern, dass eine gestörte Glykosylierung aus der SLC10A7-Defizienz rührt und so sekundär zur veränderten Calciumhomöostase führt, da einige an der Calciumhomöostase beteiligte Proteine Glykosylierungsstellen besitzen. Für ORAI wurde beispielsweise beschrieben, dass es durch Mutation der Glykosylierungsstelle N223 zu N223A, zu einem erhöhten Calciumeinstrom via SOCE in Jurkat-T Zellen kam (Dörr et al., 2016). Die Arbeitsgruppe beschrieb zusätzlich, dass durch *Knockdown* des *ST6GAL1*-Gens in Jurkat-T Zellen die Verknüpfung von α2-6-Sia in der ORAI-Glykankette fehlte, wodurch es zu einem erhöhten Einstrom von Calcium in die Zellen kam (Dörr et al., 2016). Viele weitere Proteine, die mit der Calciumhomöostase in Verbindung gebracht werden, besitzen ebenfalls Glykosylierungsstellen. Jedoch ist die Anzahl dieser Proteine immens hoch, weshalb eine Auflistung an dieser Stelle nicht sinnvoll erscheint. Sie sind aber in Bezug auf SLC10A7 nicht zu vernachlässigen.

Die Calciumhomöostase und die Glykosylierung scheinen zwei eng miteinander verknüpfte Prozesse zu sein. Welcher Prozess in SLC10A7-CDG Patienten und auf zellulärer Ebene jedoch ursächlich für den anderen ist, konnte bis jetzt nicht geklärt werden.

3.6 ZUSÄTZLICHE EXPERIMENTE IN BEZUG AUF DIE N-GLYKOSYLIERUNG

Um mögliche Veränderungen der Glykosylierung im Hap1-KOP7 Zellmodell zu untersuchen, wurden weitere Experimente während dieser Doktorarbeit durchgeführt. Sie sollten erste Hinweise auf mögliche, durch SLC10A7-Defizienz beeinträchtigte Enzyme liefern und mögliche Unterschiede im Glykosylierungsverhalten der Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen detektieren – v.a. in Bezug auf die oben diskutierten Punkte.

3.6.1 RT-PCR

In einem ersten Experiment sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Expression verschiedener in der Glykosylierung beteiligten Enzyme zwischen Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen zu sehen sind. Dafür wurde exemplarisch die Expression der Gene MAN1B1, ST6GAL1 und TMEM165 in einer semiquantitativen RT-PCR untersucht. Sie sollte eine mögliche Überoder Unterexpression der Gene in SLC10A7-defizienten Zellen detektieren, die es der Zelle ermöglichen könnte, die verminderte Funktion eines Proteins zu kompensieren (Abb. 17). In drei unabhängigen Experimenten konnte jedoch kein Unterschied in der Expression der Gene detektiert werden. Dass die Expression des MAN1B1-Gens in Hap1-KOP7 Zellen verändert sein könnte, lag aufgrund der erhöhten mannosereichen Glykanstrukturen in SLC10A7-defizienten Patienten nahe. Ein anderer Grund, der für die Untersuchung des Enzyms sprach, war die Abhängigkeit des Enzyms von Calcium als Cofaktor. Neben MAN1B1 wäre ebenfalls eine verminderte Aktivität der Sialyltransferase ST6GAL1 und eine damit einhergehende Überexpression in Hap1-KOP7 Zellen denkbar gewesen, da eine verminderte Sialylierung von ORAI in den Experimenten von Dörr et al. zu einem erhöhten Calciumeinstrom in Jurkat-T Zellen führte (Dörr et al., 2016). Ergo einem vergleichbaren Effekt, wie er in Hap1-KOP7 Zellen zu beobachten war. Zusätzlich wurde die Expression des TMEM165-Proteins aufgrund der vielfachen, gemeinsamen klinischen Effekte bei Defizienz, untersucht. GAPDH wurde als Hauskeeping-Kontrollgen eingesetzt.

3.6.2 Quantitative PCR (qPCR)

In einem zweiten Experiment sollten die Ergebnisse aus der beschriebenen RT-PCR verifiziert werden (Daten nicht aufgeführt). Mithilfe der Echtzeit-PCR lassen sich quantitative Aussagen bezüglich des mRNA-Levels eines Gens treffen. Deshalb wurde die mRNA-Expression der Gene aus dem ersten Experiment zusätzlich in der qPCR untersucht. Das Probenmaterial stammte dabei aus Hap1-WT, Hap1-KOP7, HekP7-Tet. und HekP7+Tet. Zellen. Auch hier konnten für die



| Gen | | Primersequenz | PCR-Produktgröße (Bp) | |
|---------|-----|--------------------------------|-----------------------|--|
| MAN1B1 | for | CTGTGGATCCCCGCCCGGAA | 105 | |
| | rev | TCAGATGCACTGGTGTGCCCTGT | 105 | |
| TMEM165 | for | GCTTCTGCTCTTTCTGGTTCC | 398 | |
| | rev | AGCCAAACAAAACTGACAAGCA | | |
| ST6GAL1 | for | GCCATGATTCACACCAACCTGAAGAAAAAG | 1218 | |
| | rev | GCAGTGAATGGTCCGGAAGC | | |
| GAPDH | for | GACAGTCAGCCGCATCTTCT | 391 | |
| | rev | AAATGAGCCCCAGCCTTCTC | | |

ABBILDUNG 17 & TABELLE 12 | Semiquantitative PCR spezifisch ausgewählter Gene, die für Proteine kodieren, welche im Prozess der N-Glykosylierung beteiligt sind. Für die PCR wurde cDNA von MAN1B1, TMEM165 und ST6GAL1 aus Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen verwendet. GAPDH diente als Housekeeping-Kontrollgen. Aus Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen wurde RNA mithilfe des Quick-RNA MiniPrep Kit (ZYMO RESEARCH) isoliert, welche mithilfe des SuperScript III First-Strand Synthesis System Kits (Invitrogen) in cDNA übersetzt wurde. Für die folgende PCR wurden Primer (Tab. 12) designt, die Sequenzausschnitte der kodierenden Bereiche der Gene eingrenzen. Die PCR erfolgte mithilfe des Pegstar XS-Cycler (Peglab) und der DreamTag-DNA-Polymerase, inkl. DreamTag-Puffer (Thermo Fisher) im 20 µL Ansatz unter den folgenden Bedingungen: initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min, 35 anschließende Zyklen für TMEM165 und MAN1B1, 30 Zyklen für ST6GAL1 und 21 Zyklen für GAPDH mit 30 s à 95 °C für die anschließende Denaturierung, 30 s à 57,5 °C für die Primeranlagerung und 60 s à 72 °C für die Elongation. Die finale Verlängerung erfolgte bei 72 °C für 5 min. Je 5 µL des PCR-Produkts wurden mit 2 µL 6X-Loading Dye versetzt und auf ein mit Ethidiumbromid versetztes 1,5 % Agarosegel aufgetragen und bei 100 V für 45 min aufgetrennt. DNA Banden wurden mithilfe von UV-Licht im Imagemaster VDS (Pharmacia Biotech) sichtbar gemacht. Für keines der untersuchten Gene ist ein Unterschied in der Bandenintensität zu sehen. Das Bild zeigt exemplarisch die Ergebnisse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. | Bp = Basenpaare; for = Vorwärtsprimer; rev = Rückwärtsprimer; WT = Wildtyp.

proteinkodierenden Gene *MAN1B1* und *TMEM165* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen dargestellt werden. Mögliche Unterschiede in der Expression des *ST6GAL1*-Gens konnten in diesem Experiment nicht untersucht werden, da die im Versuchsaufbau eingesetzten Primer nicht dazu in der Lage waren, während der qPCR korrekt an die cDNA zu binden.

3.6.3 Western Blot

Da es auf DNA/RNA-Ebene nicht gelang, Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien dazustellen, sollte in Western Blot Experimenten ein Unterschied in der Protein-Glykosylierung zwischen Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen detektiert werden. Als Marker einer intakten Glykosylierung sollte in diesen Experimenten das lysosomale Protein LAMP2 dienen (Morelle et al., 2017). LAMP2 besitzt über zwanzig verschiedene Glykosylierungsstellen und eignet sich deshalb in Western Blot Experimenten besonders gut, um Glykosylierungsdefekte darzustellen³⁴. Eine schnellere Migration des Proteins in der SDS-PAGE bedeutet eine geringere Masse und damit eine verminderte Glykosylierung des Proteins. In Hap1-KOP7 Zellen ließ sich nur ein schmaler Schift (um wenige Kilodalton) der LAMP2-Proteinbanden im Vergleich zu Hap1-WT Zellen zeigen (Abb. 18A). Dieses Ergebnis spiegelt äquivalent die Daten aus den Versuchen durch Dubail et al. wider, die die Migration der aus Blutproben SLC10A7defizienter Patienten stammenden Proteine Orosomucoid und Haptoglobin untersuchten. Diese migrierten in der SDS-PAGE ebenfalls geringfügig schneller als vergleichbare Kontrollproben (Dubail et al., 2018). Da sich der Schift der Proteinbanden im LAMP2-Western Blot nur geringfügig abzeichnete, wäre eine veränderte Sialylierung in Hap1-KOP7 Zellen denkbar. Als Kontrollproben sollten Zelllysate Tunicamycin behandelter Zellen eingesetzt werden. Tunicamycin verhindert die initiale Übertragung des GlcNAc-Moleküls auf den Dol-P-P-Anker während der ersten Schritte der N-Glykosylierung, indem es das Enzym DPAGT1 hemmt. Folglich sollten die Proteine Tunicamycin behandelter Zellen deutlich schneller in der SDS-PAGE migrieren als unbehandelte Kontrollproben (ca. 70 kDa). Für den dargestellten Western Blot gelang es jedoch nicht, diesen Effekt in Hap1 Zellen (WT und KOP7) darzustellen. Zur Kontrolle wurde das Experiment mit anderen Zelllysaten (aus HepG2 Zellen) und anderen Primärantikörpern (Flag, gegen NTCP-Flag) wiederholt. Etablierte HepG2 Zellen, die durch Behandlung mit Doxycyclin NTCP-Flag stabil überexprimieren, wurden mit Tunicamycin behandelt. NTCP-Flag besitzt zwei potenzielle N-Glykosylierungsstellen (N5 und N11), weshalb die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin zur Reduktion der Bandengröße im Western Blot führte. Hier konnte der durch Tunicamycin erwartete Effekt abgebildet werden (Abb. 18B).

In einem zusätzlichen Western Blot Experiment sollte die Migration von ORAI, das aus HEK293 bzw. Hap1 Zelllysaten stammte, untersucht werden, da die Versuche durch Dörr et al. veränderte Glykosylierungen des Proteins als einen Grund für veränderten SOCE angeben

³⁴ https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LAMP2

(Dörr et al., 2016). Jedoch war es nicht möglich das Protein mithilfe der vorhandenen Primärantikörper – weder in Hap1/Hap1-KOP7 (Daten nicht aufgeführt) noch in HEK293 Zellen – zu detektieren, sodass keine weitere Aussage bezügliches des Einflusses von ORAI anhand potenziell veränderter Glykankettengrößen auf einen veränderten Calciuminflux in SLC10A7defizienten Zellen getroffen werden kann (**Abb. 18C**). Um auch mögliche Veränderungen der zwei existierenden Glykosylierungsstellen des STIM-Proteins (N131 und N171) im Hap1 und HEK293 Zellkulturmodell zu detektieren, wurde das Migrationsverhalten dieses Proteins im Western Blot untersucht (**Abb. 18D**). Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im Migrationsverhalten und damit auch kein Unterschied in der Proteinmasse des STIM1-Proteins aus verschiedenen Zelllysaten (Hap1-WT, Hap1-KOP7, HekP7-Tet., HekP7+Tet.). Folglich ist eine potenziell veränderte Glykosylierung für STIM1 in den unterschiedlich SLC10A7-exprimierenden Zellen auszuschließen. Das SERCA2b-Protein besitzt keine Glykosylierungsstellen und wurde deshalb nicht in diesem *Versuchssetup* charakterisiert.



ABBILDUNG 18 | Western Blot glykosylierter Proteine aus verschiedenen Zelllysaten. Hap1- (WT und KOP7), HepG2 oder HEK293 Zellen wurden in den angegebenen Lysispuffern auf Eis geerntet und lysiert. Die Proteinlysate wurden mit mithilfe des BCA-Protein-Assay-Kit (Merck) und des Nanodrop One (Thermo Scientific) quantifiziert und auf die angegebenen Mengen normiert. Die Proben wurden je mit Lämmli-Puffer versetzt, für 10 min bei 95 °C gekocht, auf Eis gestellt und auf Acrylamid-Trenngele aufgetragen (3 % Sammelgel) sowie anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteinproben wurden folgend bei 400 mA auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membran wurde im Anschluss für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBS-T inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Primärantikörperinkubation (Produktnummer in Klammern) erfolgte in Milchpulverlösung bei 4 °C über Nacht in den angegebenen Konzentrationen. Nach 16 h wurde die Membran mit TBS-T für 1 × 15 min und 3 × 5 min gewaschen. Die Inkubation mit den angegebenen Sekundärantikörpern (1:5000) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut gewaschen und die Chemilumineszenz der HRP-gekoppelten Sekundärantikörper mittels ROTI-Luminlösung (Roth) und dem ChemiDoc Imaging System (BioRad) detektiert. (A) Zwischen Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen lässt sich in drei unabhängigen Experimenten ein schmaler Schift von wenigen kDa der LAMP2-Proteinbanden detektieren (rot gestrichelte Linie). Die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin sollte als Positivkontrolle für unglykosyliertes LAMP2-Protein dienen. Jedoch konnte in wiederholten Versuchen keine Auswirkung von Tunicamycin auf die Proteinmasse dargestellt werden. (B) Kontrolle der Substanz Tunicamycin in einer anderen Zelllinie. Durch Doxycyclin-Behandlung wird in HepG2-modifizierten Zellen die NTCP-Flag Expression angeregt. Die Negativkontrolle beinhaltet Doxycyclin-unbehandelte HepG2-Zellen und zeigt demnach keine

Proteinbande mit dem Flag-Antikörper; im Gegensatz zu Doxycyclin behandelten Zellen (42 kDa Bande). Mit Doxycyclin und mit unterschiedlichen Tunicamycinkonzentrationen (3 und 5 µg/mL) behandelte Zellen zeigen eine schnellere Miration in der SDS-PAGE (Bande bei 37 kDa). **(C)** Western Blot mit Anti-ORAI1-Antikörper und Zelllysaten aus HEK293 Zellen. Mithilfe unterschiedlich eingesetzter Antikörperkonzentrationen war es nicht möglich, unterschiedliche Mengen des nativen ORAI1-Proteins im Western Blot zu detektieren. **(D)** Detektion des STIM1-Proteins im Western Blot aus HEK293 Zellen sind keine Unterschiedle in der Bandengröße von STIM1 zu erkennen und schließen deshalb eine unterschiedliche Glykosylierung des Proteins in den Zellen aus. GAPDH dient als *Housekeeping*-Kontrolle.



4 AUSBLICK

Für die weitere Charakterisierung und die Aufklärung der Funktion des SLC10A7-Proteins wären folgende Punkte wünschenswert:

- Die Entwicklung SLC10A7-spezifischer Antikörper, die sich sowohl im Western Blot als auch in der IF einsetzen lassen, wären für die Verifizierung der Effekte, die durch das getaggte Protein verursacht werden, unabdingbar, insbesondere da große Proteintags wie GFP oder mScarlet die Effekte des nativen Proteins verschleiern, überdecken oder verändern können. Es könnte somit Klarheit über die kontroversen Aussagen zur subzellulären Lokalisation und Gewebeexpression gewonnen werden.
- Als Grundlage für die 3D-SLC10A7-Proteinstruktur dient bisher die Proteinsequenz eines SLC10-verwandten Proteins aus dem Bakterium Y. frederiksenii, welches als ASBT_{Yf} bezeichnet wird. Aufgrund der recht geringen Sequenzidentität zwischen dem humanen SLC10A7 und ASBT_{Yf} ist dieses Modell aber nur eingeschränkt gültig. Jedoch würde die Strukturaufklärung des humanen SLC10A7-Proteins neue Möglichkeiten für Computersimulationen eröffnen, die mögliche Substrate des Proteins identifizieren könnten. 3D-Strukturen könnten zudem zur molekularen Funktionsaufklärung einzelner Domänen beitragen. Dies könnte auch neue Theorien zu möglichen Interaktionen zwischen SLC10A7, STIM, ORAI oder SERCA zulassen.
- Andere Nachweismethoden für Protein-Protein-Interkationen sollten durchgeführt werden, um die Hinweise aus den Colokalisationsstudien zu bestätigen. Mithilfe funktionierender SLC10A7-Antikörper, die das native Protein detektieren, wären Nachweise wie die Co-Immunopräzipitation möglich. Auch technisch aufwendigere Methoden wie FRET könnten dabei helfen, mögliche Interaktionen zu detektieren.
- Um die durchgeführten Experimente zu komplementieren, sollte weiterhin versucht werden, SERCA-GFP zu klonieren und im dargestellten Zellmodell zu exprimieren. Mögliche Hinweise auf Interaktionen von SLC10A7 zu SERCA könnten mithilfe dieses Modells gewonnen werden.
- Mithilfe einer Hap1 Zelle, die SLC10A7 stabil überexprimiert, könnten bessere Vergleiche zu Wildtyp- und Knockout-Zellen gezogen werden. Auch die Expression von SLC10A7-Mutanten, die in SLC10A7-Knockout-Zellen stabil exprimiert werden,

könnten verlässlichere Aussagen zur Auswirkung der Mutation ermöglichen, da in diesen Zellen keine native SLC10A7-Proteinexpression zu erwarten wäre.

- Die Aussagen zur Calciumkonzentrationsveränderung könnten mithilfe anderer, weniger störanfälligerer Methoden verifiziert und detaillierter dargestellt werden. Membranströme könnten z.B. über Vergleiche zwischen WT und modifizierter Zelle durch elektrophysiologische Methoden wie der Patch-Clamp-Technik gemessen werden. Einflüsse von SLC10A7 auf Ionenströme und spannungsabhängige Kanäle könnten damit untersucht werden.
- Auch ORAI-spezifischere Inhibitoren (z.B. Pyrazolderivat Pyr6) könnten in zusätzlichen Experimenten verwendet werden, um potenzielle Einflüsse der TRP-Kanäle in den durchgeführten Calciummessungen mit BTP-2 auszuschließen.
- Ergebnisse aus Fluo-4 Experimenten, die die transiente Expression der mScarlet-Konstrukte beinhalten, könnten durch ergänzende Negativkontrollen mit mScarlet-Leervektoren abgesichert werden, um potenzielle *Off-Target*-Effekte von SLC10A7 auszuschließen.
- In Bezug auf die Glykosylierung müssen Enzyme identifiziert werden, die durch SLC10A7 in ihrer Funktion beeinflusst werden. Expressionsanalysen der Sialyltransferasen – vergleichend zwischen Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen – scheinen am vielversprechendsten. Auch verschiedene Mannosidasen sollten in diesem Zusammenhang untersucht werden, ebenso wie das Enzym NANS.
- Zudem müssten die Glykosylierungsmuster in den Hap1-WT und Hap1-KOP7 Zellen massenspektrometrisch untersucht werden, um auch im Zellmodell, die im humanen Patienten beschriebenen Effekte darzustellen.
- Mithilfe dieser Daten könnte ein *Readout* geschaffen werden, mit dem es möglich wäre, Therapieversuche in Hap1-KOP7 Zellen zu starten. Dies könnte ähnlich ablaufen wie bei TMEM165-*Knockout*-Zellen, denen Galactose oder Mangan supplementiert wurde. Die Basis dieser grundlegenden Versuche führte letztendlich zur erfolgreichen Therapie betroffener TMEM165-CDG-Patienten und wäre für SLC10A7-CDG-Patienten ebenfalls wünschenswert.
- In Bezug auf die GAG-Synthese müssten Auswirkungen in Modellen untersucht werden, die die Analyse der extrazellulären Matrix ermöglichen würden.

- Es müsste die Frage geklärt werden, welcher zelluläre Prozess die Ursache der beschriebenen Effekte auf die gestörte Calciumhomöostase und die Glykosylierung ist. Mithilfe dieser Information könnten Versuche gezielter geplant und durchgeführt werden.
- Zudem wäre interessant, welche zusätzlichen Stoffwechselwege durch SLC10A7 angesprochen werden und wie sie im pathologischen Fall verändert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 DEUTSCH

SLC10A7 wird aufgrund seiner Sequenzhomologie der Familie der Gallensäuretransporter (SLC10) zugeordnet, obwohl es sich von diesen funktionell abgrenzt. Phylogenetisch kommt SLC10A7 in unterschiedlichsten Tierklassen hochkonserviert vor. Für den Menschen werden sieben verschiedene Transkriptvarianten beschrieben, von denen hauptsächlich die Transkriptvarianten 2 und 4 in einem breiten Gewebespektrum exprimiert werden. In funktionellen Fluo-4 Calciummessungen zeigte sich, dass die SLC10A7-Proteinexpression negativ mit dem Calciumeintritt über speichergesteuerte Calciumkanäle (SOCE) korreliert. SLC10A7-Knockout-Hap1 Zellen zeigten höhere zytoplasmatische Calciumkonzentrationen nach Behandlung mit SOCE-anregenden Substanzen wie Thapsigargin, Ionomycin und ATP + Carbachol; ein gegenteiliger Effekt war für SLC10A7-überexprimierende HEK293 Zellen zu detektieren. Die meisten der bisher bekannten Patientenmutationen des SLC10A7-Gens verloren den Effekt des Wildtypproteins auf den Calciumeinstrom, nachdem sie im Zellkulturmodell exprimiert wurden und werden deshalb als funktionell inaktiv angenommen. Für genetische SLC10A7-Varianten, die in Online-Datenbanken gelistet sind und die durch bioinformatische Algorithmen ebenfalls als funktionsbeeinträchtigend vorausgesagt werden, ließ sich dieser Effekt bei sechs von sieben Varianten nicht nachweisen, trotz einer dem Wildtypprotein ähnlichen Sortierung ins ER. Fluoreszenzbasierte Colokalisationsstudien zwischen SLC10A7 und an SOCE-beteiligten Proteinen ergaben die höchste Korrelation für STIM, einem ER-ständigen Calciumsensorprotein. Humanes SLC10A7 wird deshalb in dieser Doktorarbeit als Negativregulator des intrazellulären Calciumhaushalts beschrieben, der hauptsächlich über eine Regulation von STIM im ER agieren könnte. Wie genau dies passiert, muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden. Eine direkte Interaktion mit ORAI wurde ausgeschlossen. Aussagen bezüglich der Beziehung zu SERCA können nicht getroffen werden, da geeignete Konstrukte für die in vitro Untersuchung in der Zellkultur fehlen. Für die Rolle von SLC10A7 im Prozess der Glykosylierung konnten keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression der an der N-Glykosylierung beteiligten Proteine MAN1B1, ST6GAL1 und TMEM165 nachgewiesen werden. Das lysosomale Protein LAMP2 aus SLC10A7-Knockout-Zellen zeigte im Vergleich zu Wildtypzellen ein geringgradig verringertes Molekulargewicht im Western Blot, was aufgrund dieses schmalen Effekts auf einen veränderten, späteren Schritt in der Glykosylierungskaskade (wie der Sialylierung) hinweist. Was der Auslöser für diesen dargestellten Effekt ist, muss jedoch in weiteren Experimenten wie einer MS-Analyse der Glykanketten geklärt werden. Auch die veränderte Aktivität verschiedener Mannosidasen bei SLC10A7-Defizienz kann nicht ausgeschlossen werden.

5.2 ENGLISCH

SLC10A7 is assigned to the bile acid transporter family due to its sequence homology, although it is functionally distinct from the other carriers of this protein family. Phylogenetically, SLC10A7 is highly conserved in a wide variety of animal species. Seven different transcript variants are described for humans, of which mainly transcript variants 2 and 4 are expressed in a broad tissue spectrum. Functional Fluo-4 calcium measurements showed that the SLC10A7 protein expression correlated negatively with calcium entry via store-operated calcium channels (SOCE). SLC10A7 knockout Hap1 cells showed higher cytoplasmic calcium concentrations after treatment with SOCE-stimulating substances such as thapsigargin, ionomycin and ATP + carbachol; the opposite was detected for SLC10A7-overexpressing HEK293 cells. Most of the currently known patient mutations in the SLC10A7 gene were functionally defective when expressed in cell culture. For genetic SLC10A7 variants listed in online databases and predicted to be also functionally inactive by bioinformatic algorithms, this effect could not be approved in six out of seven variants, despite a wild-type like protein sorting into the ER. Fluorescence-based colocalization studies between SLC10A7 and proteins involved in SOCE revealed the highest correlation for STIM, an ER-site calcium sensor protein. Human SLC10A7 is therefore described in this thesis as a negative regulator of intracellular calcium signaling, acting mainly via regulation of STIM in the ER. However, the molecular mechanism behind this effect needs further investigation. A direct interaction between SLC10A7 and ORAI was excluded due to different sorting patterns. Statements regarding the relationship with SERCA cannot be made, as suitable constructs for *in vitro* investigation in cell culture are lacking. For the role of SLC10A7 in the process of glycosylation, no significant differences in the expression of the MAN1B1, ST6GAL1 and TMEM165 mRNA transcripts, all involved in N-glycosylation could be detected. The lysosomal protein LAMP2 showed a slightly reduced molecular mass in the western blot when isolated from SLC10A7 knockout cells compared to wild-type cells. This indicates that a later step in the glycosylation cascade (such as sialylation) might be affected. However, this effect has to be closer analysed in subsequent studies including MS analytics of the glycan spectrum. The altered activity of various mannosidases in the case of SLC10A7 deficiency cannot be ruled out either.

