

## RAPORT ANUAL DE ACTIVITATE 2012

### PROIECT TE\_127

# IMAGISTICA BAZATA PE NANOPARTICULE DE SILICIU FLUORESCENTE - EVALUAREA TOXICITATII TISULARE DATORATE BIOACUMULARII IN VIVO PRIN ABORDARI BIOCHIMICE SI MOLECULARE

## INTRODUCERE

### *Nanoparticule si stres oxidativ*

Nanoparticulele reprezinta o clasa de materiale din ce in ce mai utilizata in domeniul industrial, stiintific si medical. Pe masura ce interesul pentru aceste noi materiale creste, trebuie avut in vedere si potentialul toxic al acestora asupra organismelor, fie in urma utilizarii lor pe sisteme biologice sau in urma eliberarii accidentale in mediu.

Atat studiile in vitro cat si cele in vivo au aratat ca nanoparticulele, cu diverse compozitii, elibereaza ROS (Oberdörster et al., 2005). ROS cauzeaza leziuni celulare prin procesele de peroxidare lipidica, oxidari la nivel proteic, lezarea ADN, prin interferenta in numeroase cai de semnalizare si modularea transcriptiei genice (Brown et al., 2004). Stresului oxidativ este un raspuns fata de agresiunile celulare, insa poate aparea si ca urmare a metabolismului celulare (Risom et al., 2005).

La nivele moderate, stresul oxidativ stimuleaza mecanisme cu rol protector, inclusiv biosinteza de proteine chaperon, care protejeaza componentele celulare de conditiile neavorabile (Benjamin & McMillan, 1998). Necesitatea sintezei proteinelor de soc termic creste proportional cu nivelul de stres (Sorensen et al. 2003), iar defectele sau functionarea incorecta a acestor proteine cu rol protector determina susceptibilitatea la leziuni oxidative. Acestea sunt implicate în : importul proteinelor la nivelul diferitelor compartimente celulare, plierea lor in citosol, reticulul endoplasmatic si mitocondrie, in degradarea proteinelor instabile si prevenirea agregarii acestora.

Proteinele Hsps interferă cu o serie de procese fiziologice la nivelul organitelor, fiind translocate la nivelul diferitelor compartimente celulare după inducerea sintezei lor sub influența unor factori de stres de tip diferit. Proteinele Hsp27, -70, si -90 sunt supraexprimate pentru a asigura supravietuirea celulelor afectate de radiatii UV (Simon et al., 1995), cu leziuni ADN (Nadin et al., 2003), supuse la soc termic (Mosser et al., 2000), deprivare de nutrienti (Mailhos et al., 1993), ceramide (Ahn et al., 1999) si specii reactive de oxigen (Beere, 2005; Polla et al., 1996), dar si in cazul stresului reticulului endoplasmic, inhibitei proteasomului si dezorganizarii citoscheletului (Beere, 2005). In majoritatea acestor cazuri, proteinele Hsp actioneaza prin inhibarea activarii caspazelor. Mai exact rolul antiapoptotic este indeplinit prin inhibarea eliberarii factorilor apoptotici cum sunt citocromul c, factorul AIF (apoptosis-inducing factor), sau Smac din mitocondrii.

Stresul oxidativ poate determina moartea celulara, de tip apoptoza si necroza, prin implicarea a unor numeroase mecanisme celulare, inclusiv a receptorilor Fas (CD95). Semnalizarea in aval de Fas poate induce activarea factorilor transcriptionali ce mediaza apoptoza, cum este de exemplu proteina p53. Activarea (fosforilarea) p53 poate declansa apoptoza in numeroase tipuri celulare. Gena care codifica proteina p53 este intens studiată, datorită rolului său foarte important în moartea celulară programată (apoptoză), proliferare și senescență. Proteina p53 cu rol de supresor tumoral, este considerată a fi gardianul genomului și are rol cheie într-o serie de procese celulare. Diferite tipuri de stres celular, cum ar

fi: leziuni ale ADN, activarea oncogenelor, hipoxia, stimularea factorului de creștere și stresul oxidativ, pot activa expresia proteinei p53 (Pluquet & Hainaut, 2001) având ca efect reglarea transcripțională a peste 60 de gene a căror produși de expresie sunt implicați în blocarea ciclului celular, reglarea procesului apoptotic sau a procesului de reparare ADN. Mecanismele prin care proteina p53 induce procesul apoptotic consecutiv acțiunii anumitor factori de stres, rămân încă necunoscute.

