

**Untersuchungen zum Clustering von KDEL-Rezeptoren und deren
Transportdynamiken an der Oberfläche von Säugerzellen**

Dissertation

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

von

Master of Science

Achim Bauer

Saarbrücken

2024

Tag des Kolloquiums:	05.12.2024
Dekan:	Prof. Dr. Dirk Bähre
Berichterstatter:	Prof. Dr. Manfred J. Schmitt Prof. Dr. Uli Müller
Vorsitz:	Prof. Dr. Marc Schneider
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Mark Lommel

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen:

Bauer A, Santen L, Schmitt MJ, Shaebani MR, Becker B (2020). Cell-type-specific differences in KDEL receptor clustering in mammalian cells. *PLoS One*. 15(7):e0235864. Published 2020 Jul 9. doi:10.1371/journal.pone.0235864

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abstract	11
1. Einleitung	12
1.1. Sekretorischer „Pathway“ und gerichteter Proteintransport.....	12
1.2. KDEL-Rezeptoren.....	15
1.3. KDEL-Rezeptoren und ER-Stress.....	24
1.4. KDELR-assoziierte Erkrankungen.....	27
Ziele der Arbeit.....	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Organismen.....	31
2.1.1. Bakterien.....	31
2.1.2. Hefen.....	31
2.1.3. Säugerzellen.....	31
2.2. Kultivierung.....	33
2.2.1. Medien für Bakterien.....	33
2.2.2. Medien für Hefen.....	33
2.2.3. Medien für Säugerzellen.....	34
2.2.4. Differenzierung von Makrophagen aus THP1-Monozyten.....	36
2.2.5. Passagieren von Säugerzelllinien.....	36
2.2.6. Kryokulturen.....	36
2.2.6.1. Einfrieren von Bakterien und Hefen.....	36
2.2.6.2. Einfrieren von Säugerzellen.....	36
2.2.6.3. Auftauen von Säugerzellen.....	37
2.3. Molekularbiologische Methoden.....	37
2.3.1. Plasmide.....	37
2.3.2. Oligonukleotide.....	40
2.3.3. Synthetische Gensequenzen.....	41
2.3.3.1. Alkalische Lyse.....	42
2.3.3.2. Mini/Midi Prep.....	42
2.3.4. RNA-Isolierung aus Säugerzellen.....	43
2.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA.....	43
2.3.6. Restriktion von Plasmid-DNA.....	43
2.3.7. pYES2.1 TOPO [®] TA-Cloning.....	43

2.3.8.	Sequenzierung	44
2.3.9.	Polymerasekettenreaktion	44
2.3.10.	Agarosegelelektrophorese	45
2.3.11.	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	46
2.3.12.	Ligation und Entsalzung	46
2.3.13.	Transformationsmethoden	46
2.3.13.1.	Bakterien.....	46
2.3.13.2.	Hefen	47
2.3.13.3.	Transfektion von Säugerzellen	48
2.3.14.	Expressionsanalyse in Säugerzellen	48
2.3.14.1.	cDNA-Synthese	48
2.3.14.2.	qPCR.....	49
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	50
2.4.1.	Zellaufschlussmethoden	50
2.4.1.1.	Aufschluss von Hefezellen	50
2.4.1.2.	Aufschluss von Säugerzellen.....	51
2.4.2.	TAE-Peptide.....	51
2.4.3.	Zelloberflächen-Biotinylierung von Säugerzellen	52
2.4.4.	Proteinexpression und Aufreinigung von RTA-Varianten.....	54
2.4.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	55
2.4.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.4.7.	Western Blot-Analyse	57
2.4.8.	Coomassie-Färbung.....	59
2.5.	Hefespezifische Methoden	59
2.5.1.	Spektrometrische Zellzahlbestimmung	59
2.5.2.	Optische Zellzahlbestimmung.....	59
2.5.3.	FOA-Selektion	60
2.5.4.	Methylenblau-Agardiffusionstest.....	60
2.6.	Säugerspezifische Methoden	61
2.6.1.	Bestimmung der Zellzahl	61
2.6.2.	Bestimmung der Zellgröße.....	62
2.6.3.	Herstellung stabil transfizierter Zellen.....	62
2.6.4.	Viabilitätsbestimmung mittels XTT-Assay.....	62
2.6.5.	Indirekte Immunfluoreszenz - fixierte Präparate.....	63

2.6.6.	Indirekte Immunfluoreszenz – „Live Cell Imaging“	64
2.6.7.	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	64
3.	Ergebnisse	65
3.1.	KDEL-Clustering auf der Oberfläche verschiedener Säugerzelllinien	66
3.1.1.	Erstellung eines „Receptor Cycling“-Modells	72
3.1.2.	KDEL-Clustering in Makrophagen	79
3.1.3.	KDEL-Clustering in HAP1-Knockout-Zelllinien	83
3.1.4.	Experimente zur Charakterisierung von HAP1-Knockout-Zelllinien	89
3.1.5.	KDEL-Expression unter Stressbedingungen	92
3.2.	KDEL-Dynamik an der Zelloberfläche	96
3.2.1.	Einfluss von ER-Stress auf die Zelloberflächenlokalisierung von KDELs	101
3.2.2.	Internalisierung von KDELs nach Ligandenzugabe	103
3.3.	Einblicke in das KDEL-Interaktom: Rab-Proteine als Transportregulatoren	109
3.3.1.	Colokalisation von Rab-Proteinen und KDEL- ⁸⁷ HA ⁸⁸ -Varianten	109
3.3.2.	Colokalisation von Rab-Proteinen und KDEL-mCherry-Varianten	117
4.	Diskussion	124
	Clusterentwicklung und „Receptor Cycling“-Modell	125
	KDEL-Dynamiken unter Stressbedingungen	136
	KDEL-Transport und die Beteiligung von Rab-Proteinen	141
	Ausblick	143
	Zusammenfassung	145
	Literaturverzeichnis	148
	Danksagung	167

Abkürzungsverzeichnis

ACBD3	„acyl-coenzyme A binding domain containing 3“
AK	Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ATP	Adenosintri-phosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	„cyclic adenosine monophosphate“
cDNA	„copy DNA“
CDNF	„cerebral dopamine neurotrophic factor“
CHOP	„C/EBP homologous protein“
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
ConA	Concanavalin A
COP	„coat protein complex“
CRISPR	„clustered regularly interspaced short palindromic repeats“
Ct	„cycle threshold“
CvE	Clathrin-vermittelte Endozytose
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d/o	„drop/out“
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHB	Dreifach-Helixbündel
DMEM	„Dulbecco's modified eagle's medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	„early endosome antigen 1“

eGFP	„enhanced green fluorescence protein“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ENaCs	„epithelial sodium channel“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERD	„ER retention defective“
ERGIC	„ER-Golgi intermediate compartment“
FAK	„focal adhesion kinase“
FITC	„fluorescein isothiocyanate“
FKS	Fötales Kälberserum
FOA	5-Fluororotsäure
GAP	„GTPase activating protein“
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“
GLB	„gel loading buffer“
GPCR	„G-Protein-coupled receptor“
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GRP	„glucose regulated protein“
GTP	Guanosintriphosphat
HOPS	„homotypic fusion and protein sorting“
HRP	„horseradish peroxidase“
IF	Immunfluoreszenz
IMDM	„Iscoe's modified dulbecco's medium“
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JNKs	c-Jun-N-terminale Kinasen
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KDEL	KDEL-Rezeptor
LiAc	Lithiumacetat
LB	„lysogeny broth“
LC	„long chain“
MANF	„mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor“
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MBA	Methylenblau-Agar

MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“
MWCO	„molecular weight cut-off“
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate-buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PHB	Prohibitin
PDI	Proteindisulfidisomerase
PGK	Phosphoglyceratkinase
PKA/PKC	Proteinkinase A / Proteinkinase C
PEG	Polyethyenglykol
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	„quantitative polymerase chain reaction“
Rab	„ras-related in brain“
REP	„Rab escort proteins“
RIP	Ribosom-inaktivierendes Protein
RIPA	„radio-immunoprecipitation assay“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„revolutions per minute“
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
RTA	Rizin-Toxin A
RT-qPCR	„quantitative reverse transcription PCR“
SC	„synthetic complete“
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SED	„supressors of <i>ERD2</i> deletion“
SERCA	„sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase“
SFK	„Src-family kinase“

SNARE	„soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors“
SOC	„super optimal broth glucose“
Src	„cellular sarcoma“ Tyrosinkinase
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	„tris-buffered saline“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TIDeRs	„traffic-induced degradation response for secretion“
TM	Transmembran
TMD	Transmembrandomäne
TOG	„transporter-opsin-G protein-coupled receptor“
SWEET	„sugars will eventually be exported transporter“
U	“unit”
UPR	„unfolded protein response“
UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“
WT	Wildtyp
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)- 2 <i>H</i> -tetrazoliumhydroxid
YNB	„yeast nitrogen base“

Abstract

The retention of a subset of soluble ER-resident proteins is a well-known function of KDEL receptors (KDELRs). A fraction of KDELRs is also localized on the surface of yeast and mammalian cells, where the receptors can bind and internalize extracellular ligands. Thereby, KDELRs undergo a dynamic clustering process, which is investigated in this work by using a fluorescent KDELR model ligand on human and murine cell lines *via* live cell imaging. While particular differences could be observed in several cell types, macrophages of both species did not show any cluster formation. A mathematical model was established to describe the relationship between KDELR internalization and recycling that allows cluster formation. Additionally, the role of KDELR subtypes was further addressed in respective knockout cell lines as well as RT-qPCR based expression analyses without finding a clear relationship between the clustering process and single KDELR subtypes. Furthermore, stably transfected cell lines facilitated a first insight into the dynamics of KDELRs on cell surfaces in an immunolabeling approach. To depuzzle the complex transport related KDELR interactome, intensive colocalization studies with eGFP labeled Rab proteins and KDELR variants were performed, giving first hints towards diverse transport regulations of these fascinating receptors.

Die Hauptfunktion von KDEL-Rezeptoren (KDELRs) liegt in der Retention löslicher ER-residenter Proteine. Ein Teil der KDELRs ist jedoch an der Plasmamembran von Hefe- und Säugerzellen lokalisiert, wo die Rezeptoren extrazelluläre Liganden binden und internalisieren können. Hierbei vollziehen sie einen dynamischen Clusteringprozess, welcher in dieser Arbeit mit Hilfe fluoreszierender Rezeptor-Liganden in humanen und murinen Zelllinien mittels „Live Cell Imaging“ untersucht wurde. Dadurch konnten zelltypspezifische Unterschiede detektiert und ein Modell etabliert werden, welches den Zusammenhang zwischen Clusterentwicklung und KDELR-Internalisierung bzw. -Recycling beschreibt. Zusätzlich zeigten weder Untersuchungen von KDELR-Knockout-Zelllinien noch RT-qPCR-basierte Expressionsanalysen eine Korrelation zwischen Clusterentstehung und Expression einzelner KDELR-Subtypen. Des Weiteren konnten Immunfluoreszenzstudien mit stabil transfizierten Säugerzellen erste Einblicke in die KDELR-Oberflächendynamik in einem antikörperbasierten System vermitteln. Darüber hinaus wurden potenzielle Transportinteraktionen von allen KDELR-Subtypen in Colokalisationsstudien mit eGFP-markierten Rab-Proteinen beobachtet und so erste Hinweise auf das komplexe Interaktom dieser faszinierenden Rezeptoren gewonnen.

1. Einleitung

Im Laufe der Evolution entwickelten sich aus primitiveren Vorläuferzellen die ersten eukaryonten Zellen. Damit einhergehend entstanden immer komplexere zelluläre Strukturen, welche durch Membranen voneinander getrennt sind und so Reaktionsräume mit spezifischen chemischen Eigenschaften definieren könnten. Diese abgetrennten Einheiten werden als Organellen bezeichnet und unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften, sondern bilden zusätzlich durch individuelle Proteinzusammensetzungen eine Grundlage für die jeweilige komplexe Funktionalität. Hierbei erlaubt die Spezifität jedes einzelnen Kompartiments eine derartige Zusammenarbeit von Molekülen, die nur so die Evolution, ausgehend von simplen Nukleinsäuresträngen hin zu komplexen lebendigen Strukturen, ermöglichte.

1.1. Sekretorischer „Pathway“ und gerichteter Proteintransport

Der eukaryote Sekretionsweg umfasst das Zusammenspiel nahezu aller Zellorganellen und einer komplexen Proteinmaschinerie. Hierfür ist, neben der korrekten Synthese und Reifung der Proteine in ER und Golgi, der präzise zielgerichtete Weitertransport zum Organell unabdingbar. Nahezu ein Drittel des gesamten Proteoms durchläuft den kompletten sekretorischen „Pathway“ und wird sezerniert oder im Fall von Membranproteinen bis in die äußerste Zellperipherie transportiert (Barlowe & Miller, 2013). Einen zentralen Anteil stellt dabei der Vesikel-basierte Proteintransport dar. Hierbei werden zu transportierende Proteine oder Bestandteile mithilfe einer äußerst komplexen und vielfältigen Proteinmaschinerie in Membranen verpackt, mit charakteristischen Hüllproteinen versehen und dann gerichtet entlang des Zytoskeletts zum Zielort transportiert. Die Hüllproteine unterstützen nicht nur die Bildung und Stabilität der Vesikel, sondern definieren auch deren Transportrichtung und die Interaktion mit dem Zytoskelett und verschiedenen Motorproteinen (Schu, 2001).

Der intrazelluläre Proteintransport kann hierbei in vier grundlegende Abschnitte unterteilt werden: Die Bildung des Vesikels, den Transport entlang des Zytoskeletts, das Andocken an die Zielmembran und schließlich die Verschmelzung mit dieser. All diese Teilschritte benötigen Kontrollinstanzen, welche die zeitliche und räumliche Rekrutierung der beteiligten Proteine regulieren und beständig koordinieren. Einen der wichtigsten Bestandteile dieser Koordination sind die „Ras related in brain“ (Rab)-Proteine. Rabs gelten als „Master Regulatoren“ des intrazellulären Vesikeltransports und bilden die größte Familie monomerer GTPasen (Hutagalung & Novick, 2011). Strukturell stellen sie prenylverankerte, periphere Membranproteine dar, welche prominent ins Zytosol ragen (Pylypenko *et al.*, 2018). In Hefe konnten bisher elf Proteine beschrieben werden, deren Funktionen größtenteils homolog zu

den Funktionen der Säuger-Rabs sind und die eine hohe Konservierung auch über weitere Speziesgrenzen hinweg aufzeigen (Li & Marlin, 2015). Im Menschen können bis dato mindestens 66 Rab-Proteine differenziert werden, was auf eine höhere funktionelle Spezifität und Anpassung an kompliziertere Zellmechanismen und Transportwege hindeutet (Diekmann *et al.*, 2011; Klöpffer *et al.*, 2012; Li & Marlin, 2015). Rabs regulieren den Membran- und Proteinfluss, indem sie sowohl die Herkunft als auch den Zielort des Cargos definieren, die Richtung des Vesikeltransports angeben und die Verschmelzung der Vesikel mit der Zielmembran initiieren (Segev, 2001; Stenmark, 2009). Zusammen mit ihren Effektoren und Regulatoren sind sie an allen Vorgängen des Vesikeltransports beteiligt und in der Lage, gezielte Transportvorgänge zwischen Organellen zu organisieren, zu kontrollieren und zu diversen Zeitpunkten an- bzw. abzuschalten (Hutagalung & Novick, 2011). Die Aktivität von Rab-Proteinen wird dabei durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität gesteuert, indem sie durch Anwesenheit von GTP zeitlich begrenzt eine aktive Form einnehmen (Pfeffer & Aivazian, 2004; Barr & Lambright, 2010). Katalysiert wird der GDP/GTP-Austausch durch Rab-spezifische GEF-Effektorproteine an der Donormembran: Diese binden in der „switch“-Region von Rab-Proteinen und setzen das dort lokalisierte GDP frei, woraufhin zytosolisches GTP binden kann und die Rabs so in eine aktive Form überführt (Segev, 2001). Nach erfolgtem Transport und Fusion des Vesikels mit der Zielmembran werden Rabs durch GTP-Hydrolyse deaktiviert und der Rücktransport durch das Zytosol eingeleitet. Die GTP-Hydrolyse wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) unterstützt (Lamber *et al.*, 2019). Der nun inaktive Status wird weiterhin durch „Rab GDP dissociation inhibitors“ (GDIs) und „Rab escort proteins“ (REPs) feinreguliert bzw. erhalten (Stenmark, 2009; Müller & Goody, 2018). Nach erfolgtem Rücktransport werden die jeweiligen Rab-Proteine wieder über einen Prenylanker in die Membran inseriert (Hutagalung & Novick, 2011).

Für ein zielgerichtetes Vesikeltargeting ist die Verschmelzung mit der korrekten Membran essenziell und unterliegt daher entsprechenden Kontrollmechanismen. SNARE-Komplexe („soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor“) spielen bei der direkten Verschmelzung als wichtiger Teil des Fusionsapparates der Membranen eine entscheidende Rolle: Die SNAREs an Vesikeln (v-SNAREs) sowie an der Zielmembran (t-SNAREs) sind kompartimentspezifisch aus verschiedenen membranverankerten Proteinen zusammengesetzt und definieren somit durch ihre Zusammensetzung, dass nur bestimmte Membranabschnitte miteinander fusionieren können (Jahn & Scheller, 2006). Kommt es durch passende Proteinzusammensetzung zur Ausbildung eines SNARE-Komplexes, erlaubt dieser robuste Komplex die Überwindung der notwendigen Energiebarriere zur Membranfusion (Weber *et*

al., 1998; Brunger *et al.*, 2015). Während der räumlichen Annäherung von Membranen sind Rab-Proteine mit als Erstes in den Prozess des „tethering“ involviert und bilden zusammen mit ihren Effektorproteinen eine Kontrollinstanz während aller Teilschritte der Fusion (Zerial & McBride, 2001).

Initiiert wird der Proteintransport über das Präsentieren eines spezifischen Signals. Dies kann im Falle membranständiger Proteine über einen zum Zytosol hin exponierten Bestandteil der Aminosäurekette stattfinden, während lösliche Proteine indirekt über Interaktionspartner wie Rezeptoren das Transportsignal über Membrangrenzen hinweg weiterleiten (Letourneur *et al.*, 1994; Mizuno & Singer, 1993; Balch *et al.*, 1994; Gomez-Navarro & Miller, 2016). Evolutionär entwickelte sich eine große Anzahl an Rezeptortypen mit unterschiedlichsten Funktionen und Interaktionspartnern. Die Spanne der möglichen Liganden umfasst Ionen, Hormone und Neurotransmitter bis hin zu einfachen Proteinen oder komplexeren Proteinmultimeren. Hierbei bestimmen sowohl das durch den Rezeptor gebundene Molekül als auch der Rezeptor selbst, wie das Signal verarbeitet wird, was eine außerordentlich spezifische und feinregulierte Antwort ermöglicht. Die zellulären Reaktionen reichen von simplen Reizantworten über Initiierung von biochemischen Signalkaskaden bis hin zur Anpassung der Genexpression oder sogar zur Apoptose (Yeagle, 2016). So kann bspw. auch ein extrazellulärer Stimulus in die Zelle übertragen werden und dort eine adäquate Reaktion hervorrufen. Neben der reinen Signalweiterleitung können Rezeptoren als Modulatoren bzw. Regulatoren auch nachfolgende Signalwege beeinflussen. Hierbei ist eine positive Modifikation, genauer gesagt eine Aktivierung oder Verstärkung, aber auch eine Inhibition oder Herunterregulierung der Signalwege möglich. Ebenso können Rezeptoren genutzt werden, um etwa Proteine oder Botenstoffe über die Membran hinweg zu transportieren, indem diese ihre Agonisten binden und anschließend den Transport einleiten. In der vorliegenden Arbeit spielen eine bestimmte Klasse löslicher Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) als Agonisten für Rezeptoren eine zentrale Rolle.

Diese ER-residenten Proteine sind, in Diskrepanz zu ihrem Namen, nicht dauerhaft im ER lokalisiert, sondern unterliegen aufgrund der ausgeprägten dynamischen Transportcharakteristik des ER einem ständigen Rückführungsmechanismus. Dieser Proteingruppe konnten eigenständige luminalen Aminosäuremerkmale zugeschrieben werden, die eine erfolgreiche Rückführung dieser Proteine aus dem sekretorischen „Pathway“ zurück ins ER vermitteln: ER-residente Typ1-Transmembranproteine besitzen übereinstimmend ein di-Lysin-Motiv (KKXX), welches mit COPI-Coatome-Bestandteilen interagieren kann, während lösliche Proteine über ein C-terminales KDEL-ähnliches Aminosäuremotiv

verfügen, welches einen rezeptorvermittelten Transport ermöglicht (Jackson *et al.*, 1990; Munro & Pelham, 1987; Pelham, 1990). Prominente Beispiele hierfür stellen etwa die Chaperone BiP („binding protein“), Endoplasmic reticulum chaperone („glucose regulated protein 94“) oder verschiedene Proteindisulfidisomerasen (PDIs) dar (Munro & Pelham, 1987). Dass dieses Motiv tatsächlich für eine Rückführung verantwortlich ist, konnte durch das Anfügen einer C-terminalen HDEL-Sequenz an das nicht ER-residente Lysozym und dessen erfolgreiche Retention bewiesen werden (Munro & Pelham, 1987). Golgi-spezifische Modifikationen an N- bzw. O-glykosylierten Seitenketten zeigen zudem, dass eine Rückführung nativer ER-residenter Proteine hauptsächlich aus frühen *cis*-Golgi Kompartimenten heraus erfolgt, wobei auch die Rückführung aus späteren Abschnitten des sekretorischen „Pathways“ beobachtet wurde (Pelham, 1988; Pelham *et al.*, 1988; Dean & Pelham, 1990; Griffiths *et al.*, 1994). Eine detailliertere Aufklärung beteiligter Komponenten dieses Retentionsmechanismus erfolgte durch die Erzeugung von Hefemutanten, bei denen sich die Gene *ERD1* und *ERD2* („ER-retention defective“) als essenziell für eine erfolgreiche Rückhaltung löslicher ER-residenter Proteine zeigten (Hardwick *et al.*, 1990). Während eine Deletion von *ERD1* zwar zu einer verstärkten Sezernierung von nativen und artifiziellen ER-residenten Proteinen führte, zeigte die Deletion von *ERD2* einen letalen Phänotyp (Hardwick *et al.*, 1990). *ERD2* kodiert für ein etwa 26 kDa großes Membranprotein in den Membranen des ER und Golgi, dessen Expressionsstärke direkt mit der Rückhaltung HDEL-tragender, ER-residenter Proteine korreliert (Semenza *et al.*, 1990). Dieser Transmembranrezeptor wird Erd2p, oder, aufgrund seines in Hefe präferierten Bindemotives, HDEL-Rezeptor genannt.

1.2. KDEL-Rezeptoren

Schon früh konnte vermutet werden, dass Erd2p eine weitreichendere Rolle zusätzlich zu einer reinen Retentionsvermittlung einnimmt, denn *ERD2*-Deletionsmutanten wiesen Defekte im sekretorischen „Pathway“ auf und zeigten Akkumulationen von intrazellulären Membranen (Semenza *et al.*, 1990). Zwischen der ER-Retention, dem ER-Golgi Membrantransport sowie der anterograden Proteinsezernierung muss es also eine regulatorische Verbindung des Membranflusses geben, die durch Erd2p dargestellt werden könnte. Die komplexe zelluläre Bedeutung von Erd2p bezüglich der Retention und Organisation des Membranflusses wurde in einem „supressor screening“ deutlich, bei dem sechs Gene identifiziert werden konnten, die eine *ERD2*-Deletion zumindest teilweise kompensierten (Hardwick *et al.*, 1992). Hierbei traten zumeist deutliche Wachstumsdefekte sowie abnorme intrazelluläre Membrankonzentrationen auf, die auf eine übergeordnete Orchestrationsfunktion von Erd2p hindeuten könnten. Der zugrundeliegende

Kompensationsmechanismus ist nicht für alle SED-Gene („supressors of *ERD2* deletion“) direkt ersichtlich, jedoch sind die Genprodukte von *SED2*, *SED4* und *SED5* direkt in ER-Golgi-Transportprozesse involviert (Barlowe & Schekman, 1993; Gimeno *et al.*, 1995; Hardwick & Pelham, 1992).

Als humane Erd2p-Homologe konnten zunächst Erd2.1 bzw. Erd2.2 identifiziert werden (Lewis & Pelham, 1990; Lewis & Pelham, 1992b; Hsu *et al.*, 1992). Das Genom- und ORFeome-Projekt identifizierte dann abschließend Erd2.3 als drittes Erd2p-Homolog (Collins *et al.*, 2004). Im Gegensatz zum hefespezifischen HDEL-Rezeptor zeichnen sich die drei humanen KDELR-Varianten durch die Präferenz von Lysin im Retentionsmotiv aus, sodass diese auch als KDEL-Rezeptoren bzw. KDELR1-3 bezeichnet werden (Capitani & Sallese, 2009). Diese Rezeptoren zeigen sich spezieübergreifend als stark konservierte Proteinklasse, so dass auch in Modellorganismen wie etwa *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* homologe Rezeptoren identifiziert werden konnten (Xu *et al.*, 2012; Mathews *et al.*, 2021; Abrams *et al.*, 2013). Die Bedeutung dieser Proteine spiegelt sich auch im Ausmaß der zellulären Organisationskomplexität in höheren Organismen wider, so dass es in diversen Organismen zu einer Verdreifachung und evolutionären Konservierung des Ursprungsgens kam (Cela *et al.*, 2022; Capitani & Sallese, 2009).

Lange Zeit konnte über den strukturellen Aufbau der KDELRs keine exakte Aussage getroffen werden, so dass durchaus kontroverse Vermutungen über die Topologie der drei KDELRs und des HDEL-Rezeptors diskutiert wurden. Basierend auf den chemischen Eigenschaften der Aminosäureabfolge wurde eine Struktur mit sieben integralen Transmembrandomänen (TMD) als wahrscheinlichstes Modell akzeptiert, bei dem der N-Terminus im Lumen des ER liegt, während der C-Terminus ins Zytoplasma ragt (Scheel & Pelham, 1998; Townsley *et al.*, 1993). Final bestätigt wurde diese Theorie mit einer erfolgreichen Analyse der Kristallstruktur des KDELR2 von *Gallus gallus* (*G. gallus*) sowohl in Holo- als auch in Apo-Form (Abbildung 1) (Bräuer *et al.*, 2019; Wu & Rapoport, 2021). Hierbei konnte ein hexagonaler, fassähnlicher Grundaufbau des KDELR2 mit sieben TMD bestätigt werden (Bräuer *et al.*, 2019).

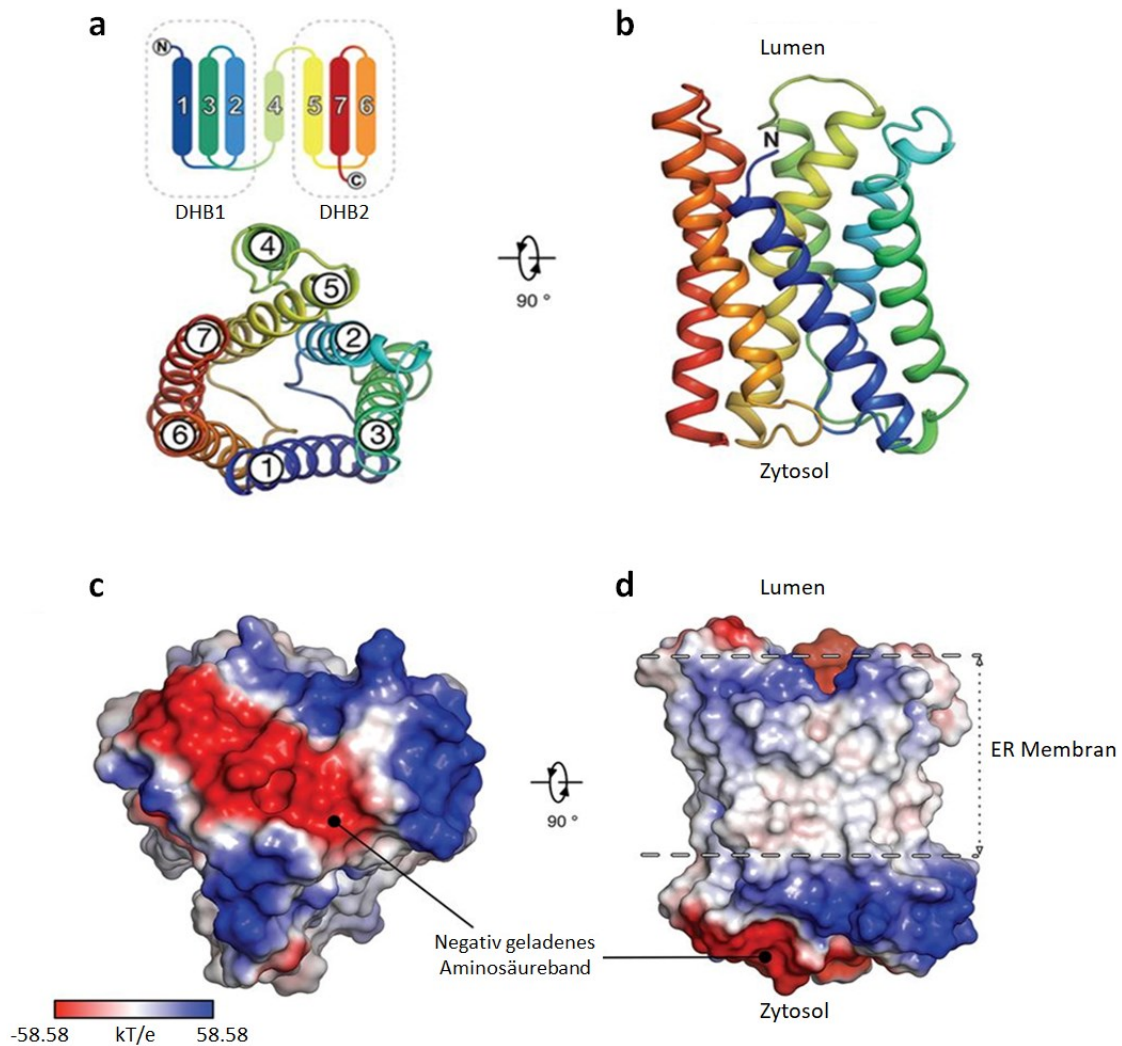


Abbildung 1: Schematische Abbildungen und Kristallstruktur von KDELR2 aus *Gallus gallus*.

a) Dargestellt sind die beiden Dreifachhelixbündel (DHB1, DHB2) in ihrer 3+1+3 Konformation sowie die luminalen Betrachtung der KDELR2-Topologie mit analog nummerierten Transmembranhelices. b) Eine um 90° gedrehte dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur. c) Verteilung der elektrostatischen Oberflächenladung. In Rot ist das negativ geladene Band aus dipolaren Aminosäuren auf luminaler Rezeptorseite gezeigt, in Blau die weniger negativen Bereiche. d) Eine um 90° gedrehte Darstellung, mit gestrichelter Markierung des in die ER-Membran eingebetteten hydrophoben Rezeptorbereichs.

[Abbildung verändert nach Bräuer *et al.*, 2019]

Die detaillierte Aufklärung der dreidimensionalen KDELR2-Struktur lässt nun auch genauere Rückschlüsse auf die Verwandtschaft und phylogenetische Einteilung der KDELRs zu: Analysen des molekularen Aufbaus und der Struktur zeigen eine Zugehörigkeit der drei KDELRs zur „transporter-opsin G-protein-coupled receptor“ (TOG) Superfamilie (Yee *et al.*, 2013; Medrano-Soto *et al.*, 2020). Diese funktional vielfältige Proteinfamilie beinhaltet membranständige Proteine wie Kanäle, Transporter und diverse Rezeptoren, welche eine Struktur von sieben oder acht α -helikalen Transmembransegmenten aufweisen. Die Entwicklung dieser Strukturen ist vermutlich auf eine Genduplikation eines gemeinsamen, vier Transmembransegmente umfassenden Vorläufers zurückzuführen, wobei eine oder auch

teilweise mehrere Transmembrandomänen evolutionär verloren gingen und fortan unabhängige Mutationen in den Helixbündeln erlauben (Yee *et al.*, 2013).

Übereinstimmend mit anderen Transmembranproteinen dieser Unterklassen zeigen KDELRs eine 3+1+3 TM-Struktur, wobei die Domänen 1-3 sowie 5-7 ein Homodimer aus zwei dreifach-Helixbündeln bilden, während TMD4 eine Verbindung dieser darstellt (Bräuer *et al.*, 2019; Wu & Rapoport, 2021; Medrano-Soto *et al.*, 2020). Hierbei zeigen phylogenetische Vergleiche, dass die Struktur der KDELRs mit den TMD2-8 der TOG-Superfamilie übereinstimmt, so dass ein Verlust der N-terminalen TMD in der Entwicklungsgeschichte der KDELRs nahe liegt. Hierdurch ergibt sich eine starke Ähnlichkeit zu SWEET-Proteinen („sugars will eventually be exported transporter“), welche 7-TMD-Transporter der TOG-Familie darstellen (Yee *et al.*, 2013; Newstead & Barr, 2020; Chen *et al.*, 2010). Diese Transporter sind hauptsächlich im Golgi sowie der PM lokalisiert und in Eukaryonten in einer 3+1+3 TMD-Struktur organisiert. Bakterielle semiSWEETs hingegen bilden ein funktionelles Dimer aus zwei Dreifachhelixbündeln ohne eine verbindende Inversions-Helix. SemiSWEETs verfügen über jeweils einen PQ-Loop in TMD 1/2, wobei KDELRs durch den evolutionären Verlust der N-terminalen TMD nur ein einziges PQ-Motiv in TMD 5/6 aufweisen (Abbildung 2) (Newstead & Barr, 2020; Chen *et al.*, 2010; Saudek, 2012; Yee *et al.*, 2013).

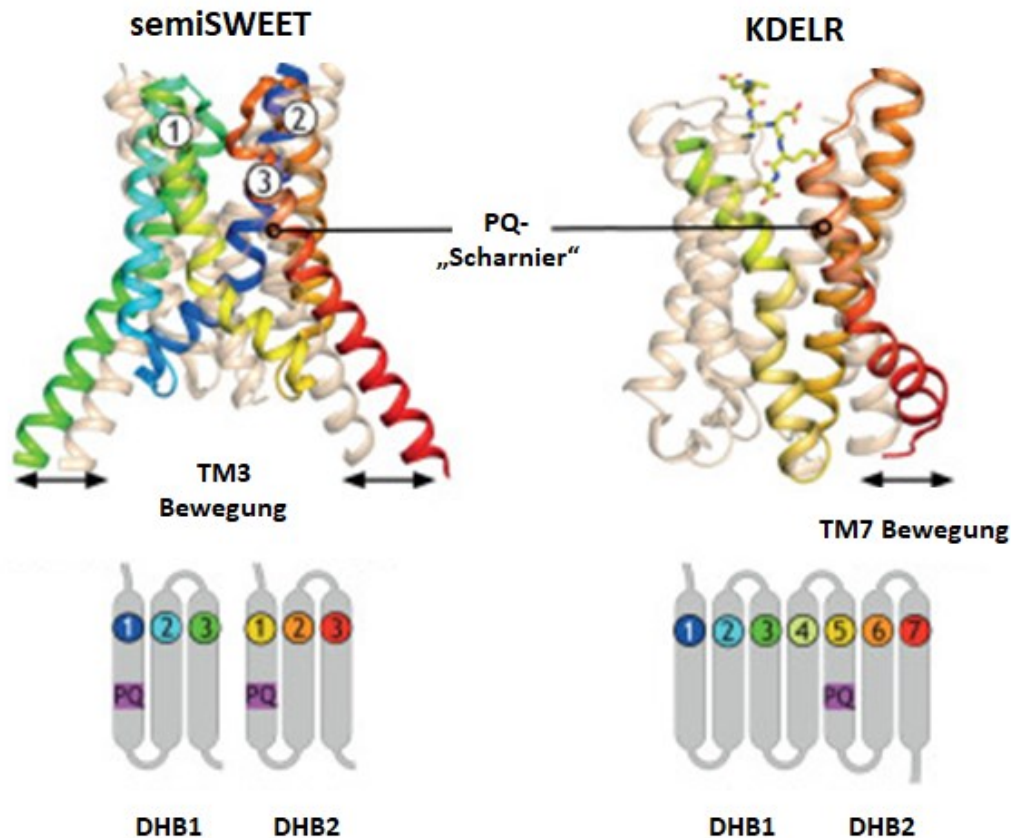


Abbildung 2: Dreidimensionale Darstellung von semiSWEET- und KDELR-Sekundärstrukturen.

Das PQ-Aminosäuremotiv in bakteriellen semiSWEETs ist jeweils in der ersten TM beider Dreifach-Helixbündel (DHB) lokalisiert. Dort nimmt es die Funktion als Helixbrecher, also eine Art symmetrisches „Scharnier“ ein, welches dem Protein eine gewisse Flexibilität verleiht und Transportvorgänge erlaubt. KDELRs hingegen besitzen lediglich noch ein PQ-Motiv in TM5 im zweiten DHB, wodurch diese nach Ligandenbindung nur eine halbe „Transporterbewegung“ durchführen können und stattdessen den Liganden fixieren. Dies führt zeitgleich zur Exposition von TM7 auf zytoplasmatischer Seite und Exposition des Di-Lysin Motivs der KDELRs.

[Abbildung verändert nach Newstead & Barr, 2020]

Funktionell nehmen die PQ-Motive eine wichtige Rolle in der intramolekularen Transportdynamik von SWEETs ein: SWEETs und andere Transporter verfügen über eine zentrale Molekülbindestelle und beidseitig über „Gates“, welche einen unkontrollierten Transport durch die Membran verhindern (Jardetzky, 1966). Hierbei unterbrechen PQ-Motive die rigide Struktur der Transmembranhelixbündel und erhöhen so ihre Dynamik, wodurch ein flexibles Zusammenspiel der Helixbündel ermöglicht wird. Durch das Fehlen des ersten PQ-Loops können KDELRs jedoch keine komplette Umstrukturierung durchführen, sondern durchlaufen mit den TM5-7 nur eine „halbe“ Bewegung nach Ligandenbindung, wodurch evolutionär die eigentliche Transporterfunktion verloren ging und sich KDELRs zu deutlich komplexeren Rezeptoren mit simultaner Transport- sowie Signaltransduktionsfunktion entwickelten (Bräuer *et al.*, 2019; Newstead & Barr, 2020).

Die zytosolische Seite eines KDEL-R wird dominiert durch saure Aminosäurereste (Asp⁸⁷, Glu¹⁴³, Glu¹⁴⁵), welche für die Stabilität der integralen Struktur von entscheidender Bedeutung sind und zudem ein negativ geladenes Aminosäureband bilden, welches Ähnlichkeiten zu potenziellen COPII-Bindemotiven aufweist (Bräuer *et al.*, 2019; Nishimura & Balch, 1997).

Der stark hydrophobe Intermembranraum ist im Durchmesser schmäler als der zytosolische sowie luminal exponierte Rezeptorbereich, wodurch sich ein leicht sanduhrförmiger Rezeptorquerschnitt ergibt. Die Distanz des Intermembranraums ist an der dicksten Stelle nur etwa 27 Ångström (Å) lang und entspricht somit den geringeren Membrandicken von ER und Golgi, den Hauptlokalisationsorten der KDEL-Rs (Sharpe *et al.*, 2010; Wu & Rapoport, 2021; Griffiths *et al.*, 1994). Luminal befindet sich eine polare 13x15x12 Å große Einbuchtung, welche die Bindetasche darstellt (Bräuer *et al.*, 2019; Majoul *et al.*, 2001). Die Selektivität der KDEL-Rs bezüglich ihrer Liganden ist im Aufbau dieser Bindetasche begründet und nimmt hierdurch einen erheblichen Einfluss auf die zu transportierenden Proteine und dementsprechend auch auf die aktivierten Signalwege der KDEL-Rs.

Generell sind KDEL-Rs in der Lage, eine Vielzahl von Aminosäuremotiven zu erkennen, wobei sich Präferenzen zu unterschiedlichen Motiven ableiten lassen: so transportiert KDEL-R1 verstärkt Liganden mit KDEL-Motiven, während KDEL-R2 eher HXEL und KDEL-R3 vermehrt HDEL-Motive präferieren (Hulo *et al.*, 2006; Raykhel *et al.*, 2007). Auch wenn es gewisse Spielräume bezüglich des molekularen Aufbaus des Retentionsmotivs, auch über die vier Aminosäuren hinaus zu geben scheint, stellen KDEL-Rezeptoren äußerst präzise Sensoren ihrer Liganden dar (Alanen *et al.*, 2011). Hierbei dient Position -4 des Retentionsmotivs (vorzugsweise H, K bzw. R) als „proofreading“-Aminosäure, welche ladungsabhängig während der Bindungsinitiation durch ihre räumliche Nähe zu den Rezeptoraminosäuren Glu¹¹⁷ und Asp⁵⁰ den Eintritt in die Bindetasche bestimmt (Gerondopoulos *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2024).

Schon seit Langem ist bekannt, dass die Interaktion von Liganden mit H/KDEL-Rezeptoren einem pH-Einfluss unterliegt. Im leicht sauren Milieu des Golgi herrscht eine besonders hohe Bindeaffinität zum Liganden vor, während diese bei neutraleren pH-Werten des ER schwächer wird und zur Dissoziation des Liganden/Rezeptor-Komplexes führt (Wilson *et al.*, 1993). Dieser Mechanismus konnte auf molekularer Ebene näher aufgeklärt werden: Der Eintritt eines Bindemotivs in das Innere der fassähnlichen Rezeptorstruktur führt zur Ausbildung diverser Salzbrücken, die das Peptid in der Bindetasche verankern und die Konformationsänderung des Rezeptors stabilisieren. Hierbei ist vor allem eine ungewöhnlich kurze Wasserstoffbrückenbindung, welche auf dem Protonierungszustand von His¹² beruht,

von entscheidender Bedeutung für das finale Verankern des Liganden (Abbildung 3) (Gerondopoulos *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2024).

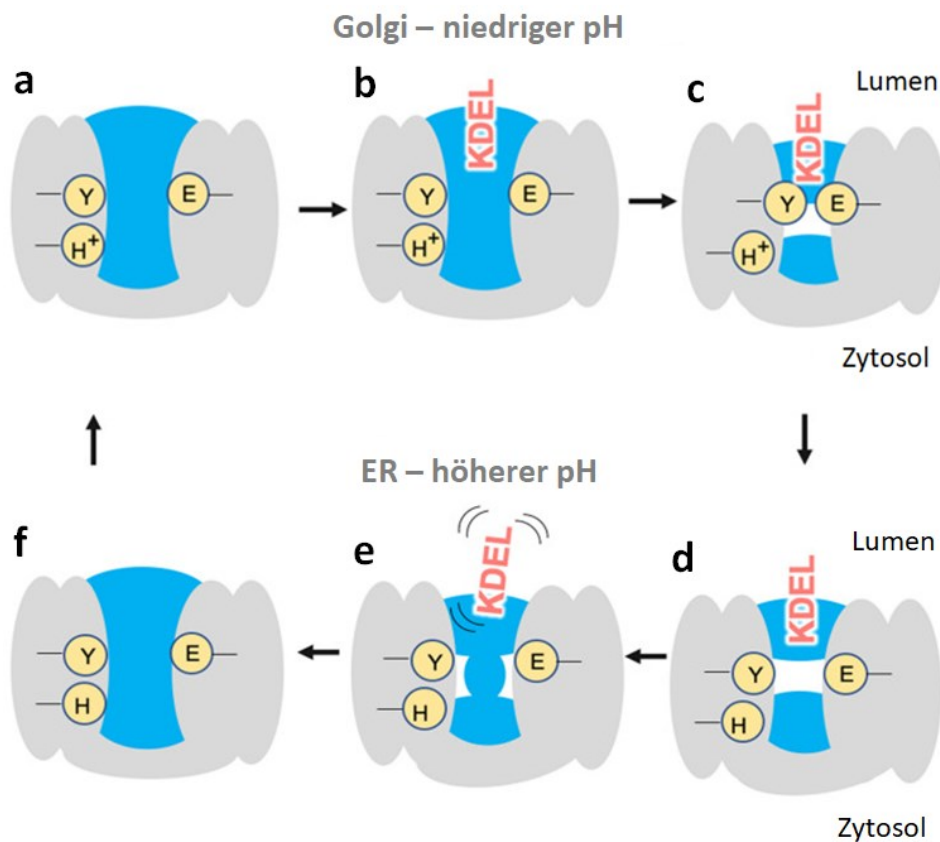


Abbildung 3: Schematische Darstellung der pH-abhängigen KDELR/Liganden-Interaktion im ER und der Dissoziation im Golgi.

a) Gezeigt ist der Apo-Zustand eines KDELR. His¹² liegt protoniert vor (H⁺) und es befindet sich ein kontinuierliches Netzwerk aus Wassermolekülen in der Rezeptorbindetasche. b) Bei Eintritt eines Liganden werden Wassermoleküle im Inneren des Rezeptors blockiert und tiefer in den Rezeptor gedrückt. c) Bei Voranschreiten der Bindung wird so eine Konformationsänderung des Rezeptors forciert, wodurch der Transport in das ER eingeleitet wird. Dies erlaubt die damit einhergehende Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und schneidet Wassermoleküle komplett vom Lumen ab. d) Im ER deprotoniert H¹² und erniedrigt die Stabilität der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen E¹²⁷ und Y¹⁵⁸. e) Die Ligandenbindung wird somit ebenfalls destabilisiert und die Dissoziation beginnt. f) Dies begünstigt die Wiederherstellung des Wassernetzwerkes im Rezeptor und erlaubt eine simultane Restrukturierung des Rezeptors zum Apo-Zustand, wodurch der Transport hin zum Golgi initiiert werden kann.

[Abbildung verändert nach Wu *et al.*, 2020]

Auf luminaler Seite kommt es durch den Ligandeneintritt zu einer Bewegung von TM1, welche das Zentrum des Rezeptors etwas weitet und den tiefen Eintritt des Peptid-Leucins erlaubt. Zeitgleich entsteht die Möglichkeit, dass Arg⁵ (TM1) mit der Carboxylgruppe des Peptides interagieren kann und eine Salzbrücke mit dem Peptid-Glutamat formt. Des Weiteren werden eine Salzbrücke mit Arg¹⁶⁹ (TM6) und eine Wasserstoffbrückenbindung mit Trp¹⁶⁶ geformt, wodurch das Peptid stabilisiert wird. Durch diese Konformationsänderung

wird zusätzlich die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung bei Tyr¹⁵⁸ (TM6) und Glu¹²⁷ (TM5) gefestigt und somit ein Entkoppeln des Peptides aus der Bindetasche verhindert. Die finale Umstrukturierung wird mit der besonders kurzen Wasserstoffbrückenbindung des protonierten His¹² realisiert, welche abermals die Stabilisierung des Peptids mit TM6 in der Bindetasche verstärkt. Im protonierten Zustand werden etwa 57 kcal/mol Energie mehr benötigt, um vom Holo- in den Apo-Status zu wechseln (Wu *et al.*, 2020; Gerondopoulos *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2024). Die Bewegung von TM6 und TM7 führt hierbei zu einer Änderung der dreidimensionalen Struktur auf zytosolischer Seite: Ein Teil von TM6 rotiert zum Rezeptorzentrum hin und TM7 bewegt sich um etwa 14 Å in Richtung TM5, wodurch zuvor im Rezeptor verborgene Bereiche von TM7 exponiert werden. Hier strecken sich Lys²⁰¹, Lys²⁰⁴ und Lys²⁰⁶ ins Zytoplasma und bilden somit als basische Aminosäuren eine potenzielle COPI-Bindestelle in Form eines klassischen Di-Lysin-Motivs (Bräuer *et al.*, 2019; Letourneur *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 2012). Durch einen pH-Anstieg nach erfolgtem Transport ins ER wird His¹² deprotoniert und die verkürzte H⁺-Bindung kann nicht aufrechterhalten werden, wodurch der Ligand seine erhöhte Affinität zur Bindetasche verliert und letztendlich in das ER-Lumen entlassen wird (Gerondopoulos *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2024). Abgesehen von dieser reinen Transportfunktion sind KDELRs durch Assoziation mit G-Proteinen in der Lage, Signalketten für nachfolgende Kinasen zu initiieren und zu regulieren (Abbildung 4) (Rosenbaum *et al.*, 2009; Gianotta *et al.*, 2012; Solis *et al.*, 2017; Cancino *et al.*, 2014).