6 **REFERENZLISTE**

6.1 FACHZEITSCHRIFTEN UND FACHBÜCHER

- Aaron, J.S., Taylor, A.B., and Chew, T.L. (2018). Image co-localization co-occurrence versus correlation. J Cell Sci 131(3). doi: 10.1242/jcs.211847.
- Abd Alraheam, I., and Donovan, T. (2020). Management of amelogenesis imperfecta in an adult patient: a short review and clinical report. *Br Dent J* 229(4), 239-243. doi: 10.1038/s41415-020-1990-z.
- Adzhubei, I., Jordan, D.M., and Sunyaev, S.R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 7, Unit7 20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76.
- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* 1833(11), 2430-2437. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.001.
- Aguayo-Ortiz, R., and Espinoza-Fonseca, L.M. (2020). Linking Biochemical and Structural States of SERCA: Achievements, Challenges, and New Opportunities. *Int J Mol Sci* 21(11). doi: 10.3390/ijms21114146.
- Alber, J., Jiang, L., and Geyer, J. (2013). CaRch1p does not functionally interact with the high-affinity Ca(2+) influx system (HACS) of Candida albicans. Yeast 30(11), 449-457. doi: 10.1002/yea.2981.
- Algar, W.R., Hildebrandt, N., Vogel, S.S., and Medintz, I.L. (2019). FRET as a biomolecular research tool - understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nat Methods* 16(9), 815-829. doi: 10.1038/s41592-019-0530-8.
- Alzayady, K.J., Wang, L., Chandrasekhar, R., Wagner, L.E., Van Petegem, F., and Yule, D.I. (2016). Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca2+ release. *Sci Signal* 9(422), ra35. doi: 10.1126/scisignal.aad6281.
- Andersen, T.B., Lopez, C.Q., Manczak, T., Martinez, K., and Simonsen, H.T. (2015). Thapsigargin--from Thapsia L. to mipsagargin. *Molecules* 20(4), 6113-6127. doi: 10.3390/molecules20046113.
- Andersson, B.S., Beran, M., Pathak, S., Goodacre, A., Barlogie, B., and McCredie, K.B. (1987). Phpositive chronic myeloid leukemia with near-haploid conversion in vivo and establishment of a continuously growing cell line with similar cytogenetic pattern. *Cancer Genet Cytogenet* 24(2), 335-343. doi: 10.1016/0165-4608(87)90116-6.
- Anwer, M.S., and Stieger, B. (2014). Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch* 466(1), 77-89. doi: 10.1007/s00424-013-1367-0.
- Arnemann, J. (2019). Splice-Mutation, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, eds. A.M. Gressner & T. Arndt. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 2195-2195. doi: 10.1007/978-3-662-48986-4_3584
- Ashikov, A., Abu Bakar, N., Wen, X.Y., Niemeijer, M., Rodrigues Pinto Osorio, G., Brand-Arzamendi, K., et al. (2018). Integrating glycomics and genomics uncovers SLC10A7 as essential factor for bone mineralization by regulating post-Golgi protein transport and glycosylation. *Hum Mol Genet* 27(17), 3029-3045. doi: 10.1093/hmg/ddy213.
- Atchison, D.K., and Beierwaltes, W.H. (2013). The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin. *Pflugers Arch* 465(1), 59-69. doi: 10.1007/s00424-012-1107-x.
- Azimi, I., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2014). Calcium influx pathways in breast cancer: opportunities for pharmacological intervention. *Br J Pharmacol* 171(4), 945-960. doi: 10.1111/bph.12486.
- Balakrishnan, A., and Polli, J.E. (2006). Apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT, SLC10A2): a potential prodrug target. *Mol Pharm* 3(3), 223-230. doi: 10.1021/mp060022d.
- Beigl, T.B., Kjosas, I., Seljeseth, E., Glomnes, N., and Aksnes, H. (2020). Efficient and crucial quality control of HAP1 cell ploidy status. *Biol Open* 9(11). doi: 10.1242/bio.057174.

- Bennett, J.P., Cockcroft, S., and Gomperts, B.D. (1979). Ionomycin stimulates mast cell histamine secretion by forming a lipid-soluble calcium complex. *Nature* 282(5741), 851-853. doi: 10.1038/282851a0.
- Berridge, M.J. (2012). Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans* 40(2), 297-309. doi: 10.1042/BST20110766.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7), 517-529. doi: 10.1038/nrm1155.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 1(1), 11-21. doi: 10.1038/35036035.
- Bhardwaj, R., Hediger, M.A., and Demaurex, N. (2016). Redox modulation of STIM-ORAI signaling. Cell Calcium 60(2), 142-152. doi: 10.1016/j.ceca.2016.03.006.
- Bhide, G.P., and Colley, K.J. (2017). Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. *Histochem Cell Biol* 147(2), 149-174. doi: 10.1007/s00418-016-1520-x.
- Bijsmans, I.T., Bouwmeester, R.A., Geyer, J., Faber, K.N., and van de Graaf, S.F. (2012). Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na(+)-dependent taurocholate cotransporting protein. *Biochem J* 441(3), 1007-1015. doi: 10.1042/BJ20111234.
- Bill, B.R., Petzold, A.M., Clark, K.J., Schimmenti, L.A., and Ekker, S.C. (2009). A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6(1), 69-77. doi: 10.1089/zeb.2008.0555.
- Bindels, D.S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K.E., Mastop, M., et al. (2017). mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat Methods* 14(1), 53-56. doi: 10.1038/nmeth.4074.
- Blackburn, J.B., Kudlyk, T., Pokrovskaya, I., and Lupashin, V.V. (2018). More than just sugars: Conserved oligomeric Golgi complex deficiency causes glycosylation-independent cellular defects. *Traffic* 19(6), 463-480. doi: 10.1111/tra.12564.
- Bogeski, I., Al-Ansary, D., Qu, B., Niemeyer, B.A., Hoth, M., and Peinelt, C. (2010). Pharmacology of ORAI channels as a tool to understand their physiological functions. *Expert Rev Clin Pharmacol* 3(3), 291-303. doi: 10.1586/ecp.10.23.
- Bohm, J., Chevessier, F., Maues De Paula, A., Koch, C., Attarian, S., Feger, C., et al. (2013). Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy. *Am J Hum Genet* 92(2), 271-278. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.12.007.
- Bonafe, L., Cormier-Daire, V., Hall, C., Lachman, R., Mortier, G., Mundlos, S., et al. (2015). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet A* 167A(12), 2869-2892. doi: 10.1002/ajmg.a.37365.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J., and Roderick, H.L. (2002). Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol* 12(16), R563-565. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01055-2.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2012). Calcium pumps: why so many? *Compr Physiol* 2(2), 1045-1060. doi: 10.1002/cphy.c110034.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and signaling. Met lons Life Sci 12, 119-168. doi: 10.1007/978-94-007-5561-1_5.
- Brommage, R., Liu, J., Hansen, G.M., Kirkpatrick, L.L., Potter, D.G., Sands, A.T., et al. (2014). Highthroughput screening of mouse gene knockouts identifies established and novel skeletal phenotypes. *Bone Res* 2, 14034. doi: 10.1038/boneres.2014.34.
- Bruneel, A., Cholet, S., Tran, N.T., Mai, T.D., and Fenaille, F. (2020). CDG biochemical screening: Where do we stand? *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864(10), 129652. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129652.
- Bruneel, A., Habarou, F., Stojkovic, T., Plouviez, G., Bougas, L., Guillemet, F., et al. (2017). Twodimensional electrophoresis highlights haptoglobin beta chain as an additional biomarker of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta* 470, 70-74. doi: 10.1016/j.cca.2017.04.022.
- Busse, B., Galloway, J.L., Gray, R.S., Harris, M.P., and Kwon, R.Y. (2020). Zebrafish: An Emerging Model for Orthopedic Research. *J Orthop Res* 38(5), 925-936. doi: 10.1002/jor.24539.

- Campbell, R.M., Metzler, M., Granovsky, M., Dennis, J.W., and Marth, J.D. (1995). Complex asparagine-linked oligosaccharides in Mgat1-null embryos. *Glycobiology* 5(5), 535-543. doi: 10.1093/glycob/5.5.535.
- Carafoli, E., and Krebs, J. (2016). Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem* 291(40), 20849-20857. doi: 10.1074/jbc.R116.735894.
- Casetta, B., Malvagia, S., Funghini, S., Martinelli, D., Dionisi-Vici, C., Barone, R., et al. (2020). A new strategy implementing mass spectrometry in the diagnosis of congenital disorders of Nglycosylation (CDG). *Clin Chem Lab Med* 59(1), 165-171. doi: 10.1515/cclm-2020-0650.
- Caval, T., de Haan, N., Konstantinidi, A., and Vakhrushev, S.Y. (2021). Quantitative characterization of O-GalNAc glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 68, 135-141. doi: 10.1016/j.sbi.2020.12.010.
- Chang, I.J., He, M., and Lam, C.T. (2018). Congenital disorders of glycosylation. Ann Transl Med 6(24), 477. doi: 10.21037/atm.2018.10.45.
- Chemaly, E.R., Troncone, L., and Lebeche, D. (2018). SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium* 69, 46-61. doi: 10.1016/j.ceca.2017.07.001.
- Chen, J., De Raeymaecker, J., Hovgaard, J.B., Smaardijk, S., Vandecaetsbeek, I., Wuytack, F., et al. (2017). Structure/activity relationship of thapsigargin inhibition on the purified Golgi/secretory pathway Ca(2+)/Mn(2+)-transport ATPase (SPCA1a). J Biol Chem 292(17), 6938-6951. doi: 10.1074/jbc.M117.778431.
- Choi, S., Maleth, J., Jha, A., Lee, K.P., Kim, M.S., So, I., et al. (2014). The TRPCs–STIM1–Orai Interaction, in *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume II*, eds. B. Nilius & V. Flockerzi. (Cham: Springer International Publishing), 1035-1054. doi: 10.1007/978-3-319-05161-1 13.
- Christensen, S.B., Simonsen, H.T., Engedal, N., Nissen, P., Moller, J.V., Denmeade, S.R., et al. (2021). From Plant to Patient: Thapsigargin, a Tool for Understanding Natural Product Chemistry, Total Syntheses, Biosynthesis, Taxonomy, ATPases, Cell Death, and Drug Development. Prog Chem Org Nat Prod 115, 59-114. doi: 10.1007/978-3-030-64853-4 2.
- Claro da Silva, T., Polli, J.E., and Swaan, P.W. (2013). The solute carrier family 10 (SLC10): beyond bile acid transport. *Mol Aspects Med* 34(2-3), 252-269. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.004.
- Copoiu, L., and Malhotra, S. (2020). The current structural glycome landscape and emerging technologies. *Curr Opin Struct Biol* 62, 132-139. doi: 10.1016/j.sbi.2019.12.020.
- Czuba, L.C., Hillgren, K.M., and Swaan, P.W. (2018). Post-translational modifications of transporters. *Pharmacol Ther* 192, 88-99. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.013.
- Dagan, I., and Palty, R. (2021). Regulation of Store-Operated Ca(2+) Entry by SARAF. *Cells* 10(8). doi: 10.3390/cells10081887.
- De Angelis, I., Ricceri, L., and Vitale, A. (2019). The 3R principle: 60 years taken well. Preface. Ann Ist Super Sanita 55(4), 398-399. doi: 10.4415/ANN_19_04_15.
- Decrock, E., De Bock, M., Wang, N., Gadicherla, A.K., Bol, M., Delvaeye, T., et al. (2013). IP3, a small molecule with a powerful message. *Biochim Biophys Acta* 1833(7), 1772-1786. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.016.
- Decuypere, J.P., Kindt, D., Luyten, T., Welkenhuyzen, K., Missiaen, L., De Smedt, H., et al. (2013). mTOR-Controlled Autophagy Requires Intracellular Ca(2+) Signaling. *PLoS One* 8(4), e61020. doi: 10.1371/journal.pone.0061020.
- den Hollander, B., Rasing, A., Post, M.A., Klein, W.M., Oud, M.M., Brands, M.M., et al. (2021). NANS-CDG: Delineation of the Genetic, Biochemical, and Clinical Spectrum. *Front Neurol* 12, 668640. doi: 10.3389/fneur.2021.668640.
- Di Virgilio, F., Steinberg, T.H., and Silverstein, S.C. (1990). Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium* 11(2-3), 57-62. doi: 10.1016/0143-4160(90)90059-4.
- Dörr, K., Kilch, T., Kappel, S., Alansary, D., Schwar, G., Niemeyer, B.A., et al. (2016). Cell type-specific glycosylation of Orai1 modulates store-operated Ca2+ entry. *Sci Signal* 9(418), ra25. doi: 10.1126/scisignal.aaa9913.

- Dubail, J., Huber, C., Chantepie, S., Sonntag, S., Tuysuz, B., Mihci, E., et al. (2018). SLC10A7 mutations cause a skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta mediated by GAG biosynthesis defects. *Nat Commun* 9(1), 3087. doi: 10.1038/s41467-018-05191-8.
- Dulary, E., Potelle, S., Legrand, D., and Foulquier, F. (2017). TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG-II): Clues and evidences for roles of the protein in Golgi functions and ion homeostasis. *Tissue Cell* 49(2 Pt A), 150-156. doi: 10.1016/j.tice.2016.06.006.
- Dunn, K.W., Kamocka, M.M., and McDonald, J.H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. Am J Physiol Cell Physiol 300(4), C723-742. doi: 10.1152/ajpcell.00462.2010.
- Eichler, J. (2019). Protein glycosylation. Curr Biol 29(7), R229-R231. doi: 10.1016/j.cub.2019.01.003.
- Elbein, A.D. (1984). Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. CRC Crit Rev Biochem 16(1), 21-49. doi: 10.3109/10409238409102805.
- Endo, M., Tanaka, M., and Ogawa, Y. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228(5266), 34-36. doi: 10.1038/228034a0.
- Enomoto, M., Nishikawa, T., Back, S.I., Ishiyama, N., Zheng, L., Stathopulos, P.B., et al. (2020). Coordination of a Single Calcium Ion in the EF-hand Maintains the Off State of the Stromal Interaction Molecule Luminal Domain. J Mol Biol 432(2), 367-383. doi: 10.1016/j.jmb.2019.10.003.
- Espinoza-Fonseca, L.M. (2019). Probing the effects of nonannular lipid binding on the stability of the calcium pump SERCA. *Sci Rep* 9(1), 3349. doi: 10.1038/s41598-019-40004-y.
- Espinoza-Fonseca, L.M. (2021). Structural Basis for the Function of the C-Terminal Proton Release Pathway in the Calcium Pump. *Int J Mol Sci* 22(7). doi: 10.3390/ijms22073507.
- Feng, M., Grice, D.M., Faddy, H.M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., et al. (2010). Store-independent activation of Orai1 by SPCA2 in mammary tumors. *Cell* 143(1), 84-98. doi: 10.1016/j.cell.2010.08.040.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., et al. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441(7090), 179-185. doi: 10.1038/nature04702.
- Forrest, L.R. (2013). Structural biology. (Pseudo-)symmetrical transport. *Science* 339(6118), 399-401. doi: 10.1126/science.1228465.
- Foulquier, F., Amyere, M., Jaeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V., et al. (2012). TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet* 91(1), 15-26. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.05.002.
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195(1), 1-10. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00140-6.
- Fredriksson, R., Nordstrom, K.J., Stephansson, O., Hagglund, M.G., and Schioth, H.B. (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett* 582(27), 3811-3816. doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.016.
- Garibaldi, M., Fattori, F., Riva, B., Labasse, C., Brochier, G., Ottaviani, P., et al. (2017). A novel gain-offunction mutation in ORAI1 causes late-onset tubular aggregate myopathy and congenital miosis. *Clin Genet* 91(5), 780-786. doi: 10.1111/cge.12888.
- Gee, K.R., Brown, K.A., Chen, W.N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., and Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27(2), 97-106. doi: 10.1054/ceca.1999.0095.
- Geyer, J., Bakhaus, K., Bernhardt, R., Blaschka, C., Dezhkam, Y., Fietz, D., et al. (2017). The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 172, 207-221. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.07.002.
- Geyer, J., Döring, B., Meerkamp, K., Ugele, B., Bakhiya, N., Fernandes, C.F., et al. (2007). Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). J Biol Chem 282(27), 19728-19741. doi: 10.1074/jbc.M702663200.

- Geyer, J., Godoy, J.R., and Petzinger, E. (2004). Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 316(2), 300-306. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.048.
- Geyer, J., Wilke, T., and Petzinger, E. (2006). The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372(6), 413-431. doi: 10.1007/s00210-006-0043-8.
- Gifford, J.L., Walsh, M.P., and Vogel, H.J. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca2+-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 405(2), 199-221. doi: 10.1042/BJ20070255.
- Godoy, J.R., Fernandes, C., Döring, B., Beuerlein, K., Petzinger, E., and Geyer, J. (2007). Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur J Cell Biol* 86(8), 445-460. doi: 10.1016/j.ejcb.2007.06.001.
- Goreta, S.S., Dabelic, S., and Dumic, J. (2012). Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. *Biochem Med (Zagreb)* 22(2), 156-170. doi: 10.11613/bm.2012.019.
- Gorski, P.A., Ceholski, D.K., and Young, H.S. (2017). Structure-Function Relationship of the SERCA Pump and Its Regulation by Phospholamban and Sarcolipin. *Adv Exp Med Biol* 981, 77-119. doi: 10.1007/978-3-319-55858-5_5.
- Grabmayr, H., Romanin, C., and Fahrner, M. (2020). STIM Proteins: An Ever-Expanding Family. Int J Mol Sci 22(1). doi: 10.3390/ijms22010378.
- Grewal, R.K., Shaikh, A.R., Gorle, S., Kaur, M., Videira, P.A., Cavallo, L., et al. (2021). Structural Insights in Mammalian Sialyltransferases and Fucosyltransferases: We Have Come a Long Way, but It Is Still a Long Way Down. *Molecules* 26(17). doi: 10.3390/molecules26175203.
- Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na+/bile acid cotransporter. J Clin Invest 93(3), 1326-1331. doi: 10.1172/JCl117091.
- He, L., Vasiliou, K., and Nebert, D.W. (2009). Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics* 3(2), 195-206. doi: 10.1186/1479-7364-3-2-195.
- He, W., and Hu, Z. (2012). The role of the Golgi-resident SPCA Ca(2+)/Mn(2+) pump in ionic homeostasis and neural function. *Neurochem Res* 37(3), 455-468. doi: 10.1007/s11064-011-0644-6.
- Hediger, M.A., Clemencon, B., Burrier, R.E., and Bruford, E.A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med* 34(2-3), 95-107. doi: 10.1016/j.mam.2012.12.009.
- Hediger, M.A., Romero, M.F., Peng, J.B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E.A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins - Introduction. *Pflugers Arch* 447(5), 465-468. doi: 10.1007/s00424-003-1192-y.
- Hombu, R., Neelamegham, S., and Park, S. (2021). Cellular and Molecular Engineering of Glycan Sialylation in Heterologous Systems. *Molecules* 26(19). doi: 10.3390/molecules26195950.
- Houdou, M., Lebredonchel, E., Garat, A., Duvet, S., Legrand, D., Decool, V., et al. (2019). Involvement of thapsigargin- and cyclopiazonic acid-sensitive pumps in the rescue of TMEM165associated glycosylation defects by Mn(2+). FASEB J 33(2), 2669-2679. doi: 10.1096/fj.201800387R.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496(7446), 498-503. doi: 10.1038/nature12111.
- Hullen, A., Falkenstein, K., Weigel, C., Huidekoper, H., Naumann-Bartsch, N., Spenger, J., et al. (2021). Congenital disorders of glycosylation with defective fucosylation. J Inherit Metab Dis 44(6), 1441-1452. doi: 10.1002/jimd.12426.
- Hwang, J., and Qi, L. (2018). Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci* 43(8), 593-605. doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.005.

- Indellicato, R., Parini, R., Domenighini, R., Malagolini, N., Iascone, M., Gasperini, S., et al. (2019). Total loss of GM3 synthase activity by a normally processed enzyme in a novel variant and in all ST3GAL5 variants reported to cause a distinct congenital disorder of glycosylation. *Glycobiology* 29(3), 229-241. doi: 10.1093/glycob/cwy112.
- Jacobsen, L., Calvin, S., and Lobenhofer, E. (2009). Transcriptional effects of transfection: the potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells. *Biotechniques* 47(1), 617-624. doi: 10.2144/000113132.
- Jaskulska, A., Janecka, A.E., and Gach-Janczak, K. (2020). Thapsigargin-From Traditional Medicine to Anticancer Drug. *Int J Mol Sci* 22(1). doi: 10.3390/ijms22010004.
- Jiang, L., Alber, J., Wang, J., Du, W., Yang, X., Li, X., et al. (2012). The Candida albicans plasma membrane protein Rch1p, a member of the vertebrate SLC10 carrier family, is a novel regulator of cytosolic Ca2+ homoeostasis. *Biochem J* 444(3), 497-502. doi: 10.1042/BJ20112166.
- Jin, Z.C., Kitajima, T., Dong, W., Huang, Y.F., Ren, W.W., Guan, F., et al. (2018). Genetic disruption of multiple alpha1,2-mannosidases generates mammalian cells producing recombinant proteins with high-mannose-type N-glycans. J Biol Chem 293(15), 5572-5584. doi: 10.1074/jbc.M117.813030.
- Karakus, E., Wannowius, M., Müller, S.F., Leiting, S., Leidolf, R., Noppes, S., et al. (2020). The orphan solute carrier SLC10A7 is a novel negative regulator of intracellular calcium signaling. *Sci Rep* 10(1), 7248. doi: 10.1038/s41598-020-64006-3.
- Karousis, E.D., and Muhlemann, O. (2019). Nonsense-Mediated mRNA Decay Begins Where Translation Ends. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11(2). doi: 10.1101/cshperspect.a032862.
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., et al. (2013). Function of alternative splicing. *Gene* 514(1), 1-30. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.083.
- Khamirani, H.J., Zoghi, S., Faghihi, F., Dastgheib, S.A., Hassanipour, H., Bagher Tabei, S.M., et al. (2021). Phenotype of ST3GAL3 deficient patients: A case and review of the literature. *Eur J Med Genet* 64(8), 104250. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104250.
- Kim, T.K., and Eberwine, J.H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. Anal Bioanal Chem 397(8), 3173-3178. doi: 10.1007/s00216-010-3821-6.
- Kotecki, M., Reddy, P.S., and Cochran, B.H. (1999). Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp Cell Res* 252(2), 273-280. doi: 10.1006/excr.1999.4656.
- Krebs, J., Agellon, L.B., and Michalak, M. (2015). Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 460(1), 114-121. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.004.
- Kretsinger, R.H., and Nockolds, C.E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein: II. Structure determination and general description. J Biol Chem 248(9), 3313-3326.
- Krieg, J., Glasner, W., Vicentini, A., Doucey, M.A., Loffler, A., Hess, D., et al. (1997). C-Mannosylation of human RNase 2 is an intracellular process performed by a variety of cultured cells. *J Biol Chem* 272(42), 26687-26692. doi: 10.1074/jbc.272.42.26687.
- Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P.C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4(7), 1073-1081. doi: 10.1038/nprot.2009.86.
- Lagache, T., Sauvonnet, N., Danglot, L., and Olivo-Marin, J.C. (2015). Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging. *Cytometry A* 87(6), 568-579. doi: 10.1002/cyto.a.22629.
- Laugel-Haushalter, V., Bar, S., Schaefer, E., Stoetzel, C., Geoffroy, V., Alembik, Y., et al. (2019). A New SLC10A7 Homozygous Missense Mutation Responsible for a Milder Phenotype of Skeletal Dysplasia With Amelogenesis Imperfecta. *Front Genet* 10, 504. doi: 10.3389/fgene.2019.00504.
- Lebredonchel, E., Houdou, M., Potelle, S., de Bettignies, G., Schulz, C., Krzewinski Recchi, M.A., et al. (2019). Dissection of TMEM165 function in Golgi glycosylation and its Mn(2+) sensitivity. *Biochimie* 165, 123-130. doi: 10.1016/j.biochi.2019.07.016.