Ne propunem în studiul de față să evidențiem modificările transcripționale și translationale ale proteinelor de șoc termic Hsp27, Hsp60, Hsp70 și Hsp90 precum și a factorului transcripțional p53 în tesuturile cu acumulare maximă de nanoparticule.

## **MATERIALE SI METODE**

### **Prelevarea probelor și pastrarea lor**

Tesuturile cu acumulare maximă de Si/SiO<sub>2</sub> QDs (ficat și rinichi) au fost prelevate pentru analize imunochimice, imunohistochimice și pentru studiile de expresie genică. Imediat după prelevare, tesuturile destinate analizelor de imunochimie și imunohistochimie au fost congelate la -80°C, iar fragmentele de țesut pentru analize de expresie genică au fost complet submersate în soluție de preservare a ARN (RNAlater® (Qiagen GmbH, D-40724 Hilden, Germany), raportul țesut: soluție de păstrare fiind de 1:10. Aceste fragmente tisulare au fost păstrate la 4°C peste noapte, pentru a permite soluției să penetreze în profunzime tesuturile, fiind ulterior congelate la -80°C

### **Analizele imunochimice**

Pentru analizele de imunochimie a fost necesară obținerea unui extract proteic total din tesuturile de interes. Astfel, extracția proteinelor a fost realizată în tampon Tris-HCl 0.1 M, EDTA 5mM, pH 7.4 prin maruntirea mecanică a tesuturilor hepatic și renal folosind omogenizatorul MixerMill 301 (Retch). Omogenatele obținute au fost centrifugate (10000 rpm, 30 minute, 4°C) iar supernatantele corespunzătoare au fost păstrate la -80°C.

Concentrația proteică a fiecărui extract proteic total obținut a fost determinată folosind metoda Lowry (Lowry, 1951). Cantități egale de proteină din fiecare probă (30 μg/godeu) au fost migrate în sistemul SDS-PAGE (PAA10%). După transferul pe membranele PVDF, proteinele imobilizate au fost incubate cu anticorpii:

- Anti Hsp 70 anticorp monoclonal de soarece (Acris Antibodies GmbH)
- Anti-Hsp90 antibody [AC88] (ab13492) (Abcam)
- Anti-Hsp27 antibody [G3.1] (ab115846) (Abcam)
- Anti-Hsp60 Mouse mAb (LK-1) (Calbiochem)
- Anti-beta-Actin (AC-15) (Santa Cruz Biotechnology)

Benzile imunoreactive au fost detectate după revelarea membranelor folosind kitul Western Breeze Chromogenic Immunodetection Kit (Invitrogen) cu anticorp secundar anti-soarece (toți anticorpii primari folosiți au fost obținuți în gazde soarece). Benzile obținute au fost cuantificate utilizând software-ul BioCapt 12.6 (Vilbert Lourmat).

### **Real-time PCR cantitativ**

Extractia ARN total a fost realizată utilizând reactivul TRIzol (Invitrogen) conform instrucțiunilor producătorului, și după metoda descrisă anterior (Chomczynski, 1993). Înainte de a realiza extractia ARN, tesuturile păstrate în RNA Later au fost dezghețate iar soluția de preservare a fost îndepărtată. Fragmente mici de țesut au fost omogenizate împreună cu 1 mL de reactiv TRIzol cu ajutorul omogenizatorului MixerMill MM301 (2 minute la temperatura camerei, 30 oscilații pe secundă).

Puritatea ARN total extras a fost evaluata prin raportul absorbantelor 260nm/ 280nm si concentratia a fost calculata pe baza absorbantei la 260nm (BioSpec Nano UV-VIS spectrophotometer, Shimatzu, Japan). Integritatea ARN extras a fost verificata folosind platforma 2100 Bioanalyzer (Agilent, US) si kitul 6000 RNA Nano Kit (Agilent, USA), urmarind procedurile standard. Toate extractele ARN au obtinut calificative RIN (RNA Integrity Number) mai mari decat 7 (un calificativ de 1 este acordat in cazul ARN complet degradat, iar 10 ARN-ului intact).

Reactia de revers transcriere a fost realizata utilizand alicoturi de 1 µg ARN total per reactie si kitul Bio-Rad iScript cDNA synthesis Kit, respectand indicatiile producatorului.