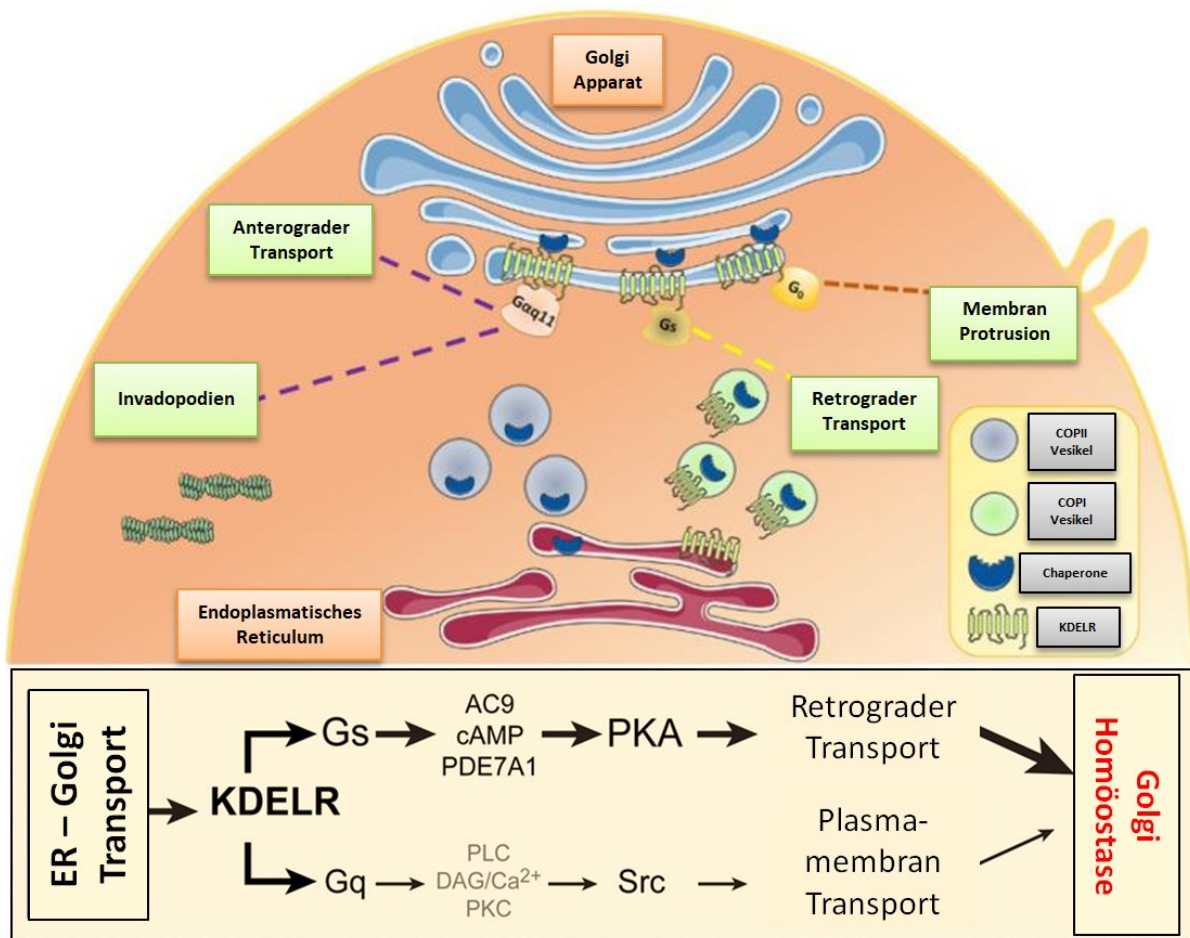


Abbildung 4: Schematische Übersicht der Modulation von Transportvorgängen durch KDEL-R-Aktivierung.

Die intrazelluläre Homöostase wird nach Ligandenbindung durch Aktivierung von KDEL-R-assoziierten G-Proteinen feinjustiert, wobei Membranströme zentral vom Golgi aus kontrolliert werden. Der retrograde Transport wird unter anderem durch Phosphorylierung und nachfolgende Rekrutierung der Transportmaschinerie über eine cAMP-abhängige PKA-Aktivierung verstärkt. Beim anterograden Transport wird der Membranfluss über den Gq-Src Signalweg kontrolliert, wobei dieser auch mit der Bildung von Invaspodien in Zusammenhang gebracht wird. Zudem können über $G\alpha_0$ vermehrt Ausstülpungen der Membran initiiert werden.

[Abbildung verändert nach Cela *et al.*, 2022; Cancino *et al.*, 2014]

Interagiert im Golgi ein Ligand mit einem KDEL-R, erfolgt eine Aktivierung der G-Protein-Untereinheit $G\alpha_q/11$ und Src, was zur Initiation von verstärkten intra-Golgi- und post-Golgi-Transportprozessen führt. Diese Initiierung basiert auf der Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und den daraufhin gebildeten „second messenger“ Molekülen der Inositol-Familie (IP₃, Inositol-triphosphat) und Diacylglycerol (DAG) (Pulvirenti *et al.*, 2008; Gianotta *et al.*, 2012). Diese Signalkette rekrutiert Proteinkinase C (PKC) an Membranen und führt letztendlich zu einer lokalen Aktivierung von Src-Kinasen. Nachfolgende Prozesse werden nun durch Aktivierung von cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren kontrolliert, welche die

Expression transportassoziierter Gene aktivieren und so den Membranstrom feinjustieren (De Matteis *et al.*, 1993).

KDELRs sind des Weiteren durch Kopplung an Gas dazu in der Lage, modulativ durch die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) in anterograde Transportprozesse einzugreifen. Durch Ligandenbindung an KDELRs wird, über den GDP/GTP- „Switch“ an Gas und die darauffolgende Aktivierung der Adenylylzyklase 9 (AC9) ein Phosphodiesterase- (PDE7A1) und cAMP-abhängiger Signalweg initiiert. Dies führt zur Aktivierung der PKA und u.a. des Transkriptionsfaktors CREB1, was wiederum zu verstärkten Golgi-ER-Transportprozessen führt. So wird durch die Transkriptionskontrolle in den retrograden Proteintransport eingegriffen und zur homöostatischen Regulation der Transportflüsse beigetragen (Martin *et al.*, 2000; Cancino *et al.*, 2014). Interessanterweise konnte zusätzlich auch die außergewöhnliche Interaktion mit dem monomeren G-Protein Gα0 gezeigt werden, welches mit Rab1- sowie Rab3-assoziierten Transportvorgängen vom Golgi zur PM in Verbindung steht. Durch die Fähigkeit der KDELRs, Transportprozesse sowohl in antero- als auch retrograder Richtung zu modulieren, tragen sie als feinjustierender „Traffic“-Sensor dazu bei, eine Überlastung des Golgi-Apparates zu verhindern (Pulvirenti *et al.*, 2008; Sallese *et al.*, 2009).

1.3. KDEL-Rezeptoren und ER-Stress

Unter ER-Stressbedingungen, die etwa zur Auslösung der „unfolded protein response“ (UPR) führen, müssen Maßnahmen ergriffen werden, um die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten, wobei gerade KDELRs durch ihre Retentionsfähigkeit von Chaperonen prädestiniert sind, solche Szenarien auszubalancieren (Wires *et al.*, 2021; Trychta *et al.*, 2018; Dossat *et al.*, 2024). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass KDEL2 und KDEL3 hierbei eine spezielle adaptive Rolle einzunehmen scheinen, da sie durch Aktivierung der UPR vermehrt exprimiert werden. Die Expression wird mutmaßlich über den UPR-regulierten Transkriptionsfaktor XBP1 („x-box binding protein 1“) aktiviert, für den die Gensequenzen von KDEL2 und KDEL3 vermehrt Bindestellen in der Promotorregion aufzeigen (Trychta *et al.*, 2018). In Hamsterzellen (CHO, „chinese hamster ovary“) konnte hingegen eine erhöhte Expressionsrate von KDEL1 nach Thapsigargin-induziertem ER-Stress beobachtet werden, was die Komplexität und zellspezifische Variabilität der KDEL-Expression verdeutlicht (Samy *et al.*, 2020).

Darüber hinaus sind KDELRs in der Lage, unter Stressbedingungen regulativ in Autophagieprozesse einzugreifen, einem Mechanismus, der eng mit der UPR verknüpft ist (Qi

& Chen, 2019; Tapia *et al.*, 2019; Tapia *et al.*, 2023). Hierbei werden zytosolische Bestandteile in Autophagosomen eingeschlossen und anschließend mit dem Lysosom zur Degradierung verschmolzen. Im Zusammenhang damit konnte ein eigener KDELR1-induzierter Mechanismus namens TIDeRS („traffic-induced degradation response for secretion“) aufgeklärt werden, welcher molekulare Bestandteile der Membrantransportmaschinerie und Umstrukturierungen des Zytoskeletts sowie autophagozytäre Prozesse umfasst. Das Ziel dabei ist es, Membranfluss und Proteinsekretion durch „lipid-droplet-turnover“ und Lysosom-Repositionierung aufrechtzuerhalten, sodass sich Zellen in ausreichendem Maß von schädigenden Proteinen entgiften können. Die Initiierung autophagozytärer Prozesse erfolgt hierbei KDELR-abhängig über PKA-Signalwege oder MAP-Kinasen. Im Speziellen sind hier auch die „dual activity mitogen-activated protein kinase 1“ (MEK1) und „extracellular signal-regulated kinases“ (ERKs) beteiligt (Tapia *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2011; Tapia *et al.*, 2023). Abgesehen davon sind KDELRs auch noch in weitere Prozesse während der Stressantwort involviert: Durch eine ligandenabhängige Aktivierung von KDELR1 im *cis*-Golgi werden p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (p38 MAPKs) und „c-Jun amino-terminal kinases“ (JNKs) aktiviert, wodurch modulativ und regulierend in MAPK-abhängige Signalwege der ER-Stressantwort eingegriffen werden kann (Yamamoto *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2022).

1.4. Lokalisation von KDELRs

Die intrazelluläre Verteilung der KDELRs ist aufgrund des Retentionskreislaufes zu einem gewissen Grad autoreguliert und fokussiert sich somit hauptsächlich auf die Membranen des ER, ERGIC („ER-Golgi intermediate compartment“) und Golgi, während die Anzahl der Rezeptoren in Richtung *trans*-Golgi und Zellperipherie deutlich geringer wird (Griffiths *et al.*, 1994). Die Lokalisation ist dynamisch und kann durch vermehrte Interaktion mit Liganden zum ER hin verschoben werden, wobei dieser Effekt ebenfalls durch eine überexpressionsbedingte Autoaktivierung hervorgerufen werden kann (Hsu *et al.*, 1992; Pulvirenti *et al.*, 2008).

Neue Studien legen nahe, dass die KDELR-Interaktionspartner Prohibitin (PHB) und „acyl-CoA binding domain-containing 3“ (ACBD3) regulierende Bestandteile der KDELR-Signalwege darstellen, welche sich letztendlich auf die KDELR-Lokalisation auswirken (Giannotta *et al.*, 2015; Yue *et al.*, 2021). PHB interagiert direkt mit KDELRs und stellt so einen notwendigen Faktor der Src-Aktivierung dar. Durch eine PHB-Deletion verringert sich die *cis*-Golgi-Lokalisation von KDELRs und die damit einhergehende Initiierung

anterograder Transportprozesse (Gianotta *et al.*, 2015). ACBD3 scheint hingegen eine negative Regulierung des retrograden Transportwegs auszuüben, indem es lokal die PKA-Aktivität verringert und so eine Aktivierung von Apo-Rezeptoren verhindert (Yue *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2023).

Interessanterweise sind HDELs bzw. KDELs auch in geringen Mengen im endosomalen Kompartiment und an der Zelloberfläche in Hefen und Säugerzellen nachweisbar, wo sie in der Lage sind, externe Proteine zu internalisieren und den retrograden Transport in das Zellinnere zu vermitteln (Becker *et al.*, 2016a; Becker *et al.*, 2016b; Henderson *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2023; Bartels *et al.*, 2019; Jia *et al.*, 2021). Erste Vermutungen deuten hier darauf hin, dass eine Überexpression der Rezeptoren sowie das Vorhandensein von Liganden im extrazellulären Bereich zu einer verstärkten Verschiebung der Lokalisation in Richtung Zellperipherie bzw. Plasmamembran führt (Becker *et al.*, 2016b; Henderson *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2021). Schon lange ist die Existenz von extrazellulären Proteinen mit einer KDEL-Bindesequenz am C-Terminus bekannt, wobei hier insbesondere einige Vertreter der A/B-Toxine, im Speziellen *Pseudomonas*-Exotoxin A, Cholera Toxin und das Killertoxin K28, von großem Interesse sind. Diese parasitieren den retrograden Transportweg durch Interaktion ihrer B-Untereinheit mit den H/KDEL-Rezeptoren auf Ebene der Plasmamembran und üben anschließend im Zellinneren ihre toxische Wirkung aus (Eisfeld *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 1999; Lencer *et al.*, 1995). Vor allem bei K28 konnte nachgewiesen werden, dass hierbei HDEL-Rezeptoren nicht nur den retrograden Transport zwischen Golgi und ER durchführen, sondern auch auf Ebene der Plasmamembran die initiale Toxinbindung über dessen β -Untereinheit katalysieren (Eisfeld *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2016a).

Durch den Nachweis einer Interaktion von KDELs mit dem neuroprotektiven Protein MANF („mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor“) konnten weitere Hinweise auf eine Oberflächenlokalisierung und damit verbundene Funktionen von KDELs in Säugerzellen entdeckt werden (Petrova *et al.*, 2003; Henderson *et al.*, 2013). Unter ER-Stressbedingungen in neuronalen SH-SY5Y-Zellen kommt es zu einer verstärkten MANF-Sekretion in den Extrazellulärraum, woraufhin oberflächenlokalisierte KDELs dieses über die C-terminale RTDL-Sequenz binden und reinternalisieren können (Oh-Hashi *et al.*, 2012; Henderson *et al.*, 2013). Studien in humanen und murinen Kardiomyozyten konnten zudem zeigen, dass KDELs als CDNF-Rezeptoren („cerebral dopamine neurotrophic factor“) auf Ebene der PM fungieren könnten und über eine damit assoziierte Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges zudem eine kardioprotektive Wirkung aufweisen (Maciel *et al.*, 2021). Weitere Studien geben Hinweise auf eine Internalisierung sezernierter KDEL-Liganden: Colligin

(Hsp47) wird durch seine C-terminale RDEL-Sequenz insbesondere von KDELR2 im ER zurückgehalten und unterstützt dort die Faltung von Kollagen-Vorläuferproteinen (van Dijk *et al.*, 2020; Efthymiou *et al.*, 2021). Eine externe Applikation dieses Chaperons führte zur KDELR-abhängigen Aufnahme an der Zelloberfläche und zum retrograden Transport in das ER (Khan *et al.*, 2019, retracted 2023). Dies könnte wiederum ein Hinweis auf eine Sensortätigkeit der KDELRs für eigentlich ER-residente Proteine im Extrazellularraum sein, aber ebenso ein nützliches Recycling-Tool für fehlerhaft sezernierte Proteine darstellen.

Auf HeLa-Zellen konnten „hot spots“ eines gezielten KDELR-Transports zur Zelloberfläche detektiert werden, was auf eine dynamische Interaktion mit anderen Zelloberflächenproteinen hindeuten könnte, zumindest aber Bereiche mit verstärktem KDELR-Transport bzw. -Recycling aufzeigt (Becker *et al.*, 2016b). Die Konzentration von KDELR-Rezeptoren an der Zelloberfläche scheint unter anderem durch die Aktivität der GTPase Rab4a und zudem durch das „Scaffold Protein“ ACBD3 („acyl-CoA binding containing protein 3“) kontrolliert zu werden (Tan *et al.*, 2023). Die Internalisierungsdynamik von KDELRs besteht in einer initialen Bildung von Clustern, die durch Interaktion mit extrazellulären KDELR-Liganden ausgelöst wird und im weiteren Verlauf unter Beteiligung der Clathrin-vermittelten Endozytosemaschinerie abläuft (Becker *et al.*, 2016b; Jia *et al.*, 2021). Erste Hinweise auf die Transportrouten für internalisierte KDELRs finden sich in HeLa- und MCF7-Zellen, wo neueste Studien tiefere Einblicke in den Rücktransport von KDELR1 aufzeigen. Endozytierte KDELR1 werden über gezielte Transportrouten retrograd innerhalb von 30 min bis zum *cis*-Golgi/TGN (*trans*-Golgi Netzwerk) transportiert und wahrscheinlich teilweise direkt an die PM rezykliert oder zunächst Rab11/14 vermittelt in endosomale Kompartimente überführt (Jia *et al.*, 2021).

1.4. KDELR-assozierte Erkrankungen

Die Rolle der KDELRs als Regulatoren und Mediatoren des zentralen Membranflusses sowie ihre Beteiligung an der ER-Qualitätssicherung machen sie zu Knotenpunkten in der zellulären Homöostase. Diese umfassenden Funktionen fungieren allerdings auch als potenzieller Ausgangspunkt für Fehlregulationen und können somit physiologische Dysfunktionen hervorrufen. Damit einher geht aber ein ebenso umfangreiches Potential zur Behandlung diverser Erkrankungen. Das KDELR-assozierte Krankheitsfeld ist sehr breit gefächert und die direkten Zusammenhänge bezüglich der Rezeptoren sind oftmals noch unbekannt. Im Speziellen sind hierbei bspw. Krebserkrankungen zu betrachten, welche oftmals mit der Überexpression einer Vielzahl von Proteinen einhergehen. Diese erhöhten Stressbedingungen

führen auch zu einer verstärkten Aktivierung von KDELRs und folglich zu einer Aktivierung bzw. Fehlregulierung der assoziierten Signalwege (Trychta *et al.*, 2018; Tapia *et al.*, 2019; Mao *et al.* 2020; Liao *et al.*, 2019; Marie *et al.*, 2020). Aktinreiche Ausläufer der Plasmamembran (Fokalkontakte oder auch „focal adhesions“) sind eng mit invasivem Krebs assoziiert, sodass in präinvasiven Zellen oftmals eine erhöhte Expression der „focal adhesion kinase“ (FAK) festgestellt werden kann (Maziveyi & Alahari, 2017). Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang auch eine direkte KDELR1-abhängige Rekrutierung und Phosphorylierung von FAK beschrieben werden (Ruggiero *et al.*, 2017). KDELR1 und KDELR2 können durch ihre „Src family kinases“ (SFK) - aktivierende Funktion und die damit verbundene erhöhte Aktivität von Matrixmetalloproteasen die Ausbildung von Invadopodien begünstigen und so eine elementare Beteiligung bei der invasiven Karzinogenese darstellen (Ruggiero *et al.*, 2015; Artym *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2006).

Die universelle Beteiligung von KDELRs als Interaktionspartner von Chaperonen bzw. protektiven Proteinen machen sie zu einem äußerst wichtigen Bestandteil des intrazellulären Proteingefüges. Ist die Integrität dieser Funktionalität etwa durch Mutationen verändert, können vielfältige negative zelluläre Effekte oder Einschränkungen der Gesundheit des Gesamtorganismus beobachtet werden. So scheint sich eine nicht native KDELR1-Funktion auf immunologische Prozesse auszuwirken, da eine verringerte virusspezifische Antwort sowie eine generelle Immundefizienz bezüglich angeborener wie auch adaptiver Immunreaktionen beobachtet werden konnte (Siggs *et al.*, 2015; Bainter *et al.*, 2021). Insbesondere die Reduktion der T-Zell-Homöostase sowie eine verminderte TCR-Expression sind deutliche negative Effekte einer KDELR1-Mutation (Siggs *et al.*, 2015). In Mausmodellen konnten nach KDELR-Mutation (D193N) vermehrt Fibrosen ebenso wie eine erhöhte Expression des proapoptotischen Faktors CHOP („C/EBP-homologous protein“) und damit einhergehend eine verstärkte Sensitivität des myokardialen Gewebes gegenüber Stress beobachtet werden. Neben einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinaggregaten leiden diese Mäuse auch unter einer vergrößerten ventrikulären Herzkammer mit verschlechterter Fähigkeit zur Muskelkontraktion sowie Atmungsproblemen und generellen Einschränkungen der Beweglichkeit (Hamada *et al.*, 2004). Auch eine nicht native KDELR2-Funktion zeigte Auswirkungen abseits der klassischen Retentionsfunktionen. So konnte in neueren Studien die Beteiligung von KDELR2 bei der Kollagenbildung und -sekretion festgestellt werden, was sich unmittelbar auf Knochenstrukturen auswirkt und mit *Osteogenesis Imperfecta* assoziiert ist (van Dijk *et al.*, 2020; Efthymiou *et al.*, 2021).

Die Proteine MANF sowie PHB gelten als Protektoren gegenüber Diabetes, sodass Interaktionen dieser Proteine mit den KDELRs einen interessanten Ansatz für zukünftige Therapien oder die Prävention der Krankheit darstellen könnten (Ade *et al.*, 2016; Danilova & Lindahl, 2018; Altenhofen *et al.*, 2023). Diabetes-Erkrankungen sind mit einer übermäßigen Aktivierung von Src-Kinasen assoziiert, weshalb über eine verstärkte Aktivierung dieser Kinasen durch KDELR und PHB spekuliert wird (Wires *et al.*, 2021). Eine Überexpression von KDELR-Rezeptoren bzw deren vermehrte Aktivierung kann mit einer Vielzahl von pathologischen Zuständen, wie z.B. der Tumorprogression und der Metastasierung von Karzinomen, in Verbindung gebracht werden (Levin *et al.*, 2020; Cela *et al.*, 2022; Wei *et al.*, 2021; Bajaj *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024).

In den meisten Fällen deutet die verstärkte KDELR-Expression unter Krankheitsbedingungen aber auf eine unterstützende Wirkung der Rezeptoren hin und bietet eine Grundlage für therapeutische Ansätze. Eine Reihe neurodegenerativer Krankheiten, darunter etwa Parkinson oder Huntington, sind mit Proteinaggregaten und ER-Stress assoziiert (Jin *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2017; Hetz & Saxena, 2017; Tapia *et al.*, 2023). Dies führt zu einer dauerhaften Aktivierung der UPR und somit zu einer gesteigerten Expression von KDELR2 und KDELR3 (Trychta *et al.*, 2018). Durch die erhöhte KDELR-Menge und die damit verbundene Aktivierung von autophagozytären Prozessen können KDELRs die betroffenen Zellen bei der „clearance“ von Proteinaggregaten unterstützen (Wang *et al.*, 2011). Auch bei ischämischen Zuständen nach Herzinfarkt bzw. Schlaganfall konnte beobachtet werden, dass die Expressionsrate der KDELRs und deren Lokalisation verändert vorliegt, was eine Involvierung dieser Proteine bei der Bewältigung von oxidativem Stress nahelegt (Lukovic *et al.*, 2019; Hamada *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2022; Dossat *et al.*, 2024). Eine durch CRISPR/Cas9 durchgeführte Deletion von KDELR1 in HAP1-Zellen zeigte zudem umfassende Auswirkungen auf das gesamte zelluläre Transkriptom, mit den größten Veränderungen in Bereichen der Zellentwicklung und Organisation, aber auch bei Genen, welche die Extrazelluläre Matrix betreffen. Die untersuchten Zellen zeigten sich in ihrer Adhäsionsfähigkeit eingeschränkt und es konnte eine erhöhte ER-Stressanfälligkeit nachgewiesen werden (Blum *et al.*, 2019). Die vielfältigen regulatorischen Funktionen der KDELRs, in Kombination mit der großen Anzahl an medizinisch relevanten Anwendungsgebieten, machen diese Rezeptoren zu einem besonders interessanten Gegenstand der Forschung, welcher in Zukunft mit Sicherheit eine bedeutende Rolle einnehmen wird.

Ziele der Arbeit

Die Lokalisation von KDEL-Rezeptoren an der Zelloberfläche stellt ein interessantes Phänomen dar, welches bislang nur unzureichend erforscht ist. Dabei ist vor allem die Funktion dieser hauptsächlich im ERGIC agierenden Proteine immer stärker in den Fokus aktueller Studien gerückt. So gibt es bereits seit längerem deutliche Hinweise auf Funktionen der Rezeptoren an der Zelloberfläche von Hefen, aber auch von Säugerzellen.

Ein erster Eindruck über die Oberflächendynamik von KDELRs in HeLa-Zellen konnte in einem „Trafficking“-Modell gewonnen werden. Hierbei zeigten sich ein dynamisches Clusterverhalten von PM-lokalisierten KDELRs nach Interaktion mit externen Liganden und erste Hinweise auf einen gezielten Transport von KDELRs zu „hot spots“ der Plasmamembran (Becker *et al.*, 2016b).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Details dieses äußerst dynamischen Mechanismus entschlüsselt werden, wobei die Untersuchung auf verschiedene, spezieübergreifende Zelltypen ausgeweitet werden sollte. Die experimentell ermittelten Daten sollten mit der Unterstützung von Monte-Carlo-Simulationen die Grundlage für ein „Receptor Cycling“-Modell bilden, welches die Endozytose- und Recyclingraten von KDELRs mit dem beobachteten Clusterphänomen in Zusammenhang bringt. Die Durchführung dieser Experimente sollte durch Echtzeit-Dokumentation des Clusterprozesses in einem „Live Cell Imaging“-Setup in Kombination mit einem fluoreszierenden Modellliganden auf Basis einer modifizierten Variante des A/B-Toxins Rizin erfolgen. Des Weiteren sollten die Auswirkungen eines genomischen Knockouts einzelner KDEL-Subtypen auf das Clusteringverhalten der Zellen und insbesondere eventuelle Kompensationsmechanismen unter Stressbedingungen untersucht werden. Weiterhin fungierte eine grundlegende Analyse eines bislang nicht veröffentlichten KDEL-Interaktoms (Becker, persönliche Mitteilung) in dieser Arbeit als Basis zur Auswahl potenzieller Interaktionspartner. Einen experimentellen Orientierungspunkt für zukünftige Forschungen bezüglich des Rezeptor-Interaktoms sollte die Herstellung stabil transfizierter Säugerzellen darstellen, welche eine genauere Bestimmung der intrazellulären Lokalisation sowie eine Detektion der KDELRs auf der Zelloberfläche erlauben. Abschließend sollten insbesondere Proteine der zentral am Transport beteiligten Rab-Familie näher untersucht und auf ihre potenzielle Interaktion mit allen drei KDEL-Paralogen überprüft werden. Mithilfe einer hochauflösenden konfokalen Laser Scanning Mikroskopie sollten schließlich Einblicke in die Lokalisation und die Interaktion von KDELRs mit transportassoziierten Proteinen gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

2.1.1. Bakterien

In Tabelle 1 sind alle verwendeten Bakterienstämme aufgeführt.

Tabelle 1: *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme mit Beschreibungen des Genotyps sowie Herkunft.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
TOP 10	<i>F</i> ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
TOP 10 F'	<i>F'</i> , <i>lacq</i> <i>Tn10</i> (<i>Tetr</i>)- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA1</i> <i>nup</i>	Invitrogen
NovaBlue Singles	<i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rK12-mK12</i> ⁺) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>F'</i> * <i>proA+B+</i> <i>lacIq</i> ZΔ <i>M15</i> :: <i>Tn 10</i> ⁺ (<i>TetR</i>)	Novagen
DH5-α	<i>F</i> ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Pharmacia
BL21 (DE3)	<i>F'</i> <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon</i> <i>hsdSB</i> (<i>rBmB</i> ⁻) λ(DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5</i> -T7 gene 1 <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i>])	Biomol

2.1.2. Hefen

In Tabelle 2 sind alle verwendeten Hefestämme aufgeführt.

Tabelle 2: *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) Stämme mit Beschreibungen des Genotyps sowie Herkunft.

Hefestamm	Genotyp	Herkunft
BY4742	<i>MATα</i> <i>his3Δ1</i> <i>leu2Δ0</i> <i>lys2Δ0</i> <i>ura3Δ0</i>	Open Biosystems
YA12	<i>MATα</i> <i>ade2</i> <i>ade3</i> <i>his3-200</i> <i>leu2-3,112</i> <i>ura3- 52</i> <i>TRP1</i> <i>erd2-Nco</i> mit Plasmid <i>pYA12</i> (2μ <i>URA3</i> <i>ADE3</i> <i>SEC12</i>)	Prof. Pelham (Semenza <i>et al.</i> , 1990)

2.1.3. Säugerzellen

In Tabelle 3 sind alle verwendeten Säugerzelllinien aufgeführt.

Tabelle 3: Säugerzelllinien mit Beschreibungen des Genotyps sowie Herkunft.

Zelllinie	Eigenschaften	Herkunft
HeLa	Human, Epithelzellen, Zervixkarzinom	AG Prof. Walter
HEK293T	Human, Epithelzellen, embryonale Nieren	AG Prof. R. Zimmermann
THP1	Human, Monozyten, gewonnen aus einem Leukämie (ALM) - Patienten	ATCC® (TIB-202)
MEF	Murin, Fibroblasten, embryonal	Prof. del Campo, INM
L929	Murin, Fibroblasten, subkutanes Bindegewebe	Prof. del Campo, INM

SH-SY5Y	Human, Epithelzellen, Neuroblastom	ATTC® (CRL-2266TM)
HAP1	Human, Fibroblasten-ähnlich, gewonnen aus der Zelllinie KBM-7, haploid	Horizon
HAP1 KDELRL1-KO	HAP1-Zellen mit Stopp-Codon im KDELRL1-Exon 2 durch CRISPR/Cas9-KO-Technologie erzeugte „T“-Insertion	Horizon
HAP1 KDELRL2-KO	HAP1-Zellen mit Stopp-Codon im KDELRL2-Exon 2 durch CRISPR/Cas9-KO-Technologie erzeugte „C“-Insertion	Horizon
IC-21	Murin, Peritoneale Makrophagen, gewonnen aus SV40 transformierten C57BL/6 Makrophagen	ATCC® (TIB-189TM)
RAWBlue	Murin, Makrophagen, "Abelson murine leukemia virus"-induzierte Tumorzellen	Invivogen
Flp-In™ T-REx™ HEK293	Basierend auf HEK293, erlauben den Einbau von Flp-In™ Expressionsvektoren in eine FRT-Stelle an einem transkriptionsaktiven Genomlocus, Genexpression unter Tetrazyclin-Promotor	Thermo Fisher Scientific
Flp-In™ T-REx™ HEK293- ERD2.1 ^{87HA88}	Flp-In™ T-REx™ HEK293 Mit stabiler Integration einer KDELRL1-Variante mit HA-Tag Insertion an Position 87/88	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ HEK293- ERD2.2 ^{87HA88}	Flp-In™ T-REx™ HEK293 Mit stabiler Integration einer KDELRL2-Variante mit HA-Tag Insertion an Position 87/88	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ HEK293- ERD2.3 ^{87HA88}	Flp-In™ T-REx™ HEK293 Mit stabiler Integration einer KDELRL3-Variante mit HA-Tag Insertion an Position 87/88	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ HEK293- ERD2.1-mCherry	Flp-In™ T-REx™ HEK293 Mit stabiler Integration einer mCherry markierten KDELRL1-Variante	Dissertation Rammo, 2017
Flp-In™ T-REx™ HEK293- ERD2.2-mCherry	Flp-In™ T-REx™ HEK293 Mit stabiler Integration einer mCherry markierten KDELRL2-Variante	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ HEK293- HA-Li-ERD2.1	Flp-In™ T-REx™ HEK293 Mit stabiler Integration einer N-terminal HA-markierten und mit GGS-Linker verknüpften KDELRL1-Variante	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ HEK293- HA-Li-ERD2.2	Flp-In™ T-REx™ HEK293 Mit stabiler Integration einer N-terminal HA-markierten und mit GGS-Linker verknüpften KDELRL2-Variante	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ HEK293- HA-Li-ERD2.3	Flp-In™ T-REx™ HEK293 Mit stabiler Integration einer N-terminal HA-markierten und mit GGS-Linker verknüpften KDELRL3-Variante	Diese Arbeit

2.2. Kultivierung

Die Medien zur Kultivierung von Bakterien und Hefen wurden grundsätzlich mit H₂O_{dest.} angesetzt und autoklaviert, sofern nicht anders angegeben.

2.2.1. Medien für Bakterien

LB-Medium

Trypton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %
(Agar für Platten	1,5 %)

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50 mg/ml
Ethanol	50 %

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	25 mg/ml
-----------	----------

Die Antibiotikallösungen wurden steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte im Schüttelinkubator „Multitron“ (Infors) bei 37 °C und 220 rpm. Zuvor transformierten Bakterienkulturen wurde entsprechendes Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin) zum Erhalt des Selektionsdruckes zugegeben. Agarplatten wurden hierfür mit 40 µl der Antibiotikumlösung und 160 µl Wasser supplementiert. Beimpfte Agarplatten wurden bei 37 °C inkubiert.

2.2.2. Medien für Hefen

YPD-Medium

Glukose	2,0 %
Pepton	2,0 %
Hefeextrakt	1,0 %

Drop/out (d/o)-Medien

Lösung A:

Glukose / Galaktose	2,0 % / 3,0 %
(Agar	1,5 %)

Lösung B:

Ammoniumsulfat	0,5 %
d/o-Mix	0,087 %

10x „drop/out“-Mix

Adenin	2,5 g
Arginin	1,2 g
Aspartat	6,0 g
Glutamat	6,0 g
Histidin	1,2 g
Leucin	3,6 g
Lysin	1,8 g
Methionin	1,2 g
Phenylalanin	3,0 g
Serin	22,5 g
Threonin	12,0 g
Tyrosin	1,8 g
Tryptophan	1,2 g
Valin	9,0 g
Uracil	1,2 g

Zur Herstellung des 10x „drop/out“-Mix wurden zur Selektion benötigte Aminosäuren nicht hinzugegeben.

Lösung C:

YNB 0,17 %

Lösungen A und B wurden getrennt autoklaviert und Lösung C steril filtiert.

Die Kultivierung in Flüssigmedien erfolgte im Schüttelinkubator bei 30 °C und 220 rpm. Beimpfte Agarplatten wurden im Brutschrank ebenfalls bei 30 °C inkubiert.

2.2.3. Medien für Säugerzellen

Zellkulturmedien

DMEM / IMDM / RPMI 1640

FKS 10 %

Antibiotikum

Die Ansätze der Medien wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

In Tabelle 4 sind die verwendeten Säugerzelllinien in Verbindung mit ihren Medien aufgeführt.

Tabelle 4: Säugerzelllinien und deren Medien sowie Hersteller.

Zelllinie	Medium	Hersteller
HeLa, HEK293, MEF, L929, SH-SY5Y, RAWBlue	DMEM	Sigma-Aldrich
HAP1	IMDM	Gibco
IC-21, THP1	RPMI 1640	Sigma-Aldrich

In Tabelle 5 sind die verwendeten Säugerzelllinien in Verbindung mit den verwendeten Antibiotika, deren Konzentration sowie deren Funktion aufgelistet.

Tabelle 5: Säugerzelllinien und die verwendeten Antibiotika inklusive Konzentration und deren Funktion sowie Hersteller.

Zelllinie	Antibiotikum	Konzentration	Funktion	Hersteller
Alle (außer Makrophagen)	Penicillin/ Streptomycin	1 %	Kontaminationschutz	Sigma
RAWBlue	Normocin™ Zeocin™	100 µg/ml 200 µg/ml	Kontaminationschutz, Selektion	Invivogen
Flp-In™ T-REx™ (untransfiziert)	Zeocin™	200 µg/ml	Selektion	Invivogen
Flp-In™ T-REx™ (transfiziert)	Hygromycin B Gold	200 µg/ml	Selektion	Invivogen
Flp-In™ T-REx™ (transfiziert)	Tetrazyklin	1 µg/ml	Induktion	AppliChem

Säugerzellen wurden entsprechend der Herstellerangaben in „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM), „Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium“ (IMDM) oder „Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium“ (RPMI 1640) kultiviert. Hierfür wurde das Medium mit hitzeinaktiviertem 10 % fötalem Kälberserum (FKS) versetzt. Unter Standard-Kultivierungsbedingungen wurde grundsätzlich Phenolrot als pH-Indikator verwendet und zum Reinerhalt der Zelllinie Penicillin/Streptomycin eingesetzt, mit Ausnahme der Makrophagen-Zelllinien (THP1, RAWBlue, IC-21). Alle Medien und Puffer wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C temperiert, sofern nicht anders angegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte je nach Zelllinie in beschichteten bzw. unbeschichteten Zellkulturflaschen von Greiner bio-one unter 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre bei 37 °C im Brutschrank (HeraCell150, Thermo Scientific).

2.2.4. Differenzierung von Makrophagen aus THP1-Monozyten

Humane Makrophagen dienten in dieser Arbeit als Modellsystem für Immunzellen, welche im Kontrast zu Gewebszellen wie HeLa oder HEK293 untersucht wurden. THP1-Monozyten können in Anwesenheit von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenziert werden. Hierfür wurden 3×10^5 THP1-Monozyten pro ml ausgesät und mit 30 ng/ml PMA in RPMI 1640-Medium kultiviert (Caras *et al.*, 2011).

2.2.5. Passagieren von Säugerzelllinien

Adhärente Säugerzellen

Nach Erreichen der Zelllinienspezifischen Konfluenz wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 1x PBS (Merck) gewaschen. HEK293-abstammende Zelllinien wurden aufgrund der schwachen Adhärenz nicht gewaschen, um Zellverluste zu vermeiden.

Nachfolgend wurden die Zellen durch flächendeckende Zugabe von 1x Trypsin/EDTA bei 37 °C bis zum Ablösen inkubiert. Ein erneutes Versetzen und Durchmischen der Zellen mit FKS-haltigem Medium im Verhältnis von 1:5 diente zum Stopp des Trypsin-induzierten Verdaus. Makrophagen wurden durch eine 5-minütige Inkubation mit 1x PBS auf das Ablösen vorbereitet. Unter Verwendung eines Zellschabers wurden die Zellen mechanisch abgelöst und in Medium aufgenommen.

Nicht adhärenente Säugerzellen

Die Zelldichte von Suspensions-Zellkulturen wurde überprüft und bei Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde das Medium durch Zentrifugation (300 x g, 5 min) entfernt. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen und die entsprechende Zellzahl entnommen. Die „Split“-Raten erfolgten stets unter Beachtung der Zelllinienspezifischen Wachstumsraten.

2.2.6. Kryokulturen

2.2.6.1. Einfrieren von Bakterien und Hefen

Kryokulturen von Bakterien und Hefen wurden in einer 1:1 Mischung aus einer frischen Kultur und sterilem Glycerin in Kryoröhrchen hergestellt und unmittelbar bei -80 °C eingefroren und dauerhaft gelagert.

2.2.6.2. Einfrieren von Säugerzellen

Einfrieremedium:

FKS	60 %
DMSO	20 %
DMEM/IMDM/RPMI 1640	20 %

Kryokulturen von Säugerzellen wurden erstellt, indem Säugerzelllinien nach ihren spezifischen Eigenschaften (analog zum Passagieren) abgelöst wurden. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden die Zellen bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und mit einer 1:1 Mischung aus Einfriermedium mit Zellkulturmedium versetzt, sodass final 2×10^6 Zellen pro 1,8 ml aufgenommen wurden. Nach sanfter Resuspension wurden Kryoröhrchen zu je 1,8 ml befüllt und kontrolliert bei maximal -1 °C/min in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (CryoSave™, Scienceware) auf -80 °C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.6.3. Auftauen von Säugerzellen

Gefrorene Kryoröhrchen wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad vollständig aufgetaut und unmittelbar in 4 °C kaltem Zellkulturmedium (Endvolumen 5 ml) aufgenommen. Nach 5-minütiger Zentrifugation (300 x g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 5 ml des entsprechenden 37 °C warmen Mediums resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Plasmide

In Tabelle 6 sind alle verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Plasmide mit Beschreibungen der Eigenschaften sowie Herkunft.

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pSTBlue1	Erlaubt Klonierung eines <i>Taq</i> -amplifizierten PCR-Produkts, <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Kan^R</i> -Gen, ermöglicht Blau-Weiß-Selektion	Novagen
pYES2.1/V5-His-TOPO	<i>Amp^R</i> -Gen, <i>URA3</i> -Gen, erlaubt die Klonierung eines <i>Taq</i> -amplifizierten PCR-Produkts, 2µ „origin of replication“, <i>GAL1</i> - Promotor	Invitrogen
pRS315	CEN6, ARSH4, <i>LEU2</i> -Marker, ori, fl origin, lacZ, <i>Amp^R</i> -Gen	Sikorski & Hieter, 1989
pRS316	“shuttle”-Vektor mit “yeast centromer sequence”(CEN), “autonomously replicating sequence” (ARS), <i>URA3</i> - und <i>Amp^R</i> -Gen	Sikorski & Hieter, 1989
pcDNA3.1	Plasmid zur Expression in Säugerzellen, <i>Amp^R</i> -Gen, pUC ori, CMV-Promotor	Invitrogen
pYES Erd2-V5	pYES mit V5-getaggtm <i>ERD2</i> -Gen	Dissertation Blum, 2018
pRS316 Erd2-V5	pRS316 mit V5-getaggtm <i>ERD2</i> -Gen	Dissertation Blum, 2018
pET-24a+	Expressionsvektor mit <i>Kan^R</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG induzierbarem T7-Promotor	Novagen
pET-24a+-RTA	Expressionsvektor mit <i>Kan^R</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG induzierbarem T7-Promotor sowie RTA Sequenz	Dissertation Becker, 2012
pET-24a+	Expressionsvektor mit <i>Kan^R</i> -Gen, T7-Tag	Dissertation

RTAHDEL	Sequenz, His6-Tag, IPTG induzierbarem T7-Promotor sowie RTA Sequenz mit C-terminalem HDEL-Motiv	Becker, 2012
pET-24a+ RTAKDEL	Expressionsvektor mit <i>Kan^R</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG induzierbarem T7-Promotor sowie RTA Sequenz mit C-terminalem KDEL-Motiv	Dissertation Becker, 2012
pET-24a+ eGFP-RTA ^{E177D}	Expressionsvektor mit <i>Kan^R</i> -Gen, T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG induzierbarem T7-Promotor sowie eGFP markierter RTA ^{E177D} -Sequenz	Dissertation Becker, 2012
pET-24a+ eGFP-RTA ^{E177D} HDEL	T7-Tag Sequenz, His6-Tag, IPTG induzierbarem T7-Promotor sowie eGFP markierter RTA ^{E177D} HDEL-Sequenz	Dissertation Becker, 2012
pRS315 Erd2.2mC	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), Promotor PGal , „autonomously replicating sequence“ (ARS), <i>LEU2</i> - und <i>Amp^R</i> -Gen sowie mCherry getaggtter KDEL2-Sequenz	Dissertation Rammo, 2017
pcDNA5/FRT/TO	Expressionsvektor zur stabilen Integration von DNA mit <i>Hygromycin^R</i> -Gen, Tetrazyklin-induzierbarem CMV-Promotor, FRT-Stellen	Invitrogen
pcDNA5/FRT/TO Erd2.1mC	Expressionsvektor zur stabilen Integration von DNA mit <i>Hygromycin^R</i> -Gen, Tetrazyklin-induzierbarem CMV-Promotor, FRT-Stellen und einer mCherry markierten KDEL1-Sequenz	Dissertation Rammo, 2017
pcDNA3.1 Erd2.2mC	Expressionsvektor zur stabilen Integration von DNA mit <i>Hygromycin^R</i> -Gen, Tetrazyklin-induzierbarem CMV-Promotor, FRT-Stellen und einer mCherry markierten KDEL2-Sequenz	Dissertation Rammo, 2017
pOG44	Säugerzellvektor, codiert für die „Flp Rekombinase“ des Flp-In TM Systems	Thermo-Fisher
pcDNA3.1 Erd2.1 ^{87HA} ⁸⁸	pcDNA3.1-Vektor mit einer KDEL1-Variante mit HA-Tag-Insertion im zweiten zytoplasmatischen Loop zwischen Position 87 und 88	Dissertation Blum, 2018
pcDNA5/FRT/TO Erd2.2 ^{87HA} ⁸⁸	pcDNA5-Vektor mit einer KDEL2-Variante mit HA-Tag-Insertion im zweiten zytoplasmatischen Loop zwischen Position 87 und 88	Diese Arbeit
pcDNA5/FRT/TO Erd2.3 ^{87HA} ⁸⁸	pcDNA5-Vektor mit einer Erd2.3-Variante mit HA-Tag-Insertion im zweiten zytoplasmatischen Loop zwischen Position 87 und 88	Diese Arbeit
pcDNA5/FRT/TO HA-Li-Erd2.1	pcDNA5-Vektor mit einer N-terminal HA-markierten und mit GGC-Linker verknüpften KDEL1-Variante	Diese Arbeit
pcDNA5/FRT/TO HA-Li-Erd2.2	pcDNA5-Vektor mit einer N-terminal HA-markierten und mit GGC-Linker verknüpften KDEL2-Variante	Diese Arbeit
pcDNA5/FRT/TO HA-Li-Erd2.3	pcDNA5-Vektor mit einer N-terminal HA-markierten und mit GGC-Linker verknüpften KDEL3-Variante	Diese Arbeit
EGFP-Rab1	eGFP C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab1a unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab3a	eGFP C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab3a unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene

EGFP-Rab4	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab4a unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
GFP-Rab5	pAcGFP1-C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab5b unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab6	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab6a unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
GFP-Rab7	pAcGFP1-C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-HA-Rab7a unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
GFP-Rab7 DN	pEGFP-C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression einer nicht funktionellen eGFP-HA-Rab7T22N-Variante unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab8	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-HA-Rab8a unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab10	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab10 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab11	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab11a unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
GFP-Rab11 DN	p-EGFP-C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression einer nicht funktionellen eGFP-HA-Rab11aS25N-Variante unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab14	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab14 unter Kontrolle Promotors	Addgene
EGFP-Rab18	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab18 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab21	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab21 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab22	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab22a unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab31	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab31 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab32	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab32 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
EGFP-Rab35	eGPF C1-basierter Säugervektor mit <i>Kan^R</i> - und <i>Neo^R</i> -Gen, zur Expression von eGFP-Rab35 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Addgene
pESC-LEU	“shuttle“-Vektor mit 2μ “origin of replication”, <i>LEU2</i> - und <i>Amp^R</i> -Gen, GAL1- oder GAL10-Promotor	Stratagene
pESC-LEU Erd2	pESC-LEU-Vektor mit wildtypischer Sequenz des HDEL-Rezeptors	Dissertation Dausend, 2010
pESC-LEU ERD2ΔC	pESC-LEU-Vektor mit einer um 39 bp C-terminal verkürzten, nicht funktioneller HDEL-R-Variante	Dissertation Dausend, 2010

pESC-LEU Erd2.1 ⁸⁷ HA ⁸⁸	pESC-LEU-Vektor mit einer KDEL R1-Variante mit HA-Tag-Insertion im zweiten zytoplasmatischen Loop zwischen Position 87 und 88	Diese Arbeit
pESC-LEU Erd2.2 ⁸⁷ HA ⁸⁸	pESC-LEU-Vektor mit einer KDEL R2-Variante mit HA-Tag-Insertion im zweiten zytoplasmatischen Loop zwischen Position 87 und 88	Diese Arbeit
pESC-LEU Erd2.3 ⁸⁷ HA ⁸⁸	pESC-LEU-Vektor mit einer KDEL R3-Variante mit HA-Tag-Insertion im zweiten zytoplasmatischen Loop zwischen Position 87 und 88	Diese Arbeit
pESC-LEU HA-Li-Erd2.1	pESC-LEU-Vektor mit einer N-terminal HA-markierten und mit GGGC-Linker verknüpften KDEL R1-Variante	Diese Arbeit
pESC-LEU HA-Li-Erd2.2	pESC-LEU-Vektor mit einer N-terminal HA-markierten und mit GGGC-Linker verknüpften KDEL R2-Variante	Diese Arbeit
pESC-LEU HA-Li-Erd2.3	pESC-LEU-Vektor mit einer N-terminal HA-markierten und mit GGGC-Linker verknüpften KDEL R3-Variante	Diese Arbeit

2.3.2. Oligonukleotide

In Tabelle 7 sind alle zur RT-qPCR verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Diese wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 7: Verwendete Primer mit Sequenz und Beschreibung des Amplifikats.