- Li, D., and Mukhopadhyay, S. (2021). A three-pocket model for substrate coordination and selectivity by the nucleotide sugar transporters SLC35A1 and SLC35A2. *J Biol Chem* 297(3), 101069. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101069.
- Li, X., Llorente, I., and Brasch, M. (2008). Improvements in live cell analysis of G protein coupled receptors using second generation BD calcium assay kits. *Curr Chem Genomics* 2, 10-15. doi: 10.2174/1875397300802010010.
- Liao, J., Patel, D., Zhao, Q., Peng, R., Guo, H., and Diwu, Z. (2021). A novel Ca(2+) indicator for longterm tracking of intracellular calcium flux. *Biotechniques* 70(5), 271-277. doi: 10.2144/btn-2020-0161.
- Lichtman, J.W., and Conchello, J.A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2(12), 910-919. doi: 10.1038/nmeth817.
- Lin, Y.C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., et al. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 5, 4767. doi: 10.1038/ncomms5767.
- Liu, X. (2019). SLC Family Transporters. *Adv Exp Med Biol* 1141, 101-202. doi: 10.1007/978-981-13-7647-4_3.
- Lopes, M.C., Joyce, C., Ritchie, G.R., John, S.L., Cunningham, F., Asimit, J., et al. (2012). A combined functional annotation score for non-synonymous variants. *Hum Hered* 73(1), 47-51. doi: 10.1159/000334984.
- Lu, H.C., Fornili, A., and Fraternali, F. (2013). Protein-protein interaction networks studies and importance of 3D structure knowledge. *Expert Rev Proteomics* 10(6), 511-520. doi: 10.1586/14789450.2013.856764.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., et al. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 47(W1), W636-W641. doi: 10.1093/nar/gkz268.
- Mager, W.H., and Winderickx, J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci* 26(5), 265-273. doi: 10.1016/j.tips.2005.03.004.
- Marquardt, T. (2007). Angeborene Glykosylierungsstörungen, in Pädiatrie: Grundlagen und Praxis, eds. M.J. Lentze, F.J. Schulte, J. Schaub & J. Spranger. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 319-322. doi:10.1007/978-3-642-54671-6_82-2
- Maynard, J.C., Burlingame, A.L., and Medzihradszky, K.F. (2016). Cysteine S-linked Nacetylglucosamine (S-GlcNAcylation), A New Post-translational Modification in Mammals. *Mol Cell Proteomics* 15(11), 3405-3411. doi: 10.1074/mcp.M116.061549.
- Morelle, W., Potelle, S., Witters, P., Wong, S., Climer, L., Lupashin, V., et al. (2017). Galactose Supplementation in Patients With TMEM165-CDG Rescues the Glycosylation Defects. J Clin Endocrinol Metab 102(4), 1375-1386. doi: 10.1210/jc.2016-3443.
- Moremen, K.W., and Nairn, A.V. (2014). Mannosidase, Alpha, Class 1 (MAN1A1 (Golgi Alpha-Mannosidase IA), Man1A2 (Golgi Alpha-Mannosidase IB), MAN1B1(ER Alpha-Mannosidase I), MAN1C1 (Golgi Alpha-Mannosidase IC)). In: Taniguchi N., Honke K., Fukuda M., Narimatsu H., Yamaguchi Y., Angata T. (eds) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. Springer, Tokyo. doi:10.1007/978-4-431-54240-7_84.
- Morgan, A.J., and Jacob, R. (1994). Ionomycin enhances Ca2+ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J* 300 (Pt 3), 665-672. doi: 10.1042/bj3000665.
- Ng, P.C., and Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31(13), 3812-3814. doi: 10.1093/nar/gkg509.
- Nguyen, N.T., Han, W., Cao, W.M., Wang, Y., Wen, S., Huang, Y., et al. (2018). Store-Operated Calcium Entry Mediated by ORAI and STIM. *Compr Physiol* 8(3), 981-1002. doi: 10.1002/cphy.c170031.
- Noppes, S., Müller, S.F., Bennien, J., Holtemeyer, M., Palatini, M., Leidolf, R., et al. (2019). Homo- and heterodimerization is a common feature of the solute carrier family SLC10 members. *Biol Chem* 400(10), 1371-1384. doi: 10.1515/hsz-2019-0148.

- Nusse, O., Serrander, L., Foyouzi-Youssefi, R., Monod, A., Lew, D.P., and Krause, K.H. (1997). Storeoperated Ca2+ influx and stimulation of exocytosis in HL-60 granulocytes. *J Biol Chem* 272(45), 28360-28367. doi: 10.1074/jbc.272.45.28360.
- Ondruskova, N., Cechova, A., Hansikova, H., Honzik, T., and Jaeken, J. (2021). Congenital disorders of glycosylation: Still "hot" in 2020. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865(1), 129751. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129751.
- Orioli, I.M., Castilla, E.E., and Barbosa-Neto, J.G. (1986). The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J Med Genet* 23(4), 328-332. doi: 10.1136/jmg.23.4.328.
- Ortiz, L., Pereira, A.M., Jahangiri, L., and Choi, M. (2019). Management of Amelogenesis Imperfecta in Adolescent Patients: Clinical Report. *J Prosthodont* 28(6), 607-612. doi: 10.1111/jopr.13069.
- Oswald, S., Groer, C., Drozdzik, M., and Siegmund, W. (2013). Mass spectrometry-based targeted proteomics as a tool to elucidate the expression and function of intestinal drug transporters. *AAPS J* 15(4), 1128-1140. doi: 10.1208/s12248-013-9521-3.
- Pakala, R.S., Brown, K.N., and Preuss, C.V. (2021). Cholinergic Medications, in *StatPearls*. (Treasure Island (FL)).
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., and Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* 149(2), 425-438. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.055.
- Pan, S., Wang, S., Utama, B., Huang, L., Blok, N., Estes, M.K., et al. (2011). Golgi localization of ERManl defines spatial separation of the mammalian glycoprotein quality control system. *Mol Biol Cell* 22(16), 2810-2822. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0118.
- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., Zheng, W., and Lechleiter, J.D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods* 46(3), 143-151. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.09.025.
- Parekh, A.B. (2017). Regulation of CRAC channels by Ca(2+)-dependent inactivation. *Cell Calcium* 63, 20-23. doi: 10.1016/j.ceca.2016.12.003.
- Park, E., Pan, Z., Zhang, Z., Lin, L., and Xing, Y. (2018a). The Expanding Landscape of Alternative Splicing Variation in Human Populations. Am J Hum Genet 102(1), 11-26. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.11.002.
- Park, J.H., Hogrebe, M., Fobker, M., Brackmann, R., Fiedler, B., Reunert, J., et al. (2018b). SLC39A8 deficiency: biochemical correction and major clinical improvement by manganese therapy. *Genet Med* 20(2), 259-268. doi: 10.1038/gim.2017.106.
- Park, J.H., Hogrebe, M., Gruneberg, M., DuChesne, I., von der Heiden, A.L., Reunert, J., et al. (2015). SLC39A8 Deficiency: A Disorder of Manganese Transport and Glycosylation. *American Journal* of Human Genetics 97(6), 894-903. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.003.
- Pauli, R.M. (2019). Achondroplasia: a comprehensive clinical review. Orphanet J Rare Dis 14(1), 1. doi: 10.1186/s13023-018-0972-6.
- Peanne, R., de Lonlay, P., Foulquier, F., Kornak, U., Lefeber, D.J., Morava, E., et al. (2018). Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur J Med Genet* 61(11), 643-663. doi: 10.1016/j.ejmg.2017.10.012.
- Peanne, R., Vanbeselaere, J., Vicogne, D., Mir, A.M., Biot, C., Matthijs, G., et al. (2013). Assessing ER and Golgi N-glycosylation process using metabolic labeling in mammalian cultured cells. *Methods Cell Biol* 118, 157-176. doi: 10.1016/B978-0-12-417164-0.00010-0.
- Perland, E., and Fredriksson, R. (2017). Classification Systems of Secondary Active Transporters. *Trends Pharmacol Sci* 38(3), 305-315. doi: 10.1016/j.tips.2016.11.008.
- Picard, C., McCarl, C.A., Papolos, A., Khalil, S., Luthy, K., Hivroz, C., et al. (2009). STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. N Engl J Med 360(19), 1971-1980. doi: 10.1056/NEJMoa0900082.
- Pizzagalli, M.D., Bensimon, A., and Superti-Furga, G. (2021). A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *FEBS J* 288(9), 2784-2835. doi: 10.1111/febs.15531.
- Poskanzer, S.A., Schultz, M.J., Turgeon, C.T., Vidal-Folch, N., Liedtke, K., Oglesbee, D., et al. (2021). Immune dysfunction in MGAT2-CDG: A clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet A* 185(1), 213-218. doi: 10.1002/ajmg.a.61914.

- Primeau, J.O., Armanious, G.P., Fisher, M.E., and Young, H.S. (2018). The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Subcell Biochem* 87, 229-258. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_8.
- Raabe, C.A., and Brosius, J. (2015). Does every transcript originate from a gene? Ann N Y Acad Sci 1341, 136-148. doi: 10.1111/nyas.12741.
- Ranza, E., Huber, C., Levin, N., Baujat, G., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., et al. (2017). Chondrodysplasia with multiple dislocations: comprehensive study of a series of 30 cases. *Clin Genet* 91(6), 868-880. doi: 10.1111/cge.12885.
- Rasmussen, S.A., Bieber, F.R., Benacerraf, B.R., Lachman, R.S., Rimoin, D.L., and Holmes, L.B. (1996). Epidemiology of osteochondrodysplasias: changing trends due to advances in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 61(1), 49-58. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19960102)61:1<49::AID-AJMG10>3.0.CO;2-W.
- Rathod, N., Bak, J.J., Primeau, J.O., Fisher, M.E., Espinoza-Fonseca, L.M., Lemieux, M.J., et al. (2021).
 Nothing Regular about the Regulins: Distinct Functional Properties of SERCA Transmembrane
 Peptide Regulatory Subunits. Int J Mol Sci 22(16). doi: 10.3390/ijms22168891.
- Riley, L.G., Cowley, M.J., Gayevskiy, V., Roscioli, T., Thorburn, D.R., Prelog, K., et al. (2017). A SLC39A8 variant causes manganese deficiency, and glycosylation and mitochondrial disorders. J Inherit Metab Dis 40(2), 261-269. doi: 10.1007/s10545-016-0010-6.
- Rymen, D., Peanne, R., Millon, M.B., Race, V., Sturiale, L., Garozzo, D., et al. (2013). MAN1B1 deficiency: an unexpected CDG-II. *PLoS Genet* 9(12), e1003989. doi: 10.1371/journal.pgen.1003989.
- Sabandal, M.M., and Schäfer, E. (2016). Amelogenesis imperfecta: review of diagnostic findings and treatment concepts. *Odontology* 104(3), 245-256. doi: 10.1007/s10266-016-0266-1.
- Saldova, R., Stockmann, H., O'Flaherty, R., Lefeber, D.J., Jaeken, J., and Rudd, P.M. (2015). N-Glycosylation of Serum IgG and Total Glycoproteins in MAN1B1 Deficiency. *J Proteome Res* 14(10), 4402-4412. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00709.
- Salter, M.W., and Hicks, J.L. (1995). ATP causes release of intracellular Ca2+ via the phospholipase C beta/IP3 pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *J Neurosci* 15(4), 2961-2971.
- Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., and Marks, A.R. (2017). Intracellular calcium release channels: an update. *J Physiol* 595(10), 3041-3051. doi: 10.1113/JP272781.
- Savic, N., and Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl Res* 168, 15-21. doi: 10.1016/j.trsl.2015.09.008.
- Schjoldager, K.T., Narimatsu, Y., Joshi, H.J., and Clausen, H. (2020). Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(12), 729-749. doi: 10.1038/s41580-020-00294-x.
- Schleifer, H., Doleschal, B., Lichtenegger, M., Oppenrieder, R., Derler, I., Frischauf, I., et al. (2012). Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca(2+) entry pathways. *Br J Pharmacol* 167(8), 1712-1722. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02126.x.
- Schulte Althoff, S., Grüneberg, M., Reunert, J., Park, J.H., Rust, S., Mühlhausen, C., et al. (2016). TMEM165 Deficiency: Postnatal Changes in Glycosylation. JIMD Rep 26, 21-29. doi: 10.1007/8904_2015_455.
- Schwede, T., Sali, A., Honig, B., Levitt, M., Berman, H.M., Jones, D., et al. (2009). Outcome of a workshop on applications of protein models in biomedical research. *Structure* 17(2), 151-159. doi: 10.1016/j.str.2008.12.014.
- Shi, Y. (2013). Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys* 42, 51-72. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130429.
- Srikanth, S., Ribalet, B., and Gwack, Y. (2013). Regulation of CRAC channels by protein interactions and post-translational modification. *Channels (Austin)* 7(5), 354-363. doi: 10.4161/chan.23801.
- Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., et al. (2005). Function of alternative splicing. *Gene* 344, 1-20. doi: 10.1016/j.gene.2004.10.022.

Stanley, P., Taniguchi, N., and Aebi, M. (2015). "N-Glycans," in *Essentials of Glycobiology*, eds. rd, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, R.L. Schnaar & P.H. Seeberger. (Cold Spring Harbor (NY)), 99-111.

Stepanenko, A.A., and Heng, H.H. (2017). Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutat Res Rev Mutat Res* 773, 91-103. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.05.002.

Stormorken, H., Sjaastad, O., Langslet, A., Sulg, I., Egge, K., and Diderichsen, J. (1985). A new syndrome: thrombocytopathia, muscle fatigue, asplenia, miosis, migraine, dyslexia and ichthyosis. *Clin Genet* 28(5), 367-374. doi: 10.1111/j.1399-0004.1985.tb02209.x.

Sukumaran, P., Nascimento Da Conceicao, V., Sun, Y., Ahamad, N., Saraiva, L.R., Selvaraj, S., et al. (2021). Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cells* 10(8). doi: 10.3390/cells10082125.

Sweeney, Z.K., Minatti, A., Button, D.C., and Patrick, S. (2009). Small-molecule inhibitors of storeoperated calcium entry. *ChemMedChem* 4(5), 706-718. doi: 10.1002/cmdc.200800452.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.

Van Petegem, F. (2012). Ryanodine receptors: structure and function. *J Biol Chem* 287(38), 31624-31632. doi: 10.1074/jbc.R112.349068.

Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., et al. (2009). Structural basis for the high Ca2+ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca2+ pump. Proc Natl Acad Sci U S A 106(44), 18533-18538. doi: 10.1073/pnas.0906797106.

Verheijen, J., Tahata, S., Kozicz, T., Witters, P., and Morava, E. (2020). Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update. *Genet Med* 22(2), 268-279. doi: 10.1038/s41436-019-0647-2.

Wada, Y. (2020). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry to Detect Diagnostic Glycopeptide Markers of Congenital Disorders of Glycosylation. *Mass Spectrom* (*Tokyo*) 9(1), A0084. doi: 10.5702/massspectrometry.A0084.

Wang, F., Feng, X.C., Li, Y.M., Yang, H., and Ma, T.H. (2006). Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin* 27(4), 395-401. doi: 10.1111/j.1745-7254.2006.00318.x.

Welti, M. (2013). Regulation of dolichol-linked glycosylation. Glycoconj J 30(1), 51-56. doi: 10.1007/s10719-012-9417-y.

Yang, N.J., and Hinner, M.J. (2015). Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol Biol* 1266, 29-53. doi: 10.1007/978-1-4939-2272-7_3.

Zeevaert, R., de Zegher, F., Sturiale, L., Garozzo, D., Smet, M., Moens, M., et al. (2013). Bone Dysplasia as a Key Feature in Three Patients with a Novel Congenital Disorder of Glycosylation (CDG) Type II Due to a Deep Intronic Splice Mutation in TMEM165. *JIMD Rep* 8, 145-152. doi: 10.1007/8904_2012_172.

Zhang, Y., Inoue, M., Tsutsumi, A., Watanabe, S., Nishizawa, T., Nagata, K., et al. (2020). Cryo-EM structures of SERCA2b reveal the mechanism of regulation by the luminal extension tail. *Sci Adv* 6(33), eabb0147. doi: 10.1126/sciadv.abb0147.

Zhao, Y., Yan, H., Happeck, R., Peiter-Volk, T., Xu, H., Zhang, Y., et al. (2016). The plasma membrane protein Rch1 is a negative regulator of cytosolic calcium homeostasis and positively regulated by the calcium/calcineurin signaling pathway in budding yeast. *Eur J Cell Biol* 95(3-5), 164-174. doi: 10.1016/j.ejcb.2016.01.001.

Zhou, X., Levin, E.J., Pan, Y., McCoy, J.G., Sharma, R., Kloss, B., et al. (2014). Structural basis of the alternating-access mechanism in a bile acid transporter. *Nature* 505(7484), 569-573. doi: 10.1038/nature12811.

Zou, X., Wang, D., Qiu, G., Ji, C., Jin, F., Wu, M., et al. (2005). Molecular cloning and characterization of a novel human C4orf13 gene, tentatively a member of the sodium bile acid cotransporter family. *Biochem Genet* 43(3-4), 165-173. doi: 10.1007/s10528-005-1509-y.

6.2 WEBSEITEN

| Fußnoten- | Internetadresse | Zeitraum der Abfrage |
|-----------|---|-------------------------|
| * | www.biorender.com | 11/2021- |
| + | https://app.biorender.com/biorender-templates/t- 5faadf428a991000a8ce0732-timeline-7-segments-horizontal-2 | 11/2021 |
| ŧ | https://app.biorender.com/biorender-templates/t- 6196bfa863e22700a765f6cc-mrna-splicing-types | 12/2021 |
| ş | https://app.biorender.com/biorender- templates/figures/5c8c7ba9d4f2ef3300632942/t- 5fac3e4834fa7b00a383dcd7-activation-of-protein-kinase-c-pkc | 12/2021 |
| ** | https://app.biorender.com/biorender- templates/figures/5c65c5eebce1963300935370/t- 6174300ecfd32300ad13cedc-circulatory-system-with-callouts-layout | 12/2021 |
| 6 | www.ncbi.nlm.nih.gov | 09/2021 |
| 7 | www.ensembl.org | 09/2021 |
| 8 | www.proteinatlas.org | 09/2021 |
| 9 | www.genecards.org | 09/2021 |
| 10 | www.genecards.org/cgi- bin/carddisp.pl?gene=SLC10A7&keywords=slc10a7 | 09/2021 |
| 11 | www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK50679/#!po=20.4545 | 09/2021 |
| 12 | www.genecards.org/cgi- bin/carddisp.pl?gene=SLC10A7&keywords=slc10a7 | 09/2021 |
| 13 | www.swissmodel.expasy.org/templates/4n7w.1 | 09/2021 |
| 14 | www.genecards.com | 09/2021 |
| 15 | http:/geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2015/11768/ | 10/2021 |
| 16 | http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2020/15338/ | 10/2021 |
| 17 | http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2018/13719/ | 10/2021 |
| 18 | www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/proteins- expression-isolation-and-analysis/protein-expression- protocol/inducible-protein-expression-using-the-trex-system.html | 10/2021 |
| 19 | www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/troubleshooting- western-blots-with-western-blot-doctor?ID=MIW4HR15 | 10/2021 |
| 20 | www.eurogentec.com/en/custom-antibodies | 10/2021 |
| 21 | www.eurogentec.com/en/pre-immune-selection | 10/2021 |
| 22 | www.fpbase.org | 11/2021 |
| 23 | www.thermofisher.com/order/catalog/product/F14201 | 11/2021 |
| 24 | https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25058176 | 11/2021 |
| 25 | www.thermofisher.com/order/catalog/product/124222 | 11/2021 |
| 26 | https://gnomad.broadinstitute.org/about | 12/2021 |
| 27 | https:/sift.bii.a-star.edu.sg/ | 12/2021 |
| 28 | http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2018/13719/ | 12/2021 |
| 29 | http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/start | 12/2021 |
| 30 | www.omim.org | 04/2020 |
| 31 | www.genecards.org | 12/2021 |
| 32 | www.uniprot.org | 12/2021 |
| 33 | www.genecards.org | 12/2021 |
| 34 | https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LAMP2 | 12/2021 |

7 DANKSAGUNG

"Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen." Mit dieser einleitenden Weisheit Ciceros möchte ich meine Schuld erleichtern und mich bei all denjenigen bedanken, die mir die letzten drei Jahre am Institut möglich gemacht haben - die zusammen mit mir Freude und Frustration, Rat, Tat, Zeit und Schokolade geteilt haben. Auch wenn ein paar Zeilen meinem tatsächlichen Dank in keinster Weise gerecht werden können.

Mein herzlichster und besonderer Dank gilt meiner Familie. Meiner Mutter Bettina, die mich seit ich denken kann in allem und jedem liebevoll und weise unterstützt und die in jeder Lebenslage die richtigen Worte findet. Danke Mutschki. Dieser Dank gilt in gleicher Weise meinem Vater Klaus, der meinen Lebensabschnitt der Promotion nicht mehr miterleben durfte, aber dessen wissenschaftliche Neugier weiter in mir lebt und bei jedem Experiment neu in mir aufblüht. Dem Lebensgefährten meiner Mutter, Peter, der immer mit Rat und Tat (mindestens drei Tassen Kaffee) unsrer ganzen Familie und mir zu Seite steht. Meinen mehr oder weniger großen (Zwillings-) Brüdern Max, Paul und Simon, auf die ich mich immer verlassen kann und die mich immer wieder aufs Neue zum Lachen bringen und für die richtige Ablenkung immer allzeit bereit sind. Meinen Großmüttern Maria und Sieglinde, die mich ebenfalls bei allem unterstützen.

Ein nicht minderer Dank gilt meinem wunderbaren Freund Gilbert, der mir mit einem immer offenen Ohr in jeglicher Gefühlslage solidarisch beiseite steht. Der mich unterstützt, motiviert und - falls das nichts hilft - mit Schokolade, Kaffee und einer Umarmung einsatzbereit in der Küche steht.

Ein großer Dank gilt all meinen Freunden. Insbesondere Isabelle, Emmelie, Elena, Blanche, Judith und Chris, ohne die ich wohl weder Studium noch Promotion durchgehalten hätte und mit denen ich so viele schöne Stunden fern ab vom Institut erleben durfte.

Ein riesiges Dankeschön geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Joachim Geyer, mit dem eine Promotion überhaupt erst möglich wurde. Bei dem die Tür - im wahrsten Sinne des Wortes immer offen stand und bei dem ich immer unterstützende Worte und anregende Ideen fand. Mit dem Probleme schnell gelöst werden konnten und bei dem man sich immer gut aufgehoben fühlte. Vielen Dank, Achim! Im gleichen Atemzug muss ich Emre, meinen Betreuer, Bürokollegen und Türkischlehrer erwähnen, der mich in einer fantastischen Art und Weise von Anfang an unterstützt hat und ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Bei jeglichen Versuchsplanungen, Auswertungen, Diskussionen (über die Arbeit und das Leben) und Perfektionierungen von "letzten Versionen" konnte ich auf deine Hilfe zählen. Vielen, vielen Dank Emre!

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Melanie Hamann, die ein großes Vorbild ist und mich schon während der Studienzeit insgeheim für die Pharmakologie und Toxikologie begeistert hat. Die so fantastische Geschichten beim Mittagessen erzählt und so super gut erklären kann. Danke Melanie!

Ein sehr sehr (ich kann gar nicht aufhören) großes Danke geht an unsre lieben TAS Silke, Regina, Bärbel und Anita, ohne die – und das würde jeder so unterschreiben – nichts laufen würde. Ihr seid die feste Instanz, auf die man zählen kann. Egal ob bei Versuchsplanungen oder -durchführungen, Auswertungen, Beschaffungen, Etablierungen neuer Methoden oder unterstützenden Worten. Ihr seid bei allem eine bombastische Hilfe. In den Situationen, in denen ich fast am Verzweifeln war (man denke an den in Flammen stehenden Absauger, diverse Western Blots oder die Transfektion der KOP7 Zellen), wusstet ihr immer die richtige Antwort und eine Lösung für diese Probleme. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Silke von Herzen danken, die so häufig unsre Rettung im "Team P7" war und die ich so häufig mit Fragen durchlöchern durfte, ohne dass sie die Geduld verlor. Also: Danke euch allen!!

Ein herzliches Dankeschön geht an unsre beiden Sekretärinnen Edda und Ingrid, die ausnahmslos alles immer super schnell und noch dazu super gut organisiert haben! Ohne euch würde ich wohl immer noch beim Ausfüllen der ersten Reiseanzeigen, Vertragswechsel, Urlaubsanträge oder bei der Beschaffung von BioRender feststecken. Danke ihr beiden!

Danke auch an meine tollen Kollegen Daniela, Dariusz, Janina, Kira, Lisa, Maria, Massimo, Michi, Mies, Orhan, Sebastian, Simon und Chris. Ohne euch wären die Mittagspausen nicht halb so witzig, die Versuche nicht halb so schnell durchgeführt, die Zeit nicht so schnell vergangen, die Doktorhüte nicht so fantastisch gebastelt und die Nudeln nicht so lecker gewesen! Mit so vielen tollen Leuten zusammen arbeiten zu dürfen ist nicht selbstverständlich und macht die Arbeit jeden Tag aufs Neue wieder schön! Vielen Dank euch allen für die super Zeit!

122

Last but not least möchte ich mich bei Marion, Birgit, Jörg und Herrn Zimmermann bedanken, die die Arbeit so viel schneller und besser von Hand gehen lassen und ohne die wohl auch nichts laufen würde. Sei es das Überwinden der IT-Krise, die Entsorgung chemischer Abfälle, die Besorgung des flüssigen Stickstoffs oder das Stecken der Hundertmillionen Pipettenspitzen, die ich wohl verbraucht habe. Vielen, vielen Dank an euch!