Pentru reactia de PCR cantitativ au fost desemnate perechi sens si antisens de primeri specifici (CyberGene AB, Stockholm) pentru genele *p53* si *GAPDH*. Pentru desemnarea primerilor am utilizat baza de date NCBI si programul Primer3 Input (version 0.4.0) (Tabel 1). Gena *GAPDH* a fost utilizata ca gena de referinta (housekeeping).

**Tabel 1. Genele de interes si perechile de primeri utilizati in reactia de PCR cantitativ.**

<i>Gena (mRNA)</i>	<i>Secventa primer (5'-3')</i>	<i>Produs amplificat (pb)</i>	<i>T(a)</i>
<i>GAPDH left</i>	<i>GATACACGGAGCACCAGGTT</i>	163	56°C
<i>GAPDH right</i>	<i>GCCATCAGGTCACATACACG</i>		
<i>P53 left</i>	<i>CACTCCACTGGGACCTTTGT</i>	238	54°C
<i>P53 right</i>	<i>CAATCCGATGGTTTGTCC</i>		

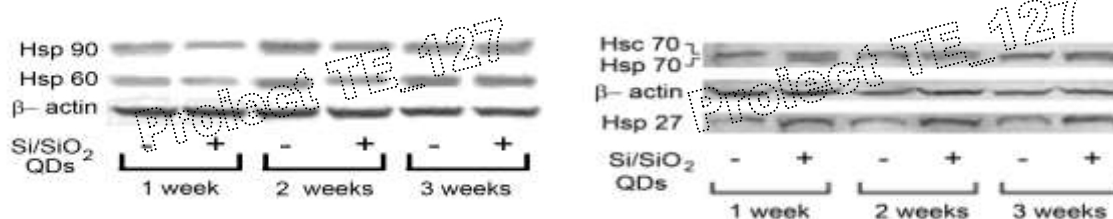
Reactia de PCR cantitativ a fost realizata intr-un volum final de 25 µL, din care 5 µL au continut ADNc matrita diluat, 12.5 µL BioRad 2x iQ SYBR™ Green Supermix , si 200 nM din fiecare primer sens si antisens. Toate reactiile de amplificare au fost rulate pe termociclorul BioRad iCycler iQ™. Conditiiile de PCR cantitativ au fost 1 ciclu initial de denaturare la 95°C timp de 3.5 min, 45 de cicluri de amplificare cu urmatoarele etape: 95°C timp de 30 s, 56°C/54°C timp de 30 s, si 72°C timp de 45 s. La finalul fiecărei etape de 45 s la 72°C a avut loc o achizitie de fluorescenta pe baza careia au fost construite curbele de amplificare. Analiza curbelor de topire au aratat ca produsul amplificat cu fiecare pereche de primeri este unic si corespunde cu fragmentul pentru care au fost desemnati primerii. Toate experimentele de PCR cantitativ au fost repetate de doua ori. Expresia relativa a genei de interes a fost calculata folosind ecuatiile lui Pfaffl (Pfaffl, 2001).

**Evidențierea imunohistochimică a proteinei p53** pe secțiuni de ficat si rinichi provenite atat de la indivizi control (injectati cu NaCl 0.7%) cat si injectati cu Si/SiO<sub>2</sub> a fost realizata folosind anticorpul primar anti human p53 (mouse IgG2a monoclonal antibody, Santa Cruz) obținut în șoarece. Anticorpul diluat a fost diluat la o concentrație de 30µg/ml într-o soluție 1x PBS suplimentată cu 1,2 % BSA (albumină serică bovină) și cu 2 % ser uman. Anticorpul secundar biotinitat anti șoarece obținut în iepure a fost folosit diluat de 50 ori într-o soluție 1x PBS suplimentată cu 1,2% BSA. Revelarea a fost realizată cu o soluție diluată de FITC (izotiocianat de fluoresceină) / streptavidină diluată de 40x în 1x PBS suplimentată cu 1,2 % BSA.