Primer	5' - 3' Sequenz	Amplifikat	Herkunft
5' qPCR-KDEL R1	CACAGCCATTCTGGCGTTC CTG	Humaner KDEL R1, Exon 3,4, qPCR	Dissertation Blum, 2018
3' qPCR-KDEL R1	CCATGAACAGCTGCGGCAA GAT	Humaner KDEL R1, Exon 3,4, qPCR	Dissertation Blum, 2018
5' qPCR-KDEL R2	CTGGTCTTCACAACTCGTT ACCTGGATC	Humaner KDEL R2, Exon 2,3, qPCR	Dissertation Blum, 2018
3' qPCR-KDEL R2	CAGGTAGATCAGGTACACT GTGGCATAGG	Humaner KDEL R2, Exon 2,3, qPCR	Dissertation Blum, 2018
5' qPCR-KDEL R3	CTTCTGGTCCCAGTCATTG GCCT	Humaner KDEL R3, Exon 3,4, qPCR	Dissertation Blum, 2018
3' qPCR-KDEL R3	GGGGCAGGATAGCCACTG ATTCC	Humaner KDEL R3, Exon 3,4, qPCR	Dissertation Blum, 2018
5' qPCR-GAPDH	TTCGACAGTCAGCCGCATC T	Humanes GAPDH, qPCR	Dissertation Blum, 2018
3' qPCR-GAPDH	GCCCAATACGACCAAATCC GTT	Humanes GAPDH, qPCR	Dissertation Blum, 2018
5' qPCR-β-Aktin	TGCGTGACATTAAGGAGAA G	Humanes β-Aktin, qPCR	Dissertation Blum, 2018
3' qPCR-β-Aktin	GTCAGGCAGCTCGTAGCTC T	Humanes β-Aktin, qPCR	Dissertation Blum, 2018
5' qPCR KDEL R1 _{mus}	GTGGTGTTCACTGCCCGAT A	muriner KDEL R1, Exon 2,3, qPCR	Diese Arbeit
3' qPCR KDEL R1 _{mus}	AACTCCACCCGGAAAGTGT C	muriner KDEL R1, Exon 2,3, qPCR	Diese Arbeit
5' qPCR KDEL R2 _{mus}	TGGTCTTCACGACTCGCTA C	muriner KDEL R2, Exon 2,3, qPCR	Diese Arbeit
3' qPCR KDEL R2 _{mus}	AGGTACACCGTGGCATAGG A	muriner KDEL R2, Exon 2,3, qPCR	Diese Arbeit
5' qPCR KDEL R3 _{mus}	CTTCATCTCCATCTACAAC ACAGTG	muriner KDEL R3, Exon 2,3, qPCR	Diese Arbeit

3' qPCR KDEL3 _{mus}	CTCCAGCCGGAATGTGTCA T	muriner KDEL3, Exon 2,3, qPCR	Diese Arbeit
5' qPCR GAPDH _{mus}	GAGAGTGTTCCTCGTCCC G	murines GAPDH, Exon 2,3, qPCR	Diese Arbeit
3' qPCR GAPDH _{mus}	TCCCGTTGATGACAAGCTT CC	murines GAPDH, Exon 2,3, qPCR	Diese Arbeit

2.3.3. Synthetische Gensequenzen

HA-markierte Rezeptorvarianten wurden von „GeneArt“ synthetisiert und kommerziell als GeneString™ erworben. Die Gensequenzen sowie Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Zur direkten Klonierung verwendete Gen-Sequenzen. Die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind *kursiv* und HA-Tag-Sequenzen sind **fett** gedruckt. Linker Sequenzen werden **rot** dargestellt.

ERD2.2⁸⁷HA⁸⁸	
<i>Bam</i> HI	<p>ggatccATGAACGTGTTCCGAATCCTCGGCGACCTGAGCCACCTCTGGCCATGATCTTGTCTGCTGGGGAAGATCTGGAG GTCCAAGTGTGCAAGGGCATCTCTGGGAAGAGCCAGATCCTGTTGCTCTCGTCTTACCACCAGGTACCTGGACCT GTTCCACCAACTTCATCTCCATCTACAACACAGTAATGAAGGTGGTTTTTCTCCTCTGTGCCTATGTTACAGTGTACATG ATATATGGGAAATTCCGTA AAAACTTTTGACTACCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGTGAGAATGACACATTCCG CCGAGTTTCTTCTGGTCCAGTCATTGGCCTTTCCTTCTGAAAACACTACAGTTTCACTCTGCTGGAGATCCTCTGGACT TTCTCTATCTATCTGGAATCAGTGGCTATCCTGCCCCAGCTCTTCATGATCAGCAAGACTGGAGAGGGCTGAGACCATA ACTACTACTACTGTTCTTTCTGGGTCTGTACCGGGCACTACCTGGCTAACTGGATCAGGCGGTACCAGACTGAGA ATTTCTATGACCAAATTCAGTCTGTCTGGAGTAGTACAACCACTTCTACTGTGACTTCTTCTACTTGTATGTGAC CAAAGTCTTAAGGGAAGAAGTTAAGTCTTCCAATGCCAATCTGAgcgccgcg</p> <p style="text-align: right;"><i>NotI</i></p>
ERD2.3⁸⁷HA⁸⁸	
<i>Bam</i> HI	<p>ggatccATGAACATTTTCCGGCTGACTGGGGACCTGTCCACCTGGCGGCCATCGTCATCCTGTCTGCTGAAGATCTGGAA GACGCGCTCCTGCGCCGGTATTTCTGGGAAAAGCCAGCTTCTGTTTGCCTGCTTCAAACTCGTTACCTGGATCTT TTTACTTCATTATTTCATTGTATAACACATCTATGAAGTTATCTACCTTGCTGCTCTATGCCACAGTGTACCTGAT CTACCTGAAATTTAAGGCAACCTACGATTACCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGAAATCATGATACCTTCCGAG TGGAGTTCTGGTGGTCCCTGTGGGAGGCCTCTCATTTTATGTAATCAGATTCTCTCCTTTGAGACTCCTCTGGACC TTCTCCATACCTGGAGTCCGTGGCTATCCTTCCGACGCTATTTATGATCAGCAAGACTGGGGAGGCCGAGACCATC ACCACCCACTACCTGTTCTTCTGGGCTCTATCGTCTTTGTATCTTGTCAACTGGATCTGGCGCTTCTACTTTGAGGG CTTCTTTGACCTCATTGCTGTGGTGGCCGGCGTAGTCCAGACCATCTATACTGTGACTTCTTCTACTTGTACATTACAA AAGTACTCAAGGGAAGAAGCTCAGTTTGCCAGCATAAgcgccgcg</p> <p style="text-align: right;"><i>NotI</i></p>
HA-Linker-ERD2.1	
<i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI	<p>aagcttggatccATGTACCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGCGGAGGCGGAAGCAATCTCTTCCGATTCTGGGAGAC CTCTCCACCTCCTCGCCATCATCTTGCTACTGCTCAAAATCTGGAAAGTCCCGCTCGTGCGCCGGAATTCAGGGAAGA GCCAGGTCTGTTTGTGTGGTGTCTACTGCCGATATCTGGACCTTCCACCAACTACATCTACTCTACAACACGTG TATGAAGTGGTCTACATAGCCTGCTCCTTACCACGGTCTGGTTGATTTATAGCAAGTTCAAAGCTACTTACGATGGG AACCATGACACGTTCCAGAGTGGAGTTCCTGGTCCGTTCCACAGCCATTCTGGCGTTCCTGGTCAATCATGACTTACCC CTCTGGAGATCCTCTGGACCTTCTCCATCTACCTGGAGTCACTGGCCATCTTGCCGCAGCTGTTATGGTGAGCAAGAC CGGCGAGGCGGAGACCATCACCAGCCACTACTTGTGCTAGGCGTTTACCAGCAGCTCTATCTTCAACTGGATC TGGCGTACCATTTCAGGGCTTCTTCCGACCTCATGCCATTGTGGCAGGCTGGTCCAGACAGCTCTACTGCGATT TCTTCTACTCTATATACCAAAGTCTAAAGGGGAAGAAGTTGAGTTTGGCCGCATAGcgccgcctcgag</p> <p style="text-align: right;"><i>NotI, Xho</i>I</p>
HA-Linker-ERD2.2	
<i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI	<p>aagcttggatccATGTACCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGCGGAGGCGGAAGCAACATTTTCCGGCTGACTGGGGAC CTGTCCACCTGGCGGCCATCGTATCCTGCTGCTGAAGATCTGGAAAGACGCGCTCCTGCGCCGGTATTTCTGGGAAA AGCCAGTCTGTTTGCCTGCTTCAAACTCGTTACCTGGATCTTTTACTTCAATTATTCTGTATAACACATC TATGAAGTTATCTACCTTGCTCCTATGCCACAGTGTACCTGATCTACCTGAAATTTAAGGCAACCTACGATGGA AATCATGATACCTTCCGAGTGGAGTTTCTGGTGGTCCCTGTGGGAGGCCTCTCATTTTATGTTAATCAGATTCTCTCC TCTTGGAGATCCTTGGACCTTCTCCATCTACCTGGAGTCCGTTGGTATCCTTCCGCAGCTATTTATGATCAGCAAGACT GGGAGGCCGAGACCATCACCACCCACTACCTGTTCTTCCGGGCTCTATCGTCTTTGTATCTTGTCAACTGGATCT GGCGCTTCTACTTTGAGGGCTTCTTTGACCTCATTGCTGTGGTGGCCGGCGTAGTCCAGACCATCTATACTGTGACTT CTTCTACTTGTACATTACAAAAGTACTCAAGGGAAGAAGCTCAGTTTGCCAGCATAAgcgccgcctcgag</p> <p style="text-align: right;"><i>NotI, Xho</i>I</p>

HA-Linker-ERD2.3

HindIII, BamHI

```
aaagcttggatccATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGCGGAGGCGGAAGCAACGTGTTCCGAATCCTCGGGCGAC
CTGAGCCACCTCCTGGCCATGATCTTGCTGCTGGGGAAGATCTGGAGGTCCAAGTGTGCAAGGGCATCTCTGGGAAG
AGCCAGATCCTGTTTGGCTCTCGTCTTCACCACCAGGTACCTGGACCTGTTTACCAACTTCATCTCCATCTACAACACAG
TAATGAAGTGTTTCTCCTCTGTGCCTATGTTACAGTGTACATGATATATGGGAAATCCGTAACACTTTTGACAG
TGAGAATGACACATTCCGCCTGGAGTTTCTTCTGGTCCCAGTCATTGGCCTTTCCTTCCTTGAACACTACAGTTTCACTC
TGCTGGAGATCCTCTGGACTTTCTCTATCTATCTGGAATCAGTGGCTATCCTGCCCCAGCTTTCATGATCAGCAAGAC
TGGAGAGGCTGAGACCATAACTACTCACTACCTGTTCTTCTGGGTCTGTACCGGGCACTCTACCTGGCTAACTGGATC
AGGCGGTACCAGACTGAGAATTTCTATGACCAAATTCAGATCGTGTCTGGAGTAGTACAAACCATCTTCTACTGTGAC
TTCTTCTACTGTATGTGACCAAAGTCCTTAAGGAAAGAAGTTAAGTCTCCAATGCCAATCTGAagggccgctcgag
```

NotI, XhoI

DNA-Isolation aus Bakterien

2.3.3.1. Alkalische Lyse

GTE-Lösung

Glukose	50 mM
Tris-HCl, pH 8,0	25 mM
Na ₂ EDTA	10 mM

NaOH/SDS-Lösung

NaOH	0,2 mM
SDS	1,0 %

KAc-Lösung

Eisessig	29,5 %
----------	--------

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden 2 ml einer frischen Übernachtskultur zunächst bei 15.000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 150 µl GTE-Lösung resuspendiert. Es wurden anschließend 200 µl NaOH/SDS-Lösung hinzu pipettiert. Nach sanftem Invertieren der Suspension erfolgte die Lyse der Zellen für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 150 µl KAc-Lösung hinzugegeben und die Proben 2 min auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, mit 800 µl eiskaltem Ethanol versetzt und erneut eine Zentrifugation durchgeführt. Das so gewonnene DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30 µl H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.3.3.2. Mini/Midi Prep

Klein volumige Mengen an DNA aus bis zu 5 ml Bakterienkultur wurden mit dem Miniprep Kit „innuPrep“ (Analytik Jena) isoliert.

Groß volumige Mengen an DNA aus bis zu 50 ml Bakterienkultur wurden mit dem „GenElute™ HP Plasmid Midiprep“ Kit (Sigma) aufgereinigt.

Die Präparation wurde jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.3.4. RNA-Isolierung aus Säugerzellen

Das „Direct-zol RNA MiniPrep Kit“ (Zymo Research) diente zur Gewinnung von Säugerzell-RNA und wurde unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet.

Zwecks Vorbereitung der RNA-Isolierung wurden Zellen konfluent im 6-well Format kultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurden diese mit 1x PBS gewaschen und in 500 µl „TRIzol[®] Reagent“ (life technologies) resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform hinzu pipettiert und nach starkem Mischen ein 2-Phasen-Gemisch durch Zentrifugation (12.000 x g, 4 °C, 15 min) erzeugt. Hierbei enthält die obere Phase die gewünschte RNA. Diese wurde abgenommen und zur Nukleinsäure-Fällung mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde das RNA-Präzipitat durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss erfolgte noch ein weiterer Waschschrift mit Ethanol (75 %), bevor das getrocknete Pellet in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde. Nach finaler 15-minütiger Inkubation bei 55 °C im Heizblock wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentration sowie Reinheit von Nukleinsäuren wurde mittels „NanoDrop 2000c“ (PEQLAB Biotechnologie) gemessen.

2.3.6. Restriktion von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mithilfe von Restriktionsenzymen der Firma Thermo Scientific behandelt.

Hierbei wurden die Restriktionspuffer und die Konzentration der Endonukleasen laut Herstellerangaben eingesetzt. Ein Standardansatz wurde für 2-3 h bei 37 °C inkubiert und bestand aus folgenden Komponenten:

Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym I	0,4 µl
Restriktionsenzym II	0,4 µl
RNase A	0,1 µl
DNA	1 µg
H ₂ O steril	ad 20 µl

2.3.7. pYES2.1 TOPO[®] TA-Cloning

Mithilfe des „pYES2.1 TOPO[®] TA-Cloning“ Kits (Invitrogen) wurden Klonierungen in den pYES2.1-Vektor durchgeführt, wodurch auch eine anschließende Sequenzierung möglich

wurde. Hierfür wurden zunächst an PCR-Fragmente Adenin-Überhänge angefügt und anschließend mit linearisiertem Vektor nach Herstellerangaben ligiert. Die Transformation wurde mit chemisch kompetenten TOP10 F'-Zellen durchgeführt.

2.3.8. Sequenzierung

DNA wurde durch die Firma GATC Biotech sequenziert und mittels „SeqMan“ (DNA-Star) analysiert.

2.3.9. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wird verwendet, um Nukleinsäurestränge zu vervielfältigen. Zunächst werden bei 95 °C die Wasserstoffbrücken von DNA-Doppelsträngen gelöst. Dies erlaubt das „Annealing“ von Oligonukleotid-„Primern“ bei niedrigerer Temperatur, welche als Startpunkte für die gezielte Amplifikation spezifisch eingegrenzter Sequenzen dienen. Die „Annealing“-Temperatur wurde hierbei mit der Formel $T_m = 2\text{ °C}(A+T) + 4\text{ °C}(G+C)$ berechnet. Die finale Synthese des Doppelstranges erfolgt durch die *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*) bei 72 °C.

Mithilfe des „FastStart High Fidelity PCR System“ (Roche) wurden in dieser Arbeit DNA-Fragmente amplifiziert. Der Standardansatz für eine PCR wurde folgendermaßen pipettiert:

PCR-Puffer	5,0 µl
Primer forward (100 mM)	0,25 µl
Primer reverse (100 mM)	0,25 µl
Template-DNA	100 ng
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Der PCR-Ansatz wurde für jedes Amplifikat spezifisch optimiert und die Temperaturen dem jeweiligen Primerdesign angepasst und für jede PCR evaluiert. Die PCR erfolgte im Thermocycler „Mastercycler“ (Eppendorf) nach folgendem Grundprogramm:

95 °C	2 min	
95 °C	20 s	} 30 Zyklen
55 °C	30 s	
68 °C	2 min	
68 °C	5 min	
4 °C	∞	

Der Erfolg der Amplifikation wurde per Agarosegel überprüft.

2.3.10. Agarosegelelektrophorese

10 x TBE Puffer

Tris-HCl, pH 8,0	0,89 M
Borsäure	0,89 M
Na ₂ EDTA	0,02 M

GLB ("Gel Loading Buffer")

Glyzerin	50 %
SDS	1,0 %
EDTA	125 mM
Bromphenolblau	0,05 %
Xylencyanol	0,05 %

Mittels Agarosegelelektrophorese wurden Nukleinsäurefragmente ihrer Länge nach aufgetrennt. Hierbei bildet das 1 %ige Agarosegel eine Matrix, durch welche negativ geladene Nukleinsäuren größenbedingt unterschiedlich schnell in Richtung der Anode wandern. Der DNA-Marker „HyperLadder™1kb“ (Bioline) dient hierbei zur Abschätzung der DNA-Größe.

Auftrennung von DNA

Die entsprechende Menge Agarose wurde bis zur vollständigen Auflösung in 1x TBE-Puffer gekocht und nach Abkühlen in Gelschlitten gegossen. Die Gelkammern wurden mit 1x TBE als Elektrophoresepuffer gefüllt und die im Verhältnis 1:5 mit GLB versetzten DNA-Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 400 mA unter 160 V Spannung durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch Inkubation in einer Ethidiumbromidlösung (2,5 µg/ml) für 15 min und anschließender Beleuchtung mit UV-Licht. Die Dokumentation wurde mithilfe des „ChemiDoc XRS system“ und der Software „Quantity One 4.6.2“ (Biorad) durchgeführt.

Auftrennung von RNA

Die Integrität von isolierter Säugerzell-RNA wurde in einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Hierfür wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x MOPS unter Kochen gelöst und nach Abkühlen 7,5 ml Formaldehyd (37 %) hinzugegeben. 1 µg RNA wurde mit GelRed (Biotium) versetzt und 5 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Die Elektrophorese im RNase-freien Gelkammersystem erfolgte mit 1x MOPS als Puffer bei 400 mA unter 80 V Spannung. Die Visualisierung wurde mithilfe des „Amersham Imager“ (GE Healthcare) durchgeführt.

10x MOPS

MOPS	0,2 M
Natriumacetat	50 mM
EDTA	19 mM

Es wurde RNase freies Wasser verwendet und der pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

2.3.11. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Reisolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mithilfe des „E.Z.N.A. gel extraction kit“ (Omega).

2.3.12. Ligation und Entsalzung

Die Ligation von „sticky-end“-DNA-Fragmenten wurde durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert. Hierfür wurden reisierte DNA-Fragmente entsprechend dem Herstellerprotokoll (Thermo Scientific) mit T4-Ligase und Puffer versetzt und über Nacht bei 16 °C oder alternativ 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der hohe Salzgehalt wurde generell vor weiterer Verwendung durch eine einstündige Dialyse gegen 10 %iges Glyzerin auf Dialysefiltern (0,025 µm, Millipore) reduziert.

2.3.13. Transformationsmethoden

2.3.13.1. Bakterien

Herstellung elektrokompenter *E. coli*

Das Einbringen von DNA in Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen wird als Transformation beschrieben. In dieser Arbeit wurden Bakterien ausschließlich per Elektroporation dazu gebracht, Fremd-Plasmid-DNA aufzunehmen. Hierfür müssen diese jedoch erst in einem Verfahren „elektrokompent“ gemacht werden, indem sie in ihrer logarithmischen Wachstumsphase völlig salzfrei geerntet werden.

Hierfür wurden Bakterienzellen in LB-Medium bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,7 bis 1,0 unter Standardbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und per Zentrifugation (6.000 x g, 5 min) sedimentiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem 10 % Glyzerin (steril) gewaschen und, nach Verwerfen des Überstandes, wurde das Zellpellet in gleichem Verhältnis mit 10 % Glyzerin aufgenommen. 40 µl Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
Pepton	2,0 %
Natriumchlorid	10 mM
Glukose	20 mM
Kaliumchlorid	10 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
Magnesiumsulfat	2,5 mM

Auf Eis aufgetaute elektrokompetente *E. coli* wurden mit 100 ng Plasmid-DNA unter sanftem Rühren vermischt und für 10 min inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Biorad) gegeben und mittels „GenePulser Xcell™“ (Biorad) bei 200 Ω , 2,5 kV/cm und 2,5 μ F die Elektroporation durchgeführt. Die Zellen wurden unmittelbar danach in 1 ml SOC-Medium (37 °C) aufgenommen und bis zu 1 h im Schüttler unter Standardbedingungen inkubiert. Das Ausplattieren auf Agar erfolgte im Anschluss unter Berücksichtigung der jeweiligen Selektionsbedingungen und die Inkubation wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt.

2.3.13.2. Hefen

TE-Puffer (10x)

Tris-HCl, pH 7,5	100 mM
EDTA	10 mM

Lithiumacetat (10x)

Lithiumacetat	1,0 M
---------------	-------

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt.

PEG-Lösung (50 %)

Polyethylenglykol-4000	50 %
------------------------	------

Lithiumacetat-TE-Lösung (LiAc-TE)

10x TE-Puffer	10 %
10x Lithiumacetat	10 %
H ₂ O steril	80 %

PEG-Lösung

10x TE-Puffer	10 %
10x Lithiumacetat	10 %
PEG-Lösung (50 %)	80 %

Von einer frischen Übernachtskultur *S. cerevisiae* wurde 1 ml zentrifugiert (5 min, 6.000 x g) und das Pellet mit 500 µl LiAc-TE-Lösung gewaschen, um das Restmedium zu entfernen. Nach Aufnahme des Pellets in 100 µl LiAc-TE-Lösung erfolgte die Zugabe eines Gemisches aus 10 µl Carrier-DNA (hitzeinaktiviertem Heringssperma), 200 µg Plasmid-DNA und 3 µl 10x Lithiumacetat. Im Anschluss wurden 600 µl PEG-Lösung hinzu pipettiert und der Transformationsansatz für mindestens 30 min bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Nach 15-minütigem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurden die Hefen per Zentrifugation (1 min, 15.000 x g) pelletiert. Nach zwei Waschschrritten mit je 500 µl 1x TE-Puffer wurden die Hefen auf entsprechenden d/o-Agarplatten ausplattiert und für 3-5 Tage im 30 °C Brutschrank bebrütet.

2.3.13.3. Transfektion von Säugerzellen

Die chemische Transfektion von Säugerzellen erfolgte mithilfe des „FuGENE® HD Transfection Reagent“ (Promega). Hierbei wurden zelllinienabhängig die Mengen von DNA, Zellen, Transfektionsreagenz sowie Zellkulturplatten und Inkubationszeiten im Rahmen der Herstellerangaben angepasst. Als Transfektionsmedium wurde FKS-freies OptiMEM (Gibco) verwendet.

2.3.14. Expressionsanalyse in Säugerzellen

Zwecks Analyse von Expressionsstärken wurde die quantitative PCR (qPCR) verwendet. Hierbei können mithilfe eines dsDNA-bindenden, fluoreszierenden Farbstoffes die Menge an erzeugter DNA-Amplicons indirekt nach jedem Amplifikationszyklus ermittelt werden. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR kann so ein quantitativer Echtzeitnachweis von vorhandenen DNA-Sequenzen durchgeführt werden.

2.3.14.1. cDNA-Synthese

In dieser Arbeit wurde eine zweistufige RT-qPCR (reverse Transkriptase qPCR) angewendet. Hierbei werden RNA-Transkripte zunächst in cDNA umgeschrieben und danach in der eigentlichen qPCR analysiert.

Die Synthese von cDNA wurde mit aus Säugerzellen isolierter RNA durchgeführt. Jeder Syntheseansatz wurde 5 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert und kurz auf Eis gelagert.

RNA	500 ng
Oligo dT ₍₁₈₎ -Primer	1,0 µl
dNTPs	1,0 µl
H ₂ O (RNase frei)	ad 18 µl

Die reverse Transkription wurde im Anschluss durch Zugabe folgender Komponenten initiiert. Das Programm des Thermocyclers wurde folgendermaßen durchgeführt und die cDNA im Anschluss bei -20 °C gelagert:

RNase Inhibitor	1,0 µl
5 x RT-Puffer	5,0 µl
Maxima Reverse Transkriptase	1,0 µl

Thermocycler-Programm

40 °C	1 h
70 °C	15 min
4 °C	∞

No-RT Kontrollen wurden ohne Reverse Transkriptase analog angesetzt und aufbewahrt.

2.3.14.2. qPCR

Um eine gleichbleibende qPCR-Qualität zu gewährleisten, wurde der „5 x Hot-Start-*Taq*² qPCR *EvaGreen*[®] Mix“ (Axon) verwendet. Die Forward- bzw. Reverse-Primer Konzentration wurde je nach Amplifikat spezifisch ermittelt. Die Amplifizierungseffizienz E der Primer ($2,0 \pm 0,2$) wurde durch die Geradensteigung (m) der ermittelten Ct-Werte einer dreifachen logarithmischen cDNA-Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-3}) ermittelt und basiert auf der Formel $E = 10^{(-1/m)}$.

EvaGreen-Mix	2,0 µl
Primer forward (10 mM)	x µl
Primer reverse (10 mM)	x µl
cDNA (1:10 verdünnt)	1,0 µl
H ₂ O steril	ad 10 µl

Die qPCR wurde im „CFX Connect™ Real-Time System“ (Biorad) mit der Analyse-Software „CFX Manager 3.1“ (Biorad) durchgeführt und ausgewertet. Das Programm umfasste folgende Einstellungen:

95 °C	12 min	
95 °C	15 s	} 40 Zyklen
x°C	20 s	
72 °C	20 s	
65 °C	5 s	
95 °C	5 s	

x = primerspezifisch

Die Verunreinigung von RNA-Isolaten mit genomischer DNA wurde überprüft, indem ein RNA-Ansatz ohne Reverse Transkriptase-Behandlung einer qPCR unterzogen wurde.

Die Expressionsstärke von KDEL-Rezeptoren wurde aus drei biologischen (n=3) und dem Mittelwert mindestens zweier technischer Replikate (n≥2) errechnet. Als Normierungsgrundlage diente jeweils ein Haushaltsgen (β-Aktin oder GAPDH). Diese ΔCt-Werte wurden zur Ermittlung des „fold changes“ durch die Formel $E^{-\Delta Ct}$ ermittelt. Bei zelltypübergreifenden Vergleichen bzw. der Analyse von induzierten KDELR-Expressionen, erfolgte die Normierung auf den ΔCt-Wert des jeweils angegebenen Zelltyps (ΔΔCt). Der „fold change“ wurde hierbei analog durch $E^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnet.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Zellaufschlussmethoden

2.4.1.1. Aufschluss von Hefezellen

SUMEB-Puffer

SDS	1,0 %
Harnstoff	8,0 M
MOPS, pH 6,8	10 mM
EDTA	10 mM
Bromphenolblau	0,01 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 M

MOPS wurde steril filtriert und nach dem Autoklavieren dazu gegeben.

Protease-Inhibitor-Stammlösung

Eine Tablette „protease inhibitor cocktail with EDTA“ (Roche) wurde in 2 ml sterilem H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben.

5 ml Hefesuspension einer frischen Übernachtskultur wurden zentrifugiert (6.000 x g, 5 min) und mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl SUMEB-Puffer mit 5 % Protease-Inhibitor-Stammlösung aufgenommen und in ein Aufschlussröhrchen mit 0,15 g Glasperlen (0,8-1 mm) überführt. Der Zellaufschluss erfolgte im „Homogenisator“ (Precellys[®] Evolution) und wurde dreimal für 20 s bei 3.000 x g durchgeführt, wobei zwischen jedem Aufschlussschritt eine 30-sekündige Pause abgewartet wurde.

Nach kurzem Kühlen auf Eis wurden Zelldebris und Schaum abzentrifugiert (15.000 x g, 1 min) und der Überstand mit SDS-Probenpuffer versetzt, hitzedenaturiert und zur SDS-PAGE eingesetzt.

2.4.1.2. Aufschluss von Säugerzellen

RIPA-Puffer

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

Zunächst wurde bei adhärennten Zellen das alte Medium entfernt und mit kaltem 1x PBS gewaschen. Ein an die Zellmenge und Zielprotein angepasstes Volumen des mit Proteaseinhibitor versetztem RIPA-Lysepuffers (50-100 µl für 10⁶ Zellen) wurde zu den Zellen pipettiert und diese mittels Zellschaber abgelöst. Die Lyse wurde auf Eis für 30 min unter mehrmaligem vortexen durchgeführt. Zelldebris wurden durch Zentrifugation (10 min, 15.000 x g, 4 °C) entfernt und der Überstand mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach Inkubation bei 70-100 °C im Heizblock für 2-15 min wurden die Proteinproben der SDS-PAGE zugeführt.

2.4.2. TAE-Peptide

In dieser Arbeit wurden kurze Peptid-Sequenzen verwendet, welche als artifizielle Liganden Interaktionspartner der KDELRs darstellen. Diese wurden synthetisiert und kommerziell in

lyophilisierter Form von Thermo Fisher Scientific erworben. Hierbei stellt TAE-KDEL die C-terminale Aminosäuresequenz des „Binding Proteins (BiP)“ bzw. „Glucose regulated Protein 78“ (GRP78) dar, während TAE-AAAA eine nicht KDELR-bindende Aminosäuresequenz repräsentiert. Die Peptide wurden in 1x PBS gelöst und in einer Konzentration von 50 µM verwendet.

2.4.3. Zelloberflächen-Biotinylierung von Säugerzellen

Die Menge von KDEL-Rezeptoren an der PM wurde mithilfe der Zelloberflächen-Biotinylierung quantitativ analysiert. Proteine, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind, wurden markiert und im Anschluss per SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Hierbei kam ein chemisch modifiziertes Biotin zum Einsatz, welches über einen „Spacer“-arm mit einem Sulfo-NHS-Ester verbunden ist. Das Sulfo-NHS-Ester erlaubt die Bindung an primäre Amine der Aminosäuren „R N Q K“ und bestimmt die Löslichkeit des Biotins in wässrigen Lösungen. Der „Spacer“-arm wurde in einer LC-Version („Long Chain“) und einer SS-Version (Disulfidbrücke) verwendet.

PBS

Na ₂ HPO ₄	3,2 M
KH ₂ HPO ₄	0,5 mM
KCl	1,3 mM
NaCl	135 mM

Der pH wurde eingestellt auf 7,4.

„Quenching“-Puffer

Glyzin	194 mM
Tris	25 mM

Waschlösung

RIPA-Puffer	
NaCl	300 mM
BSA	0,1 mM
Tween20	0,1 mM

Die Markierung mit Biotin wurde im 6-well Format mit Zellkulturschalen durchgeführt. Hierfür wurden Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Biotinylierung etwa 80-90 %

Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und alle weiteren Schritte mit kalten Puffern im Kühlraum auf Eis durchgeführt. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC/SS-Biotin (in PBS) unter leichtem Schütteln für 30 min. Die Biotinylierung wurde abgestoppt, indem die Zellen dreimal für 15 min mit „Quenching“-Puffer gewaschen wurden. Die biotinylierten Zellen wurden per Zellschaber aus der Zellkulturschale entfernt, abzentrifugiert (5 min, 300 x g, 4 °C) und in mit Proteaseinhibitor versetztem RIPA-Puffer lysiert. Nach Zentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer (15 min, 18.000 x g, 4 °C) erfolgte die Aufreinigung, welche mit magnetischen „Streptavidin-Beads“ (EZ-Link, Pierce) durchgeführt wurde. Streptavidin stellt ein Tetramer mit vier hochaffinen Biotin-Bindestellen da und vermindert durch seine Abwesenheit von Kohlenhydratgruppen unpezifische Bindungen. Für jede Probe im 6-well Format wurden 50 µl „Beads“ verwendet. Nach Abnahme der Gesamtproteinprobe „Input“ wurde die restliche Probe („Surface“) über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Hierbei erfolgte die Zugabe von 0,1 % Tween20, um unspezifische Bindungen der „Beads“ an die Reaktionsgefäßwand zu minimieren.

Die Trennung von „Beads“ und Zelllysat erfolgte mithilfe eines magnetischen Reaktionsgefäßständers, sodass Protein/„Bead“-Verluste, wie sie bei Zentrifugationen auftreten, minimiert wurden. Die „Beads“ wurden 10 x mit Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt. Die Elution und Denaturierung erfolgte im Heizblock, wonach die Probe der SDS-PAGE und Western Blot zugeführt wurde. Die Berechnung der prozentualen Menge von KDELRs auf der Zelloberfläche erfolgte nach Analyse der aus dem Western Blot ermittelten Signalstärken für „Input“ und „Surface“. Da KDELRs nur in geringen Mengen an der Zelloberfläche lokalisieren, wurde der Proteinanteil in der biotinylierten Probe in wesentlich höherer Konzentration aufgetragen. Die Berechnung ergibt sich also wie folgt:

$$\text{Zelloberflächenlokalisierung [\%]} = \frac{\text{"Surface" Probe} \times \text{Konzentrationsfaktor}}{\text{Gesamtprotein "Input"}} \times 100$$

Der Konzentrationsfaktor definiert sich hierbei aus den verwendeten Lysat- sowie SDS-Puffervolumina für die Gesamtproteinmenge und die Zelloberflächenfraktion.

2.4.4. Proteinexpression und Aufreinigung von RTA-Varianten

Zur Proteinexpression wurden transformierte *E. coli* BL21 (DE3) und der mit Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbare, unter der Kontrolle des T7-Promotors stehende Expressionsvektor pET-24+ verwendet. Die Produktion Poly-His-markierter RTA-Varianten (Rizin Toxin A) und des eGFP-RTA-Modellliganden erfolgte in 1.000 ml LB-Medium, welches 1 %ig mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert wurde. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 - 1,2 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG die Proteinexpression gestartet und für 5 h bei 20 °C unter Schütteln durchgeführt.

Bindepuffer

NaCl	500 mM
Imidazol	10 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	20 mM

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Elutionspuffer

NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	20 mM

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Die Zellernte und alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter Kühlung auf Eis. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte ebenfalls bei 4 °C (10 min, 6.000 x g). Das Pellet wurde zweimal mit 25 ml eiskaltem Bindepuffer gewaschen und in einem Endvolumen von 10-12 ml in Bindepuffer aufgenommen. Bei Bedarf wurde das Zellpellet bei -80 °C eingefroren und am Folgetag auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 45 μ l/ml EDTA-freier Proteaseinhibitor-Lösung wurde der Ultraschall-basierte Zellaufschluss am „Soniprep 150 Ultrasonic Desintegrator“ (MSE) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen in einem konischen Glasröhrchen im Eis-Salz-Wasserbad dauerhaft gekühlt. Die Ultraschallbehandlung wurde in fünf Zyklen mit jeweils 15 s Dauer bei 20 Microns und 30 s Pause durchgeführt. Zur Erhöhung der Aufreinigungsqualität und Erhalt der Säulenqualität wurde der Zelldebris durch Zentrifugation (10 min, 18.000 x g, 4 °C) und Filtrierung (0,8 μ m) entfernt.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte im „ÄKTA pure protein purification system“ (Cytiva). Die eigentliche Trennung von ungewünschten Proteinen basiert hierbei auf einer Ni²⁺-Sephrose Matrix, die Histidine mit hoher Affinität bindet. Das Zellysate wurde mit

einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durch 5 ml „HisTrap™“-Säulen (Cytiva) geleitet. Der verwendete Bindepuffer besitzt hierfür einen niedrigen Imidazolgehalt von 10 mM, sodass unspezifische Bindungen vermindert werden. Nach Auswaschen der nicht gebundenen Proteine mit mindestens drei Säulenvolumen an Bindepuffer, erfolgte die Elution mit Elutionspuffer, der durch seinen hohen Imidazolgehalt von 500 mM zur Verdrängung der Proteine von der Ni²⁺-Matrix führt. Die aufgereinigte Proteinlösung wurde in 53 ml „HiPrep 26/10 Desalting“-Säulen (Cytiva) entsalzt und in 1x PBS aufgenommen. Final wurde das so verdünnte Eluat in 10.000 MWCO „Vivaspin 20“-Säulen (Sartorius) mittels Zentrifugation konzentriert.

2.4.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben.

2.4.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tris-HCl/SDS

Tris-HCl, pH 8,45	3,0 M
SDS	0,3 %

3x SDS-Probenpuffer

10 % SDS	8,0 ml
0,3 M Tris-HCl, pH 6,8	6,0 ml
Glyzerin	5,0 ml
H ₂ O	1,0 ml
Bromphenolblau	

Zur Herstellung von reduzierendem Probenpuffer wurden 5 % Mercaptoethanol oder 10 mM DTT zugegeben.

5x Anodenpuffer

Tris-HCl, pH 8,9	1,0 M
------------------	-------

5x Kathodenpuffer

Tris	0,5 M
Tricin	0,5 M
SDS	0,5 %

Die SDS-PAGE wurde durchgeführt mit 10 %igen Tris/Tricin-Gelen. Hierbei besteht ein Gel aus jeweils einem Trenn- sowie Sammelgel.

Trenngel

Rotiphoresegel 30 (Roth)	5,9 ml
Tris-HCl/SDS	3,1 ml
H ₂ O dest.	7,8 ml
Glyzerin (79 %)	2,0 ml
TEMED	25 µl
APS (10 %)	80 µl

Sammelgel

Rotiphoresegel 30 (Roth)	1,6 ml
Tris-HCl/SDS	3,1 ml
H ₂ O dest.	7,8 ml
TEMED	25 µl
APS (10 %)	80 µl

Komponenten des Trenngels wurden gemischt und unmittelbar in die Gelkammer pipettiert. Zur Erzeugung einer glatten Oberfläche wurde Isopropanol hinzugegeben und nach Polymerisierung des Trenngels wieder vollständig abgenommen. Anschließend wurde das Sammelgel gemischt und auf das Trenngel gegossen. Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer gemischt und im Heizblock, angepasst an die Proteingröße sowie die Anzahl der eventuellen Transmembrandomänen, für 5-15 min bei 70-100 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung wurde mit dem „Mini-Protean II“ System (Biorad) durchgeführt. Hierbei wurde zunächst eine niedrige Spannung von 80 V angelegt, bis der Stapeleffekt der Proteine an der Grenzlinie zwischen Trenn- und Sammelgel eingetreten ist und eine Auftrennung der Proben sichtbar wurde. Die weitere Elektrophorese wurde bei 120 V abgeschlossen. „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific) fungierte als Marker (Abbildung 5).

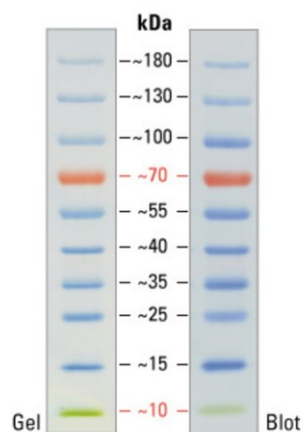


Abbildung 5: Zur Größenbestimmung verwendeter Proteinmarker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific).

2.4.7. Western Blot-Analyse

Transferpuffer

Tris	3,03 g/l
Glyzin	14,4 g/l
SDS	0,1 %
Methanol	20 %

10x TBS

Tris-HCl, pH 7,5	1,0 M
NaCl	1,0 M

Waschpuffer

10x TBS	10 %
Tween20	0,05 %

„Blocking“-Puffer A

Magermilch	5,0 %
In Waschpuffer	

„Blocking“-Puffer B

BSA	3,0 %
In Waschpuffer	

Eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF, Roche) diente als Trägermatrix für die aufgetrennten Proteine der SDS-PAGE. Diese wurde mit Methanol benetzt und in

Transferpuffer inkubiert. SDS-Gele und Filterpapiere (3 mm, Biorad) wurden ebenfalls in Transferpuffer unter sanftem Taumeln inkubiert. Der Proteintransfer wurde in einer „Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell“ (Biorad) durchgeführt. Pro Gel-Aufbau (Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier) wurde eine Stromstärke von 50 mA verwendet, mit einer Spannung von maximal 15 V für 90 min. Unmittelbar im Anschluss erfolgte eine Lagerung der Membran in „Blocking“-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter sanftem Schütteln. Antikörper wurden nach Herstellerangaben in Magermilch- oder BSA-Puffer verdünnt und für 1 h bei 20 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer und eine weitere Inkubation mit entsprechendem sekundärem Antikörper, welcher analog in „Blocking“-Puffer verdünnt unter Schütteln inkubiert wurde.

Nach 1 h wurde die Membran dreimal gewaschen und mit „SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ Kits (Thermo Scientific) benetzt. Die Chemolumineszenz wurde mittels „Amersham Imager 600“ (GE Healthcare) gemessen und analysiert.

In Tabelle 9 sind alle verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 9: Antikörper mit entsprechender Verdünnung sowie Herkunft.

Antikörper (Organismus)	Verdünnung	Herkunft
Anti-ATP1A1 (Kaninchen)	1:1000	OriGene
Anti-HA (Ratte)	1:1000	Roche
Anti-HA High Affinity (Ratte)	1:500	Roche
Anti-GAPDH (Maus)	1:1000	OriGene
Anti-Kar2p (Kaninchen)	1:10000	R. Scheckman
Anti-Pdi1 (Maus)	1:1000	abcam
Anti-V5 (Maus)	1:1000	Biorad
Anti-β-Aktin (Maus)	1:1000	abcam
Anti-β-Aktin (Kaninchen)	1:10000	abcam
Anti-Gm130 (Kaninchen)	1:10000	abcam
Anti-CD47 (Maus)	1:500	abcam
Anti-Maus-HRP	1:10000	Sigma
Anti-Kaninchen-HRP	1:10000	Sigma
Anti-Ratte-FITC	1:100	Sigma
Anti-Ratte-HRP	1:1000	Cell Signaling
Anti-Maus-AF488	1:500	abcam
Anti-Maus-AF546	1:500	Invitrogen
Anti-Maus-AF647	1:500	abcam
Anti-Kaninchen-AF488	1:500	abcam
Anti-Kaninchen-AF568	1:500	abcam
Anti-Kaninchen-AF546	1:500	Molecular Probes
Anti-Ratte-AF350	1:500	Invitrogen
Anti-Ratte-AF488	1:500	Invitrogen
Anti-Ratte-AF594	1:500	Invitrogen

2.4.8. Coomassie-Färbung

Nach erfolgter SDS-PAGE können in der Gelmatrix fixierte Proteine mithilfe einer Coomassie-Färbung unspezifisch sichtbar gemacht werden. Hierbei interagiert „Coomassie Brilliant Blue“, ein Triphenylmethan-Farbstoff, mit aromatischen und basischen Seitenketten der Aminosäuren der Proteine. Ein saurer pH-Wert führt hierbei zu einer aktiven Bindung des Farbstoffes. Zur Färbung wurden SDS-Gele mit Färbelösung bedeckt und bis zum Aufkochen erhitzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln, erfolgte das Abwaschen übermäßigen Farbstoffes unter mehrmaligem inkubieren in Entfärbelösung.

Färbelösung

Coomassie blau R	0,1 %
Methanol	30 %
Essigsäure	7,5 %

Entfärbelösung

Methanol	30 %
Essigsäure	7,5 %

2.5. Hefespezifische Methoden

2.5.1. Spektrometrische Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Kulturdichte von Hefekulturen wurde die optische Dichte bei 600 nm im Spektrometer („Ultrospec 2100 pro“, Amersham Bioscience) gemessen. Hierbei kamen Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm zum Einsatz.

2.5.2. Optische Zellzahlbestimmung

Alternativ wurde die exakte Zellzahl mittels Zählkammer (Neubauer-improved, Kammertiefe: 0,1 mm) bestimmt. 10 µl Hefesuspension wurden auf die Zählkammer pipettiert und mithilfe eines Mikroskopes ausgezählt. Die Formel zur Berechnung der Zellzahl lautet hierfür:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl in 80 Kleinquadraten} \times 4 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}}{80 \times \text{Verdünnungsstufe}}$$

2.5.3. FOA-Selektion

5-FOA d/o-Medium

5-Fluororotsäure (FOA)	0,1 %
2x d/o-Agar	50 %

5-FOA-Agar wurde hergestellt, indem eine autoklavierte, zweifach konzentrierte „Drop/out“ Agar Lösung mit gleicher Menge steril filtrierter Fluororotsäure (0,2 %) versetzt wurde. Der noch flüssige Agar wurde in Platten gegossen und bei 4 °C gelagert.

Mithilfe des *ERD2*-deletierten Hefestammes YA12 wurde die FOA-Selektion durchgeführt. Der Mangel des essenziellen HDEL-Rezeptors wird in diesem Stamm durch eine Plasmid-getragene Überexpression des Guanin Nukleotid-Austauschfaktors Sec12p kompensiert. Als Selektionsmarker fungiert hierbei *URA3*. Die FOA-Selektion wurde durchgeführt, indem YA12 (*URA3-SEC12*) mit der zu prüfenden Variante (co)transformiert wurde. Diese befindet sich auf einem *LEU2*-haltigem Plasmid. Die FOA-Selektion beruht auf dem Prinzip der katalytischen Umsetzung von 5-FOA zum zytotoxischen 5-Fluoruracil durch das Genprodukt von *URA3*. Besitzen Zellen in ihrem Genom oder auf einem Plasmid dieses Gen, können diese nicht auf 5-FOA haltigem Agar wachsen. Da nun durch den Verlust des *URA3*-Plasmides keine Überexpression von Sec12p stattfindet, können Hefezellen nur durch eine per Plasmid eingebrachte funktionelle HDEL-Rezeptorvariante die genomische *ERD2*-Deletion kompensieren.

2.5.4. Methylenblau-Agardiffusionstest

Der Methylenblau-Agardiffusionstest (MBA) dient als Methode, welche eine Aussage über die Toxinsensitivität von Hefen erlaubt. Im Falle des Killertoxin K28 kann mit dem MBA ein direktes Maß der HDEL-Rezeptoraktivität/Funktionalität ermittelt werden. Hierbei werden Hefen in Agar eingebettet und ein Loch in die Plattenmitte ausgestanzt. In dieses wird Toxin gefüllt, welches dann in den Agar diffundiert und das Wachstum in einer Hemmzone inhibiert. Hierbei steht die Toxizität in einem logarithmischen Verhältnis zum Hemmhofdurchmesser. Das im Agar befindliche Methylenblau dient hierbei der Abgrenzung von lebenden und toten Zellen.

Methylenblau-Agar

Lösung A

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

Der Ansatz wurde in 700 ml destilliertem H₂O gelöst und der pH-Wert mit K₂HPO₄ auf 4,7 eingestellt.

Lösung B

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

Der Ansatz wurde in 100 ml H₂O gelöst und steril filtriert.

Lösung C

Galaktose	30 g
Agar	16 g

Der Ansatz wurde in 200 ml H₂O gelöst.

McIlvaine Puffer pH 4.7 (100 ml)

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

Der Ansatz wurde steril filtriert.

Zur Vorbereitung eines MBA-Tests wurde eine definierte Anzahl an Hefen ($OD_{600}=0.68$ in 1 ml H₂O) aus Übernachtskulturen in 15 ml verflüssigten und auf 56 °C abgekühlten Agar gegeben. Mittels Korkbohrer wurde ein Loch in die Mitte der Agarplatte gestanzt und 100 µl K28-Toxinkonzentrat (in McIlvaine-Puffer) eingefüllt. Die Platten wurden 5-7 Tage bei 20° C inkubiert und der Hemmhofdurchmesser dokumentiert.

2.6. Säugerspezifische Methoden

2.6.1. Bestimmung der Zellzahl

Säugerzellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Kammertiefe) gezählt. Hierfür wurden adhärente Zellen analog zum Passagieren in der Zellkulturflasche mit 1x PBS

gewaschen und per Trypsin-Verdau oder Zellschaber abgelöst sowie in Medium aufgenommen. Suspensionszellen wurden hingegen direkt auf die Zählkammer aufgetropft. 10 µl Zellsuspension wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und mit folgender Gleichung wurde die Zellzahl ermittelt:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl in 4 Quadraten}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.6.2. Bestimmung der Zellgröße

Adhärente Säugerzellen wurden durch eine Trypsin-Behandlung abgelöst und nach Herstellerangaben mithilfe des „CASY Zellzähler- und Analysesystem“ (Omni Life Science) auf ihre Größe und Zellzahl untersucht.

2.6.3. Herstellung stabil transfizierter Zellen

Die Herstellung von stabil transfizierten Zellen wurde mit dem Flp-In™-System der Firma Thermo Fisher durchgeführt. Das Flp-In™-System basiert auf stabil integrierten FRT-Stellen im Genom, welche eine gezielte Integration eines gewünschten Genes durch einen Flp-In™-Expressionsvektor erlaubt. Hierzu wurde eine Co-Transfektion mit dem Flp-Rekombinase-Vektor pOG44 durchgeführt, welcher die gezielte Integration ermöglicht. In diesem Fall wurde die Flp-In™ T-REx™ 293 Zelllinie nach Herstellerangaben mit dem gewünschten Gen auf einem pcDNA™5/FRT-Plasmid transfiziert, Einzelklone selektiert und auf die Insertion hin überprüft. Das Gen steht folglich unter Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren CMV-Promotors.

