

# **KDEL-Rezeptor-Trafficking und Rezeptor/Liganden-Dynamik in Säugerzellen**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Universität des Saarlandes

von

Diplom-Biologe

**Domenik Rammo**

**Saarbrücken**

**2017**

Tag des Kolloquiums: 07.03.2018  
Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick  
Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Jürgen Schmitt  
Prof. Dr. Markus Hoth

Vorsitz: Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring  
Akademischer Mitarbeiter: Dr. Sascha Tierling

**Freundlichkeit sollte niemals mit Schwäche verwechselt werden**

Domenik Rammo

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1.1 Proteintransport und Signalverarbeitung in Säugerzellen .....	11
1.2 Der KDEL-Rezeptor in Säugerzellen .....	16
1.3 Das A/B-Toxin Rizin.....	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	25
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Verwendete Stämme .....	27
2.1.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	27
2.1.1.2 Verwendete Hefestämme .....	27
2.1.3 Verwendete Plasmide.....	29
2.1.4 Oligonukleotide.....	32
2.1.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	33
2.1.6 Verwendete Kits .....	33
2.1.7 Verwendete Antikörper .....	34
2.2 Methoden .....	34
2.2.1 Kultivierungsbedingungen .....	34
2.2.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	34
2.2.1.2 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
2.2.1.3 Kultivierung von Säugerzellen.....	35
2.2.1.4 Herstellung von Kryokulturen für Bakterien und Hefen.....	35
2.2.1.5 Verwendete Nährmedien und Lösungen .....	35

2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
2.2.2.1 PCR („Polymerase Chain Reaction“) Varianten .....	37
2.2.2.1.1 PCR („Polymerase Chain Reaction“).....	37
2.2.2.1.2 SOE („Splicing by Overlapping Extension“) PCR .....	38
2.2.2.2 Agarosegelektrophorese .....	39
2.2.2.3 Methoden zur DNA Isolierung.....	40
2.2.2.3.1 Alkalische Lyse .....	40
2.2.2.3.2 MiniPrep-Plasmidisolierung.....	41
2.2.2.3.3 MidiPrep-Plasmidisolierung.....	42
2.2.2.3.4 DNA Isolierung aus Agarosegelen.....	42
2.2.2.4 Restriktionsanalysen.....	42
2.2.2.5 Ligation .....	43
2.2.2.6 Transformation von <i>E. coli</i> .....	43
2.2.2.6.1 AccepTor <sup>TM</sup> Klonierung.....	43
2.2.2.6.2 Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	43
2.2.2.7 Methoden zur DNA-Konzentrationsbestimmung .....	44
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden .....	45
2.2.3.1 SDS-PAGE.....	45
2.2.3.2 Coomassie Färbung .....	46
2.2.3.3 Western Blot Analyse.....	47
2.2.3.4 Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	48
2.2.3.4.1 Rekombinante Expression nicht fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten.....	48
2.2.3.4.2 Rekombinante Expression fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten.....	48
2.2.3.4.3 Rekombinante Expression verschiedener eGFP-Varianten .....	49
2.2.3.5 Zellernte und Zellaufschluss von <i>E. coli</i> .....	49
2.2.3.6 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	49
2.2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	50
2.2.4 Hefespezifische Methoden .....	50

2.2.4.1 Lithiumacetat-Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	50
2.2.4.2 FOA Selektion.....	51
2.2.4.3 Methylenblau-Agardiffusionstest.....	52
2.2.5 Zellkultur.....	54
2.2.5.1 Auftauen und Einfrieren von Sägerzellen .....	54
2.2.5.1.1 Auftauen von Sägerzellen .....	54
2.2.5.1.2 Kryokonservierung von Sägerzellen .....	54
2.2.5.2 Passagieren von Sägerzellen .....	54
2.2.5.3 Vitalitätsbestimmung mittels XTT-Assay.....	55
2.2.5.4 Transfektion von Sägerzellen.....	56
2.2.5.4.1 Transiente Transfektion von Sägerzellen.....	56
2.2.5.4.2 Stabile Transfektion von Sägerzellen.....	56
2.2.5.5 Zellaufschluss von Sägerzellen .....	56
2.2.5.5.1 Zellaufschluss mittels RIPA-Puffer .....	56
2.2.5.5.2 Zellaufschluss mit Glasperlen und SDS-Probenpuffer .....	57
2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie.....	57
2.2.6.1 Immunfluoreszenz.....	57
2.2.6.2 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie.....	58
2.2.6.3 „Live Cell Imaging“ .....	58
2.2.7 Monte-Carlo Simulationen .....	58
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
3.1 Herstellung fluoreszenzmarkierter KDEL-Rezeptorvarianten .....	60
3.1.1 Herstellung mCherry-markierter KDEL-Rezeptorvarianten durch SOE-PCR .....	60
3.1.2 Funktionalitätsnachweis der KDEL-Rezeptor/mCherry Fusionsproteine.....	62
3.2 KDEL-Rezeptor/Liganden-Clusterbildung und –Entwicklung in Sägerzellen .....	64
3.2.1 KDEL-Rezeptor/Liganden-Clusterentwicklung an HeLa-Zellen .....	64
3.2.1.1 „Live Cell Imaging“ von HeLa-Zellen.....	64

3.2.1.2 Plasmamembranfärbung von HeLa-Zellen und Expression fluoreszenzmarkierter KDEL-Rezeptorvarianten.....	68
3.2.1.3 Koexpression fluoreszenzmarkierter KDEL-Rezeptorvarianten in HeLa-Zellen.....	70
3.2.2 KDEL-Rezeptor/Liganden Clusterentwicklung an HEK-293-Zellen .....	71
3.2.2.1 „Live Cell Imaging“ von HEK-293 Zellen .....	73
3.2.3 KDEL-Rezeptor/Liganden Clusterentwicklung an HEp-2-Zellen .....	74
3.2.4 KDEL-Rezeptor/Liganden-Clusterentwicklung an SH-SY5Y-Zellen.....	76
3.2.5 KDEL-Rezeptor/Liganden Clusterentwicklung an RAW-Blue Makrophagen.....	77
3.2.6 KDEL-Rezeptor/Liganden Clusterentwicklung an IC-21-Zellen .....	78
3.3 Adaptive Monte-Carlo-Simulation und Etablierung eines minimalistischen „Trafficking-Modells“ zur Beschreibung der KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen.....	79
3.4 Einfluss der Temperatur und der Liganden-Konzentration auf die KDELR/Liganden Clusterentwicklung bei HeLa-Zellen.....	82
3.4.1 Einfluss der Temperatur auf die KDELR/Liganden-Clusterentwicklung bei HeLa-Zellen .....	83
3.4.2 Einfluss der Konzentration extern applizierter Modell-Liganden auf die KDELR/Liganden-Clusterentwicklung bei HeLa-Zellen .....	84
3.5 Untersuchungen zum anterograden KDELR-Transport.....	86
3.6 Einfluss des Zytoskeletts auf die KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen .....	89
3.6.1 Einfluss der Mikrotubuli auf die KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen .....	89
3.6.2 Einfluss von Aktin auf die KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen.....	91
3.7 Studien zur KDELR/Liganden-Clusterentwicklung nach Applikation katalytisch vermindert aktiver Modell-Liganden.....	92
3.7.1 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in HeLa-Zellen nach Applikation von RTAE177D.....	93
3.7.2 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in HEK-Zellen nach Applikation von RTAE177D.....	96
3.7.3 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in SH-SY5Y-Zellen nach Applikation von RTAE177D.....	98

3.7.4 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in IC21-Zellen nach Applikation von RTA-E177D.....	99
3.7.5 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in RAW-Blue-Zellen nach Applikation von RTA-E177D .....	100
3.8. XTT-basierte Vitalitätsbestimmung von Sägerzellen nach Applikation katalytisch aktiver RTA-Varianten .....	101
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>103</b>
<b>5. Ausblick.....</b>	<b>126</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>127</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>138</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
Amp	Ampicilin
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
COPI	„coat protein complex 1“
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d/o	„drop-out“
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
eGFP	„enhanced green fluorescence protein“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ELF2	„chain elongation factor 2“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	„endoplasmatic reticulum associated protein degradation“
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	„Guanine nucleotide exchange factor“
GPCR	„G-Protein coupled receptor“
G-Proteine	GTP-bindende Proteine
GRK	„G-Protein coupled receptor kinase“
GTP	Guanosintriphosphat
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KDELR	KDEL-Rezeptor
LB	„lysogeny broth“
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
MBA	Methylenblau-Agar

MC-Simulation	Monte-Carlo-Simulation
MT	Mikrotubuli
N-terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dicht
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“
PDI	Proteindisulfidisomerase
PE	Phycoerythrin
PKA/PKC	Protein kinase A/Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGS	„regulator of G-Protein signaling“
RIP	Ribosom-inaktivierendes Protein
rpm	„revolutions per minute“
RTA/RTB	Rizin-A-Kette/Rizin-B-Kette
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SEL1L	„protein sel-1 homolog 1“
TEMED	N,N,N’,N’- Tetramethylethan-1,2-diamin
TGN	„ <i>trans</i> -Golgi network“
UPR	„unfolded protein response“
WT	Wildtyp

## Abstract

Die Fähigkeit einer Zelle, extrinsische Signale wahrzunehmen, zu verarbeiten und intrazelluläre Vorgänge als Antwort auf einen extrazellulären Reiz zu regulieren, gehört zu deren wichtigsten Eigenschaften, ohne die das komplex koordinierte Zusammenspiel wesentlicher zelleigener Prozesse nicht möglich wäre. Dabei sind vor allem Plasmamembranlokalisierte Rezeptoren, wie etwa der KDELR-Rezeptor (KDEL-R), und deren fehlerfreie Regulation von entscheidender Bedeutung. Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung eines theoretischen „Trafficking-Modells“ zur grundlegenden Charakterisierung der KDELR-Dynamik und KDELR/Liganden-Interaktion in Säugerzellen. Durch einen kombinierten Ansatz aus experimentellen „Live-Cell-Imaging“ Analysen und adaptiven Monte-Carlo Simulationen konnte ein solches Modell erstellt und sowohl das mechanistische Verständnis um die KDELR-Dynamik und Clusterbildung nachhaltig vertieft, als auch eine mögliche, bislang unbekannte, Funktion des KDELR auf der Oberfläche von Säugerzellen aufgezeigt werden.

The property of living cells to regulate intracellular events as a response to extrinsic stimuli is one of their most striking characteristics that allows to precisely balance and coordinate some of the most basic essential processes. For that matter plasma membrane located receptors like the KDELR-receptor (KDEL-R) and their proper regulation in particular play an essential role. The mayor goal of this study was to design a minimal theoretical Trafficking-Model to further characterize KDELR-dynamics and basic receptor/ligand-interactions in mammalian cells. A combined approach of experimental live-cell-imaging studies and adaptive Monte-Carlo simulations led to the establishment of such a model shedding light on both the mechanistic understanding of KDELR-dynamics and cluster evolution and a potential new role oft he KDELR on the mammalian cell surface.

# **1. Einleitung**

Der zielgerichtete Membrantransport in Säugerzellen umfasst eine Vielzahl an Organellen und mit der Transportmaschinerie assoziierte Proteine, welche auch über die anatomischen Grenzen separater Kompartimente hinaus im ständigen Austausch miteinander stehen. Eine exakte Regulierung dieses sekretorischen Membranflusses ist dabei von essentieller Bedeutung, um den korrekten Transport von Proteinen zu ihren jeweiligen Zielorten sicher zu stellen sowie die Homöostase und Kompositionen der einzelnen Kompartimente aufrecht zu erhalten. Die Gewährleistung dieser umfassenden und schrittweisen Regulierung des Membrantransports geschieht dabei sowohl in Abhängigkeit spezialisierter molekularer Strukturen wie etwa Hüllen- und SNARE-Proteine als auch unter Beeinflussung durch entsprechende Signalkaskaden zur Kontrolle von Transportraten und Aufrechterhaltung der Homöostase (Bonifacino und Glick, 2004; Heinrich und Rapport, 2005; Sallese *et al.*, 2006, 2009). Diese Regulationsmechanismen gelten nicht nur für intrazelluläre Signale sondern auch für extrazelluläre Stimuli. Die Fähigkeit, auf einen extrinsisch wahrgenommen Reiz eine intrinsische Antwort auszulösen, befähigt eukaryotische Zellen zur präzisen Kontrolle verschiedenster essentieller Prozesse wie etwa Zellproliferation, Zellmigration, Neurotransmission oder einer Immunantwort (Casaletto und McClatchey, 2012; Jaqaman und Grinstein, 2012; Munoz *et al.*, 2008; Park und Lee, 2015; Renner *et al.*, 2008; Wajant *et al.*, 2003). „G-protein coupled receptors“ (GPCRs) sind in diesem Zusammenhang sowohl für das Erkennen extrazellulär lokalisierter Liganden, als auch für die korrekte Regulierung und Verarbeitung intrazellulärer Signalprozesse von zentraler Bedeutung (Hanlon und Andrew, 2015).

## **1.1 Proteintransport und Signalverarbeitung in Säugerzellen**

Eukaryotische Zellen sind zur Ausübung und Koordination einer Vielzahl hoch komplexer Aufgaben und Funktionen in der Lage. Ausschlaggebend dafür ist das korrekte Zusammenspiel einzelner, hoch spezialisierter Organellen. Der intrazelluläre Protein- bzw. Membrantransport stellt dabei einen präzise regulierten Prozess dar, an dessen fehlerfreiem Ablauf vor allem das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, das „ER-Golgi intermediate compartment“ (ERGIC) und Endosomen beteiligt sind. Sekretorische Proteine werden zunächst im ER durch Chaperone gefaltet und anschließend über den Golgi-Apparat in das „*trans*-Golgi network“ (TGN) transportiert, von wo die Proteine schließlich entweder

in das endosomale/lysosomale System integriert, oder zwecks Sekretion zur Plasmamembran (PM) weiter geleitet werden (Griffiths und Simons, 1986; Gu *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Rothman, 1994; Traub und Kornfeld, 1997). Das Membranvolumen, welches dabei das ER verlässt, beträgt schätzungsweise 1,5-5 % des maximalen ER-Membranvolumens pro Minute (Karrenbauer *et al.*, 1990; Thor *et al.*, 2009; Wieland *et al.*, 1987). In Anbetracht der Tatsache, dass die Oberfläche des ER etwa zehnfach größer ist als die des Golgi-Apparates und der PM, stellt dies eine enorm hohe Membranflussrate dar (Griffiths *et al.*, 1984). Der Golgi-Apparat - als zentrales organisierendes Kompartiment des sekretorischen Wegs - ist dabei der Hauptempfänger für diesen Membranfluss. Das Membranvolumen, um welches der Golgi-Apparat pro Minute zunimmt, entspricht annähernd 5-10 % seines gesamten Volumens (Cancino *et al.*, 2013). Eine solche Transportrate würde bereits nach kurzer Zeit zu einem kritischen Anschwellen des Golgi-Apparats führen und somit dessen Funktionalität dramatisch einschränken (Sannerud *et al.*, 2003; Wieland *et al.*, 1987). Zusätzlich ist der Golgi-Apparat auch Empfänger retrograd transportierter Proteine, welche beispielsweise auf Ebene der PM internalisiert und/oder zielgerichtet von Endosomen zum Golgi geführt werden (Rohn *et al.*, 2000; Snider und Rogers, 1985). Um die Komposition der Organellen des sekretorischen Wegs weiterhin zu erhalten und ein zu starkes Anschwellen des Golgi-Apparates in Folge des aufgenommen Membranvolumens zu verhindern, ist ein effizienter Kontrollmechanismus zum weiterführenden Transport vom TGN zu distal gelegenen Organellen sowie zur Rückführung der transportierten Membran mitsamt der integrierten Membranproteine unerlässlich. Diese retrograde Rückführung von Proteinen des ERGIC zum ER gilt dabei als der bedeutendste Mechanismus zur Kompensation dieses Membranflusses (Klumperman, 2000; Sannerud, *et al.*, 2003). Die Wichtigkeit des anterograden Transports vom Golgi zur PM ist in diesem Zusammenhang nicht eindeutig geklärt, sollte aber keinesfalls ignoriert werden (Cancino *et al.*, 2013).

Eine rein intrinsische Selbstregulierung der einzelnen Kompartimente reicht dabei nicht aus, um den Membranfluss entlang der jeweiligen Organellen des sekretorischen Wegs mit der erforderlichen Präzision zu kontrollieren. Es wird zusätzlich ein übergeordneter Kontrollmechanismus zur Feinabstimmung der Transportraten und Gewährleistung der Funktionalität benötigt, bei dem intrazelluläre Signaltransduktion und rezeptorvermittelte Signalverarbeitung als Antwort auf extrazelluläre Reize eine tragende Rolle spielen (Sallese *et al.*, 2009). Die ursprüngliche Vorstellung intrazellulärer Signalverarbeitung beruht auf der initialen Interaktion eines externen Liganden mit einem spezifischen Rezeptor auf der PM. Das daraus resultierende Signal wird dann durch eine Abfolge exakt koordinierter Ereignisse

verstärkt und weitergeleitet, wobei spezialisierte Proteine wie Kinasen, Lipasen und GTPasen an der Fortleitung des Signals in das Zellinnere beteiligt sind. Als direkte Konsequenz einer solchen Signalkaskade kommt es schließlich zu signalspezifischen Reaktionen der Zelle. Der Gedanke einer strikt auf PM-lokalisierte Rezeptoren limitierten Signalübertragung hat mittlerweile jedoch keine Gültigkeit mehr, da indessen das Vorhandensein diverser, an der Signalleitung beteiligter Proteine auch intrazellulär, vor allem in den Membranen der verschiedenen Organellen des sekretorischen Wegs, nachgewiesen werden konnte (McBride *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004; Ron und Walter, 2007; Sallese *et al.*, 2006; Sorkin und von Zastrow, 2002). Diese Proteine müssen zwar nicht zwingend an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sein, ihre Lokalisation auf diversen Endomembranen ließe sich auch dadurch erklären, dass diese Proteine nach der Synthese entlang der Organellen des sekretorischen Wegs zur PM transportiert werden (Marrari *et al.*, 2007; Michaelson *et al.*, 2002). Allerdings wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass solche Proteine an der Verarbeitung von PM-vermittelten Signalen entscheidend mitwirken (De Matteis *et al.*, 1993; Di Fiore und De Camilli, 2001). Darüber hinaus muss eine intrazelluläre Signalübertragung nicht zwingend durch ein extrazelluläres Signal ausgelöst werden, sondern kann durchaus auch einen endogenen Ursprung haben (Asp und Nilsson, 2008; Pulvirenti *et al.*, 2008).

Bei der Verarbeitung extrazellulär initierter Signale sind GPCRs und heteromere GTP-bindende Proteine (G-Proteine) von zentraler Bedeutung. Bei GPCRs handelt es sich um sieben Transmembrandomänen umfassende Rezeptoren, welche das Weiterleiten intrazellulärer Signale als Antwort auf extrazelluläre Stimuli vermitteln. Dabei fungieren GPCRs als Liganden gesteuerte „Guanine nucleotide exchange factors“ (GEFs) für entsprechende G-Proteine. Der rezeptorvermittelte Austausch von GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins führt zu einer Dissoziation der nun aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit vom freien  $\beta/\gamma$ -Subkomplex (Neer, 1995). Beide Komponenten wirken fortan als Signalmoleküle zur Initiierung und Modulierung von Signalkaskaden ins Zellinnere, wobei die Signaltransduktion jederzeit durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit zum Erliegen kommen kann, indem die GTP gebundene Form der  $\alpha$ -Untereinheit in die entsprechende GDP gebundene Form umgewandelt und somit eine Neuformierung des inaktiven Heterotrimers begünstigt wird (Sorkin und von Zastrow, 2002). Zusätzlich zu der beschriebenen intrinsischen GTPase-Aktivität von  $G\alpha$  unterstützen auch so genannte „regulator of G-protein signalling“-Proteine (RGS) die  $G\alpha$ -GTP-Hydrolyse, indem sie die für die GTPase-Aktivität bevorzugte Konformation der  $G\alpha$ -Untereinheiten stabilisieren (Harrison und Traynor, 2003; Kostenis, 2006; Oldham und Hamm, 2008). Die Rezeptoraktivität im

Rahmen der Signalverarbeitung wird zusätzlich durch Rezeptor-spezifische Kinasen (GRKs) und „second messenger“-abhängige Kinasen (z. B. PKA, PKC) mittels Phosphorylierung reguliert (Chuang *et al.*, 1996; Reiter und Lefkowitz, 2006). Die Vorstellung, dass GPCRs entweder in einer aktiven oder gänzlich inaktiven Form vorliegen, ist allerdings stark vereinfacht und die GPCR-vermittelte Signaltransduktion um ein Vielfaches komplizierter. Tatsächlich handelt es sich bei der GPCR-Aktivierung um einen mehrstufigen Prozess, bei dem Liganden-spezifische Rezeptorkonformationen eine unterschiedliche Initialisierung und Weiterleitung nachgeschalteter Signalwege bedingen (Kenakin 2009, 2011; Thomson *et al.*, 2012; Urban *et al.*, 2007). Verschiedene an der GPCR-vermittelten Signalübertragung beteiligte Adapterproteine stabilisieren dabei spezifische Rezeptorkonformationen, welche sich wiederum in ihrer Fähigkeit mit entsprechenden G-Proteinen oder anderen Rezeptor-assoziierten Proteinen zu interagieren, unterscheiden. Die Rezeptorkonformation bestimmt also maßgeblich dessen Spezifität und die Art des intrinsisch transduzierten Signals. Ob ein Ligand dabei als Agonist, inverser Agonist oder als neutraler Antagonist wirkt, ist nicht allgemein zu beschreiben und muss für jeden Signalweg im Einzelnen betrachtet werden (Baker *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2008; Kobilka, 2007; Kobilka und Deupi, 2007; Rajagopal *et. al.*, 2010). Neben den klassischen G-Proteinen wurden in der Vergangenheit etliche zusätzliche Proteine entdeckt (z. B. β-Arrestine), mit denen GPCRs ebenfalls interagieren können, um weitere Signalwege zu modulieren (Chidiac *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1992; Kenakin, 2009, 2011; Lefkowitz *et al.*, 1993; Rajagopal *et al.*, 2010; Thomson *et al.* 2012). β-Arrestine fungieren dabei als multifunktionale Adapterproteine, die unabhängig von G-Proteinen an der Signalverarbeitung im Zusammenspiel mit verschiedenen Mediatoren beteiligt sind (Gutkind, 2000; Kenakin, 2001/2008; Rajagopal *et al.*, 2010).

Nachdem die initiale Rezeptor/Liganden-Interaktion auf Ebene der PM stattgefunden hat und der GPCR durch Phosphorylierung aktiviert wurde, kann der entsprechende Rezeptor endozytiert und in intrazelluläre Kompartimente (z. B. Endosomen) eingebracht werden. Die endozytierten GPCRs werden im Anschluss entweder lysosomal degradiert oder zurück zur PM transportiert, um an der Verarbeitung weiter Signalereignisse mitzuwirken (Clague und Urbe, 2006). Ein solcher Endozytoseprozess muss im Falle der GPCR-vermittelten Signaltransduktion allerdings nicht zwangsläufig das Ende der Signalübertragung bedeuten, sondern kann auch dazu genutzt werden, um das Signal auf einen anderen Signalweg zu übertragen (von Zastrow und Sorkin, 2007). Tatsächlich sind die internalisierten und endosomal lokalisierten Rezeptormoleküle dazu in der Lage, Endosomen-spezifische Signalkaskaden zu initiieren, deren Wichtigkeit mit PM-initiierten Signalereignissen

weitestgehend gleichzusetzen ist. Endozytierte GPCRs können beispielsweise MAP-Kinasen aktivieren und somit das Zellwachstum regulieren oder während der Embryonalentwicklung über die Rab5-vermittelte Aktivierung von endosomal lokalisiertem APPL1 die zelluläre Überlebensrate sicherstellen (Sallese *et al.*, 2009; Schenck *et al.*, 2008). Eine zentrale Stelle für die Verarbeitung PM-initierter Signale nimmt der Golgi-Komplex ein, welcher einen Lokalisationsort für eine Vielzahl an Rezeptoren, heterotrimeren G-Proteinen, Kinasen, Phosphatasen, Phospholipasen sowie Phosphodiesterasen darstellt (Bard *et al.*, 2002/2003; Denker *et al.*, 1996; Larocca *et al.*, 2004; Nagahama *et al.*, 2002; Sallese *et al.*, 2006; Stow *et al.*, 1991). Der Golgi-Komplex kann dabei sowohl als eine Art passiver „Signalverstärker“ für Signale, mit Ursprung auf der PM fungieren, als auch aktiv an der Initiierung von Signalen beteiligt sein (Sallese *et al.*, 2009). Anschaulich untersucht wurde dieses Phänomen am Beispiel des Ras-Signalweges (Bivona *et al.*, 2003; Bivona und Philips, 2003/2005). Ras gehört zu einer Familie von G-Proteinen, die mit der Regulierung wichtiger Prozesse als Antwort auf PM-initiierte Signaltransduktionen assoziiert sind. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Ras auf Ebene der PM aktiviert wird, und diese Aktivität bis hin zu den Membranen des Golgi-Komplexes beibehalten werden kann (Bivona *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass eine Aktivierung von Ras am Golgi-Komplex, wiedererwarten, scheinbar keinen Einfluss auf den Membrantransport ausübt, zeigt, dass der Golgi-Komplex dabei wohl nicht Ursprung, sondern vielmehr Mediator eines gerichteten Signals ist (Bivona *et al.*, 2009; Bivona und Philips, 2003). Darüber hinaus konnte sogar gezeigt werden, dass das Resultat der Ras-Aktivierung maßgeblich vom Ort der Aktivierung abhängig ist. In T-Lymphozyten führt zum Beispiel die Golgi-lokalierte Ras-Aktivierung zu einer Unterstützung des Zellwachstums, während die PM-lokalierte Ras-Aktivierung bei der Regulation der Adhäsion eine tragende Rolle spielt (Mor *et al.*, 2007/2007; Mor und Philips, 2006).

Ergänzend zu den Signalereignissen, die ihren Ursprung durch eine Rezeptor/Liganden-Interaktion auf Ebene der PM haben und Endomembran-assoziiert in das Zellinnere transduziert werden, existieren auch Signalmechanismen, welche endogen (z. B. im Golgi-Komplex) initiiert und beispielsweise durch ER-transportierte Chaperone aktiviert werden (Asp und Nilsson, 2008; Griffiths *et al.*, 1994; Pulvirenti, 2008). Eine zentrale Rolle für die Kontrolle und Organisation Golgi-assozierter Signale nimmt dabei der KDELR-Rezeptor (KDEL-R) ein (siehe 1.2). Zwei sehr populäre Beispiele für die endogene Aktivierung bzw. Fortleitung eines Signals stellen zum Einen die „unfolded protein response“ (UPR), welche als Antwort auf eine nicht kontrollierte Veränderung der ER-Homöostase ausgelöst wird, und zum Anderen die Einleitung der Apoptose dar (Lee, 2001; Rutkowski und Kaufman, 2004).

Apoptose kann dabei aufgrund einer Vielzahl verschiedener Gründe ausgelöst werden; allen ist jedoch die Initiierung zweier hochkomplexer Signalkaskaden gemein: der extrinsische bzw. intrinsische apoptotische Signalweg (Hill *et al.*, 2003; Ow *et al.*, 2008). Der extrinsische Weg wird dabei durch die Interaktion zwischen einem Liganden und dessen korrespondierenden Rezeptor („death-receptor“) auf der PM initiiert und resultiert schlussendlich in der Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Xu und Shi, 2007). Im Gegensatz dazu wird der intrinsische Weg durch interne zelluläre Schäden ausgelöst und beinhaltet sowohl ein entstehendes Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalproteinen, wie auch die Freisetzung von Kalzium aus dem ER und die spätere Wiederaufnahme durch Mitochondrien (Fulda und Debatin, 2006). Beide apoptotischen Signalwege setzen ein hohes Maß an inter-organellem Informationsaustausch zwischen ER, Mitochondrien und Zellkern voraus.

Ohnehin nimmt auch der Nukleus eine wichtige Position innerhalb der intrazellulären Signalverarbeitung ein. Auch wenn allgemein davon ausgegangen werden kann, dass viele Signalkaskaden ihren Ursprung auf oder nahe der PM haben, konnte gezeigt werden, dass manche GPCRs (z. B. jene assoziiert mit Chemokinen und Prostaglandin) auf der Kernhülle lokalisiert sind und maßgeblich an der Signaltransduktion mitwirken (Lee *et al.*, 2004; Morinelli *et al.*, 2007; Shibuta *et. al.*, 2002; Spano *et. al.*, 2004).

## 1.2 Der KDEL-Rezeptor in Säugerzellen

Bei dem HDEL- bzw. KDEL-Rezeptor handelt es sich um ein sieben Transmembrandomänen umfassendes Protein, dessen am besten untersuchte Funktion in der Rückführung ER-residenter Proteine liegt. Innerhalb des sekretorischen Weges ist es unerlässlich, dass lösliche ER-residente Proteine im Rahmen vesikulärer Transportereignisse das Lumen des ER in Richtung des Golgi-Komplexes verlassen (Pelham, 1988). Die spezifische Rückführung solcher Proteine wird dabei über ein C-terminales Erkennungsmotiv (HDEL in Hefe, KDEL in Säugerzellen) vermittelt und über die pH-abhängige H/KDEL/R/Liganden-Affinität reguliert (Pelham, 1989/1990; Wilson *et al.*, 1993). Das saure Milieu des Golgi-Apparates begünstigt in diesem Zusammenhang eine effiziente und hoch spezifische Interaktion zwischen dem H/KDEL/R und einem geeigneten Liganden unter Bildung eines sehr stabilen Rezeptor/Liganden-Komplexes. Dieser Komplex wird darauffolgend zurück zum ER transportiert, wo dessen Stabilität schließlich aufgrund des dort vorherrschenden, eher

neutralen pH-Wertes geschwächt wird und die gebundenen Liganden wieder vom H/KDEL-R dissoziieren (siehe Abb. 1).

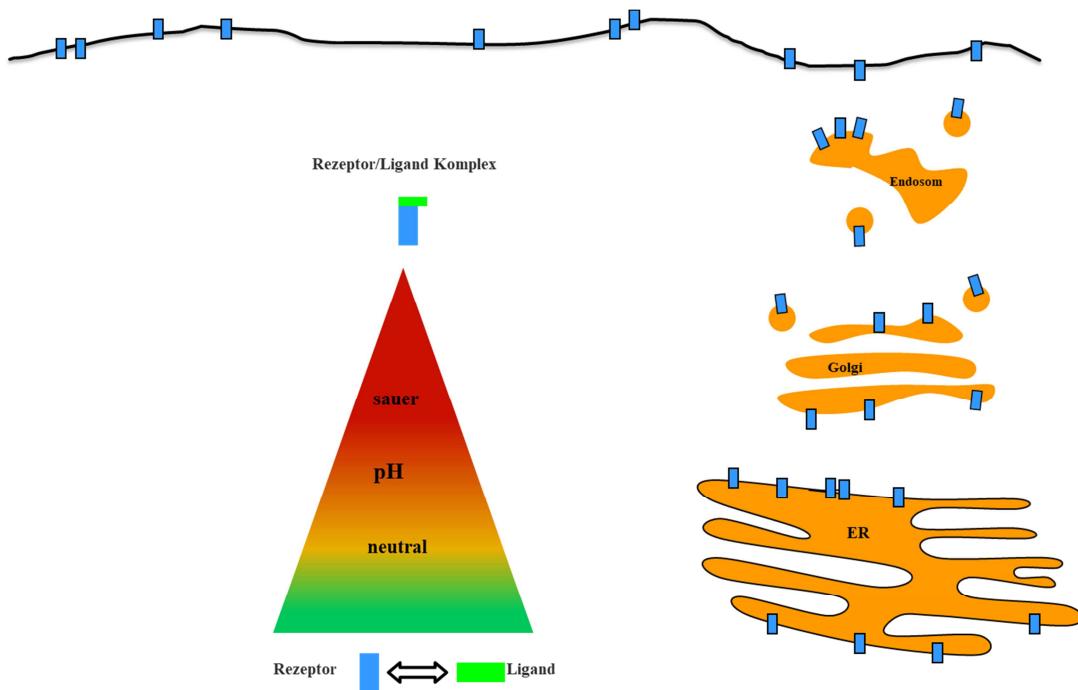


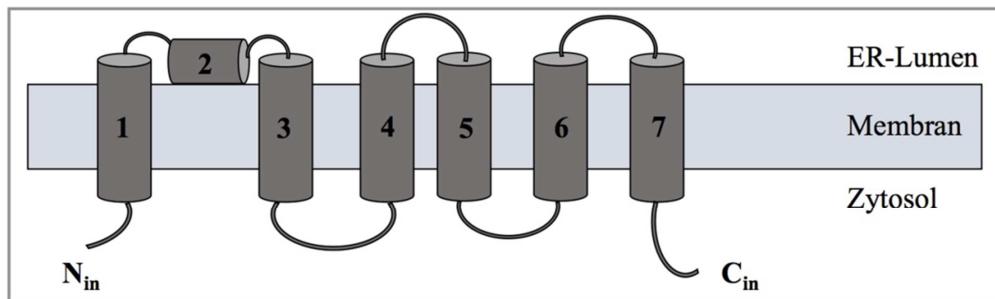
Abbildung 1: Schematische Darstellung der KDELR-vermittelten, pH-abhängigen Rückführung ER-residenter Proteine. Im leicht sauren Milieu des Golgi-Komplexes binden KDELR-assoziierte Liganden mit hoher Affinität an den KDELR unter Bildung eines äußerst stabilen Rezeptor/Liganden-Komplexes. Dieser Komplex wird anschließend zum ER rücktransportiert, wo aufgrund des eher neutralen pH-Werts die Stabilität des zuvor gebildeten Komplexes reduziert wird und der Ligand erneut vom KDELR dissoziiert.

Der für die ER-Rückführung verantwortliche Rezeptor wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert und als ein 26 kDa großes, integrales Membranprotein beschrieben, welches von dem *ERD2*-Gen kodiert wird (Semenza *et al.*, 1990). Benannt wurde das Genprodukt als Erd2p oder, in Anbetracht des für die Liganden-Interaktion präferierten Sequenzmotivs HDEL-Rezeptor. Im Unterschied zur Hefe sind derzeit drei verschiedene säugerspezifische KDEL-Rezeptor-Isoformen bekannt (Lewis *et al.*, 1990; Semenza *et al.*, 1990). Das erste humane HDEL-Rezeptorhomolog, *hERD2* oder auch KDEL-Rezeptor (KDELR1 bzw. Erd2.1) genannt, wurde in den frühen Neunzigerjahren von Lewis und Pelham identifiziert (Lewis und Pelham, 1990). Später gelang es zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein zweites HDEL-Homolog zu charakterisieren (KDELR2 bzw. Erd2.2) bevor um die Jahrtausendwende, im Rahmen des Genom- und ORFeome-Projekts, die Existenz eines dritten Homologes (KDELR3 bzw. Erd2.3) aufgedeckt werden konnte (Collins *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 1992; Lewis und Pelham, 1992). Diese drei säugerspezifischen KDELR-Isoformen weisen eine sehr hohe Übereinstimmung hinsichtlich

ihrer Aminosäuresequenz auf (72-83,5 %) und sind allesamt hauptsächlich auf den Membranen des Golgi-Komplexes, ER bzw. ERGIC lokalisiert (Capitani und Sallese, 2009; Griffiths *et al.*, 1994; Raykhel *et al.*, 2007). Dabei ist die Lokalisation im ERGIC und *cis*-Golgibereich fünfmal häufiger als im medialen oder *trans*-Golgi-Kompartiment, während in endosomalen Regionen nahezu kein KDELR nachweisbar ist (Griffiths *et al.*, 1994; Orci *et al.*, 1997). Im Hinblick auf die Transkription bzw. Expressionsrate sind allerdings wesentliche Unterschiede zu beobachten. Mittels quantitativer „real-time PCR“ wurde gezeigt, dass das Verhältnis an mRNA zwischen Erd2.3 und Erd2.1 in HeLa-Zellen bei etwa 5 % liegt, während Erd2.2 knapp doppelt so stark transkribiert wird wie Erd2.1, wenngleich auch gewebsspezifische Unterschiede bezüglich der Transkriptionsstärke sowie Variationen zwischen einzelnen RNA-Proben beobachtet wurden (Raykhel, 2007). Die abgeänderte Bezeichnung der säugerspezifischen KDELRs gegenüber Erd2p in Hefe resultiert aus deren unterschiedlichen Liganden-Spezifitäten. Während Erd2p in Hefen hauptsächlich mit HDEL-Sequenzmotiv tragenden Proteinen interagiert und folgerichtig als HDEL-Rezeptor bezeichnet wird, stellt KDEL das bevorzugte Sequenzmotiv der humanen Erd2p-Homologe Erd2.1, Erd2.2 sowie Erd2.3 dar. Über diese Sequenzmotive hinaus existiert allerdings noch eine Vielzahl HDEL- und KDEL-ähnlicher Motive mit denen die säugerspezifischen KDELRs ebenfalls interagieren können (Hulo *et al.*, 2006; Raykhel *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang wird auch deutlich, dass die einzelnen KDELR-Isoformen durchaus Unterschiede hinsichtlich ihrer Sequenzaffinität aufweisen können und KDEL nicht zwingend das präferierte Motiv in Säugerzellen sein muss. Mithilfe bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) konnte gezeigt werden, dass Erd2.1 keine stark gesteigerte Affinität gegenüber KDEL aufweist, sondern auch HDEL und diverse HDEL-ähnliche Motive mit hoher Spezifität binden kann, während Erd2.3 HDEL gegenüber KDEL zu bevorzugen scheint (Raykhel, 2007). Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass diese Detailunterschiede hinsichtlich der Spezifität nur dann wesentlich zum Tragen kommen, wenn entsprechende Liganden direkt um eine Interaktion mit dem jeweiligen KDELR konkurrieren; unter physiologischen Bedingungen sollte jede KDELR-Isoform sowohl mit HDEL- als auch mit KDEL-Sequenzmotiv tragenden Proteinen effizient wechselwirken können.

Die exakte Topologie des H/KDEL-Rezeptors ist bislang nicht eindeutig aufgeklärt und wird in der Fachliteratur kontrovers diskutiert. Sehr häufig wird der KDELR als ein sieben Transmembrandomänen umfassendes, integrales Membranprotein beschrieben, wobei der N-Terminus luminal und der C-Terminus zytosolisch lokalisiert ist (Semenza *et al.*, 1990;

Scheel und Pelham, 1988; Townsley *et al.*, 1993). Diesem Modell wird eine alternative Topologie gegenübergestellt (siehe Abbildung 2), nach der es sich beim KDELR um ein sechs Transmembrandomänen umfassendes Protein handelt, wobei sowohl N- als auch C-Terminus zytosolisch lokalisiert sind; die siebte Domäne des KDELR ist der Membran in diesem Fall aufgelagert (Singh *et al.*, 1993).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Topologie des KDELR-Rezeptors.** Das hier vorgestellte Modell beschreibt den KDELR als ein sechs Transmembrandomänen umfassendes Protein mit einer zusätzlichen, der PM aufgelagerten Domäne. N- und C-Terminus sind beide zytosolisch lokalisiert (verändert nach Singh *et al.*, 1993).

In der jüngeren Vergangenheit wurden dem KDELR in Säugerzellen, über seine ursprüngliche Rolle bei der Rückführung ER-residenter Proteine hinaus, zahlreiche weitere Funktionen zugesprochen. Die wohl wichtigste darunter beschreibt die Funktion des KDELR als Signalrezeptor und bedeutender Regulator von Golgi-Komplex-assoziierten Transportvorgängen. Studien zur Verarbeitung Golgi-Komplex-initierter Signale als Antwort auf die Ankunft von Vesikeln aus dem ER zeigen, dass solche Vesikel unter anderem auch potentielle KDELR-Interaktionspartner enthalten und eine darauffolgende Aktivierung des KDELR zur Initiierung von Signalereignissen führt, welche schlussendlich zur verstärkten Aktivierung des retrograden und anterograden Transports führen.

Dieser Regulationsmechanismus dient dabei wohl überwiegend der Kontrolle und Abstimmung des intrazellulären Membranflusses und ist somit für die Aufrechterhaltung der Golgi-Homöostase sowie für die bedarfsmäßige Aktivierung des intra-Golgi Transports von entscheidender Bedeutung (Cancino *et al.*, 2013; Giannotta *et. al.*, 2012; Pulvirenti *et al.*, 2008). Wie der KDELR seine Funktion als Signalrezeptor ausübt, kann anhand seines molekularen Aufbaus erklärt werden. Die dreidimensionale Struktur des KDELR entspricht der eines klassischen GPCRs (Giannotta *et al.*, 2012). Folglich ist der KDELR in der Lage, mit G-Proteinen zu interagieren und ermöglicht somit die Initiierung von Signalereignissen, welche schlussendlich eine wesentliche Rolle für die korrekte Regulation Golgi-Komplex-assozierter Transportvorgänge einnehmen (siehe Abb. 3). Es wurde gezeigt, dass der KDELR

auf Ebene des Golgi scheinbar direkt mit zwei G $\alpha$ -Proteinen (G $\alpha$ <sub>q</sub> bzw. G $\alpha$ <sub>s</sub>) interagiert und das zusätzliche Binden eines KDELR-Sequenzmotiv-tragenden Liganden zur Aktivierung dieser G $\alpha$ -Proteine durch den KDELR führt (Cancino *et al.*, nicht publiziert; Giannotta *et al.*, 2012). Die Aktivierung von G $\alpha$ <sub>q</sub> reguliert post- und intra-Golgi-Transportereignisse über einen Mechanismus, der im wesentlichen Phospholipase C (PLC), Diacylglycerol (DAG), Protein Kinase C (PKC) sowie die Tyrosinkinase Src involviert, während G $\alpha$ <sub>s</sub> den retrograden Transport indirekt über die Regulation der Protein Kinase A (PKA) kontrolliert (Cancino *et al.*, 2013/nicht publiziert; Giannotta *et al.*, 2012; Pulvirenti *et al.*, 2008).

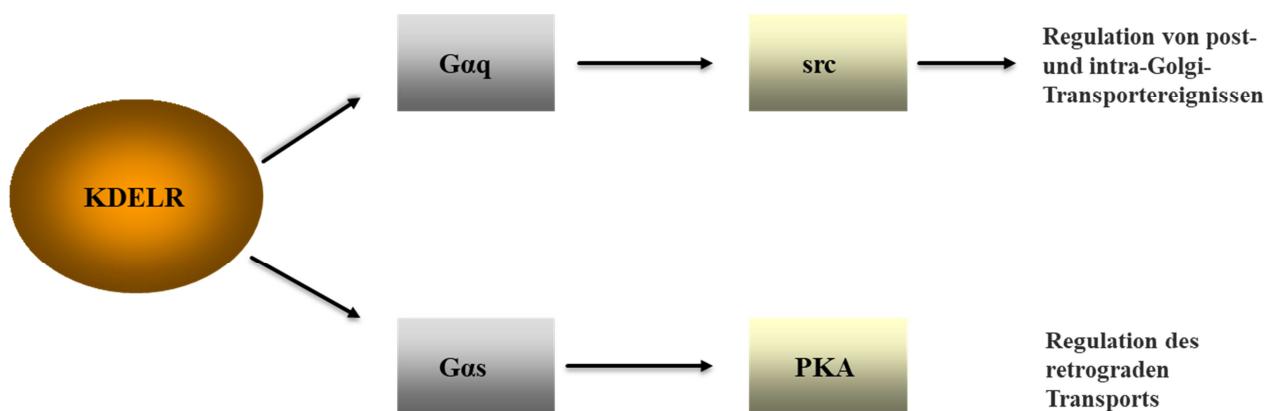


Abbildung 3: Schematische und vereinfachte Übersicht über die KDELR vermittelte Regulation Golgi-Komplex-assozierter Transportvorgänge. Aufgrund seiner GPCR-ähnlichen Struktur ist der KDELR zur Interaktion mit verschiedenen G-Proteinen, speziell den dargestellten G-Proteinen G $\alpha$ <sub>s</sub> und G $\alpha$ <sub>q</sub>, und der damit verbundenen Initiierung von Signalereignissen zur Regulation entsprechender Transportvorgänge und Aufrechterhaltung der Golgi Homöostase fähig.

G $\alpha$ <sub>q</sub> und G $\alpha$ <sub>s</sub> wirken auf Ebene des Golgi an der Formierung und Sekretion von Vesikeln sowie auf die Interaktion zwischen PKA und Golgi-Membran ein und beeinflussen somit maßgeblich die korrekte Struktur und Funktionalität des Golgi-Apparates (Cabrera *et al.*, 2003; Denker *et. al.*, 1996; Martin *et. al.*, 1999; Muniz *et al.*, 1996/1997; Mavillard *et al.*, 2010; Stow *et al.*, 1991; Stow und Heimann, 1998). Die Freisetzung des  $\beta/\gamma$ -Subkomplexes vom heterotrimeren G-Protein aktiviert zudem PLC  $\beta 3$  und bedingt die darauffolgende, Diacylglycerol-abhängige Aktivierung von PKC $\eta$  und PKD am trans-Golgi Netzwerk zwecks Kontrolle des gerichteten Transports vom Golgi zur PM (Diaz Anel, 2007; Jamora *et. al.*, 1997).

### 1.3 Das A/B-Toxin Rizin

Das Pflanzentoxin Rizin ist ein heterodimeres Protein, welches in den Samenschalen des Wunderbaums *Ricinus communis* vorkommt wird und zu den potentesten bekannten pflanzlichen Toxinen gehört. Aufgrund seiner außerordentlich hohen Toxizität und der Tatsache, dass bislang keine wirksame Therapie gegen eine Rizin-Intoxikation etabliert wurde, wird das Holotoxin als potentielle bio-terroristische und biologische Waffe klassifiziert. Rizin gehört zu der Gruppe der A/B-Toxine und setzt sich demnach aus zwei funktionell und strukturell unterschiedlichen Untereinheiten zusammen, welche durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind; einer 32 kDa großen, katalytisch aktiven N-Glykosidase-Domäne (RTA) und einer 34 kDa großen, zellbindenden Lektin-Domäne (RTB) (siehe Abb. 4). Dabei vermittelt RTA den eigentlichen toxischen Effekt, während RTB dem Toxin eine effiziente Aufnahme durch jeweilige Zielzellen ermöglicht. Als Galaktose-spezifisches Lektin bindet RTB an freie,  $\beta$ -1,4 verknüpfte Galaktosereste wie sie bei verschiedenen Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Zelloberfläche von Säugerzellen vorkommen (Lord und Spooner, 2011; Sandvig *et al.*, 1976; Spilsberg *et al.*, 2003; Spooner *et al.*, 2004; Spooner und Lord, 2015).