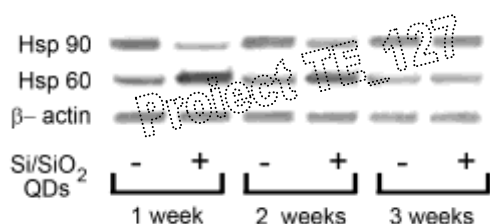
## REZULTATE

**Analizele imunochimice.** La nivelul tesutului hepatic, expresia proteică a Hsp 90 este mult diminuata, in special in primul interval studiat (7 zile dupa injectare), în schimb dupa 14 zile de la injectarea se observă o tendință de ameliorare pentru ca la 21 de zile dupa injectare, expresia proteică a Hsp 90 la peștii tratați să depășească valoarea martorilor de 1,2 ori. Proteina Hsp 60 are un trend

asemănător cu cel al proteinei Hsp 90 cu excepția faptului că la intervalul de 21 de zile, expresia proteică a Hsp 60 în cazul peștilor tratați cu QDs o egalează pe cea a martorilor.

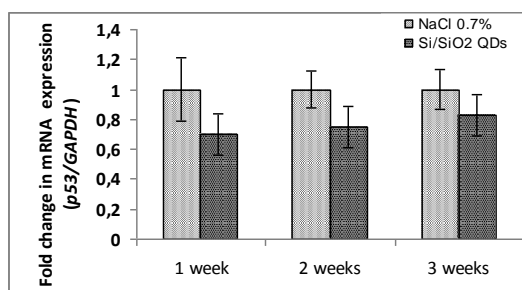


**Figura 1.** Modificarile le nivel de expresie proteica a proteinelor de soc termic Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70 si Hsp 90 in tesutul hepatic dupa 1 saptamana, 2 saptamanai si 3 saptamani dupa injectarea intraperitoneala cu doturi cuantice de Si/SiO<sub>2</sub>. Imaginea prezinta benzile imunoreactive obtinute dupa incubarea cu anticorpii Hsp 90, Hsp60 si beta actina (imaginea din stanga) respectiv dupa incubarea cu anticorpii Hsp70, beta actina si Hsp 27 (imaginea din dreapta).



**Figura 2.** Modificarile le nivel de expresie proteica a proteinelor de soc termic Hsp 60, si Hsp 90 in tesutul renal la 1 saptamana, 2 saptamanai si 3 saptamani dupa injectarea intraperitoneala cu doturi cuantice de Si/SiO<sub>2</sub>. Imaginea prezinta benzile imunoreactive obtinute dupa incubarea cu anticorpii Hsp 90, Hsp60 si beta actina.

Interesant este faptul că în cazul peștilor tratați cu QDs are loc activarea formei Hsp 70 inductibilă chiar după primul interval de tratament, fiind prezentă alături de forma constitutivă Hcs 70, singura formă detectată în cazul martorilor la toate intervalele de tratament. De asemenea, expresia proteică a Hsp 27 crește o dată cu intervalul de tratament, atingând cel mai mare nivel la 21 de zile ca și Hsp 70 (Figura 1).



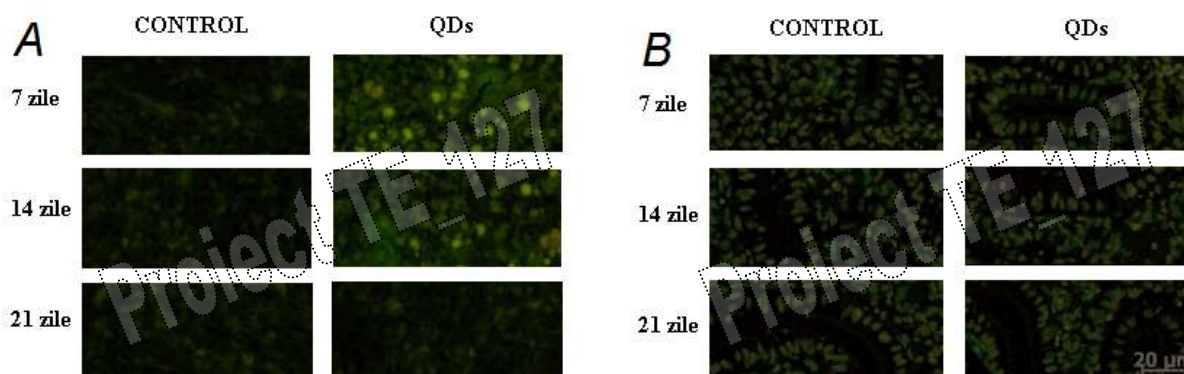
**Figura 3.** Modificarile transcriptionale relative ale p53 in tesutul hepatic

La nivelul tesutului renal, expresia proteică a Hsp 90 este mult diminuată, în special în primul interval studiat (7 zile după injectare), în schimb după 14 zile de la injectare se observă o tendință de ameliorare pentru că la 21 de zile după injectare, expresia proteică a Hsp 90 la peștii tratați să egaleze valoarea martorilor. Proteina Hsp 60 are o evoluție distinctă în rinichi, unde are o expresie foarte ridicată încă din primul interval de timp studiat. După 14 zile de la injectarea doturilor cuantice de Si/SiO<sub>2</sub> expresia Hsp60 începe să se diminueze, pentru că la intervalul de 21 de zile, expresia proteică a Hsp 60 în lotul tratat cu QDs să o egaleze pe cea a martorilor.