2.6.4. Viabilitätsbestimmung mittels XTT-Assay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate bzw. Viabilität von Säugerzellen wurde der kolorimetrische XTT-Assay angewendet, welcher auf dem MTT-Assay beruht (Mosmann, 1983). Hierbei wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase genutzt, um die Stoffwechselaktivität von Zellen zu ermitteln und so deren Viabilität abzuschätzen. Diese Dehydrogenase ist nur in metabolisch aktiven Zellen in der Lage, das zugesetzte gelbliche Tetrazoliumsalz XTT (2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid) in ein oranges Formazan-Derivat zu reduzieren, welches bei 450 nm detektiert werden kann. Hierfür wurde das „Cell Proliferation Kit II“ (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Prinzipiell wurden hierfür Zellen im 24- oder 48- well Format ausgesät und für 24 h in phenolrotfreiem Medium kultiviert. Nach einer 24-stündigen Toxinbehandlung erfolgte die Viabilitätsbestimmung. Die Zellkulturschalen wurden

abzentrifugiert (3 min, 300 x g) und 1 x mit PBS gewaschen. 200 µl phenolrotfreies Medium mit 50 µl XTT-Reagenz im 24-well Format (bzw. 100 µl Medium und 25 µl XTT-Reagenz im 48-well Format) wurden für 3 h bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach kurzer Zentrifugation der Platten bei 300 x g photometrisch vermessen.

2.6.5. Indirekte Immunfluoreszenz - fixierte Präparate

Ca²⁺-Ringerlösung

NaCl	8,6 g
KCl	0,3 g
CaCl ₂	0,33 g
HEPES, pH 7,35	1,0 g
H ₂ O steril	ad 1,0 l

Formaldehydlösung

Formaldehyd	3 %
-------------	-----

In Ringerlösung bei 60-70 °C gelöst und steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Permeabilisierungslösung

Triton-X-100	0,1 %
--------------	-------

Nach Ansetzen in Ringerlösung wurde die Lösung steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Säugerzellen wurden, sofern nicht anders angegeben, 48 h nach transienter Transfektion oder 24 h nach Induktion der stabil transfizierten Flp-InTM T-RExTM-Zelllinien präpariert. Hierfür wurde zunächst das Medium entfernt und der Zellrasen mit Ca²⁺-Ringerlösung gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 10 min in 3 %iger Formaldehydlösung, worauf zwei Waschschrte mit Ringerlösung folgten. Die Zellmembran wurde mit 0,1 %iger Triton-X-100 Lösung für 10 min permeabilisiert, woraufhin abermals zweimal mit Ringerlösung gewaschen wurde. Vor Antikörperbehandlungen wurden die Proben 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit 2 % BSA in Ringerlösung inkubiert. Nach drei Waschschrten erfolgte die Primär- und Sekundär-Antikörperbehandlung nach Herstellerangaben. Zwischen den Antikörperbehandlungen sowie vor der Mikroskopie erfolgten 3 zusätzliche Waschschrte, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Die Darstellung von Zellkernen, bzw. die Gegenfärbung der Zelloberflächen, erfolgte nach Herstellerangaben mit DAPI (Roth) bzw. ConcanavalinA CF405s (Biotium).

2.6.6. Indirekte Immunfluoreszenz – „Live Cell Imaging“

Säugerzellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn in phenolrotfreiem Medium so ausgesät, dass etwa 50 % Konfluenz erreicht wurden. Verwendet wurden 35 mm „µ-Dishes“ (Ibidi) mit Plastikboden, welche einerseits zur Kultivierung, aber auch zur Mikroskopie geeignet sind.

Die Mikroskopie von lebenden Säugerzellen wurde im Inkubator-Einsatz bei 37 °C und 5 % CO₂ des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) durchgeführt.

RTA-Clustering

Unmittelbar vor Beginn der Mikroskopie wurden die lichtgeschützt und auf Eis transportierten eGFP-RTA-Modellliganden steril filtriert und 160 µg/ml in 1x PBS eingesetzt.

2.6.7. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Hochauflösende mikroskopische Aufnahmen wurden mithilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM 710 META, Carl Zeiss) angefertigt. Hierbei wurden die Objektive C-Apochromat 63x (1.20 W Korr M27-Objektiv) für Säugerzellen und EC Plan-Neofluar 100x für Hefen verwendet. Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wird punktförmig die Oberfläche der zu betrachtenden Probe abgerastert, wodurch ausbleichende Effekte vermindert werden und eine höhere Auflösung im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie erreicht wird. Die Öffnung des „Pinholes“ betrug 73 µm. Die Laserintensität im Falle der eGFP-RTA-Clusterexperimente betrug 1,1 %, während diese in anderen Experimenten an die Signalstärke angepasst wurde, um optimale Kontraste zu erreichen. eGFP wurde bei 488 nm angeregt (Filter 493-583 nm), mCherry bei 543 nm (Filter 585-733 nm), DAPI bzw. ConA bei 405 nm (Filter 410-483 nm). Die Fluorophore der sekundären Antikörper (siehe Tabelle 9) wurden mit den vom Hersteller angegebenen Wellenlängen angeregt und detektiert. Die Analyse und Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte unter Verwendung der Software Zen2.1 (Zeiss).

3. Ergebnisse

Zellulärer Proteintransport ist ein komplexer und hochregulierter Prozess, welcher das Zusammenspiel vielfältigster Faktoren beinhaltet und eine wichtige Grundlage für die Funktion und Kompartimentierung eukaryonter Zellen bildet. Hierbei geht ein kontrollierter Transport einher mit Membranströmen zwischen Organellen, welche im Sinne einer nachhaltigen Funktionalität jeder Zelle überwacht und reguliert werden müssen. Bis vor kurzem wurde KDEL-Rezeptoren in diesem Zusammenhang eine eher untergeordnete Rolle als Retentionsvermittler zugeordnet, was aber nach neuen Erkenntnissen eine Unterschätzung dieser regulatorisch hochaktiven Proteine darstellt. Die „klassische“ Retentionsfunktion von ER-residenten Chaperonen wie BiP, PDI oder Calnexin/Calreticulin stellt zwar eine zentrale Funktion für den Erhalt der funktionellen Proteinbiosynthese und -faltung dar, jedoch fungieren KDELRs im Golgi simultan auch als „Traffic“-Sensoren für Proteinströme. Mithilfe der assoziierten G-Proteine modulieren sie den Transport von Membranen sowohl in antero- als auch in retrograder Richtung (Pulvirenti *et al.*, 2008; Gianotta *et al.*, 2012; Cancino *et al.*, 2013). Das KDELR-Homolog in *S. cerevisiae*, Erd2p, lokalisiert ebenfalls in geringen Mengen an der Zelloberfläche. Dort wird der Rezeptor bspw. von K28, einem A/B Toxin mit C-terminaler HDEL-Sequenz, parasitiert, um in toxinsensitiven Zielzellen retrograd durch den sekretorischen „Pathway“ transportiert zu werden (Eisfeld *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2016b). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass auch in Säugerzellen KDELRs an der Zelloberfläche lokalisieren und dort nach Ligandenbindung einen komplexen Clusterbildungsprozess in HeLa-Zellen durchlaufen, bevor sie internalisiert werden (Becker *et al.*, 2016b). Basierend auf diesen Daten wurde ein erstes „Trafficking“-Modell dieses Prozesses erstellt, welches in dieser Arbeit als Grundlage für weiterführende Experimente bezüglich der Funktionen von KDELRs an der Zelloberfläche diente. In vorangegangenen Studien zeigten sich bereits nicht näher ausgewertete zelltypische Unterschiede bezüglich des KDELR-spezifischen Clusterverhaltens (Rammo, 2017).

Basierend auf diesen Studien sollte in der vorliegenden Arbeit das Clusterphänomen an der Zelloberfläche verschiedener Zelltypen analysiert werden. Hierbei wurde bei der Auswahl der Zellen wurde auf eine große phänotypische Diversität geachtet (Makrophagen, Epithelzellen aus unterschiedlichen Geweben, neuronale Vorläuferzellen), um vor allem eventuelle Unterschiede zwischen einzelnen Zelltypen zu ermitteln und die Bedingungen der Clusterbildung näher zu charakterisieren. Die experimentell ermittelten Daten sollten im Anschluss mithilfe von Monte-Carlo-Simulationen in ein mathematisches Modell integriert werden, welches die grundsätzlichen Bedingungen für eine Clusterentwicklung beschreibt.

Hierbei war vor allem die Auswirkung von Endozytose- und Recycling-Raten der KDELRs auf die Clusterbildung von Interesse.

3.1. KDELR-Clustering auf der Oberfläche verschiedener Säugerzelllinien

Auf der Zelloberfläche lokalisierte KDELRs können über das C-terminale HDEL-Aminosäuremotiv mit dem Liganden im umgebenden Zellkulturmedium interagieren und darauffolgend KDELR-Clusteransammlungen hervorrufen, welche zu einer verstärkten lokalen Fluoreszenzintensität führen und sich so mit der Zeit detektierbar vom Hintergrund abheben (Becker *et al.*, 2016b). Als Modellligand wurde in diesen Studien eine Variante des A/B-Toxins Rizin verwendet, welches aus den Samen des Wunderbaums *Ricinus communis* stammt und aufgrund seiner toxischen Wirkung der Gruppe der ribosomeninaktivierenden Proteine (RIP) zugeordnet wird (Olsnes 2004, Audi *et al.*, 2005). Die lektinbindende B-Untereinheit (RTB) bindet hierbei an die Zelloberfläche und führt zur Endozytose von Rizin, während die A-Untereinheit (RTA) die katalytisch aktive Domäne dieses Toxins darstellt (Spooner & Lord, 2015). Um eine gezielte KDELR-Interaktion an der Zelloberfläche zu begünstigen, wurde in der vorliegenden Arbeit die etwa 34 kDa große A-Untereinheit (RTA) verwendet, welche am C-Terminus mit einer KDELR-spezifischen HDEL-Aminosäuresequenz versehen wurde (Munro & Pelham, 1987). Die toxische Wirkung von Rizin beruht auf einer Deadenylierung der 28S-RNA der ribosomalen 60S Untereinheit, wodurch es zu einem Translationsstopp des entsprechenden Ribosoms kommt. Zur Minimierung zytotoxischer Effekte während des 180-minütigen Versuchsaufbaus wurde eine RTA^{E177D} Variante verwendet, welche eine etwa 50- bis 70-fach geringere Toxizität aufweist (Audi *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2010; Chaddock & Roberts, 1993). Die Detektion dieses Liganden erfolgte über das N-terminal lokalisierte eGFP, während die affinitätschromatographische Aufreinigung nach heterologer Expression in *E. coli* über das C-terminal angebrachte Poly-Histidin-Tag (His)₆ ermöglicht wurde (Abbildung 6a). Vor Verwendung wurde der Ligand auf seine Reinheit mittels SDS-PAGE hin überprüft und in 1xPBS umgepuffert.

Die hier verwendeten humanen Makrophagen wurden zuvor aus der Monozytenzelllinie THP1 differenziert. Die Kultivierung im Vorfeld sowie während der Experimente erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂, sofern nicht explizit anders vermerkt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Zellen gewaschen, der Modellligand in einer Endkonzentration von 160 µg/ml im entsprechenden Medium zugegeben und das Imaging gestartet. Die Dokumentation erfolgte alle 30 s über einen Zeitraum von 180 min. Alle Experimente bezüglich des KDELR-Clustering an der Zelloberfläche wurden *via* „Live Cell Imaging“ am CLSM durchgeführt.

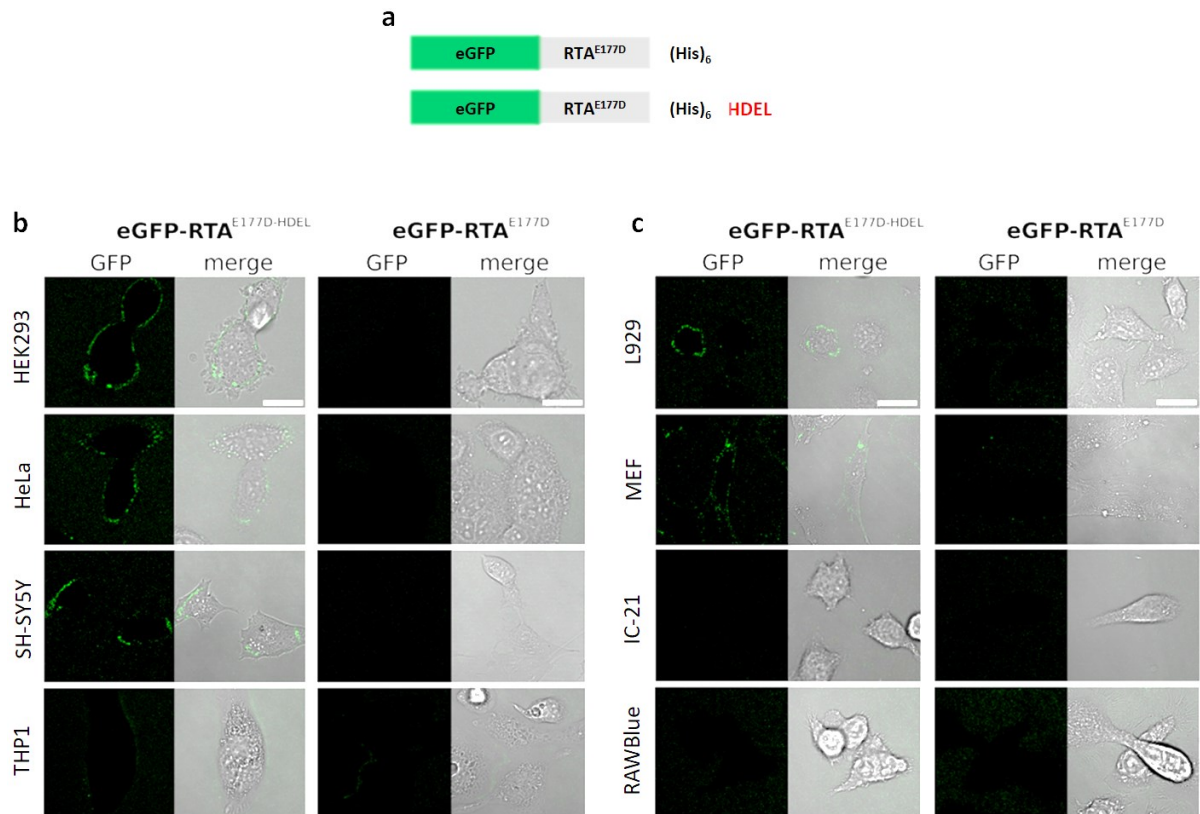


Abbildung 6: KDEL-R-Clustering an der Oberfläche unterschiedlicher Zelllinien - „Live Cell Imaging“.

a) Schematische Darstellung des fluoreszierenden Modellliganden basierend auf der α - Untereinheit des *Ricinus communis*-Toxins Rizin. In dieser Arbeit wird die 50-fach weniger toxische Variante mit der Mutation E177D verwendet, mit und ohne KDEL-spezifischem Retentionsmotiv (HDEL). Das sechsfach Histidin-Tag dient der affinitätschromatographischen Proteinaufreinigung, während das N-terminale eGFP zwecks fluoreszenzmikroskopischer Detektion angefügt wurde. b) Zelltypspezifisches KDEL-Rezeptor Clustering an der Oberfläche von humanen und c) murinen Säugerzellen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des „Live Cell Imaging“ am CLSM ($t=150$ min) mit Clusterbildung bei der Variante mit HDEL-Motiv an der Oberfläche von diversen humanen (HEK293, HeLa, SH-SY5Y) und murinen (MEF, L929) Zelllinien, jedoch nicht bei Makrophagen beider Spezies (THP1, IC-21, RAWBlue). Ohne Retentionsmotiv konnte generell kein signifikantes Clustering beobachtet werden. Der Größenstandard entspricht 20 μm .

[Abbildung (b, c) publiziert in Bauer *et al.*, 2020; modifiziert]

Abbildung 6 zeigt neben der schematischen Darstellung des Modellliganden (a) mikroskopische Aufnahmen eines repräsentativen Zeitpunktes während des Clustering-Experiments (b und c). Nach Zugabe des fluoreszierenden Modellliganden mit HDEL-Motiv zeigten sich nach kurzer Latenzphase grün fluoreszierende Bereiche an der Zelloberfläche, welche sich vom ebenfalls grün fluoreszierenden Hintergrund durch die lokale Konzentration des Liganden abzeichneten. Im Verlauf des Experiments nahmen diese Signale in Zahl, Größe und Intensität zu und traten deutlicher hervor. Dieses KDEL-R-Clustering konnte in humanen HEK293-, HeLa- sowie SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden, wohingegen humane THP1-Makrophagen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine Zunahme der Fluoreszenzintensität an der Zelloberfläche zeigten (Abbildung 6b). Auch die murinen

Zelllinien MEF und L929 zeigten in einem sehr ähnlichen Ausmaß die Bindung des KDELR-Modellliganden mit kontinuierlicher Entwicklung von Clustern (Abbildung 6c). Auch in den murinen Zelllinien konnte eine kurze Latenzphase ohne sichtbare Clusterbildung beobachtet werden, wonach sich dann Fluoreszenzsignale vom Hintergrund abhoben und in Größe sowie Intensität zunahmen. Übereinstimmend mit THP1-Makrophagen war auch bei den murinen Makrophagen RAWBlue bzw. IC-21 keine Zunahme der Fluoreszenz an der Zelloberfläche detektierbar. Ebenso zeigten sich über den gesamten Versuchsverlauf keine Cluster an Zellen, wenn der eGFP-gekoppelte RTA-Modellligand ohne KDELR-spezifisches HDEL-Retentionsmotiv verwendet wurde, sodass von einer spezifischen KDELR-abhängigen Reaktion auszugehen ist.

Somit konnte gezeigt werden, dass KDELR-Clustering nach externer Ligandenapplikation nicht nur wie bisher veröffentlicht in HeLa-Zellen, sondern auch spezies- und zelltypübergreifend auftritt. Die untersuchten Makrophagen hingegen zeigten keine vergleichbare Reaktion auf den Modellliganden und stellen somit den ersten dokumentierten Zelltyp ohne KDELR-spezifische Clusterbildung dar. Die visuelle Darstellung der Fluoreszenzintensitäten lässt zwar eine absolute Aussage über das Vorhandensein von KDELR-Clustern zu, bietet jedoch keine objektive Möglichkeit zur Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Dynamik, welche ein Clustering in manchen Zelltypen erlaubt. Eine detaillierte mathematische Auswertung dieses Prozesses wurde deshalb in enger Zusammenarbeit mit Dr. M. Reza Shaebani (Arbeitsgruppe Prof. Ludger Santen, theoretische Physik, Universität des Saarlandes) im Rahmen des SFB1027 durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Intensitäten lokaler Fluoreszenzsignale über die Versuchszeit verglichen und ein bereits etabliertes Auswertungsmodell angewandt, welches nachfolgend zunächst erläutert wird (Becker *et al.*, 2016b). Die experimentellen Rohdaten wurden zunächst in binäre Graustufen umgewandelt und Pixelintensitäten von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) zugeordnet. Der Hintergrund um die lokalen Intensitäten wurde durch anisotrope Gauß'sche Annäherungen geglättet und das Hintergrundrauschen von den gemessenen Signalen abgezogen, wodurch die qualitative Entwicklung der Clusterintensität und -größe bestimmt werden konnte (Abbildung 7; Details in Bauer *et al.*, 2020).

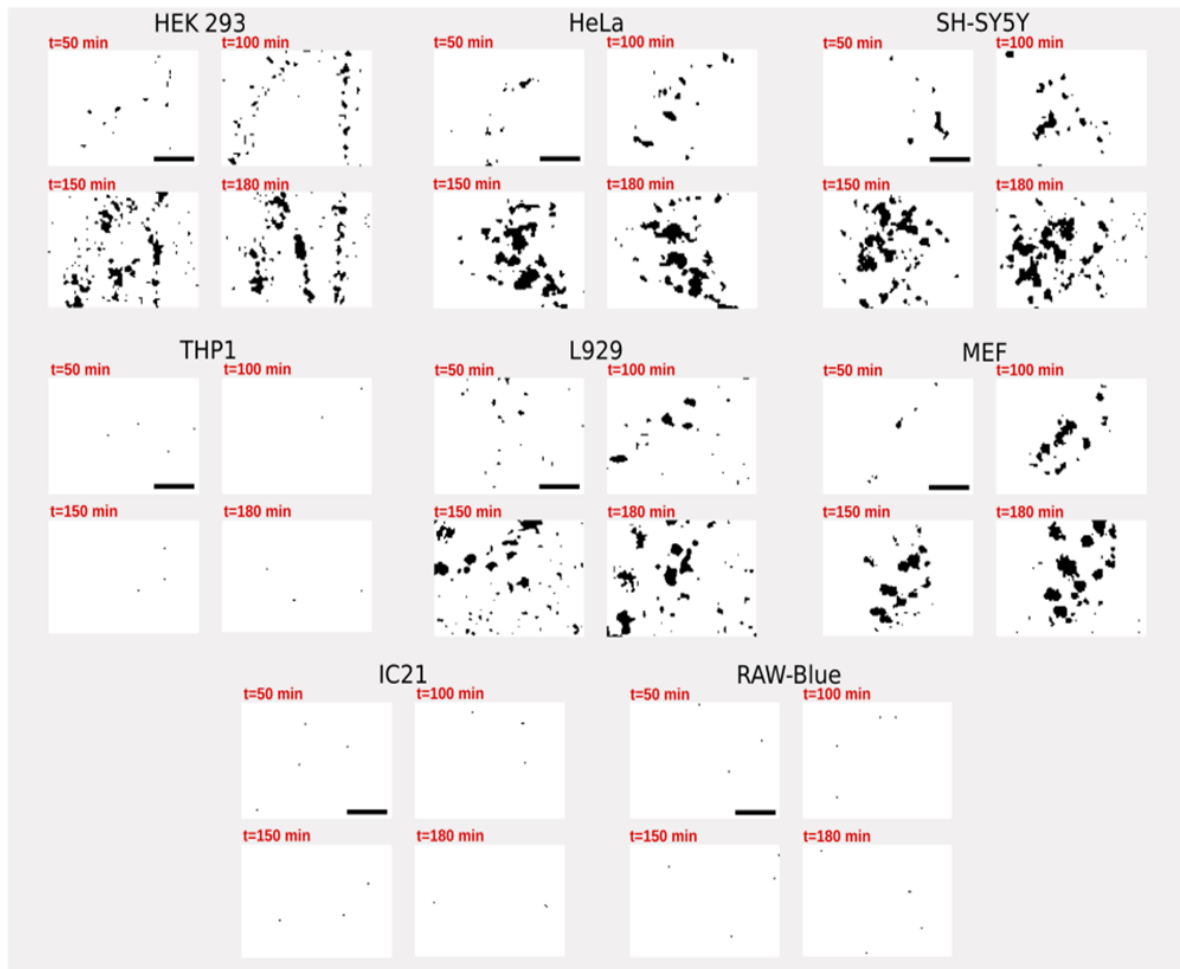


Abbildung 7: Clusterentwicklung an zufällig ausgewählten Regionen der Zelloberfläche unterschiedlicher Zelllinien.

Gezeigt sind je vier Zeitpunkte ($t=50-180$ min), welche die Entwicklung der KDEL-R-Cluster an den beschriebenen Säugerzelllinien in Größe und Intensität über die Versuchszeit hinweg darstellen. Hierfür wurden die experimentell erzeugten Bilder in Graustufen umgewandelt und das GFP-bedingte Hintergrundrauschen entfernt. Der Größenstandard entspricht $4 \mu\text{m}$.

[Abbildung publiziert in Bauer *et al.*, 2020]

In Abbildung 7 sind zufällige Bereiche der Plasmamembran abgebildet, welche über unterschiedliche Zeitpunkte ($t=50-180$ min) die Clusterentwicklung dokumentieren. Bei clusternden Zelllinien waren anfänglich erste Ansammlungen des Liganden als kleine schwarze Stellen sichtbar, welche im Verlauf des Experiments an Größe sowie Intensität zunahmten. Die untersuchten Makrophagenzelllinien zeigten nur vereinzelte, zufällige Punkte, die sich nicht über das Hintergrundrauschen hinweg in Größe und Form entwickelten. Diese Umwandlung der experimentell erzeugten Daten stellt die Grundlage für die nachfolgende vergleichende Analyse der Clusterentwicklung (Abbildung 8) dar und wurde für die Erstellung eines Modells (Abbildung 9) verwendet, welches die grundlegende Beziehung zwischen Clustering und Rezeptorendozytose bzw. -recycling beschreibt.

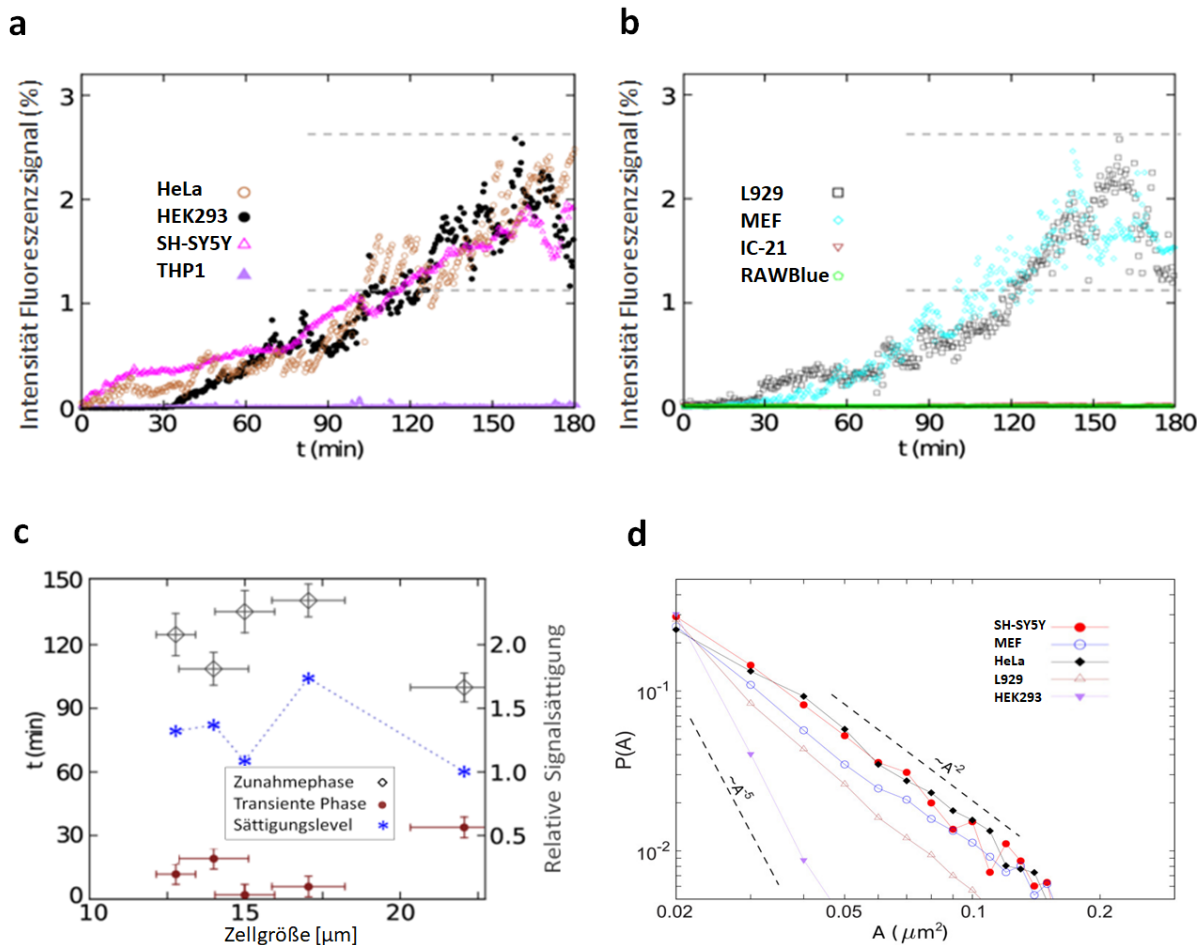


Abbildung 8: Clusterentwicklung über die Zeit an der Oberfläche verschiedener Zelltypen.

a) Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität an der Oberfläche a) humaner und b) muriner Zelllinien nach Behandlung mit eGFP-gekoppelten KDELR-Liganden (eGFP-RTA^{E177D}-HDEL). c) Kombinierte Darstellung des Zusammenhangs zwischen Zellgröße, Fluoreszenz-Sättigungslevel, der Dauer der transienten Phase sowie der Zunahmephase. d) Größenentwicklung der Cluster in Abhängigkeit vom „power-law“-Exponenten, welcher sich zwischen $\alpha \approx 2$ (HeLa) und $\alpha \approx 5$ (HEK293) bewegt, wodurch ein zufälliges oder reguliertes Recycling der KDELR-Rezeptoren an präferierte Orte der Zelloberfläche abgeleitet werden kann.

[Abbildung publiziert in Bauer *et al.*, 2020; modifiziert]

Die im Clusterexperiment ermittelten Signalintensitäten von humanen (a) und murinen (b) Zellen sind in Abbildung 8 graphisch in Abhängigkeit von der Zeit präsentiert. Allgemein lässt sich die Entwicklung bei allen clusternden Zelllinien in drei Phasen einteilen: Eine Phase der Latenz ohne sichtbare Signale, welche als „transiente Phase“ definiert wird, gefolgt von einer „Zunahmephase“ der Fluoreszenzsignale, welche sich in einer exponentiellen Wachstumskurve vom Hintergrund abhebt, bis hin zum „steady state“, in dem die Clusterbildung bzw. Fluoreszenzintensität in einem dynamischen Equilibrium um einen Mittelwert schwankt (graue Striche). In den ersten 20-30 min war vor allem bei L929-, MEF- und HEK293-Zellen eine Übergangsphase ohne deutliche Clusterbildung zu beobachten. HeLa- und SH-SY5Y-Zellen zeigten hingegen einen schnelleren initialen Anstieg, wobei der

Eintritt in die zweite Phase der exponentiellen Clusterentwicklung etwas versetzt nach 60 min eintrat. Dies war bei HEK293 und den murinen Zellen in einem fließenden Verlauf direkt nach Beendigung der transienten Übergangsphase zu beobachten. Nach etwa 2 h Inkubationszeit begannen die Zellen in die „steady state“-Phase einzutreten, welche die Homöostase zwischen Rezeptorinternalisierung und -transport zur Oberfläche darstellt. Diese Phase war dadurch gekennzeichnet, dass die Signalintensitäten auf der Zelloberfläche um einen Mittelwert schwankten. Allgemein folgte die Entwicklung bei allen clusterbildenden Zelltypen einem sehr ähnlichen und charakteristischen Verlauf, während bei Makrophagen beider Spezies über die gesamte Versuchszeit hinweg keine Clusterbildung beobachtet werden konnte.

Um erste Einblicke in die molekular-physikalischen Hintergründe der unterschiedlichen Clusterdynamiken zu erlangen, wurden die Zelltypen unter Berücksichtigung weiterer Faktoren miteinander verglichen (Abbildung 8 c). Hierfür sollten zunächst einfache Parameter wie die teils deutlich voneinander abweichende Größe der Zelltypen betrachtet werden. Damit sollte insbesondere geklärt werden, ob unterschiedlich große Membranflächen und eine damit einhergehende variable Rezeptorzahl zu einem schnelleren Eintritt in die Wachstumsphase führen oder sich sogar auf die Fluoreszenzintensität der Cluster auswirken könnten. Von zufällig ausgewählten Zellen unterschiedlicher Größe wurde das Volumen errechnet und in Bezug zum zeitlichen Verlauf der Clusterphasen und Signalsättigung betrachtet. Es konnte jedoch keinerlei Korrelation zwischen der Zellgröße und der zeitlichen Entwicklung der Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 8c). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass weniger die Ausgangsmembranfläche und somit die Zahl der anfänglichen KDELRs an der Zelloberfläche, sondern eher andere Parameter wie etwa Endozytose und Recycling der Rezeptoren einen Einfluss auf die Clusterbildung nehmen. Der Transport von KDELRs zur Zelloberfläche wurde bisher in HeLa-Zellen untersucht und darauf aufbauend ein gerichteter Transport von KDELRs an „hot spots“ der PM vermutet (Becker *et al.*, 2016b). Durch eine nahezu lineare Zunahme der Clustergrößen konnte hierbei ein gerichteter Transport von KDELRs zur Zelloberfläche vermutet werden, der sich mathematisch durch eine „power law“-Gesetzmäßigkeit beschreiben lassen kann und auch für die verwendeten Zelllinien in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden sollte. Die „power law-decay“-Darstellung in Abbildung 8d beschreibt die Anzahl der detektierten Cluster und bringt sie mit deren Größe in Zusammenhang, sodass die Fluoreszenzentwicklung als Steigung der Form $A^{-\alpha}$ dargestellt werden kann. Die Größenentwicklung der Cluster konnte auch hier durch einen „power law“-Exponenten beschrieben werden und ist durch die Formel $\alpha=1+1/\beta$ definiert. Die

Wahrscheinlichkeit eines gerichteten KDELR-Transports zur Zelloberfläche wird durch β beschrieben. Findet ein absolut zufälliger Recyclingprozess der Rezeptoren zur PM statt, sinkt die Effizienz der Clusterbildung, wobei gezielte Transportvorgänge an „hot spots“ der PM die Geschwindigkeit erhöhen. Ist der Transport zielgerichtet, kann β einen maximalen Wert von 1 annehmen, sodass es durch eine Verdopplung der Clustergröße zu einem exponentiellen Wachstum der Fluoreszenzsignale kommt. Bei einem eher zufälligen Transport ($\beta < 1$) ist α somit entsprechend höher. In dieser Arbeit wurde zunächst die Kontinuität der Clusterentwicklung in HeLa betrachtet, wobei ein „power law“-Exponent von $\alpha \approx 2$ beobachtet werden konnte. Die Clusterentwicklung von humanen SH-SY5Y und murinen MEF-Zellen findet in einem ähnlichen Rahmen statt. L929-Zellen zeigen nicht nur insgesamt kleinere Cluster, sondern auch eine etwas geringere Geschwindigkeit in der Größenentwicklung der Fluoreszenzsignale ($\alpha > 2$). Zusätzlich konnte mit HEK293 ($\alpha \approx 5$) ein Zelltyp dokumentiert werden, welcher einen ungerichteten Transport von KDELRs zur Zelloberfläche durchführt und insgesamt verhältnismäßig kleine Cluster aufzeigt. Somit kann hiervon abgeleitet werden, dass die unterschiedlichen Zelltypen charakteristische Differenzen im gerichteten KDELR-Transport aufweisen, wobei hier vor allem Varianzen in der Anzahl oder Größe von „hot spot“-Mikrodomänen der PM mit ankommenden Rezeptoren vermutet werden können. Zusammenfassend kann aufgrund dieser Analysen gefolgert werden, dass KDELR-Cluster einer definierten Entwicklung folgen. Nach der transienten Übergangsphase, in der erste Cluster durch die Schwelle des GFP-Hintergrundrauschens nicht detektierbar sind, treten die Fluoreszenzsignale in eine Zunahmephase ein bis sie eine maximale Signalintensität erreichen. Diese Zunahme ist exponentiell und stellt ein charakteristisches Merkmal zwischen verschiedenen Zelllinien dar, woraus ein gezielter Transport von KDELRs zu bestimmten Domänen der Zelloberfläche abgeleitet werden konnte. Zwischen den verschiedenen Zelltypen traten hierbei allerdings deutliche Unterschiede auf, sodass zelltypspezifische Transportvorgänge von KDELRs an der Zelloberfläche vermutet werden können.

3.1.1. Erstellung eines „Receptor Cycling“-Modells

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen sollte ein Modell erstellt werden, welches die Rahmenbedingungen der Clusterbildung hinsichtlich Endo- und Exozytoseraten von KDELRs in Zusammenhang bringt. Hierbei sollten einerseits die Grundvoraussetzungen für detektierbare Clustern definiert, aber auch Unterschiede zwischen den Rezeptortransportraten von Makrophagen und anderen Zelltypen offengelegt werden. Um eine aussagekräftige Darstellung der KDELR-Transportvorgänge zu modellieren, sollten

experimentell ermittelte Daten in Kombination mit mathematischen Berechnungen, basierend auf Monte-Carlo-Simulationen, zur Anwendung kommen (Abbildung 9).

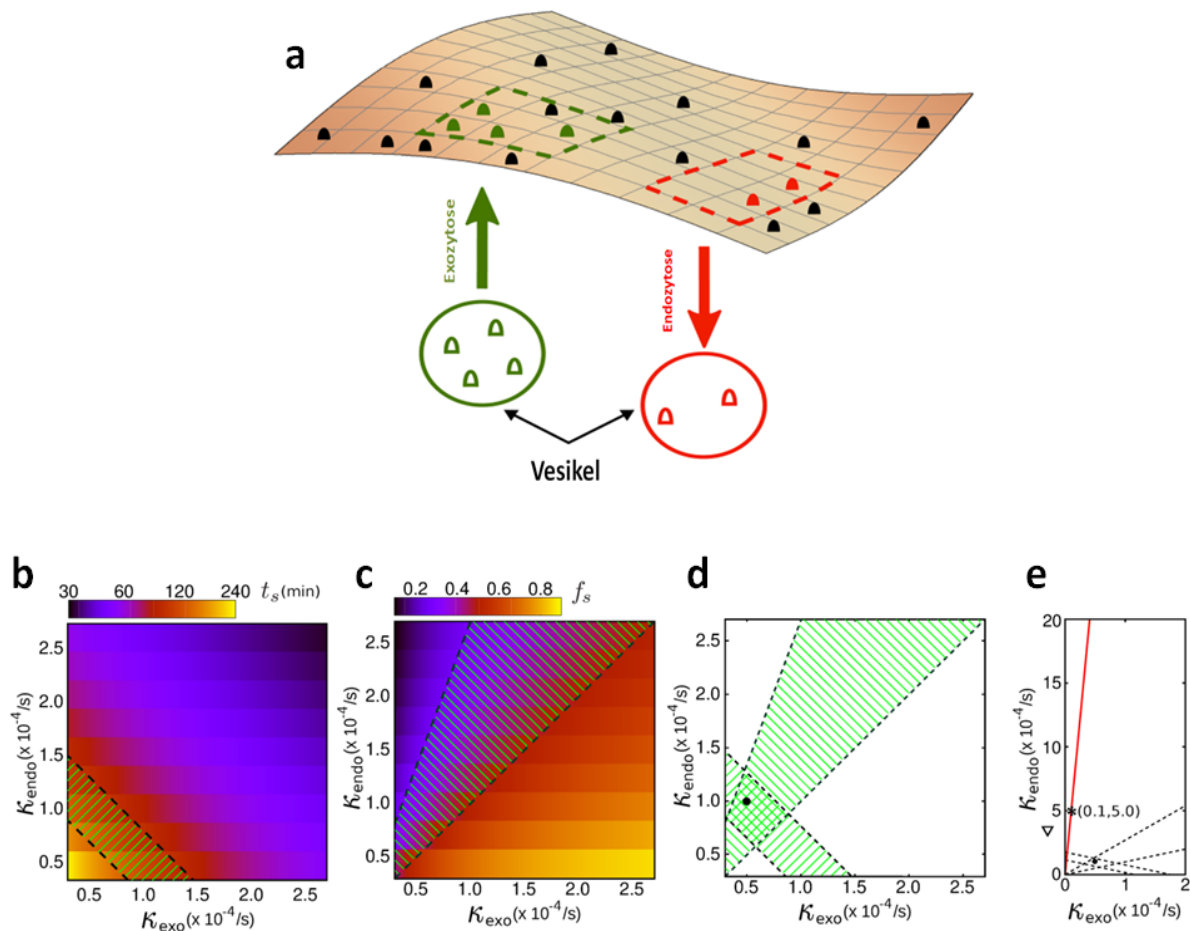


Abbildung 9: Schematischer Aufbau und Grundlagen zum „Receptor Cycling“-Modell.

a) Gezeigt ist der schematische Aufbau des verwendeten Membran-Modells, welches den Zusammenhang von Endozytose und Recycling von KDEL-Rezeptoren (schwarz, rot, grün) der Zelloberfläche beschreibt. Grüne Bereiche stellen ankommende Vesikel da, während rote Bereiche zu endozytierende Flächen darstellen. b) Darstellung der Zeit t_s und c) des relativen Rezeptor-Sättigungslevel f_s in Bezug zur Endozytose- (κ_{endo}) und Exozytose-Rate (κ_{exo}). Die schraffierten Bereiche stellen Verhältnisse dar, welche durch die experimentell ermittelten Werte in Bezug zu t_s ermittelt werden konnten bzw. welche für eine relative Rezeptormenge $f_s^{\text{min}}=0,5$ angenommen werden. d) Kombinierte Darstellung von t_s und f_s , wobei der doppelt schraffierte Bereich die wahrscheinlichen Recyclingverhältnisse bestimmt, welche in clusternden Zellen beobachtet werden konnten. Der schwarze Punkt dient als Referenzpunkt für eine Endozytose-Rate $\kappa_{\text{endo}}=1 \cdot 10^{-4}$ /s und einer Exozytose-Rate von $\kappa_{\text{exo}}=0,5 \cdot 10^{-4}$ /s, welche das KDEL-Clustering ermöglichen würden. e) Analoge Darstellung zu d), jedoch mit veränderter Skalierung und zusätzlichem Bezug auf $\kappa_{\text{endo}}/\kappa_{\text{exo}}$ -Verhältnisse, welche die Grenze ($f_s=0,02$) des detektierbaren Clustering darstellen. Unterhalb dieses Bereiches kann Clustering bis hin zum Eintritt in den „steady state“ auftreten, jedoch nicht detektiert werden. Der schwarze Stern ist ein Beispiel für eine erhöhte Endozytose-Rate ($\kappa_{\text{endo}}=5 \cdot 10^{-4}$ /s) und verringerte Exozytose-Rate ($\kappa_{\text{exo}}=0,1 \cdot 10^{-4}$ /s) der KDELs, wie sie in Makrophagen stattfinden könnte.

[Abbildung publiziert in Bauer *et al.*, 2020; modifiziert]

Abbildung 9a zeigt eine schematische Darstellung des Modells, welches die Grundlage für die nachfolgenden Simulationen und Berechnungen ist. Die Oberfläche einer Zelle wird vereinfacht als flache Membran mit einer Seitenlänge $L=10 \mu\text{m}$ dargestellt und in ein

Gitterraster mit je 5 nm Seitenlänge unterteilt, was in etwa der Größenordnung von KDEL-Rezeptoren in der Membran entspricht (Bräuer *et al.*, 2019). Jede Gitterfläche kann nun zufällig von einem KDELR besetzt sein oder leer vorliegen. Da die Clathrin-vermittelte Endozytose bei der Internalisierung von KDEL-Rezeptoren die wohl wichtigste Rolle einnimmt, werden Endozytosebereiche in der Größenordnung von Clathrinvesikeln definiert, wodurch alle KDELRs in diesen Bereichen eliminiert werden (Jia *et al.*, 2021; Agrawal *et al.*, 2010). Ebenso ist die Größe der ankommenden Vesikel in diesem Rahmen definiert, wobei die Menge an KDELRs zufällig zwischen 0 und der maximalen Kapazität des Vesikels angenommen wird.

Zunächst werden nachfolgend Parameter hergeleitet und definiert, welche der Erstellung mathematischer Grundlagen dieses Modells dienen. Die Zeit t_s zum Erreichen dieses „steady state“ ist direkt abhängig von Endozytoseraten (κ_{endo}) und Recycling- bzw. Exozytoseraten (κ_{exo}), was mathematisch mit $t_s=1/(\kappa_{\text{endo}}+\kappa_{\text{exo}})$ in Zusammenhang gebracht werden kann (mathematische Details siehe Bauer *et al.*, 2020). Aufgrund von Fluktuationen der Signalintensitäten können ebenso der Eintritt als auch das Maximum der Signale als t_s^{min} und t_s^{max} durch $\kappa_{\text{endo}}+\kappa_{\text{exo}}=1/t_s^{\text{min(max)}}$ ausgedrückt werden. In Abbildung 9b ist im schraffierten Bereich dieser Zusammenhang visuell dargestellt; er zeigt den experimentell ermittelten Zeitbereich in Kombination mit möglichen Endozytose- bzw. Exozytoseraten der KDELRs. Der „steady state“ wird in diesem Modell zudem durch das Sättigungslevel f_s definiert, welches sich direkt durch die Fluoreszenzsignale in den Experimenten ableitet. Dieses erlaubt eine indirekte Beschreibung der KDELRs der Zelloberfläche und kann naturgemäß nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen ($f_s \in [0,1]$), wobei 0 eine KDELR-freie Membran beschreibt und 1 die maximale Anzahl der dort lokalisierten KDELRs. Durch eine gesteigerte Endozytoserate bzw. eine verringerte Exozytoserate wird somit die maximal erreichbare Sättigung der KDELRs auf der PM bestimmt, was durch $f_s=\kappa_{\text{exo}}/(\kappa_{\text{endo}}+\kappa_{\text{exo}})$ beschrieben werden kann. Geht man davon aus, dass sich f_s zwischen f_s^{min} und f_s^{max} bewegt, können die Grenzen der experimentell erreichten Werte nun wie folgt definiert werden: $\kappa_{\text{endo}}=(-1+1/f_s^{\text{min(max)}})\kappa_{\text{exo}}$. Da die absolute Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu keinem Zeitpunkt bekannt ist, lassen sich auch keine exakten Werte für f_s^{min} und f_s^{max} bestimmen. Jedoch kann aus den experimentell ermittelten Daten für HeLa-Zellen das Verhältnis zwischen minimalem und maximalem Sättigungslevel auf $f_s^{\text{max}}/f_s^{\text{min}} \approx 1,85$ festgelegt werden, wodurch sich auch ohne exakte Rezeptorzahlen abschätzen lässt, inwiefern sich eine Veränderung der Endozytose- oder Exozytoserate auf die Außengrenzen des schraffierten Bereichs (in Abbildung 9c) auswirkt. In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass maximal die Hälfte aller

Oberflächen-KDELs auch tatsächlich im „steady state“ an der PM präsent sind ($f_s^{\max}=0,5$). Dadurch lässt sich f_s^{\min} als $\sim 0,27$ festlegen und definiert so den schraffierten Bereich. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass eine Änderung von f_s^{\max} Auswirkungen auf die Außengrenzen des schraffierten Bereichs hat. In dem hier später ausgearbeiteten Aspekt spielt dies aber nur eine untergeordnete Rolle und kann daher zunächst vernachlässigt werden. Durch die mathematischen Beziehungen zwischen den hier hergeleiteten Parametern können diese, wie in Abbildung 9d, kombiniert dargestellt werden. Es ergibt sich ein doppelt schraffierter Bereich, welcher die Endozytose- und Recycling-Raten der hier untersuchten clusternden Zellen widerspiegelt. Als Nächstes sollte anhand dieses Modells eine Veränderung der Rezeptortransportraten als mögliche Ursache für den ausbleibenden Cluster-Phänotyp in Makrophagen betrachtet werden. Zunächst muss hierfür festgehalten werden, dass Fluoreszenzsignale zur Detektion in ihrer Intensität stärker als das eGFP-Hintergrundrauschen sein müssen. Dieses Modell definiert diesen Schwellenwert durch $f_s=0,02$. Folglich kann von diesem Modell auch abgeleitet werden, ob biologisch sinnvolle Transportraten existieren, ohne dass sich dies in diesem experimentellen Setup als Clustering darstellt. Um die Grenzen dieses Systems besser abschätzen zu können, wurde zunächst ein willkürlicher Startpunkt aus dem doppelt schraffierten Bereich in Abbildung 9d gewählt. Ausgehend von einer Endozytoserate von $\kappa_{\text{endo}}=1$ und einer Exozytoserate von $\kappa_{\text{exo}}=0,5$ müsste bei gleichbleibender Recyclingrate κ_{endo} 25-fach ansteigen bzw. bei gleichbleibender Endozytoserate κ_{exo} 25-fach schwächer ausfallen, um die Rezeptorsättigung unterhalb von $f_s=0,02$ zu erreichen. Diese mathematisch korrekte Darstellung hilft beim Verständnis des Modells, sie ist physiologisch allerdings eher weniger sinnvoll, da lediglich maximale Grenzen der Verhältnisse dargestellt werden. Abbildung 9e zeigt daher, dass auch realistischere Verhältnisse zu einem nicht nachweisbar clusternden Phänotyp führen würden, indem man die maximal errechneten Grenzwerte entlang der roten Linie in einen physiologisch sinnvolleren Bereich verschiebt. Etwa eine erhöhte Endozytoserate ($\kappa_{\text{endo}}=5$) in Kombination mit verringertem Rezeptorrecycling ($\kappa_{\text{exo}}=0,5$) würde ebenfalls zu einem nicht detektierbaren KDEL-Clustering führen (schwarzer Stern), welches sogar in eine „steady state“-Phase eintreten kann. Zu beachten ist hierbei, dass die gestrichelten Linien durch die abgewandelte Skalierung im Vergleich zu den vorherigen Abbildungen 9b, c und d leicht verzerrt dargestellt werden. Hierdurch wird jedoch sichtbar, dass eine Veränderung der in c) getroffenen Annahme von $f_s^{\max}=0,5$ die hier ermittelten Raten von κ_{endo} und κ_{exo} zwar beeinflussen würden, dies aber qualitativ nur vernachlässigbare Auswirkungen auf das hier vorgestellte Modell hätte.