8 ANHANG

Es folgen Publikation #1 und Publikation #2 sowie deren Ergänzungsmaterial (Supplementary material) als Anhang.

SCIENTIFIC REPORTS

natureresearch

Check for updates

OPEN The orphan solute carrier SLC10A7 is a novel negative regulator of intracellular calcium signaling

> Emre Karakus 1, Marie Wannowius¹, Simon Franz Müller¹, Silke Leiting¹, Regina Leidolf¹, Saskia Noppes¹, Stefan Oswald², Martin Diener³ & Joachim Geyer D^{1⊠}

SLC10A7 represents an orphan member of the Solute Carrier Family SLC10. Recently, mutations in the human SLC10A7 gene were associated with skeletal dysplasia, amelogenesis imperfecta, and decreased bone mineral density. However, the exact molecular function of SLC10A7 and the mechanisms underlying these pathologies are still unknown. For this reason, the role of SLC10A7 on intracellular calcium signaling was investigated. SLC10A7 protein expression was negatively correlated with store-operated calcium entry (SOCE) via the plasma membrane. Whereas SLC10A7 knockout HAP1 cells showed significantly increased calcium influx after thapsigargin, ionomycin and ATP/carbachol treatment, SLC10A7 overexpression reduced this calcium influx. Intracellular Ca²⁺ levels were higher in the SLC10A7 knockout cells and lower in the SLC10A7-overexpressing cells. The SLC10A7 protein colocalized with STIM1, Orai1, and SERCA2. Most of the previously described human SLC10A7 mutations had no effect on the calcium influx and thus were confirmed to be functionally inactive. In the present study, SLC10A7 was established as a novel negative regulator of intracellular calcium signaling that most likely acts via STIM1, Orai1 and/or SERCA2 inhibition. Based on this, SLC10A7 is suggested to be named as negative regulator of intracellular calcium signaling (in short: RCAS).

Ca2+ is one of the most versatile second messengers in eukaryotic cells. It is involved in many cellular processes such as muscle contraction, vesicle exocytosis, cell proliferation and growth, and gene expression¹. Whereas calcium influx into excitable cells is mainly mediated by voltage-gated calcium channels, the major entry pathway of calcium into non-excitable cells involves calcium release-activated calcium channels in the plasma membrane that allow store-operated calcium entry (SOCE)2,3.

Orail and the canonical transient receptor potential protein (TRPC) are two well-recognized store-operated Ca²⁺ channels⁴. While SOCE through Orail is dependent on activation and translocation of the stromal interaction molecule¹ (STIM1), SOCE through TRPC can function in a STIM1-dependent or -independent manner⁴. These store-operated calcium channels are opened in response to calcium depletion of the endoplasmic reticulum (ER). Release of Ca²⁺ from the intracellular stores leads to activation of the ER Ca²⁺ sensor STIM1, which then interacts with Orail subunits to form a STIM-Orai complex that supports SOCE at a typically high selectivity for Ca^{2+5-7} . A local increase in Ca^{2+} levels or gradual refilling of the calcium stores then inactivates the channels by negative feedback regulation^{8,9}.

The sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) transports Ca²⁺ from the cytosol into the SR/ER lumen to maintain the cytosolic Ca²⁺ at its low resting level¹⁰. The activity of SERCA is regulated according to the cellular requirements and extracellular signals of two different small proteins, phospholamban and sarcolipin. Both regulator proteins are only expressed in muscle cells, and decrease the calcium affinity of SERCA^{11,12}. STIM/Orai activation, inactivation, and interaction are also regulated by several cellular factors. These include the CRAC channel regulator 2A (CRACR2A) that stabilises the STIM-Orai complex^{13,14}, and the SOCE-associated regulatory factor (SARAF) that slowly inactivates STIM-dependent SOCE to prevent Ca²⁺ overfilling of the cell¹⁵.

In the present study, we identified an additional and novel negative regulator of intracellular calcium signaling, the orphan solute carrier SLC10A7, that most likely acts via STIM1, Orai1 and/or SERCA2 inhibition. Very recently, several mutations within the human SLC10A7 gene were identified in patients with skeletal dysplasia,

¹Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, 35392, Giessen, Germany. ²Institute of Pharmacology, University of Greifswald, 17487, Greifswald, Germany. ³Institute of Veterinary Physiology and Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, 35392, Giessen, Germany. [™]e-mail: Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de


Figure 1. SLC10A7 mRNA and protein expression in the HAP1 and HEK293 cell lines. (**a**) Genomic DNA of HAP1 and HAP1-KOP7 cells was used for PCR amplification of the region flanking the site of CRISPR/Cas mutation in the *SLC10A7* coding exon 2 by using the oligonucleotide primers F and R. (**b**) PCR products of 321 bp (HAP1) and 298 bp (HAP1-KOP7) were subjected to DNA sequencing. The chromatograms clearly confirmed the CRISPR/Cas mutation of 23 bp within the reading frame of SLC10A7 in exon 2. (c) SLC10A7 mRNA expression was quantified by real-time PCR in the HAP1 and HEK293 cell lines using an SLC10A7-specific TaqMan probe targeting exon boundary 1–2. SLC10A7 expression was significantly lower in the HAP1-KOP7 cells compared to the HAP1 cells, but was significantly increased in the HEKP7 cells by tetracycline treatment (+tet). Data represent means \pm RQmin/RQmax of n = 3 values (p < 0.05, Student's t-test). (**d-e**) Protein abundance of the SLC10A7 (**d**) and ABCB1, ABCC1/2 (**e**) proteins was analyzed by mass spectrometry-based targeted proteomics.

amelogenesis imperfecta and decreased bone mineral density^{16–18}. These included the splice-site mutations c.774–1G > A (leading to skipping of exons 9 + 10 or only of exon 10), as well as c.773+1G > A and c.722-16A > G (both leading to skipping of exons 9, as well as the missense mutations c.388G > A (G130R), c.221T > C (L74P), c.335G > A (G112D) and c.908C > T (P303L)^{16–18}. This pathological human phenotype was verified in (1) *Slc10a7^{-/-}* knockout mice, which show tooth enamel anomalies, shortened long bones, and growth plate disorganization¹⁷ and (11) in *Slc10a7*-deficient zebrafish, which show decreased calcium deposits in bone mineralization¹⁶. As patients with *SLC10A7* mutations revealed unique glycomic signatures and mis-localization of glycoproteins, a role of SLC10A7 in glyosaminoglycan synthesis, transport of glycoproteins to the extracellular



Figure 2. Ca^{2+} influx and Ca^{2+} stores in SLC10A7 overexpressing and SLC10A7 knockout cells. Calcium imaging was performed in HAP1 (control), HAP1-K0P7 (SLC10A7 knockout), HEKP7-tet (control, cells without tetracycline treatment), and HEKP7+tet (SLC10A7 verexpression after tetracycline treatment) cells pre-loaded with 2 µM Fluo-4 AM. Cells were treated with 2 µM ionomycin (**a**,**b**), 1 µM TG (**c**,**d**), or 100 µM ATP+Crb (**e**,**f**) in the absence of extracellular calcium to allow ER depletion. Then, 2 mM Ca^{2+} were added to allow store-operated Ca^{2+} entry. Fluorescence recording was performed every 10 s, and cell-based fluorescence was determined at defined regions of interest for each cell line (n = 6-10 for the HAP1 cells and n = 9-20 for the HEK293 cells), with a total number of about 84–260 cells. The bar graphs indicate the maximum peak data after ionomycin/TG/ATP+Crb (first peak) and calcium (second peak) treatment, respectively. (**g**) Cells were incubated in growth medium supplemented with 4 mM Ca^{2+} for 20 min. Total cellular Ca^{2+} was detected using a colorimetric calcium assay and was calculated after measuring the absorbance at 575 nm. All data were related to the total protein content of the cells. Data represent means \pm SD of triplicate determinations of a

representative experiment. (h) The Ca²⁺ content of intracellular stores was calculated by measuring the peak of ionomycin-mediated Ca²⁺ release in the presence of 3 mM extracellular EGTA (inset). Cell-based fluorescence was analyzed in each cell line at 10 defined regions of interest with a total number of about 180 to 260 cells. All data represent means \pm SD of a representative experiment. *Significantly different with p < 0.05 (Student's t-test).

matrix, and bone mineralization was suggested in these reports^{16–18}. However, the exact molecular function of the SLC10A7 protein is still unclear, and the identified genomic *SLC10A7* mutations have not been analyzed and verified at the functional protein level so far. Therefore, in the present study, we have established SLC10A7 knockout and SLC10A7 overexpressing cell lines and show, for the first time, that SLC10A7 protein expression is negatively correlated with SOCE. Based on this, SLC10A7 is suggested to be named as negative regulator of intracellular calcium signaling (in short: RCAS).

Results

SLC10A7 knockout and overexpressing cell lines. In order to investigate the role of SLC10A7 for the influx of calcium into eukaryotic cells, we established cell models for SLC10A7 knockout as well as SLC10A7 overexpression, respectively. For the first approach, we used the near-haploid human cell line HAP1, which is derived from chronic myelogenous leukemia cells. Wild type HAP1 cells (HAP1), as well as CRISPR/ Cas9-mediated SLC10A7 knockout HAP1 cells (HAP1-KOP7) were used. These HAP1-KOP7 cells revealed a genomic 23 bp deletion in coding exon 2, as shown by PCR amplification of the region of interest followed by DNA sequencing (Fig. 1a,b). Apart from destroying the coding sequence of the SLC10A7 protein, this mutation additionally seemed to compromise the stability of the SLC10A7 transcript. Consequently, significantly lower SLC10A7 mRNA expression levels in the HAP1-KOP7 cells were detected compared to the HAP1 wild type cells by means of real-time PCR expression analysis (Fig. 1c). Finally, the absence of SLC10A7 was confirmed on the protein level by mass spectrometry (MS)-based proteomics using the SLC10A7-specific reference peptide TEELTSALVHLK. In the HAP1-KOP7, this peptide could not be detected, but showed considerable presence in the HAP1 wild type cells (Fig. 1d). The second approach aimed to overexpress the SLC10A7 protein in cell culture. For this purpose, human embryonic kidney HEK293 cells, stably transfected with an SLC10A7 construct via Flp-FRT recombination, were used. Within these stably SLC10A7-transfected HEK293 cells (here referred to as HEKP7), SLC10A7 expression is under the control of a tetracycline-regulated promoter. Tetracycline treatment of these cells (HEKP7+tet) increased the SLC10A7 mRNA expression several fold compared with non-tetracycline treated cells (HEKP7-tet). This was shown at the mRNA expression level via real-time PCR (Fig. 1c), and on the protein level by means of MS-based proteomics (Fig. 1d). As control groups, other membrane carriers (ABCB1, ABCC1, and ABCC2) were included in this analysis, and showed comparable expression levels in HAP1 wild type and HAP1-KOP7 cells, as well as in HEKP7+tet and HEKP7-tet, respectively (Fig. 1e). Interestingly, SLC10A7 protein expression was comparable between the HAP1 and HEKP7-tet cells (Fig. 1d).

SLC10A7 regulates SOCE. In both cell lines, calcium influx then was analyzed by fluorescence imaging after pre-loading the cells with the green-fluorescent calcium indicator Fluo-4 AM. After 1 min of background fluorescence recording, cells were treated with 2 µM ionomycin or 1 µM TG in the absence of extracellular calcium to allow calcium depletion of the calcium stores and activation of SOCE via the plasma membrane. In the HAP1-KOP7 cells, ionomycin and TG treatment resulted in a significant elevation of $[Ca^{2+}]_{cyto}$ compared with the wild type HAP1 cells. In both cell lines, calcium fluorescence then completely returned to baseline levels within 4 min (Fig. 2a,c). The activity in the SLC10A7-overexpressing cells was contrary to this. Here, SLC10A7 overexpression significantly reduced the calcium signals after ionomycin and TG treatment (Fig. 2b,d). This indicates that SLC10A7 expression is negatively correlated with the increase of [Ca2+] cyto after ionomycin or TG treatment. The same was true after stimulation of the rapid calcium entry via SOCE after addition of 2 mM extracellular Ca²⁺. This calcium influx was about 2-fold higher in the HAP1-KOP7 cells compared to their HAP1 controls, but was significantly restricted by SLC10A7 overexpression in the HEKP7+tet cells (Fig. 2a-d). The addition of 2 mM extracellular Ca²⁺ in the absence of TG or ionomycin resulted in no difference in the calcium influx between all cell lines (Supplementary Fig. S1). In addition, the increase of [Ca²⁺]_{cyto} was analyzed after ATP + carbachol (Crb) treatment. Both compounds activate signaling cascades that deplete ER calcium stores via the inositol-tris-phosphate receptor (IP3R) pathway. Both cell lines were pre-incubated with 3 mM of the calcium chelator EGTA for 20 min prior to ATP+Crb treatment. In the HAP1-KOP7 cells, ATP+Crb treatment resulted in significantly higher increase of [Ca²⁺]_{cvto} compared to wild type HAP1 cells (Fig. 2e). In comparison, SLC10A7 overexpression significantly reduced the calcium signals after ATP+Crb treatment and the Ca^{2+} influx after the addition of extracellular Ca²⁺ (Fig. 2f). This data showed again that SLC10A7 expression is negatively correlated with the increase of [Ca²⁺]_{cyto}.

To further clarify if the increased calcium fluorescence merely results from functionally higher influx rates or indeed reflects higher intracellular calcium contents, intracellular calcium was directly analyzed in the different cell lines under cultivation in normal medium supplemented with 4 mM Ca²⁺. As shown in Fig. 2g, the absence of SLC10A7 resulted in a significantly higher amount of calcium ions in HAP1-KOP7 cells compared to the HAP1 control cells. In contrast, SLC10A7 overexpression in HEKP7+tet cells significantly reduced the total amount of calcium ions compared to the HEKP7-tet controls. The calcium content of the intracellular organelles was also measured. For these experiments, the Ca²⁺ ionophore ionomycin was used, which is well known to rapidly release Ca²⁺ from internal Ca²⁺ stores. By additional application of the Ca²⁺ chelator ECTA to the incubation medium, Ca²⁺ influx from outside of the cell was prevented. Thereby, the calcium organelle content was estimated from the ionomycin-induced increase of [Ca²⁺]_{opty}. These calcium signals were significantly higher in HAP1-KOP7 cells



Figure 3. Complementation of the SLC10A7 knockout in HAP1-KOP7 cells. HAP1 and HAP1-KOP7 cells were transiently transfected with an SLC10A7-mScarlet construct (transcription variant v2), coding for the red fluorescenet SLC10A7-mScarlet fusion protein. Then, cells were pre-loaded with 2 µM Fluo-4 AM and pre-treated with 1 µM TG and finally 2 mM extracellular Ca²⁺ were added. Red (mScarlet) and green (Fluo-4) fluorescence were recorded every 10 s in SLC10A7-mScarlet-expressing cells. The bar graphs represent the maximal induced calcium fluorescence (a) and the red fluorescence of the SLC10A7-mScarlet protein (b). (Images in b) Overlay of red and green fluorescence of 8–13 individual cells. Fluorescence recording was performed every 10 s, and the fluorescence of 8–13 individual cells was determined for each cell line. All data represent means \pm SD of a representative experiment. *Significantly different with p < 0.05 (One-way ANOVA).

compared to HAP1 control cells. In contrast, SLC10A7 overexpression in HEKP7+tet cells resulted in a significant reduction of the $[Ca^{2+}]_{cyto}$ increase (Fig. 2h).

Overexpression of SLC10A7 inhibits SOCE in HAP1-KOP7 cells. In order to determine if the different levels of calcium influx in HAP1 and HAP1-KOP7 cells truly result from different SLC10A7 expression, we transiently overexpressed an SLC10A7-mScarlet red fluorescent construct in the HAP1-KOP7 cells. Fluorescent labeling of SLC10A7 was of particular importance here, as it facilitated the selection of the SLC10A7-transfected cells for calcium imaging. As before (see Fig. 2c,d), all cells were pre-treated with 1µM TG for 20 min to deplete intracellular calcium stores and to prevent Ca²⁺ reuptake into the ER. Then 2 mM extracellular Ca²⁺ was added, and calcium fluorescence was analyzed in the different cell lines, i.e. HAP1 (wild type), HAP1+SLC10A7-mScarlet (overexpression), HAP1-KOP7 (knockout), and HAP1-KOP7+SLC10A7-mScarlet (complementation of the knockout). As shown in Fig. 3a, calcium influx was negatively correlated with the SLC10A7 expression level, and was significantly higher in the HAP1-KOP7 cells compared to the HAP1 wild type cells. In both cell lines, the SLC10A7-mScarlet fluorescent protein was expressed at equal levels (Fig. 3b), and significantly suppressed calcium influx to comparable basic levels (Fig. 3a). Accordingly, in the SLC10A7-mScarlet overexpressing cells, only a few calcium signals (green fluorescence) were visible, whereas HAP1-KOP7 cells showed strong calcium fluorescence, and HAP1-Cells revealed moderate green fluorescence (in Fig. 3b).

SOCE inhibition affects intracellular Ca²⁺ release and Ca²⁺ influx. Since we expected that SLC10A7 would regulate the calcium influx via inhibition of SOCE, we investigated the effect of the SOCE-inhibitor BTP-2 on the TG-induced and Ca²⁺-stimulated calcium fluorescence. HAP1 and HAP1-KOP7 cells were again loaded with Fluo-4 AM and pre-treated with 0 μ M BTP-2 for 20 min. Then cells were treated with TG in the absence of extracellular calcium to allow depletion of intracellular calcium stores and activation of SOCE in the plasma membrane. As already shown, calcium fluorescence was significantly increased in the HAP1-KOP7 compared to the HAP1 cells, after both 1 μ M TG and 2 m M Ca²⁺ includation. Interestingly, BTP-2 significantly reduced the calcium fluorescence in both cell lines about 2-fold for the TG response and about 3-fold for the treatment with 2 mM Ca²⁺ (Fig. 4), BTP-2 reduced the calcium influx to baseline levels in the HAP1 cells, whereas in HAP1-KOP7, the calcium influx was proportionally lower, but still showed considerable fluorescence signals, comparable to those of the wild type HAP1 cells without BTP-2 inhibition.

SLC10A7 co-localization with STIM1, Orail and SERCA2. In order to localize the site of interaction of SLC10A7 with calcium signaling, we performed co-localization studies using the SLC10A7-mScarlet construct,



Figure 4. BTP-2 blocks intracellular calcium mobilization and calcium entry in HAP1 and HAP1-KOP7 cells. (a) HAP1 and HAP1-KOP7 cells were pre-loaded with 2 μ M Fluo-4 AM and pre-treated with 10 μ M BTP-2 or vehicle (DMSO) for 20 min. Then, 1 μ M TG was added in the absence of extracellular calcium to allow ER depletion. 4 min later, 2 mM Ca²⁺ were added to allow store-operated Ca²⁺ entry. Fluorescence recording was performed every 10 s, and cell-based fluorescence was determined at six defined regions of interest for each cell line with a total number of about 90–100 cells. (b) The bar graph indicates the maximal peak data on calcium release from the ER (TG, first peak) and calcium entry via SOCE (Ca²⁺, second peak). All data represent means \pm SD of a representative experiment. *Significantly different with *p* <-0.05 (One-way ANOVA).

transiently transfected into HEK293 cells, with STIM1, Orai1 and SERCA2. Interestingly, SLC10A7-mScarlet co-localized with all three proteins, STIM1 (Fig. 5a), Orai1 (Fig. 5b), and SERCA2 (Fig. 5c). Furthermore, we found a trend for a higher degree of co-localization between SLC10A7-mScarlet (red) and STIM1 (green) after TG treatment (Fig. 5a).

SLC10A7 transcript variants v2 and v4 were expressed in most human tissues. In order to analyze expression of SLC10A7 transcript variants in different human tissues, PCR primers were selected that allowed the amplification of known SLC10A7 variants at different amplicon lengths in a single PCR reaction. As shown in Fig. 6, SLC10A7 revealed a broad expression pattern, but transcript variant occurrence was not identical in all organs. SLC10A7 transcript variants 2 and 4 were amplified at comparable levels in most tissue cDNAs. Only few organs revealed dominant occurrence of transcript variant v2 (e.g. the urinary bladder), or SLC10A7 transcript variant v4 (e.g. salivary gland). Both variants only differ in their last few amino acids at the C-terminus, which is localized intracellularly (see Fig. 7a and Supplementary Figs. S2 and S3). Other SLC10A7 transcript variants listed in the GenBank database (being v1, v3, and v5, see Supplementary Table S1) were not detected at the mRNA level.

Effects of SLC10A7 transcript variants and mutants on Ca²⁺ influx. All experiments involving overexpression of the SLC10A7 protein in HEK293 cells or complementation of the knockout in HAP1-KOP7 cells with the SLC10A7-mScarlet construct were performed with the SLC10A7 splice variant 2 (SLC10A7 v2) that we consider to be the physiologically most relevant coding sequence for the full-length SLC10A7 protein of 340 amino acids (Supplementary Fig. S2). However, as already described in a previous study, expression of the SLC10A7 gene produces more than one SLC10A7 transcript variant¹⁹. However, based on the expression analysis shown in Fig. 6, only transcript variants v2 and v4 were considered relevant (see Supplementary Table S1, Supplementary Figs. S2 and S3, and Fig. 7a). In order to analyze if the SLC10A7 transcript variant v4 is also active in limiting SOCE via the plasma membrane, as it was demonstrated for transcript variant SLC10A7 v2 (see Fig. 2), SLC10A7-mScarlet tagged constructs for v2 and v4 were transiently transfected into HEK293 cells. Then calcium influx following TG treatment was analyzed after addition of 2 mM extracellular Ca²⁺. As shown in Fig. 7a, expression of the transcript variants SLC10A7-mScarlet v2 and v4 resulted in comparably significant inhibition of the calcium influx. Apart from the SLC10A7 transcript variants, SLC10A7 mutations previously described to be associated with human pathologies were functionally analyzed in HEK293 cells. These include the point mutations L74P, G112D, and G130R as well as the exon-skipping variants Δ 9, Δ 9+10, and Δ 10 that were described in patients, due to genomic splice site mutations (see Supplementary Table S2). Different mutant SLC10A7-mScarlet constructs were generated as indicated in Fig. 7b, and were transiently transfected into HEK293 cells. All constructs revealed expression of the red fluorescent SLC10A7-mScarlet protein, as indicated by the red bars. However, none of mutant constructs analyzed revealed an inhibitory effect on calcium influx, as was shown for the wild type SLC10A7 protein. The only exception was the SLC10A7 variant G112D mutation, which showed a slightly but significantly reduced calcium influx compared to the non-SLC10A7-mScarlet expressing control cells (Fig. 7b).



Figure 5. Co-localization of SLC10A7-mScarlet with STIM1, Orai1 and SERCA2 in HEK293 cells. HEK293 cells were seeded on coverslips and were transiently transfected with the SLC10A7-mScarlet (transcript variant v2) construct (red fluorescence). After 48 h, the cells were treated with 1 μM TG for 5 min and then the cellular co-localization with STIM1, Orai1 and SERCA2 was detected by immunofluorescence with respective anti-STIM1, anti-Orai1 and anti-SERCA2 antibodies (green fluorescence). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Images represent maximum projections of z-stacks at 630-x magnification after deconvolution. Scale bars: 10 μm. Arrows: Co-localization of both proteins.

Discussion

In the present study, we provided evidence for the first time of a direct role of the human SLC10A7 protein in intracellular calcium signaling. Initially, SLC10A7 was thought to be a putative novel bile acid transporter, based on a certain sequence homology to members of the bile acid transporter family SLC10 (Solute Carrier Family 10)^{19–21}. However, heterologous expression of the SLC10A7 protein in HEK293 cells and *Xenopus laevis* oocytes failed to show any transport activity for bile acids¹⁹. As SLC10A7 homologous proteins also exist in yeasts, bacteria and plants, we previously aimed to use one of these organisms to elucidate the function of the SLC10A7 protein. Therefore, SLC10A7 mutants of the yeast fungus *Candida albicans* were generated²². Interestingly, these mutants were hypersensitive to high concentrations of extracellular calcium and revealed increased calcium influx and cytosolic calcium levels, finally leading to the denomination of the SLC10A7-homologous protein in *Candida albicans* as regulator of calcium homeostasis CaRch 19^{2,23}. Later, a functional homolog of CaRch1p was also identified in *Saccharomyces cerevisiae* (ScRch1p)³⁴. This was the first step in establishing the role of Rch1p/ SLC10A7 for calcium homeostasis. However, the preses cellular and molecular function of the human SLC10A7 protein still remained elusive and, therefore, in the present study, we aimed to clarify the functional role of human SLC10A7 and to verify if SLC10A7 patient mutations indeed reveal an SLC10A7 loss-of-function phenotype.

The basic finding of the present study is that increasing or decreasing expression levels of the human SLC10A7 protein lead to contrary effects on intracellular calcium levels and calcium signaling. Furthermore, SLC10A7 protein expression was negatively correlated with the store-operated calcium entry (SOCE). These findings overall indicate that SLC10A7 plays a role in regulation of cellular calcium homeostasis. Interestingly, the higher calcium levels and calcium influx into HAP1 cells lacking SLC10A7 expression phenocopy quite well the calcium sensitive phenotype of the Rch1 mutants of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*^{12–24}. Furthermore, fibroblasts ¹⁷.