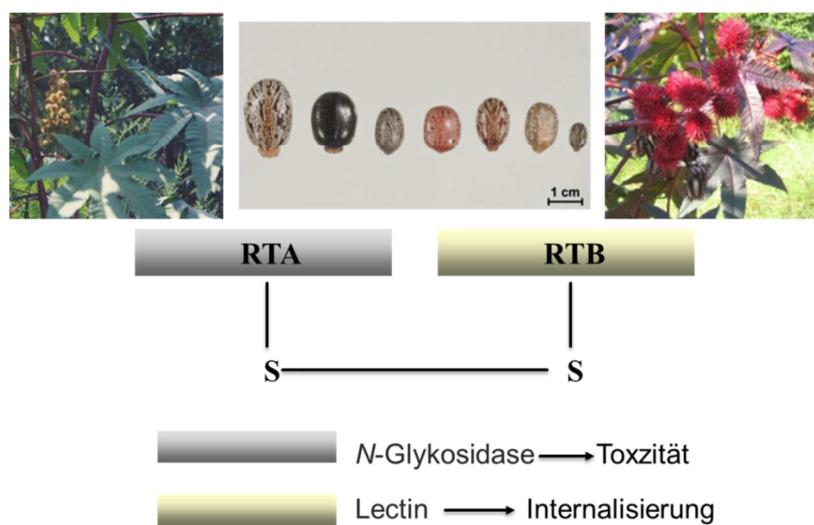


Abbildung4: Oben: Photographische Dokumentation des Wunderbaums *Ricinus communis* sowie einer Auswahl verschiedener Rizinussamen („castor beans“), (Audi *et al.*, 2005; Worbs *et al.*, 2011). Unten: Schematische Untereinheitenstruktur des Pflanzentoxins Rizin bestehend aus den beiden Toxin-Untereinheiten RTA und RTB (verändert nach Peumans *et al.*, 2001)

Ein gewisser Anteil der an die Zelloberfläche gebundenen Rizin-Moleküle wird anschließend endozytiert, wobei sich der Endozytosemechanismus (Clathrin-abhängig oder Clathrin-unabhängig) in Abhängigkeit der Oberflächenstruktur, an welche das Toxinmolekül gebunden

hatte, unterscheiden kann. Nach der Internalisierung sind die Rizinmoleküle zunächst in frühen Endosomen („early endosomes“, EE) lokalisiert und können von dort aus verschiedene weitere Transportrouten einschlagen. Ein großer Anteil der aufgenommenen Toxinmoleküle wird entweder über späte Endosomen zu Lysosomen transportiert und dort degradiert oder verpackt in Recycling-Endosomen zurück zur PM dirigiert und schlussendlich wieder ausgeschieden. Ein kleiner Teil der Rizinmoleküle wird jedoch retrograd über den Golgi ins ER transportiert (van Deurs *et al.*, 1988; Spooner *et al.*, 2006).

Der exakte Transportmechanismus von Rizin ist bislang nicht eindeutig aufgeklärt, jedoch wurde gezeigt, dass der Transport von den endosomalen Kompartimenten zum Golgi-Komplex Rab9- und Rab11-unabhängig abläuft, während vermehrt Hinweise für einen über die Rab6-Isoformen Rab6A bzw. Rab6A' vermittelten Transport sprechen (Iversen *et al.*, 2001; Utskarpen *et al.*, 2006). Auch eine Beteiligung von Dynamin-2 bzw. einem Dynamin-Homolog am retrograden Rizintransport wird diskutiert, da Experimente mit <sup>125</sup>I-markiertem, sulfatiertem Rizin einen inhibitorischen Effekt dieses mutierten Dynamins auf den Rizintransport von den Endosomen zum Golgi-Apparat aufzeigen konnten (Llorente *et al.*, 1998). Ein niedriger endosomaler pH-Wert scheint den Transport allerdings nicht zu beeinflussen (Sandvig und van Deurs, 1996).

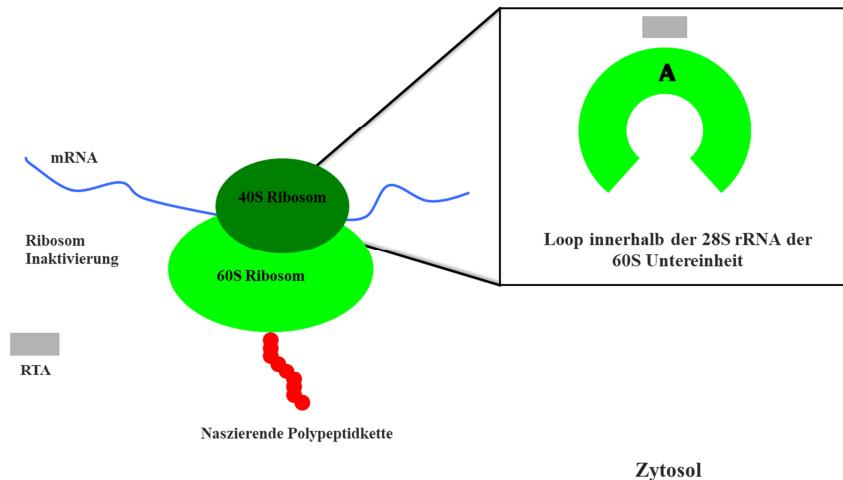
Auch der Transport vom Golgi-Komplex zum ER ist bislang nur oberflächlich verstanden. Der wohl am besten beschriebene Mechanismus zum retrograden Transport Golgi-lokalisierter Proteine zum ER verläuft über COPI-Vesikel nach erfolgter Bindung an den KDEL-R. Allerdings verfügt Rizin nicht über ein KDELR-assoziiertes H/KDEL-ähnliches Sequenzmotiv, womit dieser Mechanismus keine tragende Rolle spielen sollte. Darüber hinaus scheint der Rizintransport zum ER zudem COPI-unabhängig zu verlaufen (Llorente *et al.*, 2003). Es wird diskutiert, ob Rizin möglicherweise an galaktosyliertes Calreticulin bindet und somit ein indirekter Transport vom Golgi zum ER ermöglicht wird, allerdings bleibt der exakte Transportmechanismus auf weiteres unaufgeklärt (Wesche, 2001). Nachdem das A/B-Toxin das Lumen des ER erreicht hat, wird die Disulfidbrücke, welche die beiden Untereinheiten miteinander verbindet, reduktiv gespalten und RTA, nun in seiner potentiell katalytisch aktiven Konformation vorliegend, wird in das Zytosol transloziert, wo es seinen toxischen Effekt ausüben kann. Trotz des oxidierenden Milieus im ER-Lumen wird die Reduktion der Disulfidbrücke über die Proteindisulfidisomerase (PDI) katalysiert (Bellisola *et al.*, 2004; Majoul *et al.*, 1997; Spooner *et al.*, 2004). Die Translokation aus dem ER erfolgt im Falle von RTA höchstwahrscheinlich über „endoplasmatic reticulum associated protein degradation“ (ERAD), einen Mechanismus, dessen Funktion eigentlich in der Markierung und

Vorbereitung falsch gefalteter Proteine für einen späteren proteasomalen Abbau im Zytosol liegt. Dabei ist die Polyubiquitinierung der zu degradierenden Proteine, bevorzugt an Lysinresten, ein essentieller Schritt. Da die katalytisch aktive Rizin-Domäne lediglich über vergleichsweise wenige Lysine verfügt, könnte dieser niedrige Lysingehalt RTA vor der Degradation schützen und einen späteren ERAD-vermittelten Transport in das Zytosol ermöglichen (Hazes und Read, 1997). Experimente mit RTA-Varianten, welche einen höheren Lysingehalt aufweisen, unterstützen diese Vermutung, da sich solche Varianten stets als anfälliger für den proteasomalen Abbau erwiesen (Deeks *et al.*, 2002; Rodighiero *et al.*, 2002). Warum ein eigentlich natives und funktionales Protein wie RTA als potentielles Substrat für den ERAD-Mechanismus in Frage kommt, ist bislang nicht eindeutig geklärt; allerdings steht die Tatsache, dass sich RTA im ER teilweise entfaltet wahrscheinlich damit in Zusammenhang. Nahe dem C-Terminus verfügt RTA über eine größere Region hydrophober Aminosäuren, welche normalerweise durch die angefügte B-Domäne verdeckt wird. Nach der reduktiven Spaltung wird diese Region jedoch zugänglich und kann mit der ER-Membran interagieren. In Kombination mit der thermalen Instabilität von RTA führt eine gerichtete Interaktion mit bzw. Insertion in die ER-Membran zu einer teilweisen Veränderung in der Faltung der dreidimensionalen RTA-Struktur. Es wird vermutet, dass diese Struktur als fehlgefaltetes Protein erkannt und somit ERAD-vermittelt aus dem ER in das Zytosol transloziert wird. Da ERAD-assoziierte Substrate für gewöhnlich in löslicher Form präsent sein müssen, liegt die Vermutung nahe, dass auch Chaperone wie etwa BiP auf diesen Mechanismus einwirken (Lamb *et al.*, 1985; Li *et al.*, 2010; Lord und Spooner, 2011; Spooner *et al.*, 2008). Die exakte Ablauf der RTA-Translokation wurde in verschiedenen Systemen analysiert (*Saccharomyces*, Pflanzenzellen, Säugerzellen), wobei neben einigen allgemeinen Abläufen auch systemspezifische Charakteristika aufgezeigt wurden. In Hefen scheint RTA bevorzugt über nicht-verankerte, nicht-optimierte Dislocons transloziert zu werden und entgeht dabei dem proteasomalen Abbau (Lord und Spooner, 2011). In Pflanzenzellen scheint der Prozess nicht von einer zuvor erfolgten Polyubiquitinierung abhängig zu sein, wenngleich Cdc48 wohl eine wichtige Rolle spielt und ein gewisser RTA Anteil vor der Translokation proteasomal degradiert wird (Di Cola *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 2008). In Säugerzellen ist dieser Prozess bisher am wenigsten charakterisiert. Es existieren zwar Hinweise für eine Beteiligung von Sec61p und dem HRD-Komplex-Regulator SEL1L, was wiederum eine Nutzung wesentlicher ERAD-Komponenten für die Dislokation durch RTA nahelegen würde, jedoch lassen sich auch Argumente finden, die diese Annahme entkräften. So scheint Derlin-1, eine wichtige Komponente des säugerzellspezifischen Dislocons, nicht von Bedeutung für

die RTA-Translokation in Säugerzellen zu sein (Lilley und Ploegh, 2004; Redman *et al.*, 2011; Simpson *et al.*, 1999; Wesche *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2004).

Nachdem RTA schließlich im Zytosol, seinem eigentlichen Wirkungsort, angekommen ist, liegt es zunächst als fehlgefaltetes Protein vor und muss zur Ausübung seines toxischen Effekts wieder in eine aktive Konformation gebracht werden. Zwar wurde *in vitro* beobachtet, dass RTA seine katalytische Aktivität in der Nähe von Ribosomen wiedererlangen kann, *in vivo* scheint für diesen Vorgang jedoch das zytosolische Chaperon Hsc70 benötigt zu werden (Argent *et al.*, 2000; Spooner *et al.*, 2008). Hsc70 übt in diesem Zusammenhang wahrscheinlich zwei wesentliche Funktionen aus. Zum Einen scheint es die Löslichkeit der translozierten RTA-Moleküle zu verbessern und somit eine Ribosomen-unterstützte Rückfaltung in die korrekte Konformation zu ermöglichen; zum anderen könnte Hsc70 die RTA Moleküle durch das Maskieren der hydrophoben Aminosäurebereiche stabilisieren und somit die Interaktion mit der ER Membran einschränken (Lord und Spooner, 2011). Nach erfolgter Translokation und Rückgewinnung der katalytischen Aktivität können die RTA-Moleküle schließlich ihren toxischen Effekt ausüben.

Der eigentliche, toxische Effekt von Rizin beruht auf der permanenten und irreversiblen Inhibierung eukaryotischer Ribosomen (siehe Abb. 5). Durch die katalytische Aktivität als *N*-Glykosidase ist RTA in der Lage, einen spezifischen Adeninrest innerhalb eines hoch konservierten „feedback loop“ der 28S-rRNA der 60S ribosomalen Untereinheit zu deadenylieren. Diese Deadenylierung verhindert eine Wechselwirkung mit dem „chain elongation factor 2“ (ELF2), wodurch eine folgende Interaktion zwischen der mRNA und der rRNA nicht mehr möglich ist. Aufgrund dessen kommt die Proteinbiosynthese an dem betroffenen Ribosom permanent zum Erliegen, was schlussendlich zum Zelltod führt (Endo, 1988; Lord, 2003; Olsnes und Pihl, 1972; Olsnes *et al.*, 1975/1976; Sandvig und van Deurs, 2000).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Ribosomen-inaktivierenden Wirkung von Rizin. Durch die N-Glykosidase Aktivität von RTA wird ein spezifischer Adeninrest innerhalb eines hoch konservierten „feedback loop“ der 28S-rRNA der 60S Untereinheit eukaryotischer Ribosomen deadenyliert. Durch diese Deadenylierung ist eine Interaktion zwischen mRNA und rRNA nicht mehr möglich und die Proteintranslation an dem betroffenen Ribosom kommt irreversibel zum Erliegen (verändert nach Audi *et al.*, 2005).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Es ist hinlänglich bekannt, dass Rezeptor-Clusterbildung in Pro- und in Eukaryonten für die korrekte Erkennung, Verarbeitung und Transduktion verschiedener Signale von entscheidender Bedeutung ist. Zwar wurde dieses Phänomen für eine Reihe wichtiger Rezeptoren, wie etwa Neurotransmitter-Rezeptoren in Säugerzellen oder Chemotaxis-Rezeptoren in Bakterien, beschrieben, die Mechanismen der zugrunde liegenden molekularbiologischen Prozesse sind allerdings bislang nur oberflächlich verstanden. Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit bestand somit darin, das grundlegende Verständnis um die KDELR-Dynamik sowie die KDELR/Liganden-Interaktion in Säugerzellen zu vertiefen sowie die Mechanismen hinsichtlich der KDELR- bzw. Liganden-Clusterformierung und -Entwicklung näher zu charakterisieren. Abschließend sollten die dabei gewonnenen Erkenntnisse die Etablierung eines minimalistischen „Trafficking-Modells“ zur Beschreibung der KDELR-Dynamik und KDELR/Liganden-Interaktionen ermöglichen.

Zum Erreichen dieses Ziels sollten „Live Cell Imaging“-Analysen an Säugerzellen nach externer Applikation fluoreszenzmarkierter Modell-Liganden ( $e\text{GFP-RTA}$ ,  $e\text{GFP-RTA}^{\text{H/KDEL}}$ ,  $\text{RTA-E177D}$ ,  $\text{RTA-E177D}^{\text{HDEL}}$ ) durchgeführt und die zeitabhängige Clusterbildung und -Entwicklung analysiert werden. Dabei war vor allem von Interesse, inwiefern das zusätzliche Anfügen eines KDELR-assoziierten Sequenzmotivs (H/KDEL) die Clusterentwicklung beeinflusst. Ergänzende Studien mit fluoreszenzmarkierten KDELR-Varianten sollten

zusätzlich eine detaillierte Analyse der intrazellulären KDELR-Lokalisation sowie des KDELR-Transports unterstützen, als auch die Dokumentation expliziter KDELR/Liganden-Interaktionen auf Ebene der zellulären PM ermöglichen. Kombiniert mit und unterstützt durch adaptive Monte-Carlo-Simulationen sollten die gewonnenen experimentellen Erkenntnisse schlussendlich die Voraussetzungen für die Konstruktion eines „Trafficking-Modells“ zur Beschreibung der KDELR-Dynamik in Säugerzellen schaffen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verwendete Stämme

##### 2.1.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden der Stammsammlung des Instituts für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Bakterienstämme sowie deren Genotyp und Herkunft

Stamm	Genotyp	Herkunft
<b><i>Escherichia coli</i> Nova Blue Singles</b>	<i>endA1 hsdR17</i> (rK12- mK12+) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> <i>lac F' [proA+B+ lacIqZΔM15::Tn10] (TetR)</i>	Novagen
<b><i>Escherichia coli</i> TOP10</b>	<i>F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80lacZΔM 15 ΔlacX74 recA1</i> <i>deoR araD139 Δ(araleu) 7697</i> <i>galU galK rpsL (StrR) endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<b><i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)</b>	<i>F' ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Biomol (Studier und Moffatt, 1986)

##### 2.1.1.2 Verwendete Hefestämme

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestämme wurden der Stammsammlung des Instituts für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Auflistung der verwendeten Hefestämme sowie deren Genotyp und Herkunft

Stamm	Genotyp	Herkunft
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742</b>	<i>MATA; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <b>YA12</b>	<i>MATa; ade; ade3; his3-200; leu2-3, 112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> (mit Plasmid pYA12(2μURA3 ADE3 SEC12))	Pellham und Semenza
------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------

## 2.1.2 Verwendete Säugerzelllinien

Sämtliche verwendeten Säugerzelllinien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Säugerzelllinien

Zelllinie	Merkmale	Herkunft
<b>HeLa</b>	Humane, epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie, Monolayer, adhärent	ATCC® (CCL-2.2™)
<b>T-REx™ HeLa</b>	Humane, epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie, Monolayer, adhärent, Tetrazyklin basierte Kontrolle der Genexpression	Thermo Fisher Scientific
<b>HEK-293</b>	Humane, embryonale Nierenzelllinie, Fibroblasten-Zellen, Monolayer, adhärent und in Suspension	Sigma-Aldrich
<b>Flp-In™ T-REx™ HEK-293</b>	Humane, embryonale Nierenzelllinie, Fibroblasten-Zellen, Monolayer, adhärent und in Suspension, spezialisiert auf den Einbau von Flp-InTM Expressionsvektoren, Tetrazyklin basierte Kontrolle der Genexpression	Thermo Fisher Scientific
<b>Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Erd2.1-mCherry</b>	Flp-In™ T-REx™ HEK-293 nach erfolgter, stabiler Integration einer mCherry markierten Erd2.1-Variante	Vorliegende Arbeit
<b>Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Erd2.1-FLAG</b>	Flp-In™ T-REx™ HEK-293 nach stabiler Integration einer FLAG markierten Erd2.1-Variante	Vorliegende Arbeit
<b>HEp-2</b>	Humane, epitheliale, Karzinom-Zellline, enthält humane Papilloma Viren, adhärent	ATTC® (CCL-23™)

<b>SH-SY5Y</b>	Humane, epitheliale Neuroblastoma-Zelllinie, adhärent und in Suspension	ATTC® (CRL-2266™)
<b>RAW-Blue™</b>	Makrophagenzelllinie aus <i>Mus musculus</i> , etabliert aus Tumorgeweben (induziert durch "Abelson murine leukemia virus"), adhärent	Invivogen®
<b>IC-21</b>	Peritoneale Makrophagenzelllinie aus <i>Mus musculus</i> , etabliert aus SV40 transformierten C57BL/6 Makrophagen, adhärent	ATCC® (TIB-189™)

### 2.1.3 Verwendete Plasmide

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Plasmide sind in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Plasmide sowie deren Beschreibung und Herkunft**

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
<b>pET-24a<sup>+</sup></b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> - Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG- induzierbarem T7-Promotor	Novagen
<b>pET-24a<sup>+</sup>-RTA</b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> - Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG- induzierbarem T7-Promotor sowie RTA Sequenz	Björn Becker, Dissertation
<b>pET-24a<sup>+</sup>-RTA<sup>HDEL</sup></b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> - Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG- induzierbarem T7-Promotor sowie RTA Sequenz mit C-terminalem HDEL-Motiv	Björn Becker, Dissertation

<b>pET-24a<sup>+</sup>-RTA<sup>KDEL</sup></b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG-induzierbarem T7-Promotor sowie RTA Sequenz mit C-terminalem KDEL-Motiv	Björn Becker, Dissertation
<b>pET-24a<sup>+</sup>-eGFP-RTA</b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG-induzierbarem T7-Promotor sowie eGFP-getaggrter RTA Sequenz	Björn Becker, Dissertation
<b>pET-24a<sup>+</sup>-eGFP-RTA<sup>HDEL</sup></b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG-induzierbarem T7-Promotor sowie eGFP-getaggrter RTA Sequenz mit C-terminalem HDEL-Motiv	Björn Becker, Dissertation
<b>pET-24a<sup>+</sup>-eGFP-RTA<sup>KDEL</sup></b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG-induzierbarem T7-Promotor sowie eGFP-getaggrter RTA Sequenz mit C-terminalem KDEL-Motiv	Björn Becker, Dissertation
<b>pET-24a<sup>+</sup>-eGFP-RTAE177D</b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG-induzierbarem T7-Promotor sowie eGFP-getaggrter RTAE177D Sequenz	Björn Becker, Dissertation
<b>pET-24a<sup>+</sup>-eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup></b>	Expressionsvektor mit <i>KanR</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG-induzierbarem T7-Promotor sowie eGFP-getaggrter RTAE177D Sequenz mit C-terminalem HDEL-Motiv	Björn Becker, Dissertation
<b>pRS-315</b>	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), Promotor P <sub>Gal</sub> , „autonomously replicating sequence“ (ARS), <i>LEU2</i> - und <i>AmpR</i> -Gen	Sikorski und Hieter, 1989

<b>pRS-315-Erd2.1mC</b>	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), Promotor P <sub>Gal</sub> , „autonomously replicating sequence“ (ARS), LEU2- und AmpR-Gen sowie mCherry getaggter Erd2.1 Sequenz	Vorliegende Arbeit
<b>pRS-315-Erd2.2mC</b>	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), Promotor P <sub>Gal</sub> , „autonomously replicating sequence“ (ARS), LEU2- und AmpR-Gen sowie mCherry getaggter Erd2.2 Sequenz	Vorliegende Arbeit
<b>pRS-315-Erd2.3mC</b>	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), Promotor P <sub>Gal</sub> , „autonomously replicating sequence“ (ARS), LEU2- und AmpR-Gen sowie mCherry getaggter Erd2.3 Sequenz	Vorliegende Arbeit
<b>pRS-315-Erd2p</b>	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), Promotor P <sub>Gal</sub> , „autonomously replicating sequence“ (ARS), LEU2- und AmpR-Gen sowie Erd2p Sequenz	Julia Dausend, Dissertation
<b>pRS-315-Erd2ΔC</b>	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), Promotor P <sub>Gal</sub> , „autonomously replicating sequence“ (ARS), LEU2- und AmpR-Gen sowie einer C-terminal verkürzten, nicht funktionalen Erd2p Sequenz	Julia Dausend, Dissertation
<b>pcDNA3.1</b>	Säugerexpressionsvektor	Thermo Fisher Scientific
<b>pcDNA3.1-Erd2.1mC</b>	Säugerexpressionsvektor mit einer mCherry markierten Erd2.1 Sequenz	Vorliegende Arbeit
<b>pcDNA3.1-Erd2.2mC</b>	Säugerexpressionsvektor mit einer mCherry markierten Erd2.2 Sequenz	Vorliegende Arbeit
<b>pcDNA3.1-Erd2.3mC</b>	Säugerexpressionsvektor mit einer mCherry markierten Erd2.3 Sequenz	Vorliegende Arbeit
<b>pcDNA5/FRT/TO</b>	Expressionsvektor zur stabilen Integration von DNA mit HygromycinR-Gen, Tetrazyklin-induzierbarem CMV-Promotor, FRT-Stellen	Invitrogen

<b>pcDNA5/FRT/TO-Erd2.1mC</b>	Expressionsvektor zur stabilen Integration von DNA mit <i>HygromycinR</i> -Gen, Tetrazyklin-induzierbarem CMV-Promotor, FRT-Stellen und einer mCherry markierten Erd2.1 Sequenz	Vorliegende Arbeit
<b>pcDNA5/FRT/TO-Erd2.2mC</b>	Expressionsvektor zur stabilen Integration von DNA mit <i>HygromycinR</i> -Gen, Tetrazyklin-induzierbarem CMV-Promotor, FRT-Stellen und einer mCherry markierten Erd2.2 Sequenz	Vorliegende Arbeit
<b>pcDNA5/FRT/TO-Erd2.1-FLAG</b>	Expressionsvektor zur stabilen Integration von DNA mit <i>HygromycinR</i> -Gen, Tetrazyklin-induzierbarem CMV-Promotor, FRT-Stellen und einer FLAG markierten Erd2.1 Sequenz	Vorliegende Arbeit

## 2.1.4 Oligonukleotide

Sämtliche im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer können der nachstehenden Tabelle 5 entnommen werden.

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Primer in 5'-3' Leserichtung

Primer	5'-3' Sequenz
<b>5'Erd2.1</b>	gaattctctagaATGAATCTCTCCGATTCCCTGGGAGAC
<b>5'Erd2.2</b>	gaattctctagaATGAACATTTCCCGCTGACTGGGG
<b>5'Erd2.3</b>	gaattctctagaATGAACGTGTTCCGAATCCTCGG
<b>5'Erd2.1mCherry SOE</b>	GGAAGAAAGTTGAGTTGCCGGCAATGGTGAGCAAGGGCGAG GAG
<b>5'Erd2.2mCherry SOE</b>	GGAAAGAAGCTCAGTTGCCAGCAATGGTGAGCAAGGGCGA GGAG
<b>5'Erd23mCherry SOE</b>	GAAAGAACTTAAGTCTCCAATGCCAATCTGAATGGTGAGCA AGGGCGAGGAG
<b>3'Erd2.1mCherry SOE</b>	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATGCCGGCAAACCTCAACTTCTTC C
<b>3'Erd2.2mCherry SOE</b>	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATGCCGGCAAACTGAGCTTCTT CC

<b>3'Erd2.3mCherry</b>	CTCCTCGCCCTTGCTCACCAATTGAGATTGGCATTGGAAGACTT
<b>SOE</b>	AACTTCTTTC
<b>3'mCherry</b>	ggatccgggcccTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

## 2.1.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Nitrocellulose-Membran	Roche
Whatman-Papier	BioRad, München
Dialysemembranen	Millipore, Deutschland
Kryoröhrchen	Nalgene, Cryoware
Zellkulturflaschen	Cellstar/Greiner
24/48/96-Well Zellkulturtetsplatten	TPP/Cellstar/Greiner
Microwell-Testplatten	Thermo Scientific
Elektroporationsküvette	BioRad
Hyper Ladder 1 kb	Bioline
Prestained Protein Ladder	Fermentas
Protease-Inhibitor (EDTA frei)	Roche
RNase	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas/AppliChem
T4 DNA Ligase Puffer	Fermentas/AppliChem
dNTPs	Roche
Restriktionsendonukleasen	Fermentas/Roche
μ-Dishes, 35 mm high	Ibidi
μ-Dishes, 35 mm high glass bottom	Ibidi
μ-Dishes, 35 mm high grid	Ibidi

Nicht explizit aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen „AppliChem“, „Roth“ bzw. „Merk“ erworben.

## 2.1.6 Verwendete Kits

pSTBlue-1 AccepTor <sup>TM</sup> Vector Giga Kit	Novagen
innuPREP Plasmid Mini Kit	analytic Jena
Bicinchoninic acid Kit for protein determination	Sigma

Gel Extraction Kit	Omega bio-tek
Gene Elute HP Plasmid MidiPrep Kit	Sigma Aldrich
<i>In vitro</i> Toxicology Assay Kit, XTT based	Sigma-Aldrich
Flp-In™ T-REx™ Core Kit	Thermo Fisher Scientific
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega
Western Lightning Plus	Perkin Elmer

## 2.1.7 Verwendete Antikörper

Verwendete primäre Antikörper sind in Tabelle 6 gelistet.

**Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper samt eingesetzter Verdünnung und Herkunft**

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
<b>anti-PE, Maus</b>	1:50	Sigma

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierungsbedingungen

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium bei 37 °C über Nacht und unter konstantem Schütteln bei 220 rpm im Schüttelinkubator Multitron der Firma „Infors“. Zur Anzucht von *E. coli*-Kolonien wurden LB Agarplatten verwendet. Zwecks langfristiger Lagerung wurden Kryokulturen angelegt und bei -80 °C gelagert (siehe 2.2.1.4).

#### 2.2.1.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* Flüssigkulturen erfolgte in YPD-Medium oder einem geeigneten definierten Mangel-Medium („drop-out“ bzw. d/o-Medium) bei 30 °C über Nacht unter konstantem Schütteln bei 220 rpm im Schüttelinkubator Multitron der Firma „Infors“.

Die Anzucht von Kolonien erfolgte mittels YPD- bzw. d/o-Agarplatten über einen Zeitraum von 3-5 d bei 30 °C. Zur langfristigen Lagerung wurden Kryokulturen angelegt und bei -80 °C gelagert (siehe 2.2.1.4).

### 2.2.1.3 Kultivierung von Säugerzellen

Adhärente HeLa, HEK-293, SHSY-4Y, RAW-Blue und HEp2-Zellen wurden wie unter 2.2.5.1 beschrieben aufgetaut und in DMEM-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS; 30 min bei 56 °C) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Adhärente IC21-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.2.1.4 Herstellung von Kryokulturen für Bakterien und Hefen

1 ml einer frischen Übernachtkultur wurde mit 1 ml 99 % Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt und fortan bei -80 °C gelagert. Zur Kryokonservierung von Säugerzellen siehe 2.2.5.1.2.

### 2.2.1.5 Verwendete Nährmedien und Lösungen

Sämtliche Medien und Lösungen wurden, sofern nichts anderes angegeben, 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei RT gelagert. Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

#### LB-Medium

Trypton/Pepton	1 %
Hefe-Extrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden zusätzlich 1,5 % Agar zugegeben. Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

### SOC-Medium

Trypton	2 %
Hefe-Extrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
Glukose	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
KCl	10 mM

Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

### YPD-Medium

Glukose	2 %
Pepton	2 %
Hefe-Extrakt	1 %

Die Glukose wurde in 200 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst, während der Rest in 800 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst wurde. Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und anschließend vereint.

### 10 x „drop-out“ Mix

Adenin, Uracil, Histidin	
Arginin, Tryptophan, Methionin	jeweils 0,2 g/l
Tyrosin, Lysin, Isoleucin	jeweils 0,3 g/l
Phenylalanin	0,5 g/l
Leucin, Aspartat	jeweils 1 g/l
Threonin	2 g/l
Valin	2,5 g/l

Zur Herstellung eines Selektionsmediums wurden entsprechende Aminosäuren weggelassen und die übrigen Zusätze den Angaben entsprechend abgewogen und in einem Mörser durchmischt.

### Definiertes Mangel-Medium („drop-out“ bzw. d/o)

#### Lösung A:

Ammoniumsulfat	5 g/l
„drop-out“ Mix	0,87 g/l

Der Ansatz wurde in 250 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst

## Lösung B

Glukose/Raffinose/(Galaktose)                    20 g/l / (30 g/l)

Zur Herstellung von Glukose- bzw. Raffinose-haltigem Medium wurden 20 g/l des entsprechenden Zuckers eingewogen. Für Galaktose-haltige definierte Mangelmedien wurde 30 g/l Galaktose eingewogen. Zur Herstellung von Agarplatten wurden zusätzlich 15 g/l Agar zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend in 700 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

## Lösung C

YNB w/o amino acids                            1,7 g/l

Der Ansatz wurde in 50 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst, sterilfiltriert und anschließend mit den autoklavierten Lösungen A und B zum fertigen definierten Mangelmedium vereint.

## DMEM-Medium

Dulbeco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) wurde von der Firma „Sigma-Aldrich“ bezogen und bei 4 °C gelagert.

## RPMI-1640-Medium

RPMI-1640-Medium wurde von der Firma „Sigma-Aldrich“ bezogen und bei 4 °C gelagert.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 PCR („Polymerase Chain Reaction“) Varianten**

#### **2.2.2.1.1 PCR („Polymerase Chain Reaction“)**

Die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) ist eine von Karry Mullis 1983 entwickelte Methode, um *in vitro* ausgewählte Nukleinsäureabschnitte mittels flankierender Primer zu amplifizieren. Standartmäßig wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgendes Protokoll verwendet:

DNA	0,2 µl
Primer 5'	0,25 µl
Primer 3'	0,25 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
10 x Taq-Puffer	5 µl
dNTPs (Roche)	1 µl
H <sub>2</sub> O dest.	ad 50 µl
94 °C	2 min
94 °C	30 s
57 °C	30 s
72 °C	1 min
72 °C	7 min

27 Zyklen

#### 2.2.2.1.2 SOE („Splicing by Overlapping Extension“) PCR

Die SOE-PCR stellt eine spezielle Variante der PCR dar, die es ermöglicht, lückenlose Fusionsgenabschnitte zweier unterschiedlicher DNA-Ursprungssequenzen herzustellen. Hierzu werden die beiden zu fusionierenden Nukleinsäureabschnitte zunächst in einer ersten PCR getrennt voneinander amplifiziert, wobei darauf zu achten ist, dass der 3'-Primer des ersten Genabschnitts und der 5'-Primer des zweiten jeweils homologe Sequenzen aus den 5'- bzw. 3'-Enden der jeweiligen Genabschnitte enthalten. In einer darauffolgenden zweiten PCR werden diese Amplifikate als Template eingesetzt. Zusätzlich enthält dieser zweite PCR-Ansatz lediglich die flankierenden Primer der ersten PCR (5'-Primer Genabschnitt 1 und 3'-Primer Genabschnitt 2). Durch das darauffolgende „Annealing“ der überlappenden Bereiche findet eine vollständige Replikation des neuen Fusionsgenabschnittes statt. Standartmäßig wurde für alle SOE-PCRs folgendes Protokoll verwendet:

##### 1. PCR

Puffer	2,5 µl
Primer 5'	0,25 µl
Primer 3'	0,25 µl
dNTPs	0,5 µl

DNA	1 µl
Polymerase	0,25 µl
H <sub>2</sub> O dest.	ad 25 µl

Verwendet wurde das „FastStart High Fidelity PCR System“ der Firma „Roche“

95 °C	2 min	
95 °C	20 s	
57 °C	20 s	25 Zyklen
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

## 2. PCR

Puffer	2,5 µl
Primer 5'	0,25 µl
Primer 3'	0,25 µl
dNTPs	0,5 µl
DNA	je 2,5 µl
Polymerase	0,25 µl
H <sub>2</sub> O dest.	ad 25 l

Als Template wurden die gereinigten Amplifikate der ersten PCR eingesetzt. Verwendet wurde das „FastStart High Fidelity PCR System“ von „Roche“.

95 °C	2 min	
95 °C	20 s	
54 °C	20 s	25 Zyklen
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

### **2.2.2.2 Agarosegelektrophorese**

Die Agarosegelektrophorese ist eine Methode zur großenabhängigen Auf trennung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld. In einem basischen Milieu wandern die Nukleinsäuren nach Anlegung einer elektrischen Spannung aufgrund ihres stark negativ geladenen Phosphatrückrades zur Anode. Große Fragmente bewegen sich dabei langsamer als

kleine durch das feinporige Agarosegel. Die Agarosekonzentration des verwendeten Gels bestimmt dabei die Effizienz der Auftrennung, wobei ein höherer Agarosegehalt in der Regel eine feinere Auftrennung bedingt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Die Proben wurden dabei jeweils mit 5 x GLB versetzt (Endkonzentration 1 %) und bei 400 mA und 160 V in 1 x TE-Puffer aufgetrennt. Für große Gele wurde die Spannung auf maximal 250 V erhöht. Als Größenstandart wurde der Marker „Hyper Ladder“ der Firma „Bioline“ verwendet. Abschließend wurden die Gele mindestens 10 min in Ethidiumbromid inkubiert und mit dem „ChemiDoc-XRS-System“ der Firma „Biorad“ und der Software „Quantity One“ analysiert.

#### 10 x TBE-Puffer

Tris/HCL	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA	20 mM

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt und die einzelnen Bestandteile in H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

#### GLB-Puffer

Glycerin (96 %)	50 %
SDS	1 %
EDTA	125 mM
Bromphenolblau	0,05 %
Xylencyanol	0,05 %

Die einzelnen Bestandteile wurden in H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

### **2.2.2.3 Methoden zur DNA Isolierung**

#### 2.2.2.3.1 Alkalische Lyse

Bei der alkalischen Lyse handelt es sich um eine gängige Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA. Hierbei wurden 1,5 ml einer frischen *E. coli* Übernachtkultur 1 min bei

13000 rpm zentrifugiert, der Überstand (ÜS) verworfen und das Pellet in 100 µl GTE resuspendiert. Dabei ist auf eine vollständige Resuspendierung des Zellpellets zu achten, da dies die Effizienz der DNA-Isolierung maßgeblich beeinflusst. Die Suspension wurde 5 min bei RT inkubiert, mit 200 µl NaOH-SDS versetzt, mehrfach vorsichtig invertiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 150 µl KAC zugegeben, kräftig geschüttelt und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation wurden 400 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß mit 800 µl Ethanol (99%/vergällt) überführt, vorsichtig invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde fortan bei -20 °C gelagert.

#### GTE

Glucose	50 mM
Tris/HCL	25 mM
EDTA	10 mM

Die einzelnen Bestandteile wurden in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt.

#### NaOH-SDS

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

Die einzelnen Bestandteile wurden in H<sub>2</sub>O dest. gelöst

#### Kaliumacetat

Eisessig	29,5 ml
----------	---------

Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O dest. auf 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert mit KOH auf 4,8 eingestellt.

### 2.2.2.3.2 MiniPrep-Plasmidisolierung

Eine MiniPrep-Plasmidisolierung ermöglicht im Vergleich zur alkalischen Lyse eine vielfach reinere Isolierung von Plasmid-DNA. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das „innuPREP Plasmid Mini Kit“ der Firma „Analytic Jena“ verwendet und die

Plasmidisolierung nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.2.3.3 MidiPrep-Plasmidisolierung

Bei der MidiPrep-Plasmidisolierung handelt es sich um eine Variante der MiniPrep-Plasmidisolierung, die zur Isolierung und Reinigung größerer DNA Mengen geeignet ist. Für solche MidiPrep-Plasmidisolierungen wurde das „Gene Elute HP Plasmid MIDIPrep Kit“ der Firma „Sigma Aldrich“ verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt

#### 2.2.2.3.4 DNA Isolierung aus Agarosegelen

Zur Reisolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das „Gel Extraction Kit“ der Firma „Omega bio-tek“ verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die DNA wurde anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.2.4 Restriktionsanalysen

Sämtliche im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Restriktionsanalysen wurden mit Restriktionsenzymen und Puffersystemen der Firma „Fermentas“ durchgeführt. Die verwendete Menge an Enzym und entsprechendem Puffer entsprach stets den Herstellerangaben. Präparative Restriktionen wurden über einen Zeitraum von 3 h bei 37 °C inkubiert, wohingegen Restriktionen zu Kontrollzwecken lediglich 1-2 h bei 37 °C inkubiert wurden. Eine Ausnahme bildeten Restriktionsansätze, die das Enzym *ApaI* enthielten, diese wurden bei 30 °C inkubiert. Um die Effizienz der übrigen Restriktionsenzyme nicht zu beeinträchtigen, wurde die DNA zunächst ausschließlich mit *ApaI* verdaut, nach gelelektrophoretischer Auf trennung reisoliert und anschließend mit dem zweiten Restriktionsenzym erneut verdaut (37 °C). Die eingesetzte DNA-Menge betrug immer 1 µg. Sämtliche Ansätze wurden nach der Inkubation mit 5 µl GLB versetzt (Endkonzentration in der Probe 1 x) und gelelektrophoretisch analysiert.

### **2.2.2.5 Ligation**

Enzymatisch linearisierte DNA-Fragmente können durch Verwendung geeigneter DNA-Ligasen wieder zu einem vollständigen Plasmid zusammengefügt werden. Die Ligase katalysiert hierbei die dafür notwendige Bildung von Phosphodiester-Bindungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden T4-DNA Ligasen der Firmen „Fermentas“ und „Applichem“ verwendet. Standartmäßig wurde für Ligationsansätze folgendes Protokoll verwendet:

Vektor-DNA	7 µl
Insert-DNA	10 µl
Ligase	1 µl
10 x Ligase-Puffer	2 µl

Das Verhältnis aus eingesetzter Vektor- und Insert-DNA konnte je nach DNA-Gehalt variieren. Die Inkubation der Ansätze erfolgte entweder bei 16 °C über Nacht oder für 2 h bei RT.

### **2.2.2.6 Transformation von *E. coli***

#### **2.2.2.6.1 AccepTor<sup>TM</sup> Klonierung**

Zur Überprüfung der korrekten Identität entsprechender Konstrukte wurden diese in den „AccepTor<sup>TM</sup> Vector pSTBlue-1“ kloniert. Dabei wurde das „pSTBlue Vector Giga Kit“ der Firma „Novagen“ verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die Konstrukte wurden anschließend von der Firma „GATC Biotech (Köln)“ sequenziert.

#### **2.2.2.6.2 Elektroporation von *E. coli***

Die Elektroporation ist eine Methode zur Transformation von Bakterienzellen, bei der durch schwache elektrische Impulse Poren in der Membran der zu transformierenden Zelle erzeugt werden. Vor der eigentlichen Transformation müssen zunächst elektrokompetente Bakterienzellen hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurden 5 ml einer frischen Übernachtkultur von *E. coli* Top10 in 500 ml LB Medium überimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 1-1,5 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die OD wurde

spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen zellfreies LB-Medium als Referenz überprüft. Nach Erreichen der gewünschten OD wurde die Zellsuspension 15 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Bei sämtlichen folgenden Arbeitsschritten ist darauf zu achten, die Zellen möglichst auf Eis zu lagern. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 100 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin gewaschen und 5 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Rückfluss resuspendiert. Die Suspension wurde im Anschluss in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 200 µl eiskaltem 10 %-igem Glycerin aufgenommen. Abschließend wurden die nun elektrokompetenten Zellen zu je 40 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Um die Leitfähigkeit der Ligationsansätze, welche für die Transformation eingesetzt werden zu reduzieren, wurden diese im Vorfeld durch Dialyse entsalzt. Diese Dialyse wurde 40 min gegen 10 %-iges Glycerin auf Dialysemembranen der Firma „Millipore (0,025 µm)“ durchgeführt. Dem Liagtionsansatz wurde anschließend 1 Tropfen steriles Glycerin (99 %) hinzugefügt und zu den kompetenten Zellen gegeben. Die eigentliche Elektroporation wurde in Elektroporationsküvetten und dem Elektroporator „Gene Pulser II“ der Firma „Biorad“ bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm durchgeführt. Danach wurden die Zellen sofort in 800 µl vorgewärmtes SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 300 µl der transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit einem geeigneten Antibiotikum zur Selektion ausplattiert. Hierzu wurden vorher je 20 µl einer 25 mg/ml Kanamycin-Stammlösung bzw. 40 µl einer 50 mg/ml Ampicilin-Stammlösung mit H<sub>2</sub>O dest. auf 200 µl aufgefüllt und das gesamte Volumen auf den LB-Agarplatten ausplattiert. Abschließend wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert und auf gewachsene Kolonien überprüft.

### **2.2.2.7 Methoden zur DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration isolierter Plamid-DNA wurde mit dem NanoDrop 2000c Spektrophotometer der Firma „Peqlab Biotechnologie GmbH“ bestimmt. Alternativ wurde zur Konzentrationsbestimmung das Spektralphotometer „UV-visible Spectrometre“ der Firma „Pharmacia Biochrom“ verwendet. Hierzu wurden die Proben 1:60 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette gemessen.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 SDS-PAGE

Durch eine SDS-Gelelektrophorese können Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach getrennt werden. Das Prinzip entspricht dabei dem der Agarosegelelektrophorese. Vor der eigentlichen Trennung werden die Proben mit SDS-Probenpuffer (denaturierend) versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht. Zur Analyse von Membranproteinen wurden die Ansätze 15 min bei 55 °C inkubiert. Nachdem die Proben auf die SDS-Gele aufgetragen wurden (siehe Tab. 7) wurden diese mit 1 x Kathoden- und 1 x Anodenpuffer aufgetrennt. Die angelegte Spannung betrug dabei zu Beginn 80 V und wurde nach etwa 15 min auf 120 V erhöht. Die Gele wurden im Anschluss entweder für Western-Analysen oder Coomassie-Färbungen eingesetzt.

Anodenpuffer (5 x) Tris/HCl 121,1 g/l

Tris/HCl wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

Kathodenpuffer (5 x)

Tris/HCl 60,55 g/l

SDS 5 g/l

Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

SDS Probenpuffer (reduzierend)

Tris/HCl pH 8,45 900 mM

Glycerol 24 %

SDS 4 %

β-Mercaptoethanol 10 %

Phenolrot Spatelspitze

Serwa Blue White Spatelspitze

## SDS-Gele

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE (Rezept für 2 Gele)

Trenngel	Sammelgel
5,88 ml Rotiphorese Gel 30	1,62 ml Rotiphorese Gel 30
5 ml Tris/HCl pH 8,45	3,1 ml Tris/HCl pH 8,45
2,12 ml H <sub>2</sub> O dest.	7,78 ml H <sub>2</sub> O dest.
2 ml Glycerin (79 %)	25 µl TEMED
25 µl TEMED	80 µl Ammoniumperoxodisulfat (10 %)
80 µl Ammoniumperoxodisulfat (10 %)	

### **2.2.3.2 Coomassie Färbung**

Die Coomassie Färbung ist eine Methode zur unspezifischen Färbung von Proteinen. Dabei interagiert der Triphenylmethan-Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue“ im sauren Milieu mit den basischen und aromatischen Aminosäureseitenketten der zu färbenden Proteine. Nach erfolgter Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Gele mit der entsprechenden Färbelösung benetzt, die Färbelösung kurz aufgekocht und danach 20-30 min bei RT unter sanftem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Gele mehrmals mit Entfärbelösung gewaschen und photographisch dokumentiert.

#### Färbelösung

Coomassie blau R                            0,1 %

Der Ansatz wurde mit Entfärbelösung aufgefüllt.