Mit dieser Arbeit wurde somit ein grundlegendes Modell erstellt, welches die Beziehung zwischen Endo- und Exozytose der KDELRs in Verbindung zum Clustering stellt. Es sind zwar keine exakten Aussagen in Form von absoluten Zahlen über Transportvorgänge möglich, jedoch lassen sich bedingt durch die Ableitung relativer Verhältnisse des Rezeptorrecyclings aus experimentellen Daten die Rahmenbedingungen für das Clustering definieren. Hieraus lässt sich die Abwesenheit von Clustern auf der Zelloberfläche in diesem experimentellen Setup dadurch erklären, dass die Rezeptortransportraten in einem bestimmten Verhältnis stehen müssen, um überhaupt erst detektiert werden zu können bzw. zu einem nachhaltigen Clustering bis hin zum „steady state“ führen zu können.

Eine Voraussetzung, um KDELR-abhängige Cluster an der Zelloberfläche zu bilden, liegt einerseits in der ausreichenden Expression von KDELRs, aber auch in deren Lokalisation an der Zelloberfläche. Falls die Zahl der KDELRs in Makrophagen deutlich geringer ausfallen sollte als in anderen Zelllinien, könnte dies einen ersten Hinweis auf die molekularen Grundlagen einer ausbleibenden Clusterbildung liefern. Zudem wurde bisher noch nicht die Frage geklärt, ob einzelne KDELR-Subtypen für das Clustering verantwortlich sind oder eine Kombination verschiedener KDELRs auf der Zelloberfläche dazu beiträgt. Um auszuschließen, dass die hier betrachteten Makrophagen über eine deutlich geringere KDELR-Expression als die clusterbildenden Zellen verfügen, wurden zunächst Expressionsanalysen der drei KDELR-Subtypen durchgeführt. Hierfür wurden die Expressionslevel der einzelnen KDELRs in allen verwendeten Zelllinien mittels einer zweistufigen RT-qPCR bestimmt. Eine Expressionsanalyse humaner KDELR-Rezeptoren wurde bereits in vorherigen Studien durchgeführt, sodass teilweise etablierte Primerpaare für humane KDELRs und die Haushaltsgene GAPDH sowie β -Aktin übernommen werden konnten (Blum, 2018). qPCR-Primer für murine Zelllinien mussten allerdings für die vorliegende Arbeit zunächst von Grund auf neu hergestellt und validiert werden (Details siehe Beschreibung ab 2.3.15.2). Zur Untersuchung der KDELR-Expressionen innerhalb der hier verwendeten Säugerzelllinien wurde RNA von Triplikaten zu je 1×10^6 Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und *via* qPCR die Expression in Form von Δ Ct-Werten ermittelt (Abbildung 10).

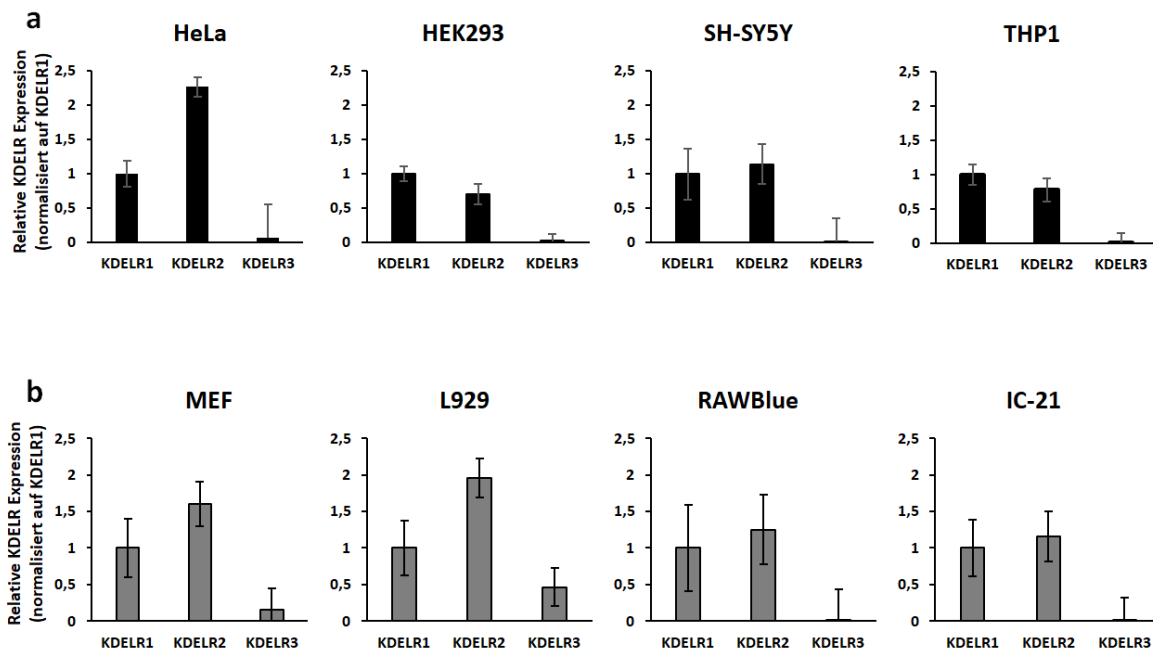


Abbildung 10: Relative KDEL R-Genexpression in humanen und murinen Säugerzelllinien .

Gezeigt ist die Expression von KDEL R1-3 in den a) humanen Zelllinien HeLa, HEK293, SH-SY5Y und THP1-Makrophagen bzw. in den b) murinen Zelllinien MEF, L929, RAWBlue und IC-21. Vor Ermittlung der relativen Expression wurden die Δ Ct-Werte auf das Referenzgen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von $n \geq 2$ technischen Replikaten und $n=3$ biologischen Replikaten.

In Abbildung 10 sind die relativen Expressionsverhältnisse der drei KDEL R-Gene in humanen (a) und murinen (b) Zelllinien nach Normierung auf ein Haushaltsgen (*GAPDH*) dargestellt. Hier wurde eine vergleichende Betrachtung der qPCR-Ergebnisse gewählt, bei der die Expression der Rezeptoren auf KDEL R1 normiert wurde. Bei vergleichender Betrachtung der relativen Expression der verschiedenen Zelllinien zeigten sich zwei Expressionsmuster: Eine etwa gleichstarke Expression von KDEL R1 und KDEL R2 in HEK293 und den untersuchten Makrophagen THP1, RAWBlue und IC-21 sowie eine verstärkte Expression von KDEL R2 in HeLa, MEF und L929 in 1,5- bis 2,25-facher Menge im Vergleich zu KDEL R1. Übereinstimmend mit bisherigen Studien wurde KDEL R3 in den humanen Zelllinien generell in einem äußerst geringen Ausmaß exprimiert (Raykhel *et al.*, 2007; Trychta *et al.*, 2018). Die murine Zelllinie MEF zeigte hingegen eine leicht erhöhte KDEL R3-Expression, wobei in L929 relativ gesehen mehr KDEL R-Transkripte nachweisbar waren. Das Verhältnis von KDEL R3 zu KDEL R1 betrug hier nahezu 0,5. Es zeigte sich jedoch zwischen Makrophagen beider Spezies und den übrigen Zelllinien keine offensichtliche Korrelation bezüglich der relativen Expression der KDEL R-Subtypen und der Clusterbildung. Nicht clusternde Zellen zeigten insgesamt etwa die gleiche Menge an KDEL R1 und KDEL R2, jedoch war dieses Verhältnis ebenfalls in SH-SY5Y zu beobachten sowie tendenziell auch in HEK293-Zellen.

Aus den relativen Verhältnissen der KDELR-Subtypen konnte folglich kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der An- oder Abwesenheit von Clustern auf der Zelloberfläche abgeleitet werden. Somit scheint nicht etwa ein bestimmter KDELR-Subtyp hauptsächlich für das Clusteringphänomen verantwortlich zu sein. In einer weiterführenden Analyse sollte deshalb betrachtet werden, inwiefern sich die Rezeptormengen zwischen den Zelllinien unterscheiden. Um zu ermitteln, ob Makrophagen bspw. insgesamt über weniger KDELRs verfügen als andere Zelltypen, wurden die relativen ΔC_t -Werte auf eine repräsentativ clusternde Zelllinie (HeLa bzw. L929) normiert (Abbildung 11).

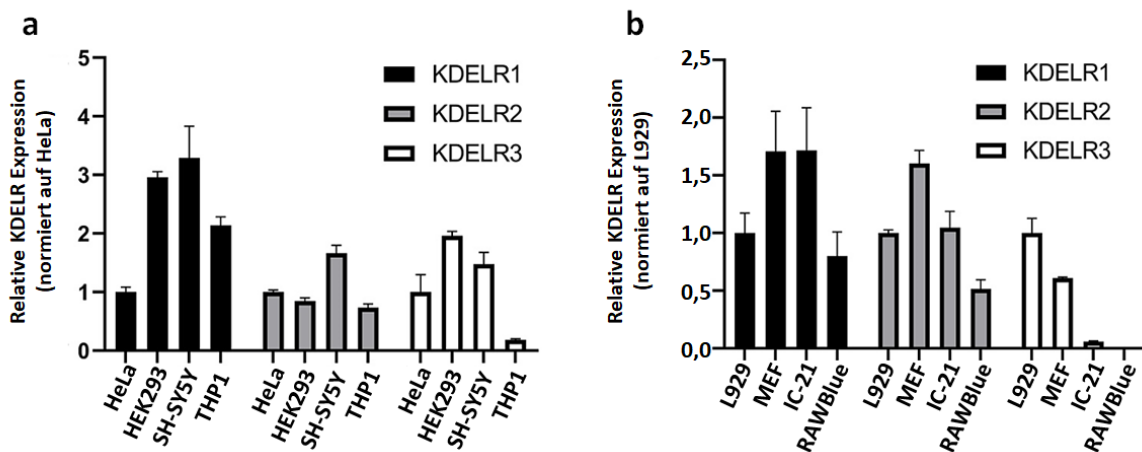


Abbildung 11: Vergleichende KDELR-Genexpressionslevel in humanen und murinen Säugierzelllinien

Gezeigt sind $\Delta\Delta C_t$ -Werte von KDELR-Genexpressionsanalysen a) humaner bzw. b) muriner Säugierzellen. Die Werte von KDELR1-3 sind jeweils normiert auf HeLa bzw. L929.

[Abbildung publiziert in Bauer *et al.*, 2020 modifiziert]

Aus Abbildung 11 geht hervor, dass auf absoluter transkriptioneller Ebene erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen auftreten. Clusternde Zelllinien wie HEK293 oder SH-SY5Y und nicht clusternde THP1-abstammende Makrophagen zeigten etwa eine zwei- bis dreifache KDELR1-Menge im Vergleich zu HeLa. Die Menge an KDELR2 war hingegen bei allen untersuchten Zelltypen vergleichbar, mit Ausnahme von SH-SY5Y. Die relative Menge des generell nur sehr schwach exprimierten KDELR3 (siehe Abbildung 10) unterscheidet sich ebenfalls in ähnlichem Maße zwischen HeLa und SH-SY5Y, wobei hier aber auch bis zu doppelt so viele Transkripte in HEK293 nachgewiesen werden konnten. Einzig die Anzahl an KDELR3-Transkripten in den THP1-abstammenden Makrophagen lag unterhalb anderer Zelllinien. In murinen MEF-Zellen betrug die KDELR1- und KDELR2-Menge etwa das 1,5-fache, während von KDELR3 nur halb so viele Transkripte nachgewiesen werden konnten. Die nicht clusternden IC-21 zeigten ebenso eine etwa 1,5-fache Anzahl an KDELR1 sowie vergleichbare Level an KDELR2. Auch in

RAWBlue-Makrophagen waren weniger KDELR1-Transkripte und, mit nur etwa 50 % der Expressionsstärke eine deutlich verringerte Menge an KDELR2 nachzuweisen. Beide murinen Makrophagenzelllinien zeigten nur eine marginale Anzahl an Transkripten für KDELR3, was eine Korrelation mit der ausbleibenden Clusterentwicklung darstellt.

3.1.2. KDELR-Clustering in Makrophagen

Aufgrund der durchgeführten Expressionsanalyse konnte ausgeschlossen werden, dass Zellen ohne Cluster über bedeutend weniger KDELRs verfügen. Diese Analyse schließt somit aus, dass ein niedriges intrazelluläres KDELR-Level die alleinige Ursache für nicht clusternde Makrophagen darstellt. Die intrazelluläre Verteilung der KDELRs, insbesondere an der PM oder in peripheren Zellbereichen, könnte sich jedoch ausschlaggebend auf die Clusterbildung auswirken. Daher wäre es im nächsten Schritt sinnvoll, die wildtypische Lokalisation in Makrophagen näher zu untersuchen, wobei die bis dato kommerziell erhältlichen Antikörper hierfür nicht spezifisch genug sind. Auch eine Transfektion und anschließende Expression von antigen- bzw. fluoreszenzmarkierten KDELRs erwies sich als sehr ineffizient und nicht auswertbar (Daten nicht gezeigt). Daher sollten die im Modell (Abbildung 9) diskutierten Transportraten der KDELRs in einem weiteren experimentellen Ansatz weiter untersucht werden. Bisherige Clusterexperimente wurden bei einer für Säugerzellen üblichen Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Geschwindigkeit von chemischen Reaktionen und biologischen Prozessen ist allerdings stark von der Temperatur abhängig, sodass auch eine verlangsamte Clusterbildung bei einer erniedrigten Temperatur vermutet werden könnte. Um die potenziell hohe Internalisierungsgeschwindigkeit von KDELRs in Makrophagen zu verringern, wurde deshalb die Versuchstemperatur in einem „Live Cell Imaging“-Setup auf den niedrigsten kontrollierbaren Wert eingestellt (20 °C).

Zur Durchführung dieses Experiments wurden RAWBlue-Makrophagen 24 h vor Versuchsbeginn ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurde das Medium entfernt und 20 °C temperiertes Medium mit eGFP-RTA^{E177D}-HDEL appliziert (Abbildung 12a). Parallel hierzu wurde eine Probe unter Standardbedingungen (37 °C) als Negativkontrolle mitgeführt (Abbildung 12b). Die Dokumentation am CLSM erfolgte über einen Zeitraum von 90 min. Durch den Abschluss der Clustering-Experimente mit erfolgreicher Erstellung eines „Receptor Cycling“-Modells wurde die Kooperation mit der AG Santen im Rahmen des SFB1027 beendet und nachfolgende Clusterexperimente ohne eine mathematische Auswertung analysiert.

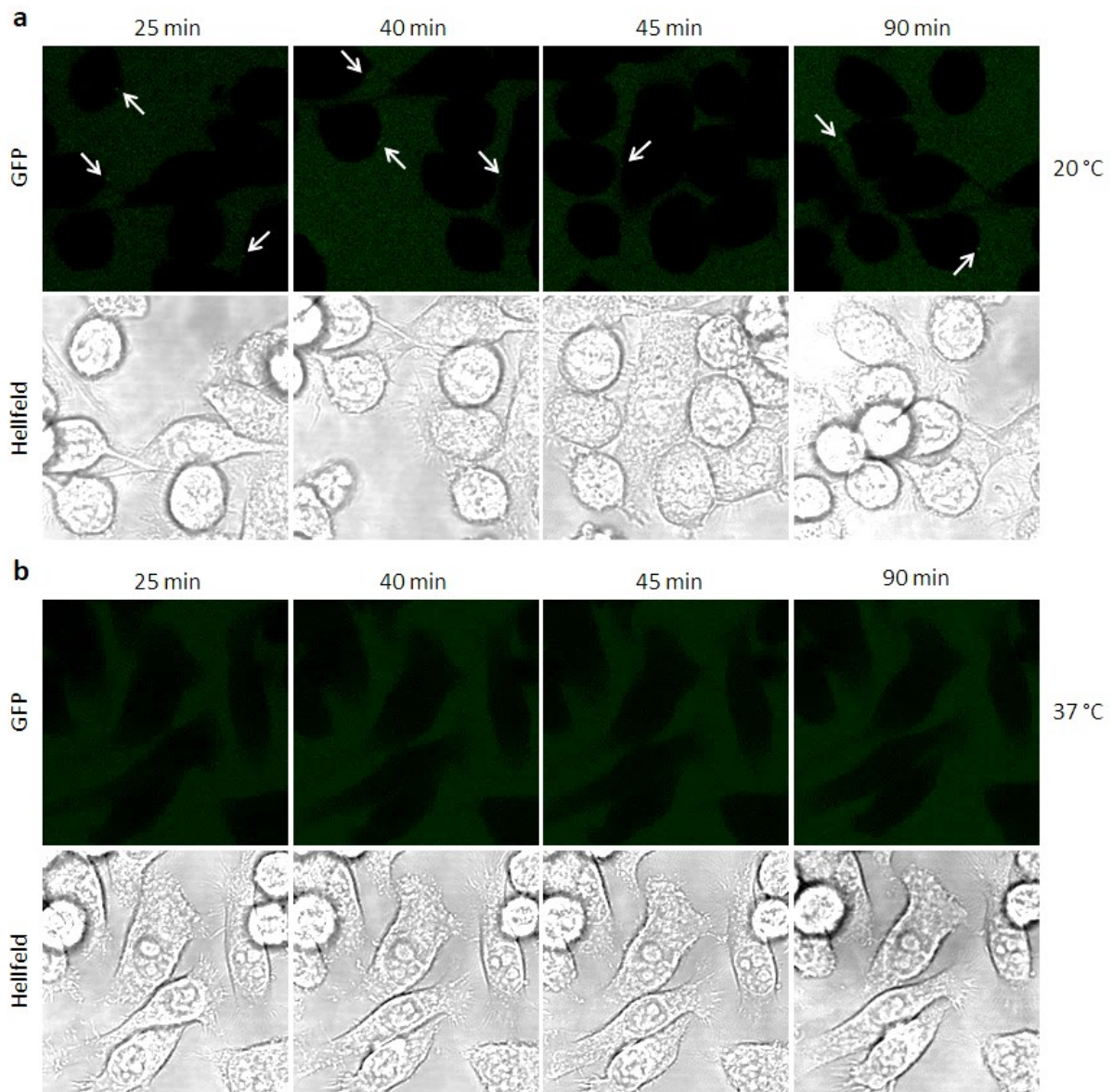


Abbildung 12: Einfluss der Temperatur auf die KDELR-Clusterentwicklung in RAWBlue-Makrophagen.

Dargestellt sind am CLSM erstellte „Live Cell Imaging“-Aufnahmen der Clusterentwicklung auf der Oberfläche von RAWBlue-Makrophagen bei a) 20 °C und b) 37 °C zu repräsentativen Zeitpunkten. Aufgrund der geringen Clusteranzahl sind in den Bildern teilweise unterschiedliche Zellen gezeigt und die Cluster mit weißen Pfeilen markiert.

Nach 25-minütiger Inkubation konnten erste, noch schwache, einzelne Fluoreszenzsignale an der Zelloberfläche von mehreren Makrophagen detektiert werden (Abbildung 12a, weiße Pfeile). Diese wurden über die Zeit (bis 90 min) nur in einem äußerst geringen Ausmaß in ihrer Intensität stärker und veränderten ihre Größe nur marginal. Aufgrund der geringen Anzahl der Cluster sind in den Bildern teilweise unterschiedliche Zellen gezeigt. Ein analoger Versuchsaufbau mit auf 37 °C temperiertem Medium (Abbildung 12b) zeigte zu keinem Zeitpunkt Fluoreszenzsignale an den Zelloberflächen, sodass unspezifische Interaktionen des Liganden ausgeschlossen werden konnten.

Folglich führte eine Verringerung der Temperatur zu einer nachweisbaren Clusterbildung nach 20-minütiger Verzögerung, wonach sich kleine Cluster bildeten und über 90 min lang konstant zu dokumentieren waren. Folglich sind Makrophagen generell dazu in der Lage, KDELR-spezifische Cluster an ihrer Zelloberfläche zu bilden, wobei diese nur in einem geringen Maße detektierbar sind.

Die Bildung von KDELR-spezifischen Clustern an der Zelloberfläche stellt also einen komplexen Mechanismus dar, welcher ein Zusammenspiel aus verschiedenen Faktoren vereint. Da bisher davon ausgegangen wird, dass eine Ligandenbindung die Clusterbildung und nachfolgende Endozytose der Rezeptoren auslöst, könnte auch die initiale Interaktion zwischen Liganden und den Rezeptoren für die Geschwindigkeit oder auch Effizienz des Clusteringprozesses ausschlaggebend sein. Es ist schon lange bekannt, dass die Rückführung ER-residenter Proteine durch KDELRs auf einem pH-abhängigem Mechanismus basiert (Wilson *et al.*, 1993). Neuere Studien konnten im Laufe dieser Arbeit zusätzlich auch die strukturellen molekularen Zusammenhänge mithilfe einer Kristallstruktur von KDELR2 aus *G. gallus* aufdecken, wodurch neue Erkenntnisse über die Rezeptor/Liganden-Interaktion gewonnen werden konnten. Der im Golgi vorliegende leicht saure pH erlaubt durch die Protonierung von His¹² eine äußerst stabile Verankerung des Retentionsmotives im Rezeptor. Dies geht simultan mit einer Konformationsänderung des Rezeptors einher, welche nach erfolgtem Rücktransport ins ER durch den pH Anstieg wieder in den ursprünglichen Zustand zurückkehren kann und der Ligand freigesetzt wird (Bräuer *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020). In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, inwiefern eine Änderung des pH die Bindung von Liganden auf der Zelloberfläche beeinflusst. Anhand der Intensität bzw. Größe der Cluster sollten so Rückschlüsse auf deren zeitliche Entwicklung näher analysiert werden. Ebenso sollte untersucht werden, ob KDELRs an der Zelloberfläche über unbekannte Mechanismen verfügen, welche auch eine Bindung von Peptiden außerhalb physiologisch vorherrschender pH-Werte zulassen.

In einem ersten Ansatz sollte die pH-Abhängigkeit der Bindung extrazellulärer Liganden an PM-lokalisierte KDELRs in HeLa-Zellen untersucht werden (Abbildung 13). Diese wurden 24 h vor Versuchsbeginn ausgesät und bei 37 °C mit dem Modellliganden behandelt. Eine Inkubationszeit von nur 15 min sollte gewährleisten, dass die Clusterentwicklung gegen Ende der stationären Phase nicht zu weit voranschreitet und schwierig zu dokumentierende Unterschiede überdeckt. Hierbei wurde steril filtrierte Medium mit einem zuvor eingestellten pH von 6,4-8 verwendet. Nach Ende der Inkubationszeit wurden mehrere Waschschrte mit 1xPBS durchgeführt.

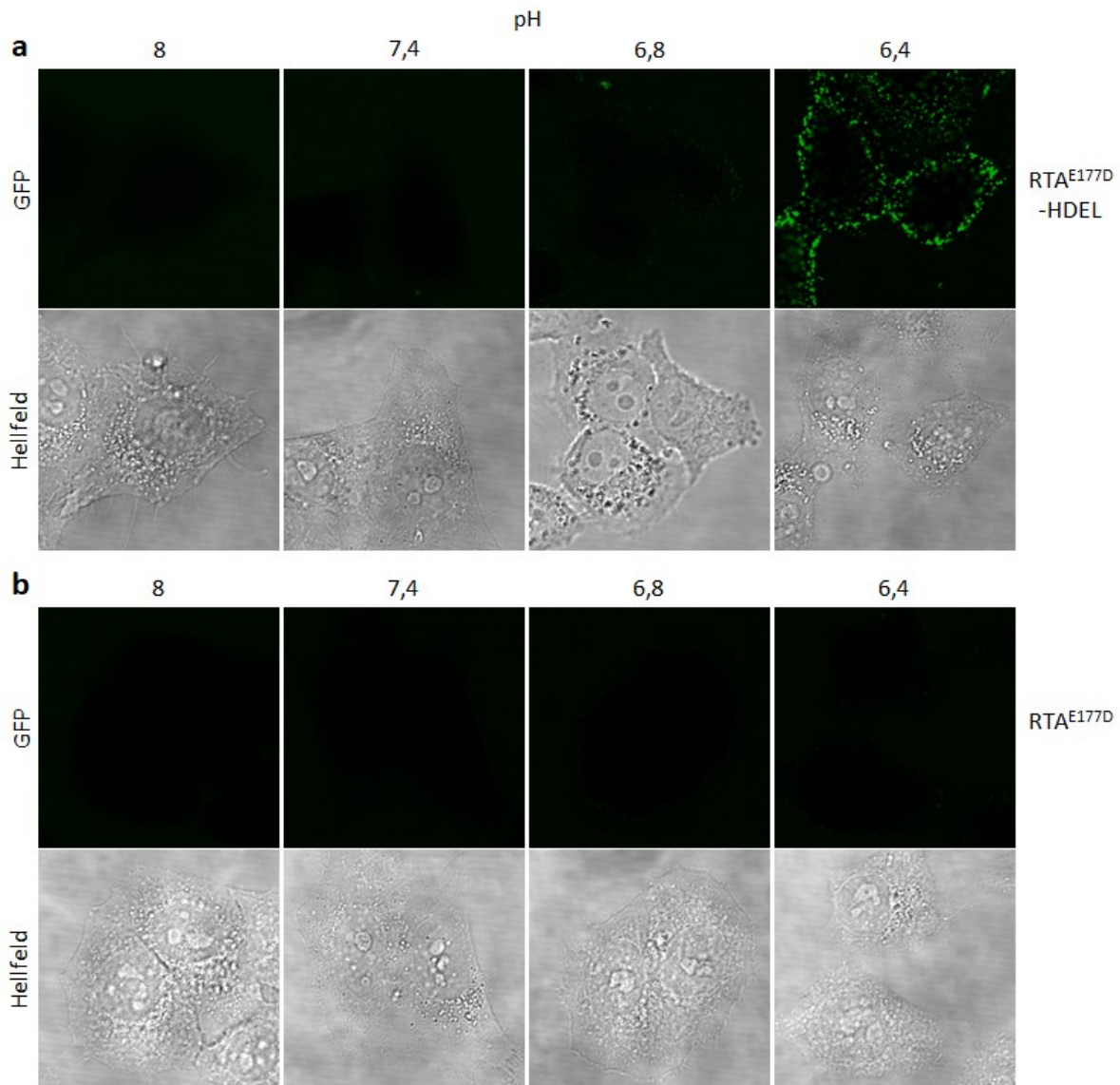


Abbildung 13: Einfluss des pH-Wertes auf die KDELR-Clusterentwicklung in HeLa-Zellen. Dargestellt sind Aufnahmen der Clusterformation auf der Oberfläche von HeLa-Zellen unter dem Einfluss verschiedener pH-Werte. Die 15-minütige Inkubation der Zellen mit dem fluoreszierenden Modellliganden erfolgte in DMEM mit den angegebenen pH-Werten. Als Ligand wurde a) eGFP-gekoppeltes RTA^{E177D}-HDEL bzw. b) die Variante eGFP-RTA^{E177D} ohne Retentionsmotiv als Negativkontrolle verwendet. Die Detektion des Fluoreszenzsignals der Cluster (grün) erfolgte am CLSM.

Abbildung 13a ist zu entnehmen, dass unter Verwendung von Medium mit den pH-Werten 8,0 und 7,4 keine Cluster innerhalb der Inkubationszeit dokumentiert werden konnten. Erst nach einer Absenkung des pH auf 6,8 zeigten sich nach 15 min erste Cluster. Eine abermalige Verringerung des pH auf 6,4 zeigte wiederum deutliche Fluoreszenzsignale entlang der Zelloberfläche. Diese waren gleichmäßig über die im Fokus liegende Peripherie der Zellen verteilt und unterschieden sich in ihrer Größe deutlich voneinander. Der gleiche Versuchsaufbau wurde mit Liganden ohne Retentionsmotiv durchgeführt, um passive Anlagerungen unter erniedrigten pH Bedingungen auszuschließen (Abbildung 13b).

Es ließ sich also beobachten, dass auch an der Zelloberfläche die Interaktion zwischen KDELRs und ihren Liganden deutlich vom pH abhängt und bei erhöhten pH-Werten keine Clusterbildung nach Ligandenzugabe detektiert werden konnte. In Einklang mit bisherigen Studien korreliert die Anzahl und Größe der Cluster mit einer Absenkung des pH, was darauf hinweist, dass der grundlegende Mechanismus der Ligandenbindung auch an der Zelloberfläche analog zu den Vorgängen in intrazellulären Membranen abläuft. Ein niedrigerer pH könnte zu einer stärkeren Rezeptor/Liganden-Interaktion und folglich zu einem effizienteren Clusteringprozess führen.

3.1.3. KDELR-Clustering in HAP1-Knockout-Zelllinien

Alle bisherigen Clusterstudien konnten nur in wildtypischen Zelllinien durchgeführt werden. Es stellt sich jedoch vor allem die Frage, ob einzelne KDELR-Subtypen Funktionen an der Zelloberfläche ausüben oder ob sie gemeinsam zum Clustering beitragen. Ein näherer Einblick in die Rolle von KDELR-Subtypen könnte durch analoge Cluster-Experimente unter Verwendung von Knockout-Mutanten erlangt werden, wobei sich die Etablierung solcher Zelllinien aber als äußerst schwierig herausstellte. Vor allem ein Knockout (KO) von KDELR1 scheint durch dessen essenzielle Funktionen nicht vollständig von anderen KDELRs kompensiert werden zu können (Blum, 2018). Hierbei konnten lediglich Klone erzeugt werden, bei denen der KO nur eines der beiden Rezeptor-Allele betrifft, wodurch die Expression von KDELR1 weiterhin in verminderter Form stattfinden konnte. Durch die Verwendung einer nahezu haploiden Zelllinie HAP1 ist es der Firma Horizon gelungen, KO-Zelllinien herzustellen, welche durch die Abwesenheit eines zweiten Allels keine kompensierenden Expressionen durchführen können. In vorangegangenen Arbeiten wurde die KDELR-Expression der wildtypischen HAP1 Zelllinie sowie der KDELR1-KO bereits per RT-qPCR verifiziert und neben einer Transkriptomanalyse erste phänotypische Charakterisierungen der HAP1 Zelllinie durchgeführt (Blum, 2018). In der vorliegenden Arbeit sollten diese Studien nun auch durch HAP1 KDELR2-KO ergänzt werden, um nach einer erfolgreichen grundlegenden Charakterisierung auch erste Clustering-Experimente in KO-Zelllinien durchzuführen. Zunächst sollte der KO von KDELR2 in HAP1-Zellen validiert werden. Hierfür wurde in einem RT-qPCR Ansatz die Expression von KDELR1-3 in den hier verwendeten HAP1-Zelllinien verglichen. Dies sollte einerseits den KO von KDELR1 bzw. KDELR2 verifizieren, andererseits aber auch eine potenzielle Kompensation des jeweiligen KO durch eine Expressionsänderung anderer KDELRs offenlegen (Abbildung 14). Die Zellen wurden für diese qPCR-Analyse 24 h im Voraus ausgesät, sodass diese zum Zeitpunkt der Lyse und RNA-Isolation nahezu konfluent vorlagen.

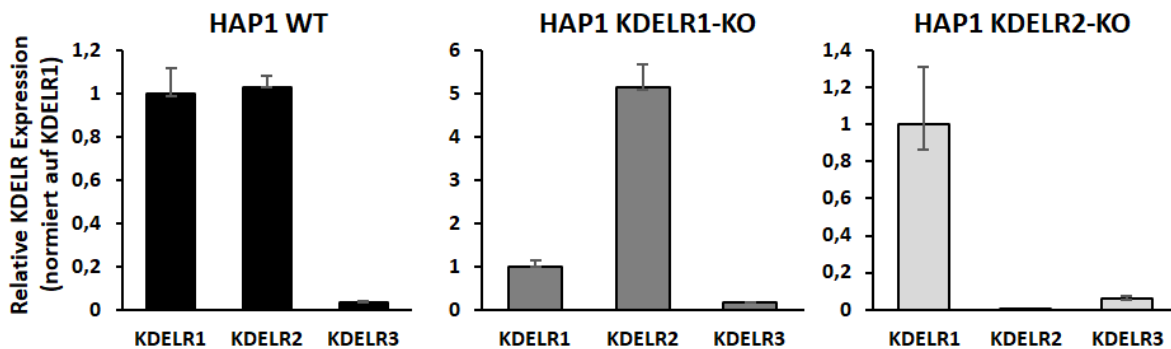


Abbildung 14: Relative KDELR-Genexpression in HAP1-Zellen.

Gezeigt sind qPCR-basierte Genexpressionsanalysen von HAP1-Zellen mit KDELR1- bzw. KDELR2-Knockout oder als wildtypische Zelllinie. Vor Ermittlung der relativen Expression wurden die Δ Ct-Werte auf das Referenzgen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die relative Genexpression der KDELRs wurde anschließend auf KDELR1 normiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von $n \geq 2$ technischen Replikaten und $n=3$ biologischen Replikaten.

Abbildung 14 bestätigt zunächst sowohl die bisher beschriebenen KDELR1-3 Expressionen in wildtypischen HAP1 als auch den KO von KDELR1 (Blum, 2018). HAP1 WT zeigte eine sehr ähnliche Anzahl an Transkripten von KDELR1 und KDELR2, während KDELR3 nur in äußerst geringen Mengen nachzuweisen war, wodurch im Expressionsverhalten gewisse Ähnlichkeiten zu den neuronalen Vorläuferzellen SH-SY5Y und THP1-Makrophagen besteht (vgl. Abbildung 10). Der KO von KDELR1 reduzierte dessen nachweisbare Transkripte im Vergleich zu KDELR2 auf etwa 20 %, während die Expression von KDELR3 auf einem ähnlich geringen Niveau stattfand, wie in wildtypischen HAP1-Zellen. Der KO von KDELR2 führte zu einer nahezu vollständigen Reduktion von KDELR2-Transkripten, wobei die Menge an KDELR3 erstmals im relativen Vergleich minimal anzusteigen schien. Somit konnte auch hier ein erfolgreicher KO von KDELR2 bestätigt werden.

Eine Darstellung der relativen Expressionen wie in Abbildung 14 erlaubt eine einfache Betrachtung der KDELR-Verhältnisse untereinander, allerdings ist es nicht möglich, eine Aussage über die absolute Menge der KDELRs zu treffen. Beispielsweise wäre es möglich, dass im Falle der KDELR1-KO Zelllinie die Reduktion der KDELR1-Transkripte zu einer vermehrten KDELR2-Expression führt, was den Mangel an funktionellem KDELR1 kompensieren könnte, aber in dieser Analyse so nicht erfasst werden kann.

Zur genaueren Untersuchung wurde daher eine weitere Analyse durchgeführt, in der die Expression der Rezeptoren durch Darstellung der $\Delta\Delta$ Ct-Werte innerhalb der Zelllinien direkt miteinander verglichen werden sollte (Abbildung 15). Die Normierung erfolgte hierbei auf wildtypische HAP1-Zellen.

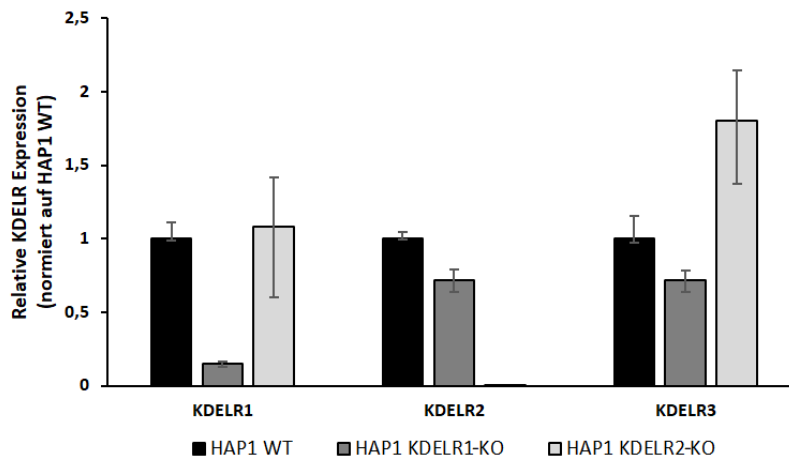


Abbildung 15: Vergleichende KDELR-Genexpressionslevel in HAP1-Zellen.

Gezeigt sind $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der qPCR-basierten Expressionsanalysen in wildtypischen HAP1 und KDELR-KO-Zellen. Die Normierung erfolgte auf den Wildtyp.

Aus Abbildung 15 geht hervor, dass ein KO von KDEL1 (HAP1 KDEL1-KO) im Vergleich zum WT zwar die RNA-Transkriptmenge von KDEL1 deutlich reduziert, jedoch keine simultane Kompensation bezüglich der Expressionsstärke von KDEL2 oder KDEL3 auftrat. Hier war die Anzahl der Transkripte von KDEL2 und KDEL3 sogar ebenfalls auf etwa 75 % reduziert. Der KO von KDEL2 führte zu einem nahezu vollständigen Stopp der KDEL2-Transkription, wobei die Menge an KDEL1 tendenziell vergleichbar mit der des Wildtypen war. Betrachtet man die Schwankungen innerhalb der Replikate, konnte allerdings auch eine Expressionsänderung im Bereich von 0,6-1,4 beobachtet werden. Interessanterweise stieg die Expression von KDEL3 nach KO von KDEL2 auf nahezu das Doppelte an. Allerdings muss hier beachtet werden, dass die Gesamttranskriptmenge verglichen mit KDEL1 sehr gering ist (vgl. Abbildung 14) und in dieser Darstellung daher Unterschiede aufgrund der Normierung auf den Wildtyp stärker ausgeprägt sind.

Zusammenfassend lässt sich ein KO der jeweiligen KDELRs in HAP1 Zelllinien bestätigen, wodurch diese Zellen prinzipiell geeignet sind, die Auswirkungen eines KDELR-KO in einem Clusteringexperiment zu untersuchen. Hier sollten diese Zelllinien zunächst in dem etablierten „Live Cell Imaging“-Setup mit dem RTA-basierten Modellliganden versetzt werden, um sie hinsichtlich ihres Clusterphänomens zu untersuchen (Abbildung 16). Analog zu vorherigen Experimenten wurden Zellen 24 h im Voraus ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde der fluoreszierende Modellligand mit HDEL-Retentionsmotiv sowie als Negativkontrolle ohne HDEL-Aminosäuremotiv in einer Konzentration von 160 µg/ml in entsprechendem Medium mit pH 6,4 appliziert und die Echtzeitdokumentation gestartet. Da diese Experimente erst in einem weitaus späteren Stadium dieser Arbeit

durchgeführt werden konnten, erfolgt nur eine rein visuelle Analyse der Clusterbildung. Damit einhergehend wurde die Versuchszeit auf 45 min begrenzt.

Zunächst sollte untersucht werden, ob HAP1-Zellen ebenfalls in der Lage sind, Cluster zu bilden und inwiefern sich diese in einen Kontext zu den bisher untersuchten Zellen einordnen lassen. Deshalb wurde zunächst ein Vergleich zwischen der bereits untersuchten HeLa-Zelllinie und den wildtypischen HAP1-Zellen durchgeführt.

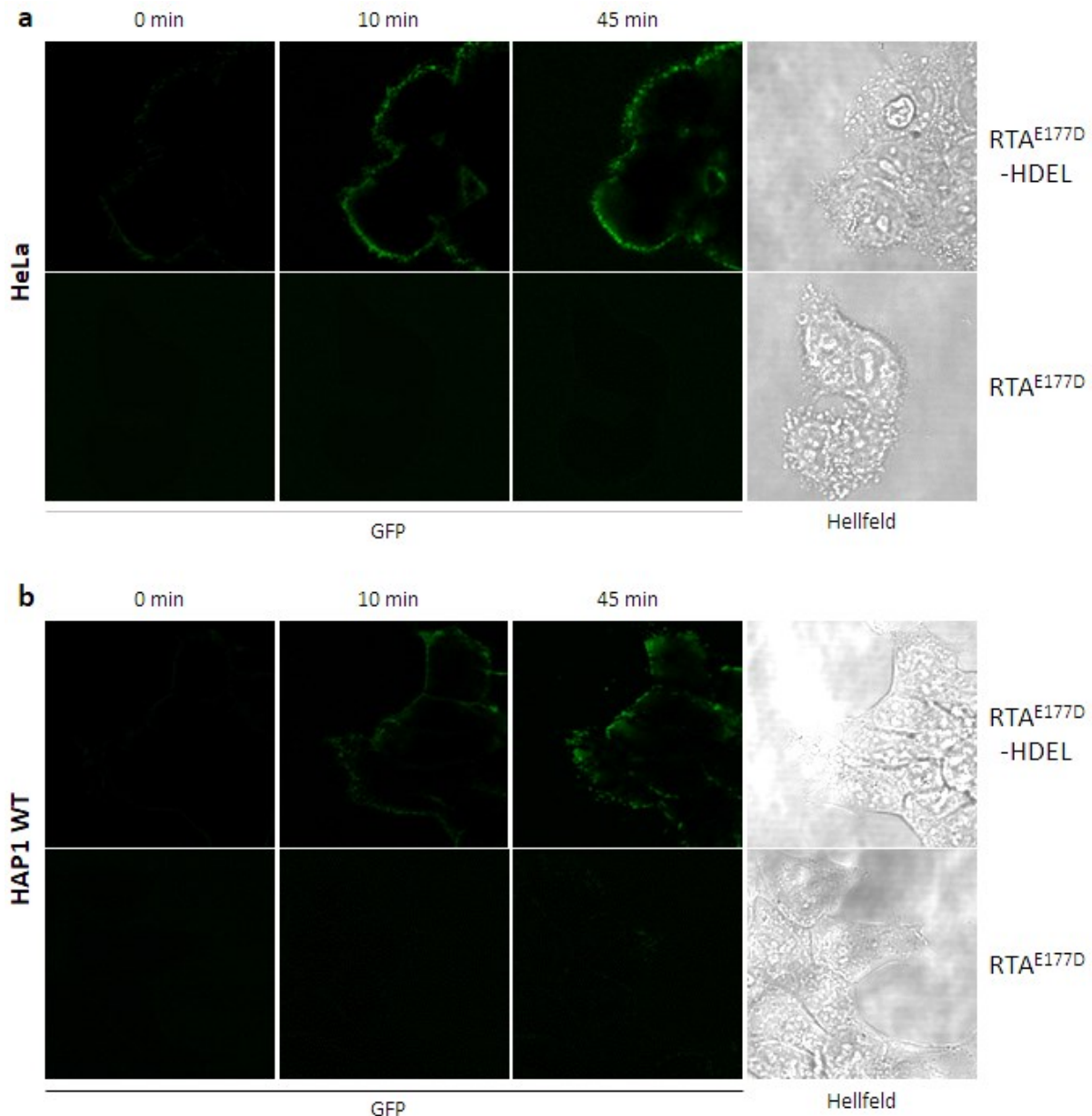


Abbildung 16: KDEL-Clusterentwicklung an der Oberfläche von wildtypischen Säugerzellen. Dargestellt sind „Live Cell Imaging“-Aufnahmen der Clusterentwicklung an der Oberfläche von a) HeLa- und b) HAP1 WT-Zellen im Zeitverlauf. Dargestellt sind der Startpunkt t=0 min, ein frühes Clusterstadium bei t=10 min und ein fortgeschrittenes Clusterstadium bei t=45 min. Als Ligand wurden 160 µg/ml eGFP-gekoppeltes RTA^{E177D}-HDEL bzw. die Variante eGFP-RTA^{E177D} ohne Retentionsmotiv als Negativkontrolle in Medium mit pH 6,4 verwendet. Die Detektion des Fluoreszenzsignals der Cluster (grün) erfolgte am CLSM.

In Abbildung 16a ist die Clusterentwicklung auf der Oberfläche von HeLa-Zellen nach Applikation von eGFP-RTA^{E177D}-HDEL zu beobachten. Aufgrund des leicht verringerten pH wurde hier eine effizientere Clusterbildung nach nur 10 min festgestellt. Die Cluster befanden sich bereits in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und waren teilweise als fokussierte Einzelcluster zu identifizieren. Über die Versuchszeit von 45 min hinweg konnte eine stetige Zunahme der Signalanzahl, -größe und -intensität beobachtet werden. Abbildung 16b zeigt die Clusterentwicklung im HAP1 Wildtyp. Nach 10 min Inkubationszeit konnten auch hier erste Ansammlungen des Liganden entlang der Zellperipherie beobachtet werden, wobei einzelne Fluoreszenzsignale bereits größere Cluster bildeten. Im Vergleich zu HeLa-Zellen war die Verteilung der Fluoreszenz etwas diffuser und insgesamt bezüglich Intensität und Größe der Cluster vermindert. Analog zu anderen Zelllinien veränderten sich die Fluoreszenzsignale über die Zeit, wobei sich die eher zufällige Verteilung im Anfangsstadium des Versuches in abgrenzbare einzelne Cluster entwickelte. Insgesamt erreichte die Fluoreszenzintensität in HAP1-Zellen innerhalb des 45-minütigen Versuches nicht das Ausmaß, wie es in HeLa-Zellen zu beobachten war. Die Negativkontrolle mit appliziertem eGFP-RTA^{E177D} ohne HDEL-Aminosäuremotiv zeigte zu keinem Zeitpunkt des Experiments Fluoreszenzsignale an HeLa- oder HAP1-Zellen.

Dieses erste Clustering-Experiment zeigte folglich erstmals, dass auch HAP1-Zellen nach Applikation eines externen KDEL-spezifischen Liganden an der Zelloberfläche Cluster bilden. Insgesamt lief die Entwicklung der Cluster jedoch etwas langsamer ab als in HeLa-Zellen, was auf einen leicht ineffizienteren Mechanismus hindeuten könnte. Die prinzipielle Fähigkeit zur Clusterbildung sollte nachfolgend unter Verwendung der KO-Zelllinien analog untersucht werden (Abbildung 17).

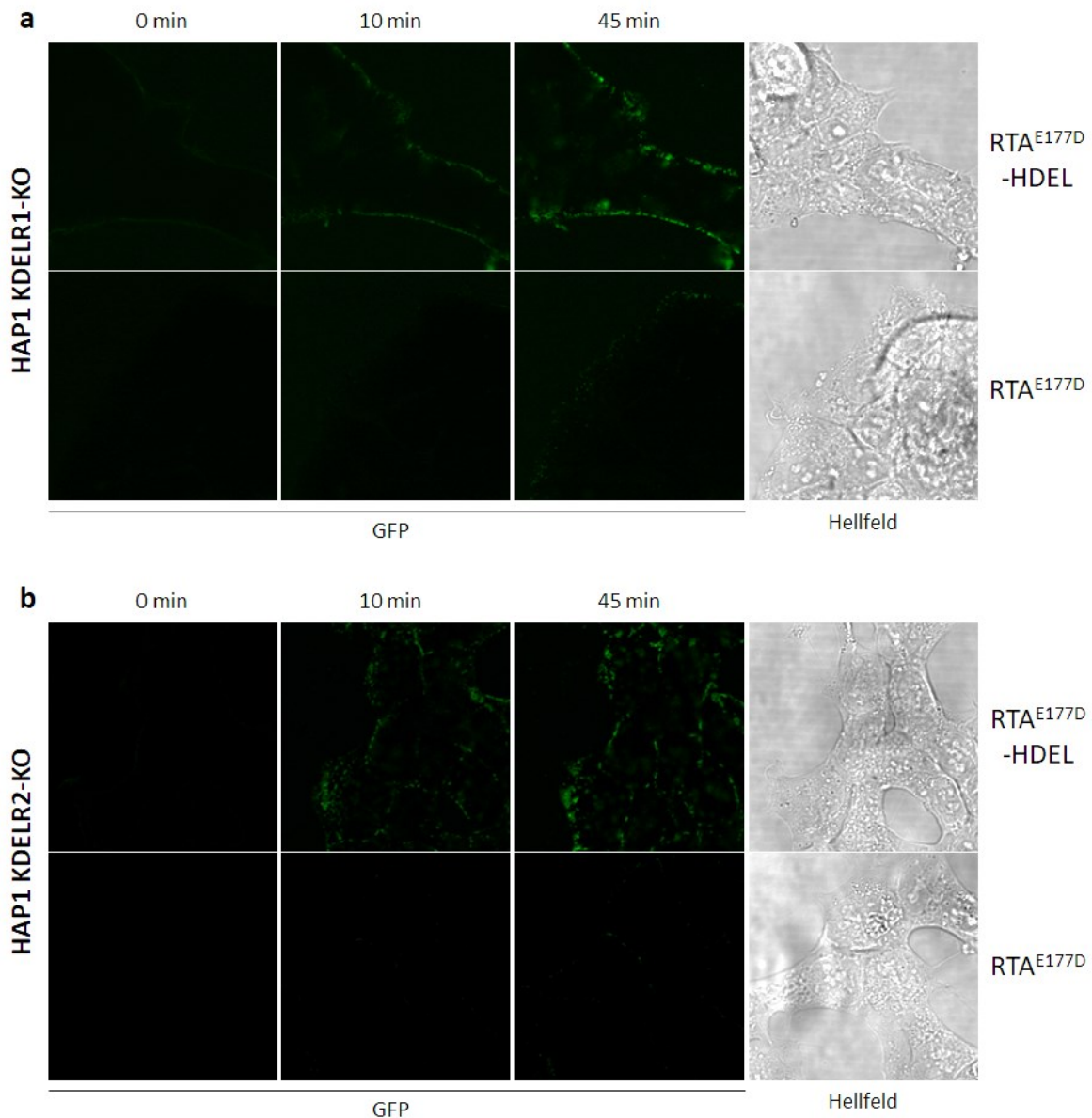


Abbildung 17: KDELR-Clusterentwicklung an der Oberfläche von KDELR-Knockout-Säugerzellen.