Ionomycin is a calcium ionophore that allows calcium release from the ER³⁵ and enables Ca²⁺ influx through ionophore pores in the plasma membrane³⁶. ATP and Crb activate signaling cascades that induce IP3R-mediated Ca²⁺ release from the ER via binding to respective G-protein-coupled receptors at the plasma membrane¹⁵²⁷. TG blocks SERCA that normally sequesters calcium in the SR/ER lumen^{10,12,28}. All these compounds induced higher



Figure 6. Expression pattern of SLC10A7 transcript variants v2 and v4 in different human tissues. Expression analysis was performed on a commercial major human tissue CDNA panel with primers theoretically allowing amplification of all different transcript variants (see Supplementary Table S1). Primers were designed to bind at exon boundary 3/4 (forward) and at exon 12 (reverse). Amplicons were separated on a 2.5% agarose gel. Only transcript variants v2 (amplicon size: 807 bp) and v4 (amplicon size: 918 bp) were detected. Individual bands were excised from the gel and sequence verified by DNA sequencing. Images were cropped from different gels for better clarity. The full-length gels are depicted in Supplementary Fig. 4.

calcium signals in the HAP1 cells lacking SLC10A7 compared to wild type HAP1 cells. Although ionomycin, TG, and ATP+CTb are commonly used to induce calcium depletion from the ER^{15,29-35}, we cannot completely reject that calcium release from mitochondria also takes place under these experimental conditions (see below). Therefore, further studies are needed to directly measure $[Ca^{2+}]_{ER}$ levels in HAP1 and HAP1-KOP7 cells³⁶.

How does SLC10A7 influence cellular calcium levels and calcium signaling on the molecular level? There are several possible explanations (see Fig. 8). SLC10A7 might limit the transport capacity of SERCA or might increase the rate of Ca^{2+} leaking from the ER, so that in the SLC10A7. Knockout cells the storage of calcium in the ER is increased. In addition, SLC10A7 might negatively regulate STIM1 and/or Orai1, e.g. by affecting the sensitivity of STIM1 to calcium, or decrease the probability of opening Orai1. A role of SLC10A7 in STIM1-Orai1 complex formation or its stability at the plasma membrane is also possible. Consequently, activation of SOCE via the STIM-Orai complex might be more pronounced due to the higher amplitude of ER calcium depletion after TG, ionomycin, or ATP+Crb treatment. Interestingly, clear co-localization of SLC10A7 with all three proteins, SERCA, STIM1, and Orai-1 was observed by immunofluorescence microscopy. However, any potential direct protein-protein interaction of these proteins and the exact mechanism of such an interaction have to be further investigated.

So far, several regulator proteins of the STIM-Orai complex and of SERCA have been described. These include CRACR2A that interacts with the N-terminus of Orai1 and functions as a Ca²⁺ sensor in the cytoplasm. Immunoprecipitation and microscopy studies revealed that CRACR2A showed clustering with STIM1 and Orai1 in T-cells, and showed partial co-localization with STIM1 without store depletion in HEX293 cells¹³. In addition, knockout of CRACR2A decreased TG-induced SOCE in HEK293 and Jurkat T cells, and, conversely, overexpression of CRACR2A increased TG-induced SOCE in HEK293 and Jurkat T cells¹³. Another regulator is SARAF, which has been characterized as a negative regulator of SOCE through its interaction with STIM1¹⁵. Like SLC10A7, overexpression or knockout of SARAF expression resulted in opposite effects on intracellular Ca²⁺ levels. SARAF was localized in the ER and co-localized with STIM1, but SARAF expression was also detected in the plasma



Figure 7. Effects of SLC10A7 transcript variants v2 and v4 as well as of different mutants on the Ca²⁺ influx into HEK293 cells. For each of the indicated SLC10A7 transcript variants (**a**) and mutants (**b**), respective SLC10A7-mScarlet constructs were generated and transiently transfected into HEK293 cells. At 48 hours after transfection, cells were prepared for calcium imaging by Fluo-4 AM (2 μ M) and TG (1 μ M) pre-incubation, followed by the addition of 2 mM extracellular Ca²⁺. Red (mScarlet) and green (Fluo-4) fluorescence signals were recorded every 10 s. Fluo-4 AM fluorescence signals then were separately analyzed in additionally red fluorescent cells (considered as SLC10A7-mScarlet expressing) and non-red fluorescent cells (un-transfected controls). The left bar graphs represent the maximal induced calcium fluorescence in both cell types and the right bar graphs indicate the fluorescence intensities of the SLC10A7-mScarlet fusion proteins. Data are means \pm SD of 33–92 individual cells from representative experiments. *Significantly different with p < 0.05 (Student's t-test).

9



Figure 8. Schematic illustration of calcium signaling in non-excitable cells. Following the stimulation of G protein-coupled receptors (GPCR), phospholipase C (PLC) hydrolyses PIP2 to 1P3. P3 activates the IP3 receptor (IP3R) and triggers the depletion of ER Ca²⁺ stores. TG or ionomycin also cause the Ca²⁺ depletion from ER by different mechanisms. Declined ER Ca²⁺ levels are sensed by STIM1 proteins. STIM1 oligomerizes, migrates towards subplasmalemmal ER-PM junctions, and interacts with Orail to trigger store-operated calcium channel opening. Then, SERCA pumps Ca²⁺ back into the ER to refill the stores with Ca²⁺. SLC10A7 is hypothesized to negatively regulate STIM1, Orail and/or SERCA2 through protein interaction. TG, SERCA inhibitor; BTP-2, SOCE blocker.

. .

membrane of SH-SY5Y neuroblastoma cells³⁷. Based on this, it is also possible that SLC10A7 mediates its effects on the calcium signaling indirectly via CRACR2A or SARAF. In the case of SERCA, phospholamban and sarcolipin have been identified as regulatory factors, and both of them co-localize with SERCA in muscle cells. While binding of phospholamban lowers SERCA pump affinity for Ca²⁺, sarcolipin decreases the V_{max} of SERCA Ca²⁺ transport^{11,34–0}. In a similar manner as phospholamban and sarcolipin, SLC10A7 might negatively regulate SERCA in non-muscle cells, so that in the absence of SLC10A7, SERCA becomes more active in sequestering calcium in the ER.

Apart from the discussed effects of SLC10A7 on STIM1, Orai1 and SERCA, an effect of SLC10A7 on cellular Ca^{2+} buffering, to which mitochondria contribute essentially⁴¹, cannot be excluded. If, for example, SLC10A7 stimulated the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) responsible for exchange of Ca^{2+} between the cytosol and mitochondria⁴², the changes in the cytosolic Ca^{2+} concentration measured with Fluo-4 would also be enhanced after SLC10A7 knockout. However, such a mechanism would not be able to explain the increase in total cellular Ca^{2+} amount after SLC10A7 knockout, or its decrease after upregulation of SLC10A7 (Fig. 2g), as any change in MCU activity would only affect cellular Ca^{2+} distribution, but not the overall content of Ca^{2+} . Thus, an interaction of SLC10A7 with Ca^{2+} buffering seems to be unlikely as explanation for the results obtained in the present study.

How is the proposed regulatory function of SLC10A7 linked to the clinical phenotype of patients with SLC10A7 mutations? These patients typically show skeletal dysplasia, amelogenesis imperfecta, and decreased bone mineral density with differences in the severity of the phenotype depending on the exact site of mutation^{16–18}. On the molecular level, altered glycosaminoglycan synthesis, intracellular mis-localization of glycoproteins and defective post-Golgi transport of glycoproteins to the extracellular matrix, as well as defective bone/enamel mineralization were described. While alterations in the composition of the extracellular matrix may have caused growth plate disorganization, growth delay, and skeletal dysplasia in the patients, the hypo-mineralization might be responsible for the amelogenesis imperfecta phenotype. While Ashikov et al. (2018) identified SLC10A7 mutant patients from a cohort of patients with abnormal Golgi glycosylation¹⁶, in the studies of Dubail et al. (2018) and Laugel-Haushalter et al. (2019), patients clinically presented with skeletal dysplasia and amelogenesis imperfecta^{17,18}. All patients then underwent whole-exome sequencing and so the different SLC10A7 mutations were identified. It is already known that synthesis and secretion of proteoglycans is dependent on the ER and Golgi calcium concentration⁴³. This process might be disturbed by the significant effect of SLC10A7 on calcium signaling and [Ca²⁺]_{FR}. On the other hand, it is interesting to note that patients with loss-of-function mutations in STIM1 and Orail also display an amelogenesis imperfecta phenotype, indicating that dysregulation of SOCE has a direct effect on bone/enamel mineralization^{44–48}. Based on this, it can be suggested that dysregulation of calcium homoeostasis by human SLC10A7 mutation represents the initial defect that subsequently leads to impaired glycosaminoglycan synthesis, disturbed glycoprotein transport, and bone/enamel hypo-mineralization, and finally ends in the clinical phenotype of skeletal dysplasia, amelogenesis imperfecta, and decreased bone mineral density¹⁶⁻¹⁸.

However, the direct role of SLC10A7 for glycosaminoglycan synthesis, glycoprotein trafficking and bone/ enamel mineralization has to be further investigated using appropriate cell culture models, such as HAP1 and HAP1-KOP7, and $Slc10a7^{-/-}$ knockout mice.

In conclusion, the present study characterized for the first time the molecular function of the orphan carrier SLC10A7, which was established as a novel negative regulator of intracellular calcium signaling that most likely acts via STIM1, Orai1 and/or SERCA2 inhibition. Based on this, SLC10A7 is suggested to be named as negative regulator of intracellular calcium signaling (in short: RCAS). The fact that the protein function of SLC10A7 genomic mutations previously identified in patients with skeletal dysplasia, amelogenesis imperfecta and decreased bone mineral density indeed hamper the function of the coded protein. Indeed, all analyzed SLC10A7 mutants, except of G112D, showed a complete loss of function. This now provides the basis to further clarify the pathogenesis of these SLC10A7-associated diseases.

Methods

Materials. All of the chemicals, unless otherwise stated, were from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), including thapsigargin (TG, T9033), ATP (A6144) and carbachol (212385M). Fluo-4 AM (F14201) and BTP-2 (*N*-[4-[3,5-bis(trifluoromethyl)]pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methylthiadiazole-5-carboxamide, 203890) were purchased from Thermo Fisher Scientific and Merck, respectively. Ca²⁺-free HEPES buffer was prepared as follows: NaCl 140 mM, KCl 4 mM, Hepes 10 mM, MgCl₂ 1 mM, and glucose 25 mM; pH 7.4.

Cell culture. HEK293 cells were maintained in DMEM/F12 medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Pan-Biotech, Aidenbach, Germany), L-glutamine (4 mM, Anprotec, Bruckburg, Germany), penicillin (100 U/ml, Anprotec), and streptomycin (100 µg/ml, Anprotec) at 37 °C, 5% CO₂, and 95% humidity. HAP1 represents a near-haploid human cell line that was derived from the male chronic myelogenous leukemia cell line KBM-7 cells and was purchased from Horizon Genomics (Cambridge, UK). The HAP1 SLC10A7 knockout cell line (further referred to as HAP1-KOP7) was engineered by CRISPR/Cas9 mutation and features a genomic 23-bp deletion in coding exon 2 of the *SLC10A7* gene (clone HZGHC005272c010, Horizon). HAP1 cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany).

Stable transfection of HEK293 cells. The recombinant human cell line SLC10A7-HEK293 (further referred to as HEKP7) was generated based on Flp-In T-REx 293 cells (Thermo Fisher Scientific), as described previously²¹. The full-length SLC10A7 open reading frame (according to GenBank accession number NM_001029998.6, transcript variant 2) was cloned into the pcDNA5/FRT/TO expression vector (Invitrogen), and was used for stable transfection of Flp-In T-REx-293 cells. Flp-In T-Rex-293 cells contain a tetracycline-regulated CMV/tetO2 hybrid promoter that allows expression of the gene of interest only under tetracycline (tet) treatment.

Construction of the mScarlet tagged SLC10A7 constructs. For SLC10A7 transcription variants v2 and v4, as well as for all known SLC10A7 mutants (listed in Supplementary Tables S1 and S2), C-terminally mScarlet tagged constructs were generated as reported before⁴⁹. Briefly, the flexible linker protein sequence GGGGSGGGGGGGGGGGG, followed by the cDNA sequence coding for the monmeric red fluorescent protein mScarlet⁵⁰ were added to all constructs via DNASTAR 15.0 SeqBuilder Pro and were synthesized by Biocat (Heidelberg, Germany) into the pcDNA3.1(+) expression vector (Thermo Fisher Scientific).

Transient transfection of HEK293 cells. HEK293 were transfected using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 40 × 10³ cells were plated onto µ-Slide 8-well coverslips (IBIDI, Gräfelfing, Germany). The following day, cells were transfected with a total of 0.25 µg SLC10A7-mScarlet plasmid DNA by Lipofectamine 2000. The transfected cells were maintained in cultures for 48 h. Fluorescence was visualized on a Leica DM5500 fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Images were analyzed with the Leica Fluorescence Workstation software LAS-X.

Sequencing analysis of SLC10A7. Genomic DNA from HAP1 and HAP1-KOP7 cells was isolated using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and was used for PCR amplification with the following oligonucleotide primers: 5'-TAG GAA TGA AGA CACA AGT CCT TTG C-3' forward and 5'-ACA AAT AGA TTC TTC TTT TGT GCC A-3' reverse. PCR products were separated on a 1.5% agarose gel, stained with GelRed (Biotium, Fremont, USA), and visualized on a UV-Transilluminator (ImageMaster, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Relevant amplicons were excised under UV light and extracted with Hi Yield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (SLG, Gauting, Germany) and were subjected to DNA sequencing (Seqlab Microsynth, Göttingen, Germany).

PCR amplification of SLC10A7 transcript variants. The TissueScan Human Major Tissue Plate by OriGene Technologies (Lot#TH28) was used to determinate expression of SLC10A7 transcript variants in different human tissues. For PCR amplification, Phusion Flash High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), forward primer (5'-GGC TTT TAA AAG GTT TGC AGA CAG TAG G-3'), and reverse primer (5'-CAG GCA ACA TTC ACA AGT ACA AGT CTT CAG-3') were added to the pre-spotted cDNA panel in each well. PCR amplification was performed on the Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System at 45 cycles under the following conditions: initialization for 90 s at 98 °C, denaturation for 30 s at 98 °C, annealing for 30 s at 64 °C, extension for 1 min at 72 °C, final elongation for 1 min at 72 °C and final hold at 4 °C. After amplification, PCR products were separated by 2.5% agarose gel electrophoresis in TAE-buffer. The gel was dyed for 45 min in GelRed solution. GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) was used to determinate the size of the bands. Representative PCR amplicons were excised from the gel and sequence verified by DNA sequencing (Seqlab Microsynth).

Real-time RT-PCR analysis. Cells were harvested, and total mRNA was extracted by Maxwell RSC simplyRNA Tissue Kit (Promega). Complementary cDNA was synthesized from 1 µg total RNA by using 8 µl of RT-mix SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). For quantitative expression analysis of the SLC10A7 transcripts, the gene-specific *TaqMan Gene Expression Assay* Hs04397477_m1 (Thermo Fisher Scientific) was used. The assay Hs02758991_g1 (ThermoFisher) was used for control amplification of GAPDH. The plates were heated for 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and then 40 cycles of 15 s at 94 °C and 60 s at 60 °C were applied. All data were expressed as fold changes using the $2^{-\Delta\Delta\Omega}$ method.

Quantification of the SLC10A7 protein in the HEK293 and HAP1 cell lines. Protein abundance of ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1) and ABCC2 (MRP2) and SLC10A7 were analyzed by mass spectrometry (MS)-based targeted proteomics using validated LC–MS/MS methods⁵¹. In brief, pellets of HEK293 and HAP1 cells were lysed and the membrane protein fraction was extracted using the ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction kit (Merck, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's protocol. All sample preparation and digestion steps were performed using Protein LoBind tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). Protein quantification was conducted on a 5500 QTRAP triple quadrupole mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) coupled to an Agilent Technologies 1260 Infinity system (Agilent Technologies). The following peptides were used for quantification of the respective proteins: ABCB1, AGAVAEEVLAAIR; ABCC1, DGAFAEFLR; ABCC2, LTIIPQDPILFSGSLR; and SLC10A7, TEELTSALVHLK. For each peptide, three mass-to-charge transitions were used for quantification (range: 0.1–25 nmol/L). Accuracy (error) and precision (CV) during sample analysis were both below 20%. Final protein abundance data (picomoles per milligram protein) were calculated by normalization to the total protein content of the isolated membrane fraction.

Ca²⁺ imaging. Cells were plated at a density of 40×10^3 cells per well in 8-well μ -slides (IBIDI) in culture medium containing 10% FCS. After 24 h, the medium was replaced by fresh serum-free medium for 2 h. Then, cells were incubated in Ca²⁺-free HEPES containing 2 μ M Fluo-4 AM for 30 min at RT and were washed three times with Ca²⁺-free HEPES to remove any excess extracellular dye. Cells were incubated for an additional 30 min to allow complete de-esterification of intracellular AM esters. The plates were set under the DM5500 Leica fluorescent microscope and basal fluorescence was recorded for 1 min. Calcium-induced fluorescence was recorded by the LAS-X imaging software and cell-based fluorescence was determined by defined regions of interest (ROI). Data are presented as the mean background-subtracted fluorescence intensity of each cell, normalized to the intensity of the first image (F/F0).

Measurement of intracellular calcium ion content. Cells were plated onto 15 cm² petri dishes and were treated with 4 mM CaCl₂ for 20 min. After treatment, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM Na_c), 2.7 mM KCl₁, 1.5 mM KH₂PO₄, 7.3 mM Na_c), PO₄, pH 7.4) and the scraped cells were centrifuged at 1,000 rpm for 2 min and then were immediately placed on ice. Measurement of the calcium ion content was performed using the Calcium Colorimetric Assay (MAK022) in 96-well plates at the GloMax Multi Detection System (Promega). The total protein content of the samples was determined using the BCA protein assay kit (Merck).

Immunofluorescence. HEK293 cells transiently transfected with the SLC10A7-mScarlet construct were grown on poly-L-lysine coated 8-well µ-slide (IBIDI). After 48 h, cells were incubated with or without 1 µM TG for 5 min and fixed with 2% PFA and blocked with blocking buffer (containing 1% bovine serum albumin and 4% goat serum in PBS) for 30 min at room temperature. Then, cells were incubated at 4°C overnight with anti-bodies against STIM1 (1:800, D99E10, Cell Signaling), Orai1 (2 µg/ml, sc-377281, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or SERCA2 (1:250, sc-376235, Santa Cruz Biotechnology) in blocking buffer, followed by labeling with AlexaFluor 488-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) and nuclear marker Hoechst 33342. Z-stack cell imaging was performed at room temperature on an inverted Leica DM5500 fluorescence microscope.

Data and statistical analyses. Statistical analysis was performed by using Student's t-test or one-way ANOVA with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Error bars represent mean \pm SD. The numbers of samples and experimental repetitions are indicated in the figure legends. A level of p < 0.05 was considered as statistically significant.

Received: 23 January 2020; Accepted: 7 April 2020; Published online: 29 April 2020

References

- Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 517–529, https://doi.org/10.1038/nrm1155 (2003).
- Zhang, S. L. et al. STIM1 is a Ca2+ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca2+ store to the plasma membrane. Nature 437, 902–905, https://doi.org/10.1038/nature04147 (2005).
- Roos, J. et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. J. Cell Biol. 169, 435–445, https://doi.org/10.1083/jcb.200502019 (2005).
 Choi, S. et al. The TRPCs-STIM1-Orai interaction. Handb. Exp. Pharmacol. 223, 1035–1054, https://doi.org/10.1007/978-3-319-
- 4. Chois 5, et al. The Fried Softwire Oral Interaction. Tantao. Exp. That match. 225, 1059–1054, https://doi.org/10.1007/97659519-05161-1_13 (2014).
- Liou, J. et al. STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. Curr. Biol. 15, 1235–1241, https:// doi.org/10.1016/j.cub.2005.055 (2005).

- Lewis, R. S. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. Nature 446, 284–287, https://doi.org/10.1038/ nature05637 (2007).
- Wang, Y. et al. STIM protein coupling in the activation of Orai channels. Proc. Natl Acad. Sci. U S A 106, 7391–7396, https://doi.org/10.1073/pnas.0900293106 (2009).
- Zweifach, A. & Lewis, R. S. Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. J. Biol. Chem. 270, 14445–14451, https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14445 (1995).
- Fierro, L. & Parekh, A. B. Fast calcium-dependent inactivation of calcium releaseactivated calcium current (CRAC) in RBL-1 cells. J. Membr. Biol. 168, 9–17 (1999).
- Brini, M. & Carafoli, E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 1341–1378, https://doi.org/10.1152/ physrev.00032.2008 (2009).
- MacLennan, D. H. & Kranias, E. G. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 566–577, https://doi.org/10.1038/nrm1151 (2003).
- Vangheluwe, P. et al. Intracellular Ca2+- and Mn2+-transport ATPases. Chem. Rev. 109, 4733–4759, https://doi.org/10.1021/ cr900013m (2009).
- Srikanth, S. et al. A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca2+ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. Nat. Cell Biol. 12, 436–446, https://doi.org/10.1038/ncb2045 (2010).
- Srikanth, S. et al. A large Rab GTPase encoded by CRACR2A is a component of subsynaptic vesicles that transmit T cell activation signals. Sci. Signal. 9, ra31, https://doi.org/10.1126/scisignal.aac9171 (2016).
- Palty, R., Ravéh, A., Kaminsky, I., Meller, R. & Reuveny, E. SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* 149, 425–438, https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.055 (2012).
- Ashikov, A. et al. Integrating glycomics and genomics uncovers SLC10A7 as essential factor for bone mineralization by regulating post-Golgi protein transport and glycosylation. Hum. Mol. Genet. 27, 3029–3045, https://doi.org/10.1093/hmg/ddy213 (2018).
- Dubail, J. et al. SLC10A7 mutations cause a skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta mediated by GAG biosynthesis defects. Nat. Commun. 9, 3087, https://doi.org/10.1038/s41467-018-05191-8 (2018).
- Laugel-Haushalter, V. et al. A New SLC10A7 Homozygous Missense Mutation Responsible for a Milder Phenotype of Skeletal Dysplasia With Amelogenesis Imperfecta. Front. Genet. 10, 504, https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00504 (2019).
- Godoy, J. R. et al. Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. Eur. J. Cell Biol. 86, 445–460, https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.06.001 (2007).
- Geyer, J., Wilke, T. & Petzinger, E. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372, 413–431, https://doi.org/10.1007/s00210-006-0043-8 (2006).
- Geyer, J. et al. Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). J. Biol. Chem. 282, 19728–19741, https://doi.org/10.1074/jbc.M702663200 (2007).
- Jiang, L. et al. The Candida albicans plasma membrane protein Rch lp, a member of the vertebrate SLC10 carrier family, is a novel regulator of cytosolic Ca2+ homoeostasis. Biochem. J. 444, 497–502, https://doi.org/10.1042/BJ20112166 (2012).
- Alber, J., Jiang, L. & Geyer, J. CaRch1p does not functionally interact with the high-affinity Ca(2+) influx system (HACS) of Candida albicans. Yeast 30, 449–457, https://doi.org/10.1002/yea.2981 (2013).
- Zhao, Y. Y. et al. The plasma membrane protein Rch1 is a negative regulator of cytosolic calcium homeostasis and positively regulated by the calcium/calcineurin signaling pathway in budding yeast. Eur. J. Cell Biol. 95, 164–174, https://doi.org/10.1016/j. ejcb.2016.01.001 (2016).
- Morgan, A. J. & Jacob, R. Ionomycin enhances Ca2+ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.* 300, 665–672, https://doi.org/10.1042/bj3000665 (1994).
- Nusse, O. et al. Store-operated Ca2+ influx and stimulation of exocytosis in HL-60 granulocytes. J. Biol. Chem. 272, 28360–28367, https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28360 (1997).
- Decuypere, J. P. et al. mTOR-Controlled Autophagy Requires Intracellular Ca2+ Signaling. PLoS One 8, e61020, https://doi. org/10.1371/journal.pone.0061020 (2013).
- Mogami, H., Tepikin, A. V. & Petersen, O. H. Termination of cytosolic Ca2+ signals: Ca2+ reuptake into intracellular stores is regulated by free Ca2+ concentration in the store lumen. *EMBO J.* 17, 435–442 (1998).
- Srikanth, S. et al. The Ca2+ sensor STIM1 regulates the type I interferon response by retaining the signaling adaptor STING at the endoplasmic reticulum. Nat. Immunol. 20, 152–162, https://doi.org/10.1038/s41590-018-0287-8 (2019).
- Yazbeck, P. et al. STIM1 Phosphorylation at Y361 Recruits Orail to STIM1 Puncta and Induces Ca2+ Entry. Sci. Rep. 7, 42758, https://doi.org/10.1038/srep42758 (2017).
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S. & Meyer, T. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca2+ levels. Cell 131, 1327–1339, https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.039 (2007).
- Bittremieux, M. et al. DPB162-AE, an inhibitor of store-operated Ca2+ entry, can deplete the endoplasmic reticulum Ca2+ store. Cell Calcium 62, 60–70, https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.015 (2017).
- Smyth, J. T., Dehaven, W. I., Bird, G. S. & Putney, J. W. Jr. Ca2+-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. J. Cell Sci. 121, 762–772, https://doi.org/10.1242/jcs.023903 (2008).
- Putney, J. W. Pharmacology of store-operated calcium channels. Mol. Interv. 10, 209–218, https://doi.org/10.1124/mi.10.4.4 (2010).
 Tang, T. H. et al. Oxidative stress disruption of receptor-mediated calcium signaling mechanisms. J. Biomed. Sci. 20, 48, https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-48 (2013).
- Palmer, A. E., Jin, C., Reed, J. C. & Tsien, R. Y. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca2+ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. Proc. Natl Acad. Sci. USA 101, 17404–17409, https://doi.org/10.1073/ pnas.0408030101 (2004).
- Albarran, L., Lopez, J. J., Woodard, G. E., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Store-operated Ca2+ Entry-associated Regulatory factor (SARAF) Plays an Important Role in the Regulation of Arachidonate-regulated Ca2+ (ARC) Channels. J. Biol. Chem. 291, 6982–6988, https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704940 (2016).
- Toyoshima, C. et al. Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg2+-bound E1 state. Nature 495, 260–264, https://doi.org/10.1038/nature11899 (2013).
- Sahoo, S. K. et al. The N Terminus of Sarcolipin Plays an Important Role in Uncoupling Sarco-endoplasmic Reticulum Ca2+-ATPase (SERCA) ATP Hydrolysis from Ca2+ Transport. J. Biol. Chem. 290, 14057–14067, https://doi.org/10.1074/jbc.M115.636738 (2015).
- Winther, A. M. et al. The sarcolipin-bound calcium pump stabilizes calcium sites exposed to the cytoplasm. Nature 495, 265–269, https://doi.org/10.1038/nature11900 (2013).
- Glitsch, M. D., Bakowski, D. & Parekh, A. B. Store-operated Ca2+ entry depends on mitochondrial Ca2+ uptake. EMBO J. 21, 6744–6754, https://doi.org/10.1093/emboj/cdf675 (2002).
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G. & Clapham, D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. Nature 427, 360–364, https://doi.org/10.1038/nature02246 (2004).
- Prydz, K. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. Biomolecules 5, 2003–2022, https://doi.org/10.3390/biom5032003 (2015).