#### Entfärbelösung

Methanol                                    30 %

Essigsäure (99,5 %)                      7,5 %

### 2.2.3.3 Western Blot Analyse

Ein Western Blot ist eine Methode zur Überführung von Proteinen auf eine geeignete Trägermembran. Üblicherweise werden dafür PVDF-Membranen eingesetzt. Im Anschluss können die so übertragenen und immobilisierten Proteine auf unterschiedliche Weise weiter analysiert werden. Nach Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Gele wenige Minuten unter sanftem Schütteln in Transferpuffer äquilibriert. Blottingpapiere sowie die Nitrozellulosemembran (jeweils zugeschnitten auf 9,5 x 6 cm) wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Die verwendete Membran wurde im Vorfeld zusätzlich in Methanol geschwenkt. Für sämtliche Western Blot Analysen wurde das „SemiDry“-Blotting-Verfahren angewandt. Hierzu wurden Blottingpapier, Membran, SDS-Gel und ein weiteres Blottingpapier schichtweise aufeinander gestapelt. Die Überführung der Proteine auf die Membran wurde über einen Zeitraum von 1,5 h bei 15 V und 50 mA pro Gel im „Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell-System“ der Firma „Biorad“ durchgeführt. Anschließend wurde die Membran entweder 1 h bei 20 °C oder über Nacht bei 4 °C in 15 ml Blockingpuffer unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach dem Blocken wurde die Blockinglösung verworfen und die Membran 1 h bei 20 °C mit 10 ml der primären Antikörperlösung unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran 3-mal 8 min in Waschpuffer unter Schütteln gewaschen bevor sich eine einstündige Inkubation mit 10 ml der sekundären Antikörperlösung anschloss. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal 8 min gewaschen und die Membran analysiert. Zum Entwickeln wurden 400 µl einer 1:1 Mischung aus Luminol-Lösung und Enhancer-Lösung gleichmäßig auf die Membran gegeben und diese im Anschluss mithilfe des ChemiDoc-XRS-Systems“ von „Biorad“ und der Software „Quantity One“ analysiert und dokumentiert.

#### Transferpuffer

Tris/HCl	3,3 g/l
Glycin	14,4 g/l
Methanol	20 %
SDS	1 g/l

Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst

### Waschpuffer

Tris/HCL	0,1 M
NaCl	0,1 M
Tween 20	0,05 %

Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst

### Blockingpuffer

5 % Magermilch in Waschpuffer

### Entwickler

Western Lightning plus ECL Enhanced Luminol Reagent	50 %
Western Lightning plus ECL Enhanced Oxidizing Reagent	50 %

## **2.2.3.4 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli***

### **2.2.3.4.1 Rekombinante Expression nicht fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten**

Zur rekombinanten Expression von RTA<sup>His</sup>, RTA<sup>His-HDEL</sup> sowie RTA<sup>His-KDEL</sup> wurden jeweils 500 ml LB-Medium mit 5 ml der entsprechenden frischen Übernachtkultur beimpft und bis zum Erreichen der OD<sub>600</sub> zwischen 1 und 1,5 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Danach wurde die Expression der RTA-Varianten durch Zugabe von 1 mM IPTG und anschließender Inkubation für 3 h unter Schütteln bei 28 °C induziert.

### **2.2.3.4.2 Rekombinante Expression fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten**

Zur rekombinanten Expression der fluoreszenzmarkierten RTA-Varianten eGFP-RTA<sup>His</sup>, eGFP-RTA<sup>His-HDEL</sup>, eGFP-RTA<sup>His-KDEL</sup> sowie der RTA-Varianten mit verminderter katalytischer Aktivität eGFP-RTA-E177D<sup>His</sup> und eGFP-RTA-E177D<sup>His-HDEL</sup> wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer entsprechenden, frischen Übernachtkultur beimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> zwischen 1 und 1,5 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Danach wurde die Expression der RTA-Varianten durch Zugabe von 1 mM IPTG und anschließender Inkubation für 5 h bei 20 °C unter Schütteln induziert.

#### **2.2.3.4.3 Rekombinante Expression verschiedener eGFP-Varianten**

Die rekombinante Expression von eGFP<sup>His</sup> sowie eGFP<sup>His-HDEL</sup> erfolgte analog zu der rekombinanten Expression nicht fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten (siehe 2.2.3.4.1)

##### **IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)**

IPTG wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.3.5 Zellernte und Zellaufschluss von *E. coli***

Die Zellen wurden 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Bindepuffer (siehe 2.2.3.6) resuspendiert und die Suspension bei -80 °C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung unter Verwendung des „Soniprep 150 Ultrasonic Desintegrator“ der Firma „MSE“. Vor dem Aufschluss wurde der Zellsuspension 20 µl/ml EDTA-freier Proteaseinhibitor (Roche) zugegeben. Die Beschallung der Zellen erfolgte in 5 Zyklen mit jeweils 15 s Dauer und 30 s Pause bei 20 Microns. Dabei war darauf zu achten, die Zellen stets ausreichend zu kühlen. Anschließend wurde das Lysat zu je 2 ml aliquotiert, 10 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert, filtriert und zur Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie eingesetzt.

#### **2.2.3.6 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie**

Die Reinigung der Proteine erfolgte über das angefügte His<sub>6</sub>-Tag unter Verwendung einer „HisTrap HP“ Säule (5 ml) von „GE Healthcare“ und einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 4 ml/min. Das korrekte Binden der Proteine an die Säulenmatrix wurde dabei durch einen Bindepuffer mit niedrigem Imidazolgehalt (10 mM) unterstützt, wogegen ungebundene Proteine während dieses Prozesses durch Waschen entfernt wurden. Die anschließende Elution der gereinigten Proteine erfolgte mithilfe eines Elutionspuffers mit entsprechend hohem Imidazolgehalt (500 mM). Im Anschluss an die Reinigung wurde das Eluat in 1 x PBS umgepuffert. Dieser Pufferaustausch erfolgte über zwei hintereinandergeschaltete „HiTrap desalting“ Säulen der Firma „GE Healthcare“ bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min. Das Eluat wurde abschließend durch wiederholte Zentrifugation in „Vivaspin 20

columns“ mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa der Firma „Sartorius“ konzentriert. Die Vorbereitung und Lagerung sämtlicher verwendeter Säulen erfolgte nach Herstellerangaben.

## Bindepuffer

NaCl	500 mM
Imidazol	10 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	20 mM

Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt

## Elutionspuffer

NaCl 500 mM  
Imidazol 500 mM  
Kaliumdihydrogenphosphat 20 mM

Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und der pH-Wert auf 7.2 eingestellt.

### **2.2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde das „Pierce Protein BCA Kit“ der Firma „Thermo Scientific“ verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

## **2.2.4 Hefespezifische Methoden**

#### 2.2.4.1 Lithiumacetat-Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Das Prinzip der Lithiumacetat-Transformation von Hefezellen beruht auf der Begünstigung der Hitzeschock bedingten Aufnahme von Fremd-DNA über die Oberfläche von Hefezellen durch vorhergehende Behandlung mit Alkali-Kationen und „Carrier-DNA“. 2 ml einer frischen Übernachtkultur von *Saccharomyces cerevisiae* wurden 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 1 ml H<sub>2</sub>O dest. gewaschen und in 100 µl Lithiumacetat/TE resuspendiert. Im Anschluss wurden den Zellen 20 µl hitzedenaturiertes Heringssperma als „Carrier-DNA“, 2 µl Plasmid-DNA sowie 1,2 ml PEG-Lösung zugegeben und 30 min bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation schloss sich ein 15-minütiger

Hitzeschock bei 42 °C an. Danach wurden die Ansätze 10 s bei 13000 rpm zentrifugiert, zweimal in 500 µl TE-Puffer gewaschen und schließlich in 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Abschließend wurden die Ansätze auf Agarplatten mit entsprechendem selektivem Mangelmedium ausplattiert und 3-5 d bei 30 °C inkubiert.

#### 10 x TE-Puffer

Tris/HCl	100 mM
EDTA	10 mM

Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 7,5 eingestellt.

#### 10 x Lithiumacetat

Lithiumacetat	1 M
---------------	-----

Das Lithiumacetat wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und der pH-Wert mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt

#### 1 x Lithiumacetat/TE

10 x TE	1 Teil
10 x Lithiumacetat	1 Teil
H <sub>2</sub> O dest.	8 Teile

#### PEG-Lösung

10 x TE	1 Teil
10 x Lithiumacetat	1 Teil
50 % PEG 4000	8 Teile

### **2.2.4.2 FOA Selektion**

Die FOA Selektion stellt eine Methode zur gezielten Eliminierung eines zuvor transformierten Plasmides dar. Voraussetzung ist es, dass das zu eliminierende Plasmid für ein funktionelles URA3-Genprodukt kodiert. Die verwendeten Zellen wurden zunächst in Leu-d/o-Galaktose-Medium angezogen und anschließend auf FOA-Agar kultiviert. Dabei wird die im FOA-Agar enthaltene 5-Fluororotsäure unter Anwesenheit eines URA3-Genproduktes zu zytotoxischem 5-Fluorouracil umgewandelt. Folglich können nur solche Zellen auf FOA-Agar wachsen, welche das URA3-kodierende Plasmid zuvor eliminiert

haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für sämtliche FOA-Selektionen stets der Hefestamm *S. cerevisiae* YA12 ( $\Delta$ erd2) verwendet. Nach erfolgter Transformation wurden die Hefen in 3 ml Leu-d/o-Galaktose-Medium überimpft und 48 h bei 30 °C und 220 rpm kultiviert. Anschließend wurden je 10 µl der zu selektierenden Kultur auf eine FOA-Agarplatte getropft, die Platte 5 d bei 30 °C inkubiert und schließlich photographisch dokumentiert.

### FOA-Agar

Doppelt konzentriertes Ura-Leu d/o-Medium wurde mit einer sterilfiltrierten, 0,2 %-igen 5-Fluororotstammlösung im Verhältnis 1:1 gemischt (FOA-Endkonzentration 0,1 %).

### **2.2.4.3 Methylenblau-Agardiffusionstest**

Ein Methylenblau-Agardiffusionstest (MBA) ist eine Methode zur Ermittlung von Toxinaktivität bzw. Toxinsensitivität. Dabei werden Hefezellen zunächst in Methylenblau-haltigen Agar eingebettet und das zu analysierende Toxin in ein zuvor gestanztes Loch gefüllt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Toxinkonzentration entlang der diffundierten Strecke im Agar logarithmisch abnimmt, kann bei entsprechender Wirkung ein Hemmhof um das mit Toxin gefüllte Loch ausgemacht und somit Rückschlüsse über die Toxizität getroffen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde stets der Hefestamm *S. cerevisiae* YA12 für Methylenblau-Agardiffusionstests verwendet. Im Vorfeld wurden die eingesetzten Kulturen 48 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert und anschließend auf eine einheitliche Zellzahl eingestellt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die OD<sub>600</sub> der Kulturen bestimmt um anhand der nachstehenden Formel das benötigte Volumen für eine OD<sub>600</sub> von 0,68 in einem 1000 µl Ansatz zu errechnen.

$$OD_1 * V_1 = OD_2 + V_2$$

( $OD_1 = OD_{600}$  der Kultur;  $V_1 = ?$ ;  $OD_2 = 0,68$ ;  $V_2 = 1000 \mu l$ )

Das benötigte Volumen wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das erhaltende Pellet in 1000 µl sterilem H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen. Methylenblau-Agar wurde aufgekocht und anschließend in einem entsprechend temperierten Wasserbad auf 54 °C abgekühlt. Anschließend wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in 15 ml Agar pipettiert, vermischt und in eine Petrischale gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden mithilfe eines Korkbohrers Löcher gestanzt und je 100 µl der zu analysierenden Toxine

eingefüllt. Die Platten wurden abschließend 5-7 d bei RT inkubiert und der Hemmhofdurchmesser ermittelt sowie fotografisch dokumentiert.

#### Methylenblau-Agar

##### Lösung A

SC-Mix	1,1 g
Citrat	18 g
Ammoniumsulfat	5 g
Methylenblau	Spatelspitze

Der Ansatz wurde in 700 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst und der pH-Wert mit K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 4,7 eingestellt.

##### Lösung B

YNB w/o amino acids	1,7 g
---------------------	-------

Der Ansatz wurde in 100 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst und sterilfiltriert

##### Lösung C

Galaktose	30 g
Agar	16 g

Der Ansatz wurde in 200 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst

Lösung A und C wurden getrennt voneinander autoklaviert und mit Lösung B zum kompletten Medium vereint.

#### McIlvaine Puffer pH 4.7 (100 ml)

0,1 M Citrat	52 ml
0,2 M Di-Natriumhydrogenphosphat	48 ml

## **2.2.5 Zellkultur**

### **2.2.5.1 Auftauen und Einfrieren von Säugerzellen**

Sämtliche im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Säugerzelllinien wurden nach dem selben Protokoll aufgetaut bzw. eingefroren. Die dabei verwendeten Zellkulturmedien und deren Zusammensetzung wurden den Herstellerangaben gemäß ausgewählt.

#### **2.2.5.1.1 Auftauen von Säugerzellen**

Die aufzutauenden Kryokulturen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37° C über einen Zeitraum von 2-3 min aufgetaut. Um das für stoffwechselaktive Zellen giftige DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension in ein Falcon mit 5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 1 ml vorgewärmten Medium vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) mit Zellkulturmedium ohne Antibiotika überführt. Die Zellen wurden fortan bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **2.2.5.1.2 Kryokonservierung von Säugerzellen**

Jeweils 3 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in 1 ml frischen, eiskaltem Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen innerhalb einer mit Isopropanol gefüllten Kryokammer über Nacht bei -80 °C gelagert. Am Folgetag wurden die Zellen der Gefrierkammer entnommen und langfristig in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### **2.2.5.2 Passagieren von Säugerzellen**

Zum Passagieren von adhärenten HeLa-, HEK-293-, HEp- sowie RAW-Blue Säugerzellen wurde das Medium entfernt, die Zellen durch einmaliges Schwenken mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung benetzt. HEK-293-Zellen wurden nicht mit 1 x PBS gewaschen, da PBS bereits zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche führen kann. Nach 3-5 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Erfolg der

Trypsinierung mikroskopisch überprüft und die abgelösten Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Zur Aussaat in Zellkulturtestplatten wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) bestimmt. HEK-293-Zellen wurden in der Regel in Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturtestplatten ausgesät. Die übrigen Zellen wurden der gewünschten Zelldichte entsprechend in eine neue Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Adhärente IC21-Zellen wurden im Prinzip analog passagiert, mit der Ausnahme, dass hier auf die Verwendung von Trypsin/EDTA verzichtet wurde. Stattdessen wurden die Zellen mit 1 x PBS benetzt, 15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit einem sterilen Zellschaber abgelöst.

### **2.2.5.3 Vitalitätsbestimmung mittels XTT-Assay**

Zur Vitalitätsbestimmung von Sägerzellen wurde das „*In Vitro* Toxicology Assay Kit“ der Firma „Sigma-Aldrich“ verwendet. Die Vitalität wird dabei indirekt über die Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität lebender Zellen ermittelt. Durch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen wird der Tetrazolium-Ring des Tetrazoliumsalzes XTT („2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt“) unter Bildung eines orangefarbenen Formazan-Derivates reduziert. Die Absorption dieses Derivates kann anschließend spektralphotometrisch bei 450 nm bestimmt werden.

Für die Vitalitätsbestimmung wurden 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/Well in 24-Well-Zellkulturtestplatten ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Toxin behandelt und erneut 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte die eigentliche Vitalitätsbestimmung. Die Zellen wurden zu Beginn 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und schließlich mit 200 µl Zellkulturmedium (ohne Phenolrot) überschichtet. Die Ansätze wurden dann durch Zugabe von 50 µl XTT-Reagenz (Endkonzentration 20 %) komplettiert. Das lyophilisierte Reagenz wurde im Vorfeld in 5 ml Zellkulturmedium (ohne Phenolrot) gelöst. Die so behandelten Zellen wurden anschließend 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubation wurden die Zellen ein weiteres mal 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert und die Absorption des 1:10 verdünnten Überstandes spektralphotometrisch bei 450 nm gegen 1 x PBS als Referenz gemessen.

## **2.2.5.4 Transfektion von Säugerzellen**

### **2.2.5.4.1 Transiente Transfektion von Säugerzellen**

Zur transienten Transfektion von Säugerzellen wurde das „FuGene HD Transfection Reagent“ der Firma „FuGene“ verwendet. Als Richtlinie wurde die „FuGene HD Transfection Protocol Database“ zu Rate gezogen. Standartmäßig wurden die Transfektionsansätze mit 2,5 µg DNA und 8,75 µl Transfektionsreagenz angesetzt und mit sterilem H<sub>2</sub>O dest. auf 125 µl aufgefüllt und durch mehrmaliges, vorsichtiges Pipettieren durchmischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz tröpfchenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben.

### **2.2.5.4.2 Stabile Transfektion von Säugerzellen**

Zur zielgerichteten Integration von DNA in das Genom von Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Zellen wurde das „Flp-In™ T-REx™-System“ der Firma „Invitrogen“ verwendet.

## **2.2.5.5 Zellaufschluss von Säugerzellen**

### **2.2.5.5.1 Zellaufschluss mittels RIPA-Puffer**

Zu lysierende Säugerzellen wurden mittels Trypsin/EDTA abgelöst, mit geeignetem Zellkulturmedium auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und es wurde anschließend die Zellzahl bestimmt. Dannach wurden die Zellen 8 min bei 300 x g und 4 °C pelletiert, das Pellet in RIPA-Puffer resuspendiert (50 µl/1 x 10<sup>6</sup> Zellen) und der Ansatz schließlich mit 20 µl Proteaseinhibitor (Roche) komplettiert. Abschließend wurden die Ansätze, nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, 30 min bei 12000 x g zentrifugiert und der ÜS bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### RIPA-Puffer

Tris/HCl	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
IGEPAL	1 %
Na-Deoxycholat	1 %
SDS	0,1 %

Der Ansatz wurde in H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

### 2.2.5.5.2 Zellaufschluss mit Glasperlen und SDS-Probenpuffer

Die Zellen wurden durch Trypsin/EDTA abgelöst, mit geeignetem Zellkulturmedium auf 1 ml Gesamtvolumen eingestellt und 8 min bei 300 x g und 4 °C pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 250 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, mit wenigen Glasperlen ergänzt (1-1,5 mm Durchmesser), mindestens 5 min unter starkem Schütteln resuspendiert und schließlich 15 min auf Eis inkubiert.

## **2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie**

### 2.2.6.1 Immunfluoreszenz

HeLa-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) wurden auf 12 mm Deckgläser adhäriert, 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und schließlich mit 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTA behandelt. Anschließend wurden die Zellen 20 min lang auf Eis inkubiert, 10-mal mit 1 x PBS (pH 7,4) gewaschen, mit 3 % Paraformaldehyd bei 4 °C fixiert und 1 h in Blockingpuffer (1 % BSA in PBS) bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 h mit einem anti-GFP Antikörper behandelt, weitere sechsmal gewaschen und mit einem PE-markierten anti-Maus Antikörper inkubiert. Nach sechs weiteren Waschschritten wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Verwendet wurde das Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ 8000 der Firma „Keyence“ unter Standardeinstellungen.

## 2.2.6.2 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie

Für konventionelle fluoreszenzmikroskopische Studien wurden die zu analysierenden Zellen auf Deckgläsern adhäriert und mit dem Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ 8000 der Firma „Keyence“ unter Standardeinstellungen dokumentiert.

## 2.2.6.3 „Live Cell Imaging“

„Live Cell Imaging“ von Sägerzellen wurden mithilfe des konfokalen Laserscanning Mikroskops LSM 710 META der Firma „Carl Zeiss GmbH“ unter Verwendung eines 63 x Objektivs von „Zeiss“ (Immersionslösung aus Wasser und Öl, numerische Apertur 1,3) durchgeführt. Anregungswellenlänge des verwendeten Lasers, Laserintensität und eingesetzte Filter wurden dem nachzuweisenden Fluorophor entsprechend angepasst (siehe Tabelle 8). Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software „ZEN Blue“ bzw. „ZEN Black“.

**Tabelle 8: Zusammenfassende Auflistung der zum Anregen entsprechender Fluorophore verwendeten Parameter**

Fluorophor	Anregungswellenlänge (nm)	Laserintensität (%)	Filter (nm)
eGFP	488	2,1	496-554
mCherry	543	4,5	578-673

## 2.2.7 Monte-Carlo Simulationen

Dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten minimalistischen „Trafficking-Modell“ liegen folgende mathematischen Parameter zugrunde. Sämtliche Berechnungen wurden von der AG Santen der Universität des Saarlandes im Rahmen des SFB 1027 kooperierend durchgeführt. Unter der Annahme einer konstanten Rezeptormenge während der Experimente kann die Beziehung zwischen der Menge an Rezeptor auf der Zelloberfläche  $n_{surf}$  und der intrazellulären Rezeptormenge  $n_{bulk}$  beschrieben werden als  $n_{surf} + n_{bulk} = 1$ . Werden zusätzlich noch die Rate an endozytierten Vesikeln  $\alpha_{loss}$  sowie die Rate an Vesikeln welche zur Zelloberfläche transportiert  $\alpha_{gain}$  in Betracht gezogen, kann die zeitabhängige Rezeptor-Clusterentwicklung wie folgt beschrieben werden

$$\frac{dn_{\text{surf}}}{dt} = \alpha_{\text{gain}} n_{\text{bulk}} - \alpha_{\text{loss}} n_{\text{surf}}.$$

Wird zusätzlich der Anteil an Zelloberflächen-lokalisierten Rezeptormolekülen zu Beginn einer Messung  $n_{\text{surf}}^0$  bzw. der Anteil an entsprechenden Rezeptormolekülen nachdem die Clusterentwicklung ein Gleichgewicht erreicht hat  $n_{\text{surf}}^\infty$  berücksichtigt, ergibt sich für die Zeitabhängige Clusterentwicklung folgende Abhängigkeit

$$n_{\text{surf}}(t) = n_{\text{surf}}^\infty + (n_{\text{surf}}^0 - n_{\text{surf}}^\infty) e^{-t/\tau_0}.$$

Die Clustergrößenverteilung  $p(s)$  wird beschrieben als

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = p_{si} = \frac{s_i}{\sum_j s_j} = \frac{s_i}{t}.$$

wobei die Variablen  $s$ ,  $i$  und  $j$  jeweils unterschiedliche Clustergrößen definieren und  $p_{si}$  die Wahrscheinlichkeit darstellt mit der ein Rezeptor zu einem Cluster der Größe  $s_i$  hinzugefügt wird. Die Wahrscheinlichkeit dass ein Cluster von geringerer Größe als  $s$  gebildet wird ist definiert durch

$$p[s_i(t) < s] = p\left(t_i > \frac{t}{s}\right).$$

Die Wahrscheinlichkeit einer Clusterbildung  $p(t_i)$  zum Zeitpunkt  $t_i$  wird beschrieben als

$$p\left(t_i > \frac{t}{s}\right) = 1 - \frac{t}{s} \cdot \frac{1}{t} = 1 - \frac{1}{s}.$$

Schließlich wird die Clustergrößenverteilung definiert als

$$p(s) = \frac{\partial p[s_i(t) < s]}{\partial s} = \frac{\partial}{\partial s} \left( 1 - \frac{1}{s} \right) = \frac{1}{s^2}.$$

Für weitere mathematische Details siehe Becker *et al.*, 2016.

### **3. Ergebnisse**

Die am besten untersuchte Funktion der KDELRs in Säugern ist die pH-abhängige Rückführung ER-residenter Proteine. Die hochspezifische Interaktion zwischen KDELR und dem rückzuführenden Protein wird dabei durch ein C-terminal gelegenes Sequenzmotiv (KDEL oder KDEL-ähnlich) ermöglicht. Für lange Zeit wurde dieser Rückführungs-Mechanismus als die essentielle Hauptfunktion der KDELRs angesehen, in jüngerer Vergangenheit hat sich diese Ansicht jedoch grundlegend geändert. Mittlerweile ist bekannt, dass die KDELRs nicht nur im ER- und Golgi-Kompartiment, sondern auch auf Ebene der PM lokalisiert sind, um dort die Interaktion mit und Internalisierung von entsprechenden Liganden zu vermitteln (Eisfeld *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2013; Riffer *et al.*, 2002; Schmitt und Breinig, 2006). Während der Rückführungsmechanismus ER-residenter Proteine gut verstanden ist, sind die exakten Vorgänge und Mechanismen, welche eine KDELR/Liganden-Interaktion auf der PM betreffen, bislang kaum untersucht. Demnach bestand das grundlegende Ziel der vorliegenden Arbeit darin, das Verständnis über die KDELR-Dynamik und die KDELR/Liganden-Interaktion auf Ebene der PM zu vertiefen und die zugrunde liegenden Mechanismen der KDELR-Clusterbildung und -Entwicklung sowie der Liganden-Bindung durch den Rezeptor näher zu charakterisieren. Die somit gewonnenen Erkenntnisse sollten abschließend die Etablierung eines grundlegenden biophysikalischen „Trafficking-Modells“ ermöglichen.

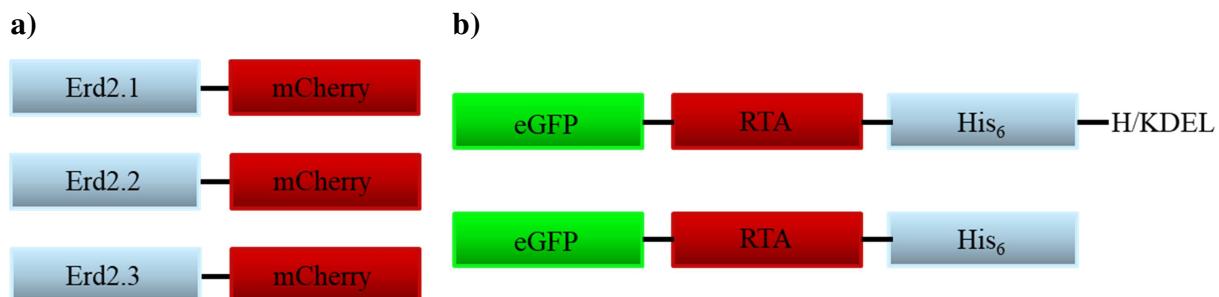
#### **3.1 Herstellung fluoreszenzmarkierter KDEL-Rezeptorvarianten**

##### **3.1.1 Herstellung mCherry-markierter KDEL-Rezeptorvarianten durch SOE-PCR**

Die wohl gängigste und praxisnaheste Methode zur anschaulichen Dokumentation intrazellulärer Prozesse ist die Markierung geeigneter Proteine und zellulärer Strukturen mittels fluoreszierender Proteine bzw. Farbstoffe. Wenngleich eine solche Markierung in vielen Fällen vergleichsweise einfach zu realisieren ist, kann diese, vor allem nach Markierung mit verhältnismäßig großen Fluoreszenzproteinen, eine eingeschränkte, physiologische Funktionalität der präparierten Zielstrukturen mit sich bringen. Daher wurden

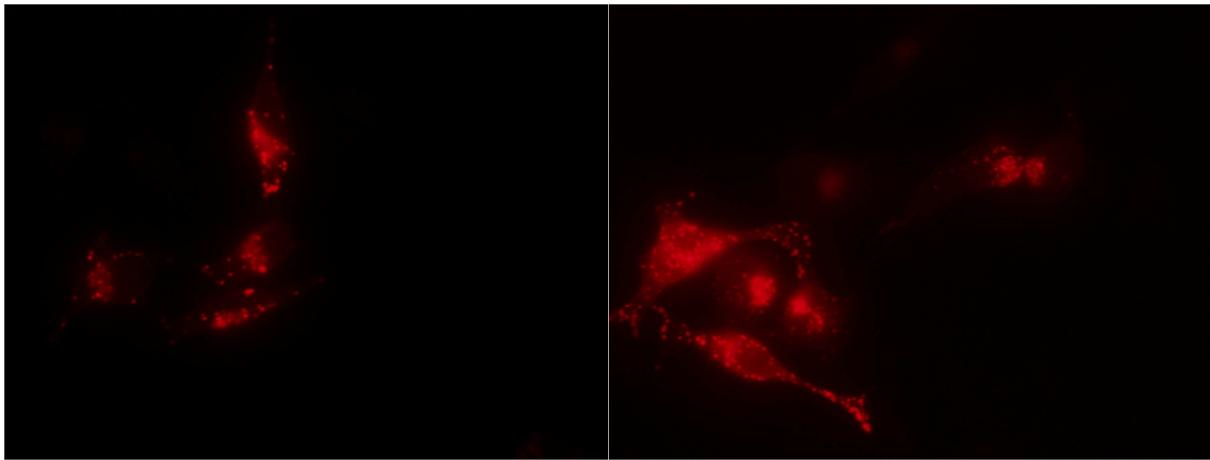
im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst fluoreszenzmarkierte KDELR-Varianten hergestellt und deren biologische Funktionalität anschließend überprüft.

Zur Analyse der KDELR-Clusterbildung als Antwort auf eine externe Liganden-Applikation mittels „Live Cell Imaging“ wurden mCherry-markierte Varianten von Erd 2.1, Erd 2.2 sowie Erd 2.3 hergestellt. Dabei wurde mCherry durch SOE-PCR unter Verwendung der unter 2.1.4 aufgeführten Primer an den C-Terminus der jeweiligen Rezeptorvariante fusioniert. Nach erfolgter Bestätigung der korrekten Identität der Konstrukte durch Sequenzierung wurden diese in den Säugerexpressionsvektor pCDNA5-FRT/TO (Invitrogen) integriert. Eine schematische Darstellung der finalen Konstrukte sowie der für „Live Cell Imaging“-Analysen verwendeten Modell-Liganden ist Abbildung 6 zu entnehmen.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit konstruierten fluoreszenzmarkierten KDELR-Varianten und Modell-Liganden.** Die mCherry-markierten Varianten von Erd2.1, Erd2.2 sowie Erd2.3 (a) wurden mittels SOE-PCR hergestellt. Die eingesetzten Modell-Liganden (b) bestehend aus der katalytisch aktiven Domäne von Rizin (RTA), einem N-terminal vorgeschalteten „mammalian enhanced green fluorescene protein“ (eGFP) zur fluoreszenzmikroskopischen Dokumentation sowie einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag zur affinitätschromatographischen Reinigung.

Um die Signalstärke und Fluoreszenzqualität der mCherry-markierten KDELR-Rezeptorvarianten zu überprüfen, wurden T-REx-HeLa-Zellen mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten KDEL-Rezeptorvarianten transfiziert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert (siehe Abbildung 7).



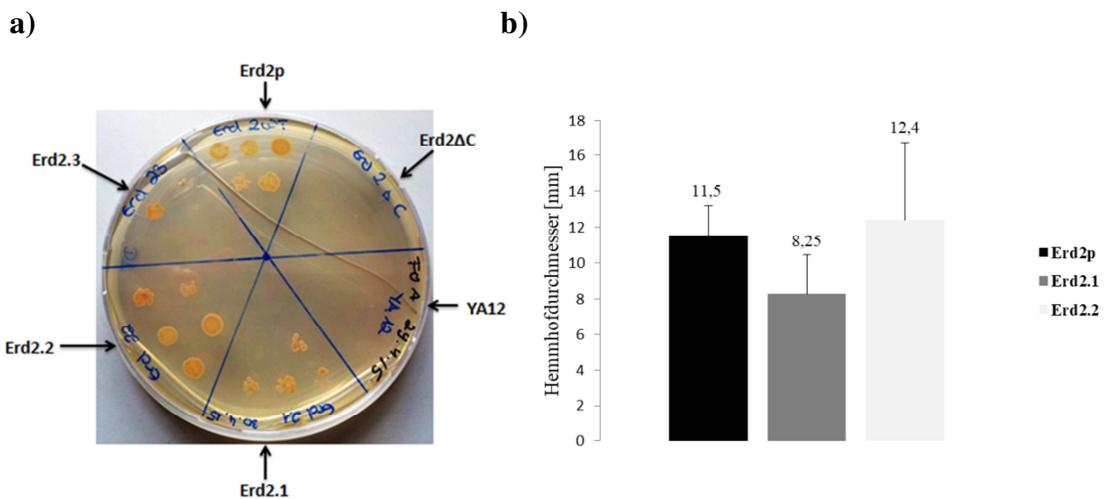
**Abbildung 7:** Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation humarer T-REx-HeLa-Zellen nach Transfektion mit pCDNA5-FRT/TO-Erd 2.1-mCherry (links) sowie pCDNA5-FRT/TO-Erd 2.2-mCherry (rechts).  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in 60 µm-Dishes ausgesät und 48 h nach der Transfektion fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Die Konstruktion der mCherry-markierten KDEL-Rezeptorvarianten Erd 2.1-mCherry und Erd 2.2-mCherry verlief erfolgreich. Für beide Varianten konnten deutlich sichtbare und klar unterscheidbare Fluoreszenzsignale beobachtet werden. Folglich eigneten sich diese Konstrukte für die darauf aufbauenden „Live Cell Imaging“-Studien hinsichtlich KDELR-Dynamik, -Lokalisation und Rezeptor/Liganden-Interaktion. Erd2.3-mCherry konnte zwar ebenfalls erfolgreich mittels SOE-PCR hergestellt und in pCDNA5-FRT/TO kloniert werden, fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten jedoch eine signifikant schwächere Signalstärke, die sich kaum von der Autofluoreszenz nicht transzierter Zellen unterschied (Daten nicht gezeigt). Die nachfolgenden Experimente zur Etablierung eines grundlegenden „Trafficking-Modells“ beschränkten sich zunächst auf die KDELR Variante Erd2.1-mCherry.

### 3.1.2 Funktionalitätsnachweis der KDEL-Rezeptor/mCherry Fusionsproteine

Die Überprüfung der korrekten Funktionalität der mCherry-markierten KDELR-Varianten erfolgte durch FOA-Selektion und MBA-Tests (Abb. 8). Frühere Studien mittels FOA-Selektion und anschließender Methylenblau-Agardiffusionstests konnten belegen, dass die säugerspezifischen KDELRs sowohl den Verlust einer funktionalen Erd2p-Variante in *S. cerevisiae* vollständig komplementieren, als auch die Rückgewinnung der zuvor verloren gegangenen Sensitivität gegen das Killertoxin K28 vermitteln (Diplomarbeit Domenik Rammo). Bei K28 handelt es sich um ein α/β heterodimeres Toxin welches von so genannten Killerstämmen der Hefe *S. cerevisiae* sezerniert und dessen effiziente Aufnahme in Zielzellen über ein C-terminales HDEL Sequenzmotiv vermittelt wird (Becker *et al.*, 2016). Demnach

sollte die Reproduktion dieser Resultate unter Verwendung der mCherry markierten KDELR-Varianten deren biologische Aktivität bestätigen. Die Experimente zum Funktionalitätsnachweis der KDELR/mCherry-Fusionsproteine wurden in Zusammenarbeit mit Frau Daniela Tavouli im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit am Institut für Molekular- und Zellbiologie an der Universität des Saarlandes durchgeführt.



**Abbildung 8: Nachweis der biologischen Aktivität mCherry-markierter KDELR-Varianten.** Die KDELR-Varianten Erd2.1-, Erd2.2- sowie Erd2.3-mCherry wurden in den Hefeexpressionsvektor pRS315 kloniert und in den *S. cerevisiae*-Stamm YA12 transformiert. Zur Kontrolle wurden nicht transformierte Hefen sowie solche verwandt, welche mit denen des wildtypischen HDEL-Rezeptors Erd2p bzw. einer C-terminal verkürzten, nicht funktionalen HDEL-R Variante Erd2ΔC transformiert wurden. Klone wurden anschließend in Leu d/o-Gal-Medium angezogen und über Nacht bei 30 °C und konstantem Schütteln bei 220 rpm inkubiert. Abschließend wurden jeweils 5 µl der Übernachtungskulturen auf FOA-Agar getropft, weitere 5 Tage bei 30 °C inkubiert und die Platte photographisch dokumentiert (a). Nachweis der wiedererlangten K28-Sensitivität der zuvor FOA-selektierten Klone. Die Zellen wurden in Methylenblau-haltigem Agar eingebettet, mit verdünntem Killertoxin K28 behandelt (1:20 in McIlvaine, pH 4,7), 5 d bei 20 °C inkubiert und auf erkennbare Hemmhöfe analysiert (b).

Die FOA-Platte wurde nach Ablauf der Inkubationszeit hinsichtlich Zellwachstum analysiert (Abb. 8 a). Erwartungsgemäß war für sämtliche Klone, welche den wildtypischen Erd2p-Rezeptor exprimieren, ein ausgeprägtes Wachstum auf dem FOA-haltigen Nährmedium zu beobachten. Das Wachstum der mit Erd2.1- sowie Erd2.2-mCherry transformierten Hefekulturen fiel ähnlich stark aus, Erd2.3-mCherry exprimierende Hefezellen zeigten nur schwaches, die Negativkontrollen kein Wachstum.

Darauf aufbauend wurde die Sensitivität der transformierten und FOA-selektierten Hefen gegen das Killertoxin K28 analysiert. Hefezellen vom Stammhintergrund YA12 zeigen aufgrund des fehlenden ERD2-Rezeptorgens für gewöhnlich keine, oder nur eine sehr stark eingeschränkte Sensitivität gegenüber einer externen K28-Applikation. Demnach wäre die Wiedererlangung der K28-Sensitivität nach erfolgter Transformation mit den mCherry-markierten KDELR-Varianten ein weiterer Beweis für deren *in vivo* Funktionalität (Abb. 8 b).

Sowohl für die mit Erd2.1-mCherry als auch mit Erd2.2-mCherry transformierten Hefekulturen konnte ein deutlicher Hemmhof beobachtet werden. Der durchschnittliche Hemmhofdurchmesser war dabei mit dem vergleichbar, welcher für Erd2p-exprimierende Hefen zu verzeichnen war. Die Resultate belegen die wiedergewonnene Sensitivität der getesteten Kulturen gegen K28 und bestätigen somit die korrekte Funktionalität der KDELR/mCherry-Fusionsproteine. Für Erd2.3-mCherry exprimierende Zellen konnte kein vergleichbarer Hemmhof festgestellt werden sondern lediglich eine deutlich kleinere Zone mit eingeschränktem Wachstum nach Applikation von weniger stark verdünntem (1:10) bzw. unverdünntem K28 (Ergebnisse nicht gezeigt).

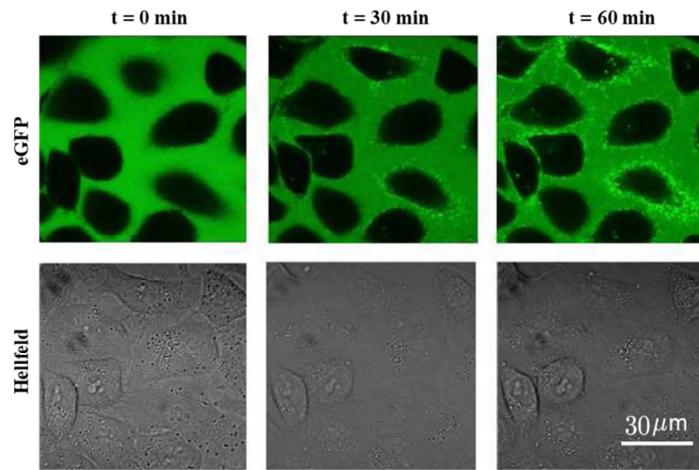
## **3.2 KDEL-Rezeptor/Liganden-Clusterbildung und -Entwicklung in Säugerzellen**

Um einen ersten Eindruck über die KDELR-Dynamik und die KDELR/Liganden-Interaktion auf der PM zu gewinnen, wurde die Clusterbildung und -entwicklung extern applizierter, fluoreszenzmarkierter Modellliganden, welche ein C-terminales KDEL-Sequenzmotiv tragen (Abb. 6), für verschiedene Säugerzelllinien mittels CLSM analysiert und mit der Clusterentwicklung von Liganden ohne entsprechende Erkennungssequenz verglichen. Die dabei eingesetzten eGFP-markierten RTA-Varianten wurden im Vorfeld der fluoreszenzmikroskopischen Studien stets rekombinant in *E. coli* exprimiert, affinitätschromatographisch gereinigt (siehe 2.2.3.4-2.2.3.7) und mittels Coomassie-Färbung bzw. XTT-Test (siehe 2.2.3.2 bzw. 2.2.5.3) hinsichtlich Reinheit und biologischer Aktivität überprüft.

### **3.2.1 KDEL-Rezeptor/Liganden-Clusterentwicklung an HeLa-Zellen**

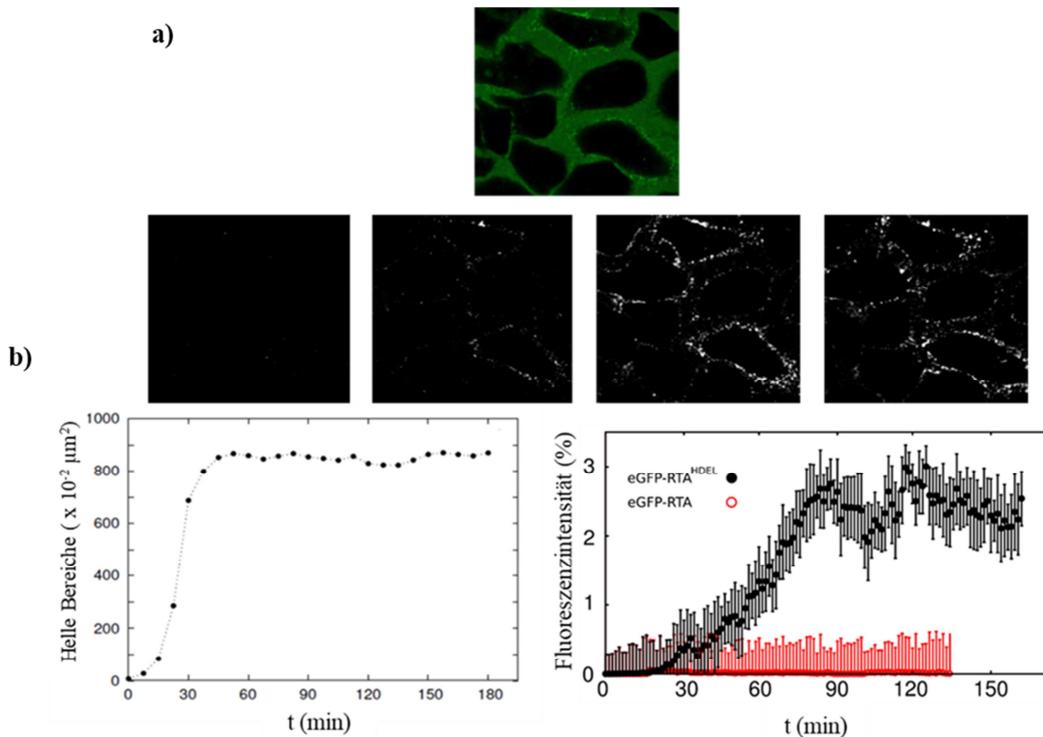
#### **3.2.1.1 „Live Cell Imaging“ von HeLa-Zellen**

Im Rahmen einer ersten Serie von Experimenten wurden  $1 \times 10^5$  HeLa-Zellen in 60 $\mu\text{m}$ -Dishes (Ibidi) ausgesät und nach 24 h Kultivierung mit 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelt, für 180 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert und die Clusterentwicklung des extern applizierten Liganden fluoreszenzmikroskopisch beobachtet (Abb. 9).



**Abbildung 9:** „Live Cell Imaging“-Analyse (45 Bilder/h) von HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden nach externer Applikation von eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> (160 µg/ml) 180 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert. Dargestellt sind drei aussagekräftige Zeitpunkte.

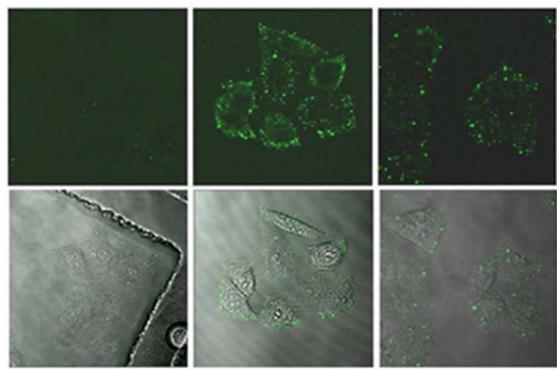
Es ist klar zu erkennen, dass Anzahl, Intensität und Größe der entstehenden Cluster an der Zellperipherie der HeLa-Zellen im Verlauf der Zeit stark zunehmen. Zur Quantifizierung wurde der aufgenommene Film anschließend zunächst in einzelne, aufeinanderfolgende Einzelbilder unterteilt und für jedes einzelne Bild der Hintergrund so reduziert, dass schwarz/weiß Bilder entstanden (Abbildung 10 a). Unter Verwendung dieser schwarz/weißen Einzelbilder wurde dann die Entwicklung der hellen Pixelbereiche im Detail analysiert, wobei die Helligkeit dieser Pixelbereiche mit der zuvor beobachteten Fluoreszenzintensität des extern applizierten Liganden korreliert. Auf diese Weise kann die zeitliche Evolution der Fluoreszenzsignale auf der Zelloberfläche quantifiziert werden (Abbildung 11 b). Sämtliche Quantifizierungen wurden in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ludger Santen der Fachrichtung Theoretische Physik der Universität des Saarlandes durchgeführt.