Dargestellt sind am CLSM erstellte „Live Cell Imaging“-Aufnahmen der Clusterentwicklung an der Oberfläche von a) HAP1 KDELR1-KO- und b) HAP1 KDELR2-KO-Zellen im Zeitverlauf. Dargestellt sind der Startpunkt $t=0$ min, ein frühes Clusterstadium bei $t=10$ min und ein fortgeschrittenes Clusterstadium bei $t=45$ min. Als Ligand wurden $160 \mu\text{g/ml}$ eGFP-gekoppeltes $\text{RTA}^{\text{E177D}}$ -HDEL bzw. die Variante eGFP- $\text{RTA}^{\text{E177D}}$ ohne Retentionsmotiv als Negativkontrolle in Medium mit pH 6,4 verwendet.

Aus Abbildung 17 ist zu entnehmen, dass sowohl HAP1 KDELR1-KO- (a) als auch KDELR2-KO-Zellen (b) in der Lage sind, nach Ligandenapplikation auf der Zelloberfläche Cluster zu bilden. Im Fall von KDELR1-KO waren bereits nach 10 min schwache Fluoreszenzsignale an der Oberfläche sichtbar, welche sich aus einzelnen Punkten zusammensetzten. Insgesamt war die Verteilung leicht diffus, bzw. waren alle Cluster noch in einem sehr frühen Entwicklungsstadium. Zu einem späteren Zeitpunkt waren die

Fluoreszenzsignale deutlich fokussiert und viele einzelne Fluoreszenzcluster entlang der Zellperipherie sichtbar. Die Intensität war hier ähnlich zum HAP1 WT (vgl. Abbildung 16). Der KO von KDELR2 (Abbildung 17b) führte ebenfalls bereits nach 10 min zu ersten schwachen Fluoreszenzsignalen. Diese waren als definierte kleine Cluster etwas konzentrierter entlang der Zellperipherie zu beobachten. Analog zu vorherigen HAP1-Clusterexperimenten nahmen die Fluoreszenzsignale bis zum Versuchsende an Intensität und Größe zu. Verglichen mit KDELR1-KO-Zellen waren die Cluster eher vereinzelt und in der Intensität etwas schwächer, dafür in ihrer Größe umfangreicher und somit vergleichbarer mit wildtypischen HAP1-Zellen. Die Negativkontrolle ohne HDEL-Sequenz zeigte in keinem Fall eine Clusterbildung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit der Leukämie-Zelllinie HAP1, welche ursprünglich aus KBM-7-Zellen stammt, in einem weiteren Zelltyp die KDELR-spezifische Clusterbildung erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Deren Entwicklung nahm sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Intensität über die Zeit hinweg zu und folgte so der bisher bei anderen Zelllinien beobachteten Clusterformation. Ein KO von KDELR1 oder KDELR2 führte in diesen rein visuellen Untersuchungen zu keinem eindeutigen Unterschied in der Clusterbildung. Ohne eine qualitative mathematische Auswertung, wie bereits zuvor beschrieben, kann zu diesem Zeitpunkt jedoch keine finale Aussage über den Einfluss der einzelnen Rezeptoren diesbezüglich getroffen werden (Bauer *et al.*, 2020).

3.1.4. Experimente zur Charakterisierung von HAP1-Knockout-Zelllinien

Bisher stellt HAP1 eine nur wenig charakterisierte Zelllinie dar. In vorangegangenen Arbeiten wurden wildtypische und KDELR1-KO-Zellen schon teilweise betrachtet, wobei vor allem die Auswirkungen von ER-Stress untersucht wurden (Blum, 2018). Da im Laufe dieser Arbeit ebenfalls ein KDELR2-KO dieser Zelllinie zur Verfügung stand, konnten nun auch weitere Charakterisierungen durchgeführt werden. In dieser Arbeit konnte bereits in wildtypischen, aber auch in den beiden KO-Zelllinien KDELR-Clustering nachgewiesen werden, was eine Kompensation der KDELR-Funktion an der Zelloberfläche durch die jeweils anderen Rezeptoren vermuten lässt.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass sich wildtypische HAP1-Zellen auch in weiteren Charakteristika von KDELR-KO-Zellen unterscheiden, sodass eine Einordnung in einen biologischen Kontext näher untersucht werden sollte. So konnte während der Kultivierung von HAP1-Zelllinien beobachtet werden, dass KDELR1-KO-Zellen langsamer Konfluenz erreichten als wildtypische HAP1 oder KDELR2-KO-Zellen. Die Fähigkeit der Zellteilung oder Gewebebildung könnte folglich durch den KO von KDELR1 beeinträchtigt

sein. Auch erschienen die KDELR1-KO-Zellen ein etwas kleineres Volumen einzunehmen als wildtypische oder KDELR2-KO-Zellen. Da die Morphologie von HAP1-Zellen äußerst vielfältig ausgeprägt ist, erschwert dies eine genaue Größenbestimmung. Ein Ablösen der Zellen führt dazu, dass diese die physikalisch stabilste Form einer Kugel annehmen, wodurch sich sowohl die Größe der Zelltypen qualitativ besser miteinander vergleichen lässt, aber auch eine quantitative Analyse mittels „Casy Cell Counter and Analyzer“ ermöglicht.

Die Deletion eines KDELR zeigte sich bereits in Vorarbeiten als Eingriff in weite Teile des Transkriptom, wodurch auch ein Einfluss auf die Zellteilung nicht ausgeschlossen werden kann (Blum *et al.*, 2019). Mithilfe eines Proliferationsassay könnten die Folgen des KDELR-Verlustes in Bezug auf Zellteilungsraten analysiert werden (Abbildung 18). Hierbei werden gleiche Mengen von Zellen unter Standardbedingungen kultiviert und zu mehreren Zeitpunkten die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase betrachtet, wodurch indirekt die Viabilität der Zellen abgeleitet werden kann.

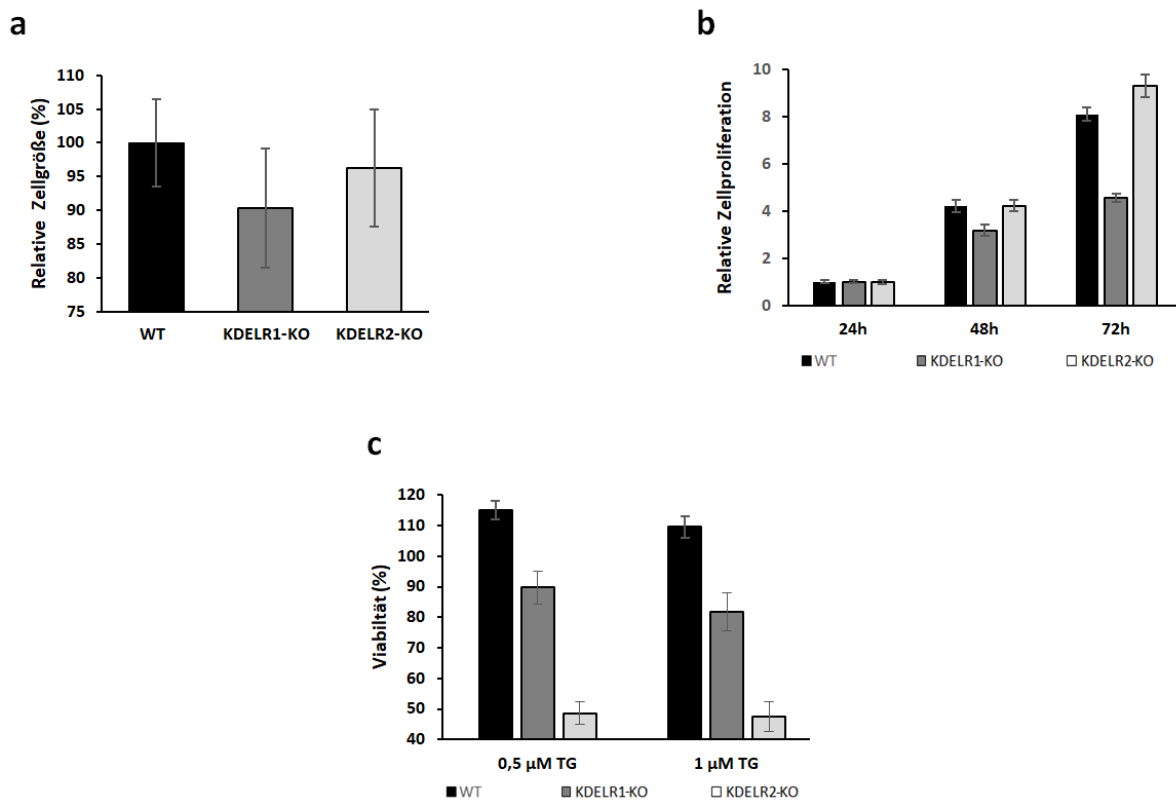


Abbildung 18: Charakteristiken verschiedener HAP1-Zelllinien.

a) Gezeigt ist ein Größenvergleich von abgelösten HAP1-Zellen, normalisiert auf den Wildtyp. Die Analyse erfolgte mittels „CASY Cell Counter and Analyzer“ und beschreibt den Durchmesser von abgelösten Zellen (n=6). b) XTT-basiertes Proliferationsassay von HAP1-Zellen (n=3). Diese wurden ausgesät und nach 24 h, 48 h sowie 72 h wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase überprüft. Die Normierung erfolgte auf den 24 h-Wert. c) Viabilitätsanalyse von HAP1-Zelllinien unter ER-Stressbedingungen. ER-Stress wurde 24 h nach Aussaat der Zellen mittels einer Thapsigarginbehandlung (0,5-1 μM TG) induziert und weitere 24 h später ein Proliferationsassay durchgeführt (n=3). Die Normierung erfolgte auf ungestresste Zellen (100%).

Die Größe von HAP1-Zellen wurde im abgelösten Zustand mittels „CASY Cell Counter and Analyzer“ ermittelt und auf die wildtypischen Zellen normiert (100 %, Abbildung 18a). Tendenziell schienen KDELR-KO-Zellen ein geringeres Volumen einzunehmen, wobei vor allem KDELR1-KO-Zellen nur etwa 90 % der Größe von wildtypischen HAP1-Zellen zeigten, während KDELR2-KO-Zellen mit 96 % näher am Wildtyp waren. In Abbildung 18b wurde die Proliferation von HAP1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten anhand der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität in einem XTT-Assay bestimmt (Details siehe Beschreibung in 2.6.4).

Als Ausgangswert und Normierungszeitpunkt wurde eine Messung 24 h nach Aussaat herangezogen. Bei der nächsten Probenentnahme (48 h) lag die Dehydrogenaseaktivität von wildtypischen und KDELR2-KO-Zellen in einem etwa vierfach höheren Bereich und verdoppelte sich erneut am Ende des Experiments (72 h). Der KO von KDELR1 führte hingegen zu verringerten Proliferationsraten. Nach 48 h war die 3,75-fache Dehydrogenaseaktivität zwar noch vergleichbar mit wildtypischen Zellen, stieg jedoch auch im Verlauf von 72 h nur noch geringfügig über diesen Wert. Durch die essenzielle Rolle von KDELRs bei der Retention von ER-Chaperonen stellt insbesondere die Untersuchung von ER-Stresszuständen einen sehr interessanten Aspekt dar. Der Verlust von KDELR1 oder KDELR2 könnte folglich diese dynamische Anpassung beeinflussen, wodurch sich selbst schwache Stresszustände auf die Proliferation der Zellen auswirken könnten. In einem analogen Versuchsansatz sollte daher die Proliferationsrate der HAP1-Zellen unter ER-Stress untersucht werden. Als Stressfaktor wurde in diesem Versuch Thapsigargin verwendet, ein Inhibitor der „sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase“ (SERCA). ER-Stress wurde 24 h nach der Aussaat durch 0,5 - 1 μ M Thapsigargin (TG) induziert und die ermittelten Proliferationswerte auf eine mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Negativkontrolle normiert (Abbildung 18c). Wildtypische HAP1-Zellen zeigten durch eine Thapsigarginbehandlung keine Anzeichen von Stress. Durch den KO von KDELR1 verringerte sich die Dehydrogenaseaktivität hingegen um etwa 10 % (0,5 μ M TG) oder nahezu 20 % (1 μ M TG). Ein KO von KDELR2 zeigte ebenfalls niedrigere Zellviabilität, wobei verglichen zur DMSO-behandelten Negativkontrolle nur etwa 50 % der Dehydrogenaseaktivität erreicht werden konnten.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass ein KO von KDELR1 oder KDELR2 Auswirkungen auf zelluläre Prozesse hat. Dieser beeinflusst erheblich die Zellteilungsrate sowie im geringeren Maß sogar die Größe von HAP1-Zellen. Unter Stressbedingungen scheint der KO von KDELR1 durch die Anwesenheit von KDELR2 und KDELR3

kompensiert werden zu können. Ein KDELR2-KO wirkt sich nur geringfügig auf die Zellteilungsrate aus, führt aber zu einer verminderten Stresstoleranz unter Ca^{2+} -Depletion. KDELR2 scheint somit für HAP1-Zellen unter Stressbedingungen eine vermehrt wichtige Rolle zu spielen, während KDELR1 insbesondere unter Normalbedingungen eine bedeutende Funktion einnimmt.

3.1.5. KDELR-Expression unter Stressbedingungen

Es sollte daher als nächstes auch auf transkriptioneller Ebene die Auswirkung von induziertem ER-Stress in HAP1-Zellen untersucht werden. Hierbei war zu klären, ob HAP1-Zellen ebenfalls mit einer Änderung der KDELR-Transkriptionsrate reagieren und inwiefern eine eventuell veränderte Expression der KDELR-Subtypen in KO-Zellen mit den bisher beobachteten Ergebnissen in Korrelation gebracht werden kann (Abbildung 19). Hierfür wurden die Zellen 24 h im Voraus ausgesät. ER-Stress wurde analog zu vorherigen Experimenten durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin mit einer Konzentration von 100 nM ausgelöst, während die Negativkontrolle entsprechend mit DMSO behandelt wurde. Nach 5-stündiger Inkubation erfolgte die RNA-Isolation, um kurzfristige Änderungen des Expressionsverhaltens analysieren zu können.

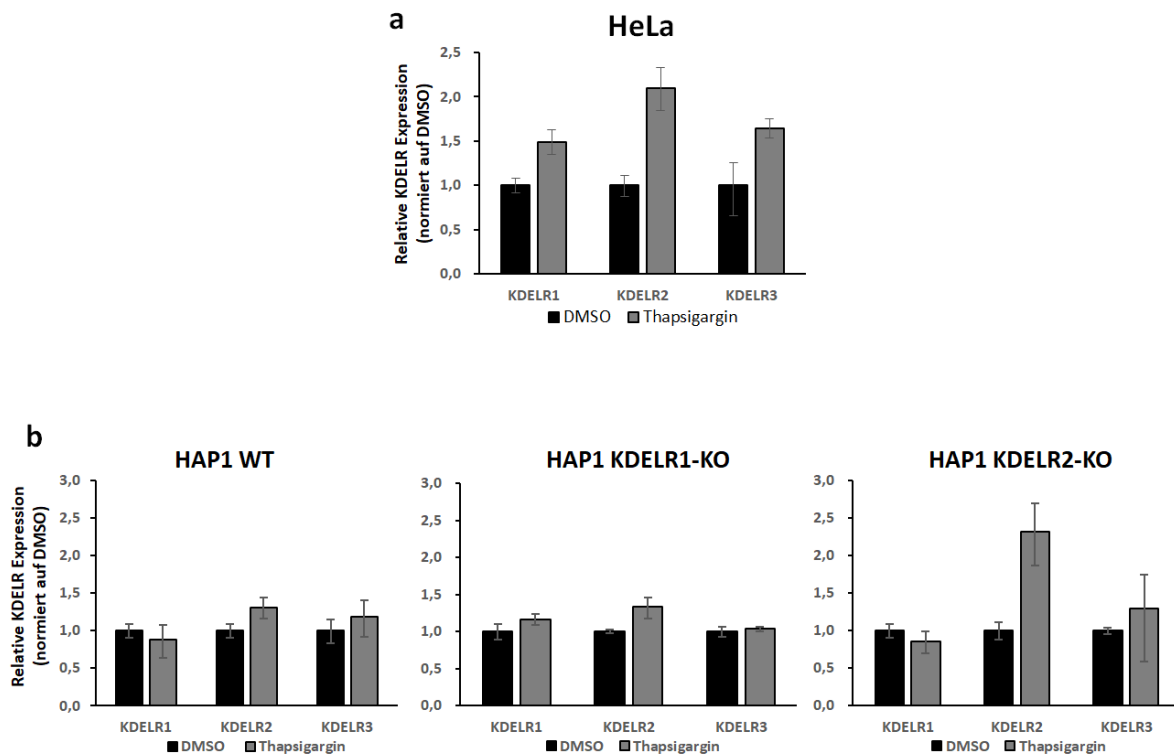


Abbildung 19: Relative KDELRL-Genexpression in HeLa- und HAP1-Zellen unter ER-Stress. Gezeigt sind qPCR-basierte Expressionsanalysen von a) HeLa- und b) HAP1-Zellen 5 h nach Induktion von ER-Stress durch 100 nM Thapsigargin. Vor Ermittlung der relativen Expression wurden die Δ Ct-Werte auf das Referenzgen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die relative Expression der KDELRLs wurde anschließend auf KDELRL-Expressionswerte in DMSO-Negativkontrollen normiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von $n \geq 2$ technischen Replikaten und $n=3$ biologischen Replikaten.

Da HeLa eine der am besten untersuchten Zelllinien darstellt und in der Mehrzahl der bisher veröffentlichten KDELRL-Studien betrachtet wurde, erfolgte zunächst in dieser Zelllinie eine RT-qPCR basierte Expressionsanalyse unter Normal- sowie unter Stressbedingungen (Abbildung 19a). Hierbei zeigte sich nach einer Thapsigarginbehandlung eine deutliche Steigerung aller KDELRL-Transkripte. Die Expression von KDELRL1 und KDELRL3 stieg auf das etwa 1,5-fache an, während sich die Expression von KDELRL2 sogar verdoppelte. Nachfolgend wurde auch in HAP1-Zellen die KDELRL Expression unter Stressbedingungen betrachtet (Abbildung 19b). Wildtypische HAP1-Zellen zeigten nach Thapsigarginbehandlung eine leicht erhöhte KDELRL2-Expression, wobei diese schwächer ausfiel als in HeLa-Zellen. KDELRL3 schien hingegen nur tendenziell verstärkt exprimiert zu werden, während die Transkriptmenge von KDELRL1 eventuell sogar leicht abzunehmen schien. KDELRL1-KO-Zellen zeigten übereinstimmend zu wildtypischen HAP1 eine 1,25-fach erhöhte Expression von KDELRL2 (Abbildung 19b, Mitte). Die Expression von KDELRL3 schien hingegen nicht von der Stressbehandlung beeinflusst zu werden. Auch von KDELRL1 konnten in leichten Tendenzen durch die Thapsigarginbehandlung vermehrt Transkripte

nachgewiesen werden, wobei die ΔCt -Werte eher hoch waren. KDELR2-KO-Zellen (Abbildung 19c, rechts) zeigten ebenso wie wildtypische HAP1-Zellen eine tendenziell leicht verringerte KDELR1 Expression. KDELR3 könnte tendenziell stärker exprimiert werden, wobei die Proben untereinander starke Abweichungen bezüglich der Transkriptzahl zeigten. Die relative Expression von KDELR2 schien nach ER-Stress auf das mehr als Zweifache anzusteigen, wobei die Gesamtzahl an Transkripten durch den KO gering war und die Darstellung deshalb durch die Normierung hier unverhältnismäßig stark verzerrt wirkte (vgl. Abbildung 15).

Insgesamt scheinen sich sowohl HeLa- als auch die hier untersuchten HAP1-Zellen durch eine verstärkte KDELR-Expression an Stressbedingungen anzupassen. Während in HeLa vermehrt Transkripte von allen drei KDELRs nachgewiesen werden konnten, scheinen HAP1-Zellen nur mit einem leichten Anstieg von KDELR2 auf Thapsigargin-induzierten ER-Stress zu reagieren. Expressionsänderungen von KDELR1 und KDELR3 waren sowohl im Wildtyp als auch in den KO-Zelllinien nicht eindeutig.

Die Beteiligung von KDELRs an der ER-Stressantwort scheint in verschiedenen Zelllinien und Spezies eine stark konservierte Funktion darzustellen (Wang *et al.*, 2011; Trychta *et al.*, 2018; Samy *et al.*, 2020). Hierbei werden die drei KDELRs auf der transkriptionellen Ebene in unterschiedlichem Ausmaß in die Stressantwort eingebunden, sodass eine funktionelle Spezifität der Rezeptoren impliziert wird. In *S. cerevisiae* existiert hingegen nur ein einziges Rezeptor-Homolog, womit sich die Frage stellt, inwiefern die Expression des HDEL-Rezeptors Erd2p in Hefe ebenfalls einen Teil der Stressantwort darstellt. Analog zu vorherigen Experimenten sollte deshalb eine Hefekultur unter ER-Stress gesetzt und auf eine Expressionsanpassung von Erd2p hin untersucht werden (Abbildung 20). Als ER-Stressfaktor fungiert Dithiothreitol (DTT), welches durch Reduktion von Disulfidbrücken zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER beiträgt. Eine Übernachtkultur wurde in Triplikate aufgesplittet und auf eine Zelldichte von $OD_{600}=1$ eingestellt. Die RNA wurde 5 h nach Induktion von ER-Stress (3 mM DTT) oder Normalbedingungen (0 mM DTT) isoliert und mittels zweistufiger RT-qPCR die Expression analysiert.

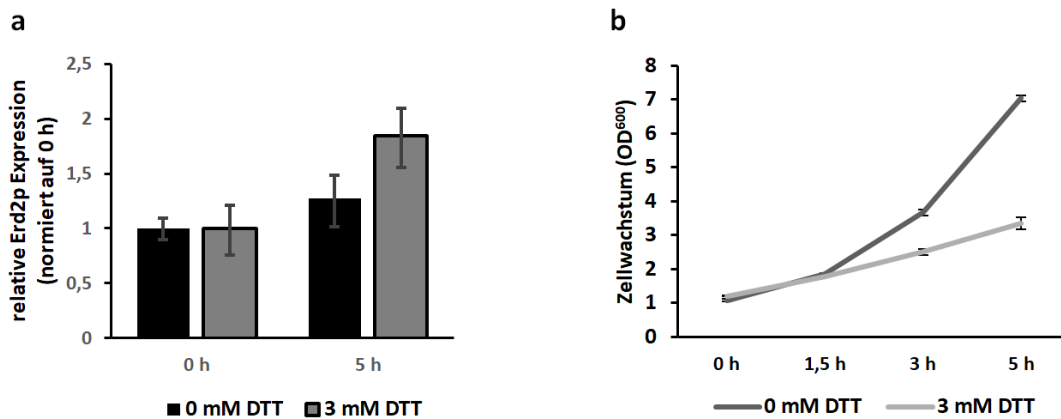


Abbildung 20: Relative Genexpression des HDEL-Rezeptors Erd2p in *S. cerevisiae* unter ER-Stress.

a) Gezeigt sind qPCR-basierte Expressionsanalysen in *S. cerevisiae* nach Induktion von ER-Stress mit 3 mM Dithiothreitol (DTT). Zur Ermittlung der relativen Expression wurden die Δ Ct-Werte auf die Transkriptmenge der Phosphoglyceratkinase (PGK) normiert. Die relative Expression von Erd2p nach 5 h wurde anschließend auf den jeweiligen 0 h Wert normiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von $n \geq 2$ technischen Replikaten und $n=3$ biologischen Replikaten. b) Wachstumskurve der in (a) verwendeten Hefekulturen, basierend auf spektralphotometrischen Messungen der optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀).

Abbildung 20a zeigt die Genexpressionsänderungen des HDEL-Rezeptors unter ungestressten (schwarz) und gestressten Bedingungen (grau). Im Verlauf der fünfstündigen Inkubation änderte sich die Expressionsrate in ungestressten Zellen (1,25-fach) als auch in gestressten Zellen, wobei nach Induktion von ER-Stress nahezu doppelt so viele Erd2p-Transkripte nachweisbar waren. Die veränderte Expression in ungestressten Hefen könnte auf die fortgeschrittene Wachstumsphase zurückzuführen sein, weshalb parallel die Zelldichte in Form einer spektralphotometrischen OD₆₀₀-Messung dokumentiert wurde (Abbildung 20b). Hierbei zeigte sich, dass ungestresste Hefen nach 5 h eine hohe Zellzahl erreichten (OD₆₀₀=7) und somit nahe einer stationären Wachstumsphase lagen. DTT-behandelte Hefen erreichten in der gleichen Zeit nur eine OD₆₀₀=3 und zeigten somit eine Beeinflussung der Zellteilung durch ER-Stress.

Eine Regulierung der KDEL-R-Genexpression als Folge von ER-Stress stellt somit einen konservierten zellulären Mechanismus dar, der sowohl in Hefe- als auch in Säugerzellen stattfindet. Die Beteiligung der drei Subtypen an der Stressantwort ist jedoch divers, was auf eine Adaption der KDEL-Rs bezüglich des Gewebe- oder Zelltyps hindeuten könnte. Es ist allerdings noch unklar, inwiefern sich diese dynamische Expression auch auf die intrazelluläre Verteilung der Rezeptoren auswirkt. Es könnten bspw. Mechanismen etabliert worden sein, die KDEL-Rs weiter im sekretorischen „Pathway“ verteilen, um dort eine ER-Stress-bedingte Sekretion von ER-residenten Proteinen zu verhindern und diese zurück in den Golgi zu transportieren. Ebenso könnte eine vermehrte Lokalisierung von KDEL-Rs an der

Zelloberfläche zur vermehrten Internalisierung sezernierter Liganden führen, weshalb nachfolgend in dieser Arbeit auch Untersuchungen zur Oberflächendynamik von KDELRs unter Stressbedingungen durchgeführt werden sollten.

3.2. KDELR-Dynamik an der Zelloberfläche

Eine nähere Betrachtung der Funktionen und Transportvorgänge in Bereichen der Zellperipherie und PM stellt folglich einen weiteren wichtigen Aspekt dieser Arbeit dar. Hierzu sollten neue KDELR-Varianten etabliert werden, welche eine IF-basierte Darstellung von oberflächenlokalisierten KDELRs erlauben. Nach der Verifizierung dieser Varianten sollten Experimente bezüglich deren Dynamik durchgeführt werden. Der kleine extrazellulär exponierte Bereich der Rezeptoren sowie deren hohe Sequenzähnlichkeit untereinander erschweren eine spezifische Antikörpererkennung (Bräuer *et al.*, 2019; Lewis & Pelham 1992; Hsu *et al.*, 1992; Capitani & Sallese, 2009). Bisherige KDELR-Varianten sind daher häufig mit zytosolischen Antigen-Tags versehen, sodass hier eine extrazelluläre Markierung mit Antikörpern nicht möglich ist und die Integrität der Zelloberfläche durch eine Perforation zuerst zerstört werden muss. Jedoch werden so zwangsläufig ebenfalls intrazelluläre Rezeptoren von Antikörpern gebunden. Auch eine Markierung mit fluoreszierenden Proteinen wie GFP oder mCherry ist für ein solches System eher ungeeignet, da durch deren Größe eine Auswirkung auf die Oberflächenlokalisierung nicht auszuschließen ist. Zudem werden hier ebenfalls auch simultan intrazelluläre Rezeptoren detektiert. Zusammen mit Michaela Groß wurden im Rahmen ihrer Masterarbeit N-terminal markierte Rezeptorvarianten hergestellt (Masterarbeit Groß, 2022). Diese sollten die Bindung eines extern applizierten Antikörpers erlauben, gleichzeitig aber die Integrität der Bindetasche funktionell nicht beeinträchtigen. Als Antigen wurden Teile des Hämagglutinins (Position 98–106) verwendet, welches aufgrund seiner geringen Größe die native KDELR-Funktion möglichst wenig beeinträchtigen sollte. N-terminal verfügen KDELR-Rezeptoren zudem über zwei nur teilweise exponiert an der Membran vorliegende Aminosäuren. Damit eine flexible und vor allem zugängliche Bindestelle für Antikörper gewährleistet ist, wurde ein zusätzlicher GGGC-Linker zwischen Antigen und der ersten Transmembrandomäne verwendet (Abbildung 21a). Damit negative Aspekte einer transienten Transfektion, wie bspw. eine unkontrollierte Expression sowie schwankende Transfektionsraten, vermieden werden, wurden HA-Linker-KDELR-Konstrukte stabil ins Genom der Flp-In™ T-REx™ HEK293-Zelllinie (Thermo Fisher Scientific) integriert und im Anschluss deren Expression und Oberflächenlokalisierung verifiziert. Zunächst wurden die HA-Linker-KDELR-Konstrukte auf ihre Expression und Funktion in

Hefe überprüft, da hier bereits etablierte Systeme zur Funktionsanalyse von Säuger-KDELRS existieren.

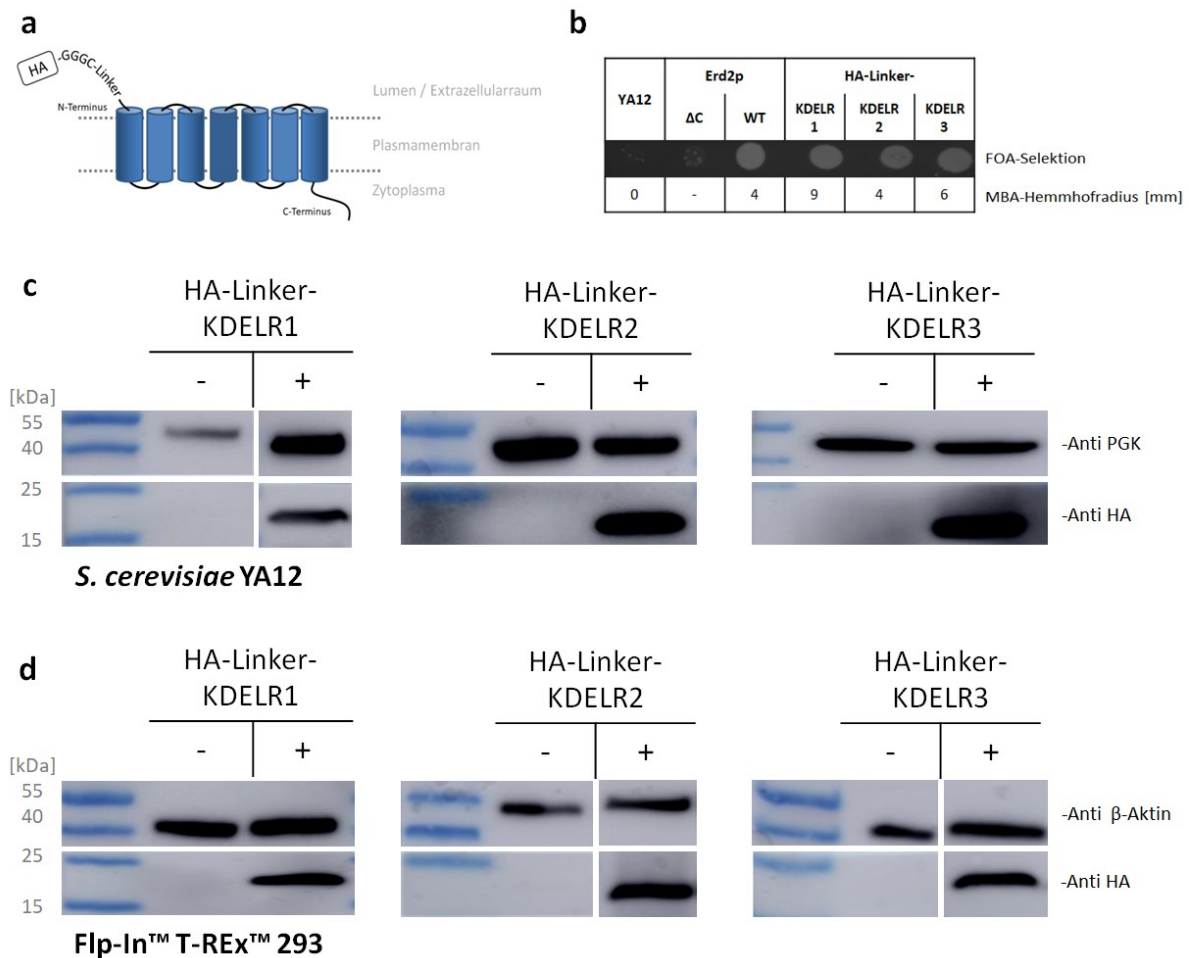


Abbildung 21: Funktion und Expression der HA-Linker-KDEL-Varianten.

a) Schematisches Modell der KDEL-Varianten mit extrazellulär lokalisiertem HA-Linker-Konstrukt am N-Terminus. b) Funktionalitätsüberprüfung von HA-Linker-KDEL-Varianten in YA12 mittels FOA-Selektion sowie Hemmhofradien der Sensitivitätsanalyse im Agardiffusionstest gegenüber K28-Toxin. c) Western Blot-Analyse der Expression von HA-Linker-KDEL-Varianten in *S. cerevisiae* YA12 nach SDS-PAGE. Als Ladekontrolle wurde die Phosphoglyceratkinase (PGK) verwendet, während die Visualisierung der Rezeptoren mit Anti-HA-Antikörpern durchgeführt wurde. Medium mit Glukose stellt die nicht induzierten Bedingungen (-) dar, während galaktosehaltiges Medium (+) zwecks Induktion der 24-stündigen Expression verwendet wurde. d) Expressionsanalyse von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen und 24 h Inkubation in unbehandeltem Säugerzellmedium DMEM (-) oder unter induzierenden Bedingungen (+) mit 1 µg/ml Tetrazyklin. Zur Darstellung der Ladekontrolle wurde ein Anti-β-Aktin-Antikörper verwendet.

Abbildung 21b zeigt die Verifizierung der Funktionalität von HA-Linker-KDEL-Varianten in *S. cerevisiae* mittels FOA-Selektion. Diese wurde im *ERD2*-deletierten Hefestamm YA12 durchgeführt, wobei nur YA12-Transformanten mit funktioneller Rezeptorvariante ein Wachstum auf FOA-haltigem Agar zeigten. Alle HA-Linker-KDEL-Varianten zeigten ein zum wildtypischen HDEL-Rezeptor vergleichbares Wachstum, wodurch auf die prinzipielle Funktionalität der Konstrukte geschlossen werden kann.

Eine genauere Analyse der Funktionalität auf Ebene der PM wurde anschließend in einem Agardiffusionstest überprüft. Durch eine Behandlung mit K28-Toxin und die damit einhergehende zytotoxische Wirkung auf Hefen lässt sich die Funktionalität der zu überprüfenden Rezeptoren ableiten. Alle drei HA-Linker-KDEL-R-Varianten zeigten über 4 - 9 mm große Hemmhofradien und sind folglich in ihrer Funktionalität mit dem wildtypischen Erd2p (4 mm Radius) vergleichbar bzw. führten sogar zu einem toxinsensitiveren Phänotyp. Die Expression der Varianten wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft, wobei die grundlegende Detektierbarkeit des N-terminalen HA-Antigens mittels Antikörper verifiziert werden sollte (Abbildung 21c). Hierfür erfolgte die Zellyse unter nicht induzierenden Bedingungen (-) sowie nach Galaktose-induzierter Expression (+), wobei ein gegen die Phosphoglyceratkinase (PGK) gerichteter Antikörper zur Detektion der Ladekontrolle verwendet wurde. Die Expression und der immunologische Nachweis konnten für alle Rezeptorvarianten mit der erwarteten Größe von etwa 24 kDa bestätigt werden. Nach erfolgter stabiler Integration der Konstrukte in Flp-In™ T-REx™ HEK293-Zellen wurde auch hier ein Expressionsnachweis durchgeführt. Unbehandeltes Medium stellte nicht induzierte Bedingungen dar (-), während Tetrazyklin (1 µg/ml) zwecks Induktion (+) verwendet wurde (Abbildung 21d). Auch hier war eine deutliche Expression der Konstrukte nachweisbar, sodass nachfolgend die Lokalisation der Rezeptorvarianten näher untersucht werden konnte.

In den drei hergestellten Säugerzelllinien wurde die Induktion über 24 h durchgeführt und die Zellen im Anschluss fixiert sowie permeabilisiert. Abschließend wurden die Zellen mit entsprechenden Antikörpern behandelt und zwecks Visualisierung des Zellkerns mit DAPI gegengefärbt. Eine Analyse der Fluoreszenzsignale erfolgte am CLSM (Abbildung 22).

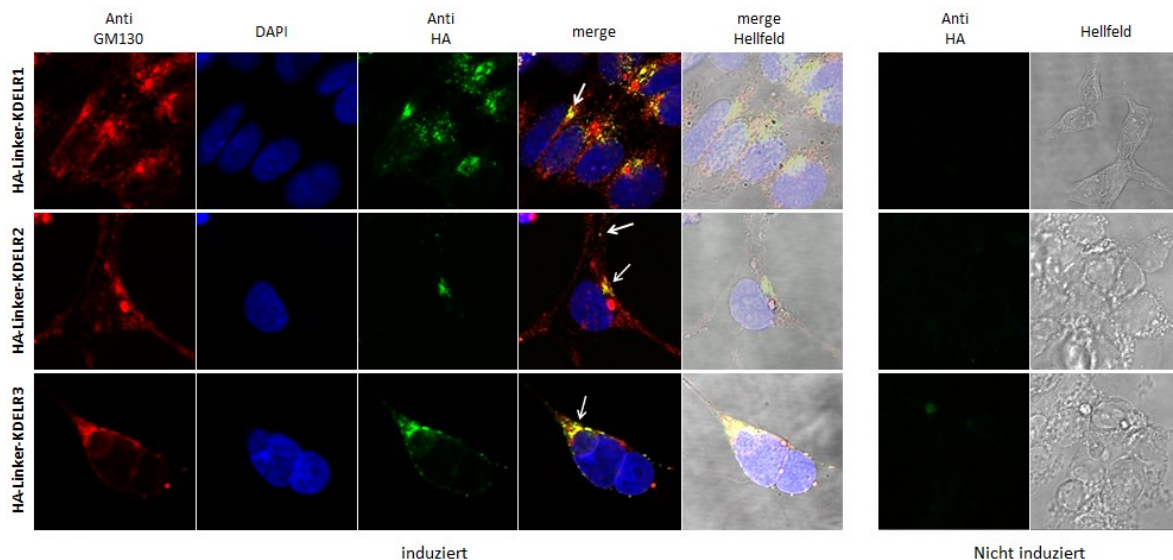


Abbildung 22: Expression von HA-Linker-KDEL-varianten in stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen.

Dargestellt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit der jeweils angegebenen HA-getaggtten KDEL-variante. Die Induktion erfolgte durch Behandlung mit 1 µg/ml Tetrazyklin über 24 h. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der KDELs (grün) und des *cis*-Golgi (rot) erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz (IF) mittels Anti-HA- bzw. Anti-GM130-Antikörpern mit entsprechenden sekundären fluorophor-gekoppelten Antikörpern (AF647 bzw. AF488). Eine Gegenfärbung des Zellkerns (blau) wurde mit DAPI durchgeführt. Überlagernde Fluoreszenzsignale (gelb) des *cis*-Golgi Markers und der KDELs sind beispielhaft mit weißen Pfeilen markiert.

Die Expression wurde mittels Anti-HA-Antikörpern detektiert und auf Colokalisation mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 überprüft, wobei sich überlappende Signale zeigten (Abb. 22, weiße Pfeile). Falsch positive Signale des Anti-HA-Antikörpers konnten durch parallele Betrachtung der nicht induzierten Zellen ausgeschlossen werden. Die Lokalisation der KDELs war nicht auf den *cis*-Golgi beschränkt, sondern zeigte auch perinukleare Signale, welche auf das ER-Netzwerk hindeuten könnten. Insgesamt spiegelten die N-terminal markierten Varianten die bekannte Lokalisation unter Überexpressionsbedingungen von KDELs wider und wichen nicht von bisher beschriebenen KDEL-varianten ab. Die Oberflächenlokalisierung war wie zu erwarten durch die Perforation der Plasmamembran und die starken intrazellulären Signale hier nicht nachweisbar.

Die PM-Lokalisation von C-terminal V5-markierten KDEL-varianten wurde in dieser Arbeit zunächst auch in den hier verwendeten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen *via* Zelloberflächenbiotinylierung mit anschließender SDS-PAGE und Western-Analyse überprüft (Abbildung 23a).

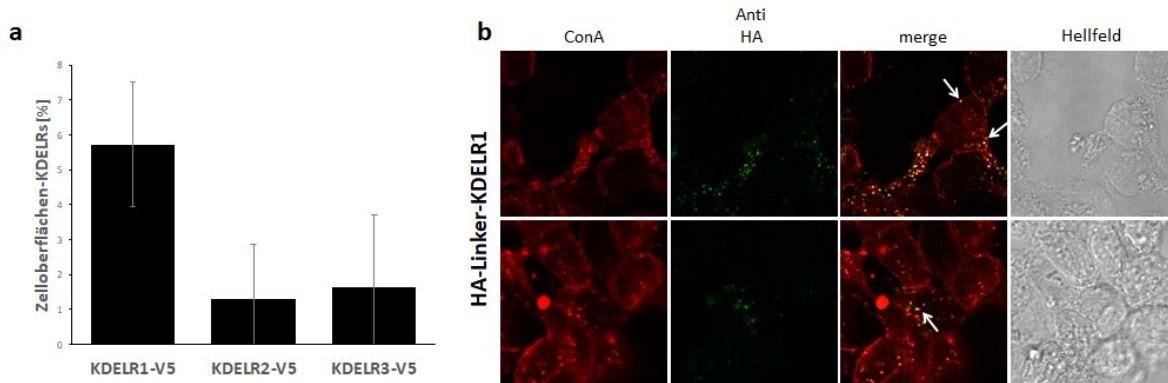


Abbildung 23: Zelloberflächenlokalisierung verschiedener KDELR-Varianten in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen.

a) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von KDELR-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen nach 24-stündiger Überexpression mittels Zelloberflächenbiotinylierung und anschließender Western-Analyse der C-terminal markierten KDELR-V5 Varianten (n=3).

b) Dargestellt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit HA-Linker-KDELR1-Variante nach 24 h Expression. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der KDELRs (grün) erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz (IF) mittels Anti-HA-Antikörper und sekundäre AF488-gekoppelte Antikörper. Eine Gegenfärbung der Zelloberfläche (rot) wurde mit Concanavalin A (ConA) durchgeführt. Überlagernde Fluoreszenzsignale (gelb) sind mit weißen Pfeilen markiert.

Nur eine äußerst geringe Zahl der KDELRs lokalisierte unter Überexpressionsbedingungen an der PM, wobei insbesondere KDELR2-V5 und KDELR3-V5 mit durchschnittlich nur 1,5 % der gesamten Rezeptormenge dort nachweisbar waren. Zudem wurden starke Schwankungen innerhalb der Proben beobachtet. KDELR1-V5 hingegen stellte mit ~ 6 % die am häufigsten an der Zelloberfläche lokalisierte Variante dar. Die hier in nachfolgenden Experimenten durchgeführten Zelloberflächenbiotinylierungen erweisen sich aufgrund der geringen Menge an PM-lokalisierten KDELRs als schwierig auszuwerten bzw. führten die schwachen Chemilumineszenzsignale zu starken Schwankungen bei der Auswertung (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Einschätzung wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit überprüft, ob eine Nachweisbarkeit der Oberflächenlokalisierung per Immunfluoreszenz (IF) von HA-Linker-KDELR1 durchführbar ist (Abbildung 23b). 24 h nach Induktion von HA-Linker-KDELR1-Varianten in stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen wurden diese fixiert und ohne Permeabilisierung mit Anti-HA-Antikörpern behandelt. Eine Markierung der Zelloberfläche wurde mittels fluorophor-gekoppeltem Concanavalin A (ConA) durchgeführt. Es konnten einzelne KDELR-Fluoreszenzsignale an der Oberfläche nachgewiesen werden, welche größtenteils mit ConA-Signalen colokalisierten (weiße Pfeile).

Aufgrund der unterschiedlich ausgeprägten Präsenz von Fluoreszenzsignalen auf den Oberflächen verschiedener Zellen kann von einem abweichenden Ausmaß der PM-Lokalisation oder Detektion der KDELR-Variante ausgegangen werden. Insgesamt scheint

eine extrazelluläre Markierung von KDELRs deren direkte immunologische Detektion mit Antikörpern zu erlauben, ohne simultan unverhältnismäßig intrazelluläre KDELR-Signale zu detektieren.

3.2.1. Einfluss von ER-Stress auf die Zelloberflächenlokalisierung von KDELRs
Zunächst sollte mit diesen Varianten der Einfluss von ER-Stress auf die KDELR-Lokalisation an der Zelloberfläche untersucht werden (Abbildung 24).

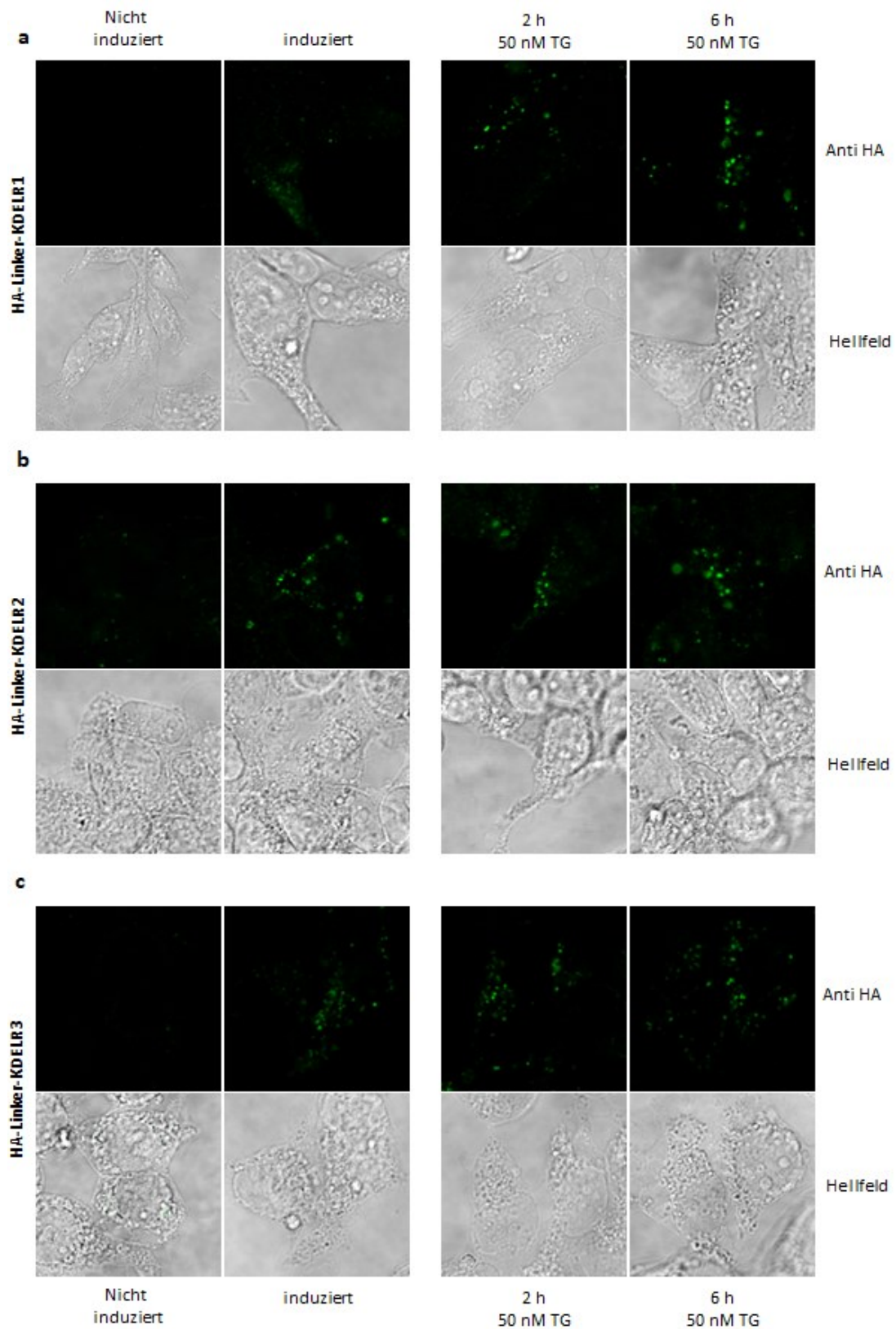


Abbildung 24: KDELR-Dynamik auf der Oberfläche von Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen unter ER-Stressbedingungen.