- Eckstein, M. et al. Store-operated Ca2+ entry controls ameloblast cell function and enamel development. JCI Insight 2, e91166, https://doi.org/10.1172/jci.insight.91166 (2017).
- Wang, S. et al. STIM1 and SLC24A4 Are Critical for Enamel Maturation. J. Dent. Res. 93, 948-100S, https://doi. org/10.1177/0022034514527971 (2014).
- McCarl, C. A. et al. ORAII deficiency and lack of store-operated Ca2+ entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. J. Allergy Clin. Immunol. 124, 1311–1318 e1317, https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.007 (2009).
- Picard, C. et al. STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. N. Engl. J. Med. 360, 1971–1980, https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900082 (2009).
- Lacruz, R. S. & Feske, S. Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1356, 45–79, https://doi. org/10.1111/nyas.12938 (2015).
- Noppes, S. et al. Homo- and heterodimerization is a common feature of the solute carrier family SLC10 members. Biol. Chem. 400, 1371–1384, https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0148 (2019).
- Bindels, D. S. et al. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. Nat. Methods 14, 53–56, https://doi. org/10.1038/nmeth.4074 (2017).
- Gröer, C. et al. LC-MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins. J. Pharm. Biomed. Anal. 85, 253–261, https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.031 (2013).

Acknowledgements

This study was supported by grants to E.K. from the Scholar Rescue Fund and by the Philipp Schwartz-Initiative of the Alexander von Humboldt-Stiftung. The authors want to acknowledge Edda Wacker and Laurence Henry for critical reading of the manuscript.

Author contributions

E.K., M.W., S.E.M., S.L., R.L., S.N., S.O. and J.G.: Acquisition and analysis of data; E.K., M.D. and J.G.: interpretation of data; E.K. and J.G.: study concept, design and supervision, writing of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-020-64006-3.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

The orphan solute carrier SLC10A7 is a novel negative regulator of intracellular calcium signaling

Emre Karakus¹, Marie Wannowius¹, Simon Franz Müller¹, Silke Leiting¹, Regina Leidolf¹, Saskia Noppes¹, Stefan Oswald², Martin Diener³, Joachim Geyer^{1*}

¹Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany

²Institute of Pharmacology, University of Greifswald, 17487 Greifswald, Germany

³Institute of Veterinary Physiology and Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany

Supplementary Table S1. SLC10A7 transcript variants

Supplementary Table S2. SLC10A7 mutants

Supplementary Fig. S1. Ca²⁺ influx into SLC10A7 knockout and overexpressing cells

Supplementary Fig. S2. SLC10A7 transcript variant v2

Supplementary Fig. S3. SLC10A7 transcript variant v4

Supplementary Fig. S4. Full-length gels corresponding to Fig. 6.

| SLC10A7 transcript variant | Transcript length | CDS (ORF length) | GenBank Accession No. | Protein isoform | Protein length | GenBank Accession No. | Comment |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|--|
| V1 | 805 bp | 1561 (561 bp) | NM_001030316 | a | 186 aa | NP_001025487 | Δexon8+9, off-frame, premature stop codon, nonsense-mediated mRNA decay (NMD) candidate |
| V2 | 3756 bp | 2241246 (1023 bp) | NM_001029998 | b | 340 aa | NP_001025169 | 12 coding exons, reference sequence |
| V3 | 1821 bp | 255-734 (480 bp) | NM_032128 | с | 159 aa | NP_115504 | Coding exons: 1-4 and additional exon 4' |
| V4 | 3867 bp | 2241300 (1077 bp) | NM_001300842 | d | 358 aa | NP_001287771 | Additional exon 11' between exon 11 and exon 12, alternative C- terminus compared with isoform b |
| V5 | 3717 bp | 2241207 (984 bp) | NM_001317816 | e | 327 aa | NP_001304745 | ∆exon5, in frame |

Supplementary Table S1. SLC10A7 transcript variants.

| Nucleotide change | mRNA change | Protein change | Reference |
|------------------------|---|--|-----------|
| c.722-16A>G (intron 8) | Exon 9 skipping due to splice acceptor site mutation | Frameshift at p.Ile241 and premature stop codon at p.Ala270 | 1 |
| c.335G>A (exon 4) | | G112D in transmembrane domain 4 | 1 |
| c.221T>C (exon 3) | | L74P in transmembrane domain 3, reduced protein expression | 2 |
| c.388G>A (exon 4) | | G130R in the second intracellular loop | 2 |
| c.773+1G>A (intron 9) | Exon 9 skipping due to splice donor site mutation | Frameshift at p.Ile241 and premature stop codon at p.Ala270 | 2 |
| c.774-1G>A (intron 9) | Exon 10 skipping due to splice acceptor site mutation | Frameshift at p.Thr.258 and premature stop codon at p.Ala270 | 2 |
| c.774-1G>A (intron 9) | Exon 9+10 skipping due to splice acceptor site mutation | In-frame deletion of 42 amino acids | |
| c.514C>T (exon 7)* | | Premature stop codon at p.Gln172 | 2 |
| c.908C>T (exon 11)* | | P303L in transmembrane domain 10 | 3 |

*Not analyzed in the present study

Supplementary Table S2. SLC10A7 mutants.



Supplementary Fig. S1. Ca^{2+} influx into SLC10A7 knockout and overexpressing cells. Calcium imaging was performed in HAP1 (control), HAP1-KOP7 (SLC10A7 knockout), HEKP7-tet (control, cells without tetracycline treatment), and HEKP7+tet (SLC10A7 overexpression) cells pre-loaded with 2 μ M Fluo-4 AM. 2 mM Ca²⁺ were added and fluorescence recording was performed every 10 s. Cell-based fluorescence was determined at defined regions of interest (n=30 for the HAP1 cells and n=40 for the HEK293 cells) for each cell line with a total number of about 360-480 cells.

SLC10A7 transcript variant 2





4

intracellular

(d)





top view

SLC10A7 transcript variant 2

| (e) | | | |
|-----|------------------------|-----|--|
| (-) | Homo sapiens | 1 | MRLLERMRKDWFMVGIVLAIAGAKLEPSIGVNGGPLKPEITVSYIAVATIFFNSGLSLKTEELTSALVHLKLHLFIQI |
| | Mus musculus | 1 | MRLLER <mark>A</mark> RKEWFMVGIVVAIGAAKLEPSVGVNGGPLKPEITVSYIAVATIFFNSGLSLKTEELTSALVH <mark>LE</mark> LHLFIQI |
| | Rattus norvegicus | 1 | ${\tt MRLLERV} RKEWF {\tt MVGIVVAIGA} a KLEPSVGV {\tt NGGPLKPEITVSYIAVATIFF} {\tt NSGLSLKTEELTSALV} {\tt KLHLF} {\tt QV} {\tt NSGLSLKTEELTSALV} {\tt KLHLF} {\tt QV} {\tt NSGLSLKTEELTSALV} {\tt NSGLSLKTETTSALV {\tt NSGLSLKTETTSALV} {\tt NSGLSLKTETTSALV {\tt NSGLSLKTETTSALV} {\tt NSGLSLKTETTSALV {\tt NSGLSLKTETTSALV {\tt NSGLSLKTETTSALV} {\tt NSGLSLKTETTSALV} {\tt NSGLSLKTEELTSALV {\tt NSGLSLKTETTSALV} {\tt NSGLSLKTTSALV} {\tt NSGLSLKTTSALV {\tt NSGLSLKTTSALV} {\tt NSGLSLKTTSALV {\tt NSGLSLKTTSALV {\tt NSGLSLKTTSALV {\tt NSGLSLKTTSALV {\tt NSGLSLKTSALV {\tt NSGLSLKTSALV {\tt NSGLSLKTSALV {\tt NSGLSLKTSALV {\tt NSGLSLKTSALV {\tt NSGLSLKTSALV {\tt NSGLSVTSCLTSALV {\tt NSGLSTSLKTSTSL$ |
| | Bos taurus | 1 | MRLLERMRKEWFM IGIVLAIAGAKLEPSIGM NGGPLKPBITVSY IAVATIFP NSGLSLATEELTSALVH KLHLFIQ I |
| | Sus scrota | 1 | MRLLERTRREWFM GIVLAIAGAKLEPS GVNGGPLRPE I TVSVI AVATI FFNSGLSIA TEELTSALVH KLHLFIQI |
| | Conic lupus fomilionis | 1 | MALLER MANNEN GIVLALAGAKLEPSVGVNGGPLAPET IVSI LAVATIFFNGGLSLA LEELI SALVHIKLALEFIQI MDI I BUDDENE GIVLALAGAKLEPSVGVNGGPLAPET MANNA IVSI LAVATIFFNGGLSLA LEELI SALVHIKLALEFIQI |
| | Folie catue | 1 | MALIDER ARKEWENIGT VIA TAGAR LEPS VOVINGE HARFET I VSI TAVAT TER NSGLSLK TEELISADVE KLIPTET V |
| | Gallus gallus | 1 | MELLER REWFTAGIAN TATAR LEPAYGYRGGPLKPEITTYIAVSAIFPNSGLSLKTEELTSALMEKKHLFVOI |
| | Danio rerio | 1 | MGL ARVRKEWFT GIVLWITFAKLOPSVGVKGGPLEPEITT TYVAVSVIFFNSGLSLKTEELASALMHVKLHEFVOT |
| | Xenopus laevis | 1 | MCLLER IRKEWFINGI IVIA AKLEPTNGVKGGPLKPEITITYIANSAIFFNSGLSLKTEELTNALMHNKLHLFNOL |
| | Homo sapiens | 79 | FTLAFFPATIWLFLQLLSITPINEWLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFNSAFGSFLGIVTTPLLLLL |
| | Mus musculus | 79 | ${\tt ftlaffpaa} iwlflolls {\tt vts} {\tt inewllkglotvgcmpppvssaviltkavggneaaaifnsafgsflgivvtpvllll$ |
| | Rattus norvegicus | 79 | ${\tt FTLAFFP} \underline{{\tt TT}} {\tt IWLFLQLLSVT} \underline{{\tt S}} {\tt INEWLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFNSAFGSFLGIVVTPVLLLL}$ |
| | Bos taurus | 79 | FTLAFFPAAVWLFLQLLSITPINEWLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFNSAFGSFLGIVVTPLLLLL |
| | Sus scrofa | 79 | $\tt FTLAFFPAAIWLFLQLLSITPINEWLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFNSAFGSFLGIVVTPLLLLL$ |
| | Equus caballus | 79 | FTLAFFPAAIWLFLQLLSITPINEWLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFNSAFGSFLGIVTPPLLLL |
| | Canis Iupus familiaris | 79 | FTLAFFPATTWLFLQLLSITPINEWLLKGLQTVGCMPPVSSAVILTKAVGCMEAAAIFNSAFGSFLGILTPLLLLL |
| | Callue callue | 79 | FILM FFFM THE DULLST FFINEHULLGUI GOUTEFFYSSAVIL I RAVGUERAATEN MARE GSFUSJVI FILLULL Dat upper a the filt of the stadt new links of any company scalar in the stade of the stade of the stade of the |
| | Danio rerio | 79 | FTI VEFDIA WI JI KUI ATTAINEWI LEGLOTVE CMPPPVSSAVI LTKAVGGNEAAA I ENSAFGSELGI VVTPLILLU |
| | Xenopus laevis | 79 | FTL <mark>V</mark> FFPTAIWLFLQVLSLTPINEWLLKGLQTV <mark>S</mark> CMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFNSAFGSFLGIVVTPLLLLL |
| | Homo sapiens | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGALSSSVLLMIIYTTFCDTFSNPNIDLDKFSL |
| | Mus musculus | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLVIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGVVSSSVLLMIIYTTFCDTFSNPNIDLDKFSL |
| | Rattus norvegicus | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLVIGQIVRRYIKDWLERKKPPFG <mark>V</mark> VSSSVLLMIIYTTFCDTFSNPNIDLDKFSL |
| | Bos taurus | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLERKQPPFGAVSSSVLLMIIYTTFCDTFSNP <mark>S</mark> IDLDKFSL |
| | Sus scrofa | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLEREKPPFGAVSSSVLLMIIYTTFCDTFSNPNFDLDKFSL |
| | Equus caballus | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAISSSVLLMIIYTTFCDTFSNPNIDLDKFSL |
| | Canis lupus familiaris | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIERKYIKDWLERKKPPFGAISSSVLIMIIYTTFCDTFSNPNIDLDKFSL |
| | Fells catus | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLENTVVPLIIGQIVKKI KDWLEKKKPFGAVSSVJJIII TTTFCDTFSNPNIDLDKFSL |
| | Danio rerio | 157 | FLGSSSSVPF151FSGLEMIVVPLI19Q1VR11FGLFFGLSSVJLMI1111FCDFFARMDUAF5 |
| | Xenopus laevis | 157 | FLGSSSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGALSSCVLLMIIYTTFCDTFSNPNIDLDTFSL |
| | Homo sapiens | 235 | VLILFIIFSIOLSFMLLTFWFSTRNNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPLLIYHPAOI |
| | Mus musculus | 235 | $\mathbf{ILILFII}^{SVQLSFMLLTF}_{FSTRNNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPLLIYHPAQI$ |
| | Rattus norvegicus | 235 | ILILFIIV <mark>S</mark> IQLSFMLLTFVFSTRNNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLIS <mark>I</mark> PLLIYHPAQI |
| | Bos taurus | 235 | LLYLFIICSIQLSFMLLTFIYSTRNNSGFTPADTVAVMFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHE <mark>Y</mark> LSLISVPLLIYHP <mark>V</mark> QI |
| | Sus scrofa | 235 | ILILF <mark>TIC</mark> SIQLSFMLLTFTFSTRNNSGFTPADTVAIMFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPLLIYHPVQI |
| | Equus caballus | 235 | IIIIFIIFSIQLSFMILTFIFSTRNNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPLLIYHPVQI |
| | Canis lupus familiaris | 235 | ILLIFIIFSIQLSFMULTFLFSTKNNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPLLIYHPVQI |
| | Callus catus | 235 | IN THE FIRST OLSEMILITE ESTRING OF TPADIVALLECTING IMILITY OF A CHARLESLISVPLLITY OF A CHAR |
| | Danio rerio | 235 | TV IT I FSTOLSEMAL HERSTSTRKSSGFFAD VALTEGSTRKSLIDGTENLKIVFAGTENLGLEVEN UDLITERGE |
| | Xenopus laevis | 235 | $vv1vf11fb1QlA \\ Fmlltflfstsknsgftpadtva1vfcsthksltlg1pmlk1vfvg2ehlsl1svpll1yhpaQ1$ |
| | Homo sapiens | 313 | LLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVKLTRPTV |
| | Mus musculus | 313 | LLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVKLTRPTV |
| | Rattus norvegicus | 313 | LLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVKLTRPTV |
| | Bos taurus | 313 | LLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVKLMRPTV |
| | Sus scrofa | 313 | LLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVKLTRPTV |
| | Equus caballus | 313 | LLGSVLVPTIKSWAVSRQKGVKLTRPTV |
| | Canis lupus familiaris | 313 | IIIGSVLVPTIKSWMVSKQKGVKIJKPTV |
| | Gallue Gallue | 313 | LLCS LVPTIKSWWSRXKUKUKU |
| | Danio rerio | 313 | Mesvil PSIK WSGROKT TPI |
| | Xenopus laevis | 313 | LLGSVLVPTIKSWMI SRQKAI KLTRQPKIPL |
| | | | |



(g)

| % identity | Homo sapiens | Mus musculus | Rattus norvegicus | Bos taurus | Sus scrofa | Equus caballus | Canis lupus familiaris | Felis catus | Gallus gallus | Danio rerio | Xenopus laevis |
|------------------------|--------------|--------------|----------------------|------------|------------|-------------------|---------------------------|-------------|---------------|-------------|-------------------|
| Homo sapiens | 100.0 | 94.6 | 94.3 | 94.0 | 95.5 | 98.2 | 97.0 | 96.7 | 88.7 | 75.6 | 87.8 |
| Mus musculus | 94.6 | 100.0 | 97.6 | 91.7 | 93.8 | 95.2 | 93.5 | 93.5 | 87.5 | 75.0 | 86.0 |
| Rattus norvegicus | 94.3 | 97.6 | 100.0 | 90.8 | 92.9 | 94.3 | 93.5 | 93.5 | 85.9 | 75.3 | 86.3 |
| Bos taurus | 94.0 | 91.7 | 90.8 | 100.0 | 95.8 | 94.9 | 93.8 | 95.5 | 84.8 | 75.3 | 84.2 |
| Sus scrofa | 95.5 | 93.8 | 92.9 | 95.8 | 100.0 | 96.7 | 95.5 | 96.1 | 87.5 | 76.2 | 86.0 |
| Equus caballus | 98.2 | 95.2 | 94.3 | 94.9 | 96.7 | 100.0 | 98.2 | 97.0 | 89.6 | 76.2 | 88.1 |
| Canis lupus familiaris | 97.0 | 93.5 | 93.5 | 93.8 | 95.5 | 98.2 | 100.0 | 97.0 | 89.0 | 75.9 | 86.9 |
| Felis catus | 96.7 | 93.5 | 93.5 | 95.5 | 96.1 | 97.0 | 97.0 | 100.0 | 88.1 | 76.8 | 87.2 |
| Gallus gallus | 88.7 | 87.5 | 86.9 | 84.8 | 87.5 | 89.6 | 89.0 | 88.1 | 100.0 | 78.9 | 92.0 |
| Danio rerio | 75.6 | 75.0 | 75.3 | 75.3 | 76.2 | 76.2 | 75.9 | 76.8 | 78.9 | 100.0 | 80.1 |
| Xenopus laevis | 87.8 | 86.0 | 86.3 | 84.2 | 86.0 | 88.1 | 86.9 | 87.2 | 92.0 | 80.1 | 100.0 |

Supplementary Fig. S2. SLC10A7 transcript variant v2. (a) Exon composition of SLC10A7 transcript variant v2. The open reading frame consists of 1023 bp and is composed of 12 coding exons. The coded protein (isoform b) consists of 340 amino acids and is regarded as the full-length SLC10A7 reference protein. (b) Exon-intron organization of the human SLC10A7 gene coding for SLC10A7 transcript variant v2. Lengths of all exons and introns are provided in addition to the nucleotide sequences at the exon/intron boundaries. Exon sequences are shown in uppercase, intron sequences in lowercase letters. (c) Schematic membrane topology model of the human SLC10A7 protein isoform b with ten transmembrane domains (TMDs) encoded by the 12 exons. The N- and C-terminal ends are both located intracellularly. Numbers indicate the amino acid positions at the beginning and end of each TMD. (d) Side and top view of a 3D homology model of human SLC10A7 isoform b. The SLC10A7 protein sequence with GenBank accession Number NP 001025169 was used as a target sequence for the SWISS-MODEL tool⁴. The model was calculated based on the template of ASBT from Yersinia frederiksenii (PDB: 4n7w)⁵. (e) Alignment of homologous SLC10A7 proteins from different species. The sequences correspond to the following GenBank Accession Numbers: NP 001025169.1 (human), NP 084012.1 (mouse), NP 001010948.1 (rat), XP 010812021.2 (cattle), NP 001131112.1 (swine), XP 001501868.1 (horse), XP 855172.2 (dog), XP 003985015.1 (cat), XP 015131664.1 (chicken), NP 001003420.1 (zebrafish), and NP 001080729.1 (African clawed frog). (f) Sequence distance and phylogenetic relationship of selected members of the SLC10 carrier family from different species. (g) Distance table of homologous SLC10A7 proteins from different species, showing the percent identity.

SLC10A7 transcript variant 4



Supplementary Fig. S3. SLC10A7 transcript variant v4. (a) Exon composition of SLC10A7 transcript variant v4. The open reading frame consists of 1077 bp and is composed of 12 coding exons. The coded protein (isoform d) consists of 358 amino acids and differs from isoform b only in the C-terminal sequence that is coded by an alternative exon 11'. Exon 12 is non-coding in SLC10A7 transcript variant v4. (b) Exon-intron organization of the human *SLC10A7* gene coding for SLC10A7 transcript variant v4. Lengths of all exons and introns are provided in addition to the nucleotide sequences at the exon/intron boundaries. Exon sequences are shown in uppercase, intron sequences in lowercase letters. (c) Protein alignment of SLC10A7 isoform b and d. Both proteins only differ in their C-terminal amino acids. (d) Schematic membrane topology model of human SLC10A7 isoform d with ten TMDs encoded by exons 1-11 and 11'. The N- and C-terminal ends are both located intracellularly. Numbers indicate the amino acid positions at the beginning and end of each TMD.



Supplementary Fig. S4. Full-length gels corresponding to Fig. 6. Expression pattern of SLC10A7 transcript variants v2 and v4 in different human tissues. Expression analysis was performed on a commercial major human tissue cDNA panel with primers theoretically allowing amplification of different SLC10A7 transcript variants. Primers were designed to bind at exon boundary 3/4 (forward) and at exon 12 (reverse). Amplicons were separated on a 2.5% agarose gel. Individual bands were excised from the gel and subjected to DNA sequencing. Only SLC10A7 transcript variants v2 (amplicon size: 807 bp) and v4 (amplicon size: 918 bp) were detected. The smaller band at 589 bp revealed to be unspecific and corresponds to homo sapiens ubiquitin specific peptidase 7 (USP7), transcript variant 3 (GenBank Accession Number NM_001286458).

References

- Ashikov, A. *et al.* Integrating glycomics and genomics uncovers SLC10A7 as essential factor for bone mineralization by regulating post-Golgi protein transport and glycosylation. *Hum Mol Genet* 27, 3029-3045 (2018).
- Dubail, J. *et al.* SLC10A7 mutations cause a skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta mediated by GAG biosynthesis defects. *Nat Commun* 9, 3087 (2018).
- Laugel-Haushalter, V. *et al.* A New SLC10A7 Homozygous Missense Mutation Responsible for a Milder Phenotype of Skeletal Dysplasia With Amelogenesis Imperfecta. *Front Genet* 10, 504 (2019).
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22(2), 195-201 (2006).
- Zhou, X. et al. Structural basis of the alternating-access mechanism in a bile acid transporter. *Nature* 505(7484), 569-573 (2014).





Functional Analysis of Rare Genetic Variants in the Negative Regulator of Intracellular Calcium Signaling RCAS/ SLC10A7

Marie Wannowius, Emre Karakus and Joachim Geyer*

Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

The solute carrier family 10 member SLC10A7 is a negative regulator of intracellular calcium signaling (RCAS). In cell culture, SLC10A7 expression is negatively correlated with store-operated calcium entry (SOCE) via the plasma membrane. SLC10A7-deficient cells have significantly increased calcium influx after treatment with thapsigargin for depletion of ER calcium stores, whereas SLC10A7/RCAS overexpression limits calcium influx. Genetic variants in the human SLC10A7 gene are associated with skeletal dysplasia and amelogenesis imperfecta and reveal loss of function on cellular calcium influx. More recently, an additional disease-related genetic variant (P303L) as well as some novel genetic variants (V235F, T221M, I136M, L210F, P285L, and G146S) have been identified. In the present study, these variants were expressed in HEK293 cells to study their subcellular localization and their effect on cellular calcium influx. All variants were properly sorted to the ER compartment and closely co-localized with the STIM protein, a functional component of SOCE. The variants P303L and L210F showed significantly reduced effects on cellular calcium influx compared to the wild type but still maintained some degree of residual activity. This might explain the milder phenotype of patients bearing the P303L variant and might indicate disease potential for the newly identified L210F variant. In contrast, all other variants behaved like the wild type. In conclusion, the occurrence of variants in the SLC10A7 gene should be considered in patients with skeletal dysplasia and amelogenesis imperfecta. In addition to the already established variants, the present study identifies another potential disease-related SLC10A7/RCAS variant, namely, L210F, which seems to be most frequent in South Asian populations.