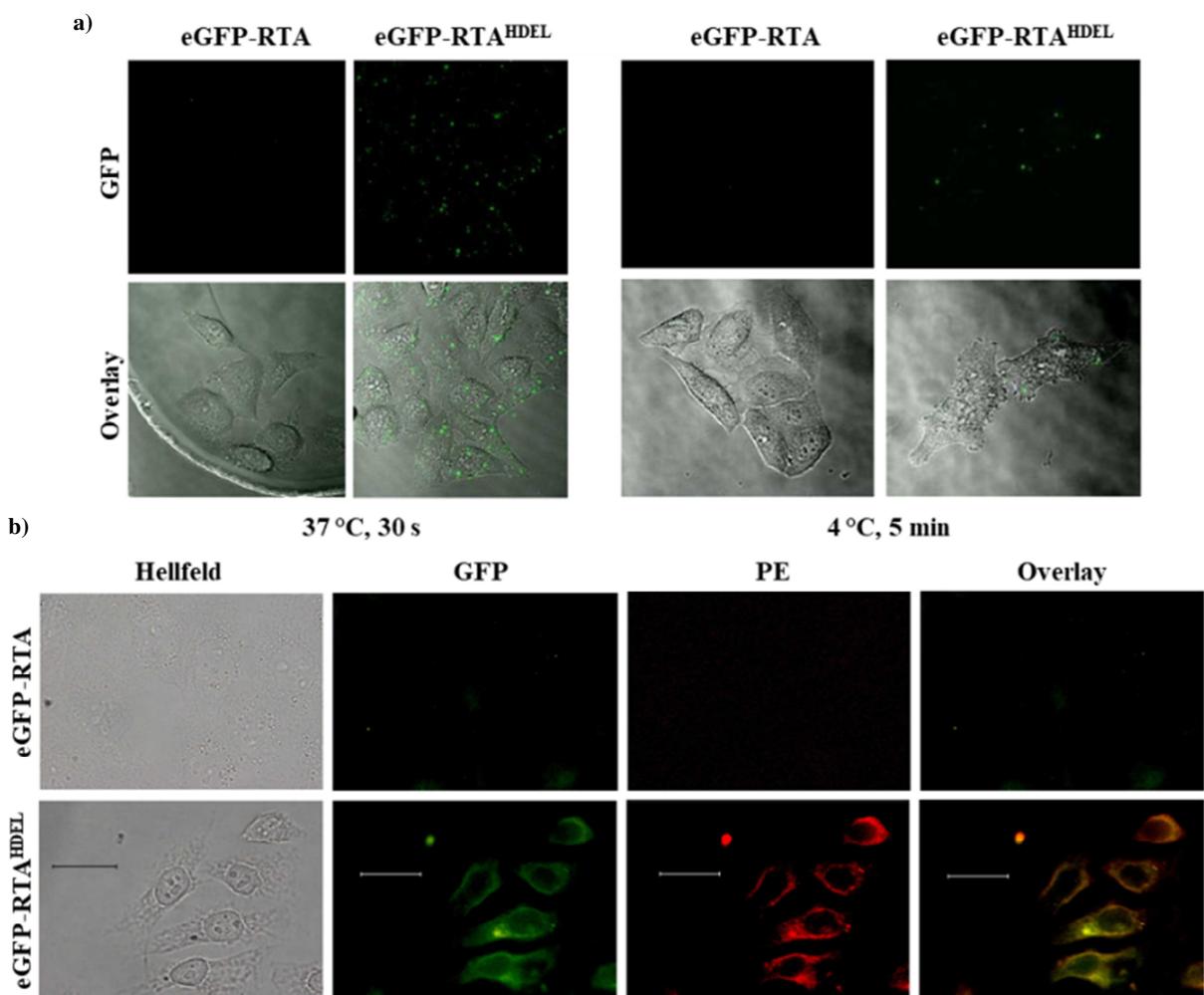
**Abbildung 10: Quantifizierung der Clustergrößenentwicklung extern applizierter KDELR-Modell-Liganden auf der Zelloberfläche von HeLa-Zellen.** „Live Cell Imaging“ von HeLa-Zellen (45 frames/h) nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> (a). Zeitabhängige Entwicklung der Fluoreszenzintensität von Liganden-Clustern an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen (b). Die Clusterentwicklung wurde nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und quantifiziert (links) und mit der Clusterentwicklung nach Behandlung mit 160 µg/ml eGFP-RTA verglichen (rechts).

Die „Live Cell Imaging“-Analysen zeigten eindeutig eine zeitabhängige Formierung und Entwicklung der eGFP-RTA<sup>HDEL</sup>-Cluster auf der Zelloberfläche. Nach einer anfänglichen Verzögerung in der Cluster-Formierung ( $t < 20$  min) war in der Regel ein starker Anstieg der Clustergröße und Clusteranzahl zu beobachten, welcher typischerweise nach etwa 80 min ein Maximum erreichte. Ab diesem Zeitpunkt blieb die zu verzeichnende Fluoreszenzintensität, unter Berücksichtigung kleinerer Schwankungen, weitestgehend stabil. Durchgeführte Kontrollexperimente mit eGFP-RTA zeigten eine im Vergleich stark reduzierte Clusterbildung an bzw. nahe der PM.

Da die Clusterentwicklung in frühen Stadien der „Live Cell Imaging“-Experimente aufgrund der vergleichsweise starken Hintergrundfluoreszenz nur eingeschränkt analysiert werden konnte, wurden HeLa-Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> sowie eGFP-RTA<sup>KDEL</sup> behandelt und nach 5 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> 10 mal mit 1 x PBS gewaschen. Zur Kontrolle wurden erneut HeLa-Zellen mit einem Modell-Liganden ohne KDELR-assoziiertes Erkennungsmotiv eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen hinsichtlich bereits gebundener Signale mittels CLSM analysiert (Abb. 11).



**Abbildung 11: Frühzeitig gebundene Modell-Liganden an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden mit 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTA behandelt, 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, 10 mal mit 1 x PBS gewaschen und hinsichtlich frühzeitig gebundener Signale analysiert.



**Abbildung 12: Nachweis PM lokalisierter Modell-Liganden nach externer Applikation auf HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden mit 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTA behandelt, 30 s bei 37 °C (oben, links) bzw. 5 min bei 4 °C (a, rechts) inkubiert und hinsichtlich erkennbarer Signale an der Zellperipherie beobachtet. Immunfluoreszenz wurde an nicht permeabilisierten HeLa-Zellen nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTA durchgeführt. Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C inkubiert, mit 3 % Paraformaldehyd fixiert und extrazellulär gebundene Liganden mittels anti-GFP bzw. anti-PE visualisiert. Die Kolokalisation zellgebundener Liganden ist in Form gelb/orangefarbener Signale zu erkennen (b).

Es ist zu erkennen, dass bereits eine fünfminütige Inkubation mit 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>H/KDEL</sup> ausreicht, um eine deutliche Cluster-Formierung an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen zu beobachten. Nach externer Applikation von eGFP-RTA war erwartungsgemäß keine vergleichbare Clusterbildung erkennbar. In einer Reihe darauf aufbauender Experimente wurde zusätzlich das Clusterverhalten nach 30 s Inkubation analysiert (Abb. 12). Ergänzend wurden analog durchgeführte Analysen bei einer erniedrigten Temperatur von 4 °C sowie Immunfluoreszenz-Studien mit nicht-permeabilisierten HeLa-Zellen durchgeführt, um ausschließen zu können, dass es sich bei den beobachteten Clustern größtenteils um endozytierte Modell-Liganden handelt (Abb. 12). Es wird deutlich, dass selbst eine 30 Sekunden andauernde Toxinbehandlung zur Ausbildung erster, vergleichsweise kleiner Cluster an der Peripherie von HeLa-Zellen ausreichte. Die Studien bei 4 °C sowie die durchgeführte Immunfluoreszenz belegten zudem die Lokalisation der beobachteten Signale auf der Zelloberfläche.

### 3.2.1.2 Plasmamembranfärbung von HeLa-Zellen und Expression fluoreszenzmarkierter KDEL-Rezeptorvarianten

Nachdem erste Erkenntnisse hinsichtlich der Dynamik extern applizierter Modell-Liganden an HeLa-Zellen gewonnen wurden, sollte nun das Verständnis bezüglich der Lokalisation und Dynamik der KDELRs in Säugerzellen vertieft werden. Um die Rezeptorlokalisierung näher zu charakterisieren, wurde die Plasmamembran von HeLa-Zellen im Anschluss an die Transfektion mit fluoreszenzmarkierten KDEL-Rezeptorvarianten zusätzlich mittels Fluorescein-markiertem (FITC) *Ricinus communis*-Agglutinin (RCA) gefärbt und die KDELR Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert (Abb. 13).

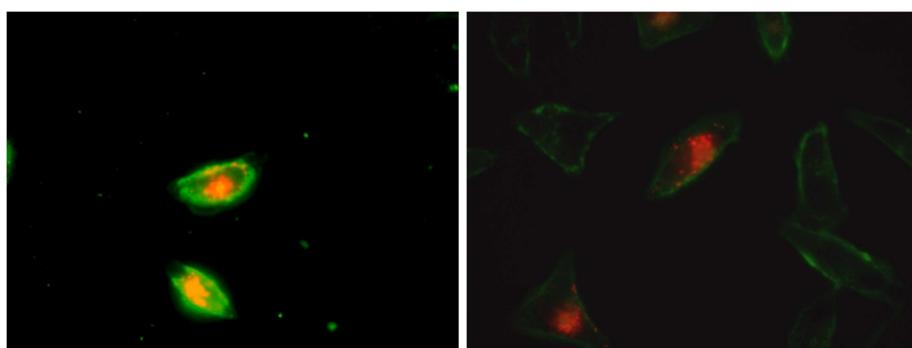
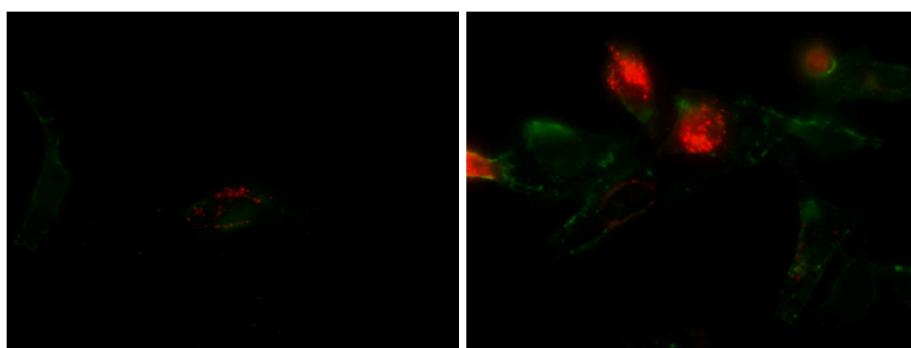


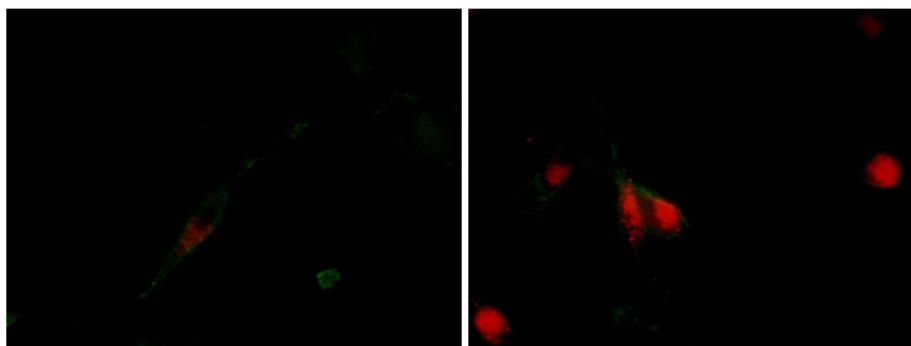
Abbildung 13: Humane TRex™ HeLa-Zellen nach Transfektion mit Erd 2.1-mCherry (links) sowie Erd 2.2-mCherry (rechts) und anschließender Plasmamembranfärbung mittels RCA. Die Plasmamembran wurde 48 h nach der Transfektion mit RCA markiert und die Zellen im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Wie in Abb. 13 dargestellt waren vereinzelte Signale auf Ebene der Plasmamembran bzw. in Plasmamembrannähe zu erkennen. Diese Beobachtungen decken sich mit der Annahme, dass die humanen KDELRs, zumindest in geringer Kopienzahl auch auf Ebene der Plasmamembran von Säugerzellen lokalisiert sind. Im Rahmen ergänzender Experimente wurden die Zellen zusätzlich mit 160 µg/ml nicht fluoreszenzmarkierter Varianten der bereits vorgestellten Modell-Liganden ( $\text{RTA}^{\text{H/KDEL}}$  bzw. RTA) behandelt, nach 15 min Inkubation bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und hinsichtlich einer eventuell auftretenden Veränderung der intrazellulären KDELR Verteilung analysiert

a)



b)



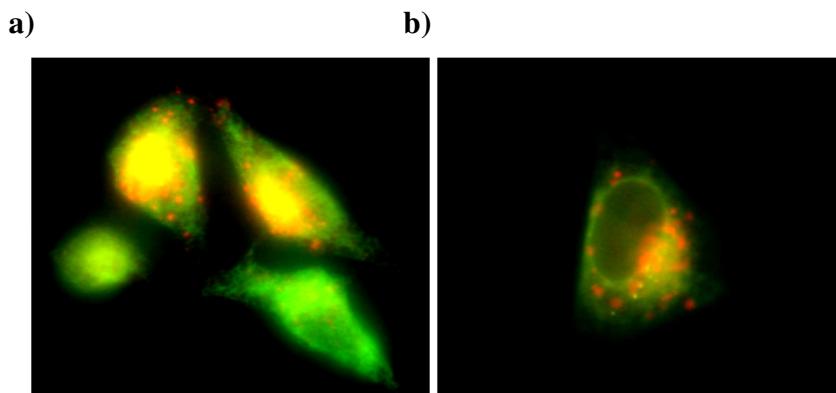
**Abbildung 14:** Humane TRex™ HeLa-Zellen nach Transfektion mit Erd 2.1-mCherry und anschließender Behandlung mit  $\text{RTA}^{\text{KDEL}}$  (a) sowie RTA (b). Die Plasmamembran wurde 48 h nach der Transfektion mit RCA markiert und die Zellen im Anschluss an eine 15 min andauernde Toxinapplikation fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Im Anschluss an die externe Applikation der Modell-Liganden war eine Veränderung der intrazellulären Rezeptorlokalisierung zu erkennen (Abb. 14). Nach Behandlung mit  $\text{RTA}^{\text{KDEL}}$  waren vermehrt Zellen zu beobachten, die eine ringförmige Rezeptoranordnung an der Zellperipherie nahe der PM zeigen. Analog durchgeführte Experimente mit  $\text{RTA}^{\text{HDEL}}$  zeigten ein vergleichbares Resultat (Daten nicht gezeigt), während dieser Effekt nach Behandlung mit RTA ohne KDELR-Bindemotiv nur in abgeschwächter Form beobachtet werden konnte.

Unterschiede zwischen den analysierten Rezeptorvarianten Erd2.1-mCherry bzw. Erd2.2-mCherry konnten jedoch nicht festgestellt werden.

### 3.2.1.3 Koexpression fluoreszenzmarkierter KDELR-Rezeptorvarianten in HeLa-Zellen

Aufbauend auf den bereits gewonnenen grundlegenden Erkenntnissen sollte im Rahmen der folgenden Experimente überprüft werden, ob unterschiedliche KDELR-Homologe aufgrund ihrer im Detail ungleichen Affinität für verschiedene H/KDEL-ähnliche Sequenzmotive (Raykhel *et al.*, 2007) auch in unterschiedlichem Ausmaß auf eine externe Liganden-Applikation reagieren. Dazu wurden TRex<sup>TM</sup> HeLa-Zellen mit Erd2.1-eGFP und Erd2.2-mCherry kotransfiziert, mit 160 µg/ml RTA<sup>KDEL</sup> behandelt und im Hinblick auf eine Veränderung der intrazellulären KDELR-Distribution fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 15). Es fällt auf, dass die beiden Rezeptorvarianten vor der Liganden-Applikation sehr stark in den Bereichen des ER und Golgi-Apparates kolokalisierten. Nach erfolgter Behandlung mit RTA<sup>KDEL</sup> war eine Veränderung hinsichtlich dieser KDELR-Distribution zu beobachten. Es erschienen nun vermehrt Signale an der Zellperipherie. Des Weiteren schien sich die Kolokalisation der beiden Rezeptorvarianten aufzuheben, so dass mehr unterscheidbare Signale zu erkennen waren.

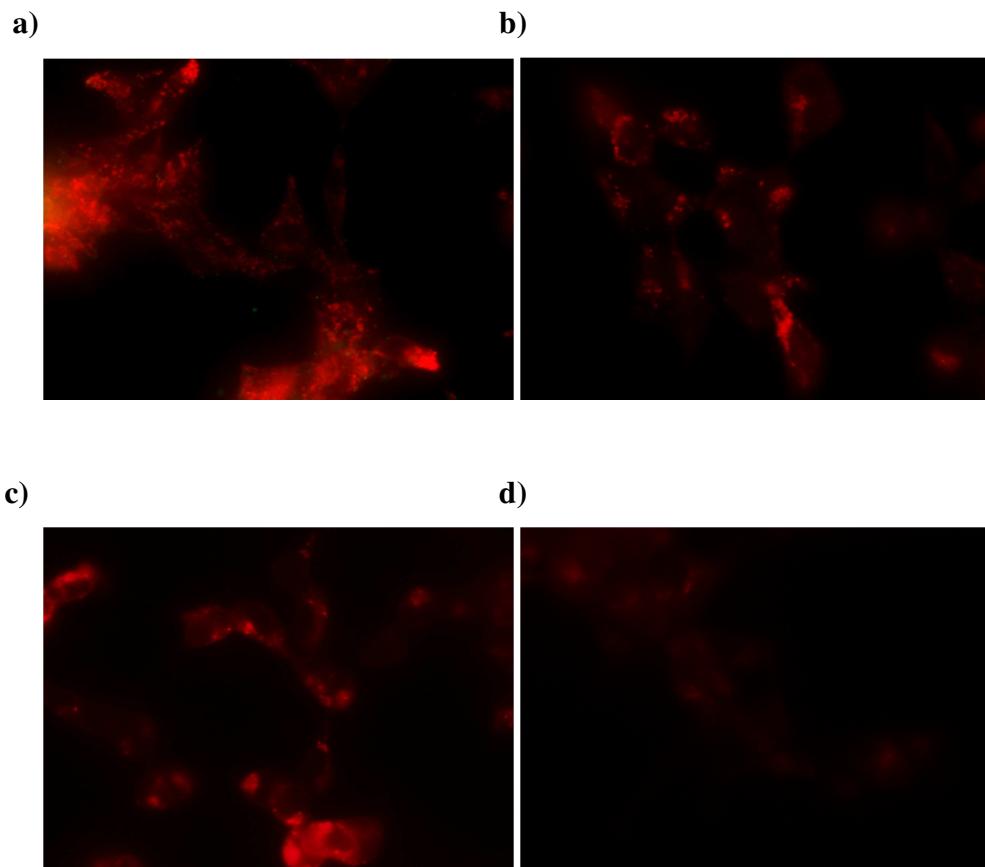


**Abbildung 15:** Humane TRex<sup>TM</sup> HeLa-Zellen nach Kotransfektion mit Erd 2.1-eGFP und Erd 2.2-mCherry. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion zunächst ohne Toxinzugabe (a) und anschließend nach 30 min. Behandlung mit 160 µg/ml RTA<sup>KDEL</sup> (b) fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

### **3.2.2 KDELR-Rezeptor/Liganden Clusterentwicklung an HEK-293-Zellen**

Die initiale Charakterisierung der KDELR/Liganden-Dynamik in Säugerzellen, welche schlussendlich zur Etablierung eines ersten, grundlegenden „Trafficking-Modells“ führte (siehe 3.3) wurde ausschließlich am Beispiel von Hela-Zellen durchgeführt. Um das „Trafficking-Modell“ langfristig komplexer zu gestalten und die KDELR-Dynamik in einem breiteren Kontext zu analysieren, wurden ergänzende „Live Cell Imaging“-Studien an alternativen Säugerzelllinien, hier am Beispiel der humanen Nierenepithelzelllinie HEK-293, durchgeführt.

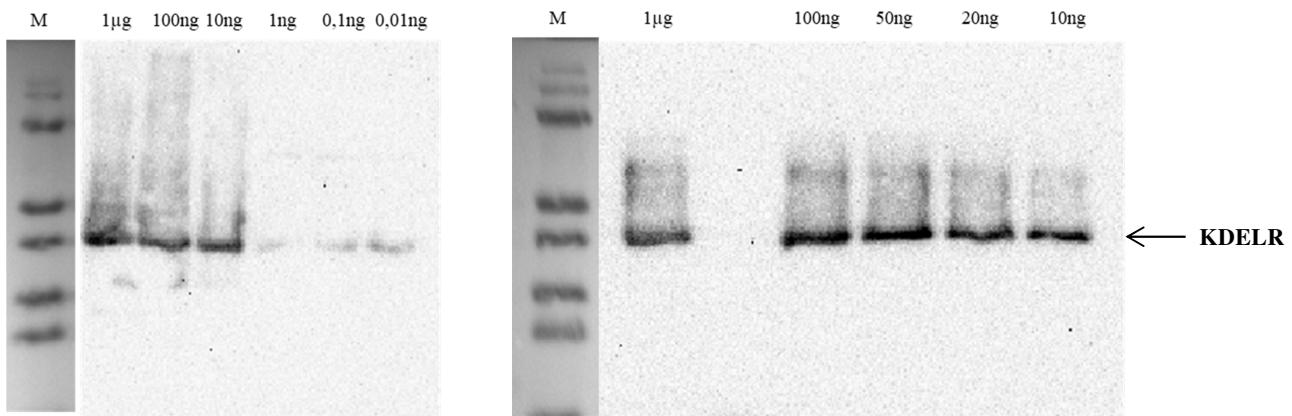
Frühere Experimente zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse mCherry-markierter KDELR-Varianten wurden stets in HeLa-Zellen nach transiente Transfektion der zu analysierenden KDELRs durchgeführt. Zum Erlangen erster Erkenntnisse ist diese schnelle und einfach umzusetzende Methode auch durchaus geeignet, um allerdings langfristig nachhaltige und reproduzierbare Resultate zu erzielen, ist eine größere Kontrolle über die Expression der Rezeptorvarianten von Vorteil. Transiente Transfektionen bedingen in der Regel deutliche Schwankungen in der Expressionsstärke sowie im Vorhandensein nicht transfizierter Zellen. Daher wurde im Rahmen dieser Versuchsreihe zunächst die fluoreszenzmarkierte KDELR-Variante Erd2.1-mCherry stabil unter Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors in das Genom von Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Zellen integriert und das Expressionsprofil nach Induktion mit verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch mittels Western-Analyse studiert (Abb. 16 und 17). Die Herstellung der stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Zelllinie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Nazli Acik während ihrer Bachelor-Arbeit, die Überprüfung der Tetrazyklin-abhängigen Expression erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Daniela Tavouli im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit.



**Abbildung 16:** Tetrazyklin-abhängige Expressionsstärke von Erd2.1-mCherry nach stabiler Integration in das Genom von Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden zwecks Induktion der Expression mit verschiedenen Tetrazyklin-Konzentrationen behandelt (1 µg/ml (a), 100 ng/ml (b), 50 ng/ml (c), 10 ng/ml (d)), 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert.

Die Resultate zeigten eine deutliche Abschwächung der Anzahl und Intensität beobachteter Fluoreszenzsignale nach Reduktion der zur Induktion eingesetzten Tetrazyklinkonzentration. Der Einsatz von 1 µg/ml Tetrazyklin führte, wie auch nach transienter Transfektion häufig beobachtet, zu einer starken Erd2.1-mCherry-Überexpression. Das Signal erscheint somit sehr diffus; einzelne Rezeptormoleküle bzw. Cluster sind kaum noch zu identifizieren. Eine Konzentration von 10 ng/ml Tetrazyklin resultierte in einer schwachen Rezeptorexpression, welche kaum noch von der Autofluoreszenz nicht transfizierter Zellen zu unterscheiden war (Negativkontrolle nicht gezeigt). Die Induktion mittels 100 bzw. 50 ng/ml Tetrazyklin erbrachte die besten Ergebnisse. Vor allem nach Applikation von 100 ng/ml sind einzelne, klar unterscheidbare Signale zu beobachten, wodurch die so behandelten Zellen für weiterführende fluoreszenzmikroskopische Studien hinsichtlich der KDEL-R-Dynamik geeignet erscheinen. Die hier vorgestellten Beobachtungen stehen im Einklang mit den parallel dazu durchgeführten Western-Analysen. Demnach ist eine Tetrazyklinkonzentration von mindestens 10 ng/ml notwendig, um eine zu detektierende Rezeptorexpression zu

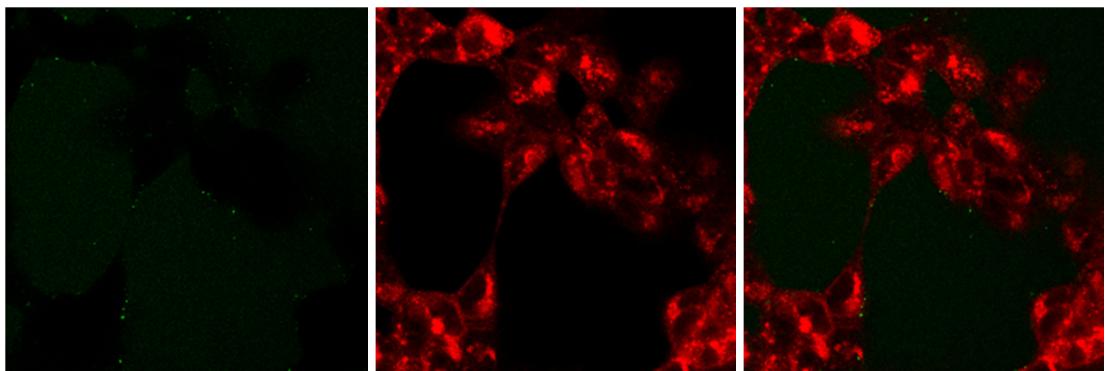
ermöglichen, während zwischen 1 µg/ml und 20 ng/ml Abschwächungen der Signale zu erkennen sind (siehe Abb. 17).



**Abbildung 17: Western-Analyse zur Überprüfung der Expressionsstärke von Erd2.1-mCherry nach stabiler Integration in das Genom von Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Zellen.** Zur Western-Analyse wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen mit verschiedenen Tetrazyklin-Konzentrationen zur Induktion der Expression behandelt, 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und der exprimierte KDELR schließlich mittels anti-mCherry-AK und einem sekundären anti-rabbit-HRP-AK detektiert.

### 3.2.2.1 „Live Cell Imaging“ von HEK-293 Zellen

Bisherige Studien zur Liganden-Clusterformierung an der Zelloberfläche von Säugerzellen lieferten zwar Erkenntnisse hinsichtlich der Geschwindigkeit der Clusterbildung sowie -Entwicklung und deuten aufgrund der beobachteten Unterschiede im Clusterverhalten der eingesetzten Modell-Liganden auf eine Beteiligung der KDELRs hin; ein direkter Beweis für eine KDELR-vermittelte Interaktion mit dem Modell-Liganden auf der Zelloberfläche ist damit allerdings noch nicht erbracht. Um zu zeigen, dass die Clusterentwicklung tatsächlich KDELR-vermittelt abläuft, wurden stabil transfizierte Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Erd2.1-mCherry Zellen nach Induktion der Expression mittels 100 ng Tetrazyklin mit 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelt und fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich festzustellender Rezeptor/Liganden-Interaktionen analysiert (Abb. 18).

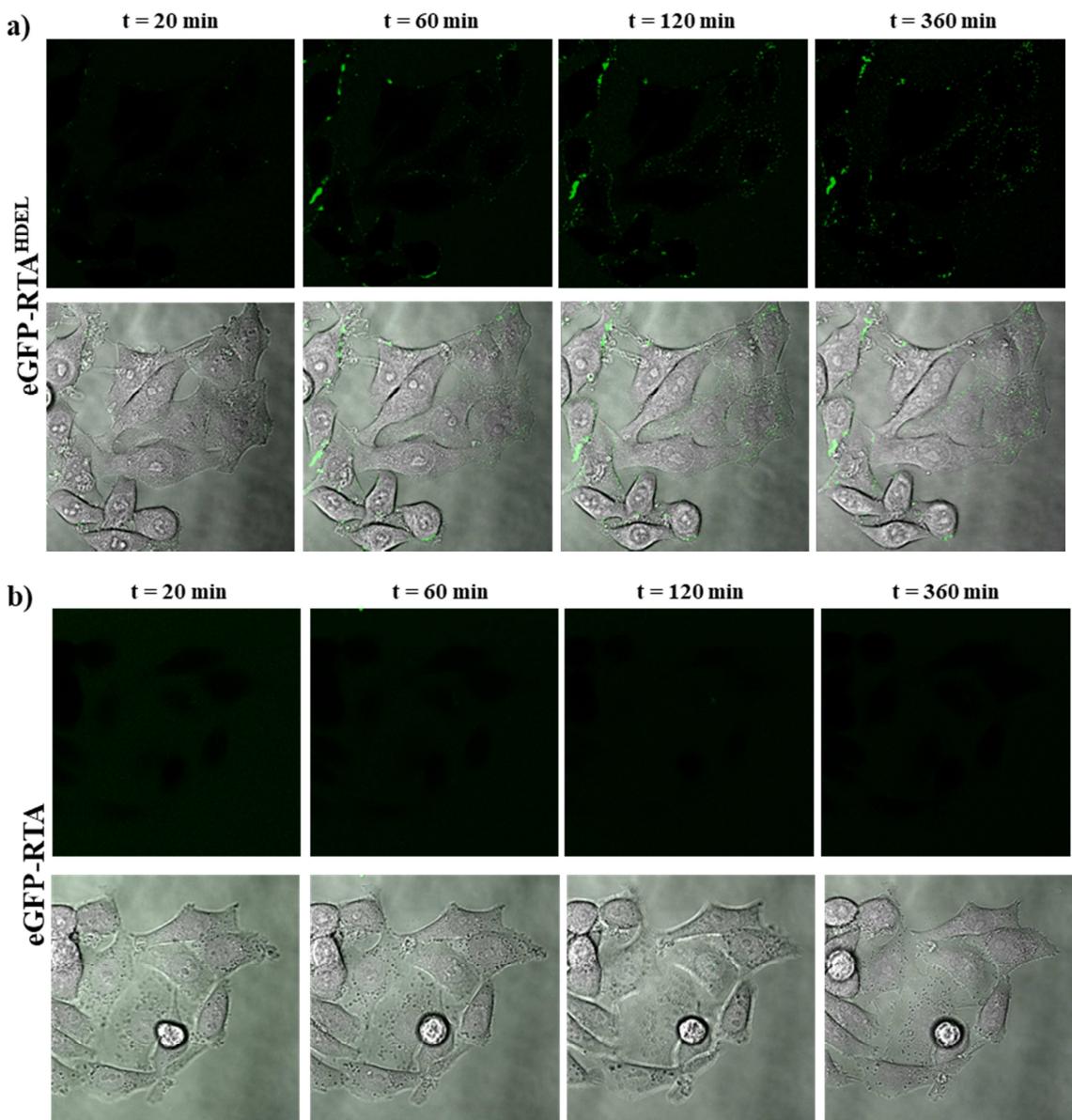


**Abbildung 18:** „Live Cell Imaging“-Analyse stabil transfizierter Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Erd.2.1-mCherry-Zellen. Die Expression wurde 48 h vor der „Live Cell Imaging“-Analyse mittels 100 ng/ml Tetrazyklin induziert, die Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelt und mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert.

Zwar waren deutliche Signale sowohl für den mCherry-markierten KDELR als auch für den eGFP-markierten Modell-Liganden an der Zellperipherie zu erkennen, eine klare Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand war jedoch nicht feststellbar. Analog durchgeführte Experimente mit unterschiedlich stark induzierten Flp-In™ T-REx™ HEK-293-Erd2.1-mCherry Zellen (1 µg/ml – 10 ng/ml) lieferten vergleichbare Resultate (Daten nicht gezeigt). Fluoreszenzmikroskopische Studien nach erfolgter Induktion der Expression mit 1 µg/ml Tetrazyklin ließen zwar bisweilen überlagernde Signale in Form orange/gelb-fluoreszierender Bereiche erkennen; aufgrund des sehr diffusen mCherry-Signals nach einer so starken Genexpression (Abb. 16) war jedoch keine eindeutige Rezeptor/Liganden-Interaktion feststellbar. Eine Clusterentwicklung von extern appliziertem eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> auf der Zelloberfläche von HEK-293-Zellen war zwar durchaus feststellbar, verlief im Allgemeinen jedoch etwas schwächer als an HeLa-Zellen beobachtet (siehe Abb. 23).

### 3.2.3 KDEL-Rezeptor/Liganden Clusterentwicklung an HEp-2-Zellen

Zur Ausweitung der bereits gewonnenen Erkenntnisse an Hela-Zellen wurde die Clusterentwicklung extern applizierter Modell-Liganden analog zu den unter 3.2.1 vorgestellten Versuchen zusätzlich an der humanen Epithelzelllinie HEp-2 analysiert (Abb. 19).

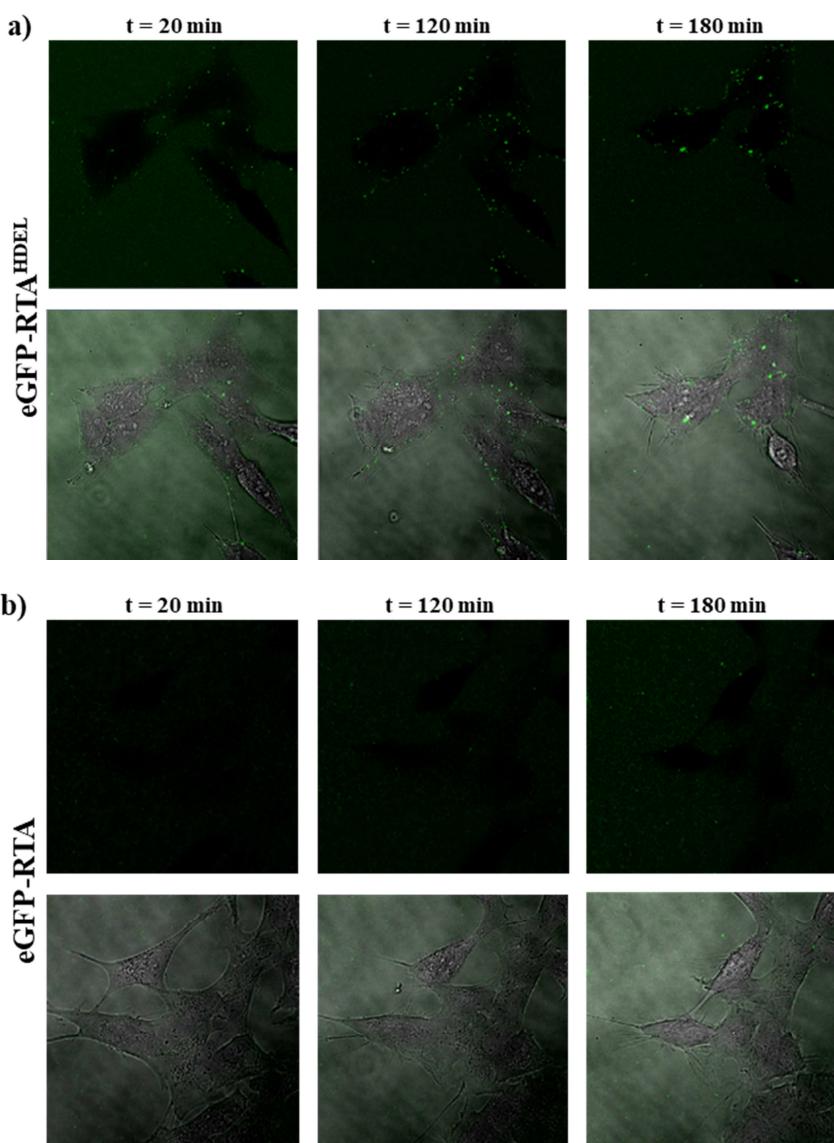


**Abbildung 19: Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche von HEp-2-Zellen nach Applikation verschiedener Modell-Liganden.** Die Zellen wurden nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> (a) bzw. eGFP-RTA (b) mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert. Dargestellt sind vier aussagekräftige Zeitpunkte (120 Bilder/h).

Die „Live Cell Imaging“-Analysen an HEp-2-Zellen zeigten eine ähnliche Clusterformierung und -Entwicklung wie sie auch bei HeLa-Zellen zu beobachten war. Auch hier wurde eine zeitabhängige Clusterentstehung auf der Zelloberfläche nach externer Applikation von eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> deutlich, welche bei den durchgeführten Kontrollexperimenten mit eGFP-RTA nicht feststellbar war. Die maximale beobachtete Fluoreszenzintensität der gebildeten Cluster war allerdings schwächer als an HeLa-Zellen beobachtet werden konnte (siehe Abb. 23)

### 3.2.4 KDEL-Rezeptor/Liganden-Clusterentwicklung an SH-SY5Y-Zellen

Nachdem für die Charakterisierung der KDELR-Dynamik am Beispiel von HeLa-, HEp-2- sowie HEK-293-Zellen bereits erste Erfolge erzielt werden konnten, sollte im Rahmen darauf aufbauender Experimente die Clusterentwicklung erstmals für Neuronen unter Verwendung der humanen Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y untersucht werden. Dazu wurden, analog zu den bereits beschriebenen Versuchen, SH-SY5Y-Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTA bzw. eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelt und der Verlauf der Clusterbildung und -Evolution über mehrere Stunden mittels CLSM dokumentiert (Abb. 20)

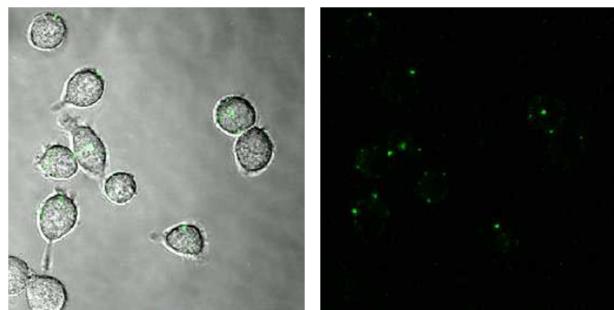


**Abbildung 20:** Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche von SH-SY5Y-Zellen nach Applikation verschiedener Modell-Liganden. Die Zellen wurden nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> (a) bzw. eGFP-RTA (b) mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert. Dargestellt sind drei aussagekräftige Zeitpunkte (120 Bilder/h).

Auch am Beispiel von SH-SY5Y-Zellen war eine deutliche Formierung und Entwicklung fluoreszierender Signale an der Zellperipherie nach externer Applikation von eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> festzustellen. Im Unterschied zu den bislang untersuchten Säugerzelllinien schien die initiale Clusterformierung im Falle von SH-SY5Y-Zellen jedoch schneller stattzufinden. Die ansonsten stets zu beobachtende Verzögerung der Clusterentwicklung bis  $t > 20$  min war hier nicht in vergleichbarer Größenordnung zu erkennen; nach 20 min waren bereits zahlreiche und vergleichsweise große Signalcluster an der Zelloberfläche erkenntlich. Die maximale Fluoreszenzintensität der akkumulierenden Signale auf bzw. nahe der PM schien derweil allerdings schwächer als an HeLa-Zellen beobachtet wurde (siehe Abb. 23).

### **3.2.5 KDEL-Rezeptor/Liganden Clusterentwicklung an RAW-Blue Makrophagen**

Ergänzend zu den bisherigen CLSM-Analysen wurden analoge Experimente an der Maus-Makrophagen-Zelllinie RAW-Blue durchgeführt. Dabei war vor allem die Frage von Interesse, inwiefern die für Makrophagen charakteristische, stark erhöhte Endozytoserate den Verlauf der Clusterbildung und -Entwicklung nach externer Applikation geeigneter Modell-Liganden beeinflusst. Dazu wurden RAW-Blue Makrophagen mit 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTA als Negativkontrolle behandelt und über mehrere Stunden mittels CLSM dokumentiert. Allerdings lieferten diese fluoreszenzmikroskopischen Studien zunächst keine eindeutig interpretierbaren Resultate. Es schien, unabhängig von der Art des extern applizierten Modell-Liganden, keine Clusterentwicklung stattzufinden. Tatsächlich legte eine erste, grob durchgeführte Quantifizierung der Signalentwicklung durch die AG Santen sogar eine schwächere Clusterevolution nahe, als sie in früheren Studien nach Applikation der Negativkontrolle eGFP-RTA zu verzeichnen war (siehe Abb. 23). Da während der mikroskopischen Analyse der Makrophagen stets ein recht starker, fluoreszierender Hintergrund vorhanden war, wurden im Rahmen ergänzender Experimente RAW-Blue Zellen erneut mit 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelt und nach 5 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mehrmals mit 1x PBS gewaschen um somit, nach Eliminierung des Hintergrunds eventuell vorhandene, schwache Signale zu detektieren.

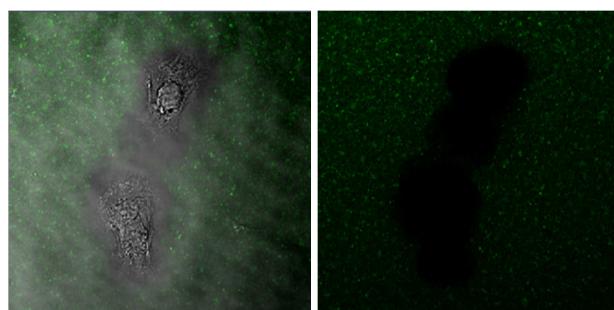


**Abbildung 21: Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche von RAW-Blue Makrophagen nach Applikation von eGFP-RTA<sup>HDEL</sup>.** Die Zellen wurden nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, 10 mal mit 1 x PBS gewaschen und hinsichtlich frühzeitig gebundener Liganden fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Nach Beseitigung des fluoreszierenden Hintergrunds durch wiederholtes Waschen mit 1 x PBS waren vereinzelte Cluster an der Peripherie der RAW-Makrophagen zu erkennen (Abb. 21). Im Unterschied zu den im Rahmen früherer Studien überprüften Säugerzelllinien schienen sich die Cluster im Verlauf der Zeit allerdings nicht, oder kaum, in ihrer Anzahl, Größe und Intensität zu entwickeln.

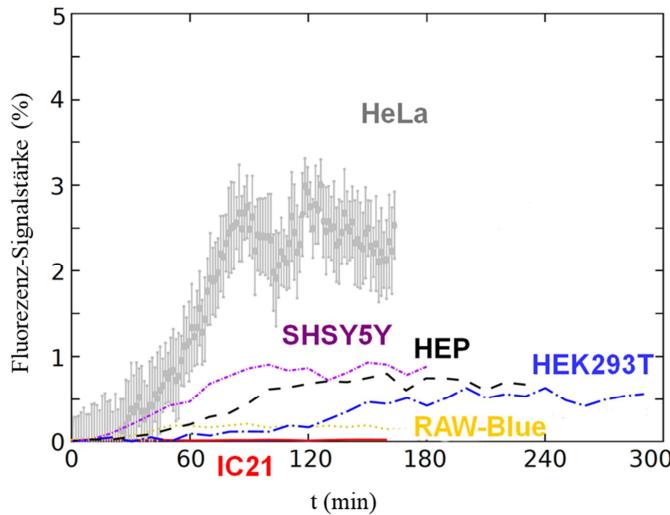
### 3.2.6 KDEL-Rezeptor/Liganden Clusterentwicklung an IC-21-Zellen

Aufbauend auf den bereits gewonnenen Erkenntnissen an RAW-Blue Makrophagen wurde eine zweite Makrophagen-Zelllinie getestet, die Maus Makrophagen-Zelllinie IC-21. Ähnlich wie bei den Experimenten mit RAW-Blue Makrophagen konnte auch im Falle der IC-21-Zellen keinerlei Clusterbildung oder Entwicklung beobachtet werden, unabhängig vom eingesetzten Modell-Liganden und der Dauer der Messung (siehe Abb. 23). Analog zu den Analysen der RAW-Blue Makrophagen wurden auch hier Zellen nach 5 minütiger Behandlung mit eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> wiederholt mit 1 x PBS gewaschen und auf das Vorhandensein gebundener Signale überprüft.



**Abbildung 22: Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche von IC-21-Zellen nach Applikation von eGFP-RTA<sup>HDEL</sup>.** Die Zellen wurden nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, 10 mal mit 1 x PBS gewaschen und hinsichtlich frühzeitig gebundener Liganden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der sichtbare, fluoreszierende Hintergrund ist Resultat der digitalen Amplifikation nach Bearbeitung der Aufnahmen mithilfe der Software „ZEN Blue“.

Wie in Abb. 22 zu erkennen ist, konnten für IC-21-Zellen im Unterschied zu RAW-Blue Makrophagen selbst nach Eliminierung des fluoreszierenden Hintergrunds keinerlei gebundene oder internalisierte Signale festgestellt werden. Die in Abb. 22 sichtbare Fluoreszenz resultiert aus der digitalen Amplifikation des Fluoreszenzsignals während der Bearbeitung der Aufnahmen mittels der Software „ZEN Blue“ und deutet somit nicht auf ein ineffizientes Waschen und den damit verbundenen Verbleib des Hintergrunds hin.



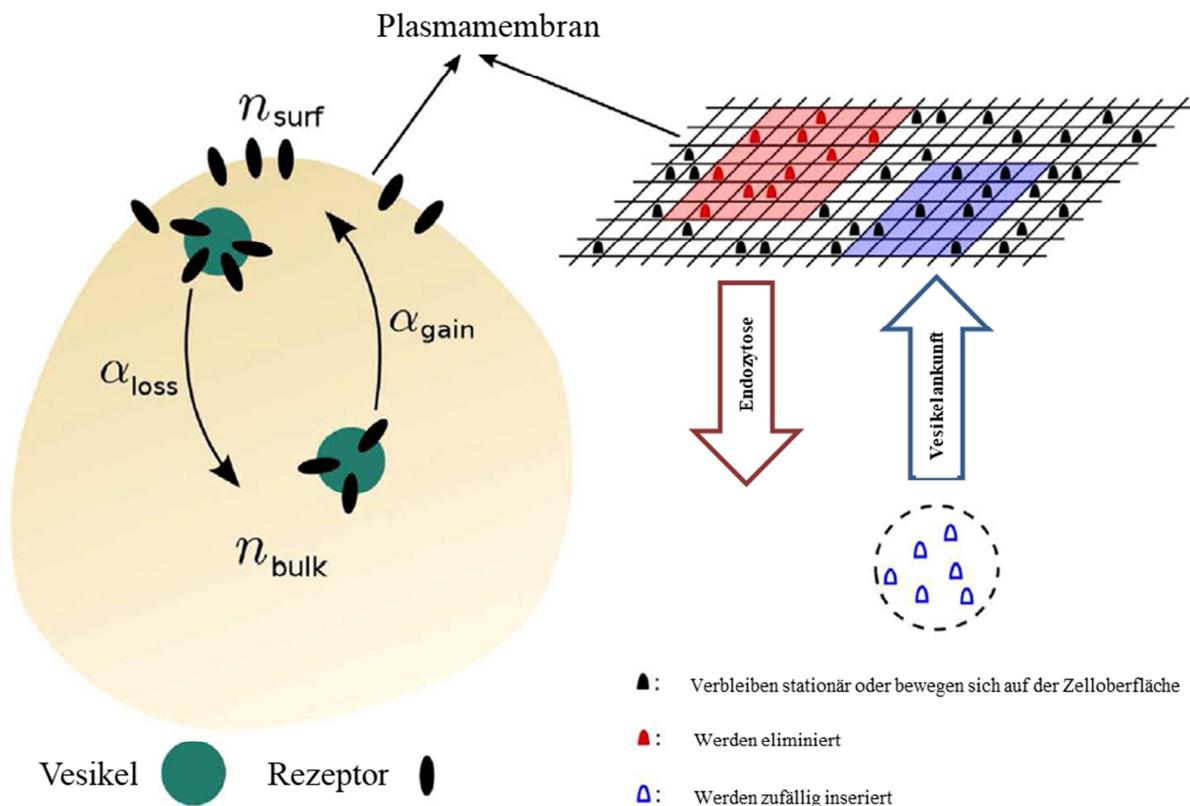
**Abbildung 23: Quantifizierung der Clustergrößenentwicklung extern applizierter KDELR-Modell-Liganden auf der Zelloberfläche von Säugerzellen.** Die Clusterentwicklung wurde nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>KDEL</sup> fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und quantifiziert.