Dargestellt sind am CLSM durchgeführte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit den Varianten a) HA-Linker-KDEL R1, b) HA-Linker-KDEL R2 und c) HA-Linker-KDEL R3 nach 24 h Induktion. ER-Stress wurde durch eine Behandlung mit Thapsigargin (50 nM, TG) über 2 h bzw. 6 h hervorgerufen. Die Visualisierung der KDELRs (grün) auf der Zelloberfläche erfolgte nach Fixierung der Zellen über indirekte IF mittels Anti-HA-Antikörper.

Abbildung 24 zeigt die Dynamik von PM-lokalisierten HA-Linker-KDEL-R-Varianten unter ungestressten Bedingungen (DMSO, „induziert“) sowie unter Thapsigargin-induziertem ER-Stress (2 - 6 h, TG). Um falsch positive Antikörpersignale auszuschließen, wurden auch nicht induzierte Zellen analog fixiert und mit HA-Antikörpern inkubiert. KDEL-R1 (Abbildung 24a) zeigte im ungestressten Zustand vereinzelte Fluoreszenzsignale, welche gleichmäßig über die Zellen verteilt waren, wobei einzelne Signale intensiver erschienen und so auf unterschiedlich starke Rezeptorkonzentrationen an verschiedenen Bereichen von Zellen hindeuten. Unter ER-Stress konnten Signale eher in größeren punktuellen Konzentrationen beobachtet werden, wobei hier die Intensität und auch das Ausmaß der gebundenen Antikörper mit der Stressdauer anstiegen. KDEL-R2 (Abbildung 24b) und KDEL-R3 (Abbildung 24c) zeigten unter ungestressten Bedingungen (DMSO, „induziert“) oftmals bereits fokussiertere Signale als KDEL-R1. Diese nahmen in Größe und Intensität jedoch zu, sobald die Zellen kurzfristig (2 h) oder längere Zeit Stress (6 h) ausgesetzt waren. Insgesamt fiel der Unterschied in der KDEL-R-Verteilung geringer aus, jedoch konnte tendenziell eine subtile Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden.

3.2.2. Internalisierung von KDEL-Rs nach Ligandenzugabe

Nachdem mit diesen KDEL-R-Varianten erste Einblicke in die Transportdynamik unter ER-Stressbedingungen zur Zelloberfläche gewonnen werden konnten, sollte nun zusätzlich die Internalisierung der Rezeptoren betrachtet werden. Bislang wurde die durch Bindung von extrazellulären KDEL-R-Liganden initiierte Internalisierung lediglich indirekt betrachtet. Mit den extrazellulär markierten Varianten und einer IF-basierten Detektion sollte nun aber auch die Liganden-induzierte Dynamik an den KDEL-Rs direkt abgebildet werden können (Abbildung 25).

Um Einflüsse auf die Bindung von Antikörpern zu minimieren, wurde hier nicht der mehr als 60 kDa große RTA-Modellligand verwendet, sondern ein kurzes Peptidfragment, welches auf den terminalen sieben Aminosäuren des häufigsten Bindepartners der KDEL-Rs, BiP, basiert (Bräuer *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020; Gerondopoulos *et al.*, 2021). Zur Untersuchung der Internalisierung wurden Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen 24 h im Voraus ausgesät und bei 37 °C für 30 min mit einem KDEL-R-spezifischen (TAE-KDEL) bzw. einem nicht bindenden Peptid (TAE-AAAA) inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurde die Oberflächenlokalisation der KDEL-Rs mittels Ani-HA-Antikörpern untersucht.

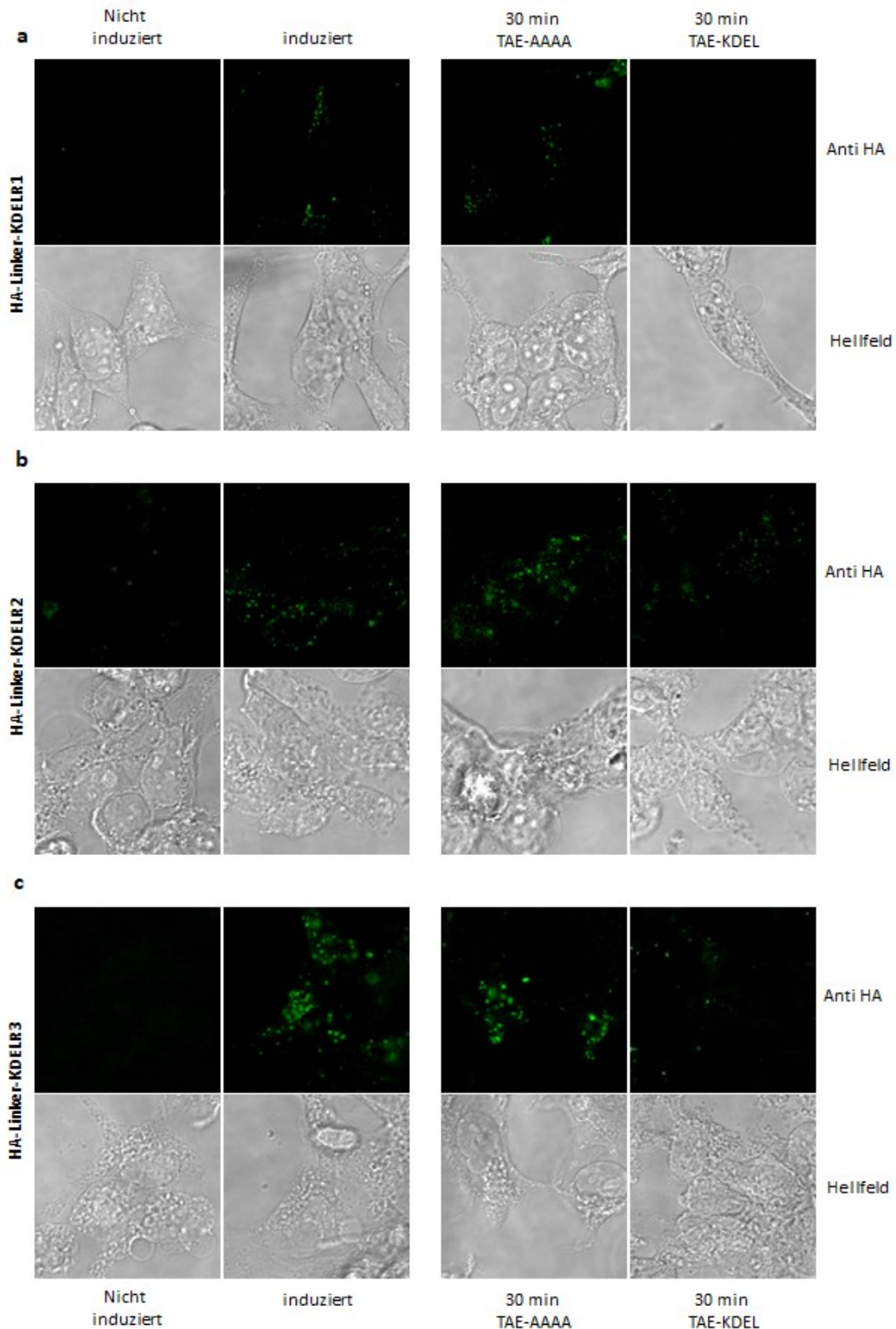


Abbildung 25: KDEL1-Dynamik auf der Oberfläche von Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen nach Zugabe extrazellulärer Liganden.

Dargestellt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit den Varianten a) HA-Linker-KDEL1, b) HA-Linker-KDEL2 und c) HA-Linker-KDEL3 nach 24 h Induktion mit 1µg/ml Tetrazyklin (induziert) bzw. unter nicht induzierenden Bedingungen. Je 50 µM Peptid mit Bindemotiv (TAE-KDEL) wie auch die Negativkontrolle (TAE-AAAA) wurden in DMEM (pH 6,5) appliziert und für einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und die Visualisierung der KDELs (grün) auf der Zelloberfläche erfolgte über indirekte IF mittels Anti-HA-Antikörpern.

Abbildung 25 zeigt die Dynamik von PM-lokalisierten HA-Linker-KDEL-R-Varianten unter Einfluss eines spezifischen Liganden mit KDEL-Motiv. KDEL-R1 (Abbildung 25a), KDEL-R2 (Abbildung 25b) und KDEL-R3 (Abbildung 25c) zeigten unter unbehandelten Bedingungen („induziert“) unterschiedlich stark konzentrierte Fluoreszenzsignale auf der Zelloberfläche. Nach einer 30-minütigen Behandlung mit TAE-KDEL-Peptid konnte eine starke Abnahme der KDEL-R-Signale beobachtet werden, während eine Behandlung mit TAE-AAAA keine Auswirkungen hatte. Insgesamt schien die Behandlung mit KDEL-R-spezifischem Liganden zu einer Abnahme großer und intensiver Fluoreszenzansammlung zu führen, allerdings war es dennoch generell möglich, KDEL-R-Signale an der Zelloberfläche zu beobachten. Diese waren tendenziell klein und schwach, wobei auch vereinzelt noch intensivere Fluoreszenz beobachtet werden konnte, welche auf lokale Rezeptoransammlungen hindeuten. Eine unspezifische Bindung von Antikörpern konnte in nicht induzierten Proben nahezu ausgeschlossen werden.

Mithilfe der in dieser Arbeit präsentierten N-terminal markierten KDEL-R-Varianten konnten nicht nur funktionelle Rezeptoren, sondern auch stabil transfizierte Zelllinien hergestellt werden. Diese erlaubten eine Markierung von Zelloberflächen-KDEL-Rs, ohne gleichzeitig die intrazellulären Rezeptoren abzubilden. Es konnte eine direkte IF-basierte Detektion an der PM durchgeführt und Hinweise auf eine stressinduzierte Verschiebung der Lokalisation von Rezeptoren hin zur Zelloberfläche gefunden werden. Ebenso gelang ein erster Einblick in die Dynamik der Rezeptoren, bei der Teile der Zelloberflächenfraktion durch eine Ligandenbindung bereits innerhalb von maximal 30 min internalisiert wurden. Mit diesem System konnte also eine Grundlage für weiterführende Dynamikstudien mit extern markierten KDEL-Rs etabliert werden.

Neben der Zelloberflächendynamik von KDEL-Rs lag in dieser Arbeit der Fokus auf der Detektion potenzieller Interaktionspartner und insbesondere deren Beteiligung am Transport der KDEL-Rs zur Zelloberfläche. Mithilfe von IF-basierten Aufnahmen am hochauflösenden CLSM sollten zum Abschluss dieser Arbeit grundlegende Colokalisationsstudien mit potenziellen KDEL-R-Interaktoren durchgeführt werden, wobei der Fokus auf dem Transport der Rezeptoren in die Zellperipherie bzw. zur PM lag. KDEL-Rs binden ihre Liganden im Lumen des ER (bzw. Extrazellularraum), während die Transportmaschinerie auf zytosolischer Seite mit den dort exponierten Rezeptorbereichen interagiert. Um nun potenzielle Interaktionen von Rezeptoren und transportrelevanten Proteinen nachzuweisen, müssen die IF-basierten Fluoreszenzsignale eine enge räumliche Nähe aufweisen. Folglich ist es sinnvoll, Rezeptorvarianten zu nutzen, die auch auf zytosolischer Seite Antigenmarkierungen

aufweisen. In vorausgegangenen Studien erwies sich eine HA-Markierung im ersten zytoplasmatischen Loop von KDELR1 als sehr geeignet für IF-basierte Aufnahmen (hergestellt im Rahmen einer Dissertation; Blum, 2018). In der vorliegenden Arbeit sollten ebenfalls KDELR2 und KDELR3 mit einem HA-Antigen-Tag versehen und analog zu vorherigen Varianten zunächst auf korrekte Expression und Funktion in Hefe überprüft werden. Im Anschluss sollten diese Varianten stabil in das Genom von Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen integriert und zunächst auf ihre korrekte Lokalisation hin überprüft werden, bevor sie für umfangreiche Colokalisationsstudien verwendet wurden (Abbildung 26). Die hier dargestellten Varianten und nachfolgenden Experimente wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Galina Breitmeier im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt (Breitmeier, 2020).

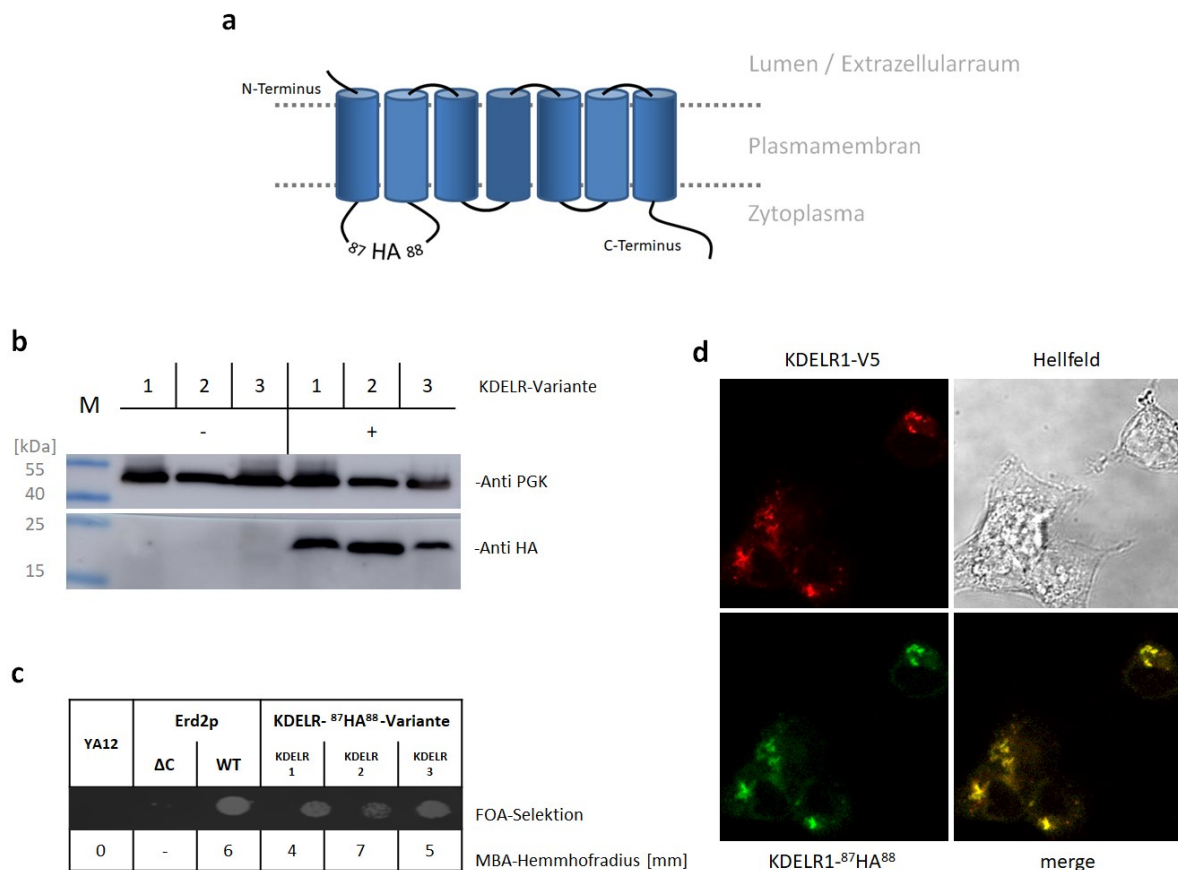


Abbildung 26: Funktion und Expression von KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten.

a) Schematisches Modell der KDELR-Varianten mit Insertion eines HA-Tags zwischen D87 und G88 im ersten zytoplasmatischen Loop. b) Western-Analyse der Expression von KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten in *S. cerevisiae* YA12 nach SDS-PAGE. Als Ladekontrolle wurde PGK verwendet, während die Visualisierung der Rezeptoren mit Anti-HA-Antikörpern durchgeführt wurde. Medium mit Glukose stellt die nicht induzierten Bedingungen (-) dar, während galaktosehaltiges Medium (+) zur 24-stündigen Expression verwendet wurde. c) Funktionalitätsüberprüfung von KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten in YA12 mittels FOA-Selektion sowie Sensitivitätsanalyse im Agardiffusionstest gegenüber K28-Toxin. d) Vergleich der Lokalisation von KDELR1-⁸⁷HA⁸⁸ (grün) mit der bereits etablierten KDEL1-V5-Variante (rot). HeLa-Zellen wurden mit beiden Rezeptorvarianten cotransformiert und die Expression für 24 h unter Standardbedingungen durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Fixierung und Permeabilisierung sowie die Behandlung der Zellen mit Anti-V5- bzw. Anti-HA-Antikörpern mit entsprechenden sekundären, fluorophorgekoppelten Antikörpern (AF647 bzw. AF488).

Abbildung 26a zeigt das schematische Modell der KDELR-Varianten. Das in dieser Arbeit bereits vorgestellte HA-Antigen-Tag wurde im ersten zytoplasmatischen Loop zwischen die Aminosäureposition D87 und G88 integriert. Die Expression und Detektierbarkeit der Varianten bei etwa 24 kDa wurde zunächst in *S. cerevisiae* unter nicht induzierenden (Glukose, -) und induzierenden Bedingungen (Galaktose, +) erfolgreich verifiziert (Abbildung 26b). Abbildung 26c zeigt die Funktionalitätsüberprüfung der KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Konstrukte in *S. cerevisiae* mittels FOA-Selektion und Überprüfung der Sensitivität gegenüber K28 im MBA-Diffusionstest. Grundsätzlich waren die zytoplasmatisch HA-

markierten Varianten in der Lage, die Deletion des HDEL-Rezeptors in Hefe zu kompensieren. Die Funktionalität konnte ebenfalls im MBA-Test bestätigt werden, wobei die getesteten Säugervarianten ähnlich große Hemmhöfe erzeugten wie der wildtypische HDEL-Rezeptor. Eine erste Überprüfung der Lokalisation von KDELR1-⁸⁷HA⁸⁸ wurde durch eine transiente Cotransfektion dieser Variante mit einer bereits etablierten C-terminal V5-markierten Variante durchgeführt (Abbildung 26d). Es zeigte sich eine nahezu vollständige Überlagerung der Fluoreszenzsignale von KDELR1-V5 (rot) mit denen von KDELR1-⁸⁷HA⁸⁸ (grün).

Nach erfolgter stabiler Integration der Konstrukte in Flp-InTM T-RExTM HEK293-Zellen wurde die intrazelluläre Lokalisation in Säugerzellen überprüft (Abbildung 27).

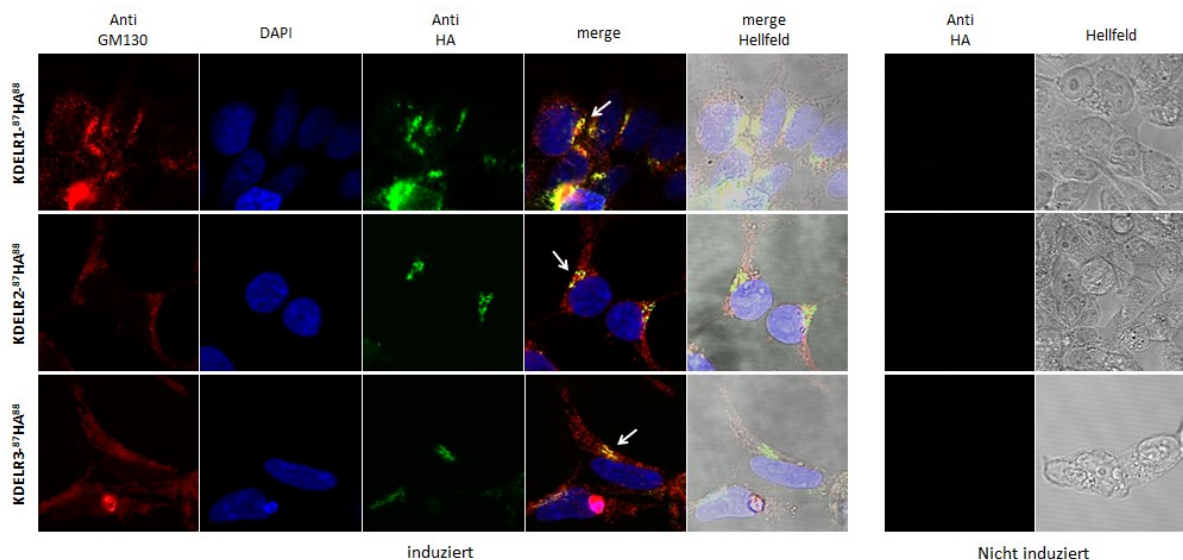


Abbildung 27: Expression von KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten in stabil transfizierten Flp-InTM T-RExTM 293-Zellen.

Dargestellt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-InTM T-RExTM 293-Zellen mit der jeweils angegebenen HA-getaggten KDELR-Variante. Die Induktion erfolgte durch Behandlung mit 1 µg/ml Tetrazyklin über 24 h. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der KDELRs (grün) und des *cis*-Golgi (rot) erfolgte über indirekte IF mittels Anti-HA- bzw. Anti-GM130 Antikörpern. Eine Gegenfärbung des Zellkerns (blau) wurde mit DAPI durchgeführt. Überlagernde Fluoreszenzsignale (gelb) des *cis*-Golgi Markers und der KDELRs sind beispielhaft mit weißen Pfeilen markiert.

KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten wurden per Anti-HA-Antikörper (grün) detektiert und deren Lokalisation mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 (rot) verglichen, wobei sich Bereiche mit stark übereinstimmenden Signalen zeigten (weiße Pfeile). Die Lokalisation war folglich größtenteils im Golgi, jedoch konnte in verschiedenen Zellen auch eine eher schwächere perinukleäre Verteilung detektiert werden.

Insgesamt zeigten auch die zytoplasmatisch markierten KDELR-Varianten die zu erwartende Lokalisation und waren folglich für weiterführende Colokalisationsstudien geeignet.

3.3. Einblicke in das KDELR-Interaktom: Rab-Proteine als Transportregulatoren

Um erste Einblicke in die Rolle der am KDELR-Transport beteiligten Proteine zu erhalten, wurde zur Identifikation potenzieller Interaktionspartner ein bisher nicht veröffentlichtes KDELR-Interaktom herangezogen (Becker, persönliche Mitteilung). Dieses lässt vermuten, dass mehrere transportassoziierte Proteine auch abseits der KDELR-Hauptlokalisation im ER/Golgi-Bereich mit den Rezeptoren interagieren könnten. Insbesondere zeigten sich hierbei eine Vielzahl von Rab-Proteinen als hochinteressante Kandidaten, da sie als „Master Regulatoren“ des intrazellulären Proteintransports an allen relevanten Vorgängen, von der Vesikelbildung hin zur -verschmelzung, aktiv beteiligt sind (Zerial & McBride 2001).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen zunächst den „Status quo“ der Lokalisation, wobei durch Überexpression von HA-markierten Rezeptoren und Rab-Proteinen eine Abschätzung der potenziellen Interaktion erfolgen sollte. Fluorophorgekoppelte Varianten der monomeren Rab-Proteine wurden bereits vielfach für Interaktions- und Lokalisationsstudien verwendet, weshalb auch in dieser Arbeit kommerziell erhältliche eGFP-gekoppelte Varianten eingesetzt wurden.

3.3.1. Colokalisation von Rab-Proteinen und KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten

Flp-InTM T-RExTM 293-Zellen wurden 24 h nach Aussaat transient mit der jeweiligen eGFP-Rab-Variante transfiziert und 24 h danach zusätzlich die jeweiligen KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten induziert. Die visuelle Darstellung der Rezeptoren erfolgte nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mittels Anti-HA- und AF647-gekoppeltem sekundärem Antikörper (rot), während Rab-Proteine über das gekoppelte eGFP (grün) detektiert wurden.

In Abbildung 28 sind Beispiele der durchgeführten Colokalisationsstudie zwischen HA-markierten KDELR-Varianten (rot) und den eGFP-markierten Rab-Proteinen Rab1a, Rab3a und Rab4a (grün) gezeigt. Hierbei sollten mithilfe von Rab1a ER-Golgi-Transportvorgänge visualisiert werden (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012; Zerial & McBride 2001), während ein potenzieller Nachweis von KDELRs in „secretory granules“ des Golgis durch eine Colokalisation mit Rab3a gezeigt werden könnte (Wandinger-Ness & Zerial, 2014). Rab4a reguliert Transportvorgänge, die unter der Beteiligung von Clathrin-behüllten Vesikeln ablaufen, sodass eine Lokalisation in frühen endosomalen Kompartimenten wie dem Recycling-Endosom angenommen wird, was im Kontext eines KDELR-Transports zur Zelloberfläche einen interessanten Aspekt darstellt (Van Der Sluijs *et al.*, 1991; Wandinger-Ness & Zerial, 2014).

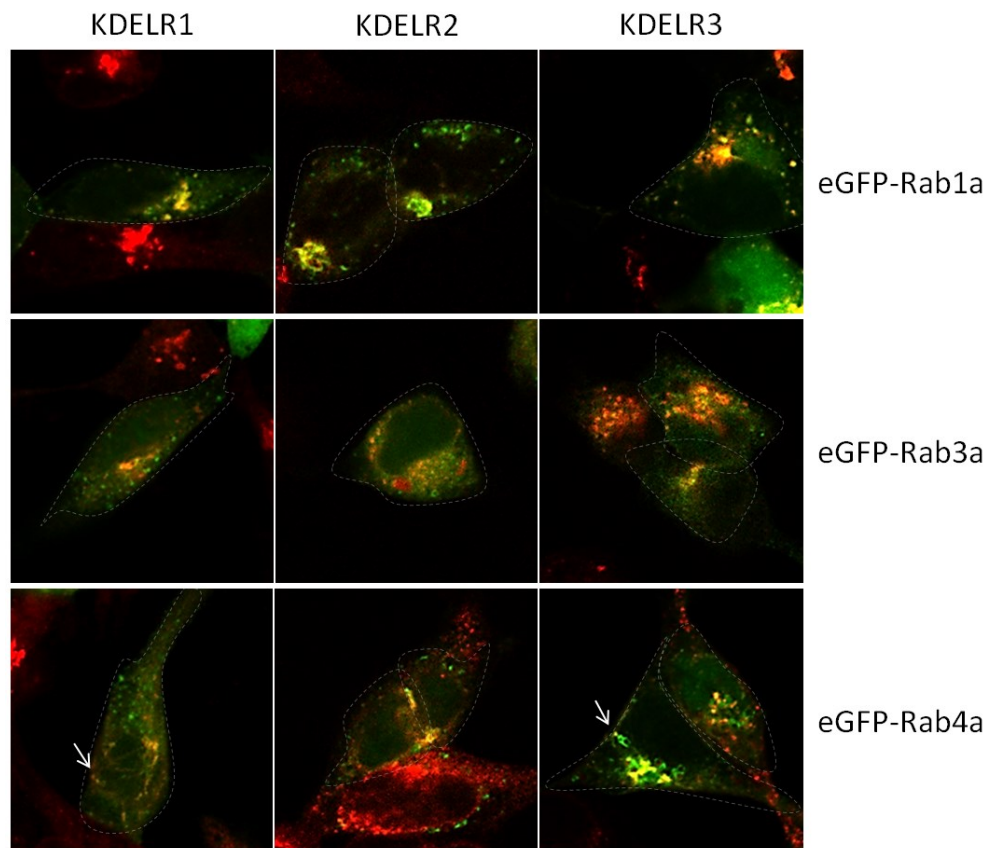


Abbildung 28: Lokalisation von Rab1a, Rab3a, Rab4a und KDEL R-Varianten in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen.

Gezeigt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit den jeweiligen KDEL R-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten. Die Expression der KDEL Rs wurde 24 h nach transients Transfektion der angegebenen eGFP-Rab-Varianten über 24 h induziert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der KDEL Rs (rot) erfolgte über indirekte IF mittels Anti-HA-Antikörper und sekundärem AF647-gekoppelten Antikörper, während Rab-Proteine (grün) direkt über das gekoppelte eGFP detektiert wurden. Zellgrenzen werden durch gestrichelte Linien dargestellt, im Text beschriebene Colokalisationen sind mit weißen Pfeilen hervorgehoben.

Rab1a-Signale waren konzentriert in der Nähe des Zellkerns oder in perinukleären Bereichen zu sehen. Die Lokalisation aller KDEL Rs stimmte zum Großteil damit überein, so dass deren hauptsächliche Golgi/ER-Lokalisation bestätigt werden konnte. Rab3a zeigte sich hingegen weniger fokussiert und implizierte vesikuläre Strukturen, welche über die gesamte Fläche der Zellen verteilt waren. Insbesondere im Fall von KDEL R2 und KDEL R3 könnte die gemeinsame Überexpression zu einer weniger strukturierten KDEL R-Lokalisation im Golgi führen. Rab4a zeigte aufgrund seiner starken endosomalen Assoziation punktuelle Signale, welche über die gesamte Zelle verteilt sichtbar waren. Zusätzlich konnten Signale detektiert werden, die eher der Lokalisation in Golgi und ER entsprechen könnten. Die Expression von Rab4a führte zu einer breiteren Verteilung der KDEL Rs, sodass deren Golgi-Lokalisation weniger fokussiert beobachtet werden konnte. Insbesondere vereinzelte gelbe Signale

deuteten auf Transportvorgänge von KDELR1 und KDELR3 im peripheren späten bzw. frühen Endosom in der Nähe der Plasmamembran hin (weiße Pfeile).

Rab5b ist am Transport Clathrin-behüllter Vesikel beteiligt und durch Fusionsvorgänge von Membranen im frühen Endosom lokalisiert, weshalb eine Untersuchung bezüglich der Colokalisation mit KDELRs Aufschluss über postendozytäre Vorgänge liefern könnte (Agola *et al.*, 2011; Chavrier *et al.*, 1990). Hinweise auf einen Golgi-PM-Transport von KDELRs könnten durch die Colokalisation zu Rab6a erlangt werden. Dieses koordiniert universell mit dem Golgi assoziierte Transportvorgänge, wobei sowohl die Regulierung von intra-Golgi Transportvorgängen, aber auch die Beteiligung am direkten Golgi-PM-Transport oder ins endosomale Kompartiment beschrieben ist. Zusätzlich zirkuliert Rab6a auch zwischen den Membranen von ER und Golgi (White *et al.*, 1999; Pfeffer, 2011). Abschließend sollten durch Coexpression der KDELRs mit Rab8a Transportvorgänge zur Plasmamembran untersucht werden, wobei insbesondere Teile des Recycling-Endosoms und des Golgis Ausgangspunkte für Rab8a-assoziierte Transportvesikel darstellen (Huber *et al.*, 1993; Wandinger-Ness & Zerial, 2014). Abbildung 29 zeigt diese Colokalisationsstudien mit eGFP-markierten Varianten von Rab5b, Rab6a, Rab8a (grün).

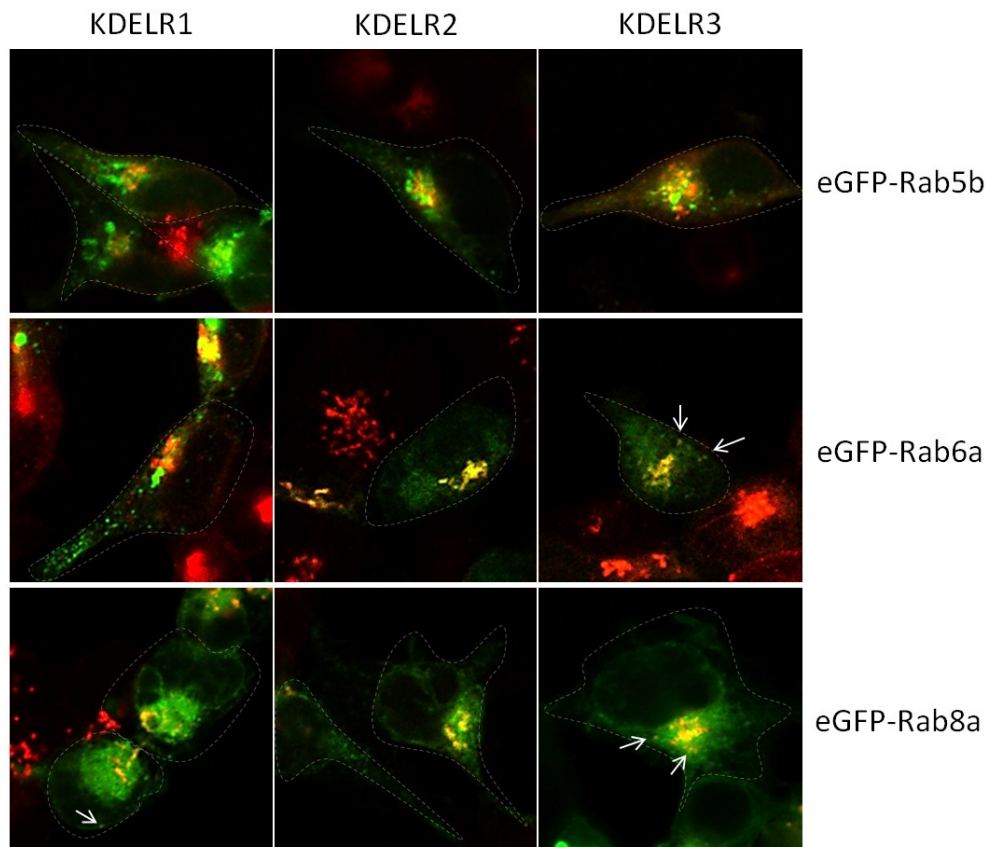


Abbildung 29: Lokalisation von Rab5b, Rab6a, Rab8a und KDEL R-Varianten in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen.

Gezeigt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit den jeweiligen KDEL R-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten. Die Expression der KDEL Rs wurde 24 h nach transients Transfektion der angegebenen eGFP-Rab-Varianten über 24 h induziert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der KDEL Rs (rot) erfolgte über indirekte IF mittels Anti-HA-Antikörper und sekundärem AF647-gekoppelten Antikörper, während Rab-Proteine (grün) direkt über das gekoppelte eGFP detektiert wurden. Zellgrenzen werden durch gestrichelte Linien dargestellt, im Text beschriebene Colokalisationen sind mit weißen Pfeilen hervorgehoben.

Rab5b zeigte eine stark konzentrierte Lokalisation im perinukleären Bereich, welche die Organellen des frühen sekretorischen „Pathways“ darstellen könnten. Eher diffuse bzw. stärker verteilte Signale in der Zellperipherie stimmten mit der Rab5b-Assoziation von Transportvorgängen in endosomalen Bereichen bzw. im Clathrin-Vesikel-Transport überein. Die Lokalisation der KDEL Rs schien stark auf Golgi-Membranen beschränkt zu sein. Hier zeigten Rab5b und KDEL Rs im Detail leicht unterschiedliche Lokalisationen, was auf eine Aufteilung der Signale von Rab5a zum *trans*-Golgi oder frühen endosomalen Bereichen und der KDEL Rs zum *cis*-Golgi hindeutet. Rab6a zeigte eine deutlichere Fokussierung auf Golgi-Bereiche mit starker Colokalisation im Falle von KDEL R2 und KDEL R3, während KDEL R1 tendenziell weniger stark ausgeprägte Übereinstimmungen zeigte. Vereinzelt positive Signale könnten bei Betrachtung von KDEL R3 in peripheren Zellbereichen auf Transportvesikel in endosomalen Bereichen hinweisen (weiße Pfeile). Rab8a zeigte eine

weniger strukturierte Verteilung, wobei nahezu flächendeckende Fluoreszenzsignale in den peripheren Zellbereichen die Beteiligung an Recycling- und Transportvorgängen zur PM hin suggerierten. Die Colokalisation mit KDELRs beschränkte sich größtenteils auf Signale des Golgi, wobei vereinzelte positive Signale von KDELR1 und KDELR3 auf Transportvorgänge fernab des TGN hindeuten könnten (weiße Pfeile).

Im nächsten Abschnitt werden potenzielle KDELR-Transportvorgänge untersucht, welche mit Rab10 in Verbindung stehen. Rab10 lokalisiert im TGN und reguliert Membranströme von dort zur PM (Chen & Lippincott-Schwartz, 2013). Vom Golgi ausgehend können jedoch auch unter Beteiligung von Rab14 und Rab18 Proteine in das endosomale Kompartiment transportiert werden, weshalb diese ebenso mit KDELRs coexprimiert und bezüglich einer potenziellen Colokalisation untersucht wurden (Junutula *et al.*, 2004; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012; Zerial & McBride 2001). In Abbildung 30 sind Aufnahmen dieser Untersuchung gezeigt, wobei HA-markierte KDELRs rot und eGFP-markierte Varianten Rab10, Rab14 und Rab18 jeweils grün dargestellt sind.

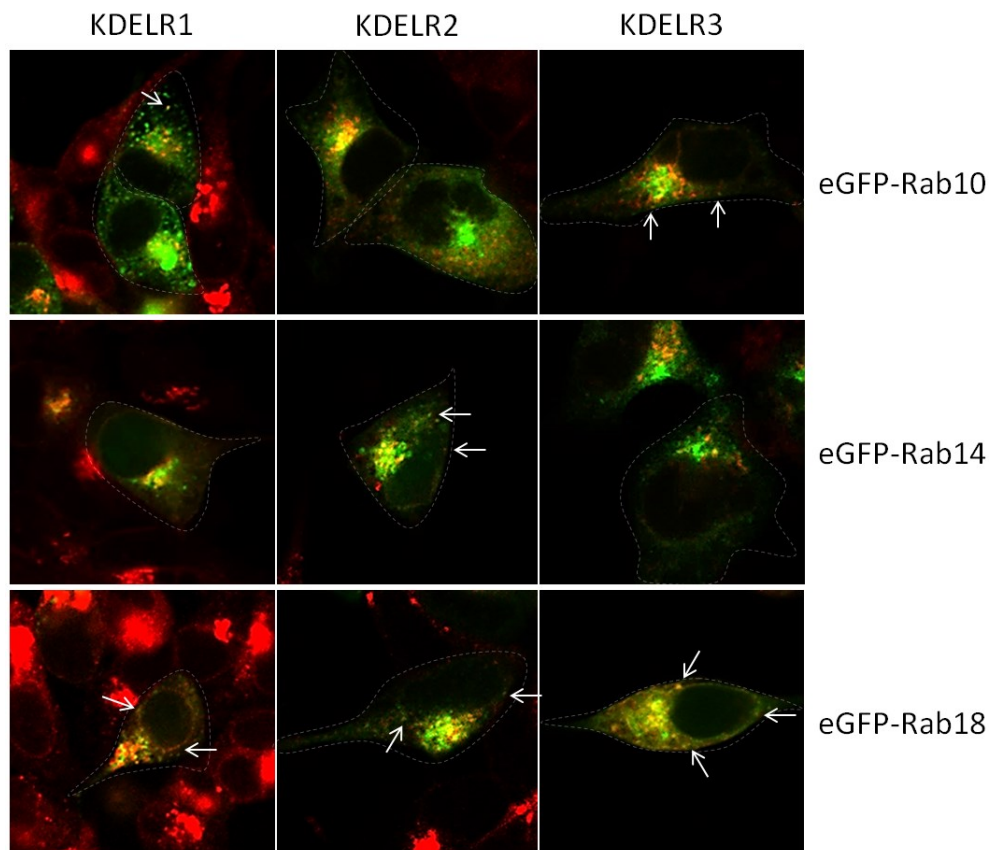


Abbildung 30: Lokalisation von Rab10, Rab14, Rab18 und KDELRL-Varianten in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen.

Gezeigt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit den jeweiligen KDELRL-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten. Die Expression der KDELRLs wurde 24 h nach transients Transfektion der angegebenen eGFP-Rab-Varianten über 24 h induziert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der KDELRLs (rot) erfolgte über indirekte IF mittels Anti-HA-Antikörper und sekundärem AF647-gekoppelten Antikörper, während Rab-Proteine (grün) direkt über das gekoppelte eGFP detektiert wurden. Zellgrenzen werden durch gestrichelte Linien dargestellt, im Text beschriebene Colokalisationen sind mit weißen Pfeilen hervorgehoben.

Rab10 zeigte in verschiedenen Zellen eine unterschiedlich stark ausgeprägte charakteristische Lokalisation, wobei stets vermehrt Signale in der Nähe des Nukleus sowie auch punktuelle Signale über die gesamte Zelle verteilt detektierbar waren. Diese peripheren Signale wiesen Übereinstimmungen mit KDELRL1 und KDELRL2 (weiße Pfeile) auf. KDELRL3 war etwas konzentrierter in den Golgi-Bereichen lokalisiert, jedoch auch mit weiteren vereinzelt positiven Colokalisationen in der Peripherie. Eine ähnliche Konzentration der Fluoreszenzsignale in Golgi-Bereichen zeigte sich auch im Falle von Rab14, wobei hier deutlich weniger punktuelle Signale in der Peripherie sichtbar waren. Die Lokalisation mit KDELRLs beschränkte sich auch vermehrt auf den Bereich des Golgi, wobei KDELRL2 abermals einzelne positive Signale in der Peripherie aufwies (weiße Pfeile). Die Coexpression von Rab18 und KDELRLs zeigte weniger übereinstimmende Signale in den Membranen des Golgi, sodass hier teilweise eher zwischen Rab18-positiven und KDELRL-positiven

Membranabschnitten unterschieden werden konnte. Die Lokalisation von Rab18 in der Zellperipherie wurde durch zahlreiche punktuelle Signale dokumentiert (weiße Pfeile), wobei eine bedeutende Übereinstimmung insbesondere mit KDELR2 und KDELR3 sichtbar war.

Im nächsten Abschnitt fokussierte sich die Untersuchung auf Rab-Proteine des endosomalen Kompartiments. Rab21 ist an endozytären Vorgängen beteiligt und hauptsächlich im frühen Endosom lokalisiert, während Rab22a und Rab31a Transportvorgänge von dort aus hin zum Golgi regulieren (Wandinger-Ness & Zerial, 2014; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012; Zerial & McBride 2001). In Abbildung 31 sind Beispiele der Colokalisation zwischen HA-markierten KDELR-Varianten (rot) und eGFP-markierten Rab-Proteinen Rab21, Rab22a und Rab31a (grün) gezeigt.

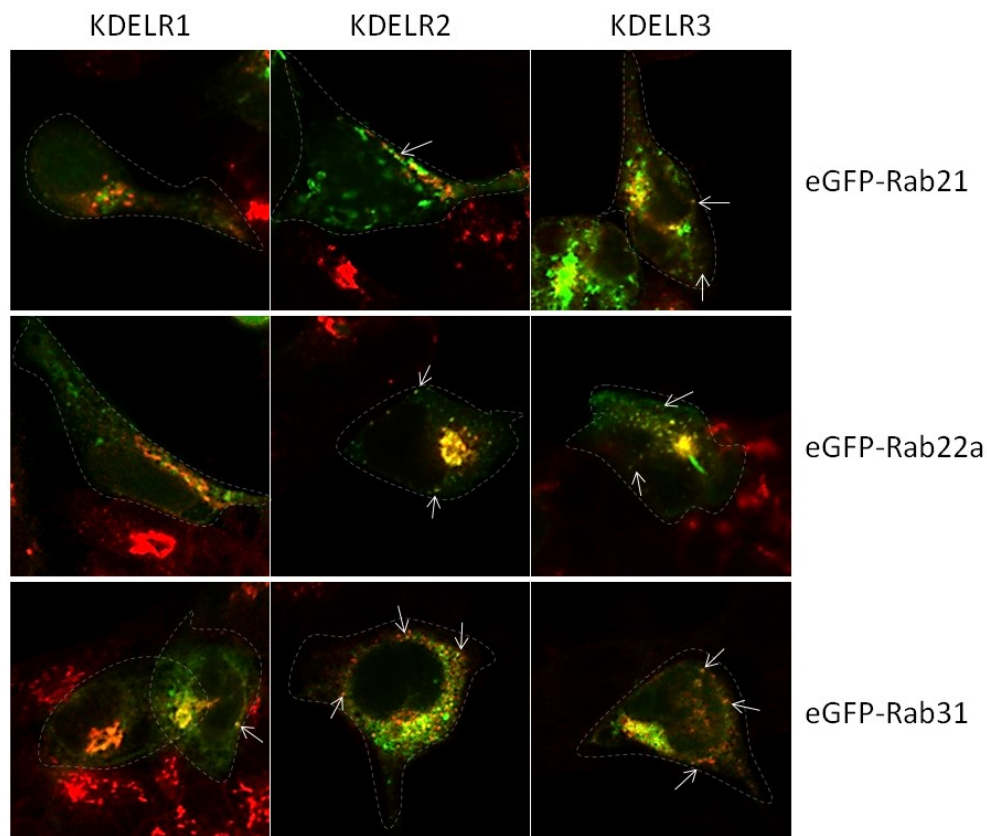


Abbildung 31: Lokalisation von Rab21, Rab22a, Rab31 und KDELR-Varianten in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen.

Gezeigt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit den jeweiligen KDELR-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten. Die Expression der KDELRs wurde 24 h nach transients Transfektion der angegebenen eGFP-Rab-Varianten über 24 h induziert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der KDELRs (rot) erfolgte über indirekte IF mittels Anti-HA-Antikörper und sekundärem AF647-gekoppelten Antikörper, während Rab-Proteine (grün) direkt über das gekoppelte eGFP detektiert wurden. Zellgrenzen werden durch gestrichelte Linien dargestellt, im Text beschriebene Colokalisationen sind mit weißen Pfeilen hervorgehoben.

Rab21-Signale waren hauptsächlich als lokale Ansammlungen in der Zellperipherie erkennbar, was auf eine Verankerung in endosomalen Membranen hindeutet. Die Lokalisation der KDELRs schien unter Coexpression mit Rab22 weniger konzentriert, sondern eher punktuell über die gesamte Zelle verteilt zu sein. Einige Signale in der Zellperipherie wiesen auf Colokalisationen im endosomalen Bereich hin, insbesondere bei KDELR2 und KDELR3 (weiße Pfeile). Rab22a und KDELRs zeigten durch die gemeinsame Lokalisation im Golgi eine Überlagerung der Signale in der Nähe des Nukleus. Während im Falle von KDELR1 eine Trennung zwischen dem eher *cis*-Golgi lokalisierten Rezeptor und dem *trans*-Golgi fokussierten Rab22a erkennbar war, wurde dies bei KDELR2 und KDELR3 nicht in dem Maße beobachtet. In der Zellperipherie waren für beide Rezeptoren zusätzlich einzelne punktuelle Colokalisationssignale detektierbar (weiße Pfeile). Für Rab31 sind Beispiele der leicht variablen Lokalisation dieses Proteins gezeigt. Diese konnte je nach Zelle eher hin zum Golgi oder eher in die Zellperipherie verschoben sein. KDELR1 und KDELR3 zeigten tendenziell eine stärkere Überlagerung der Signale zum Golgi hin, während KDELR2 eher punktuell einzelne Colokalisationssignale in der Zellperipherie aufwies. Insgesamt waren auch hier bei allen KDELRs einzelne Signale in der Zellperipherie abseits des Golgi dokumentierbar (weiße Pfeile).

Abbildung 32 zeigt Colokalisationsstudien mit HA-markierten KDELR-Varianten und die eGFP-markierten Varianten Rab32 sowie Rab35. Rab32 ist in den Membranen von Mitochondrien und Melanosomen lokalisiert, wobei zusätzlich die Beteiligung bei autophagozytären Vorgängen und den damit einhergehenden Membranströmen berichtet wird (Bultema *et al.*, 2012). Rab35 hingegen beschränkt sich in seiner Lokalisation auf die äußerste Zellperipherie, wo es direkt in die PM integriert wird und dort Internalisierungs- und Recyclingvorgänge zwischen frühem Endosom und PM reguliert (Wandinger-Ness & Zerial, 2014).