**Analiza expresiei genice a proteinei p53.** La nivelul ficatului expresia genică a p53 la nivel de ARNm se corelează cu cea obținută prin imunohistochimie sugerând că tratamentul cu QDs induce o activare a expresiei la nivel transcripțional și translational al p53 după 7 zile, expresie care se diminuează după 14 zile și atinge nivelul martorului la finele celor 21 de zile de tratament.

**Evidențierea imunohistochimică a proteinei p53 în ficat și rinichi.** Modificarile observate în cazul tesutului hepatic al indivizilor de *Carassius sp.* injectați cu QD sugerează că după 21 de zile hepatocitul are capacitatea de a se adapta la acumularea QDs deși în prima parte a tratamentului nivelul crescut al expresiei genice și proteice al p53 și inhibarea proteinelor Hsp 60 și 90 atestă un proces apoptotic la acest nivel. La nivelul țesutului renal

bioacumularea QDs nu a indus modificări de expresie genică și proteică a proteinei p53 cu rol apoptotic la nici un interval de tratament (Figura 4). Creșterea expresiei proteinei Hsp 60 în rinichi observată după 7 zile este 3,1 ori mai mare față de martor (Figura 2) este semnificativă și indică un răspuns adaptativ foarte puternic la acumularea QD în acest țesut. După 14 zile de tratament, expresia proteică a Hsp 60 rămâne crescută de 2,2 ori față de cea a matorului aceluiași interval pe când cea a Hsp 90 rămâne sub cea a matorului. În schimb, după 21 de zile de tratament expresia Hsp 60 și 90 revine la nivelul matorului (Figura 2) sugerând adaptarea țesutului renal la tratamentul cu QDs.



**Figura 4.** Evidențierea imunohistochimică a expresiei proteinei p53 pe secțiuni de ficat (A) și rinichi (B) de *Carassius sp.* (indivizi mator și indivizi injectați cu doturi cuantice de Si/SiO<sub>2</sub>).

**Concluzii.** Rezultate obținute în ceea ce privește expresia proteică a proteinelor de șoc termic Hsp 27, 60, 70 și 90 precum și a proteinei p53 la nivel hepatocitar și renal, unde s-a evidențiat bioacumularea QDs de siliciu sunt de mare însemnatate și nouitate în ceea ce privește efectul in vivo a QDs în vederea utilizării lor cu succes în diagnostic și imagistica medicală.

## Bibliografie

- Ahn, J. H., Ko, Y. G., Park, W. Y., Kang, Y. S., Chung, H. Y., and Seo, J. S.V (1999) Mol. Cells 9, 200–206
- Arrigo Andre-Patrick, Firdaus Wance, Mellier Gregory, Moulin Maryline, Paul Catherine, Diaz-Latoud Chiantal, Kretz-Remy Carole: "Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression" – *Methods* 35, 126-138, 2005;
- Arrigo Andre-Patrick, Simon S., Gibert B, Kretz Remy C., Nivon M., Czekalla A., Guilet D., Maoulin M., Diaz-Latoud C., Vicart P.: "Hsp 27 (Hsp B1) and  $\alpha$ B-crystallin (Hsp B5) as Therapeutic Targets" – *FEBS Letters*, 2007;
- Arrigo, A. P. and Landry, J., In Heat Shock Protein : Structure, Function and Regulation (eds Morimoto, R. I., Tissiere, A., and Georgopoulos, C.) 335-373, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1994
- Beere HM. 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science* 117: 2641-2651, 2004
- Beere, H. M. (2005) *J. Clin. Investig.* 115, 2633–2639
- Benjamin Ivor J. and McMillan D. Randy (1998) Stress (Heat Shock) Proteins : Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *J. of the American Heart Association Circulation Research*
- Brown D M, Donaldson K, Borm P J, Schins R P, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez L A, Stone V 2004 Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- $\alpha$  cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286 L344-L353
- Cappello F, Di Stefano A, David S, *et al.* (2006). "Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease". *Cancer* 107 (10): 2417–24.
- Chomczynski P., A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993 Sep;15(3):532-4, 536-7.
- Clemons, N. J., Buzzard, K., Steel, R., and Anderson, R. L. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 9005–9012
- Fink, A. L., 1999, Chaperone-Mediated Protein Folding, *Physiol. Rev.*, 79, 425-449.