### 3.3 Adaptive Monte-Carlo-Simulation und Etablierung eines minimalistischen „Trafficking-Modells“ zur Beschreibung der KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen

Das grundlegende Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, langfristig das Verständnis über die KDELR-Dynamik und die *in vivo* beobachteten KDELR/Liganden-Interaktionen auf Ebene der PM zu vertiefen und die zugrunde liegenden Mechanismen der Clusterbildung und -Entwicklung näher zu charakterisieren. Infolge dessen wurden Monte-Carlo-Simulationen (MC-Simulation) zur Etablierung eines minimalistischen „Trafficking-Modells“ durchgeführt (Abbildung 24). MC-Simulationen stellen ein stochastisches Verfahren dar, welches auf dem Prinzip einer sehr großen Anzahl unabhängig durchgeföhrter Zufallsexperimente verwendet werden kann, um schwer- oder unlösbare Probleme anhand der Wahrscheinlichkeitstheorie numerisch zu lösen. Die Zufallsexperimente können dabei entweder real oder im Rahmen von

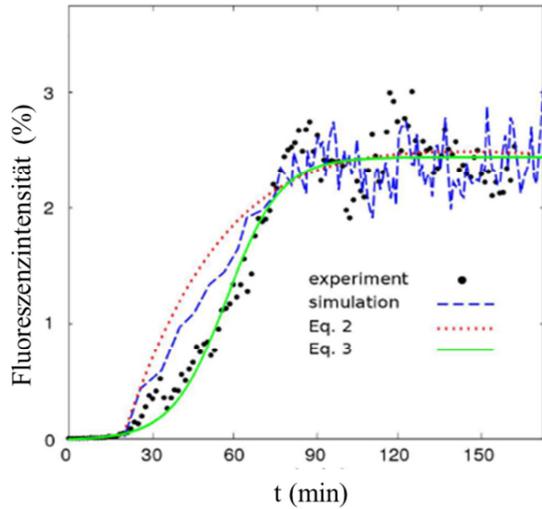
Computersimulationen mit geeigneten Algorithmen durchgeführt werden. Dieses Modell dient demnach zur grundlegenden Beschreibung von Verlust und Zugewinn an KDEL-Rezeptormolekülen während Endozytoseereignissen und Transportvorgängen zur PM. Sämtliche in dieser Arbeit gezeigten und diskutierten Simulationen wurden dabei in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ludger Santen der Fachrichtung Theoretische Physik der Universität des Saarlandes im Rahmen des SFB 1027 angefertigt. Die der Simulation zugrunde liegenden mathematischen Details wurden bereits kooperierend publiziert (Becker *et al.*, 2016).

Im Rahmen des „Trafficking-Modells“ wird die Plasmamembran als rechteckiges Gitternetzwerk mit einer Größe von  $4 \times 10^6$  Gittern bei einer Gittergröße von 10 nm definiert. Die Größe des Netzwerks orientiert sich dabei an der Größe einer HeLa-Zelle, während die Gittergröße wiederum annähernd der durchschnittlichen Größe eines Rezeptors entspricht. Demnach kann jedes Gitter maximal von einem Rezeptor, entweder mit gebundenem Liganden oder ohne Ligand, okkupiert werden. In Bezug auf die durchschnittliche Größe eines Clathrin-umhüllten Vesikels von 50-100 nm kann die Ausdehnung eines Endozytoseereignisses einen Bereich zwischen 5 x 5 und 10 x 10 Gittern umfassen und betrifft folglich sämtliche Rezeptormoleküle, der entsprechenden Region. Die Anzahl an Rezeptormolekülen die aus dem Zellinneren zur Oberfläche transportiert werden, variiert zwischen Null und der maximalen Vesikelkapazität, wobei diese Rezeptormoleküle nach Ankunft zufällig auf die verfügbaren Bereiche auf der PM verteilt werden. Unter der Annahme, dass es sich bei Frequenz, räumlicher Ausdehnung und Zielort für Endozytose und Rezeptorrückführung um unabhängige, stochastische Ereignisse handelt, berücksichtigt dieses Modell asymmetrische Raten für Endozytose und Vesikeltransport zu zufällig ausgewählten Regionen an der Zelloberfläche. Somit präsentiert dieses Modell ein in sich konsistentes Ungleichgewicht („non equilibrium steady state“) zwischen der Rate an Vesikeln, die zur Zelloberfläche transportiert werden ( $\alpha_{\text{gain}}$ ) und der Endozytoserate ( $\alpha_{\text{loss}}$ ).



**Abbildung 24:** Schematische Darstellung eines minimalistischen „Trafficking-Modells“ zur grundlegenden Beschreibung von Verlust und Zugewinn an KDEL-Rezeptormolekülen während Endozytose und Rückführung zur PM. Das Modell beschreibt ein „non equilibrium steady state“ zwischen der Endozytoserate ( $\alpha_{\text{loss}}$ ) und der Rate an Vesikeln, die zur PM transportiert werden ( $\alpha_{\text{gain}}$ ) bei gleichbleibender Rezeptor-Gesamtmenge, unterteilt in die Menge an Rezeptor im Zellinneren ( $n_{\text{bulk}}$ ) und die Rezeptormenge an der Zelloberfläche ( $n_{\text{surf}}$ ). Ein zufällig ausgewählter Bereich für ein stattfindendes Endozytoseereignis ist in rot markiert, ein entsprechender Bereich für die Ankunft eines Vesikels aus dem Zellinneren in blau.

Mithilfe dieses „Trafficking-Modells“ wurden Simulationen zur zeitabhängigen Ligandenclusterbildung und Clusterentwicklung durchgeführt und mit den Ergebnissen der real durchgeföhrten Experimente verglichen (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der Akkumulation und Clusterentwicklung von extern applizierten Modell-Liganden an HeLa-Zellen.** Verglichen werden experimentelle Daten (schwarz gepunktete Linie), Ergebnisse der Simulation (blau gestrichelte Linie) und die analytischen Ausdrucksformen Eq 2 und Eq 3. Die rot gepunktete Linie entspricht der analytischen Ausdrucksform mit der Gleichung  $\alpha_{\text{gain}} = \alpha_{\text{loss}} = 1.3 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ . Die grüne Linie repräsentiert die angepasste, analytische Ausdrucksform unter Berücksichtigung von „excluded volume“-bedingten Rezeptorinteraktionen und der möglichen Auto-Amplifizierung des Rezeptortransports. Die Startpunkte der Simulation und der analytischen Ausdrucksformen wurden dem zeitverzögerten Beginn der Clusterentwicklung entsprechend angeglichen.

Aus Abb. 25 wird ersichtlich, dass die simulierten Daten mit den realen Resultaten nahezu übereinstimmen. Die rot gepunktete Linie (Abb. 25, Eq. 2) repräsentiert hierbei die analytische Ausdrucksform mit der Gleichung  $\alpha_{\text{gain}} = \alpha_{\text{loss}} = 1.3 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ . Der hier vorgestellte Mechanismus bildet allerdings eine vereinfachte Vorstellung des intrazellulären Rezeptortransportes ab, bei dem Phänomene wie „excluded volume“ oder eine mögliche Auto-Amplifizierung des Rezeptortransportes keine Berücksichtigung finden. Werden diese Vorgänge ebenfalls in Betracht gezogen, muss die analytische Ausdrucksform entsprechend angepasst werden, um die *in vivo* beobachtete Clusterentwicklung über die Zeit zu reproduzieren (Abb 25, Eq. 3; für mathematische Details siehe Becker *et al.*, 2016).

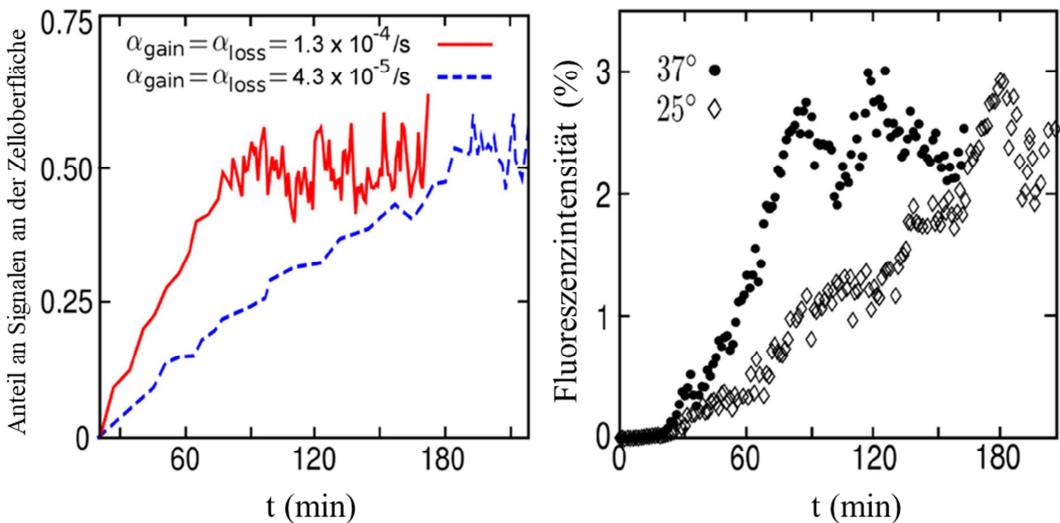
### 3.4 Einfluss der Temperatur und der Liganden-Konzentration auf die KDELR/Liganden Clusterentwicklung bei HeLa-Zellen

Nachdem die bisherigen Studien zur KDELR-Dynamik in Hela-Zellen erfolgreich die Etablierung eines vereinfachten „Trafficking-Modells“ möglich gemacht hatten, bestand der Fokus ergänzender Experimente darin, dieses „Trafficking-Modell“ weiter auszubauen, um die KDELR-Dynamik hinsichtlich komplexerer Fragestellungen und im Rahmen eines

breiteren Kontextes charakterisieren zu können. Die erste Fragestellung, welche zu diesem Zweck adressiert wurde, war der Einfluss einer Veränderung grundlegender Versuchspараметer auf die Clusterbildung und -Entwicklung nach externer Applikation geeigneter Modell-Liganden auf HeLa-Zellen. Eine erste Reihe von Experimenten hatte zum Ziel, jene Clusterentwicklung nach Anpassung der grundlegendsten äußereren Bedingungen, der Versuchstemperatur sowie der Konzentration an extern appliziertem Modell-Liganden zu analysieren.

### **3.4.1 Einfluss der Temperatur auf die KDELR/Liganden-Clusterentwicklung bei HeLa-Zellen**

Vor der Durchführung der eigentlichen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bei veränderter Umgebungstemperatur wurde das „Trafficking-Modell“ entsprechend angepasst. Unter Berücksichtigung der van-‘t-Hoff’schen Regel wurde eine um den Faktor 2-4 verlangsamte KDELR-Clusterentwicklung bei 25 °C und eine damit einhergehende Veränderung der Kinetik und des Kurvenverlaufs erwartet. Demnach wurden für die folgenden Simulationen die Vesikeltransportraten  $\alpha_{loss}$  und  $\alpha_{gain}$  um das Dreifache reduziert. Um die Aussagekraft dieser Simulation zu überprüfen, wurden dann komplettierende „Live Cell Imaging“ Experimente durchgeführt. Hierzu wurden, analog zu den Versuchen bei 37 °C, jeweils  $1 \times 10^5$  HeLa Zellen in 60 µm Zellkulturtestplatten ausgesät, 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelt. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte unmittelbar nach Ligandenapplikation bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 25 °C über einen Zeitraum von 180 min. Abbildung 26 zeigt die Resultate dieser fluoreszenzmikroskopischen Studien sowie die Daten der vorhergegangenen Simulation.



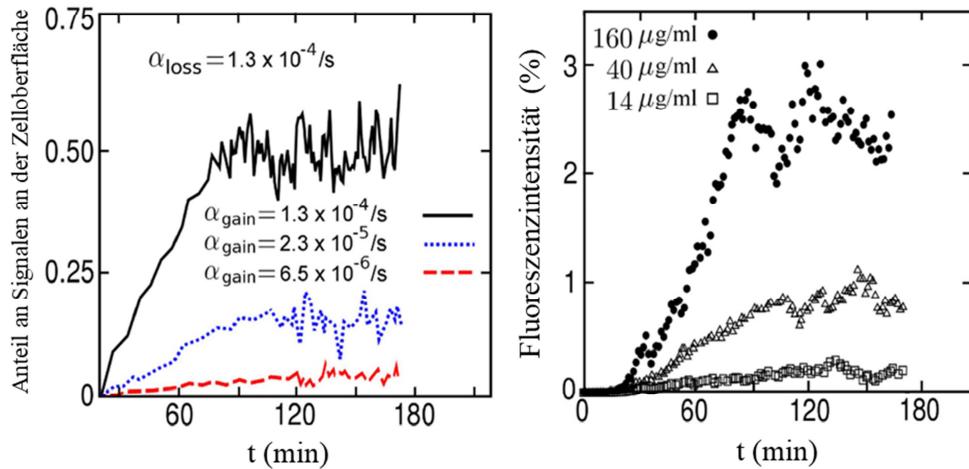
**Abbildung 26:** Veränderung der Akkumulation und Clusterentwicklung von extern appliziertem eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> auf der Zelloberfläche von HeLa-Zellen bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 25 °C und 37 °C. Die um den Faktor 3 reduzierte Clusterentwicklung der Simulation (links) repräsentiert den bekannten und durch die van-‘t-Hoff-schen Regel beschriebenen Effekt einer Temperaturveränderung auf Endozytose und intrazelluläre Transportprozesse. Die Simulation deckt sich mit den Beobachtungen der real durchgeföhrten Experimente (rechts).

In Anbetracht der im Vorfeld angepassten Simulation wurde eine zeitlich verzögerte Clusterentwicklung bei nahezu gleichbleibendem maximalem Saturationsniveau erwartet. Diese Vermutung konnte durch die durchgeföhrten „Live Cell Imaging“ Analysen bestätigt werden. Die simulierte Kinetik wird durch die real beobachtete Clusterentwicklung bei 25 °C im Vergleich zu 37 °C eindeutig bestätigt.

### 3.4.2 Einfluss der Konzentration extern applizierter Modell-Liganden auf die KDELR/Liganden-Clusterentwicklung bei HeLa-Zellen

Analog zum Einfluss einer Veränderung der Umgebungstemperatur wurde ebenfalls der Effekt einer alternierenden Konzentration von extern appliziertem Liganden auf die Clusterbildung und -Entwicklung an der Oberfläche von HeLa-Zellen analysiert. Dazu wurden analog zu den vorherigen Experimenten jeweils  $1 \times 10^5$  HeLa Zellen in 60 µm Zellkulturtestplatten ausgesät, 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und schließlich mit verschiedenen Konzentrationen von eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelt. Verwendet wurden hierbei neben der üblichen Konzentration von 160 µg/ml geringere Ligandenkonzentrationen von 40 µg/ml und 14 µg/ml. Nach der Applikation wurden die Zellen bei einer konstanten Temperatur von 37 °C über einen Zeitraum von 180 min fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Abbildung 27 zeigt den dosisabhängigen Effekt auf die KDELR/Liganden-

Clusterentwicklung und die entsprechend angepassten Parameter der Simulation im Hinblick auf das „Trafficking-Modell“.

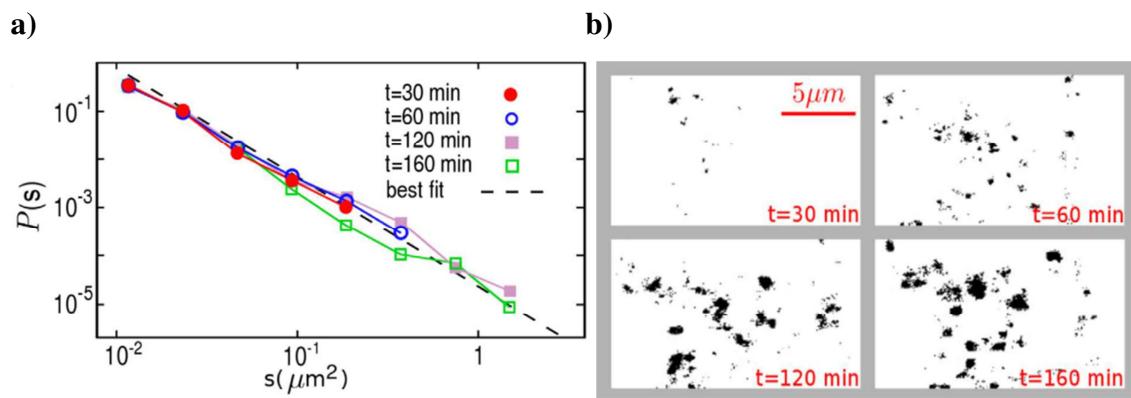


**Abbildung 27:** Dosisabhängige Veränderung der Akkumulation und Clusterentwicklung von extern appliziertem eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> auf der Zelloberfläche von HeLa-Zellen bei einer konstanten Temperatur von 37 °C. Die Vesikeltransportraten der Simulation (links) wurden angepasst, um eine optimale Übereinstimmung mit den Daten der real durchgeführten Experimente (rechts) zu erreichen.

Die Ergebnisse zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen der KDELR/Liganden-Clusterentwicklung und der Konzentration des applizierten Liganden. Eine Verringerung der Liganden-Konzentration führte erwartungsgemäß auch zu einem stark verminderten Auftreten von Clustern an der Zelloberfläche. Im Unterschied zum Einfluss der Temperatur, wurde bei der Verringerung der Liganden-Konzentration allerdings nicht nur die Clusterentwicklung verlangsamt, sondern das maximale Saturierungsniveau ebenfalls dosisabhängig vermindert. Dies äußerte sich darüber hinaus in den angepassten Vesikeltransportraten der Simulation. Während sich die Veränderung der Temperatur noch im gleichen Maße auf  $\alpha_{\text{loss}}$  und  $\alpha_{\text{gain}}$  auswirkte, wurden diese durch eine Variation der Konzentration extern applizierter Modellliganden unterschiedlich beeinflusst. Die Rate der Vesikel, die zur Plasmamembran transportiert werden ( $\alpha_{\text{gain}}$ ), wurde dabei wesentlich stärker beeinflusst als die Endozytoserate ( $\alpha_{\text{loss}}$ ). Demzufolge scheinen HeLa-Zellen die zur PM transportierte KDELR-Menge in Abhängigkeit von extern verfügbaren Liganden entsprechend regulieren zu können.

### 3.5 Untersuchungen zum anterograden KDEL-R-Transport

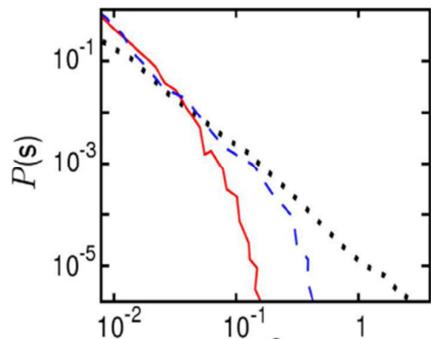
Um ein tieferes Verständnis über die Bildung und Entwicklung von KDEL/R-Liganden-Clustern zu entwickeln und die Frage aufzuklären, inwiefern die KDEL-Rezeptoren bereits in Form von vorgebildeten Clustern oder innerhalb von Mikro-Domänen auf der Zelloberfläche existieren, wurde die Clustergrößenverteilung  $P(s)$  des extern applizierten Modell-Liganden eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Wie Abbildung 28 zeigt, waren zu frühen Zeitpunkten stets nur vergleichsweise kleine Cluster sichtbar, während mit fort dauernder Messung die Clustergröße allgemein zunahm.



**Abbildung 28:** Zeitabhängige Evolution der Clustergröße von extern appliziertem eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> auf HeLa Zellen. (a) Eine „log-log“-Darstellung der zeitabhängigen Clustergrößenentwicklung  $P(s)$ . Die gestrichelte Linie repräsentiert die optimale „power-law“-Anpassung  $P(s) \sim s^{-\beta}$  wobei  $\beta \approx 2.1 \pm 0.1$ . (b) Clusterevolution auf zufällig ausgewählten Regionen der Zelloberfläche zu verschiedenen Zeitpunkten.

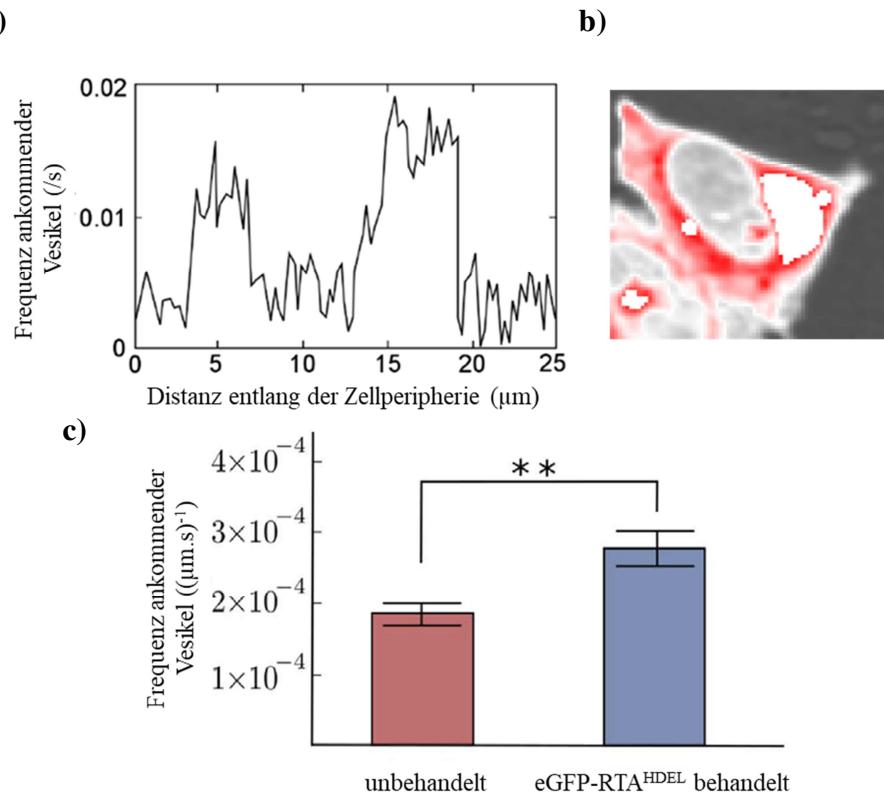
Bei genauer Analyse wird deutlich, dass die Evolution der Clustergröße sich entsprechend einer „power-law“-Verteilung  $P(s) \sim s^{-\beta}$  mit  $\beta \approx 2$  verhält. Mit Ausnahme der anfänglichen Verzögerung in der Clusterentwicklung ( $t < 20$  min) lässt sich dieses Verhalten über den gesamten Clusterbildungsprozess feststellen. Dieses „power-law“-Verhalten zeigt, dass die Verteilung der KDEL-R-Cluster an der Zelloberfläche nicht so stattfinden kann, wie im Rahmen des „Trafficking-Modells“ zunächst angenommen. Bisher wurde vermutet, dass sowohl Endozytoseereignisse als auch der Transport von KDEL-Rs zur PM auf strikt zufällige Zielorte beschränkt sind. Die Möglichkeit einer lateralen Rezeptordiffusion entlang der Zelloberfläche wurde ebenfalls nicht berücksichtigt. Auf diese Weise lässt sich durch die Simulation allerdings keine „power-law“ Verteilung der Clustergrößenentwicklung reproduzieren. Auch unter Berücksichtigung ergänzender Szenarien für die KDEL-R-Dynamik an der Zelloberfläche, wie etwa laterale Diffusion oder Rezeptor-Rezeptor-Anziehungs Kräfte, war keine „power-law“-ähnliche Evolution der Clustergröße zu beobachten (Abb. 29),

(Boggara *et al.*, 2013; Saffman und Delbrück, 1975; Guo und Levine, 1999; Reddy *et al.*, 2014). Die Kurvenverläufe entsprachen eher einer exponentiellen Clustergrößenverteilung. Eine „power-law“-Verteilung lässt sich nur unter der Annahme simulieren, dass KDELRs zu bevorzugten Stellen an der Zelloberfläche transportiert werden und dieser Transport einer auto-Amplifizierung unterliegt.



**Abbildung 29: Vergleich unterschiedlicher Szenarien zur Clustergrößenverteilung ( $P(s)$ ) von extern applizierten Modell-Liganden auf HeLa Zellen.** Dargestellt sind verschiedene, simulierte Szenarien zur KDELR-Dynamik. Der rote Graph repräsentiert  $P(s)$  bei  $t = 120$  min für zufällig zur PM verteilt, lateral nicht mobile Rezeptoren. Der blaue Graph zeigt  $P(s)$  unter Berücksichtigung einer lateralen Rezeptordiffusion sowie Anziehungskräften zwischen benachbart lokalisierten KDELRs. Der schwarze Graph zeigt  $P(s)$  unter der Annahme, dass der KDELR Transport zu bevorzugten Stellen auf der Zelloberfläche stattfindet. Nur mithilfe dieses Szenarios kann die zuvor beobachtete „power-law“-Verteilung von  $P(s)$  simuliert werden.

Es ist hinlänglich bekannt, dass die Regulierung und Umsetzung intrazellulärer Transportvorgänge eng mit dem Zytoskelett der Zelle assoziiert ist. Dabei findet der KDELR-Transport vom Golgi zur PM voraussichtlich entlang der Mikrotubuli (MT) statt, während beim Vesikeltransport und Austausch nahe der Zelloberfläche wahrscheinlich Aktinfilamente eine tragende Rolle spielen. Zwar ist die *in vivo* stattfindende Rezeptordynamik wesentlich komplizierter und komplexer reguliert und wird auch von Faktoren beeinflusst, die in dem hier vorgestellten „Trafficking-Modell“ keine Berücksichtigung finden (z. B. Dicke der PM, Lipid-Zusammensetzung usw.); dennoch kann aufgrund der bislang gewonnenen Erkenntnisse davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem intrazellulären KDELR-Transport um einen Tubulin- und Aktin-abhängigen Prozess handelt. Dieser Umstand wäre auch eine plausible Erklärung für das Vorhandensein bevorzugter KDELR-Zielbereiche auf der Zelloberfläche. Zur experimentellen Aufklärung dieser These wurden HeLa-Zellen mit einer mCherry-markierten Variante von Erd2.1 transfiziert und die Rezeptordynamik fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Dynamik von Erd2.1-mCherry in HeLa-Zellen.** (a) *In vivo* Dynamik von Erd2.1-mCherry. Die transfizierten HeLa-Zellen wurden mittels eines CLSM dokumentiert (720 Bilder/h). Die dargestellte „heat map“ zeigt die akkumulierte Fluoreszenzintensität der aufeinanderfolgenden Bilder. (b) Frequenz der Ankunft von Vesikeln an der Zelloberfläche über einen Zeitraum von 500 s. (c) Frequenz des Vesikeltransports zur Zellperipherie in unbehandelten bzw. mit eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelten Zellen ( $p \leq 0,01$ ).

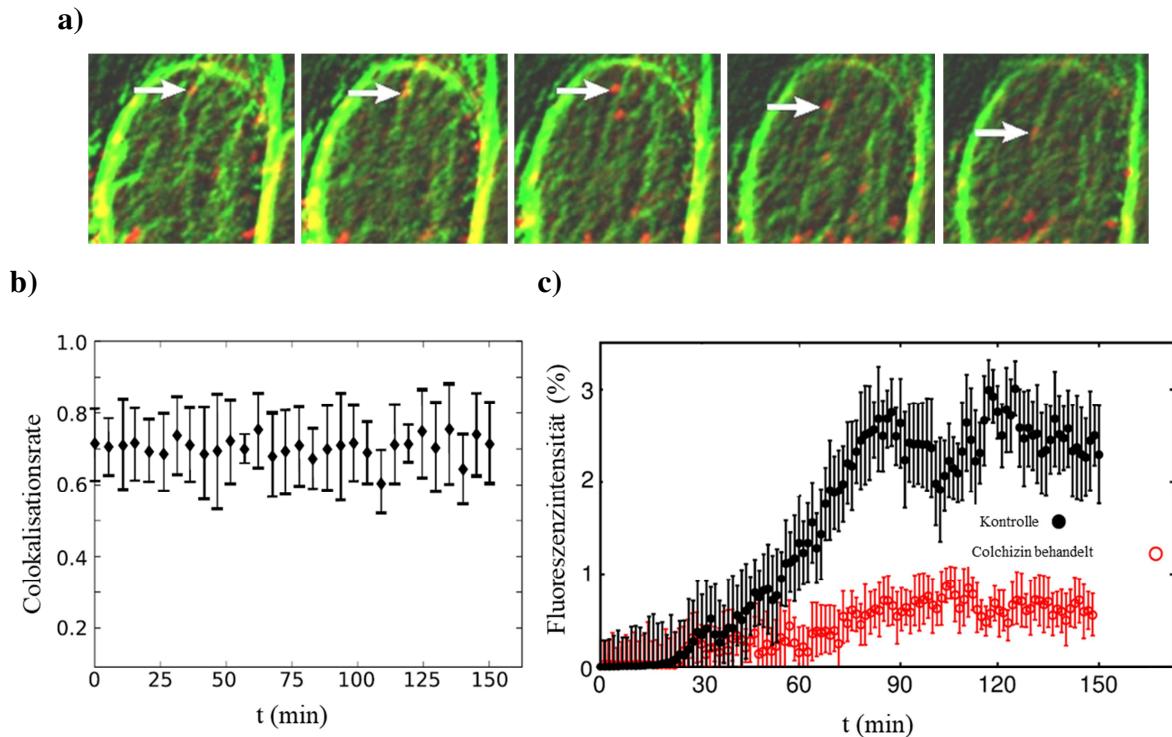
Die Beobachtungen belegen, dass der anterograde KDELR-Transport zur Zellperipherie nicht gleichmäßig oder zufällig über die Distanz der Plasmamembran verteilt stattfindet, sondern es vielmehr bestimmte Zielbereiche zu geben scheint, die häufiger als Ziel des vesikulären Transports besetzt werden. Zusätzlich konnte ein allgemein erhöhter KDELR-Transport zur PM in eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> behandelten Zellen gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die Beobachtungen stehen somit im Konsens zu den vorher gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der dosisabhängigen Clusterentwicklung extern applizierter Modell-Liganden und unterstützen die mathematische Vorhersage des „Trafficking-Modells“ und somit auch die Vermutung, dass KDELRs zu bevorzugten Zielbereichen auf der Zelloberfläche transportiert werden.

### **3.6 Einfluss des Zytoskeletts auf die KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen**

Aktiver Proteintransport entlang des Zytoskeletts wird durch MT- und Aktin-Filamente ermöglicht. Filamentöses F-Aktin ist dabei hautsächlich im Bereich des Zellkortex lokalisiert und an Zellmigration, Endozytose und Vesikeltransport nahe der Zellperipherie maßgeblich beteiligt, während MT für den Dynein/Kinesin vermittelten Transport von Vesikeln und Organellen essentiell sind (Hancock, 2014; Huber *et al.*, 2015; Soldati und Schliwa, 2006). Basierend auf den zuvor geschilderten Erkenntnissen hinsichtlich der KDELR-Verteilung entlang der Zellperipherie (siehe 3.5) und der dosisabhängigen Clusterentwicklung extern applizierter Liganden (siehe 3.4.2) sollte im Rahmen der folgenden Versuchsreihe analysiert werden, inwiefern die KDELR-Dynamik von einem intakten und funktionellen Tubulin- bzw. Aktin-vermittelten Proteintransport entlang des Zytoskeletts abhängig ist.

#### **3.6.1 Einfluss der Mikrotubuli auf die KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen**

Zur Überprüfung, ob MT tatsächlich eine tragende Rolle für die KDELR-Dynamik ausüben, wurden  $1 \times 10^5$  HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> sowohl mit einer mCherry-markierten Variante von Erd2.1 als auch mit einer eGFP-markierten Variante von β-Tubulin kotransfiziert und der KDELR-Transport entlang der fluoreszenzmarkierten MT mittels CLSM dokumentiert (Abbildung 31).



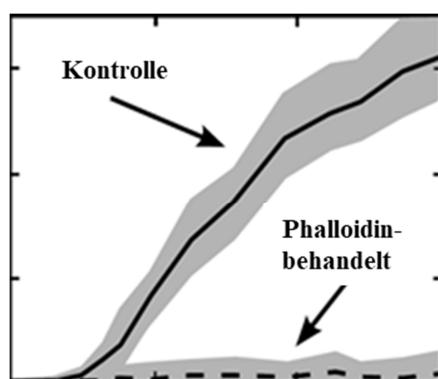
**Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation und Quantifizierung des MT-abhängigen KDELR-Transports und Clusterentwicklung extern applizierter KDELR-Modell-Liganden an HeLa-Zellen.** (a) Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation des Transports einzelner Erd2.1 Cluster (rot) entlang der Mikrotubuli (grün). Dargestellt ist eine Sequenz fünf aufeinanderfolgender Aufnahmen (720 frames/h) von HeLa-Zellen, welche sowohl eine mCherry-markierte Variante des KDELRs Erd2.1 als auch GFP-markiertes β-Tubulin exprimieren. Die Pfeile markieren Bereiche einer beispielhaften Rezeptor/Tubulin-Kolokalisation. (b) Kolokalisation zwischen GFP-Tubulin und Erd2.1-mCherry. Dargestellt ist die Kolokalisationsrate über einen Zeitraum von 500 s. (c) Clusterentwicklung nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> bei Colchizin behandelten HeLa-Zellen (2,5 µM Colchizin, 60 min vor Beginn der Messung; rot) im Vergleich zu un behandelten Zellen (schwarz).

Die Aufnahmen zeigten eine klare Rezeptor/Tubulin-Kolokalisation und einen direkten Transport des fluoreszenzmarkierten KDELRs Erd2.1 entlang der Mikrotubuli in HeLa-Zellen. Darüber hinaus zeigten quantitative Analysen eine vergleichsweise hohe Kolokalisationsrate. Um die Wichtigkeit intakter MT für den KDELR-Transport weiter aufzuklären, wurden HeLa-Zellen mit 2,5 µM Colchizin behandelt, 60 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend die Clusterentwicklung von extern appliziertem eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> analysiert (siehe Abb. 30 c). Colchizin hemmt den MT-Aufbau, indem es an freies Tubulin bindet und dieses somit für die MT-Assemblierung nicht mehr zur Verfügung steht. Dabei konnte eine sichtlich abgeminderte Clusterentstehung und Clustergrößenentwicklung im Vergleich zu behandelten Zellen festgestellt werden. Die Clusterentwicklung nach Colchizin-Behandlung entspricht eher der zuvor beobachteten Clusterentwicklung nach Applikation von eGFP-RTA ohne KDELR assoziiertes Sequenzmotiv (siehe 3.2.1). Zusätzlich zeigten „Live Cell Imaging“-Analysen mit HeLa-Zellen, welche die fluoreszenzmarkierte KDEL-Rezeptorvariante Erd2.1-mCherry exprimierten, eine deutliche

Verringerung der KDELR-Mobilität nach analoger Behandlung mit Colchizin. Während der KDELR-Transport in Bereichen des Golgi bzw. ER nahezu völlig zum Stillstand kam, wurde die Mobilität der fluoreszenzmarkierten Rezeptormoleküle nahe der Zellperipherie hingegen nur im geringen Maße beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Ergebnisse die Abhängigkeit der KDELR/Liganden-Clusterentwicklung nahe der PM vom aktiven KDELR-Transport entlang der MT.

### 3.6.2 Einfluss von Aktin auf die KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen

Analog zu den bereits vorgestellten Untersuchungen zum Mikrotubuli-vermittelten KDELR-Transport in HeLa-Zellen, wurde nun die Bedeutung von Aktin im Hinblick auf die KDELR-Dynamik näher analysiert. Die zuvor gewonnene Erkenntnis, dass die Colchizin bedingte Blockierung der MT offenbar keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Rezeptormoleküle nahe der Zellperipherie ausübt, legt nahe, dass cortikale Aktin-Filamente, auf die eine Colchizin Behandlung keine Wirkung zeigt, für den KDELR Transport und die Endozytose auf der PM verantwortlich sind. Zur experimentellen Klärung dieser Frage wurden HeLa-Zellen mit 10 µM Phalloidin behandelt, 90 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und die Clusterentwicklung von extern appliziertem eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> (160 µg/ml) mittels CLSM analysiert und mit unbehandelten Zellen verglichen (Abbildung 32). Phalloidin bindet an F-Aktin und verhindert dessen Depolymerisierung.



**Abbildung 32: KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in HeLa-Zellen nach Phalloidin Behandlung.** HeLa-Zellen wurden mit 10 µM Phalloidin behandelt, 90 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend die Clusterentwicklung von extern appliziertem eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> mittels CLSM dokumentiert und mit unbehandelten Zellen verglichen.

Die Resultate zeigten eine eindeutige Reduzierung der Clusterentwicklung in Phalloidin-behandelten HeLa-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Ergänzende Studien an HeLa-Zellen, welche die fluoreszenzmarkierte KDELR-Variante Erd2.1-mCherry

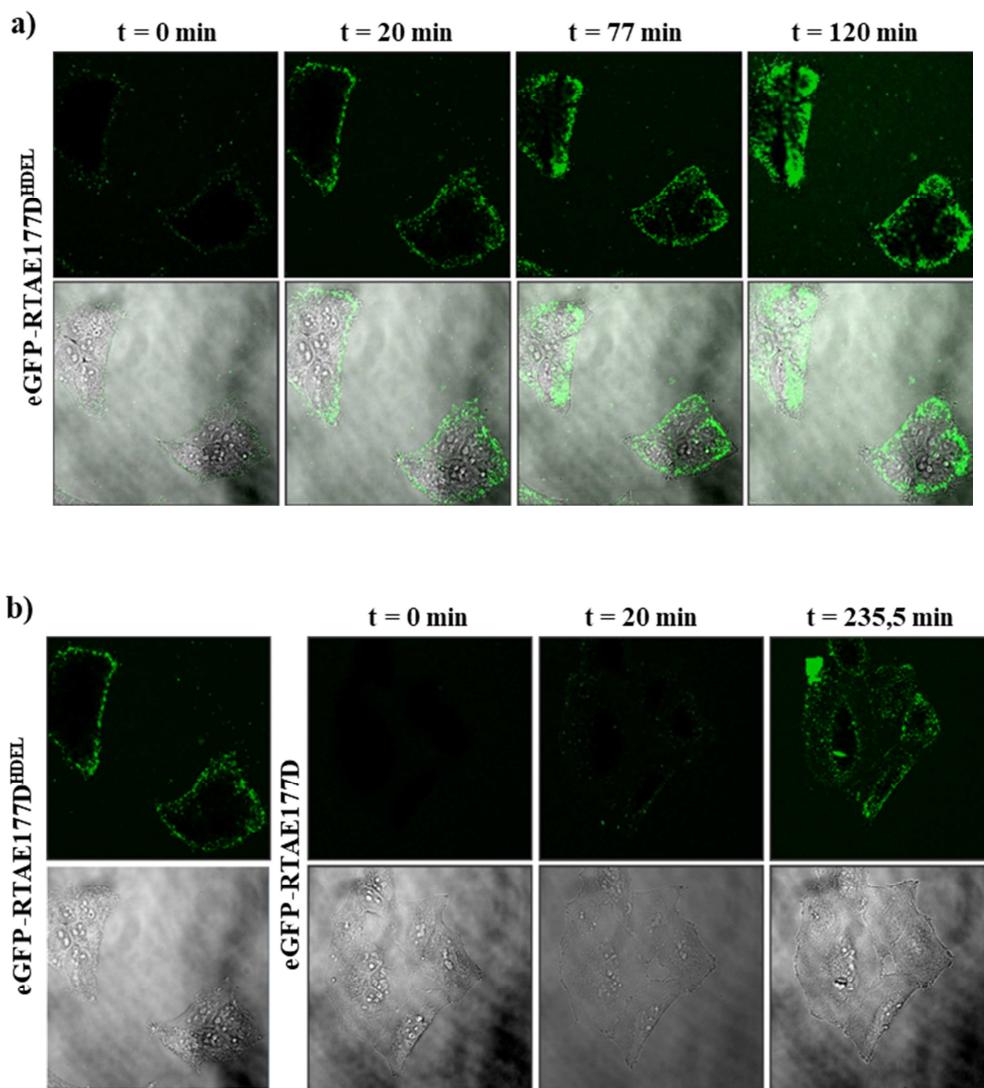
exprimierten, zeigten ebenfalls eine Verringerung der KDELR-Mobilität nahe der Zellperipherie (Daten nicht gezeigt) und unterstützen somit die Vermutung, dass der aktive, Aktin vermittelte KDELR-Transport essentiell für dessen Dynamik und Fähigkeit zur Ligandeninteraktion ist.

### **3.7 Studien zur KDELR/Liganden-Clusterentwicklung nach Applikation katalytisch vermindert aktiver Modell-Liganden**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bereits wichtige Erkenntnisse zur subzellulären KDELR-Lokalisation, KDELR-Dynamik sowie KDELR/Liganden-Interaktion in Sägerzellen gewonnen. Dabei wurden stets, den adressierten Fragestellungen entsprechend modifizierte Varianten der katalytisch aktiven Rizin-Domäne (RTA) als Modell-Liganden eingesetzt. Ein idealer Modell-Ligand sollte sich allerdings möglichst neutral verhalten und nicht durch die bloße Applikation an sich bereits diverse Effekte in der zu analysierenden Zielzelle auslösen. Nur dann kann definitiv angenommen werden, dass beobachtete Effekte und zelluläre Antworten auch tatsächlich Resultat einer KDELR-vermittelten Interaktion mit dem Liganden und nicht etwa Konsequenz eines möglicherweise unbekannten Effekts nach Applikation einer katalytisch aktiven Substanz sind. Aus diesem Grund bestand das übergeordnete Ziel der nun präsentierten Versuchsreihe darin, die bereits gewonnenen Erkenntnisse zur KDELR-Dynamik in Sägerzellen unter Verwendung einer katalytisch stark vermindert aktiven RTA-Variante, RTA-E177D, zu reproduzieren. Die E177D-Varianten zeichnen sich durch eine fünfzigfach verringerte Zytotoxizität im Vergleich zu wildtypischem RTA aus. Der Grund hierfür liegt in dem Anfügen einer Methylengruppe und der damit verbundenen Positionsveränderung von Arg180 innerhalb des RTA-Moleküls. Dadurch wird der zuvor enge räumliche Kontakt zwischen Arg180 und Tyr80 unterbrochen und die betroffenen Seitenkette verkürzt, was wiederum die angesprochene Verminderung der biologischen Aktivität von RTA bedingt (Allen *et al.*, 2007). Sämtliche hier vorgestellten Experimente zur Charakterisierung der Clusterentwicklung extern applizierter RTA-Varianten mit verminderter katalytischer Aktivität wurden in Zusammenarbeit mit Saskia Altmaier im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit am Institut für Molekular- und Zellbiologie an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

### 3.7.1 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in HeLa-Zellen nach Applikation von RTA-E177D

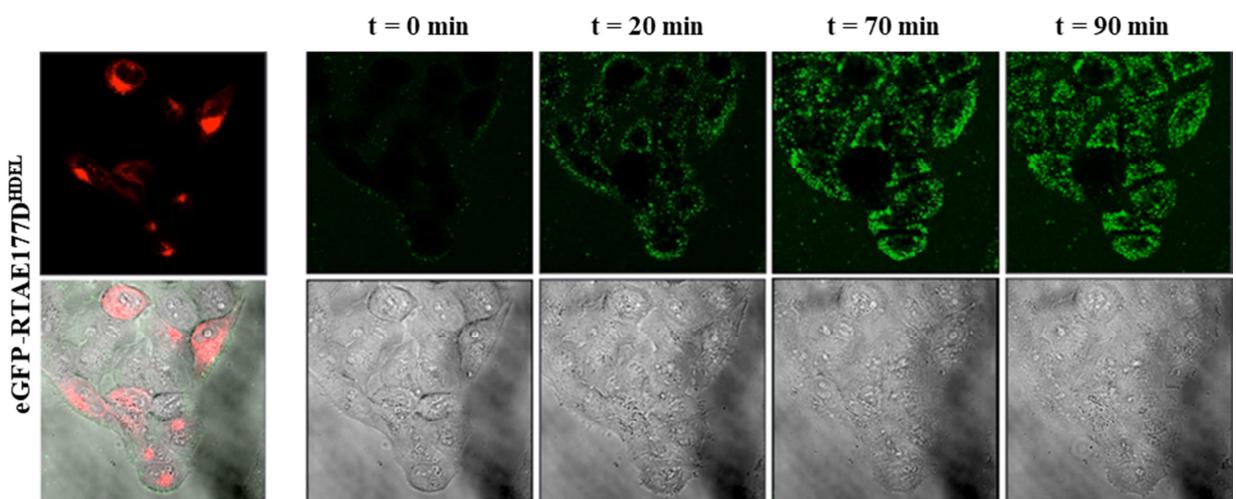
Die CLSM-Analysen zur Clusterformierung und -Entwicklung vermindert toxischer Varianten der Rizin A-Kette (RTA-E177D) wurden analog zu den bereits vorgestellten Experimenten mit wildtypischem RTA durchgeführt. Demnach wurden HeLa-Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTA-E177D<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTA-E177D behandelt und über mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM dokumentiert (Abb. 33).