Keywords: SLC10A7, RCAS, calcium signaling, STIM, co-localization, rare genetic variant

INTRODUCTION

Calcium (Ca²⁺) is one of the most important regulatory ions of eukaryotic cells and is involved in many physiological and cellular processes. The concentration of free Ca²⁺ ions is much higher in the extracellular than in the intracellular compartment. In addition, Ca²⁺ is sequestered in the endoplasmic and sarcoplasmic reticulum (ER/SR), from where it can be released for rapid cellular signaling (Fahrner et al., 2018). In response to ER calcium depletion, store-operated calcium entry (SOCE) is activated and allows Ca²⁺ to enter cells via the plasma membrane (Fahrner et al., 2018). The stromal interaction molecule STIM and ORAI (named for the keeper of the gates to heaven in Greek

OPEN ACCESS

Edited by: Cesare Indiveri, University of Calabria, Italy

Reviewed by:

Michele Visentin, University Hospital Zürich, Switzerland Qian Chen, University of Toledo, United States

*Correspondence:

Joachim Geyer Joachim.M.Geyer@vetmed.unigiessen.de

Specialty section:

This article was submitted to Cellular Biochemistry, a section of the journal Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 15 July 2021 Accepted: 15 September 2021 Published: 04 October 2021

Citation:

Wannowius M, Karakus E and Geyer J (2021) Functional Analysis of Rare Genetic Variants in the Negative Regulator of Intracellular Calcium Signaling RCAS/SLC10A7. Front. Mol. Biosci. 8:741946. doi: 10.3383/fmolb.2021.7141946

mythology; Feske et al., 2006) are the major functional components of SOCE. STIM, with its Ca2+ binding domain (EF hand) in the luminal side of the ER, represents a \tilde{Ca}^{2+} sensor (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005; Stathopulos et al., 2008). When the concentration of Ca2+ in the ER is decreased by IP3-induced Ca2+ release, Ca2+ dissociates from the EF hand of the STIM molecule (Woo et al., 2018). Subsequently, STIM is translocated to so-called ER-PM junctions near the plasma membrane, where it interacts with ORAI (Fahrner et al., 2018). ORAI is localized in the plasma membrane and after interacting with STIM allows Ca2+ influx into the cell (Stathopulos et al., 2008). The ER/SR Ca2+-ATPase SERCA, which is specifically located in the ER membrane, is then responsible for refilling the ER Ca2+ stores (Krebs et al., 2015). Once the Ca2+ stores of the ER are refilled, STIM dissociates from ORAI, and Ca²⁺ influx into the cell via this calcium release activated channel (CRAC) is terminated (Fahrner et al., 2018).

Recently, we identified a novel negative regulator of intracellular Ca²⁺ signaling, namely RCAS. RCAS (gene symbol: SLC10A7) belongs to the solute carrier family 10 of bile acid and steroid sulfate membrane transporters (Karakus et al., 2020). In cell culture, SLC10A7/RCAS expression was negatively correlated with calcium influx via the plasma membrane (Karakus et al., 2020). SLC10A7-deficient cells had significantly increased Ca2+ influx after treatment with thapsigargin (TG), ionomycin, and ATP/carbachol treatment, which are commonly used for depletion of ER Ca2+ stores. Furthermore, SLC10A7-deficient cells showed significantly higher intracellular Ca2+ levels. In contrast, SLC10A7/RCAS overexpression significantly reduced the Ca2+ influx, clearly pointing to a role of the SLC10A7/RCAS protein as negative regulator of intracellular calcium signaling. However, the exact molecular function of SLC10A7/RCAS as a transporter or regulator molecule is still not clear. However, there are several hypotheses about its function. (I) SLC10A7 might limit the transport capacity of SERCA or might increase the rate of Ca2+ leaking from the ER. (II) SLC10A7 might negatively regulate STIM and/or ORAI, e.g., by affecting the sensitivity of STIM to Ca2+, or by decreasing the probability of ORAI opening. (III) SLC10A7/RCAS might also play a role for STIM-ORAI complex formation or the stability of this complex at the plasma membrane (Karakus et al., 2020).

In three independent studies, mutations in the human SLC10A7 gene were associated with a severe disease phenotype characterized by skeletal dysplasia with short stature, osteoporosis, amelogenesis imperfecta, skeletal deformations, facial abnormalities, visual and hearing impairment, and intellectual disability (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019). Supporting this observation, in one study Slc10a7 knockout mice showed similar phenotypic characteristics as human patients with SLC10A7 mutations, including abnormal skeletal development and dental anomalies (Dubail et al., 2018). In addition, studies in zebrafish with slc10a7 morpholino knockdown have shown defective bone mineralization, which leads to the hypothesis that SLC10A7/ RCAS plays an essential role in cartilage formation and bone development (Ashikov et al., 2018). Moreover, biochemical analyses of patients with SLC10A7 gene mutations have revealed abnormal N-glycosylation of the plasma protein transferrin as well as mislocalization and defective post-Golgi transport of glycoproteins (Ashikov et al., 2018). Although not proven yet, these effects might be due to dysregulation of the Ca²⁺ homeostasis under *SLC10A7* mutation.

Several SLC10A7 mutations previously described to be associated with human pathologies have been functionally analyzed for their effect on Ca2+ signaling after treatment with TG in cell culture (Karakus et al., 2020). These include the splice-site mutations c.774-1G > A (leading to the skipping of exons 9 and 10 or only exon 10) and c.773 + 1G > A and c.722-16A > G (both leading to the skipping of exon 9) as well as the missense mutations c.388G > A (G130R), c.221T > C (L74P), and c.335G > A (G112D) (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019). Compared to the wild-type SLC10A7 construct, none of these mutants had a significant effect on Ca2+ signaling, thus indicating a loss-offunction phenotype (Karakus et al., 2020). The exception is the mutant G112D, which has a moderate but significant residual function. In contrast, the missense mutation P303L described more recently (Laugel-Haushalter et al., 2019) has not been functionally analyzed so far. In addition, several rare missense genetic variants with different rates of occurrence in specific ethnic groups have been identified in the SLC10A7 gene. These variants could also affect the function of the RCAS protein based on bioinformatics analyses.

Therefore, the aim of the present study was to functionally characterize these missense SLC10A7 genetic variants by measuring SOCE in HEK293 cells transfected with the respective variants. Among six novel genetic SLC10A7 variants, the present study identified the variant L210F that is most frequent in South Asian populations as a novel potential disease-related SLC10A7/RCAS variant.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Unless otherwise stated, all chemicals, including TG (T9033) and probenecid (P8761), were from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Fluo-4 AM (F14201) was purchased from Thermo Scientific (Waltham, MA, United States). Ca²⁺-free HEPES buffer was prepared as follows: NaCl 140 mM, KCl 4 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 1 mM, and glucose 25 mM (pH 7.4).

Cell Culture

GripTite 293 MSR cells (hereafter, "HEK293 cells") were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Carlsbad, CA, United States) supplemented with 10% fetal calf serum (Pan-Biotech, Aidenbach, Germany), 1% Minimum Essential Medium of Non Essential Amino Acids (Gibco), L-glutamine (4 mM; Anprotec, Bruckberg, Germany), penicillin (100 U/mL; Anprotec), and streptomycin (100 µg/ ml; Anprotec) at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity.

Generation of Fluorescence Constructs

C-terminally mScarlet-tagged constructs for STIM1, ORAI1, and SERCA2b were generated as reported previously for SLC10A7

 TABLE 1 | Flexible linker amino acid sequences inserted between the corresponding protein and the mScarlet fluorescence tag in the pcDNA3.1 (+) vector.

| Flexible linker amino acid sequence |
|-------------------------------------|
| GGGGSGGGGGGGGG |
| SGGGGSGGGSGGGGS |
| SGGGGSGGGSGGGGS |
| SGGGGSGGGGGGGGG |
| |

transcription variant v2 (hereafter, "SLC10A7/RCAS wild-type (WT)"; Noppes et al., 2019). Flexible linker protein sequences (see Table 1) followed by the cDNA sequence coding for the monomeric red fluorescent protein mScarlet were added virtually to the constructs via DNASTAR 16.0 SeqBuilder Pro and were synthesized by Biocat (Heidelberg, Germany) into the pcDNA3.1 (+) expression vector. The C-terminally GFP-tagged STIM1 transcript variant 2 plasmid was generated by amplifying the STIM1 sequence out of HEK293 cDNA using Phusion Flash PCR Master Mix (F-548; Thermo Scientific) with the following primers: 5'-acc atg gat gta tgc gtc cgt ctt gcc ctg t-3' forward and 5'-ctt ctt aag agg ctt ctt aaa gat ttt gag ggg aaa ctt ctt ccg-3' reverse. PCR amplification was performed on a peqSTAR XS PEQLAB PCR cycler for 27 cycles under the following conditions: initialization for 10 s at 98°C, denaturation for 1 s at 98°C, annealing for 15 s at 62°C, extension for 150 s at 72°C, final elongation for 1 min at 72°C, and a final hold at 4°C. After amplification, the PCR product was separated by 1% agarose gel electrophoresis and the appropriate band was excised and purified with a GeneJET PCR Purification Kit (#K0702; Thermo Scientific). Subsequently, the product was A-tailed with dATP nucleotides and Taq DNA Polymerase (#EP0402; Thermo Scientific) for 150 min at 72°C. Then the product was cloned into pcDNA6.2/C-EmGFP-Gw/TOPO Cloning Vector (Thermo Scientific) and immediately transformed into TOP10 chemically competent Escherichia coli (E. coli). Grown colonies were picked and plasmids were isolated with the GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. Finally, the generated STIM-GFP was verified by DNA sequencing (Seqlab Microsynth).

Site-Directed Mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed to create the described point mutations in SLC10A7-v2-mScarlet (in pcDNA3.1 (+) vector). Forward and reverse primers were designed and are listed in Table 2. Amplification was performed on a peqSTAR XS PEQLAB PCR cycler with Pfu DNA Polymerase (M774A; Promega, Madison, WI, United States) at 18 cycles under the following conditions: initial denaturation for 2 min at 95°C, denaturation for 30 s at 95°C, annealing for 1 min at 55°C, extension for 8.5 min at 72°C, final elongation for 10 min at 72°C, and a final hold at 4°C. After amplification, products were digested with DpnI enzyme (ER1701; Thermo Scientific) for 1 h at 37°C and transformed into TOP10 chemically competent E. coli. Plasmids were isolated with a GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol, and the generated point mutations were verified by DNA sequencing (Seqlab Microsynth).

Calcium Imaging

For Ca²⁺ imaging, HEK293 cells (6.0×10^4 per well) were seeded into 96-well plates (83.3924; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) coated with poly-L-lysine. Then 6 h after seeding, the cells were transiently transfected with 0.5 µg SLC10A7-mScarlet WT or mutant plasmid DNA with Lipofectamine 2000 (11668-019; Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) according to the manufacturer's protocol. After 40 h of culturing, the medium was replaced with fresh serum-free medium for 2 h. Subsequently, the cells were incubated in Ca2+-free HEPES buffer containing 2 µM Fluo-4 AM and 1 mM probenecid for 15 min at room temperature. Afterward, the cells were washed gently three times with Ca2+-free HEPES buffer and incubated for an additional 15 min to allow complete de-esterification of intracellular AM esters. Then the cells were incubated with 1 µM TG at room temperature. After 5 min of treatment with TG basal fluorescence was recorded for 1 min with a DM5500 Leica fluorescent microscope (200-fold magnification, green [488 nm] and red [568/594 nm] filter sets; Leica, Wetzlar, Germany). After these 60 s, 2 mM Ca²⁺ (5239.2; Roth, Karlsruhe, Germany) was added and Ca2+-induced fluorescence was recorded every 10 s for an additional minute. The fluorescence signal was determined with LAS-X (Leica Application Suite X;

| Amino acid substitution | Nucleotide | Primer sequences (5' $ ightarrow$ 3') | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------|--|---------|--|---------|--|--|--|--|
| | substitution | Forward | Tm (°C) | Reverse | Tm (°C) | | | | |
| V235F | $GTT \to TTT$ | aattcagcctttttctcatactgtt | 54 | tatccaggtcaatatttgggttaga | 55 | | | | |
| T221M | $ACG \rightarrow ATG$ | cattetgtgacatgttetetaacce | 57 | ttgtgtagatgatcatgaggagtac | 55 | | | | |
| 1136M | $ATA \rightarrow ATG$ | ggcagctgcaatgtttaattcagcc | 62 | tcatttccaccaactgccttggtta | 61 | | | | |
| L210F | $CTC \rightarrow TTC$ | agcagcagtgtattcctcatgatca | 60 | gatagcaccaaaaggaggcttcttt | 59 | | | | |
| P285L | $CCG \rightarrow CTG$ | ccttacattgggaattctgatgctgaagatcgt | 73 | caaacacgatcttcagcatcagaattcccaatg | 73 | | | | |
| | | gtttg | | taagg | | | | | |
| G146S | $GGC\toAGC$ | ggaagttttttgagcatcgttataa | 53 | aaaggctgaattaaatattgcagct | 55 | | | | |
| P303L | $CCC \rightarrow CTC$ | taatatctgtactcttgctcatctacc | 55 | aagagagatgctcatggcct | 58 | | | | |
| Q172* | $CAG \rightarrow TAG$ | catctattttttcttagctttttatgactg | 52 | tgaaaggcacagaagaagatg | 54 | | | | |
| L74P | $CTT\toCCT$ | ggtgcatctaaaactgcatccttttattcagatctt tactcttgcattcttcccag | 76 | ctgggaagaatgcaagagtaaagatctgaataaaag gatgcagttttagatgcacc | 76 | | | | |

Leica) for approximately 80 defined regions of interest of single cells. Data are presented as the mean background-subtracted fluorescence intensity of each cell normalized to the intensity of the first image (F/F0).

Fluorescence Microscopy

For co-localization studies, HEK293 cells $(1.0 \times 10^4 \text{ per well})$ were seeded into 8-well µ-slides (80826; IBIDI, Gräfelfing, Germany) coated with poly-L-lysine. Then 6 h after seeding, the cells were transiently transfected with 1 µg plasmid DNA (0.5 µg GFP construct and 0.5 µg mScarlet construct) with Lipofectamine 2000 (11668-019; Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After 40 h of culturing, the cells were washed with PBS and incubated with or without 2 µM TG for 10 min at 37°C. Subsequently, the cells were washed with PBS three times and fixed with 3% PFA (0335.1; Roth) for 20 min at room temperature. Thereafter, the cells were washed and loaded with 200 µL PBS per well. Z-stack cell imaging of approximately 50 single cells per well was performed as described below. For co-localization with green fluorescent organelle markers, cells were seeded and transiently transfected as described above, except only 0.5 µg mScarlet construct (SLC10A7-/STIM1-/ORAI1-/SERCA2b-mScarlet) were used for Lipofectamine 2000 transfection. After 24 h of culturing, the cell medium was changed and approximately 30 particles per cell CellLight Reagent BacMam 2.0 (Invitrogen) containing a signal peptide fused to emerald GFP were added to allow expression in the following compartments: ER (C10590), late endosomes (C10588), lysosomes (C10596), early endosomes (C10586), Golgi (C10592), peroxisomes (C10604), and mitochondria (C10600). After 16 h of culturing, the cells were washed with PBS and fixed as described above. Then Z-stack cell imaging of approximately 5-48 single cells per well was performed. All co-localization studies were performed at room temperature on an inverted Leica DM5500 fluorescence microscope (Leica). Images were generated using a 63 × oil objective and green (488 nm) and red (568/594 nm) filter sets, respectively. The Z-stack (9.5 µm size) of single cells was recorded. Subsequently, Pearson's correlation coefficients (PCC) were calculated with the LAS-X imaging software.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the Student's t-test and one-way ANOVA in GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). Error bars represent means ± SD. The number of samples, number of experimental repetitions, and significance level are indicated in the figure legends.

RESULTS

The Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1.1, https:// gnomad.broadinstitute.org) lists more than 650 genetic variants for the human *SLC10A7* gene. From these we filtered out the 540 variants that occur in exon sequences and further selected 140 missense variants (**Supplementary Table S1**). To improve the quality of the data and to avoid taking data from sequencing errors, we kept only those variants with an allele count >3. Then, we cut off the number of alleles at 50 to exclude relatively frequent variants. Of the 29 remaining variants, only six were predicted to affect protein function based on SIFT (https://sift.bii.a-star.edu. sg) and PolyPhen (https://genetics.bwh.harvard.edu) predictions, and these variants (V235F, T221M, I136M, L210F, P285L, and G146S) were experimentally analyzed in the present study (Table 3). The variants were distributed over the whole SLC10A7/RCAS protein, as indicated in 2D and 3D models (Figures 1A,B). They had overall allele counts of 4-42, and minor allele frequencies ranged from 0.0016% (G146S) to 0.0168% (V235F) (Table 4). It is interesting that all variants had different occurrences in specific ethnic groups. Most pronounced in this regard were the dominant allele counts of the V235F variant among Ashkenazi Jews (Figure 1C). In addition, three variants (Q172*, P303L, and L74P) were included that were previously associated with a disease phenotype (Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019). Data on minor allele frequency are not available for these variants.

To functionally characterize these variants, we measured Ca2+ influx in transfected HEK293 cells as done before for the diseaserelated L74P, G112D, G130R, exon $\Delta 9$, exon $\Delta 10$, and exon $\Delta 9 +$ 10 variants (Karakus et al., 2020). As variations in amino acids may change the sorting and/or functional properties of a protein, both processes were analyzed. We first examined whether the SLC10A7/RCAS variant proteins were sorted in the same way as the WT. Therefore, red fluorescent SLC10A7-mScarlet-tagged constructs were generated and transfected into HEK293 cells. In addition, different cell organelles were labeled with respective GFP-tagged marker proteins. As indicated in Figure 2A, the SLC10A7/RCAS protein mostly localized to the ER compartment, as indicated by the very high degree of fluorescence overlay. In addition, co-localization of the SLC10A7-mScarlet protein was detected with the organelle markers for late endosomes, lysosomes, early endosomes, and the Golgi compartment, whereas SLC10A7 showed hardly any signals in peroxisomes and mitochondria (Figure 2A). However, it has to be emphasized that for some organelle markers the expression rates were quite low and so only small numbers of cells could be analyzed for cofluorescence. To estimate the degree of co-fluorescence, we calculated PCC (Figure 2B), which revealed the highest values for the ER compartment. In addition to SLC10A7-mScarlet, mScarlet-tagged constructs were generated for STIM, ORAI, and SERCA. It is interesting that, STIM-mScarlet (Figures 2C,D) and SERCA-mScarlet (Supplementary Figures S1A,B) showed an even higher degree of co-localization with the green fluorescent ER marker, with PCC values at about 0.86. In contrast, ORAI appeared weakly in the ER but was clearly detected in the plasma membrane, as expected (Figures 2C,D). Next co-localization of the SLC10A7-mScarlet construct with STIM-GFP was analyzed and revealed quite high PCC values of 0.65 that were significantly reduced after the cells were treated with TG to deplete Ca²⁺ stores in the ER (Figures 2E,F). This can be explained by the well-known translocation of STIM after TG treatment. In parallel, colocalization of STIM-GFP and SERCA-mScarlet decreased significantly after treatment with TG, but PCC values for

TABLE 3 GnomAD selection algorithm for the selection of SLC10A7 rare genetic variants.

| Selection steps for SLC10A7 rare genetic variants in the gnomAD v2.1.1 online tool | Hit number |
|--|--|
| Total number of gnomAD v2.1.1 variants for SLC10A7 | 658 |
| Variants in coding exons | 540 |
| Variants in coding exons that were missense variants | 140 |
| Variants in coding exons that were missense variants and had an allele count from >3 but <50 | 29 |
| Variants in coding exons that were missense variants and had an allele count from >3 but <50 and were predicted to affect protein function by SIET analysis tool | 7 |
| Variants in coding exons that were missense variants and had an allele count from >3 but <50 and were predicted to affect protein function by SIFT analysis tool and by Polyphen prediction software. | 6 (V235F, T221M, I136M, L210F, P285L, G146S) |



FIGURE 1 SLD IUA/ rare genetic variants predicted to be damaging or possibly damaging. (4) Schematic membrane topology model of the numan SLC IUA/ RCAS protein isoform b with its 10 transmembrane domains (TMDs). This protein is coded by 12 exons, as indicated by alternating dark blue (exons 1, 3, 5, 7, 9, 11) and light blue (exons 2, 4, 6, 8, 10, 12) labeling. The N- and C-terminal ends are both located inside the cell. Numbers indicated by alternating and end of each TMD. Arrows show the localization of the nine SLC10A7 variants investigated here. (B) Side and top views of a 3D homology model of the human SLC10A7/RCAS protein. Variants are highlighted in red. The protein sequence with GenBank Accession No. NP_001025169 was used as a target sequence for SWISS-MODEL homology modeling (https://swissmodel.expasy.org). The homology model is based on the crystal structure of ASBT from Yersinia frederiksenii (PDB: 4n7w; Drou et al., 2014) (C) Graphical representation of the variant allele counts in different ethnicities.

STIM-GFP and ORAI-mScarlet co-localization increased, nicely reflecting the translocation of STIM toward the plasma membrane to form the STIM-ORAI complex that ultimately supports SOCE (**Supplementary Figures S2A,B**). To analyze whether the relatively large mScarlet tag would affect the sorting of the SLC10A7/RCAS protein, we used the small FLAG epitope as an additional tag to localize the protein. Coexpression of SLC10A7-mScarlet with the SLC10A7-FLAG construct revealed a very high degree of overlay, indicating identical sorting of these two proteins (data not shown). Based on these preliminary experiments, the sorting and localization of the SLC10A7 variants were analyzed compared to the WT SLC10A7/RCAS protein. As a marker for proper sorting and intact response to treatment with TG, we used the co-localization of the respective SLC10A7-mScarlet construct with the STIM-GFP construct in the presence and absence of TG (**Figure 3A**). Whereas the SLC10A7 variants V235F, T221M, 1136M, L210F, P285L, and G146S showed degrees of co-localization with STIM comparable to those of the WT SLC10A7/RCAS protein, the disease-related variants P303L

TABLE 4 Overview of the analyzed SLC10A7 variants and their predicted effects on protein function. Minor allele frequencies are indicated. The last three variants listed were described in earlier studies (Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019). L74P served as a control in the present study, and P303L has not yet been functionally characterized.

| SNP | Nucleotide position | Nucleotide substitution | Amino acid substitution | PolyPhen prediction | SIFT prediction | Allele count | Minor allele frequency (%) |
|--------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|
| rs148698801 | 703 | $GTT \to TTT$ | V235F | possibly | affected protein | 42 | 0.0168 |
| | | | | damaging | function | | |
| rs201501147 | 662 | $ACG\toATG$ | T221M | probably | affected protein | 12 | 0.0048 |
| | | | | damaging | function | | |
| rs145454109 | 408 | $ATA \rightarrow ATG$ | 1136M | probably | affected protein | 7 | 0.0031 |
| | | | | damaging | function | | |
| rs764016906 | 628 | $CTC \rightarrow TTC$ | L210F | probably | affected protein | 6 | 0.0024 |
| | | | | damaging | function | | |
| rs775994807 | 854 | $CCG \rightarrow CTG$ | P285L | probably | affected protein | 4 | 0.0017 |
| | | | | damaging | function | | |
| rs758419384 | 436 | $GGC\toAGC$ | G146S | probably | affected protein | 4 | 0.0016 |
| | | | | damaging | function | | |
| | | | | | | Patient | variant described by |
| _ | 908 | CCC → CTC | P303L | probably | affected protein | Laugel-Ha | aushalter et al. (2019) |
| | | | | damaging | function | 0 | |
| rs1376082145 | 514 | $CAG \rightarrow TAG$ | Q172* | - | - | Dubail et | al. (2018) |
| rs1560980659 | 221 | $CTT \rightarrow CCT$ | L74P | probably | affected protein | Dubail et | al. (2018) |
| | | | | damaging | function | | |

and L74P had significantly higher PCC values for co-localization with STIM-GFP. However, after treatment with TG, all variants decreased equally in their co-localization with STIM, with ratios of 1.2–1.3 for all constructs (**Figure 3B**). Note that the Q172* variant was not properly expressed in HEK293 cells, and therefore this variant could not be analyzed further.