- Hansen JJ, Bross P, Westergaard M, *et al.* (January 2003). "Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter". *Hum. Genet.* **112** (1): 71–7.
- Komarova EY, Afanasyeva EA, Bulatova MM, Cheetham ME, Margulis BA, Guzhova IV. Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell Stress Chaperones.* 2004 ;9(3):265-75.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A 2003 Ultrafine Particulate Pollutants Induce Oxidative Stress and Mitochondrial Damage *Environ. Health Persp.* 111 455-460
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275.
- Mailhos, C., Howard, M. K., and Latchman, D. S. (1993) *Neuroscience* **55**, 621–627
- Mosser Dick D., Morimoto Richiard I.: "Molecular Chaperones and the Stress of Oncogenesis" – *Oncogene* 23, 2907-2918, 2004;
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Meriin, A. B., Sherman, M. Y., Morimoto, R. I., and Massie, B. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7146–7159
- Nadin, S. B., Vargas-Roig, L. M., Cuello-Carrion, F. D., and Ciocca, D. R. (2003) *Cell Stress Chaperones* **8**, 361–372
- Neckers L, Neckers K. Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2002 Oct;7(2):277-88.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J 2005 Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles *Environ. Health. Perspect.* 113 823-839 and supplemental material found at <http://www.ehponline.org/members/2005/7339/7339.html>
- Pfaffl Michael, W., A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, vol.29, no. 9, 2001
- Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. Review. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Oct;59(10):1640-8.
- Pierce Robert, Campbell Jean, Stephenson Alyssa, Franklyn Christopher, Chaisson Michelle, Poot Martin, Kanagh Terrance, Rabinovitch Peter, Fausto Nelson: "Disruption in Redox Homeostasis in Tumor Necrosis Factor- Induced Apoptosis in a Murine Hepatocyte Cell Line" – *American Journal of Pathology*, vol 157, No 1, July 2000;
- Pluquet, O. & Hainaut, P., Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction, *Cancer Lett.*, 174, 1-15, 2001
- Polla, B. S., Kantengwa, S., Francois, D., Salvioli, S., Franceschi, C., Marsac, C., and Cossarizza, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6458–6463
- Rashmi R, Santhosh Kumar T.R, Karunagaran D.: "Human Colon Cancer Cells Differ in Their Sensitivity to Curcumin-Induced apoptosis and Heat-Shock Protects Them by Inhibiting the Release of Apoptosis-Inducing Factor and Caspases" – *FEBS Letters* 538, 19-24, 2003
- Risom L, Moller P, Loft S 2005 Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution *Mutat. Res.* 592 119-137
- Rossi MR, Somji S, Garrett SH, Sens MA, Nath J, Sens DA (December 2002). "Expression of hsp 27, hsp 60, hsc 70, and hsp 70 stress response genes in cultured human urothelial cells (UROtsa) exposed to lethal and sublethal concentrations of sodium arsenite". *Environ. Health Perspect.* 110 (12): 1225–32.
- Simon, M. M., Reikerstorfer, A., Schwarz, A., Krone, C., Luger, T. A., Jaattela, M., and Schwarz, T. (1995) *J. Clin. Investig.* 95, 926–933
- Sorensen Jesper Givskov, Torsten Nygaard Kristensen, Volker Loeschcke (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Vol. 6, Issue 11, 1025–1037
- Sreedhar Amere Subbarao, Csermely Peter: "Heat Shock Proteins in the Regulation of Apoptosis: New Strategies in Tumor Therapy", *Pharmacology and Therapeutics* 101, 227-257, 2004;
- Urushibara M, Kageyama Y, Akashi T, *et al.* (2007). "HSP60 may predict good pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in bladder cancer". *Jpn. J. Clin. Oncol.* **37** (1): 56–61.
- Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh J I, Wiesner M R, Nel A E 2006 Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm *Nano Lett.* 6 1794-1807
- Zimmermann, R. (1998). The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol. Chem.* 379,275-282.