**Abbildung 33: Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche von HeLa-Zellen nach Applikation verschiedener Modell-Liganden.** Die Zellen wurden nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> (a) bzw. eGFP-RTAE177D (b) mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert. Den Aufnahmen nach Behandlung mit eGFP-RTAE177D ist zusätzlich noch eine vergleichende Abbildung nach Applikation von eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> gegenübergestellt (links). Dargestellt sind ausgewählte Zeitpunkte während der Messung (120 Bilder/h).

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Clusterformierung nach externer Applikation von eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTAE177D zeigt vergleichbare Resultate zu den früher durchgeführten und beschriebenen Experimenten unter Verwendung der katalytisch aktiven RTA-Varianten. Auch für eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> war nach einer initialen Verzögerung in der Clusterbildung eine eindeutig zeitabhängige Formierung und Entwicklung fluoreszierender Cluster an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen zu beobachten. Kontrollexperimente mit eGFP-RTAE177D zeigten eine vergleichsweise stark verminderte Signalentwicklung, auch wenn bisweilen in sehr späten Phasen der „Live Cell Imaging“ Studien auch nach Applikation von eGFP-RTAE177D Signale an der Zellperipherie feststellbar waren.

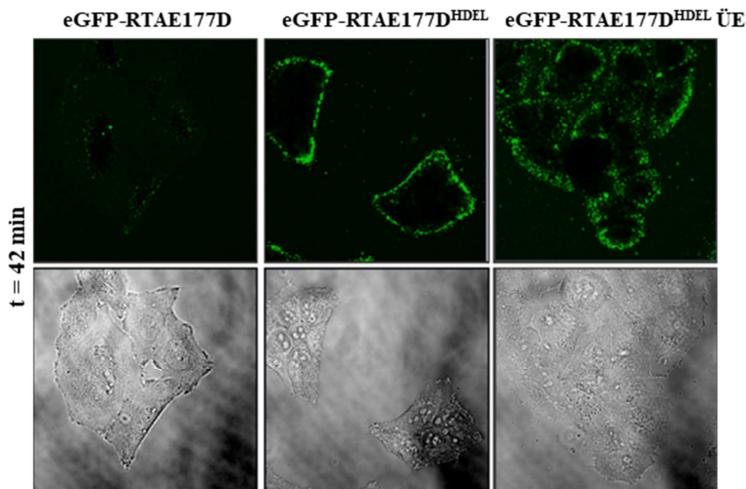
Darauf aufbauend wurden HeLa-Zellen transient und unter Kontrolle eines konstitutiven Promoters mit einer mCherry-markierten Variante des KDEL-R Erd2.1 (Erd2.1-mCherry) transfiziert, 48 h lang kultiviert und nach Behandlung mit 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 34). Dabei stand vor allem die Frage im Vordergrund, ob nach erfolgter Überexpression einer KDEL-R-Variante in HeLa-Zellen ebenfalls eine erhöhte bzw. effizientere Clusterbildung und -Evolution an der Zelloberfläche stattfindet.



**Abbildung 34:** Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der Clusterentwicklung an HeLa-Zellen nach erfolgter Überexpression einer mCherry-markierten Variante von Erd2.1. Die Überexpression erfolgte durch transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit Erd2.1-mCherry unter Kontrolle eines konstitutiven Promoters. Die Zellen wurden mit 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> behandelt und mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert. Dargestellt sind ein Nachweis der erfolgreichen Erd2.1-mCherry Expression (links) sowie vier relevante Messzeitpunkte (t0, t20, t77, t90 min)

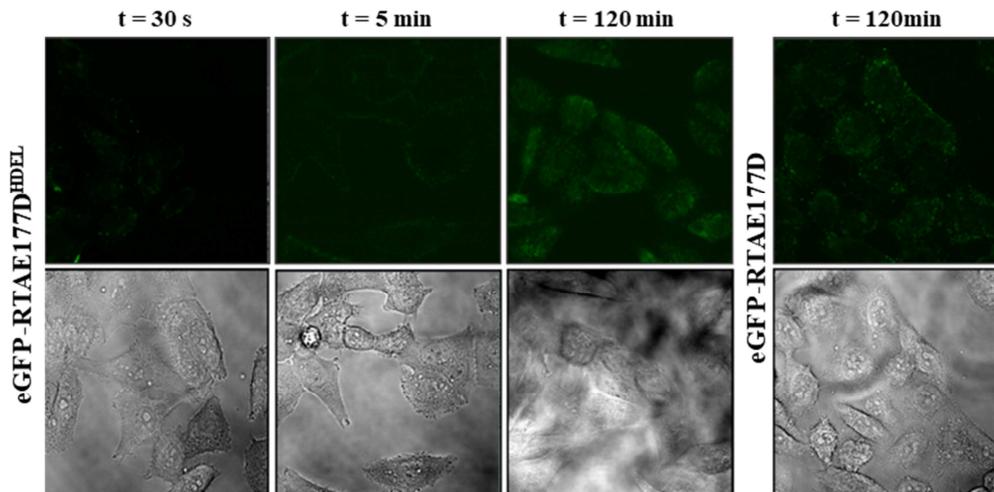
Erneut war eine deutliche und zeitabhängige Clusterentwicklung nach externer Applikation von eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> an der Zelloberfläche von Erd2.1-mCherry überexprimierenden HeLa-Zellen zu erkennen. Ob sich die Überexpression der KDEL-R-Variante tatsächlich

stärkend auf die Clusterentwicklung ausgewirkt hat kann jedoch erst nach einer exakten Evaluation und Quantifizierung der Signale beurteilt werden; diese Analysen erfolgen aktuell in Kooperation mit der AG Santen.



**Abbildung 35: Vergleichende Darstellung fluoreszenzmikroskopischer Analysen zur Clusterentwicklung an HeLa-Zellen.** Dargestellt sind HeLa-Zellen nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTAE177D (links), eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> (Mitte) sowie eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> nach vorheriger Überexpression von Erd2.1-mCherry (rechts) jeweils 42 min nach erfolgter Applikation.

Analog zu den Experimenten mit wildtypischen RTA-Varianten als Modell-Liganden wurden auch die sehr frühen Stadien der Clusterentwicklung nach externer Applikation von eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> und eGFP-RTAE177D analysiert. Dazu wurden Hela-Zellen mit jeweils 160 µg/ml der erwähnten Liganden behandelt, 30 s bzw. 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, nicht gebundene Signale durch wiederholtes Waschen mit 1 x PBS entfernt und die Zellen schließlich fluoreszenzmikroskopisch auf bereits gebundene oder internalisierte Liganden überprüft (Abb. 36).



**Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation frühzeitig gebundener Modell-Liganden an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden mit 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTAE177D behandelt, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, 10 mal mit 1 x PBS gewaschen und hinsichtlich gebundener Signale analysiert. Dargestellt sind Zellen die (von links nach rechts) 30 s, 5 min, 120 min mit eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> bzw. 120 min mit eGFP-RTAE177D behandelt wurden.

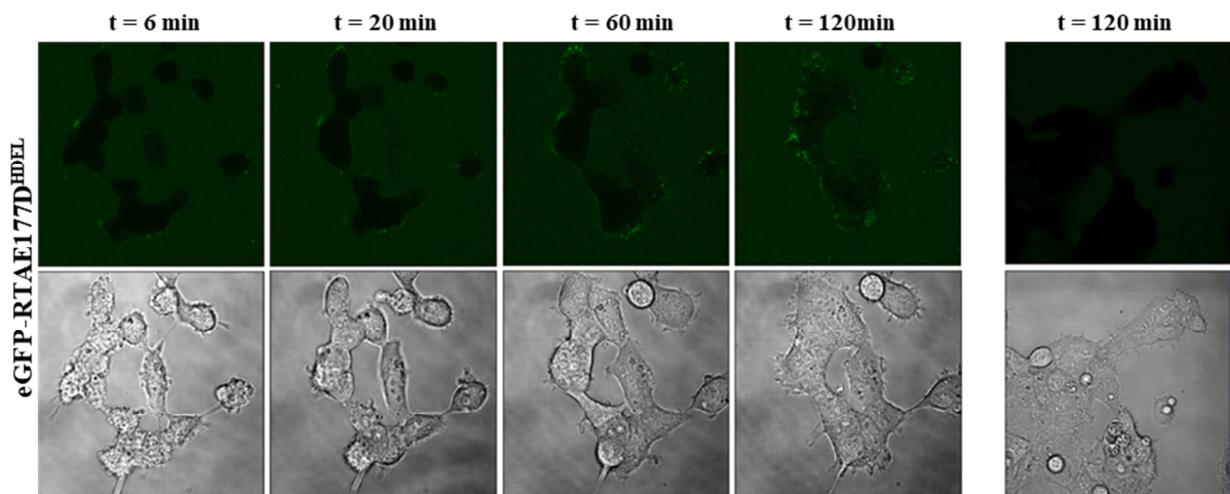
Bereits nach kurzer Inkubationszeit von 30 s bzw. 5 min waren erste schwache Signale an der Zelloberfläche zu erkennen, welche nach einer länger durchgeführten Liganden-Applikation erwartungsgemäß in Anzahl und Intensität zunahmen. Nach Applikation des Kontroll-Liganden eGFP-RTAE177D über einen Zeitraum von 2 h waren ebenfalls schwache Signale erkennbar, wenngleich die beobachtete Intensität im direkten Vergleich etwas geringer ausfiel.

Die hier gezeigten Studien mit RTA-Varianten verminderter Toxizität stehen somit durchgehend im Einklang mit den früheren Experimenten unter Einsatz wildtypischer RTA-Varianten.

### 3.7.2 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in HEK-Zellen nach Applikation von RTAE177D

Nachdem erste Erkenntnisse zur Clusterentwicklung der katalytisch vermindert aktiven RTA-Varianten bei HeLa-Zellen ein nahezu identisches Resultat erbrachten wie die ursprünglich durchgeführten Experimente mit nativem RTA, wurden ergänzende Studien an alternativen Säugerzelllinien durchgeführt. Erneut dienten diese Experimente dazu, die KDELR-Dynamik in einem breiteren Kontext adressieren und mit den bereits anhand des erstellten „Trafficking-Modells“ etablierten Resultaten vergleichen zu können.

Im Rahmen des Versuchs wurden Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293 Zellen eingesetzt, welche eine FLAG-getaggte Variante des KDELR Erd2.1 stabil und unter Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promoters im Genom tragen. Die FLAG-Markierung war dabei für diesen Versuch nicht von Bedeutung, wichtig war lediglich die Möglichkeit, eine KDELR Variante gezielt und kontrolliert in HEK-293 Zellen exprimieren zu können. Für die eigentliche Analyse wurden die betreffenden Zellen (Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293) nach der Aussaat mit 1 µg/ml Tetrazyklin zwecks Induktion der Expression behandelt, 48 h später 160 µg/ml eGFP-RTA-E177D<sup>HDEL</sup> appliziert und die Zellen schließlich bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mehrere Stunden fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert (Abb. 37).

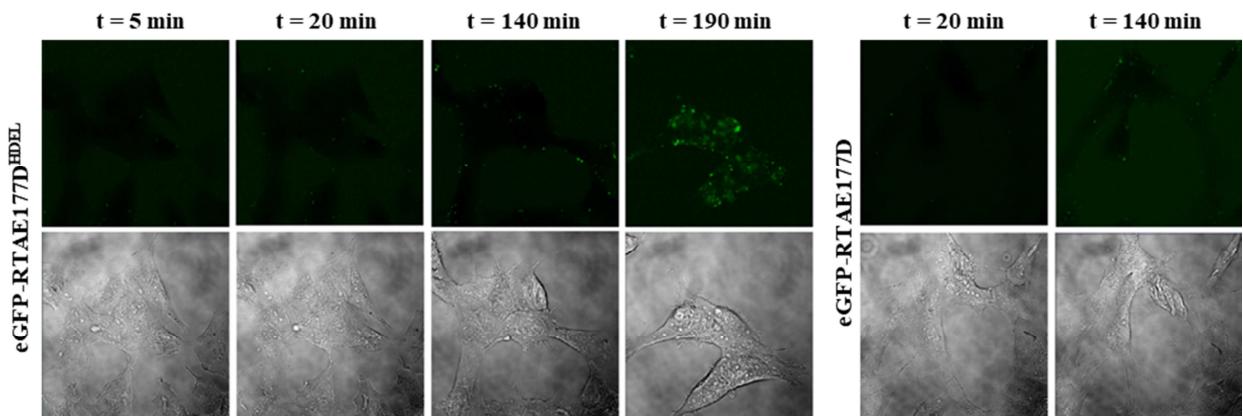


**Abbildung 37: Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche stabil transfizierter Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293-Erd2.1-FLAG-Zellen nach externer Applikation von eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup>.** Die Induktion der Expression wurde 48 h vor der „Live Cell Imaging“-Analyse mittels 1 µg/ml Tetrazyklin induziert, die Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> behandelt und mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Dargestellt sind ausgewählte Zeitpunkte während der Messung sowie Zellen ohne Induktion der Expression (rechts).

Wie zu erwarten war eine eindeutige zeitabhängige Clusterentwicklung nach externer Applikation des Modell-Liganden eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> an der Zelloberfläche zu beobachten. Inwiefern die vorher stattgefundene Induktion der Erd2.1-Überexpression die dokumentierte Clusterevolution beeinflusst hat, kann aufgrund rein visueller Eindrücke nicht verlässlich beurteilt werden. Zwar ist im direkten Vergleich mit dem durchgeführten Kontrollexperiment ohne initiale Induktion der Expression eine vermindernde Signalentwicklung zu erkennen, allerdings steht diese sehr schwache Clusterformierung nicht im Einklang mit früheren „Live Cell Imaging“-Studien mit Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293 Zellen. Für gewöhnlich ist auch ohne eine im Vorfeld induzierte Überexpression einer KDELR-Variante ein mit HeLa-Zellen vergleichbares Clusterverhalten zu erwarten.

### 3.7.3 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in SH-SY5Y-Zellen nach Applikation von RTAE177D

Analog zu den Studien zur Charakterisierung der KDELR-Dynamik unter Verwendung verschiedener RTA-Varianten als Modell-Liganden, sollte nun auch die Clusterentwicklung der RTA-Varianten mit verminderter, katalytischer Aktivität für Neuronen mithilfe der humanen Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y untersucht werden. Dazu wurden, analog zu den bereits beschriebenen Versuchen, SH-SY5Y-Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTAE177D bzw. eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> behandelt und der Verlauf der Clusterbildung und Evolution über mehrere Stunden mittels CLSM dokumentiert (Abb. 38).

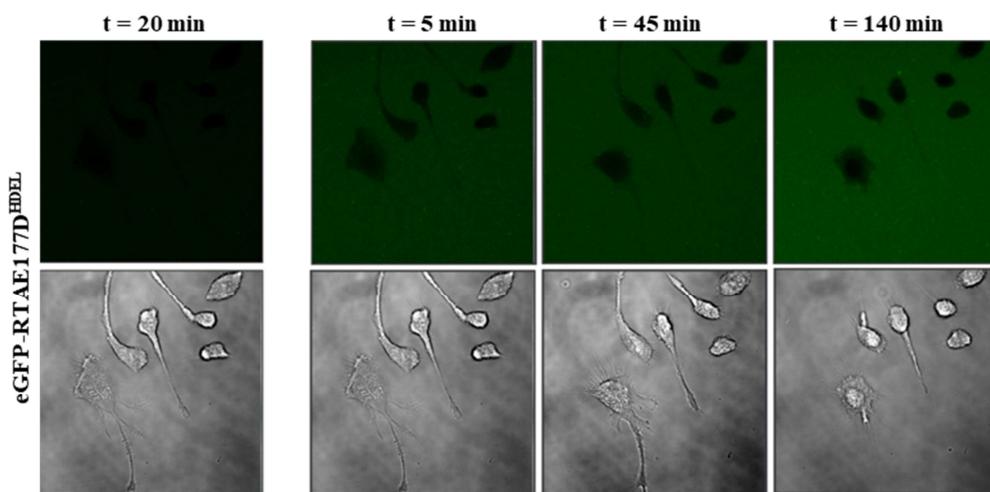


**Abbildung 38:** Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche von SH-SY5Y-Zellen nach Applikation verschiedener Modell-Liganden. Die Zellen wurden nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> (links) bzw. eGFP-RTAE177D (rechts) mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert. Dargestellt sind ausgewählte Messzeitpunkte (t5, t20, t140, t190 min und wiederholt mit 1 x PBS gewaschen (links); t20, t140 min (rechts)).

Die Beobachtungen entsprechen abermals den Erwartungen. Nach externer Applikation von eGFP-RTA-E177D<sup>HDEL</sup> war eine deutliche zeitabhängige Evolution der fluoreszierenden Signale an der Zellperipherie von SH-SY5Y zu erkennen, die im Falle der Applikation des Kontroll-Liganden eGFP-RTA-E177D nicht festzustellen war. Lediglich in den sehr späten Phasen der „Live Cell Imaging“-Analyse wurde auch nach eGFP-RTA-E177D-Behandlung eine leicht gesteigerte Clusterentwicklung beobachtet. Die hier präsentierten Beobachtungen stehen im Einklang mit den früheren Studien unter Verwendung katalytisch aktiver RTA-Varianten, für ein abschließendes Fazit bedarf es allerdings einer bildgenauen Evaluation und Quantifizierung der Entwicklung der Fluoreszenzintensität, welche bislang noch aussteht.

### 3.7.4 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in IC21-Zellen nach Applikation von RTA-E177D

Parallel zu den bereits vorgestellten Studien zur Clusterentwicklung verschiedener Modell-Liganden nach Behandlung von Zelllinien mit erhöhter Endozytoserate wurden nun auch die RTA-Varianten mit verminderter katalytischer Aktivität hinsichtlich ihres Clusterverhaltens gegenüber solchen Zelllinien analysiert. Im Rahmen einer ersten Versuchsreihe wurden IC21-Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTA-E177D behandelt und über mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> analysiert (Abb. 39).

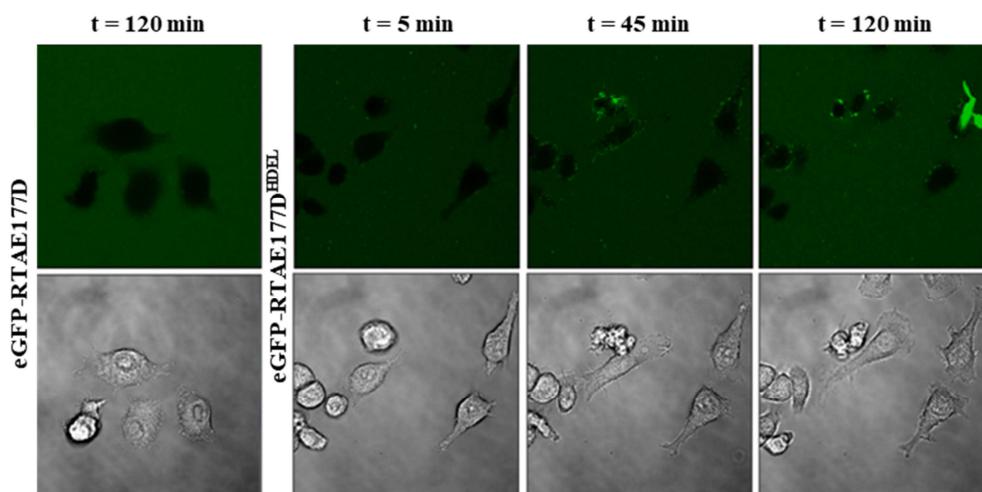


**Abbildung 39: Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche von IC-21-Zellen nach Applikation von eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup>.** Die Zellen wurden nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert. Dargestellt sind ausgewählte Messzeitpunkte (von links nach rechts: t20 min ohne digitale Amplifikation des Signals, t5, t45, t140 min). Der sichtbare fluoreszierende Hintergrund ist Resultat der digitalen Amplifikation nach Bearbeitung der Aufnahmen mithilfe der Software „ZEN Blue“. Ohne diese Bearbeitung erschienen die Aufnahmen tiefschwarz (120 Bilder/h).

Es war zu keinem Zeitpunkt, unabhängig von der Identität des applizierten Liganden, eine Bildung oder Evolution von Clustern an der Zelloberfläche der analysierten IC-21-Zellen zu beobachten (Daten für eGFP-RTAE177D nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in der Vergangenheit durchgeföhrten Experimenten mit IC-21-Zellen nach Applikation katalytisch aktiver RTA-Varianten als Modell-Liganden.

### 3.7.5 KDELR/Liganden-Clusterentwicklung in RAW-Blue-Zellen nach Applikation von RTA-E177D

Ergänzend zu den Studien mit IC-21-Zellen wurden analoge Experimente mithilfe der Maus-Makrophagen-Zelllinie RAW-Blue durchgeführt. Demnach wurden RAW-Blue-Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTAE177D<sup>HDEL</sup> bzw. eGFP-RTAE177D als Negativkontrolle behandelt und über mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert (Abb. 40).



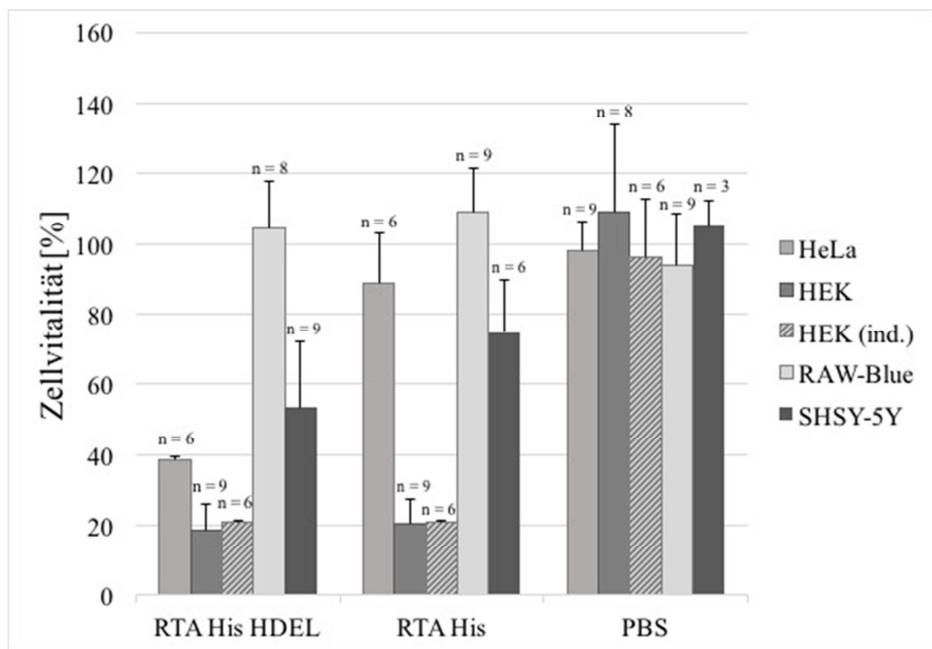
**Abbildung 40:** Analyse der Rezeptor-Clusterentwicklung an der Oberfläche von RAW-Blue Makrophagen nach Applikation verschiedener Modell-Liganden. Die Zellen wurden nach externer Applikation von 160 µg/ml eGFP-RTAE177D (links) bzw. eGFP-RTAE-177D<sup>HDEL</sup> (rechts) mehrere Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mittels CLSM analysiert. Dargestellt sind ausgewählte Messzeitpunkte (von links nach rechts: t120, t5, t45, t120 min).

Es war nur eine vergleichsweise schwache und zeitlich verzögerte Clusterformierung an der Zellperipherie von RAW-Blue Makrophagen zu erkennen. Im Gegensatz zu HeLa-Zellen waren erste deutliche Signale erst nach 45 min identifizierbar. Auch die maximale Intensität der gebildeten Cluster erschien wesentlich schwächer als im Rahmen der Experimente mit HeLa, HEK-293 sowie SH-SY5Y-Zellen festgestellt werden konnte. Nach Applikation des Kontroll-Liganden eGFP-RTAE177D fand keinerlei Clusterbildung statt.

### **3.8. XTT-basierte Vitalitätsbestimmung von Sägerzellen nach Applikation katalytisch aktiver RTA-Varianten**

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit durchgeführten „Live Cell Imaging“-Studien führten, in Abhängigkeit der eingesetzten humanen Zelllinie zu teils deutlich unterschiedlichen Ergebnissen. Folglich stellt sich die Frage, wie diese Abweichungen des Clusterverhaltens trotz identisch applizierter Modell-Liganden und analoger Versuchsbedingungen zu Stande kommen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die eingeschränkte oder nicht vorhandene Fähigkeit der Zellen effizient, mit den extern applizierten Modell-Liganden zu interagieren bzw. diese zu internalisieren. Zur experimentellen Adressierung dieser Fragestellung wurde überprüft, inwiefern eine Applikation von RTA<sup>HDEL</sup> einen toxischen Effekt auf die einzelnen Sägerzelllinien ausübt. Das Ausbleiben eines entsprechenden Effekts wäre ein starkes Indiz für die Unfähigkeit der Zielzelle, das applizierte Toxin effizient aufnehmen zu können. Die hier vorgestellten Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Saskia Altmaier als Teil ihrer Bachelor-Arbeit am Institut für Molekular- und Zellbiologie an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Die Bestimmung der Zytotoxizität nach externer Liganden-Applikation erfolgte indirekt über einen XTT-basierten Zellvitalitätsnachweis. Dazu wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen der zu analysierenden Sägerzelllinien in 24-Well Zellkulturtestplatten ausgesät, 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und schließlich mit 160 µg/ml RTA<sup>HDEL</sup> bzw. RTA ohne KDELR assoziiertes Sequenzmotiv sowie mit 1 x PBS als Negativkontrolle behandelt. Weitere 24 h später wurde die Vitalität der Zellen mittels XTT photometrisch bei 450 nm überprüft (Abb. 41).



**Abbildung 41:** XTT-basierter Zellvitalitätsnachweis zur indirekten Überprüfung der toxischen Wirkung extern applizierter RTA-Varianten gegenüber verschiedenen Säugerzelllinien.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in 24-Well Zellkulturtestplatten ausgesät, nach 24 h Kultivierung mit  $160 \mu\text{g}/\text{ml}$  RTA<sup>HDEL</sup> bzw. RTA behandelt und weitere 24 h später spektralphotometrisch bei 450 nm auf ihre Vitalität überprüft. Als Kontrollen dienten  $1 \times$  PBS bzw. DMEM-behandelte Zellen.

Die Ergebnisse bestätigen größtenteils die Beobachtungen der „Live Cell Imaging“-Studien. Wie zu erwarten übte RTA<sup>HDEL</sup> nach externer Applikation auf HeLa-Zellen einen deutlichen, zytotoxischen Effekt aus, während die Applikation von RTA einen vergleichsweise schwachen toxischen Effekt bedingte. Eine ähnliche Aussage lässt sich auch für die analysierten SH-SY5Y-Zellen treffen, wohingegen für RAW-Blue Makrophagen, unabhängig von der Art des applizierten Toxins, keinerlei toxischer Effekt zu beobachten war. Die Experimente mit Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293-Zellen lieferten allerdings kaum nachvollziehbare Resultate. Sowohl Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293-Zellen, welche vor der Liganden-Applikation mit Tetrazyklin zwecks Induktion einer Erd2.1 Überexpression behandelt wurden, als auch nicht induzierte Zellen zeigten sich stets stark sensitiv gegenüber den verwendeten RTA-Varianten. Zwischen RTA<sup>HDEL</sup> und der eigentlich weniger toxisch wirkenden RTA-Variante ohne HDEL-Motiv wurde kein Unterschied festgestellt. Es kann somit festgestellt werden dass sich die analysierten Säugerzellen hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber einer externen RTA<sup>HDEL</sup>-Applikation unterscheiden.

## 4. Diskussion

Die Fähigkeit einer Zelle, extrinsische Signale wahrzunehmen, zu verarbeiten und intrazelluläre Vorgänge als Antwort auf einen extrazellulären Reiz zu regulieren, gehört zu deren wohl wichtigsten und faszinierendsten Eigenschaften, ohne die das komplexe koordinierte Zusammenspiel wesentlicher zelleigener Prozesse nicht möglich wäre. Dabei nehmen vor allem Plasmamembran-lokalierte Rezeptoren wie beispielsweise GPCRs eine bedeutende Stellung ein, indem sie eine Vielzahl unterschiedlichster Liganden, wie etwa Peptide, Hormone oder Medikamente erkennen und somit eine ligandspezifische zelluläre Antwort vermitteln können (Hanlon und Andrew, 2015). In diesem Kontext stellt das transmembrane Rezeptor-Clustering einen weit verbreiteten Prozess dar, der in Pro- wie in Eukaryonten für die physikalische Rezeptor/Liganden-Interaktion sowie für die Verarbeitung und Umsetzung von Signalen von Wichtigkeit ist. Zahlreiche, an der Zelloberfläche lokalisierte Rezeptorklassen, wie etwa EGF- und T-Zell-Rezeptoren oder solche die von diversen A/B-Toxinen und Viren für ihren Zelleintritt parasitiert werden, assemblieren sich zu Rezeptor-Clustern innerhalb dynamischer Domänen auf oder nahe der Plasmamembran und ermöglichen der Zelle dadurch eine gezielte Modulation von Signaleignissen im Hinblick auf die Signalsensitivität und Rezeptor/Liganden-Interaktion (Abrami *et al.*, 2003; Abulrob *et al.*, 2010; Bray *et al.*, 1998; Eierhoff *et al.*, 2010; Hanlon und Andrew, 2015). Obwohl bekannt ist, dass eine solche Rezeptor-Cluster-Formierung und -Entwicklung bei zahlreichen Rezeptoren eine Rolle spielt, wirft die detaillierte Charakterisierung dieser Clusterformierung bislang allerding immer noch einige Fragen auf. Nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass viele Krankheiten direkt mit Störungen der Membranrezeptor Funktionalität assoziiert sind, ist es langfristig von größter Wichtigkeit, das grundlegende Verständnis der Regeln und Prinzipien der Rezeptor-Clusterformation und der damit verbundenen Signalverarbeitung zu vertiefen und mechanistisch zu verstehen (Abulrob *et al.*, 2010; Casaleotto und McClatchey, 2012; El-Rayes *et al.*, 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rezeptordynamik sowie Rezeptor/Liganden-Interaktion des säugerspezifischen KDEL-Rezeptors analysiert und in Form eines grundlegenden „Trafficking-Modells“ näher charakterisiert werden. In der Vergangenheit wurde stets angenommen, dass die Interaktion zwischen H/KDEL-R und seinen entsprechenden Liganden hauptsächlich auf die Membranen des Golgi-Komplex sowie des ER limitiert ist und dass die Hauptfunktion des H/KDEL-R in der Rückführung ER-residenter

Proteine zur Vermeidung ihrer Sekretion besteht. In der jüngeren Vergangenheit rückten allerdings mehr und mehr ergänzende Funktionen des H/KDEL-R in den Fokus. So wurde beispielsweise gezeigt, dass der H/KDEL-R ebenfalls für das Binden extrazellulärer Liganden, wie etwa dem neurotrophischen Faktor MANF oder dem Hefe-Killertoxin K28 an der Zelloberfläche zuständig ist (Eisfeld *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2013; Riffer *et al.*, 2002; Schmitt und Breinig, 2006). In Anbetracht dessen sollte es möglich sein, das Clusterverhalten sowie die Internalisierung und den intrazellulären Transport von H/KDEL-Sequenzmotivtragenden Modell-Liganden nach erfolgter Bindung an den KDEL-R in Säugerzellen zu analysieren und ein grundlegendes „KDEL-R-Trafficking-Modell“ zur Charakterisierung der KDEL-R-Dynamik zu etablieren.

## **Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der KDEL/R/Liganden-Interaktion an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen**

Die KDEL-R-Clusterbildung und -Entwicklung wurde zunächst am Beispiel von HeLa-Zellen unter Verwendung eGFP-markierter Varianten der katalytisch aktiven Subdomäne von Rizin (RTA) analysiert. Da Rizin bzw. RTA, im Gegensatz zu einigen anderen Vertretern der A/B-Toxin-Familie, nicht über ein H/KDEL-ähnliches Sequenzmotiv verfügt, wurde im Rahmen dieser Clusterevolutionsstudien eine RTA-Variante mit einem künstlich angefügten HDEL-Sequenzmotiv verwendet und das Clusterverhalten mit einer Variante ohne Retentionsmotiv verglichen (Becker *et al.*, 2016). Diese rekombinant exprimierten und über Affinitätschromatographie gereinigten fluoreszenzmarkierten RTA-Varianten übten nach Applikation weiterhin einen toxischen Effekt auf HeLa-Zellen aus. Dieser beobachtete toxische Effekt steht in Einklang mit früheren Studien, welche eine gesteigerte *in vivo* Toxizität von RTA nach dem Anfügen einer C-terminalen H/KDEL-Sequenz zeigten und belegen somit die nach wie vor gegebene biologische Aktivität der fluoreszenzmarkierten RTA-Varianten (Becker und Schmitt, 2011; Wales *et al.*, 1993). Die „Live Cell Imaging“-Analysen zeigten eindeutig eine zeitabhängige Formierung und Entwicklung der eGFP-RTA<sup>HDEL</sup>-Cluster auf der Zelloberfläche. Durchgeführte Kontrollexperimente mit eGFP-RTA zeigten eine im Vergleich hierzu stark reduzierte Clusterbildung auf oder nahe der PM. Warum es im Falle der Kontrollexperimente mit eGFP-RTA überhaupt zu einer beginnenden Clusterformierung kommt, kann mehrere Gründe haben. Zum Einen wurde im Rahmen dieser frühen Studien stets ein deutlicher Überschuss (160 µg/ml) an extern appliziertem Modell-Liganden eingesetzt. Demnach ist es durchaus möglich, dass sich temporär einzelne kleinere

Cluster auf den Zellen als Resultat zufälliger Anlagerung bilden. Da es sich allerdings um ein zufälliges Auflagern auf die Zelle und nicht um eine effiziente rezeptorvermittelte Interaktion zwischen Liganden und der Zelloberfläche handelt, diffundieren die Liganden wahrscheinlich im Verlauf der Messung wieder in das umgebende Medium. Die Bobachtung, dass für diese Cluster kaum Größenentwicklung und zudem in sehr späten Phasen der CLSM-Analysen in einzelnen Fällen sogar ein Rückgang der Fluoreszenzintensität erkennbar ist, untermauert diese Vermutung zusätzlich. Auch das für die Reinigung der Modell-Liganden C-terminal angefügte Polyhistidin-Tag bedingt möglicherweise eine nicht KDELR-vermittelte Interaktion zwischen der PM und den applizierten Liganden. Histidin gehört aufgrund seines Imidazol-Rests zu der Gruppe der basischen, positiv geladenen Aminosäuren. Allerdings ist Histidin die einzige Aminosäure, welche unter physiologischen pH-Bedingungen ihre Ladung wechselt kann. Imidazol-Gruppen weisen einen  $pK_a$ -Wert von 6,0 auf, demnach liegt Histidin bei einem pH-Wert von 6,0 zu 50 % protoniert vor und verhält sich bei einem pH-Wert von 8,0 entsprechend ladungsneutral. Es kann aber dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, vor allem während entsprechend langer Inkubationszeiten, dass eine schwache elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem teilweise positiv geladenen  $(\text{His})_6$ -Tag und der negativ geladenen PM stattfindet (Cooper, 2000). Allerdings wurden sämtliche, im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigten „Live Cell Imaging“-Analyse in pH-neutralen Milieus (Zellkulturmedium bzw. PBS pH 7,4) durchgeführt. Demnach sollte Histidin überwiegend nicht protoniert vorliegen und eine effiziente Interaktion mit der PM somit weitestgehend ausgeschlossen sein. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auf der PM zumindest zeitlich und räumlich limitiert Mikrodomänen mit temporär erniedrigten pH-Werten existieren. Die Existenz bestimmter Mikrodomänen wie „Lipid Rafts“, Caveolae, „Clathrin Coated Pits“, „Tetraspanin Enriched Microdomains“ usw. im Allgemeinen wurde bereits mehrfach dokumentiert und auch mit Signaltransduktion und Rezeptor/Liganden-Wechselwirkungen in Verbindung gebracht (Delos Santos *et al.*, 2015; Hancock, 2006). So konnte beispielsweise für den EGFR gezeigt werden, dass dessen Clusterformierung innerhalb von Mikrodomänen auf der PM die Signaltransduktion in das Zellinnere unterstützt (Abulrob *et al.*, 2010). Auch für die RTK-vermittelte Regulierung diverser Signaleignisse scheinen verschiedene PM-Mikrodomänen von essentieller Bedeutung zu sein (Delos Santos *et al.*, 2015). In diesem Zusammenhang wurde auch dokumentiert, dass „Clathrin Coated Pits“ an der effizienten Transduktion von Signalen mitwirken, ohne dass dafür die Endozytose des eigentlichen Rezeptors notwendig ist (Delos Santos *et al.*, 2015). Auch die stets beobachtete Cluster-Formierung und -Entwicklung nach externer Applikation geeigneter

Modell-Liganden legt die Existenz solcher Mikrodomänen nahe. Es steht in Anbetracht der Fachliteratur außer Frage, dass eine effiziente Interaktion zwischen dem KDELR und seinen spezifischen Liganden einen leicht sauren pH-Wert voraussetzt, während ein neutraler pH-Wert im Unterschied dazu die Dissoziation gebundener Liganden vom KDELR begünstigt (Wilson *et al.*, 1993). Möglicherweise spielen für die effiziente Interaktion zwischen KDELR und entsprechenden Liganden auf der Zelloberfläche inter-organelle Kontaktstellen eine Rolle. Die Bedeutung solcher Plasmamembran-Kontaktstellen mit anderen Organellen für spezielle Signalereignisse wurde bereits aufgezeigt. IGFR1 wurde beispielsweise innerhalb spezieller Plasmamembran-Einstülpungen nachgewiesen, welche in direktem Kontakt mit der Kernhülle standen und dort an der Regulation  $\text{Ca}^{2+}$ -assozierter Signalereignisse in den Zellkern beteiligt waren (Ibarra *et al.*, 2013). Demzufolge wäre auch die Existenz von entsprechenden Kontaktstellen zwischen PM und Golgi denkbar. Innerhalb dieser Mikrodomänen würde dann auch exakt das Milieu vorzufinden sein, welches für eine effiziente KDELR/Liganden-Interaktion auf der Zelloberfläche notwendig ist. Die Möglichkeit einer Histidin-bedingten Interaktion mit der PM, unabhängig von dem Vorhandensein eines KDELR-assoziierten Sequenzmotivs, widerlegt indes allerdings keinesfalls die im Rahmen der Clusterevolutionsstudien gewonnenen Erkenntnisse und die daraus resultierenden Rückschlüsse hinsichtlich einer KDELR-vermittelten Liganden-Interaktion. Aufgrund der vergleichsweise kleinen Größe der Histidin-Markierung ((His)<sub>6</sub>) sollten nur recht schwache, elektrostatische Wechselwirkungen auftreten, sowohl innerhalb des Proteins als auch mit der PM (Terpe, 2003). Demnach wird eine tatsächlich auftretende Rezeptor/Liganden-Interaktion immer ungleich effizienter sein als eventuell vorhandene Histidin-vermittelte Wechselwirkungen.

Generell muss angemerkt werden, dass die Clusterentwicklung im Rahmen der einzelnen Messungen trotz identischer Versuchsbedingungen bisweilen leicht unterschiedlich verlaufen ist. Für diesen Umstand gibt es zwei Erklärungsansätze. Zum einen wurde es in der Regel vermieden, die verwendeten Modell-Liganden vor den „Live Cell Imaging“-Studien längere Zeit aufzubewahren, da sie selbst bei optimaler Lagerung innerhalb weniger Wochen präzipitierten und somit für die Studien zur Clusterevolution unbrauchbar wurden. Demnach wurden die Liganden stets im kleineren Maßstab gereinigt und möglichst frisch den Zellen appliziert. Allerdings unterschieden sich die einzelnen Chargen bisweilen durchaus hinsichtlich ihrer Effizienz, nach erfolgter Applikation an die Zielzellen zu binden und Cluster zu formieren. Auch unterschieden sich die verwendeten Säugerzellen hin und wieder in ihrer Vitalität und somit auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit, auf die externe Liganden-

Applikation zu reagieren. Allerdings handelte es sich bei diesen beobachteten Schwankungen ausnahmslos um Detailunterschiede, welche die Aussagekraft der hier präsentierten Daten nicht einschränken.

Typischerweise verläuft die eGFP-RTA<sup>HDEL</sup>-Clusterentwicklung an HeLa-Zellen in strikt voneinander unterscheidbaren Phasen ab. Nach einer anfänglichen Verzögerung der Cluster-Entwicklung ( $t < 20$  min) ist ein rascher Anstieg der Clustergröße zu verzeichnen, welche nach etwa 80 min ihr Maximum erreicht. Von diesem Zeitpunkt an bleibt die beobachtete Clustergröße, von kleineren Schwankungen abgesehen, weitestgehend stabil. Dieses Verhalten ist charakteristisch für die Stochastik eines Prozesses, welcher sich nicht streng im Gleichgewicht befindet, bei dem sich allerdings dennoch eine Balance einstellt zwischen dem Verlust an Signalen aufgrund stattfindender Endozytose bzw. dem Rückdiffundieren nicht effizient gebundener Liganden in das umgebende Medium und dem Zugewinn neuer Signale. Die anfängliche Verzögerung in der Clusterentwicklung ist mit großer Wahrscheinlichkeit Resultat eines technischen Problems der CLSM-Analysen. Im Rahmen der hier diskutierten Clusterevolutionsstudien wurde, wie bereits erwähnt, ein deutlicher Überschuss an fluoreszenzmarkiertem Modell-Liganden appliziert. Daher ist während der „Live Cell Imaging“-Experimente in der Regel eine vergleichsweise starke Hintergrundfluoreszenz vorhanden gegen die kleine, sich in der beginnenden Formierung befindlichen Cluster auf der Zelloberfläche zunächst nicht sichtbar waren. Erst wenn die Cluster eine bestimmte Größe erreicht haben und die Fluoreszenzintensität jener Cluster folglich entsprechend hoch ist, werden sie in Form von klar detektier- und auswertbaren Clustern erkennbar. Somit entstand bei diesen Experimenten zur Clusterevolution bei HeLa-Zellen der Eindruck einer zu Beginn verlangsamten Formierung, physiologisch scheint diese verlangsamte Clusterentwicklung, zumindest in einer solchen Größenordnung, jedoch nicht stattzufinden. Experimente an HeLa-Zellen, welche kurze Zeit nach erfolgter Liganden-Applikation (30 s bzw. 5 min nach Applikation) mehrfach zwecks Eliminierung der Hintergrundfluoreszenz gewaschen wurden unterstützen diese Annahme. Auf diese Art behandelte HeLa-Zellen zeigten stets schwache, aber dennoch deutlich erkennbare Signale auf der Zelloberfläche, welche nach 5 min bereits stark an Intensität gegenüber den auftretenden Signalen nach 30 s zugenommen hatten. Somit scheint bereits kurze Zeit nach Liganden-Applikation eine Entwicklung der gebundenen Cluster stattzufinden.

Um die Frage zu adressieren, ob die zu beobachtenden Modell-Liganden tatsächlich auf Ebene der PM interagieren und akkumulieren oder ob ein Großteil dieser Signale bereits endozytiert wurde und tatsächlich eher im endosomalen Kompartiment oder in Bereichen des

kortikalen ER lokalisiert ist, wurden HeLa-Zellen bei einer konstanten Temperatur von 4 °C mit den zu testenden Liganden behandelt und hinsichtlich der Cluster-Formierung analysiert. Da die dabei detektierten Signale an der Zelloberfläche zweifelsohne mit den Signalen der Clusterevolutionsstudien bei 37 °C vergleichbar waren, belegen diese Experimente somit eindeutig, dass die eingesetzten Liganden nach der Applikation auf Ebene der PM lokalisieren, da eine effiziente Endozytose bei 4 °C nicht möglich ist. Der klare Nachweis gebundener Liganden an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen mittels ergänzender Immunfluoreszenz-Studien unterstützt diese These zusätzlich. Diese Erkenntnisse bedeuten allerdings keineswegs, dass eine Aufnahme der an die PM gebundenen Liganden unmöglich ist. Im Verlauf dieser hier vorgestellten Studien zur Clusterentwicklung auf der Zelloberfläche konnte durchaus eine teilweise Internalisierung einzelner Cluster bzw. Liganden und folglich auch der intrazelluläre Transport entsprechend aufgenommener Moleküle beobachtet werden; die exakte zeitliche bzw. kinetische Analyse dieser Endozytoseereignisse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht berücksichtigt und bleibt somit Gegenstand zukünftiger Projekte.