Finally, all SLC10A7-mScarlet constructs were transiently transfected into HEK293 cells and used to measure Ca²⁺ influx in cells preloaded with Fluo-4 AM and pretreated with TG. Extracellular Ca²⁺ was added at a concentration of 2 mM, and red (mScarlet) and green (Fluo-4) fluorescence was recorded every 10 s for 1 min. As reported before, overexpression of the SLC10A7-mScarlet WT construct significantly limited Ca2+ influx, with a ratio of 1.7 (Karakus et al., 2020). Red fluorescence was used to discriminate between SLC10A7expressing and non-expressing cells and to compare the expression of the respective mScarlet-tagged protein (Figure 4A). Apart from the WT SLC10A7/RCAS protein, the SLC10A7 variants previously described to be associated with human pathologies, namely, L74P and P303L, were functionally analyzed in HEK293 cells. Both constructs revealed expression of the red fluorescent SLC10A7-mScarlet protein at levels comparable to those of the WT, as indicated by red bars. However, both variants significantly lost their effect on Ca2+ influx. In the case of the L74P variant, the effect on Ca2+ influx was completely abrogated, which indicates a complete loss of function, as expected. The P303L variant had only a moderate effect on Ca2+ influx (Figure 4B) and compared to the WT this effect was significantly reduced (Figure 4C). The same was true for the novel variant L210F, which maintained less than 50% of the function of the WT SLC10A7 construct, which suggests a disease potential of the corresponding rs764016906 SLC10A7 rare genetic variant, at least in a biallelic constellation with another disease-related SLC10A7 variant. In contrast, all other novel SLC10A7 variants, namely, V235F, T221M, 1136M, P285L, and G146S, showed effects on Ca^{2+} influx (ratios 1.6–1.9) and protein expression comparable to those of the WT SLC10A7 protein (**Figures 4B,C**).

DISCUSSION

SLC10A7/RCAS Overexpression Restricts the Ca²⁺ Influx After TG-Induced ER Depletion

The store-operated Ca2+ entry (SOCE) with its major components STIM and ORAI is a central mechanism in cellular Ca2+ signaling. Several regulatory factors of the STIM/ ORAI complex have been described, including the CRAC channel regulator 2A (CRACR2A; Srikanth et al., 2010) and the SOCEassociated regulatory factor (SARAF; Palty et al., 2012). Recently, with SLC10A7/RCAS we identified an additional novel regulatory factor of the intracellular Ca2+ signaling (Karakus et al., 2020). Expression of the SLC10A7/RCAS protein was negatively correlated with SOCE and after transient transfection of SLC10A7/RCAS into HEK293 cells, we found co-localization with STIM, ORAI, and SERCA. Based on this, we hypothesize a role of SLC10A7/RCAS (I) in limiting the transport capacity of SERCA or (II) as a negative regulator of STIM and/or ORAI. These hypotheses about the molecular mechanism of SLC10A7/ RCAS on cellular Ca2+ signaling have to be addressed in future studies. For the present study, we just used our previous finding that SLC10A7/RCAS overexpression restricts the Ca2+ influx after TG-induced ER depletion in HEK293 cells to functionally analyze the effect of several novel genetic variants of SLC10A7



FIGURE 2 | Cellular localization of the SLC10A7/RCAS protein and its co-localization with STIM and ORAI. (A) Co-localization of the SLC10A7-mScarlet construct (red fluorescence) with the indicated organelle markers (green fluorescence). Images represent maximum projections of Z-stacks at 630 x magnification after deconvolution. (B) Graphical representation of the co-fluorescence between SLC10A7-mScarlet and ER (n = 33), late endosomes (n = 19), lyosomes (n = 5), early endosomes (n = 8), Golgi (n = 15), peroxisomes (n = 17), and mitochondria (n = 19), expressed as Pearson's correlation coefficient (PCO). Each dot represents the PCC of a single cell. Numbers in brackets indicate the number of cells analyzed. (C) Co-localization of the mScarlet-tagged STIM, ORAI, and SLC10A7 constructs with the GFP-tagged ER organelle marker. Images represent maximum projections of Z-stacks at 630 x magnification after deconvolution (D) Graphical representation of the (*Continued*)

7

FIGURE 2| co-fluorescence between the green fluorescent ER marker and the mScarlet-tagged STIM, ORAI, and SLC10A7/RCAS proteins, respectively, expressed as PCC. Each dot represents the PCC of a single cell. In total, 39 cells were analyzed for STIM, 27 for ORAI and 48 for SLC10A7. (E) Representative fluorescence images showing STIM-GFP/SLC10A7-mScarlet co-localization before (upper pictures) and after (lower pictures) treatment with thapsigargin (TG). Images represent maximum projections of Z-stacks at 630 x magnification after deconvolution. (F) Graphical representation of the co-fluorescence between STIM-GFP and SLC10A7mScarlet, expressed as PCC before (-TG) and after (+TG) treatment with TG. Each dot represents the PCC of a single cell. In total, 37 (-TG) and 43 (+TG) single cells were analyzed. Data means ± SD are indicated with lines for a representative experiment. * Significantly different from all other groups at *p* < 0.05. Scale bars: 25 µm.

and to predict their disease potential. In detail, the effects of two known disease-related SLC10A7 variants (L74P and P303L) and six novel potentially disease-related variants (V235F, T221M, I136M, L210F, P285L, and G146S) were analyzed. We first examined whether these variant proteins are sorted as the WT SLC10A7/RCAS protein, and then we determined their effects on SOCE.

Subcellular Localization of SLC10A7/RCAS

The SLC10 carrier family currently consists of seven members, three of which are expressed in the plasma membrane, where they perform carrier-mediated uptake of bile acids (NTCP/SLC10A1 and ASBT/SLC10A2) and sulfated steroid hormones (SOAT/ SLC10A6) (Geyer et al., 2006). All other SLC10 members (SLC10A3-A5 and SLC10A7) are dominantly expressed in intracellular structures, and their sorting behavior depends significantly on the cell line used for expression and the tag used for detection. Unfortunately, appropriate antibodies that would allow detection of native untagged SLC10 proteins are not available for most of these intracellularly expressed carriers, except for SLC10A4, which is localized in synaptic vesicles of cholinergic and monoaminergic neurons of the central and peripheral nervous systems in rats (Geyer et al., 2008; Burger et al., 2011). Therefore, sorting studies for the SLC10A7/RCAS protein still require the use of tagged protein constructs. In a previous study, we used a red fluorescent mScarlet-tagged SLC10A7 construct that had significant effects on SOCE after transient transfection into HEK293 cells (Karakus et al., 2020). The same construct was also used for the sorting and Ca²⁺ influx experiments in the present study. In subsequent co-localization studies of SLC10A7-mScarlet and STIM-GFP we found a high degree of overlay, which indicates that large part of the SLC10A7/ RCAS protein is localized in the ER in close proximity to STIM. However, it should be mentioned that previous studies found different sorting of the SLC10A7/RCAS protein. Using different FLAG- and HA-tagged SLC10A7 constructs, Godoy et al. (2007) demonstrated that part of the SLC10A7 protein was co-localized with calnexin in the ER, whereas a fraction of the protein was also detected in the plasma membrane. Also, the SLC10A7/RCAS homolog CaRch1p of Candida albicans is at least partly localized in the plasma membrane (Alber et al., 2013). The latter localization was verified by the expression of a SLC10A7-FLAG construct in Xenopus laevis oocytes (Godoy et al., 2007). In another study, a V5-tagged SLC10A7 construct showed clear intracellular localization in U2OS cells (Bijsmans et al., 2012). Also, Arshikov et al. (2018) used a V5-tagged SLC10A7 construct to localize the SLC10A7 protein and found expression in the Golgi compartment in HeLa cells. They also demonstrated a Golgi localization of the SLC10A7/RCAS protein in human fibroblasts after lentiviral transfection of a V5-SLC10A7 construct (Ashikov et al., 2018). Based on this, the exact subcellular localization of the SLC10A7/RCAS protein requires further investigation with appropriate antibodies that allow sorting studies with untagged native proteins in different cell lines and under different experimental conditions.

In the present study, great effort was made to localize the SLC10A7-mScarlet construct that previously showed intact function as a regulator of cellular Ca2+ influx. We examined the co-localization of mScarlet-tagged SLC10A7/RCAS and GFPtagged organelle markers in HEK293 cells and found the highest degree of co-localization with the ER marker. ER expression of SLC10A7-mScarlet was further verified by co-localization studies with STIM-GFP, which is typically located in the ER. However, it has to be mentioned that the degree of ER localization was slightly higher for STIM and SERCA compared to RCAS, which indicates that at least part of the SLC10A7/RCAS protein might also be sorted to the Golgi and plasma membrane. As a dynamic sorting regulation is known for STIM, all sorting studies were additionally performed after ER Ca2+ depletion by TG treatment. As expected, after treatment with TG STIM lost some of its co-localization with SERCA but increased its colocalization with ORAI, which reflects quite well the physiological regulation of STIM sorting under ER Ca2+ depletion (Gwack et al., 2007; Manjarres et al., 2010). This indicates that we used an appropriate cellular system to analyze SOCE. Unfortunately, we were not able to additionally analyze the co-localization of SLC10A7-mScarlet with SERCA-GFP, because despite intense effort this construct could not be created. Based on these sorting and co-localization experiments we propose SLC10A7/RCAS as a direct regulatory factor for STIM and SERCA, but most likely not for ORAI. As a potential regulatory mechanism, RCAS in the physiological state of the cell might limit STIM interaction with ORAI. An additional hypothesis is that SLC10A7/RCAS might negatively regulate Ca2+ sequestration via SERCA.

Effects of the Novel SLC10A7/RCAS Variants on Sorting and Ca²⁺ Influx

The major aim of the present study was to functionally test six novel SLC10A7 variants as well as one disease-related variant (P303L) in a cellular system. For these experiments, we included the disease-related loss-of-function variant L74P as a control. We first investigated whether these variants are sorted identically as the WT protein and whether they show a similar degree of colocalization with STIM. It is interesting that the two diseaserelated variants, namely, L74P and P303L, showed a significantly higher degree of co-localization with STIM compared to the WT. This might indicate an effect of the mutation on normal sorting



behavior that might also contribute to defective function of these SLC10A7/RCAS variant proteins (Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019). In contrast, all other novel variants showed sorting behavior comparable to that of the WT. Next, we analyzed the functional role of all variants in intracellular Ca²⁺ homeostasis. For this purpose, we tagged the corresponding SLC10A7 variants with the red fluorescent protein mScarlet and transiently transfected them into HEK293 cells. HEK293 cells inherently show very low SLC10A7 expression (according to the protein atlas, www.proteinatlas.org) and therefore are an appropriate model for transient overexpression of the respective variant SLC10A7/RCAS proteins. Ca²⁺ flux



FIGURE 4] Effects of SLC10A7-mScatet wild-type (WT) and mutant constructs on Ca²⁺ influx into HER233 calls. All constructs were transiently transfected into HER233 calls. All constructs were prepared for calcium imaging by pre-incubation in Fluo-4 AM and thapsigargin (TG), followed by the addition of extracellular Ca²⁺. Red (mScatet) and green (Fluo-4) fluorescence signals were prepared for calcium imaging by pre-incubation in Fluo-4 AM and thapsigargin (TG), followed by the addition of extracellular Ca²⁺. Red (mScatet) and green (Fluo-4) fluorescence signals were analyzed separately, (i) in additional red fluorescent calls (considered SLC10A7-mScatet-expressing cells) and (ii) non-red fluorescent cells (untransfected controls). (B) The left bar graphs represent the maximal induced Ca²⁺ fluorescence (maximum mean fluorescence at any time point) in both cell types, and the right bar graphs indicate the fluorescence isofiels were analysis was performed using Student's test. * Significantly different at p < 0.01. (C) Effects of the different SLC10A7/RCAS variants on cellular Ca²⁺ influx. Variants with ratios near the value of 1.0 are considered as loss-of-function variants. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. # Significantly different from WT at p < 0.01. Data represent three independent experiments (n = 3). Scale bars: 214 µm.

Frontiers in Molecular Biosciences | www.frontiersin.org

measurements were performed in cell culture plates with transiently transfected cells, where cells with SLC10A7mScarlet-derived red fluorescence were classified as transfected and cells without red fluorescence were classified as untransfected controls. As previously described by Karakus et al. (2020), RCAS overexpression significantly reduced Ca2+ influx in cells pretreated with TG after the addition of 2 mM Ca2+ to the extracellular medium. It is interesting that for five of the novel SLC10A7 variants (V235F, T221M, I136M, P285L, and G146S) no significant effect on Ca2+ influx could be detected compared to the WT, which indicates that contrary to the bioinformatics prediction the function of these SLC10A7/RCAS variant proteins was not affected. In contrast, the disease-related variant P303L (Laugel-Haushalter et al., 2019) that had not been functionally analyzed thus far as well as the novel L210F variant showed significantly reduced activity but maintained a moderate inhibitory effect on Ca2+ influx. Based on this finding, these two variants can be classified as variants with reduced function. In the case of P303L, this might explain the milder disease phenotype compared to other loss-of-function variants; in the case of L210F, a disease phenotype might be predicted, at least in a biallelic setting. The L74P variant that was included as a control proved again its loss-of-function phenotype as described previously (Karakus et al., 2020).

Disease Phenotype of Patients With SLC10A7 Mutation

In addition to the already established disease-related SLC10A7 variants (Ashikov et al., 2018; Dubail et al., 2018; Laugel-Haushalter et al., 2019), the occurrence of L210F might be considered in patients with skeletal dysplasia or amelogenesis imperfecta. In addition, other nonspecific symptoms might be considered as described for patients with SLC10A7 mutation. For example, Dubail et al. (2018) described the L74P mutation in a young patient of Turkish origin. The child showed several symptoms of skeletal dysplasia with multiple dislocations, amelogenesis imperfecta, and facial abnormalities. Furthermore, a delay in speech development was observed in a follow-up examination. Similar clinical features were described for patients with other SLC10A7 mutations (G130R, Q172*, exon Δ9, exon $\Delta 10$, and exon $\Delta 9 + 10$). Interestingly, Laugel-Haushalter et al. (2019) described a milder phenotype in a patient with the P303L variant that could be more comparable to the L210F variant.

REFERENCES

- Alber, J., Jiang, L., and Geyer, J. (2013). CaRch1p Does Not Functionally Interact with the High-Affinity Ca2+influx System (HACS) ofCandida Albicans. Yeast 30 (11), 449–457. doi:10.1002/yea.2981
- Ashikov, A., Abu Bakar, N., Wen, X.-Y., Niemeijer, M., Rodrigues Pinto Osorio, G., Brand-Arzamendi, K., et al. (2018). Integrating Glycomics and Genomics Uncovers SLC10A7 as Essential Factor for Bone Mineralization by Regulating Post-Golgi Protein Transport and Glycosylation. *Hum. Mol. Genet.* 27 (17), 3029–3045. doi:10.1093/hmg/ddy213
- Bijsmans, I. T. G. W., Bouwmeester, R. A. M., Geyer, J., Faber, K. N., and van de Graaf, S. F. J. (2012). Homo- and Hetero-Dimeric Architecture of the Human

In conclusion, the occurrence of variants in the *SLC10A7* gene should be considered in patients with skeletal dysplasia and amelogenesis imperfecta. In addition to the already established variants, the present study identifies another potential disease-related SLC10A7/RCAS variant, namely, L210F, which seems to be most frequent in South Asian populations.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MW, EK, and JG conceived the experiments; MW and EK performed the experiments; MW, EK, and JG analyzed and interpreted the results; and MW and JG wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

FUNDING

This study was supported in part by the grants to EK from the Scholar Rescue Fund and from the Philipp Schwartz-Initiative of the Alexander von Humboldt-Stiftung.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Silke Leiting and Regina Leidolf for excellent technical assistance, Simon Müller for his support regarding fluorescence microscopy and Massimo Palatini for his support with cloning techniques.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.741946/ full#supplementary-material

Liver Na+-Dependent Taurocholate Co-Transporting Protein. *Biochem. J.* 441 (3), 1007–1016. doi:10.1042/BJ20111234

- Burger, S., Döring, B., Hardt, M., Beuerlein, K., Gerstberger, R., and Geyer, J. (2011). Co-Expression Studies of the Orphan Carrier Protein Slc10a4 and the Vesicular Carriers VAChT and VMAT2 in the Rat central and Peripheral Nervous System. *Neuroscience* 193, 109–121. doi:10.1016/ j.neuroscience.2011.06.068
- Dubail, J., Huber, C., Chantepie, S., Sonntag, S., Tüysüz, B., Mihci, E., et al. (2018). SLC10A7 Mutations Cause a Skeletal Dysplasia with Amelogenesis Imperfecta Mediated by GAG Biosynthesis Defects. Nat. Commun. 9 (1), 3087. doi:10.1038/s41467-018-05191-8
- Fahrner, M., Schindl, R., and Romanin, C. (2018). "Studies of Structure-Function and Subunit Composition of Orai/STIM Channel," in *Calcium Entry Channels*

Frontiers in Molecular Biosciences | www.frontiersin.org

in Non-Excitable Cells. Editors J.A. Kozak and J.W. Putney, Jr. (Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis), 25–50.

- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., et al. (2006). A Mutation in Orail Causes Immune Deficiency by Abrogating CRAC Channel Function. *Nature* 441 (7090), 179–185. doi:10.1038/ nature04702
- Geyer, J., Fernandes, C. F., Döring, B., Burger, S., Godoy, J. R., Rafalzik, S., et al. (2008). Cloning and Molecular Characterization of the Orphan Carrier Protein Slc10a4: Expression in Cholinergic Neurons of the Rat Central Nervous System. *Neuroscience* 152 (4), 990–1005. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.049
- Geyer, J., Wilke, T., and Petzinger, E. (2006). The Solute Carrier Family SLC10: More Than a Family of Bile Acid Transporters Regarding Function and Phylogenetic Relationships. *Naunyn Schmied Arch. Pharmacol.* 372 (6), 413–431. doi:10.1007/s00210-006-0043-8
- Godoy, J. R., Fernandes, C., Döring, B., Beuerlein, K., Petzinger, E., and Geyer, J. (2007). Molecular and Phylogenetic Characterization of a Novel Putative Membrane Transporter (SLC10A7), Conserved in Vertebrates and Bacteria. *Eur. J. Cell Biol.* 38 (8), 445–460. doi:10.1016/j.ejcb.2007.06.001
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., et al. (2007). Biochemical and Functional Characterization of Orai Proteins. J. Biol. Chem. 282 (22), 16232–16243. doi:10.1074/jbc.M609630200
- Karakus, E., Wannowius, M., Müller, S. F., Leiting, S., Leidolf, R., Noppes, S., et al. (2020). The Orphan Solute Carrier SLC10A7 Is a Novel Negative Regulator of Intracellular Calcium Signaling. *Sci. Rep.* 10 (1), 7248. doi:10.1038/s41598-020-64006-3
- Krebs, J., Agellon, L. B., and Michalak, M. (2015). Ca2+ Homeostasis and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress: An Integrated View of Calcium Signaling. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 460 (1), 114–121. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.004
- Laugel-Haushalter, V., Bär, S., Schaefer, E., Stoetzel, C., Geoffroy, V., Alembik, Y., et al. (2019). A New SLC10A7 Homozygous Missense Mutation Responsible for a Milder Phenotype of Skeletal Dysplasia with Amelogenesis Imperfecta. *Front. Genet.* 10, 504. doi:10.3389/fgene.2019.00504
- Liou, J., Kim, M. L., Do Heo, W., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., et al. (2005). STIM Is a Ca2+ Sensor Essential for Ca2+-Store-Depletion-Triggered Ca2+ Influx. *Curr. Biol.* 15 (13). 1235–1241. doi:10.1016/j.cub.2005.05.055
- Manjarres, I. M., Rodríguez-García, A., Alonso, M. T., and García-Sancho, J. (2010). The Sarco/endoplasmic Reticulum Ca2+ ATPase (SERCA) Is the Third Element in Capacitative Calcium Entry. *Cell Calcium* 47 (5), 412–418. doi:10.1016/j.ceca.2010.03.001
- Noppes, S., Müller, S. F., Bennien, J., Holtemeyer, M., Palatini, M., Leidolf, R., et al. (2019). Homo- and Heterodimerization Is a Common Feature of the Solute

Carrier Family SLC10 Members. Biol. Chem. 400 (10), 1371-1384. doi:10.1515/ hsz-2019-0148

- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., and Reuveny, E. (2012). SARAF Inactivates the Store Operated Calcium Entry Machinery to Prevent Excess Calcium Refilling. *Cell* 149 (2), 425–438. doi:10.1016/j.cell.2012.01.055
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., et al. (2005). STIM1, an Essential and Conserved Component of Store-Operated Ca2+ Channel Function. J. Cel Biol. 169 (3), 435–445. doi:10.1083/ jcb.200502019
- Srikanth, S., Jung, H.-J., Kim, K.-D., Souda, P., Whitelegge, J., and Gwack, Y. (2010). A Novel EF-Hand Protein, CRACR2A, Is a Cytosolic Ca2+ Sensor that Stabilizes CRAC Channels in T Cells. *Nat. Cel Biol.* 12 (5), 436–446. doi:10.1038/ncb2045
- Stathopulos, P. B., Zheng, L., Li, G.-Y., Plevin, M. J., and Ikura, M. (2008). Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry. *Cell* 135 (1), 110–122. doi:10.1016/ j.cell.2008.08.006
- Woo, J. S., Srikanth, S., and Gwack, Y. (2018). "Modulation of Orai1 and STIM1 by Cellular Factors," in *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*. Editors J.A. Kozak and J.W. PutneyJr. (Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis), 73–92.
- Zhou, X., Levin, E. J., Pan, Y., McCoy, J. G., Sharma, R., Kloss, B., et al. (2014). Structural Basis of the Alternating-Access Mechanism in a Bile Acid Transporter. *Nature* 505 (7484), 569–573. doi:10.1038/nature12811

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Wannowius, Karakus and Geyer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

GLOSSARY

2D two-dimensional 3D three-dimensional ASBT apical sodium-dependent bile acid transporter CRAC calcium release activated channel CRACR2A CRAC channel regulator 2A E.coli Escherichia coli ER endoplasmic reticulum GFP green fluorescent protein gnomAD Genome Aggregation Database HEK293 cells GripTite 293 MSR cells IP₃ inositol 1,4,5-trisphosphate NTCP sodium/taurocholate cotransporting polypeptide PBS phosphate-buffered saline PCC Pearson's correlation coefficient PCR polymerase chain reaction

 PDB Protein Data Bank

 PFA paraformaldehyde

 PolyPhen Polymorphism Phenotyping

 RCAS negative regulator of intracellular calcium signaling

 SARAF SOCE-associated regulatory factor

 SERCA sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase

 SIFT Sorting Intolerant From Tolerant

 SLC10A7 solute carrier family 10 member 7

 SNP single nucleotide polymorphism

 SOAT sodium-dependent organic anion transporter

 SOCE store-operated calcium entry

 STIM stromal interaction molecule

 TG thapsigargin

 TMD transmembrane domain

WT wild-type
Supplementary Material



Supplementary Figure 1

Co-localization of a mScarlet-tagged construct for SERCA with a GFP-tagged construct for ER organelle marker. (A) Representative fluorescence images showing ER-GFP/ SERCA-mScarlet co-localization. Images represent maximum projections of Z-stacks at 630x magnification after deconvolution. (B) Graphical representation of co-fluorescence, expressed as PCC. Each dot represents the PCC of a single cell as determined with LAS-X. 8 cells were analyzed. Bars indicate means \pm SD. Scale bar: 25µm.



Supplementary Figure 2

Co-localization of mScarlet-tagged constructs for ORAI and SERCA with a GFP-tagged construct for STIM. Co-localization was analyzed before and after treatment with 2 μ M thapsigargin (TG). (A) Representative fluorescence images showing GFP/mScarlet co-localization before (upper) and after (lower pictures) treatment with 2 μ M TG. Images represent maximum projections of Z-stacks at 630x magnification after deconvolution. (B) Graphical representation of co-fluorescence, expressed as PCC before (-TG) and after (+TG) treatment with TG. Each dot represents the PCC of a single cell as determined with LAS-X. Approximately 36-61 cells were analyzed. Bars indicate means \pm SD of a representative independent experiment of the measured PCCs. * Significantly different at p < 0.05. Scale bar: 25 μ m.





Mit SLC10A7-mScarlet (rot) und STIM-GFP (grün) transient transfizierte HEK293 Zellen. Überlappende Farbkanäle erscheinen gelb. Bereiche der Zellkerne zeigen kein Fluoreszenzsignal und erscheinen deshalb schwarz.

Mit mutiertem SLC10A7-V235F-mScarlet und STIM-GFP transient transfizierte HEK293 Zellen. Degradiertes mScarlet wird an die Zellperipherie befördert, um ausgeschleust zu werden, und erscheint in Form von roten Punkten.



Mit mutiertem SLC10A7-Δ9+10-mScarlet (rot) und STIM-GFP (grün) transient transfizierte HEK293 Zelle. Die Farbsignale überlappen in beiden Kanälen, sodass in diesen Bereichen nur noch ein gelbes Signal erkannt werden kann. Durch die vergleichsweise schwachen Fluoreszenzsignale erscheint die Zelle unscharf.

"Die Welt ist das, wofür wir sie halten."

Thorsten Havener

(Mentalkünstler, *1972)





VVB LAUFERSWEILER VERLAG STAUFENBERGRING 15 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890 redaktion@doktorverlag.de www.doktorverlag.de