Ergänzend zu den rein auf die Analyse der Liganden-Cluster beschränkten Studien sollten Experimente mit Zellen, welche fluoreszenzmarkierte Varianten des KDELRs exprimierten, die Aufklärung der intrazellulären KDELR-Distribution sowie den direkten, fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einer KDELR/Liganden-Interaktion auf der PM ermöglichen. Aus diesem Grund wurden mCherry-markierte Varianten der humanen KDELRs Erd2.1, Erd2.2 sowie Erd2.3 hergestellt und deren Eignung als Reporterkonstrukt fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Für Erd2.1-mCherry sowie Erd2.2-mCherry konnten auch starke und klar unterscheidbare Signale nach erfolgter Transfektion in HeLa- bzw. HEK-293 Zellen beobachtet werden. Signale für Erd2.3-mCherry waren zwar auch nachweisbar, jedoch um ein Vielfaches schwächer als die der übrigen KDELR-Homologe und somit auch nur bedingt für fluoreszenzmikroskopische Dokumentationen geeignet. Da der Fokus für die geplanten Untersuchungen zur schrittweisen Etablierung eines „Trafficking-Modells“ allerdings ohnehin auf dem KDELR Erd2.1 lag, erwies sich dieser Umstand als vernachlässigbar. Zwar stellt die Markierung zellulärer Strukturen mit Farbstoffen bzw. Fluoreszenzproteinen die wohl am weitesten verbreitete Methode zur Visualisierung intrazellulärer Prozesse dar, frei von Risiken ist dieses Vorhaben jedoch keineswegs. Es gibt zahlreiche Berichte über die negativen Auswirkungen hinsichtlich Transport, Lokalisation und physiologischer Funktionalität fluoreszenzmarkierter Proteine. Vor allem Fluoreszenzproteine, deren Größe leicht die Größe der Zielproteine erreichen oder gar

übersteigen kann, können die biologische Funktionalität der markierten Proteine erheblich einschränken (Han *et al.*, 2015; Heymann *et al.*, 2015; Skube *et al.*, 2010; Swulius und Jensen, 2012). Demnach wurde die Funktionalität der mCherry-markierten KDELR-Varianten mittels FOA-Selektion überprüft. Dabei wurde die physiologische Funktionalität für Erd2.1-mCherry und Erd2.2-mCherry eindeutig bewiesen. Da die eingesetzten Hefezellen vom Stammhintergrund YA12 ( $\Delta$ erd2) nicht über eine funktionelle H/KDEL-R-Variante verfügen und aufgrund der Kultivierung auf FOA-Agar auch das zum Überleben dringend notwendige SEC12-Gen nicht länger exprimieren können, belegt deren Wachstum auf FOA-Agar eindeutig die biologische Funktionalität der zuvor transfizierten KDELR-Varianten. Auch der darauf aufbauende Methylenblau-Agardiffusionstest zur Überprüfung der K28-Sensitivität belegte, dass die Fluoreszenzmarkierung offenbar keinen negativen Einfluss auf die Funktion der KDELRs ausübt. Die zur FOA-Selektion verwendeten Hefezellen vom Stammhintergrund YA12 zeigen aufgrund des fehlenden Erd2p-Rezeptors für gewöhnlich keine, oder lediglich eine sehr stark eingeschränkte Sensitivität gegenüber einer externen K28-Applikation. Demnach ist die beobachtete Wiederherstellung der K28-Sensitivität nach erfolgter Transformation mit den mCherry-markierten KDELR-Varianten ein weiterer Beweis für deren physiologische Funktionalität. Für Erd2.3-mCherry konnte allerdings nur eine erheblich eingeschränkte Funktionalität nachgewiesen werden.

Zwar wird die Topologie des KDELRs bisweilen kontrovers diskutiert, die zytosolische Lokalisation des C-Terminus wird allerdings nicht angezweifelt (Scheel und Pelham, 1988; Semenza *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1993; Townsley *et al.*, 1993). Somit sollten die an der Liganden-Bindung beteiligten luminal orientierten Aminosäuren Arg-5, Asp-50, Tyr-162 und Asn-165 (Scheel und Pelham, 1998) nicht durch das C-terminal und somit zytosolisch lokalisierte Fluoreszenzprotein beeinträchtigt werden. Möglicherweise bedingt das Anfügen eines vergleichsweise großen Fluorophors eine Fehlfaltung des Rezeptors oder dessen fehlerhafte Insertion in die Membran; fraglich bleibt jedoch, warum dies angesichts der immens hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der KDELRs, ausschließlich Erd2.3 betreffen sollte. Überdies belegen Studien anhand des GPCRs  $\beta$ -Adrenorezeptors, dass ein Anfügen verschiedener Fluoreszenzproteine (u. a. mCherry) an den C-Terminus des Proteins keinerlei Auswirkungen auf dessen Lokalisation und Funktionalität ausübt (Bubnell *et al.*, 2013). Zur finalen Klärung dieser Frage wäre wohl die Aufklärung der exakten, dreidimensionalen Struktur des KDELR nötig, allerdings wurde bislang noch keine Kristallstruktur eines humanen KDELRs etabliert.

Zwecks nachhaltiger Analyse der KDELR-Dynamik in Sägerzellen wurde Erd2.1-mCherry stabil und unter Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promoters in das Genom von Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293-Zellen integriert. Diese spezialisierte HEK-Zelllinie wurde ausgewählt, da das Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup>-System hervorragend für den zielgerichteten Einbau von DNA-Abschnitten und für eine spätere kontrollierte Genexpression geeignet ist. Darüber hinaus sollten die Studien zur KDELR-Dynamik langfristig ohnehin auf alternative Zelllinien, darunter auch HEK-293, ausgeweitet werden. Transiente Transfektionen bedingen in der Regel deutliche Schwankungen in der Expressionsstärke sowie das Vorhandensein nicht transfizierter Zellen ein Problem, das durch die Verwendung der Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> HEK-293-Zellen vermieden werden kann. Außerdem ist es von großer Wichtigkeit, eine gewisse Kontrolle über Zeitpunkt und Stärke der KDELR-Expression zu haben. Es wurde gezeigt, dass eine unkontrollierte Überexpression eines KDELR-Homologes in Sägerzellen verheerende Konsequenzen für Golgi-Komplex-assoziierte Transportvorgänge und die Golgi-Homöostase mit sich bringen kann. So führt eine KDELR-Überexpression beispielsweise zu einer reduzierten Bildung GTPase-aktivierender Proteine, wodurch wiederum die Regulation des frühen intrazellulären sekretorischen Weges sowie des anterograden Transports beeinträchtigt wird (Aoe *et al.*, 1997; Semenza *et al.*, 1990). Die Überexpression des humanen Erd2-ähnlichen Proteins ELP1 bedingt sogar die Ausbildung eines Phänotyps ähnlich einer Brefeldin-A Behandlung (Hsu *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurde dokumentiert, dass eine generelle GPCR-Überexpression die fehlerhafte Regulierung Mitogen-aktivierender Proteinkinasen bedingt und somit die Signaltransduktion zur Kontrolle essentieller zellulärer Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zellwachstum oder Apoptose einschränkt (Ito *et al.*, 1995). Der KDELR tendiert nach Überexpression zusätzlich zu einer vermehrten Lokalisation in Lysosomen und verstärkt die Autophagie-Induktion, was sich im Hinblick auf die geplanten „Live Cell Imaging“-Experimente gleich aus zwei Gründen suboptimal darstellt, sowohl im Hinblick auf die intrazelluläre KDELR-Distribution als auch auf die Signalwirkung (Wang *et al.*, 2011). Die unkontrollierte Überexpression erschwert somit die Gewinnung substantieller Daten hinsichtlich der KDELR-Dynamik. Eine verlässliche Analyse der intrazellulären Lokalisation und Distribution wird durch die Fehllokalisierung nahezu unmöglich. Außerdem ist auch im Hinblick auf die wichtige und hoch komplexe Funktion des KDELR als Signalrezeptor und Regulator des Golgi-Transports eine Überexpression dringend zu vermeiden. Aufgrund des gewaltigen Schadens bezüglich der Regulation Golgi-assozierter Transportvorgänge und dem damit verbundenen Eingriff in die Zellphysiologie eignen sich Zellen in diesem stark gestressten Zustand nicht mehr als Modell-Systeme, speziell nicht für

die Analyse von Rezeptor/Liganden-Wechselwirkungen und den daraus resultierenden, zellulären Konsequenzen. Mithilfe des hier verwendeten Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup>-Systems lässt sich die KDELR-Expression nach Belieben induzieren und die Expressionsstärke durch Variation der zwecks Induktion eingesetzten Tetrazyklin-Konzentration den Anforderungen entsprechend modulieren. Die vom Hersteller empfohlene Tetrazyklin-Konzentration liegt bei 1 µg/ml, was auch allgemein als die Konzentration gilt, welche zu einer maximalen Transkriptionsaktivität in Sägerzellen führt, wie Studien anhand eines vergleichbaren Expressionssystems unter Verwendung verschiedener Tetrazyklin-Derivate zeigten (Gossen *et al.*, 1995). Demnach eignet sich diese Konzentration von 1 µg/ml allerdings nicht für die Studien zur KDELR-Dynamik, da der Rezeptor weiterhin stark überexprimiert vorliegen würde. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Tetrazyklin-Konzentration ermittelt, welche ein möglichst natürliches Expressionsprofil des KDELR begünstigt. Western-Analysen sowie fluoreszenzmikroskopische Dokumentationen von Zellen, welche mit Tetrazyklin-Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 1 µg/ml behandelt wurden, zeigten, dass die optimale Konzentration zur mikroskopischen Dokumentation klarer und einzeln wahrnehmbarer Signale zwischen 100 ng/ml und 50 ng/ml Tetrazyklin liegt. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass hier eine annährend natürliche Expression des KDELR vorliegt, es herrscht eher eine weniger starke Überexpression vor. Die Signale der Western-Analyse waren deutlich stärker als solche Signale, welche in nativen Zellen mit anti-Erd2.1 Antikörpern zum Nachweis der nativen Expression festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigten die verwendeten Antikörper auch deutliche Kreuzreaktionen, so dass die Qualität der Detektion durchaus in Frage gestellt werden muss. Noch niedrigere Tetrazyklin-Konzentrationen erwiesen sich ebenfalls als unbrauchbar, da die Expression des KDELR dann zu schwach für eine angemessene Analyse war. Bisweilen konnte die sichtbare Fluoreszenz nicht mehr von der Autofluoreszenz der Negativkontrolle unterschieden werden bzw. fiel für Western-Analysen unter die Nachweisgrenze. Ohne einen entsprechenden AK zum Nachweis des KDELR nach nativer Expression können hinsichtlich der Expressionsstärke des Rezeptors während der einzelnen Experimente nur spekulative Aussagen getroffen werden. Dementsprechend problematisch verliefen auch die Analysen zum Nachweis einer direkten KDELR/Liganden-Interaktion auf der PM von Sägerzellen. Eine solche Interaktion zwischen dem mCherry-markierten KDELR und dem eGFP-markierten Modell-Liganden sollte bestenfalls in Form einer klaren Überlagerung der Proteine als gelb/orange-erscheinendes Signal identifizierbar sein. Zwar waren solche Signale in stark überexprimierenden Zellen (Tetrazyklin-Konzentration 1 µg/ml) bisweilen feststellbar, aufgrund des diffusen Signals und

der Tatsache, dass der KDELR in diesen Zellen höchstwahrscheinlich fehllokalisiert, kann hierbei jedoch nicht von einer klar erwiesenen KDELR/Liganden-Interaktion auf der PM gesprochen werden. Analysen von Zellen nach geringerer Tetrazyklinbehandlung zeigten keinerlei überlagernde Signale, welche für eine Interaktion sprechen würden. Da eine solche Interaktion wahrscheinlich innerhalb sehr kurzer Zeit stattfindet und die Geschwindigkeit der Internalisierung des Liganden nach erfolgter Bindung wohl als sehr hoch eingeschätzt werden muss, stellt auch die Limitierung der zeitlichen Auflösung ein ernstes Problem dar. Die im Rahmen der „Live Cell Imaging“-Studien eingesetzten Fluoreszenzproteine eGFP und mCherry blichen bei zu starker Belichtung sehr schnell aus. Aus diesem Grund wurden die gemessenen Zellen in der Regel nur zweimal pro Minute für wenige Sekunden belichtet. Auch die bisweilen recht hohe Phototoxizität war speziell bei mehrstündigen Analysen ein Problem, das nur durch Verringerung der zeitlichen Auflösung umgangen werden konnte. Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einer direkten KDELR/Liganden-Interaktion auf der PM sind die Grenzen des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Systems erreicht. Zur langfristigen Aufklärung dieser Fragestellung müssten sowohl die räumliche als auch zeitliche Auflösung verbessert und womöglich auch besser geeignete Fluorophore ermittelt werden. Die grundsätzliche Aussagekraft sämtlicher Studien zur Clusterentwicklung ohne eine ergänzende Expression fluoreszenzmarkierter KDELRs muss allerdings nicht angezweifelt werden, da die verwendeten Zellen die KDELRs ausnahmslos natürlich exprimierten. Zwar ist bekannt, dass sich die KDELR-Expression in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zelle sowie als Antwort auf die Applikation biologisch aktiver Substanzen (z. B. Thapsigargin) ändern kann; jedoch handelt es sich in diesen Fällen nicht um eine unkontrollierte Überexpression als Folge genetischer Manipulation, sondern schlichtweg um eine unter physiologischen Bedingungen ablaufende Reaktion der Zelle auf veränderte äußere Umstände (Llewellyn *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2011).

## **Adaptive Monte-Carlo-Simulation der KDELR/Liganden-Dynamik auf der Zelloberfläche von HeLa-Zellen**

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Studien zur Charakterisierung der Clusterentwicklung extern applizierter KDELR-assoziierter Modell-Liganden an HeLa-Zellen resultierten in der Etablierung eines profunden Modells zur grundlegenden Beschreibung der KDELR-Dynamik und KDELR/Liganden-Interaktionen. Um dies zu realisieren, wurden experimentelle Daten zusammen mit numerischen Methoden und Monte-Carlo-Simulationen

in Betracht gezogen und auf Basis der somit gewonnenen Erkenntnisse ein minimalistisches Modell zur Beschreibung von Verlust und Zugewinn an KDEL-Rezeptormolekülen während Endozytose und Rücktransport zur PM konzipiert. Die diesem „Traficking-Modell“ zugrunde liegenden Parameter wurden entsprechend der den durchgeführten Experimenten zugrunde liegenden Abläufe und Beobachtungen definiert und reflektieren demnach Erfahrung und Erkenntnisstand bezüglich der Rezeptor-Dynamik in Sägerzellen. Der Umfang des die PM darstellenden Gitternetzwerkes von  $4 \times 10^6$  Gittern, die Größe der einzelnen Gitter von jeweils  $\sim 10$  nm sowie die vorgeschlagene Vesikelgröße zwischen 50 und 100 nm ( $5 \times 5 - 10 \times 10$  Gitter) entsprechen den bekannten, durchschnittlichen Dimensionen für HeLa-Zellen bzw. gängiger Rezeptoren und Vesikel (Agrawal *et al.*, 2010; Guo und Levine, 1999; Reddy *et al.*, 2010). Somit wird bei diesem Modell berücksichtigt, dass jedes Einzelgitter von maximal einem KDEL-Rezeptor, mit Ligand oder ohne, okkupiert sein kann. Die Entscheidung, asymmetrische Vesikeltransportraten sowie zufällige Zielorte bezüglich Endozytose und Rezeptor-Rückführung zu berücksichtigen, gründet auf der Vermutung, dass es sich bei Frequenz, räumlicher Ausdehnung und Zielort für diese Prozesse um unabhängige stochastische Ereignisse handelt. Stattfindende Endozytose führt in diesem Zusammenhang zur vollständigen Eliminierung sämtlicher Rezeptormoleküle der Zielregion, während die Anzahl an Rezeptoren, die in Vesikel verpackt zur Zelloberfläche rückgeführt werden, zwischen 0 und der maximalen Vesikelkapazität schwankt, wobei diese Rezeptormoleküle nach Ankunft zufällig auf Bereiche auf der PM verteilt werden. Das Modell berücksichtigt dabei zu Beginn stets eine zufällige Rezeptor-Verteilung auf der Zelloberfläche, wobei sich Anzahl und räumliche Ausdehnung der Rezeptor-Moleküle über die Zeit entwickeln und schließlich einen Zustand erreichen, bei dem sich ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Verlust und Zugewinn Zelloberflächen-lokalisierter Rezeptor-Moleküle einstellt. Zusätzlich wird anhand des hier diskutierten Modells immer davon ausgegangen, dass der Zelle ein deutlicher Überschuss an potentiellen Liganden zur Verfügung steht und somit die Möglichkeit nicht okkupierter KDELRs als Folge einer zu geringen Liganden-Konzentration ausgeschlossen ist. Jeder KDELR auf oder nahe der PM sollte dazu in der Lage sein, mit mindestens einem Liganden zu interagieren. Die unter Verwendung dieses minimalistischen „Traficking-Modells“ erstellten Simulationen zur Clusterevolution an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen stimmten mit den Beobachtungen der experimentell durchgeführten „Live Cell Imaging“-Studien überein und bestätigen somit die konzeptionelle Nachvollziehbarkeit des hier vorgestellten Modells. Allerdings kann anhand dieses Modells bisher lediglich eine stark vereinfachte Vorstellung der intrazellulären Rezeptordynamik abgebildet werden. Phänomene

wie etwa „excluded volume“, also die mangelnde Verfügbarkeit von Volumen für ein Molekül aufgrund eines anderen bereits vorhandenen Moleküls, oder eine eventuelle Auto-Amplifizierung des Rezeptortransports finden dabei bislang noch keinerlei Berücksichtigung. Die dem Modell zugrunde liegenden experimentellen Daten erlauben bislang keine komplexere Charakterisierung der Rezeptor/Liganden-Interaktion. Zwar kann die analytische Ausdrucksform durch eine Anpassung dieser freien Parameter in Einklang mit der *in vivo* beobachteten Clusterentwicklung gebracht werden, jedoch liegen dieser Anpassung keine real durchgeführten Experimente zugrunde. Ein weiteres Phänomen, welches durch das hier diskutierte Modell nur unzureichend adressiert werden kann, betrifft die Gesamtzahl an verfügbaren KDELRs innerhalb der Zelle. Dieses Modell setzt stets eine konstante Zahl an KDELRs während des experimentellen Zeitfensters voraus. Während diese Vorstellung bei sehr kurzen Messungen, wie etwa den Analysen zur Clusterformierung nach 30 s bzw. 5 min, wahrscheinlich Bestand haben wird, ist eine strikt gleichbleibende Rezeptoranzahl im Rahmen der mehrstündigen „Live Cell Imaging“-Studien eher fraglich. Möglicherweise können die Studien mit KDELR-überexprimierenden Zellen unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden, da sie aufgrund der sehr starken Expression wohl nahezu mit KDELR-Molekülen „gesättigt“ sind; für Zellen, denen eine natürliches KDELR-Expressionsprofil zugrunde liegt, gilt das allerdings nur unter Vorbehalt. Dass sich die KDELR-Expression in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zelle ändert und entsprechend moduliert werden kann, steht außer Frage. Zum Beispiel beeinflusst eine Thapsigargin-Behandlung und der damit induzierte ER-Stress die Anzahl an KDELR mRNA, wobei sogar die Transkriptmenge der einzelnen KDELR-Homologen unterschiedlich beeinflusst wurde (Llewellyn *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2011). Wie schnell diese Anpassung in solchen Fällen erfolgt, ist jedoch unklar; nachgewiesen wurde eine Veränderung in der KDELR-Expressionsstärke immer erst nach Zeiträumen, welche die Versuchszeit der hier durchgeführten „Live Cell Imaging“-Experimente (max 5 h) deutlich überschritten.

## **Einfluss der Temperatur und Liganden-Konzentration auf die Clusterentwicklung**

Anhand der bereits diskutierten Studien zur KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen konnte ein „Trafficking-Modell“ zur grundlegenden Charakterisierung der KDELR-Dynamik und KDELR/Liganden-Interaktion etabliert werden, welches eine klar zeitabhängige Clusterentwicklung nach externer Liganden-Applikation beschreibt. Darüber hinaus wurden

erhebliche Unterschiede in Abhängigkeit der Identität des applizierten Modell-Liganden ersichtlich. Liganden mit einem natürlichen KDELR-assoziierten Erkennungsmotiv (H/KDEL) zeigten stets ein effizienteres Binden an die Zellen, wie auch eine schnellere und stärkere Clusterentwicklung über die Zeit im Vergleich zu Liganden ohne entsprechendes Motiv und unterstützen somit die Theorie einer KDELR-Funktion an der PM von Säugerzellen. Darauf aufbauend sollten künftige Projekte die Komplexität des „Trafficking-Modells“ schrittweise erhöhen, um die KDELR-Dynamik langfristig in einem breiteren Kontext und hinsichtlich erweiterter Fragestellungen adressieren zu können. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente zum Einfluss der Temperatur und Konzentration an extern appliziertem Liganden lieferten dabei substantielle Erkenntnisse zum tieferen Verständnis über die KDELR/Liganden-Clusterevolution in HeLa-Zellen. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die KDELR-Clusterentwicklung, der van-‘t-Hoff’schen Regel entsprechend bei einer erniedrigten Umgebungstemperatur verlangsamt abläuft. Nach Senkung der Versuchstemperatur auf konstante 25 °C wurde, im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Studien bei 37 °C, eine etwa um den Faktor 3 verzögerte Clusterentwicklung festgestellt, während das maximale Saturierungsniveau der fluoreszierenden Liganden-Cluster an der Zellperipherie unverändert blieb. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den an der van-‘t-Hoff’schen Regel orientierten Anpassungen des „Trafficking-Modells“ hinsichtlich der Vesikeltransportraten  $\alpha_{\text{loss}}$  und  $\alpha_{\text{gain}}$ . Ergänzende Studien zeigten darüber hinaus einen strikt dosisabhängigen Effekt auf die KDELR/Liganden-Clusterentwicklung. Eine Verringerung der Konzentration an extern appliziertem Liganden brachte ebenfalls eine verminderte Clusterbildung und Entwicklung mit sich. Von besonderem Interesse ist hierbei, dass im Unterschied zu den Beobachtungen bei erniedriger Umgebungstemperatur, die Reduzierung der applizierten Liganden-Dosis sowohl die Geschwindigkeit der Clusterentwicklung als auch die maximale Clusteranzahl bzw. Intensität beeinflusste. Um diese experimentellen Beobachtungen durch Simulationen anhand des „Trafficking-Modells“ reproduzieren zu können, wurden die Vesikeltransportraten  $\alpha_{\text{loss}}$  und  $\alpha_{\text{gain}}$  erneut entsprechend angepasst. Während allerdings zur Simulation des temperaturabhängigen Effekts auf die Clusterentwicklung die Transportraten im gleichen Maße abgeändert wurden, erfordert die Simulation des dosisabhängigen Effekts auf die Clusterevolution eine differentielle Angleichung dieser Parameter. Demnach zeigt sich die Rate an Vesikeln, die aus dem Zellinneren zur PM transportiert werden ( $\alpha_{\text{gain}}$ ), stärker beeinflusst durch die Konzentrationsänderung als die Rate an endozytierten Vesikeln ( $\alpha_{\text{loss}}$ ). Die experimentellen Daten in Kombination mit den durch das „Trafficking-Modell“ bereitgestellten Informationen

belegen, dass die Konzentration an extern appliziertem Liganden einen direkten Einfluss auf die Menge an zur PM transportierten KDELR-Molekülen hat. Eine Erhöhung der Liganden-Konzentration bedingt gleichermaßen auch eine gesteigerte KDELR-Transportrate zur Zelloberfläche, während die Reduzierung der eingesetzten Liganden-Konzentration folgerichtig diesen KDELR-Transport zur PM einschränkt. In Anbetracht dessen schien die Zelle den KDELR-Transport zur Zelloberfläche in Abhängigkeit von extern verfügbaren Liganden entsprechend regulieren zu können. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Analysen zur differentiellen Anpassung der intrazellulären Erd2.1-eGFP bzw. Erd2.2-mCherry-Verteilung als Antwort auf eine externe Applikation von RTA<sup>KDEL</sup>. Tatsächlich mehren sich in jüngerer Zeit Hinweise darauf, dass bestimmte Liganden nicht nur einen Einfluss auf PM-lokalisierte Membranrezeptoren haben, sondern entsprechende Rezeptoren auch durch Membrantransport und Organell-lokalisierte Signaleignisse im Zellinneren modulieren können (Babcock und Li, 2013). Diese fungieren dabei sozusagen als „Chaperon-Ersatz“ und beeinflussen die Transporteffizienz bestimmter Transmembranproteine zur Zelloberfläche (Kuryatov *et al.*, 2005; Lester, *et al.*, 2009/2012; Sallette, *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang wurden unter anderem auch GPCRs erforscht, deren strukturelle Ähnlichkeit zum KDELR hinlänglich besprochen wurde. Auch wenn diese Phänomene nicht direkt mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind, zeigen sie dennoch die prinzipielle Möglichkeit einer gesteigerten Membranrezeptor-Rekrutierung zur PM als Folge einer Rezeptor/Liganden-Interaktion auf der Zelloberfläche.

Zusammenfassend liefern die hier vorgestellten Ergebnisse, ergänzt mit den numerischen Daten des „Trafficking-Modells“, einen ersten wichtigen Einblick zum langfristigen mechanistischen Verständnis des KDELR/Liganden-Clusterverhaltens an der Zelloberfläche von Säugerzellen.

## **Anterograder KDELR-Transport zu bevorzugten Regionen der eukaryotischen Plasmamembran**

Um ein tieferes Verständnis von den zugrunde liegenden Mechanismen der KDELR/Liganden-Clusterentwicklung auf der Zelloberfläche insbesondere hinsichtlich KDELR-Transport und -Distribution nach externer Liganden-Applikation zu erlangen, wurde die Liganden-Clustergrößenverteilung P(s) des extern applizierten Modell-Liganden eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> im Detail analysiert. Die Klärung dieser Fragestellung ist vor allem im Hinblick auf

die komplexe Dynamik der eukaryotischen PM interessant. Bei der zellulären PM handelt es sich keineswegs um ein starres Organell; im Gegenteil handelt es sich hierbei um ein im höchsten Maße dynamisches Kompartiment, welches präzise reguliert wird. Darüber hinaus existieren auf der Zelloberfläche verschiedene Mikrodomänen, wie etwa „Lipid-Rafts“ oder Caveolae, die eng mit Rezeptortransport und Signaltransduktion in Verbindung gebracht werden (Hancock, 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass verschiedene PM-lokalisierte Rezeptoren, wie etwa der Acetylcholin-Rezeptor (AchR), „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR) oder der „Transforming Growth Factor beta Receptor“ (TGF- $\beta$ ), mit „Lipid Rafts“ assoziiert werden können (Abulrob *et al.*, 2010; Campagna und Fallon, 2006; Chen *et al.*, 2015). Zusätzlich wurde am Beispiel des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) dokumentiert, dass eine bevorzugte Rezeptor-Clusterformierung innerhalb bestimmter Mikrodomänen auf der PM für die korrekte Signaltransduktion in das Zellinnere von großer Wichtigkeit ist, und dass sich T-Zell-Rezeptoren in Form vorgebildeter Cluster auf der PM formieren können, wobei dieses „pre-clustering“ sowohl die Liganden-Sensitivität als auch die Aktivierungsgeschwindigkeit entsprechender Signalwege signifikant erhöht (Abulrob *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2014). Die exakte Analyse der zeitabhängigen Clustergrößenverteilung und -Entwicklung auf der Zelloberfläche sollte zur Klärung der Frage beitragen, inwiefern Rezeptor „pre-clustering“ und PM lokalisierte Mikro-Domänen auch für den KDELR in HeLa-Zellen eine Rolle spielen.

Die Experimente zeigten durchweg einen zeitabhängigen Clustergrößenanstieg, nachdem zu Beginn der einzelnen Messungen stets nur verhältnismäßig kleine Cluster beobachtet werden konnten. Bei genauer Analyse wird deutlich, dass sich die Evolution der Clustergröße entsprechend einer „power-law“-Verteilung  $P(s) \sim s^{-\beta}$  mit  $\beta \approx 2$  verhält. Mit Ausnahme der anfänglichen Verzögerung in der Clusterentwicklung ( $t < 20$  min) lässt sich dieses Verhalten über den gesamten Clusterbildungsprozess feststellen. Diese Beobachtungen stehen zunächst allerdings im Widerspruch zu den Aussagen des „Trafficking-Modells“. Im Rahmen des Modells wurden bislang stets strikt zufällige Zielorte für stattfindende Endozytoseereignisse sowie für den KDELR-Transport zur PM berücksichtigt und komplexere Szenarien für die KDELR-Dynamik, wie etwa die Möglichkeit einer lateralen Rezeptordiffusion oder eventuell auftretende Rezeptor-Rezeptor-Anziehungskräfte, ebenfalls nicht in Betracht gezogen (Boggara *et al.*, 2013; Saffman und Delbrück, 1975; Guo und Levine, 1999; Reddy *et al.*, 2014). Das Einbeziehen dieser möglicherweise relevanten Phänomene in die Simulationen gemäß des „Trafficking-Modells“ führte allerdings auch nicht zu einer Reproduktion der real observierten „power-law“-Verteilung der Clustergrößenevolution  $P(s)$ . Die simulierten

Kurvenverläufe entsprachen stets einer exponentiellen Entwicklung der Clustergröße, wie sie experimentell niemals bestätigt werden konnte. Eine „power-law“-Verteilung lässt sich nur unter der Annahme eines nicht zufälligen KDELR-Transports zu bevorzugten Positionen an der Zelloberfläche nach vorheriger KDELR-auto-Amplifizierung simulieren. Diese Theorie eines nicht zufälligen, sondern gerichteten KDELR-Transports zu präferierten Regionen auf der Zelloberfläche, konnte im Rahmen ergänzender Studien auch experimentell bestätigt werden. Die Dokumentation der Rezeptordynamik einer fluoreszenzmarkierten Variante von Erd2.1 (Erd2.1-mCherry) belegte eindeutig die Existenz präferierter Bereiche auf der PM, welche häufiger als Ziel des vesikulären Transports frequentiert werden. Zusätzlich wurde ein allgemein erhöhter KDELR-Transport zur PM in eGFP-RTA<sup>HDEL</sup>-behandelten Zellen gegenüber nicht-behandelten Zellen festgestellt. Diese Beobachtungen stehen somit nicht nur im Konsens zu den vorher gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der dosisabhängigen Clusterentwicklung nach externer Applikation geeigneter Modell-Liganden, sie stehen auch im Einklang mit den Parametern des „Trafficking-Modells“ und widerlegen die ursprüngliche Annahme eines auf zufällige Zielbereiche limitierten KDELR-Transports zur PM. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt sich nun die Frage, warum solche präferierten KDELR-Zielregionen auf der PM existieren und wie der gerichtete Transport zu eben diesen Bereichen ermöglicht wird. Möglicherweise spielen hier Details hinsichtlich der PM-Komposition eine Rolle. Faktoren wie Proteingehalt, molekularer Aufbau oder Lipidkomposition der PM können laterale Diffusionsereignisse deutlich beeinflussen (Huang *et al.*, 2016) und sich somit möglicherweise auch im Zusammenhang mit Rezeptortransport und intrazellulärer Rezeptordistribution als prägend erweisen. Die wohl wahrscheinlichste und nachvollziehbarste Erklärung wäre es allerdings, von einem Tubulin- bzw. Aktin-abhängigen KDELR-Transport auszugehen, weshalb diese Möglichkeit im Rahmen ergänzender Studien adressiert wurde.

## **Einfluss von Tubulin und Aktin auf die KDELR Dynamik in HeLa-Zellen**

Es ist allgemein bekannt, dass Regulation und Ausführung intrazellulärer Transportvorgänge in Säugerzellen eng mit den unterschiedlichen Komponenten des eukaryotischen Zytoskeletts assoziiert sind. Für den aktiven Proteintransport entlang des Zytoskeletts sind vor allem Mikrotubuli (MT) und Aktin-Filamente verantwortlich. Der Dynein/Kinesin-vermittelte Transport von Vesikeln und Organellen erfolgt dabei entlang der MT, während Zelloberflächen-assoziierte Phänomene wie etwa Zellmigration, Endozytose und

Vesikeltransport nahe der PM durch Zellkortex lokalisiertes, filamentöses F-Aktin unterstützt werden (Hancock, 2014; Huber *et al.*, 2015; Soldati und Schliwa, 2006). Nicht zuletzt aufgrund der bereits diskutierten Beobachtungen hinsichtlich präferierter Zielbereiche für den anterograden KDELR-Transport zur PM ist es durchaus naheliegend diesen KDELR-Transport als einen Tubulin- und Aktin-abhängigen Prozess zu definieren, auch wenn abermals eingeräumt werden muss, dass sich die *in vivo* stattfindende Rezeptor-Dynamik ungleich komplexer gestaltet als durch das hier vorgestellte „Trafficking-Modell“ beschrieben und wesentliche den Rezeptortransport prägende Faktoren (z. B. Membrandicke, Lipidzusammensetzung usw.) somit nicht berücksichtigt werden. Ungeachtet dieser Limitation des Modells unterstützen zahlreiche Studien an anderen PM-lokalisierten Rezeptoren die hier aufgestellte These eines Tubulin-vermittelten KDELR-Transports zur Zellperipherie. So konnte gezeigt werden, dass eine Desintegration der MT die nahezu vollständige Immobilisierung von EGFR- und cAMPR-Clustern zur Folge hatte und darüber hinaus auch die EGFR-Endozytose negativ beeinflusste (Bogbara *et al.*, 2013; de Keijzer *et al.*, 2011; Kharchenko *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 1991). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten „Live Cell Imaging“-Analysen mit eGFP-markiertem  $\alpha$ -Tubulin sowie mCherry-markiertem Erd2.1 zeigten eine klare Rezeptor/Tubulin Kolokalisation sowie einen direkten KDELR-Transport entlang der MT in HeLa-Zellen. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Colchizin zeigte zudem einen signifikanten Effekt auf die KDELR-Dynamik und KDELR-assoziierte Transportvorgänge. Colchizin stellt ein äußerst potentes Spindelgift dar, welches die dynamische Mikrotubuli-Assemblierung verhindert, indem es an freies Tubulin bindet und dieses somit für den Mikrotubuli-Aufbau nicht mehr zur Verfügung steht. Sowohl Anzahl als auch Intensität beobachteter Cluster wurde durch die Colchizin-Behandlung im Vergleich zu nicht behandelten Zellen drastisch reduziert. Auch schien die Clustergrößenentwicklung nach MT-Blockade deutlich eingeschränkt. Der Effekt war in der Tat so stark, dass die Clusterentwicklung von extern appliziertem eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> eher der im Rahmen früherer Studien beobachteten Clusterentwicklung von eGFP-RTA ohne KDELR-assoziiertem Sequenzmotiv entsprach. Zusätzlich konnte eine deutliche Verringerung der KDELR-Mobilität nach Colchizin-Behandlung nachgewiesen werden. Zusammenfassend deuten diese Erkenntnisse stark auf eine Abhängigkeit des gerichteten KDELR-Transports sowie der KDELR/Liganden-Clusterevolution vom aktiven Transport entlang intakter MT hin. Interessanterweise waren allerdings nicht alle Kompartimente der Zelle von diesem Effekt betroffen. Während der KDELR-Transport in Bereichen des Golgi bzw. ER nahezu völlig zum Stillstand kam, wurde die Mobilität der fluoreszenzmarkierten Rezeptormoleküle

nahe der Zellperipherie hingegen nur im geringen Maße beeinflusst. Diese Beobachtung deutet auf eine untergeordnete Rolle der MT für die KDELR-Dynamik nahe der PM hin. Die bereits geschilderte Tatsache, dass selbst nach Colchizin-Behandlung zwar eine initiale Clusterformierung an der Zelloberfläche stattfindet, die Clustergröße sich jedoch nahezu nicht mehr entwickelt, unterstützt diese Vermutung zusätzlich. Wahrscheinlich zeigen sich für die KDELR-Dynamik nahe der PM kortikale Aktin-Filamente zuständig, auf welche Colchizin keinen inhibierenden Effekt ausübt. Möglicherweise werden das initiale Binden des Liganden an die PM und die darauffolgende Formierung erster, kleinerer Cluster Aktin-abhängig und Tubulin-unabhängig reguliert. Da allerdings aufgrund der Colchizin bedingten MT-Blockade der KDELR Transport aus dem Zellinneren nicht oder nur stark eingeschränkt möglich ist, findet im Anschluss an diese beginnende Clusterformierung keine Clusterentwicklung statt. Experimente mit Phalloidin-behandelten Zellen zur Inhibierung des Aktin-vermittelten Transports zeigten sowohl eine stark reduzierte Clusterbildung und -Entwicklung, als auch eine deutlich eingeschränkte KDELR-Mobilität nahe der Zelloberfläche und stehen somit im Einklang mit den zuvor geäußerten Hypothesen hinsichtlich der Bedeutung von Aktin für die KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen. Um den Zusammenhang zwischen einzelnen Komponenten des eukaryotischen Zytoskeletts und der KDELR-Dynamik detaillierter zu analysieren, wäre es von großem Vorteil, einzelne KDELR-Moleküle über längere Zeiträume in Verbindung mit fluoreszenzmarkiertem Aktin und Tubulin entlang ihres Transportweges verfolgen zu können. Dies war aufgrund der bereits mehrfach angesprochenen geringen zeitlichen Auflösung der „Live Cell Imaging“-Studien im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, weshalb die Visualisierung des direkten KDELR-Tubulin-Transports auf wenige Einzelbilder beschränkt bleibt.

## **Ausweitung der Studien zur KDELR/Liganden-Clusterentwicklung auf ergänzenden Säugerzelllinien**

Im Hinblick auf das ursprünglich formulierte Ziel der vorliegenden Arbeit, die Etablierung eines ersten minimalistischen „Trafficking-Modells“ zur grundlegenden Beschreibung der KDELR-Dynamik sowie KDELR/Liganden-Interaktionen in HeLa-Zellen, wurden mit den bereits diskutierten Daten substantielle Erkenntnisse gewonnen, welche schlussendlich in der Erstellung eines „Trafficking-Modells“ resultierten. Dieses Modell basiert bislang allerdings ausschließlich auf experimentellen Daten unter Verwendung von HeLa-Zellen. Obwohl

HeLa-Zellen eine der am weitesten verbreiteten Modell-Sägerzelllinien der molekularbiologischen Forschung darstellen, wird die Aussagekraft des „Trafficking-Modells“ durch diese Limitation auf eine einzelne Sägerzelllinie dennoch eingeschränkt. Unter Berücksichtigung der hoch komplexen und weitreichenden Funktionen des KDELRs als Signalrezeptor und Regulator Golgi-assozierter Transportvorgänge ist es durchaus wahrscheinlich, dass hinsichtlich der KDELR-Dynamik und vor allem im Hinblick auf die Reaktion der Zelle auf eine externe Liganden-Applikation, deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Sägerzelllinien auftreten können (Cancino *et al.*, 2013; Giannotta *et. al.*, 2012; Pulvirenti *et al.*, 2008). Auch die exakte intrazelluläre KDELR-Lokalisation bzw. -Distribution scheint nicht in jeder Sägerzelllinie identisch zu sein. So existieren eindeutige Hinweise auf eine KDELR-Lokalisation auf Ebene der PM in SH-SY5Y- und HEK-293-Zellen, während dieser Umstand im Allgemeinen für Sägerzellen nach wie vor als nicht definitiv bewiesen gilt (Henderson *et al.*, 2013). Zur langfristigen Stärkung der Relevanz des „Trafficking-Modells“ sowie zur Analyse der KDELR-Dynamik in einem breiteren Kontext wurden die Studien zur Clusterformierung und Entwicklung nach externer Applikation geeigneter Modell-Liganden auf weitere Sägerzelllinien ausgeweitet. In diesem Zusammenhang wurden die humane Nierenepithelzelllinie HEK-293, die humane Epithelzelllinie HEp-2, die humane Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y sowie die Maus-Makrophagen-Zelllinien RAW-Blue und IC-21 analysiert. Im Rahmen dieser Experimente wurden teils dramatische Unterschiede in der Clusterentwicklung zwischen den jeweiligen Zelllinien festgestellt. Während die beobachtete Clusterentwicklung in HEK-293-Zellen sowie HEp-2-Zellen zwar insgesamt schwächer aber durchaus mit der Clusterevolution in HeLa vergleichbar war, ließ sich für die Neuroblastoma-Zellline SH-SY5Y eine etwas schnellere Clusterformierung feststellen. Vor allem bei Betrachtung früher Messzeitpunkte ( $t < 20$  min) lassen sich an der Peripherie von SH-SY5Y-Zellen bereits erste, schwache Cluster dokumentieren, während bei HeLa, HEK-293 sowie HEp-Zellen zu diesen frühen Zeitpunkten noch keine gebundenen Signale zu verzeichnen waren. Die für HeLa-Zellen ausnahmslos beobachtete, und im Rahmen des „Trafficking-Modells“ entsprechend berücksichtigte, initiale Verzögerung der Clusterbildung lässt sich für SH-SY5Y demnach nur in einem deutlich geringeren Ausmaß registrieren. Demnach muss die Clusterentwicklung bei SH-SY5Y-Zellen vergleichsweise schneller ablaufen, so dass die erforderliche Clustergröße und damit verbundene Signalintensität schneller die notwendige Grenze zur visuellen Wahrnehmbarkeit gegen den fluoreszierenden Hintergrund während der Messung überschreitet. Die maximal

wahrnehmbare Clustergröße, Anzahl und Signalintensität erschien derweil allerdings deutlich schwächer als an HeLa-Zellen beobachtet.

Experimente mit Makrophagen-Zelllinien lieferten komplett gegenteilige Resultate. Sowohl für RAW-Blue als auch für IC-21 war nahezu keine Clusterbildung feststellbar. Beide Zelllinien erschienen im Rahmen der „Live Cell Imaging“-Studien als über die Applikation von eGFP-RTA<sup>HDEL</sup> keinerlei Effekt aus. Teilweise war die zu erkennende Clusterentwicklung sogar schwächer als in früheren Studien mit HeLa-Zellen nach Behandlung des Kontroll-Liganden ohne KDELR-assoziiertes Sequenzmotiv eGFP-RTA beobachtet wurde. Eine Analyse der sehr frühen Messzeitpunkte durch Entfernen des applizierten Liganden und der damit verbundenen Eliminierung des fluoreszierenden Hintergrunds offenbarte zwar vereinzelte, sehr schwache Signale an der Peripherie von RAW-Blue Makrophagen, eine Evolution dieser Cluster schien jedoch nicht stattzufinden. Dies erklärt das Unvermögen, sichtbare Cluster im Rahmen der „Live Cell Imaging“-Studien zu dokumentieren, da diese Cluster, obwohl sie sich initial zu formieren scheinen, aufgrund der mangelnden Größen- und Intensitätsentwicklung nie stark genug werden, um gegen den vorhandenen, fluoreszierenden Hintergrund sichtbar zu werden. Für IC-21-Zellen wurden indes nicht einmal diese vorläufigen Cluster zu frühen Messzeitpunkten festgestellt. Applizierte Liganden, gleich welcher Art, interagierten zu keinem Zeitpunkt mit der IC-21 Zellmembran.

Die Aufklärung der Frage warum es diese, teils deutlichen Unterschiede gibt und was solche Zellen, welche auf eine externe Liganden-Applikation scheinbar nicht reagieren, von den übrigen Zelllinien unterscheidet, gestaltet sich sehr schwierig. Ein möglicher, wenngleich unwahrscheinlicher Erklärungsansatz beruht auf den unterschiedlichen Endozytoseraten der analysierten Zelllinien. Insbesondere Makrophagen sind für eine vergleichsweise stark erhöhte Endozytoseaktivität bekannt. Demnach könnte die nicht vorhandene Clusterbildung und Entwicklung damit erklärt werden, dass die Internalisierung der Liganden schlichtweg so schnell abläuft, dass dieser Prozess vor allem angesichts der schwachen zeitlichen Auflösung im Rahmen der durchgeführten „Live Cell Imaging“-Studien nicht zu dokumentieren war. Allerdings müssten dann vermehrt Signale im Zellinnern zu beobachten sein, was weder bei den Analysen von RAW-Blue noch von IC-21-Zellen der Fall war. Eine durchaus naheliegende jedoch kaum zu beweisende Erklärung, wäre eine nicht stattfindende KDELR/Liganden-Interaktion auf der Zelloberfläche, entweder weil bei entsprechenden Zellen keine PM-lokalisierte KDELR-Fraktion existiert oder weil die Effizienz dieser Interaktion eingeschränkt ist. Auch könnte der vermutete, und im Rahmen der vorliegenden

Arbeit durch das „Trafficking-Modell“ naheliegende Mechanismus der Liganden-abhängigen KDELR-Rekrutierung zur PM in RAW-Blue und IC-21 nicht oder stark verändert ablaufen. Die Beobachtung, dass sich bei RAW-Blue Makrophagen initiale Cluster bilden, welche aber keinerlei Größenentwicklung zeigen, unterstützt diese Annahme. Auch könnte es hinsichtlich vorhandener Mikrodomänen auf der PM Unterschiede geben, welche die Interaktion zwischen KDELR und extern applizierten Modell-Liganden erschweren oder gar verhindern. Allerdings muss betont werden, dass spezialisierte Mikrodomänen auch in Immunzellen für die korrekte Modulierung unterschiedlichster Signalereignisse von enormer Wichtigkeit sind. So ist die Lokalisation verschiedener Immuno-Rezeptoren innerhalb von Mikrodomänen in Antigen-präsentierenden Zellen für eine effiziente Antigen-Erkennung, die Ausbildung der immunologischen Synapse sowie T-Zell Aktivierung obligatorisch (Zuidscherwoude *et al.*, 2013).

Im Hinblick auf frühere Erkenntnisse zur gesteigerten *in vivo* Toxizität gegen HeLa-Zellen nach dem Anfügen einer KDELR-assoziierten Signalsequenz an den C-Terminus von RTA (H/KDEL) (Becker und Schmitt, 2011; Wales *et al.*, 1993) wurde überprüft, wie sensitiv sich die jeweiligen Zelllinien ihrerseits gegenüber einer RTA<sup>HDEL</sup>-Applikation verhalten. Die erhöhte Zytotoxizität von RTA<sup>HDEL</sup> im Vergleich zu RTA ohne entsprechendes KDELR assoziiertes Sequenzmotiv legt eine effizientere Aufnahme durch die Zielzelle bzw. einen wirkungsvolleren retrograden Transport in das Zytosol als Folge einer KDELR-vermittelten Interaktion nahe. Demzufolge sollten Zellen, deren Fähigkeit KDELR vermittelt auf einen extrazellulären Stimulus zu reagieren, eingeschränkt ist, auch weniger sensitiv gegenüber einer Behandlung mit RTA<sup>HDEL</sup> reagieren. Die in diesem Zusammenhang durchgeföhrten Studien konnten die Beobachtungen der „Live Cell Imaging“-Analysen allerdings nur teilweise bestätigen. Zwar zeigten sich HeLa- und SH-SY5Y-Zellen erwartungsgemäß sensitiv und RAW-Blue-Zellen erwiesen sich im Einklang mit den fluoreszenzmikroskopischen Dokumentationen als weitestgehend resistent, die Experimente mit HEK-293- sowie IC-21-Zellen lieferten hingegen kaum auswertbare Resultate. Die Toxizität wurde stets indirekt über die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen mittels XTT-Tests ermittelt. Die dabei ermittelten Werte für HEK-293-Zellen unterlagen dabei so starken Schwankungen und erwiesen sich als so inkonsistent (bisweilen zeigten Toxin-behandelte Zellen eine höhere Vitalität als nicht behandelte), dass Aufgrund der XTT-Tests keine verlässliche Aussage getroffen werden kann. Experimente mit IC-21-Zellen zeigten sogar noch weniger verlässliche Resultate, so dass auf die Präsentation der betreffenden Daten verzichtet wurde. Es ist bekannt, dass die für den indirekten Nachweis der Vitalität

unbedingt notwendige Reduktion des Tetrazolium-Rings zu einem wasserlöslichen Formazan-Derivat von variablen Faktoren wie Zellzahl und Proliferationsrate abhängig ist (Scudiero *et al.*, 1988). Da stets Zellen unterschiedlicher und teils recht hoher Passagen verwendet wurden und sich die exakte Zellzahl trotz korrekter Zellzahlermittlung vor der Aussaat aufgrund auftretender Unterschiede in der Teilungs- bzw. Wachstumsrate zwischen einzelnen Proben durchaus unterscheiden kann, ist eine teilweise Verfälschung der gewonnenen Daten aufgrund der genannten Ursachen nicht auszuschließen.

Möglicherweise resultieren die beobachteten Unterschiede hinsichtlich des Clusterverhaltens aus einer ungleichen Komposition der PM. Studien zur Plasmamembran-Organisation in SH-SY5Y-Zellen belegten unlängst ein deutlich verändertes Verhalten hinsichtlich lateraler Diffusion als in Hela-Zellen, welches mit einem geringeren Proteingehalt bzw. einer unterschiedlichen Lipid-Zusammensetzung in Verbindung gebracht wird (Huang *et al.*, 2016). Unterschiedliche Makrophagen-Zelllinien variieren zudem teils recht deutlich im Hinblick auf Proliferation, Zytokinexpression, Morphologie sowie Expression der Oberflächenmarker in Abhängigkeit externer Faktoren wie Kultivierungsmedium, Kultivierungsdauer oder gar des verwendeten Oberflächenmaterials zur Adhäsion (Chamberlain 2015). Im Zusammenhang dazu wurde dokumentiert, dass Unterschiede in der Rezeptorverteilung die entsprechend rezeptorvermittelte zelluläre Antwort auf externe Stimuli merklich beeinflussen (Radkar, 2008).

## **Charakterisierung der KDELR/Liganden-Clusterentwicklung unter Verwendung des Modell-Liganden RTA-E177D**

Bisherige Studien zur subzellulären KDELR-Lokalisation, KDELR/Liganden-Interaktion sowie KDELR-Dynamik in Säugerzellen lieferten substantielle Erkenntnisse und ermöglichen schlussendlich die Etablierung eines theoretischen „Trafficking-Modells“ zur grundlegenden Charakterisierung der KDELR-Dynamik in HeLa-Zellen. Im Rahmen dieser Studien wurden stets modifizierte Varianten der katalytisch aktiven Domäne des A/B-Toxins Rizin (RTA) als Modell-Liganden verwendet. Jedoch kann eben diese katalytische Aktivität für die Adressierung bestimmter Fragestellungen ein wesentliches Problem darstellen. Vor allem im Hinblick auf die hoch komplexe Funktion des KDELRs als wichtiger Regulator des Golgi-Transports sollte sich ein idealer Modell-Ligand zur Analyse dieses Rezeptors nach Applikation so neutral wie möglich verhalten. Ansonsten ist es schwierig, die beobachteten Effekte auch definitiv als zelluläre Antwort auf die Rezeptor/Liganden-Interaktion und nicht

als Konsequenz eines möglicherweise unbekannten Effekts einer ohnehin katalytisch aktiven Substanz zu bewerten. Aus diesem Grund wurden die bereits gewonnenen Erkenntnisse zur KDELR-Dynamik in Säugerzellen unter Verwendung einer katalytisch stark vermindert aktiven RTA-Variante, RTA-E177D, wiederholt. Die E177D-Varianten zeichnen sich dabei durch eine fünfzigfach-verringerte Zytotoxizität im Vergleich zu wildtypischem RTA aus. Durch eine angefügte Methylengruppe und der damit verbundenen Positionsveränderung von Arg180 innerhalb des RTA-Moleküls wird der zuvor enge räumliche Kontakt zwischen Arg180 und Tyr80 unterbrochen und die betroffene Seitenkette verkürzt, was wiederum die Verminderung der biologischen Aktivität von RTA zur Folge hat (Allen *et al.*, 2007).

Die durchgeföhrten „Live Cell Imaging“-Analysen zur Clusterentwicklung nach Applikation der vermindert toxischen RTA-Varianten erbrachten durchweg nahezu identische Ergebnisse wie sie in den zuvor umgesetzten Experimenten mit katalytisch aktiven RTA-Varianten bereits erzielt wurden. Im Detail ließen sich zwar kleinere Unterschiede feststellen, so erschien die maximal erreichte Fluoreszenzintensität in einzelnen Messungen etwas höher und die Clusterentwicklung an HEK-293- sowie SH-SY5Y-Zellen verlief insgesamt schwächer als im Rahmen früherer Studien beobachtet, alles in allem waren die erzielten Resultate jedoch durchaus mit den ursprünglichen „Live Cell Imaging“-Studien vergleichbar. Darüber hinaus können die registrierten Detailunterschiede anhand der durchgeföhrten Experimente nicht angemessen beurteilt werden, da zunächst noch eine detaillierte bildgenaue Evaluation und Quantifizierung der Signalintensität erfolgen muss. Des Weiteren existieren natürlich auch hier die bereits diskutierten Probleme hinsichtlich chargenabhängiger Liganden-Qualität und abweichender Zellvitalität, so dass die beobachteten Detailunterschiede nicht zwangsläufig eine mit dem KDELR bzw. dem applizierten Liganden in Verbindung stehende Ursache haben müssen. Zusammenfassend ist jedoch die Reproduktion der initialen Studien zur Clusterevolution nach externer Applikation katalytisch aktiver RTA-Varianten unter Verwendung katalytisch vermindert aktiver RTA-Varianten gelungen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse von der biologischen Aktivität des Liganden negativ beeinflusst worden sind.

## 5. Ausblick

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung eines theoretischen „Trafficking-Modells“ zur grundlegenden numerischen Charakterisierung der KDELR-Dynamik und KDELR/Liganden-Interaktion. Bislang ist die Aussagekraft dieses Models noch weitestgehend auf HeLa-Zellen limitiert. Um die Komplexität und Nachvollziehbarkeit zukünftig zu stärken, ist eine detaillierte bildgenaue Evaluation und Quantifizierung der „Live Cell Imaging“-Analysen ergänzender humaner Zelllinien zwingend notwendig. Gleches gilt für sämtliche Studien unter Verwendung katalytisch vermindert aktiver RTA-Varianten. Im Rahmen dieser Studien an ergänzenden Säugerzelllinien ist insbesondere die Frage von Interesse, wie die beobachteten Unterschiede im Clusterverhalten nach externer Applikation von KDELR-Modell-Liganden zu erklären sind. Ergänzend sollten auch die der KDELR-Clusterdynamik zugrunde liegenden, biophysikalischen Mechanismen detaillierter charakterisiert werden, zum Beispiel durch Analyse der Aufnahme biotinylierter KDELRs in Abhängigkeit einer externen Liganden-Applikation. Die zusätzliche Markierung subzellulärer Kompartimente wie Golgi, ER oder (frühe) Endosomen würde eine genauere Analyse der KDELR-Dynamik innerhalb der entsprechenden Kompartimente ermöglichen und die Komplexität des bereits entwickelten „Trafficking-Modells“ sinnvoll erweitern. Langfristig ist auch die präzise Beschreibung der KDELR-Clusterkomposition von großer Wichtigkeit. Vor allem die Frage aus wie vielen einzelnen Rezeptormolekülen sich ein Cluster zusammensetzt und die damit gewonnene Erkenntnis bezüglich der Rezeptor-Gesamtmenge innerhalb eines beobachteten subzellulären Kompartimentes ist in diesem Zusammenhang von Interesse. Ebenfalls informativ wäre die Klärung der Fragestellung, inwiefern ein siRNA-vermittelter „knock-down“ ausgewählter Proteine, welche mit Rezeptor-Endozytose bzw. dem Transport von der PM zu Endosomen in Verbindung stehen, die KDELR-Clusterbildung und -Entwicklung beeinflusst. Im Zusammenhang damit wäre auch die Konstruktion einer KDELR- „knock-out“-Zelllinie von großem Nutzen.

Diese experimentellen Ansätze könnten langfristig zur detaillierten Charakterisierung der KDELR-Dynamik und KDELR/Liganden-Interaktion sowie zur präzisen Beschreibung der zugrunde liegenden biophysikalischen Prinzipien beitragen und schließlich die Etablierung eines umfassenden „Trafficking-Modells“ ermöglichen.

## **6. Zusammenfassung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden wichtige und grundlegende Erkenntnisse hinsichtlich der Dynamik und Liganden-Interaktion von KDELR-Rezeptoren (KDEL-R) in Säugerzellen gewonnen. Die Studien bezüglich der Liganden-Clusterentwicklung an Säugerzellen belegten eindeutig, dass ein KDELR-assoziiertes Sequenzmotiv (H/KDEL) für eine deutliche Interaktion und Clusterentwicklung extern applizierter Modell-Liganden auf der Zelloberfläche von essentieller Bedeutung ist. Ergänzende Monte Carlo-Simulationen (MC) zeigten zusätzlich eine strikte Abhängigkeit des beobachteten Clusterverhaltens von der Umgebungstemperatur sowie der Konzentration an appliziertem Liganden. Letztere Erkenntnis deutet zudem auf die Fähigkeit eukaryotischer Zellen hin, den KDELR-Transport zur Plasmamembran (PM) in Abhängigkeit von der extern verfügbaren Liganden-Konzentration modulieren zu können. Darüber hinaus wurde die Notwendigkeit eines intakten Zytoskeletts für die Clusterbildung und -Entwicklung sowie für den KDELR-Transport zur Zelloberfläche bestätigt und eine starke Verminderung der Clusterentwicklung durch Hemmung aktiver Endo- bzw. Exozytoseereignisse aufgezeigt. Des Weiteren deckten Analysen mit fluoreszenzmarkierten KDELR-Varianten eine ungleiche, jedoch nicht zufällige intrazelluläre KDELR-Verteilung auf. Tatsächlich existieren Bereiche der eukaryotischen PM, welche häufiger als KDELR-Transportziel frequentiert werden und wo somit eine deutlich höhere Menge an lokalisiertem KDELR vorliegt. Zusammenfassend deuten die gewonnenen Resultate stark auf eine KDELR-Funktion auf Ebene der eukaryotischen PM hin. Die ursprünglich formulierte Zielsetzung der vorliegenden Arbeit wurde durch die Etablierung und Publikation eines grundlegenden theoretischen „Trafficking-Modells“ zur numerischen Beschreibung der KDELR-Dynamik und KDELR/Liganden-Interaktion in HeLa-Zellen erreicht.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H. & van der Goot, F. G.** Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol* **160**, 321–328 (2003).
- Abulrob, A., Lu, Z., Baumann, E., Vobornik, D., Taylor, R., Stanimirovic, D., Johnston, L. J.** Nanoscale imaging of epidermal growth factor receptor clustering. *J Biol Chem* **285**, 3145–3156 (2010).
- Acik, N.** Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der subzellulären Lokalisation und Dynamik säugerspezifischer KDEL-Rezeptoren in HeLa-Zellen. *Bachelor-Arbeit Universität des Saarlandes* (2014).
- Agrawal, N. J., Nukpezah, J. & Radhakrishnan, R.** Minimal mesoscale model for protein-mediated vesiculation in clathrin-independent endocytosis. *PLoS Comput Biol* **6**, e1000926 (2010).
- Allen, S. C. H., Moore, K. A., Marsden, C. J., Fülop, V., Moffat, K. G., Lord, J. M., Ladds, G., Roberts, L. M.** The isolation and characterization of temperature-dependent ricin A chain molecules in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* (2007).
- Altmaier, S.** Untersuchungen zum Einfluss der externen Applikation verschiedener RTA-Varianten auf die KDEL-Rezeptor Dynamik in Säugerzellen. *Bachelor-Arbeit Universität des Saarlandes* (2017).
- Aoe, T., Cukierman, E., Lee, A., Cassel, D., Peters, P. J., Hsu, V. W.** The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase activating protein to ARF1. *EMBO J* **15**(24), 7305–16 (1997).
- Argent, R.H., Parrott, A.M., Day, P.J., Roberts, L.M., Stockley, P.G., Lord, J.M., Radford, S.E.** Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain. *J Biol Chem* **275**, 9263–9269 (2000).
- Asp, L., Nilsson, T.** Golgi gets wired up. *Nat Cell Biol* **10**, 885–7 (2008).
- Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J., Osterloh, J.** Ricin poisoning: a comprehensive review. *JAMA* **294**(18), 2342–51 (2005).
- Babcock, J. J. & Li, M.** Inside job: ligand-receptor pharmacology beneath the plasma membrane. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 859–869 (2013).
- Baker, J.G., Hill, S.J., Summers, R.J.** Evolution of β-blockers: from anti-anginal drugs to ligand-directed signalling. *Trends Pharm Sci* **32**, 227–34 (2011).
- Bard, F., Mazelin, L., Pechoux-Longin, C., Malhotra, V., Jurdic, P.** Src regulates Golgi structure and KDEL receptor-dependent retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **278**, 46601–6 (2003).
- Bard, F., Patel, U., Levy, J.B., Jurdic, P., Horne, W.C., Baron, R.** Molecular complexes that contain both c-Cbl and c-Src associate with Golgi membranes. *Eur J Cell Biol* **81**, 26–35 (2002).
- Becker, B. & Schmitt, M. J.** Adapting yeast as model to study ricin toxin a uptake and trafficking. *Toxins* **3**, 834–847 (2011).
- Becker, B.** Untersuchungen zur Endozytose und zum intrazellulären Transportweg von Ricin A (RTA) in Säuger- und Hefezellen. *Dissertation Universität des Saarlandes* (2012).
- Becker, B., Blum, A., Giebelmann, E., Dausend, J., Rammo, D., Müller, N. C., Tschaksch, E., Steimer, M., Spindler, J., Becherer, U., Rettig, J., Breinig, F., Schmitt, M. J.** H/KDEL receptors mediate host cell intoxication by a viral A/B toxin in yeast. *Sci Rep* **6**, 31105 (2016).
- Becker, B., Shaebani, M. R., Rammo, D., Bubel, T., Santen, L., Schmitt, M. J.** Cargo binding promotes KDEL receptor clustering at the mammalian cell surface. *Sci Rep* **6**, 28940 (2016).
- Bellisola, G., Fracasso, G., Ippoliti, R., Menestrina, G., Rosen, A., Solda, S., Udali, S., Tomazzolli, R., Tridente, G., Colombatti, M.** Reductive activation of ricin and ricin A-chain immunotoxins by protein disulfide isomerase and thioredoxin reductase. *Biochem Pharmacol* **67**, 1721–1731 (2004).
- Bivona, T.G. & Philips, M.R.** Analysis of Ras and Rap activation in living cells using fluorescent Ras binding domains. *Methods* **37**, 138–45 (2005).
- Bivona, T.G. & Philips, M.R.** Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 136–42 (2003).

- Bivona, T. G., Perez, D. C. I., Ahearn, I. M., Grana, T. M., Chiu, V. K., Lockyer, P. J., Cullen, P. J., Pellicer, A., Cox, A. D., Phillips M. R.** Phospholipase C-gamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* **424**, 694–8 (2003).
- Boggara, M., Athmakuri, K., Srivastava, S., Cole, R. & Kane, R. S.** Characterization of the diffusion of epidermal growth factor receptor clusters by single particle tracking. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 419–426 (2013).
- Bonifacino, J.S. & Glick, B.S.** The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–166 (2004).
- Bray, D., Levin, M. D. & Morton-Firth, C. J.** Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature* **393**, 85–88 (1998).
- Bubnell, J., Pfister, P., Sapar, M. L., Rogers, M. E., Feinstein, P.**  $\beta_2$  Adrenergic Receptor Fluorescent Protein Fusions Traffic to the Plasma Membrane and Retain Functionality. *PLoS One* **8**, e74941 (2013).
- Cabrera, M., Muniz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martin, M. E., Velasco, A.** The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol Biol Cell* **14**(10), 4114–4125 (2003).
- Campagna, J. A. & Fallon, J.** Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* **138**, 123–132 (2006).
- Cancino, J., Jung, J.E., Luini, A.** Regulation of Golgi signaling and trafficking by the KDEL receptor. *Histochem Cell Biol* **140**, 395 (2013).
- Capitani, M. & Salles, M.** The KDEL receptor: New functions for an old protein. *FEBS Letters* **583**, 3863–3871 (2009).
- Casaletto, J. B. & McClatchey, A. I.** Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 387–400 (2012).
- Castro, M. van Santen, H. M., Ferez, M., Alarcon, B., Lythe, G., Molina-Paris, C.** Receptor pre-clustering and T cell responses: insights into molecular mechanisms. *Front Immunol* **5**, 132 (2014).
- Chamberlain, L. M., Holt-Casper, D., Gonzales-Juarrero, M., Grainger, D. W.** Extended culture of macrophages from different sources and maturation results in a common M2 phenotype. *J Biomed Mater Res. Part A* **103**.9 2864–2874 (2015).
- Chen, C. L. Chen, Y. P., Lin, M. W., Huang, Y. B., Chang, F. R., Duh, T. H., Wu, D. C., Wu, W. C., Kao, Y. C., Yang, P. H.** Euphol from euphorbia tirucalli negatively modulates TGF- $\beta$  responsiveness via TGF- $\beta$  receptor segregation inside membrane rafts. *PLoS One* **10**, e0140249 (2015).
- Chidiac, P., Hebert, T.E., Valiquette, M., Dennis, M., Bouvier, M.** Inverse agonist activity of b-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* **45**, 490–9 (1994).
- Chuang, T.T., Iacobelli, L., Salles, M., De Blasi, A.** G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 416–21 (1996).
- Clague, M.J., Urbe, S.** Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol* **16**, 551–9 (2006).
- Collins, J.E., Wright, C.L., Edwards, C.A., Davis, M.P., Grinham, J.A., Cole, C.G., Goward, M.E., Aguado, B., Mallya, M., Mokrab, Y., Huckle, E.J., Beare, D.M. & Dunham, I.** A genome annotation-driven approach to cloning the human ORFeome. *Genome Biol* **5**, R84 (2004).
- Cooper, G. M.** Structure of the Plasma Membrane. *The Cell: A Molecular Approach*. 2<sup>nd</sup> Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates (2000).
- Costa, T., Ogino, Y., Munson, P.J., Onaran, H.O., Rodbard, D.** Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol Pharmacol* **41**, 549–60 (1992).
- Dausend, J.** *In vivo* Topologie und Lokalisation des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p und dessen Funktion bei der Endozytose des viralen K28-Toxins in Hefe. *Dissertation Universität des Saarlandes* (2010).
- de Keijzer, S., Galloway, J., Harms, G. S., Devreotes, P. N. & Iglesias, P. A.** Disrupting microtubule network immobilizes amoeboid chemotactic receptor in the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 1701–1708 (2011).
- de Matteis, M.A., Santini, G., Kahn, R.A., Di Tullio, G., Luini, A.** Receptor and protein kinase C-mediated regulation of ARF binding to the Golgi complex. *Nature* **364**, 818–21 (1993).

- Deeks, E.D., Cook, J.P., Day, P.J., Smith, D.C., Roberts, L.M., Lord, J.M.** The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem* **41**, 3405–3413 (2002).
- Delos Santos, R. C., Garay, C., Antonescu, C. N.** Charming neighborhoods on the cell surface: Plasma membrane microdomains regulate receptor tyrosine kinase signalling. *Cell Signal* **27**, 1963–76 (2015).
- Denker, S.P., McCaffery, J.M., Palade, G.E., Insel, P.A., Farquhar, M.G.** Differential distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J Cell Biol* **133**, 1027–40 (1996).
- Denker, S.P., McCaffery, J.M., Palade, G.E., Insel, P.A., Farquhar, M.G.** Differential distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J Cell Biol* **133**, 1027–1040 (1996).
- Di Cola, A., Frigerio, L., Lord, J., Roberts, L., Ceriotti, A.** Endoplasmic reticulum-associated degradation of ricin A chain has unique and plant-specific features. *Plant Physiol* **137**, 287–296 (2005).
- Diaz Anel, A.M.** Phospholipase C beta3 is a key component in the Gbetagamma/PKCeta/PKD-mediated regulation of trans-Golgi network to plasma membrane transport. *Biochem J* **406**(1), 157–165 (2007).
- Eierhoff, T., Hrincius, E. R., Rescher, U., Ludwig, S. & Ehrhardt, C.** The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog* **6**, e1001099 (2010).
- Eisfeld, K., Riffer, F., Mentges, J. & Schmitt, M. J.** Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol* **37**, 926–940 (2000).
- El-Rayes, B. F. & LoRusso, P. M.** Targeting the epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* **91**, 418–424 (2004).
- Endo, Y.** Mechanism of action of ricin and related toxins on the inactivation of eukaryotic ribosomes. *Cancer Treat Res* **37**, 75–89 (1988).
- Fulda, S. & Debatin, K.M.** Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798–811 (2006).
- Giannotta, M., Ruggiero, C., Grossi, M., Cancino, J., Capitani, M., Pulvirenti, T., Consoli, G.M., Geraci, C., Fanelli, F., Luini, A., Salles, M.** The KDEL receptor couples to Galphaq/11 to activate Src kinases and regulate transport through the Golgi. *EMBO J* **31**(13), 2869–2881 (2012).
- Griffiths, G. & Simons, K.** The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**(4775), 438–443 (1986).
- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse-Locker, J., Nilsson, T., Goud, B., Söling, H.D., Tang, B. L., Wong, S. H., Hong, W.** Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J Cell Biol* **127**, 1557–74 (1994).
- Griffiths, G., Warren, G., Quinn, P., Mathieu-Costello, O., Hoppeler, H.** Density of newly synthesized plasma membrane proteins in intracellular membranes I. Stereological studies. *J Cell Biol* **98**(6), 2133–2141 (1984).
- Gu, F., Crump, C.M., Thomas, G.** Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci* **58**(8), 1067–1084 (2001).
- Guo, C. & Levine, H. A.** Thermodynamic model for receptor clustering. *Biophys J* **77**, 2358–2365 (1999).
- Gutkind, J.S.** Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE REJ* **40** (2000).
- Han, B., Tiwari, A., Kenworthy, A. K.** Tagging Strategies Strongly Affect the Fate of Overexpressed Caveolin-1. *Traffic* **16**, 417–438 (2015).
- Hancock, J. F.** Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 456–462 (2006).
- Hancock, W. O.** Bidirectional cargo transport: moving beyond tug of war. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 615–628 (2014).
- Hanlon, C. D. & Andrew, D. J.** Outside-in signaling - a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. *J Cell Sci* **128**, 3533–3542 (2015).
- Harrison, C. & Traynor, J.R.** The [<sup>35</sup>S]GTPgS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci* **74**, 489–508 (2003).

- Hazes, B. & Read, R.J.** Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochem* **36**, 11051–11054 (1997).
- Heinrich, R. & Rapoport, T.A.** Generation of nonidentical compartments in vesicular transport systems. *J Cell Biol* **168**, 271–280 (2005).
- Henderson, M. J., Richie, C. T., Airavaara, M., Wang, Y. & Harvey, B. K.** Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. *J Biol Chem* **288**, 4209–4225 (2013).
- Heymann, M. C., Rabe, S., Ruß, S., Kapplusch, F., Schule, F., Stein, R., Winkler, S., Hedrich, C. M., Rösken-Wolff, A., Hofmann, S. R.** Fluorescent tags influence the enzymatic activity and subcellular localization of procaspase-1. *Clin Immunol* **160**, 172–179 (2015).
- Hill, M.M., Adrain, C., Martin, S.J.** Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* **3**, 19–26 (2003).
- Hoffmann, C., Zürn, A., Büinemann, M., Lohse, M.J.** Conformational changes in G-protein-coupled receptors – the quest for functionally selective conformations is open. *Br J Pharmacol* **153**, S358–66 (2008).
- Hsu, V.W., Shah, N. & Klausner, R.D.** A brefeldin A-like phenotype is induced by the overexpression of a human ERD-2-like protein, ELP-1. *Cell* **69**, 625–635 (1992).
- Huang, S., Lim, S. Y., Gupta, A., Bag, N., Wohland, T.** Plasma membrane organization and dynamics is probe and cell line dependent. *Biochim Biophys Acta* **1859**(9 PT A), 1483–92 (2016).
- Huber, F., Boire, A., Lopez, M. P. & Koenderink, G. H.** Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. *Curr Opin Cell Biol* **32**, 39–47 (2015).
- Hulo, N. A., Bairoch, V., Bulliard, L., Cerutti, E., De Castro, P.S., Langendijk-Genevaux, M., Pagni, & C.J.A. Sigrist** The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **34**, D227–D230 (2006).
- Ibarra, C., Vicencio J. M., Estrada, M., Lin, Y., Rocco, P., Rebellato, P., Munoz, J. P., Garcia-Pietro, J., Quest, A. F., Chiong, M., Davidson, S. M., Bulatovic, I., Grinnemo, K. H., Larsson, O., Szabadkai, G., Uhlen, P., Jaimovich, E., Lavandero, S.** Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors. *Circ Res* **112**, 236–245 (2013).
- Ito, A., Satoh, T., Kaziro, Y., Itoh, H.** G protein beta gamma subunit activates Ras, Raf, and MAP kinase in HEK 293 cells. *FEBS Lett* **368**(1), 183–7 (1995).
- Iversen, T.G., Skretting, G., Llorente, A., Nicoziani, P., van Deurs, B. & Sandvig, K.** Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. *Mol Biol Cell* **12**(7), 2099–107 (2001).
- Jamora, C., Takizawa, P.A., Zaarour, R.F., Denesvre, C., Faulkner, D.J., Malhotra, V.** Regulation of Golgi structure through heterotrimeric G proteins. *Cell* **91**(5), 617–626 (1997).
- Jaqaman, K. & Grinstein, S.** Regulation from within: the cytoskeleton in transmembrane signaling. *Trends Cell Biol* **22**, 515–26 (2012).
- Karrenbauer, A., Jeckel, D., Just, W., Birk, R., Schmidt, R.R., Rothman, J.E., Wieland, F.T.** The rate of bulk flow from the Golgi to the plasma membrane. *Cell* **63**(2), 259–267 (1990).
- Kenakin, T.P.** Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptorbased drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 617–26 (2009).
- Kenakin, T.P.** Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther* **336**, 296–302 (2011).
- Kenakin, T.P.** Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J* **15**, 598–611 (2001).
- Kenakin, T.P.** Pharmacological onomastics: what's in a name? *Br J Pharmacol* **153**, 432–8 (2008).
- Kharchenko, M. V., Aksyonov, A. A., Melikova, M. M. & Kornilova, E. S.** Epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis is accompanied by reorganization of microtubule system in HeLa cells. *Cell Biol Int* **31**, 349–359 (2007).
- Klumperman, J.** Transport between ER and Golgi. *Curr Opin Cell Biol* **12**(4), 445–449 (2000).
- Kobilka, B.K.** G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 794–807 (2007).

- Kobilka, B.K., Deupi, X.** Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 397–406 (2007).
- Kostenis, E.** G proteins in drug screening: from analysis of receptor-G protein specificity to manipulation of GPCR-mediated signalling pathways. *Curr Pharm Des* **12**, 1703–15 (2006).
- Kuryatov, A., Luo, J., Cooper, J., Lindstrom, J.** Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha 4 beta 2 acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **68**, 1839–51 (2005).
- Lamb, F.I., Roberts, L.M., Lord, J.M.** Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preproricin. *Eur J Biochem* **148**, 265–270 (1985).
- Larocca, M.C., Shanks, R.A., Tian, L., Nelson, D.L., Stewart, D.M., Goldenring, J.R.** AKAP350 interaction with cdc42 interacting protein 4 at the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* **15**, 2771–81 (2004).
- Lee, A.S.** The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* **26**, 504–10 (2001).
- Lee, D. K., Lanca, A. J., Cheng, R., Nguyen, T., Ji, X. D., Gobeil, Jr F., Chemtob, S., George, S. R., O'Dowd, B. F.** Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J Biol Chem* **279**, 7901–8 (2004).
- Lee, M.C., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., Schekman, R.** Bidirectional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 87–123 (2004).
- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samama, P., Costa, T.** Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 303–7 (1993).
- Lester, H. A., Miwa, J. M., Srinivasan, R.** Psychiatric drugs bind to classical targets within early exocytotic pathways: therapeutic effects. *Biol Psychiatry* **72**, 907–15 (2012).
- Lester, H. A., Xiao, C., Srinivasan, R., Son, C. D., Miwa, J., Pantoja, R., Banghart M. R., Dougherty, D. A., Goate, A. M., Wang, J. C.** Nicotine is a selective pharmacological chaperone of acetylcholine receptor number and stoichiometry. Implications for Drug Discovery. *AAPS J* **11**, 167–77 (2009).
- Lewis, M.J. & Pelham, H.R.** A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* **348**, 162–163 (1990).
- Lewis, M.J. & Pelham, H.R.** Sequence of a second human KDEL receptor. *J Mol Biol* **226**, 913–916 (1992).
- Lewis, M.J., Sweet, D.J. & Pelham, H.R.** The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* **61**, 1359–1363 (1990).
- Li, S., Spooner, R.A., Allen, S.C.H., Guise, C.P., Ladds, G., Schnoeder, T., Schmitt, M.J., Lord, J.M., Roberts, L.M.** Folding-competent and folding-defective forms of ricin A chain have different fates after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **21**, 2543–2554 (2010).
- Lilley, B.N., Ploegh, H.L.** A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**, 834–840 (2004).
- Llewellyn, D. H., Roderick, H. L. & Rose, S.** KDEL receptor expression is not coordinately up-regulated with ER stress-induced reticuloplasmin expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Comm* **240**, 36–40 (1997).
- Llorente, A., Lauvral, S.U., van Deurs, B. & Sandvig, K.** Induction of direct endosome to endoplasmic reticulum transport in Chinese hamster ovary (CHO) cells (LdlF) with a temperature-sensitive defect in epsilon-coatomer protein (epsilon-COP). *J Biol Chem* **278**, 35850–35855 (2003).
- Llorente, A., Rapak, A., Schmid, S.L., van Deurs, B. & Sandvig, K.** Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **140**, 1–11 (1998).
- Lord, J.M. & Spooner, R.A.** Ricin trafficking in plant and mammalian cells. *Toxins* **3**, 787–801 (2011).
- Lord, M.J., Jolliffe, N.A., Marsden, C.J., Pateman, C. S., Smith, D. C., Spooner, R. A., Watson, P. D., Roberts, L. M.** Ricin: mechanisms of cytotoxicity. *Toxicol Rev* **22**, 53–64 (2003).
- Majoul, I., Ferrari, D., Soling, H.D.** Reduction of protein disulfide bonds in an oxidizing environment. The disulfide bridge of cholera toxin A-subunit is reduced in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **401**, 104–108 (1997).
- Marrari, Y., Crouthamel, M., Irannejad, R., Wedegaertner, P.B.** Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochem* **46**(26), 7665–77 (2007).

- Marshall, R.S., Jolliffe, N.A., Ceriotti, A., Snowden, C.J., Lord, J.M., Frigerio, L., Roberts, L.M.** The role of CDC48 in the retro-translocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells. *J Biol Chem* **283**, 15869–15877 (2008).
- Martin, M.E., Hidalgo, J., Vega, F.M., Velasco, A.** Trimeric G proteins modulate the dynamic interaction of PKAII with the Golgi complex. *J Cell Sci* **112**(Pt 22), 3869–3878 (1999).
- Mavillard, F., Hidalgo, J., Megias, D., Levitsky, K.L., Velasco, A.** PKA-mediated Golgi remodeling during cAMP signal transmission. *Traffic* **11**, 90–9109 (2010).
- McBride, H. M., Neuspel, M., Wasiak, S.** Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* **16**, R551–560 (2006).
- Michaelson, D., Ahearn, I., Bergo, M., Young, S., Philips, M.** Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and Golgi. *Mol Biol Cell* **13**, 3294–302 (2002).
- Mor, A., Campi, G., Du, G., Zheng, Y., Foster, D.A., Dustin, M.L., Phillips, M. R.** The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2. *Nat Cell Biol* **9**, 713–9 (2007).
- Mor, A., Dustin, M.L., Philips, M.R.** Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. *Immunol Rev* **218**, 114–25 (2007).
- Mor, A., Philips, M.R.** Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* **24**, 771–800 (2006).
- Morinelli, T.A., Raymond, J.R., Baldys, A., Yang, Q., Lee, M.H., Luttrell, L., Ullian, M. E.** Identification of a putative nuclear localization sequence within ANG II AT(1A) receptor associated with nuclear activation. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1398–1408 (2007).
- Muniz, M., Alonso, M., Hidalgo, J., Velasco, A.** A regulatory role for cAMP-dependent protein kinase in protein traffic along the exocytic route. *J Biol Chem* **271**(48), 30935–30941 (1996).
- Muniz, M., Martin, M.E., Hidalgo, J., Velasco, A.** Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14461–14466 (1997).
- Munoz, P., Mittelbrunn, M., de la Fuente, H., Perez-Martinez, M., Garcia-Perez, A., Ariza-Vequillas, A., Malavasi, F., Zubiaur, M., Sanchez-Madrid, F., Sancho, J.** Antigen-induced clustering of surface CD38 and recruitment of intracellular CD38 to the immunologic synapse. *Blood* **111**, 3653–3664 (2008).
- Nagahama, M., Usui, S., Shinohara, T., Yamaguchi, T., Tani, K., Tagaya, M.** Inactivation of Galphaz causes disassembly of the Golgi apparatus. *J Cell Sci* **115**, 4483–93 (2002).
- Neer, E. J.** Heterotrimeric G-Proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249–257 (1995).
- Oldham, W.M., Hamm, H.E.** Heterotrimeric G protein activation by G-protein coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 60–71 (2008).
- Olsnes, S. & Pihl, A.** Treatment of abrin and ricin with β-mercaptoethanol: opposite effects on their toxicity in mice and their ability to inhibit protein synthesis in a cell-free system. *FEBS Lett* **28**, 48–50 (1972).
- Olsnes, S., Refsnes, K., Christensen, T.B. & Pihl A.** Studies on the structure and properties of the lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *Biochim Biophys Acta* **405**, 1–10 (1975).
- Olsnes, S., Sandvig, K., Refsnes, K. & Pihl, A.** Rates of different steps involved in the inhibition of protein synthesis by the toxic lectins abrin and ricin. *J Biol Chem* **251**, 3985–3992 (1976).
- Orci, L., Stammes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H. & Rothman, J.E.** Bidirectional transport by distinct populations of COPI coated vesicles. *Cell* **90**, 335–349 (1997).
- Ow, Y.L., Green, D.R., Hao, Z., Mak, T.W.** CytochromeC: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 532–42 (2008).
- Park, I. & Lee, H. S.** EphB/ephrinB signaling in cell adhesion and migration. *Mol Cell* **38**, 14–19 (2015).
- Pelham, H. R. B.** Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 1–23 (1989).
- Pelham, H. R. B.** Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J* **7**(4), 913–918 (1988).
- Pelham, H. R. B.** The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* **15**, 483–486. (1990).

- Peumans, W. J., Hao, Q. & Van Damme, E. J. M.** Ribosome inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J* **15**, 1493–1506 (2001).
- Pulvirenti, T., Giannotta, M., Capestrano, M., Capitani, M., Pisanu, A., Polishchuk, R.S., San Pietro, E., Beznoussenko, G. V., Mironov, A. A., Turacchio, G., Hsu, V. W., Sallese, M., Luini, A.** A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway. *Nat Cell Biol* **10**, 912–22 (2008).
- Radkar, V., Lau-Cam, C., Hardej, D., Billack, B.** The role of surface receptor stimulation on the cytotoxicity of resveratrol to macrophages. *Food and Chem Tox* **46**.12, 3664–3670 (2008).
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., Lefkowitz, R.J.** Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 373–86 (2010).
- Rammo, D.** Untersuchungen zum Einfluss ausgewählter Hefeproteine auf den retrograden RTA Transport sowie die Beteiligung der KDEL-Rezeptoren am Transport von RTA<sup>HDEL/KDEL</sup> in Säugerzellen. *Diplomarbeit Universität des Saarlandes* (2012).
- Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Ngyuen, V.D., Latva-Ranta, M., Ruddock, L.** A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* **179**, 1193–1204 (2007).
- Reddy, A. S., Chilukuri, S. & Raychaudhuri, S.** The network of receptors characterize B cell receptor micro- and macroclustering in a Monte Carlo model. *J Phys Chem B* **114**, 487–494 (2010).
- Redman, V., Oresic, K., Tortorella, L.L., Cook, J.P., Lord, M., Tortorella, D.** Dislocation of ricin toxin A chains in human cells utilizes selective cellular factors. *J Biol Chem* **286**, 21231–21238 (2011).
- Reiter, E., Lefkowitz, R.J.** GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* **17**, 159–65 (2006).
- Renner, M., Specht, C. G. & Triller, A.** Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 532–540 (2008).
- Riffer, F., Eisfeld, K., Breinig, F. & Schmitt, M. J.** Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* **148**, 1317–1328 (2002).
- Rodighiero, C., Tsai, B., Rapoport, T.A., Lencer, W.I.** Role of ubiquitination in retro-translocation of cholera toxin and escape of cytosolic degradation. *EMBO Rep* **3**, 1222–1227 (2002).
- Rohn, W. M., Rouille, Y., Waguri, S. & Hoflack, B.** Bi-directional trafficking between the *trans*-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *J Cell Sci* **113**, 2093–2101 (2000).
- Ron, D. & Walter, P.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519–29 (2007).
- Rothman, J.E.** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**(6501), 55–63 (1994).
- Rutkowski, D.T., Kaufman, R.J.** A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* **14**, 20–8 (2004).
- Saffman, P. G. & Delbrück, M.** Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **32**, 3111–3113 (1975).
- Sakai, T., Yamashina, S. & Ohnishi, S.** Microtubule-disrupting drugs blocked delivery of endocytosed transferrin to the cytocenter, but did not affect return of transferrin to plasma membranes tatsuy. *J Biochem* **109**, 528–533 (1991).
- Sallese, M., Giannotta, M., Luini, A.** Coordination of the secretory compartments via inter-organelle signalling. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 801–809 (2009).
- Sallese, M., Pulvirenti, T., Luini, A.** The physiology of membrane transport and endomembrane-based signalling. *EMBO J* **25**, 2663–2673 (2006).
- Sallette, J., Pons, S., Devillers-Thiery, A., Soudant, M., de Carvalho, L. P., Changeux, J. P., Corringer, P. J.** Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron* **46**, 595–607 (2005).
- Sandvig, K. & van Deurs, B.** Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* **76**, 949–966 (1996).
- Sandvig, K. & van Deurs, B.** Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J* **19**, 5943–5950 (2000).

- Sandvig, K., Olsnes, S., Pihl, A.** Kinetics of binding of the toxic lectins abrin and ricin to surface receptors of human cells. *J Bio Chem* **251**, 3977–3984 (1976).
- Sannerud, R., Saraste, J., Goud, B.** Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route: pathways and machinery. *Curr Opin Cell Biol* **15**(4), 438–445 (2003).
- Scheel, A.A. & Pelham, H.R.** Identification of amino acids in the binding pocket of the human KDEL receptor. *J Biol Chem* **273**, 2467–2472 (1998).
- Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., Brand, M., Zerial, M.** The endosomal protein App1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell* **133**, 486–97 (2008).
- Schmitt, M. J. & Breinig, F.** Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol* **4**, 212–221 (2006).
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R.** Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res* **48**.17 , 4827-4833 (1988).
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N. & Pelham, H.R.** ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**, 1349–1357 (1990).
- Shibuta, K., Mori, M., Shimoda, K., Inoue, H., Mitra, P., Barnard, G.F.** Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and cellcycle variation during in vitro differentiation. *Jpn J Cancer Res* **93**, 789–97 (2002).
- Sikorski, R. S. & Hieter, P.** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**(1), 19-27 (1989).
- Simpson, J.C., Roberts, L.M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D.H., Lord, J.M.** Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett* **459**, 80–84 (1999).
- Singh, P., Tang, B.L., Wong, S.H. & Hong, W.** Transmembrane topology of the mammalian KDEL receptor. *Mol Cell Biol* **13**, 6435–6441 (1993).
- Skube, S. B., Chaverri, J. M., Goodson, H. V.** Effect of GFP tags on the localization of EB1 and EB1 fragments *in vivo*. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**, 1-12 (2010).
- Snider, M. D. & Rogers, O. C.** Intracellular movement of cell surface receptors after endocytosis: resialylation of asialo-transferrin receptor in human erythroleukemia cells. *J Cell Biol* **100**, 826–834 (1985).
- Soldati, T. & Schliwa, M.** Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 897–908 (2006).
- Sorkin, A. & Von Zastrow, M.** Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 600–14 (2002).
- Spano, J.P., Andre, F., Morat, L., Sabatier, L., Besse, B., Combadiere, C., et al.** Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol* **15**, 613–7 (2004).
- Spilsberg, B., van Meer, G., Sandvig, K.** Role of lipids in the retrograde pathway of ricin intoxication. *Traffic* **4**, 544-552 (2003).
- Spooner, R.A. & Lord, J.M.** Ricin trafficking in cells. *Toxins* **7**, 49-65 (2015).
- Spooner, R.A., Hart, P.J., Cook, J.C., Pietroni, P., Rogon, C., Hoehfeld, J., Roberts, L.M., Lord, J.M.** Cytosolic chaperones influence the fate of a toxin dislocated from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 17408–17413 (2008).
- Spooner, R.A., Smith, D.C., Easton, A.J., Roberts, L.M., Lord, J.M.** Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Virol J* **7**, 26 (2006).
- Spooner, R.A., Watson, P.D., Marsden, C.J., Smith, D.C., Moore, K.A., Cook, J.P., Lord, J.M., Roberts, L.M.** Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **383**, 285–293 (2004).

- Srinivasan, R., Richards, C. I., Xiao, C., Rhee, D., Pantoja, R., Dougherty, D. A., Miwa, J. M., Lester, H. A.** Pharmacological chaperoning of nicotinic acetylcholine receptors reduces the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Pharmacol* **81**, 759–69 (2012).
- Stewart, A., Huang, J., Fisher, R.** A. RGS proteins in heart: brakes on the vagues. *Front Physiol* **13**:3:95 (2012).
- Stow, J.L. & Heimann, K.** Vesicle budding on Golgi membranes: regulation by G proteins and myosin motors. *Biochim Biophys Acta* **1404**(1–2), 161–171 (1998).
- Stow, J.L., de Almeida, J.B., Narula, N., Holtzman, E.J., Ercolani, L., Ausiello, D.A.** A heterotrimeric G protein, Galphai-3, on Golgi membranes regulates the secretion of a heparan sulfate proteoglycan in LLC-PK1 epithelial cells. *J Cell Biol* **114**, 1113–24 (1991).
- Studier, F. W., Moffat, B. A.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113–130 (1986).
- Swulius, M. T. & Jensen, G. J.** The helical MreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-terminal yellow fluorescent protein tag. *J Bacteriol* **194**, 6382–6386 (2012).
- Tavouli, D.** Induzierte Expression fluoreszierender KDEL-Rezeptoren in stabil transfizierten Säugerzellen (HEK-293). *Bachelor-Arbeit Universität des Saarlandes* (2015).
- Terpe, K.** Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol and Biotechnol* **60**.5 523–533 (2003).
- Thomsen, A.R.B., Hvidtfeldt, M., Bräuner-Osborne, H.** Biased agonism of the calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* **51**, 107–16 (2012).
- Thor, F., Gautschi, M., Geiger, R., Helenius, A.** Bulk flow revisited: transport of a soluble protein in the secretory pathway. *Traffic* **10**(12), 1819–1830. (2009).
- Townsley, F.M., Wilson, D.W. & Pelham, H.R.** Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J.* **12**, 2821–2829 (1993).
- Traub, L.M., Kornfeld, S.** The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr Opin Cell Biol* **9**(4), 527–533 (1997).
- Urban, J.D., Clarke, W.P., Von Zastrow, M., Nichols, D.E., Kobilka, B., Weinstein H., Javitch, J. A., Roth, B. L., Christopoulos, A., Sexton, P. M., Miller, K. J., Spedding, M., Mailman, R. B.** Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **269**, 290–6 (2007).
- Utskarpen, A., Slagsvold, H.H., Iversen, T.G., Wälchli, S. & Sandvig, K.** Transport of ricin from endosomes to the Golgi apparatus is regulated by Rab6A and Rab6A'. *Traffic* **7**, 663–672 (2006).
- van Deurs, B., Sandvig, K., Petersen, O.W., Olsnes, S., Simons, K., Griffiths, G.** Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **106**, 253–267 (1988).
- von Zastrow, M. & Sorkin, A.** Signaling on the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 436–45 (2007).
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P.** Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45–65 (2003).
- Wales, R., Roberts, L. M. & Lord, J. M.** Addition of an endoplasmic reticulum retrieval sequence to ricin A chain significantly increases its cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem* **268**, 23986–23990 (1993).
- Wang, P., Li, B., Zhou, L., Fei, E., Wang, G.** The KDEL receptor induces autophagy to promote the clearance of neurodegenerative disease-related proteins. *Neuros* **190**, 43–55 (2011).
- Wesche, J.** Retrograde transport of ricin. *Int J of Med Microbiol* **291**, 517–522 (2001).
- Wesche, J., Rapak, A., Olsnes, S.** Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Biol Chem* **274**, 34443–34449 (1999).
- Wieland, F.T., Gleason, M.L., Serafini, T.A., Rothman, J.E.** The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* **50**(2), 289–300 (1987).
- Wilson, D. W., M. J. Lewis, & H. R. B. Pelham.** pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J Biol Chem* **268**, 7465–7468 (1993).

- Worbs, S., Köhler, K., Pauly, D., Avondet, M. A., Schaer, M., Dorner, M. B., Dorner, B. G.** *Ricinus communis* intoxications in human and veterinary medicine-a summary of real cases. *Toxins* **3**(10), 1332-1372 (2011).
- Xu, G. & Shi, Y.** Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res* **17**, 759–71 (2007).
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., Rapoport, T.A.** A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**, 841–847 (2004).
- Zuidzwaard, M., de Winde, C. M., Cambi, A., van Spriel, A. B.** Microdomains in the membrane landscape shape antigen-presenting cell function. *J Leucoc Biol* **95**, 251-263 (2013).

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Nutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, 2017

(Domenik Rammo)