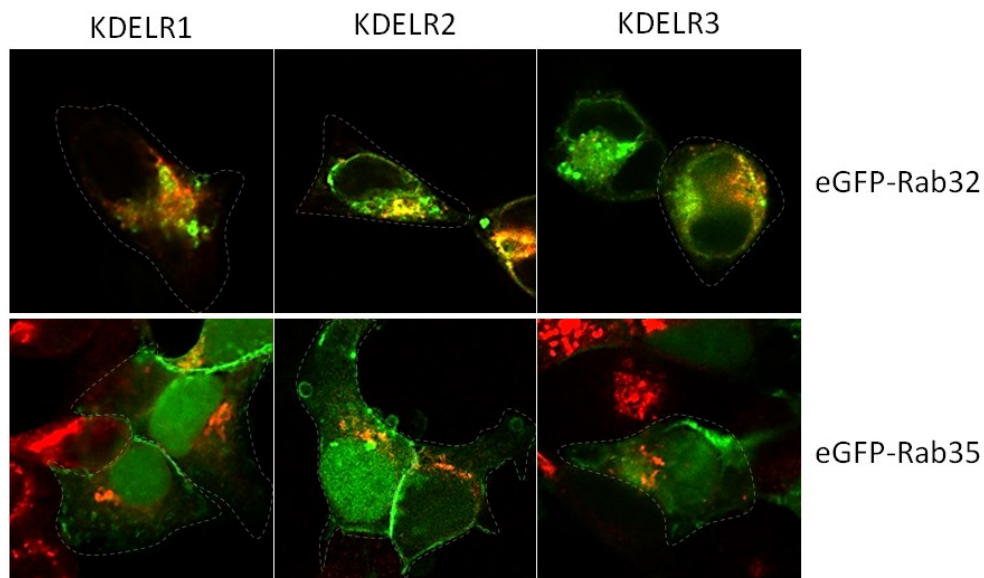


Abbildung 32: Lokalisation von Rab32, Rab35 und KDEL-varianten in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen.

Gezeigt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit den jeweiligen KDEL-⁸⁷HA⁸⁸-Varianten. Die Expression der KDELs wurde 24 h nach transienter Transfektion der angegebenen eGFP-Rab-Varianten über 24 h induziert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der KDELs (rot) erfolgte über indirekte IF mittels Anti-HA-Antikörper und sekundärem AF647-gekoppeltem Antikörper, während Rab-Proteine (grün) direkt über das gekoppelte eGFP detektiert wurden. Zellgrenzen werden durch gestrichelte Linien dargestellt.

Rab32 zeigte lokal starke punktuelle Ansammlungen und war zudem als Ring um den Nukleus sowie im Golgi erkennbar, was als Folge der starken Überexpression auf eine Ansammlung in Membranen des frühen sekretorischen „Pathways“ zurückgeführt werden könnte. KDELs waren tendenziell als lokale Überlagerung im Golgi und ER detektierbar. Rab35 lokalisierte in der Plasmamembran, was besonders deutlich an Zell/Zell-Kontakten beobachtet werden konnte. Es konnte keine eindeutige Colokalisation mit KDELs festgestellt werden, wobei minimale Überlagerungen im Golgi vermutet werden konnten.

3.3.2. Colokalisation von Rab-Proteinen und KDEL-mCherry-Varianten

Die kommerziell erhältlichen Varianten von Rab7 und Rab11 verfügen neben eGFP über ein zusätzliches HA-Antigen-Tag, weshalb die bisher verwendeten KDEL-HA-Varianten nicht mehr verwendet werden konnten. Um dennoch eine Detektion der KDELs zu ermöglichen, wurde eine bereits etablierte Flp-In™ T-REx™ 293-Zelllinie mit einer C-terminal markierten KDEL1-mCherry-Variante verwendet (Rammo, 2017). Diese wurde in der hier vorliegenden Arbeit noch um eine stabil transfizierte Flp-In™ T-REx™ 293 KDEL2-mCherry-Zelllinie ergänzt, wobei eine KDEL3-Variante aus Zeitgründen nicht mehr hergestellt werden konnte.

Durch die Regulierung von Transportvorgängen zwischen frühem und spätem Endosom bis hin zum Golgi und Lysosom war Rab7a hauptsächlich in diesen Organellen nachweisbar. Zusätzlich wurde die Beteiligung von Rab7a bei der Ausbildung von Autophagosomen nachgewiesen (Pfeffer, 2009; Wandinger-Ness & Zerial, 2014; Zerial & McBride 2001; Hyttinen *et al.*, 2013). Rab11a hingegen ist bei endozytären Vorgängen und dem direkten Transport aus dem Recycling-Endosom zurück zur PM beteiligt. Ebenso scheinen auch Rab11a-regulierte Transportwege zwischen dem TGN und endosomalen Kompartimenten zu existieren (Ullrich *et al.*, 1996; Trischler *et al.*, 1999). In Abbildung 33 sind C-terminal mit mCherry markierte Varianten von KDELR1 und KDELR2 (rot) sowie eGFP-HA-markierte Rab7a- bzw. Rab11a-Varianten (grün) dargestellt.

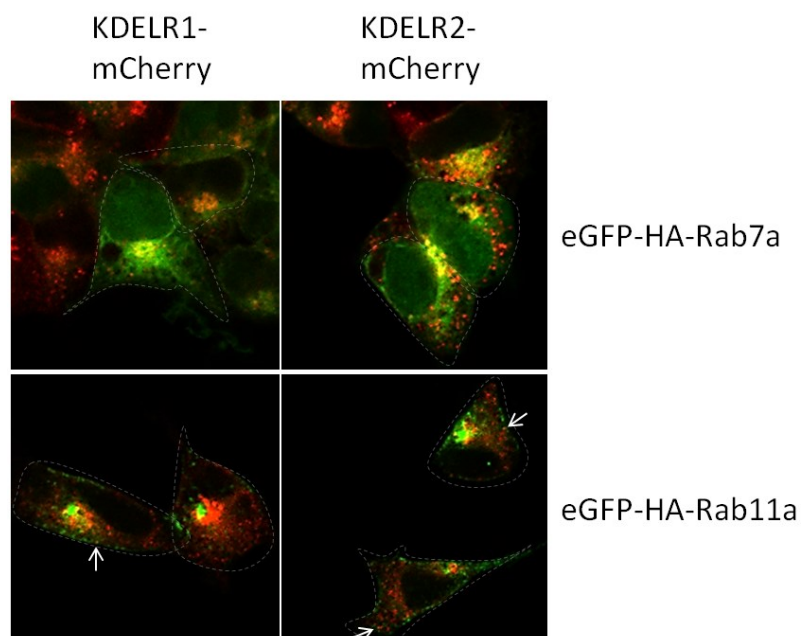


Abbildung 33: Lokalisation von Rab7a, Rab11a und KDELR-Varianten in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen.

Gezeigt sind am CLSM erstellte Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit den jeweiligen KDELR-mCherry-Varianten. Die Expression der KDELRs wurde 24 h nach transients Transfektion der angegebenen eGFP-HA-Rab-Varianten über 24 h induziert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. KDELRs (rot) und Rab-Proteine (grün) konnten direkt über das gekoppelte mCherry bzw. eGFP detektiert werden. Zellgrenzen werden durch gestrichelte Linien dargestellt, im Text beschriebene Colokalisationen sind mit weißen Pfeilen hervorgehoben.

Rab7a zeigte eine nahezu gleichmäßige Verteilung in der gesamten Zelle, wobei neben dem endosomalen Netzwerk sowie dem Golgi auch Signale in Bereichen des Nukleus sichtbar waren. Insbesondere im Golgi war eine starke Überlagerung von KDELR-Signalen und Rab7a feststellbar. Rab11a zeigte einerseits punktuelle Signale entlang der Plasmamembran, aber auch eine perinukleäre Ansammlung, welche mit der Lokalisation von KDELR1 und KDELR2 teilweise übereinstimmte. Hierbei lässt sich eine Trennung zwischen dem eher im

trans-Golgi-lokalisierten Rab11a und den eher im *cis*-Golgi lokalisierten Rezeptoren ableiten. KDELR1 und KDELR2 zeigten vereinzelte schwach positive Signale in der Nähe der Plasmamembran.

In diesen grundlegenden Colokalisationsexperimenten sollten durch die gleichzeitige Überexpression eGFP-gekoppelter Rab-Proteine und verschiedener KDELR-Varianten erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion dieser Proteine untersucht werden. Hierbei zeigte sich die vielfältige Spezialisierung der Rab-Proteine an Transportvorgängen zwischen allen Zellorganellen. Neben der obligatorischen Lokalisation der KDELRs in Membranen des Golgi, konnten einige potenzielle Transportereignisse bzw. Colokalisationen in Organellen des späten Sekretionsweg beobachtet werden. Somit konnten die hier neu hergestellten Varianten erfolgreich in einem Versuchsansatz eingesetzt werden, welcher die grundsätzliche Beteiligung von KDELRs in Transportvorgängen abseits des Golgi bestätigt.

Die bisherigen Colokalisationsstudien basieren auf der statischen Überexpression von KDELRs und Rab-Proteinen. Um nun einen ersten Einblick in dynamische Interaktionen zu erhalten, sollten die in dieser Arbeit bereits vorgestellten KDELR-spezifischen Peptide extrazellulär appliziert werden. Hierdurch sollten KDELRs an der Zelloberfläche aktiviert und internalisiert werden, wodurch sich intrazelluläre Colokalisationsänderungen mit Rab-Proteinen ergeben könnten. Hierzu wurden stabil transfizierte Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen, welche die KDELR1-mCherry Variante Tetrazyklin-abhängig exprimierten, analog zu vorherigen Experimenten mit eGFP-Rab-Proteinen transfiziert, über 30 min mit TAE-KDEL- bzw. TAE-AAAA-Peptiden inkubiert und währenddessen in einem „Live Cell Imaging“-Ansatz beobachtet. Diese Experimente wurden mit insgesamt zehn verschiedenen Rab-Proteinen durchgeführt, welche einen funktionellen Bezug zum Transport zur Zelloberfläche oder in endosomale Kompartimente haben. Beispiele für beobachtete Peptid-induzierte Veränderungen der Rab-KDELR-Colokalisation werden hier nachfolgend gezeigt. Zunächst sollte durch Coexpression von Rab5b untersucht werden, inwiefern es zu Änderungen der Colokalisation zwischen KDELR1 und der im endosomalen Kompartiment agierenden Rab-Proteine kommt.

Abbildung 34 zeigt die Colokalisationsstudien zu KDELR1-mCherry und eGFP-gekoppeltem Rab5b während der 30-minütigen Inkubation mit a) TAE-KDEL bzw. b) TAE-AAAA Peptid.

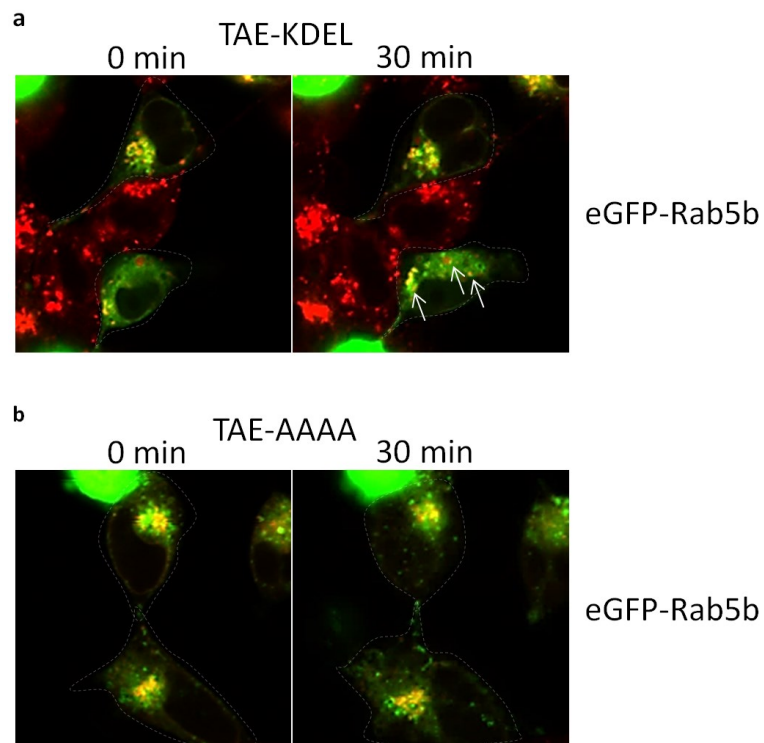


Abbildung 34: Colokalisation von Rab5b und KDELRL1-mCherry in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen nach Peptidbehandlung.

Gezeigt sind am CLSM erstellte „Live Cell Imaging“-Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit einer KDELRL1-mCherry-Variante. Die Expression wurde 24 h nach transienter Transfektion von eGFP-Rab5b für weitere 24 h induziert. Gezeigt sind Aufnahmen der Fluoreszenz unmittelbar nach Applikation der Peptide sowie nach 30 min. KDELRLs (rot) und Rab-Proteine (grün) konnten direkt über das gekoppelte mCherry bzw. eGFP detektiert werden. Zellgrenzen sind weiß gestrichelt dargestellt und potenzielle Colokalisationsänderungen mit weißen Pfeilen hervorgehoben. a) Aufnahmen unter Verwendung von 50 µM TAE-KDEL. b) Negativkontrolle unter Verwendung von 50 µM TAE-AAAA.

Eine deutliche Colokalisation zwischen Rab5b und KDELRL1 war zu Versuchsbeginn wie bereits zuvor dokumentiert im Golgi detektierbar. Durch die TAE-KDEL Ligandenzugabe zeigten sich nach 30 min zusätzlich einzelne Fluoreszenzsignale in peripheren Zellbereichen (Abbildung 34a, weiße Pfeile). Die Zugabe von TAE-AAAA als Negativkontrolle zeigte keine Änderungen der intrazellulären Colokalisation mit Rab5b (Abbildung 34b).

Durch Coexpression von KDELRL1-mCherry und Rab6a wurde als nächstes der Einfluss einer externen Ligandenapplikation auf direkte Transportvorgänge zwischen PM und Golgi untersucht (Abbildung 35).

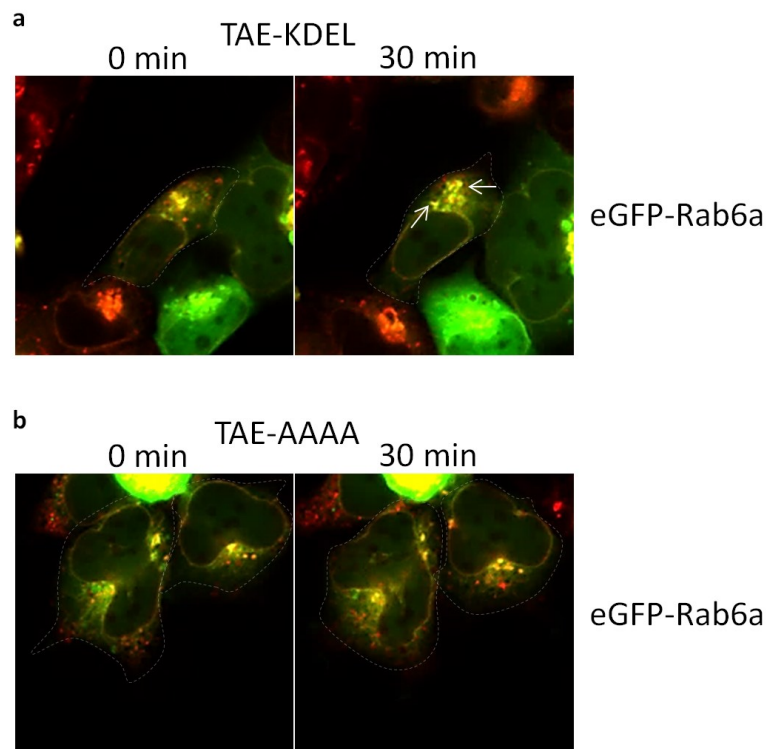


Abbildung 35: Colokalisation von Rab6a und KDELRL1-mCherry in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen nach Peptidbehandlung.

Gezeigt sind am CLSM erstellte „Live Cell Imaging“-Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit einer KDELRL1-mCherry-Variante. Die Expression wurde 24 h nach transients Transfektion von eGFP-Rab6a für weitere 24 h induziert. Gezeigt sind Aufnahmen der Fluoreszenz unmittelbar nach Applikation der Peptide sowie nach 30 min. KDELRLs (rot) und Rab-Proteine (grün) konnten direkt über das gekoppelte mCherry bzw. eGFP detektiert werden. Zellgrenzen sind weiß gestrichelt dargestellt und potenzielle Colokalisationsänderungen mit weißen Pfeilen hervorgehoben. a) Aufnahmen unter Verwendung von 50 µM TAE-KDEL. b) Negativkontrolle unter Verwendung von 50 µM TAE-AAAA.

Rab6a und KDELRL1 zeigten, wie in vorherigen Untersuchungen, hauptsächlich in Golgi-Membranen eine deutliche Signalüberlagerung. Durch die Zugabe von TAE-KDEL-Peptid konnte eine Verschiebung sowie Zunahme der Colokalisation beobachtet werden, wobei die Strukturen leicht tubulären Charakter hatten bzw. punktueller hervortraten (Abbildung 35a). Nach einer Behandlung mit dem als Negativkontrolle fungierenden TAE-AAAA konnte dies nicht beobachtet werden (Abbildung 35b).

Mittels näherer Untersuchung der Dynamik von Rab10 und KDELRL1 sollte nachfolgend analysiert werden, inwiefern sich eine Ligandenzugabe potenziell auf den Transport vom TGN zur PM auswirkt (Abbildung 36).

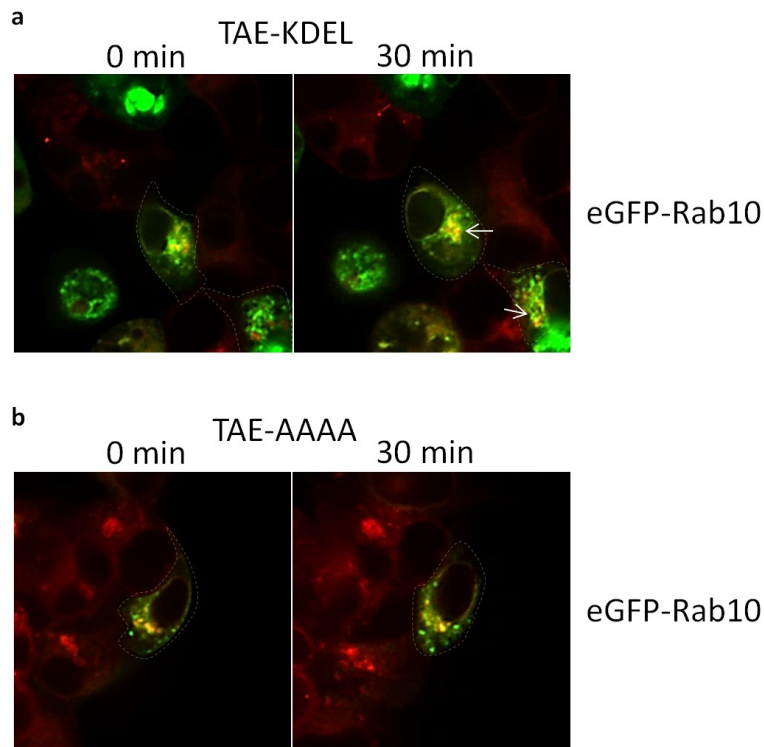


Abbildung 36: Colokalisation von Rab10 und KDELRL1-mCherry in Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen nach Peptidbehandlung.

Gezeigt sind am CLSM erstellte „Live Cell Imaging“-Aufnahmen von stabil transfizierten Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen mit einer KDELRL1-mCherry-Variante. Die Expression wurde 24 h nach transienter Transfektion von eGFP-Rab5b für weitere 24 h induziert. Gezeigt sind Aufnahmen der Fluoreszenz unmittelbar nach Applikation der Peptide sowie nach 30 min. KDELRLs (rot) und Rab-Proteine (grün) konnten direkt über das gekoppelte mCherry bzw. eGFP detektiert werden. Zellgrenzen sind weiß gestrichelt dargestellt und potenzielle Colokalisationsänderungen mit weißen Pfeilen hervorgehoben. a) Aufnahmen unter Verwendung von 50 μ M TAE-KDEL. b) Negativkontrolle unter Verwendung von 50 μ M TAE-AAAA.

Rab10 und KDELRL1 zeigten wie bereits beobachtet zu Versuchsbeginn eine starke Überlagerung der Fluoreszenzsignale in perinukleären Bereichen, welche dem Golgi zuzuordnen sind. Hierbei war eine tendenzielle Trennung des eher im TGN lokalisierten Rab10 von dem im *cis*-Golgi vorkommenden KDELRL1 sichtbar (Abbildung 36a). Nach externer Applikation des KDELRL-Peptides war diese Trennung weniger erkennbar, was auf eine vermehrte TGN-Lokalisation des KDELRL1 hindeutet. TAE-AAAA konnte diesen Effekt nicht hervorrufen (Abbildung 36b).

Die Coexpression von fluorophorgekoppelten Rab-Proteinen und KDELRL1 konnte in diesen Experimenten erfolgreich für Studien genutzt werden, welche die Dynamik der Colokalisation beider Proteine nach der externen Applikation KDELRL-spezifischer Liganden näher charakterisiert. Hierbei konnte anhand der veränderten intrazellulären Fluoreszenzsignale gezeigt werden, dass bereits innerhalb von 30 min Restrukturierungen des Golgi und

Transportvorgänge von KDELR1 im Endosom stattfinden. Dass nur einige der untersuchten Rabs eine veränderte Colokalisation mit KDELR1 aufzeigten, erscheint als deutlicher Hinweis für spezifische Transportvorgänge. Deren Initiierung beruhte auf einem externen Stimulus, während KDELR-unspezifische Liganden wie TAE-AAAA zu keiner vergleichbaren Reaktion führten.

4. Diskussion

Der eukaryote Sekretionsweg wird aus mehreren eng miteinander verknüpften Organellen gebildet. Jedem dieser Zellkompartimente können dabei charakteristische Eigenschaften zugeordnet werden, welche es erlauben, ausgehend von Nukleinsäuresequenzen hochkomplexe dreidimensionale Proteinstrukturen zu formen und einem bestimmten Ort zuzuweisen. Die reifenden Proteine werden in diesem Prozess von Organell zu Organell transportiert bis sie ihren definierten Zielort erreichen. Ein gerichteter Transport wird organisiert durch ein komplexes Zusammenspiel aus einer Vielzahl von Proteinen und besteht aus multiplen Teilschritten, welche gewährleisten, dass Proteine in bestimmte Organellen hinein oder auch aus der Zelle hinaus transportiert werden.

Im ER existiert eine Klasse von löslichen Proteinen mit der C-terminalen Retentionssequenz KDEL, welche als Erkennungsmerkmal für eine rezeptorbasierte Rückführung dieser Proteine dient (Pelham, 1988; Dean & Pelham, 1990). KDEL-Rezeptoren können diese Proteine erkennen und deren Rückführung in das ER initiieren (Semenza *et al.*, 1990; Lewis & Pelham, 1990; Lewis & Pelham, 1992a). Lange Zeit wurden KDELRs in ihrer Funktion auf diesen Retentionsmechanismus beschränkt, jedoch zeigen neuere Studien auch die Beteiligung an regulativen Vorgängen und zudem zusätzliche Funktionen der Rezeptoren an der Zelloberfläche. KDEL-Rezeptoren sind dort in der Lage, extrazelluläre Proteine zu binden und zu internalisieren, woraufhin sie den sekretorischen „Pathway“ retrograd durchwandern und bis ins ER transportiert werden, in dessen Lumen die Liganden dann entlassen werden. Dieses Prinzip konnte schon früh in *S. cerevisiae* gezeigt werden, wo u.a. das durch Killerhefen sezernierte Toxin K28 mithilfe seiner C-terminalen HDEL-Sequenz an den hefeeigenen Rezeptor Erd2p auf Ebene der PM bindet und so den retrograden Transportweg parasitiert (Becker *et al.*, 2016a). Während die Zelloberflächenlokalisation der Rezeptoren anfänglich kontrovers diskutiert wurde, ist auch in Säugerzellen mittlerweile die Internalisierung und Aufnahme von neuroprotektiven Proteinen wie MANF oder CDFN durch Zelloberflächen-ständige KDELRs nachgewiesen, sodass deren physiologische Rolle in peripheren Zellbereichen immer mehr an Bedeutung gewinnt (Henderson *et al.*, 2013; Maciel *et al.*, 2021).

Weiterhin konnte der Transport von KDELR-Liganden zwischen den Hauptlokalisationsorten im *cis*-Golgi und ER näher aufgeschlüsselt werden, wobei die Transportwege, Interaktionspartner und molekularen Hintergründe des Transports von und zur Zelloberfläche noch weitestgehend unbekannt sind (Wilson *et al.*, 1993; Newstead & Barr, 2020; Gomez-Navarro & Miller, 2016). Jedoch konnte unter anderem bereits gezeigt werden, dass die

Zelloberflächenlokalisation von PDIA1, PDIA3 und PDIA6 mit KDELR1 assoziiert ist (Bartels *et al.*, 2019). Neueste Studien fanden erstmals Hinweise auf die Beteiligung von Clathrin-vermittelter Endozytose bei der Internalisierung von KDELRs und auch die Interaktion mit Rab-Proteinen während des postendozytären Transports bzw. bei Recyclingvorgängen konnte aufgedeckt werden (Jia *et al.*, 2021). Interessanterweise kommt es nach Interaktion mit externen Liganden zu einer Clusterbildung der Rezeptoren, bevor diese internalisiert werden (Becker *et al.*, 2016b). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Dynamiken der KDELRs während des Transports von und zur Zelloberfläche näher zu untersuchen. Hierbei lag insbesondere der Clustering-Prozess auf der Oberfläche von unterschiedlichen Zelltypen im experimentellen Fokus.

Clusterentwicklung und „Receptor Cycling“-Modell

Das in dieser Arbeit erstellte „Receptor Cycling“-Modell basiert in seinen experimentellen Grundzügen und wesentlichen mathematischen Herleitungen auf einem bereits publizierten Modell (Becker *et al.*, 2016b). In dieser Studie wird die Clusterentwicklung über verschiedene Phasen in HeLa-Zellen beschrieben und es konnten erste Hinweise auf einen gezielten KDELR-Transport an Mikrodomänen der Plasmamembran anhand der Clusterentwicklung abgeleitet werden. Nicht nur konnten diese bereits ermittelten Daten in der vorliegenden Arbeit reproduziert, sondern zusätzlich die Clusterentwicklung in verschiedenen Zelllinien unterschiedlicher Spezies nachgewiesen und untersucht werden. In Verbindung mit Monte-Carlo-Simulationen konnten zudem erstmals mögliche Endozytose- und Transportraten der KDELRs zur Zelloberfläche mit der Clusterentwicklung in Zusammenhang gebracht werden. Monte-Carlo-Simulationen stellen einen Lösungsansatz für komplexe Systeme dar und ermöglichen es, ausgehend von einem kleinen Datensatz, durch wiederholte Simulationen zufälliger Abläufe eine realistische Annäherung des Ergebnisszenarios abzubilden. Insbesondere bei der Dynamik von Recyclingvorgängen und Clusterbildung an zellulären Membranen wird dieses Verfahren verwendet, um so dynamische stochastische Prozesse zu simulieren (Berger *et al.*, 2016; Truong Quang *et al.*, 2013).

Durch die Analyse der experimentell ermittelten Daten konnte die Clusterentwicklung in verschiedene Phasen eingeteilt werden, welche in einem breiten Spektrum von Zelltypen dokumentiert wurden: Die Clusterentwicklung beginnt mit einer transienten Phase ohne sichtbare Signalveränderungen über den eGFP-Hintergrund hinaus. Es folgt eine Wachstumsphase des Signals bis hin zum „steady state“, welcher durch ein dynamisches Equilibrium der Fluoreszenzstärke um einen Mittelpunkt charakterisiert ist. Die molekularen Vorgänge während der Latenzphase können in der vorliegenden Arbeit nicht näher

erschlossen werden. Erst ab einer definierten Signalintensität, die direkt aus der Anzahl der Rezeptor/Liganden-Komplexe resultiert, kann das lokal erhöhte eGFP-Fluoreszenzsignal über den Hintergrund hinweg detektiert werden. Alle Vorgänge bis zu diesem Zeitpunkt sind also in diesem experimentellen Setup nicht nachvollziehbar. Hierbei wird jedoch von einer Initiationsphase der Clusterbildung ausgegangen, während der sich einzelne Rezeptoren nach Ligandenbindung zu Clustern zusammenlagern und so in ihrer Größe und Fluoreszenzintensität zunehmen. Über die Ligandeninteraktion, Rezeptorlokalisierung oder Dynamiken der Rezeptor/Liganden-Komplexe auf der Zelloberfläche kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Eine anfänglich niedrige Rezeptoranzahl bindet Liganden und die Zahl der Rezeptoren steigt mutmaßlich über die Zeit an. Dies ermöglicht ein Wachstum der Cluster, bis diese als detektierbare Signale sichtbar werden. Es stellt sich nun die Frage, ob eine Interaktion der Rezeptoren mit einer Signaltransduktion und Änderung der Transportrate, also einer Autoamplifikation, einhergeht. Die Ligandenbindung an der Zelloberfläche führt vermutlich zur Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch der Gαq-SFK-Signalweg aktiviert werden und einen verstärkten anterograden Transport auslösen könnte (Pulvirenti *et al.*, 2008; Giannotta *et al.*, 2012). Die Initiierung dieses Transportprozesses ist zwar unmittelbar, jedoch führt die Signalübertragung und Anpassung der Membranströme zu einer Verzögerung des Rezeptortransports zur PM. Dies könnte folglich eine Erklärung für die anfängliche Latenzzeit der Signalentwicklung darstellen. In der Wachstumsphase der Clusterentwicklung ist eine Steigerung der Signalintensität erkennbar, welche in Abhängigkeit des Zelltyps entweder eine leicht exponentielle oder aber auch lineare Charakteristik zeigt. Im Falle einer Autoamplifikation des Transports wäre eher mit einer exponentiellen Charakteristik des ansteigenden Signals zu rechnen, da mit der zunehmenden Rezeptorzahl in Verbindung mit einem Ligandenüberschuss auch eine dauerhafte Zunahme der entsprechenden Signalwege einhergehen sollte. Dieser Verlauf konnte so auch bei HeLa oder den murinen Zelllinien nachgewiesen werden. Dieser beobachtete Anstieg verläuft jedoch nur annähernd exponentiell oder ist im Falle von HEK293 teilweise sogar linear. Es kann daher vermutet werden, dass entweder eine parallele Feinregulierung des retrograden Transports stattfindet oder dass der Transport zur PM nicht linear zur Rezeptorzahl mit einhergehender Ligandenbindung autoamplifiziert wird. Denkbar wäre hier eine Balancierung des Membranstroms durch simultan vermehrte Gas-PKA-Signalaktivierung (Cancino *et al.*, 2014). Auch wäre eine ACBD3-basierte Inhibition einer übermäßigen KDELR-PKA-Aktivierung möglich, wobei viele molekulare Details hierbei noch ungeklärt wären (Yue *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2023). Alternativ könnte der Transport von KDELRs nicht aktiv

amplifiziert werden, sondern einen konstanten Transportprozess darstellen, wenngleich auch auf einem niedrigschwelligem Niveau. Der Transport von KDELRs zur Zelloberfläche würde so den Geschwindigkeitsfaktor der möglichen Clusterentwicklung definieren, sodass ein linearer Anstieg bis hin zur maximalen Signalintensität erklärbar wäre, wie er etwa bei HEK293-Zellen beobachtet wird. Dieser lineare Intensitätsverlauf wäre dann auch in der Latenzphase existent, aber aufgrund des hohen eGFP-Hintergrundes hier nicht detektierbar. Prinzipiell spielen hierbei auch viele weitere Faktoren eine Rolle, welche etwa eine laterale Diffusion der Rezeptoren auf der Zelloberfläche beinhalten, aber im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten. Der Signalanstieg aller clusternden Zellen beginnt erst in der „steady state“-Phase deutlich in seiner Intensität zu schwanken. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Mehrheit der Cluster erst eine gewisse Mindestgröße erreichen muss, bevor diese internalisiert werden. Durch die mathematische Herleitung der Beziehung zwischen Rezeptorendozytose und -exozytose wären auch geringe relative Transportraten zur Zelloberfläche möglich, um ein nachhaltiges Equilibrium dieser Phase zu ermöglichen, sofern diese innerhalb der im Modell aufgeführten Bereiche liegen.

Da KDELRs in der Zellperipherie im Vergleich zur Golgi-Lokalisation eher unterrepräsentiert sind, stellt sich die Frage, inwiefern und unter welchen Bedingungen die Rezeptor-Paraloge zur Zelloberfläche transportiert werden. Ob alle drei KDELRs generell auf der Zelloberfläche lokalisieren, ob dies einen gezielten Prozess darstellt und welche Funktionen die Rezeptoren an der Zelloberfläche ausüben, all dies ist bislang nur unzureichend untersucht. Während unter Normalbedingungen im *cis*-Golgi etwa fünfmal so viele KDELRs nachweisbar sind wie im ER, nimmt die Konzentration der Rezeptoren zum *trans*-Golgi und darüber hinaus in anterograder Richtung drastisch ab (Orci *et al.*, 1997). Bislang existieren keine Hinweise darauf, dass sich die intrazelluläre Lokalisation der KDELR-Subtypen unterscheidet, sodass alle drei Paraloge hauptsächlich im Bereich von Golgi und ER agieren. Die Rückführung ER-residenter Proteine impliziert jedoch eine gewisse ligandenabhängige Autoregulierung der KDELR-Lokalisation, weshalb unklar ist, wieso KDELRs auch außerhalb des ER-Golgi-Bereichs nachgewiesen werden können und inwiefern sie dort Funktionen ausführen. Ebenso ist bisher unbekannt, inwiefern der Transport in die Zellperipherie einem regulierten Mechanismus unterliegt. Das Ausmaß eines gerichteten KDELR-Transports zu bestimmten „hot spots“ der PM wirkt sich jedoch nachweislich auf die Entwicklungsgeschwindigkeit, die Zahl sowie finale Größe der Cluster aus. In dieser Arbeit konnten hierbei distinkte Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien festgestellt werden, wobei die Bandbreite von vermehrt zufälligem (HEK293) bis hin zu stark gezieltem Transport (HeLa, SH-SY5Y)

reicht. Es könnte spekuliert werden, dass die KDELR-Verteilung zur Zellperipherie hin eher aufgrund zufälliger Transportereignisse stattfindet bzw. KDELRs aufgrund ihrer temporären Assoziation mit anderen Proteinen bspw. zur Zelloberfläche transportiert werden (Bartels *et al.*, 2019). Zwar sind mit *Gas* und *Gao* zwei KDELR-assoziierte G-Proteine in Verbindung mit anterograden Transportwegen bekannt, jedoch ist unsicher, inwiefern dies die Rezeptoren selbst gezielt zur Zelloberfläche transportiert (Giannotta *et al.*, 2012; Solis *et al.*, 2017). In dieser Arbeit wurden KDELR-assoziierte Cluster an verschiedensten Säugerzelllinien unterschiedlicher Spezies dokumentiert, sodass ein gezielter KDELR-Transport an „hot spots“ der PM plausibel erscheint. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Zelllinien lassen es sogar zu, eine Spezialisierung der oberflächenlokalisierten KDELRs abzuleiten, wobei das Ziel ein effizienteres Clustering und eine damit einhergehende Aufnahme von Liganden darstellt. Dies könnte für verschiedene Gewebe eine evolutionäre Anpassung an die jeweiligen extrazellulären Bedingungen bzw. Liganden implizieren und die hier dokumentierten Unterschiede zwischen Zervixepithel (HeLa) und bspw. Nierengewebe (HEK293) begründen. Diese aufgeführten Argumente beinhalten jedoch bislang keinerlei Bezug zur Spezifität des Transports einzelner Rezeptorsubtypen in die Zellperipherie. Es wäre möglich, dass unterschiedliche intrazelluläre KDELR-Level sich in ihrem Verhältnis auch auf die Zelloberflächenfraktion der Rezeptoren auswirken können. Diese zelltypspezifischen Unterschiede konnten in dieser Arbeit auch bezüglich der relativen und absoluten Menge an KDELRs durch qPCR-basierte Expressionsanalysen bestätigt werden. Interessanterweise ist der in der Literatur am häufigsten beschriebene KDELR1 nicht generell am stärksten exprimiert. Es kann neben der allgemein sehr niedrigen Expression von KDELR3, keine eindeutige Präferenz für KDELR1 oder KDELR2 in verschiedenen Zelllinien beobachtet werden. Es existieren mit SH-SY5Y und IC-21 Zelltypen, die ein ausgeglichenes KDELR1/2 Verhältnis aufweisen, wohingegen die Expression von KDELR1 in HEK293- oder THP1-Zellen überwiegt. In vielen anderen Zelllinien wie HeLa oder L929 dominiert hingegen KDELR2 deutlich (vergleiche Abbildung 10; Trychta *et al.*, 2018; Raykhel *et al.*, 2007). KDELRs zeigen also eine äußerst gewebe- bzw. zelltypspezifisch differenzierte Expression der drei Subtypen, wobei noch unklar ist, weshalb sich die Genexpression so deutlich unterscheidet.

Ob die Lokalisation der unterschiedlichen Subtypen beim Clustering eine Rolle spielen könnte, wurde in dieser Arbeit zwar nicht direkt betrachtet, dennoch konnte keine Korrelation zwischen der Clusterentwicklung und der Expressionsstärke der Rezeptoren in wildtypischen und Knockout-Zelllinien festgestellt werden. Die intrazelluläre Verteilung und der Transport

zur PM scheinen also weniger auf bestimmten Rezeptorsubtypen zu basieren, sondern stellen möglicherweise eine zelltypspezifische Charakteristik dar. Diese Ergebnisse implizieren daher eher, dass sich unterschiedliche Spezifitäten der Subtypen in den jeweiligen Zelltypen bzw. Geweben manifestiert haben könnten, welche jedoch unabhängig von ihrer Typenzusammensetzung an der PM über ein ähnliches Clusterverhalten verfügen, also funktionell im Sinne der Ligandenbindung und Internalisierungscharakteristik komplementär zueinander sind. Dass dies möglich wäre, liegt an der starken strukturellen Ähnlichkeit der KDELRs zueinander, wobei die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen humaner Rezeptoren etwa 73-84 % beträgt (Lewis & Pelham 1992b; Hsu *et al.*, 1992; Capitani & Sallese, 2009). Auch über Speziesgrenzen hinweg zeigt sich die deutliche funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit der Rezeptoren (Semenza *et al.*, 1990; Trychta *et al.*, 2018). Hierbei sind die Rezeptoren derart fähig, sich in ihrer Funktion zu komplementieren, dass sogar Säuger-KDELRs in Hefe funktionell sind und das hefeeigene Erd2p vollständig ersetzen können (Becker *et al.*, 2016a). Es zeigten sich gewisse Tendenzen der Rezeptoren bezüglich ihrer Präferenz zu den C-terminalen Bindemotiven ihrer Interaktionspartner, jedoch sollte dies unter wildtypischen Bedingungen eher eine untergeordnete Rolle spielen. Generell führen [KH]-X-EL-Aminosäuremotive zu einer stärkeren ER-Lokalisation als andere Varianten (Raykhel *et al.*, 2007; Trychta *et al.*, 2018). Im Detail scheinen sich für jeden Rezeptorsubtypen Tendenzen zu favorisierten Retentionsmotiven gebildet zu haben, wobei vereinfacht gesagt KDELR1 und KDELR3 über eine breitere Flexibilität zu XXEL-ähnlichen Motiven verfügen, während KDELR2 etwas spezialisierter HXEL-Motiv-tragende Proteine im ER zurückhält (Raykhel *et al.*, 2007). Diese Studien wurden mit einer artifiziellen Überexpression an Reporterproteinen durchgeführt, sodass dies zwar prinzipiell Informationen über Bindeaffinitäten der Rezeptoren vermittelt, allerdings unter wildtypischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle spielen könnte. So existiert in Säugern eine vergleichbare Anzahl an Proteinen mit K-, H- oder RDEL-Motiv, jedoch unterscheidet sich deren Expressionsstärke absolut. KDEL-Proteine sind in ihrer Zahl etwa fünfmal häufiger vorhanden als Proteine mit H- oder RDEL-Motiv, sodass generell KDEL-Proteine öfter mit den Rezeptoren interagieren sollten als andere (Gerondopoulos *et al.*, 2021). Aus sterischen Gründen sollte zudem eine direkte Konkurrenz zweier Motive in der Bindetasche der KDELRs unwahrscheinlich sein. Folglich sollte eher die Zahl der jeweiligen Rezeptortypen und Liganden über die Interaktion mit den Rezeptoren entscheiden, nicht die Kombination aus Affinität und Motiv. KDELRs sollten auch an der Zelloberfläche in der Lage sein, eine vergleichbar komplementäre Funktion aufzuzeigen, sodass prinzipiell jeder Rezeptortyp an

der Zelloberfläche Liganden binden und eine Clusterbildung initiieren könnte, speziell in dem hier verwendeten Setup mit einem Überschuss an Liganden im extrazellulären Medium. Die gegenseitige Komplementierung der Funktionen bietet auch einen Erklärungsansatz, weshalb in den HAP1-Zelllinien sowohl in KDELR1- als auch in KDELR2-KO-Zellen jeweils Clustering dokumentiert werden konnte. Während hier eine detaillierte mathematische Analyse der Clusterentwicklung, bedingt durch die bereits abgeschlossene Kooperation mit der AG Santen im Rahmen des SFB1027, nicht durchgeführt werden konnte, lässt sich dennoch folgende Aussage treffen: Es können zwar durch einen KO von KDELR1 oder KDELR2 distinkte Unterschiede vermutet werden, jedoch zeigten HAP1-Zellen in beiden Fällen eine deutliche Clusterbildung. Folglich erscheint es möglich, dass verschiedene Rezeptorsubtypen an der Oberfläche lokalisieren und sich in ihrer Funktion dort gegenseitig komplementieren könnten. Somit basiert das KDELR-Clustering offenbar nicht auf einer bestimmten Rezeptorvariante, sondern ist in wildtypischen Zellen entweder aus einer Mischpopulation von Rezeptoren möglich oder dynamisch von der Expression der jeweiligen Rezeptoren abhängig.

Über KDELR3 kann im Rahmen dieser Studien keine Aussage getroffen werden, da die entsprechenden KO-Zellen nicht zur Verfügung standen. Es kann daher nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass das letzte verbleibende Rezeptor-Paralog möglicherweise eine Rolle im Clusterphänomen spielen könnte, wobei dies aufgrund der niedrigen Expression eher ein unrealistisches Szenario darstellt. Nichtsdestotrotz wäre es im Bereich des Möglichen, dass KDELR3 an der Zelloberfläche lokalisiert und von dort aus nach Ligandenbindung weitere Rezeptoren zur PM rekrutieren könnte. Die Oberflächenlokalisierung von KDELR3 scheint jedoch ebenfalls zelltypabhängig zu sein, sodass es schwierig ist hiervon allgemeine Mechanismen abzuleiten. In der vorliegenden Arbeit konnte KDELR1 in HEK293-basierten Zellen vermehrt an der PM detektiert werden, während bspw. in MCF7-Zellen KDELR3 dominierte (vergleiche Abbildung 23; Jia *et al.*, 2021). Es zeigte sich in den hier durchgeführten Expressionsstudien, dass die nicht clusternden Makrophagenzelllinien generell über eine niedrigere KDELR3-Expression verfügen, sodass eine Beteiligung dieses Rezeptors an Clusteringprozessen nicht ausgeschlossen werden kann.

Nach Abschluss der initialen Clusterexperimente und ersten Analysen zeigte sich, dass Makrophagen entweder über einen gänzlich differenten, also nicht detektierbaren, KDELR-Clusteringmechanismus auf der Zelloberfläche verfügen oder dass dies dort überhaupt nicht stattfindet. Zunächst wurde untersucht, ob eine entsprechende abweichende Gesamtzahl der Rezeptoren als mögliche Erklärung in Betracht gezogen werden könnte. Die Anzahl der

KDEL-Rezeptoren oder eines einzelnen Subtyps war jedoch in allen Makrophagenzelllinien nicht in einem solchen Ausmaß verringert, dass dies eine Erklärung für ein ausbleibendes Clustering darstellen würde. Folglich bestünde die Möglichkeit, dass ein Clustering in Makrophagen stattfindet, es jedoch im Rahmen des eingesetzten experimentellen Setups nicht detektiert werden kann. Hierzu wurden modellbasierte Berechnungen durchgeführt, welche die Möglichkeiten eines nicht detektierbaren Clusterings berücksichtigen. Durch die Verwendung eines fluoreszierenden Liganden herrscht ein starkes Signalgrundrauschen im umgebenden Medium vor. Erst wenn durch die rezeptorabhängige lokale Konzentration eGFP-gekoppelter Liganden in eine engere räumliche Nähe gebracht werden, kann dies mittels CLSM als stärkeres Signal identifiziert und entsprechend abgebildet werden. In welchem Ausmaß dies stattfinden muss, ist jedoch bislang nicht näher definiert. In Kooperation mit der AG Santen war es jedoch möglich, einen relativen Signalschwellenwert hierfür zu ermitteln. Unterhalb dieses Schwellenwertes könnten sich Vorgänge abspielen, die nicht visuell darstellbar sind. Zur Vermeidung dieser technischen Limitierung wäre es sinnvoll, statt eines fluoreszierenden Liganden, KDELRs direkt zu markieren und zu detektieren. Um einen „Live Cell Imaging“-Ansatz durchführen zu können wäre jedoch eine Kopplung an ein fluoreszierendes Protein notwendig, da antikörperbasierte Methoden in der Regel eine Fixierung der Zellen voraussetzen. Zwar existieren Möglichkeiten eines antikörperbasierten Imaging mit lebenden Zellen, allerdings resultiert dieses Verfahren in der Regel in unzureichenden Signalqualitäten (Manos *et al.*, 2011). Eine Proteinfusion hingegen bietet bessere Fluoreszenzsignale, geht dafür aber immer mit einer Reihe an nicht abschätzbaren Nachteilen einher, bedingt durch die Größe des Fluoreszenzproteins und der damit verbundenen sterischen Hinderungen. Dies betrifft die Funktionalität, Lokalisation und Konformation der zu untersuchenden Proteine und macht die Analysen deshalb unter Umständen nur bedingt aussagekräftig. In vorangegangenen Arbeiten wurde eine mCherry-gekoppelte KDELR1-Variante in analogen Experimenten verwendet, jedoch ohne ein eindeutiges Clustering des Rezeptors zu beobachten (Rammo, 2017), sodass sich zumindest eine C-terminale Markierung negativ auf die Clusterentwicklung, möglicherweise sogar auf den Rezeptortransport zur Zelloberfläche, auszuwirken scheint. Um die Bedingungen für ein detektierbares Rezeptorclustering zu optimieren, wurde daher ein neuer Versuchsansatz gewählt, welcher die im Modell diskutierten Endozytoseraten bei Makrophagen adressiert. Hierbei wurde sich die Beobachtung von van't Hoff zu Nutze gemacht, welche den temperaturbedingten Zusammenhang im Hinblick auf Reaktionsgeschwindigkeiten herleitet. So führte eine auf 20 °C erniedrigte Temperatur zu einer schwachen, aber detektierbaren

Clusterbildung bei RAWBlue-Makrophagen, welche bei 37 °C nicht detektiert werden konnte. Generell sollten bei einer Verringerung der Temperatur alle aktiven zellulären Prozesse in einem ähnlichen Maße langsamer ablaufen und so die Endozytoserate, aber auch der Transport von Rezeptoren zur Zelloberfläche, im gleichen Maße verlangsamt werden. Dennoch schien sich hier das Verhältnis zugunsten eines schwachen, aber detektierbaren Clusterings zu verschieben. Dies könnte darauf hindeuten, dass die endozytären Prozesse für das KDELR-Clustering mehr Zeit oder mehr Schritte benötigen als ein Transport der Rezeptoren zur Zelloberfläche. Dies spräche erneut dafür, dass der KDELR-Transport zur Zelloberfläche weniger komplex orchestriert wird, sondern sich zumindest teilweise „passiv“ aus den zellulären Voraussetzungen (Ligandenanzahl, Transportvorgänge o.ä.) ergibt, während die Internalisierung demgegenüber aus einer komplexeren Abfolge von Ligandenbindung, Konformationsänderung, lateraler Diffusion, Oligomerisierung bis hin zur Clusterbildung, Signaltransduktion und Rekrutierung der Endozytosemaschinerie besteht. So könnten zumindest im beobachteten Zeitrahmen die Verhältnisse von Endo- und Exozytose gerade so verschoben werden, dass die stärksten Signale in den detektierbaren Bereich fallen (vergleiche Abbildung 9d und e). Findet die Clusterentwicklung in Makrophagen analog zu anderen Zelllinien statt, würden diese Fluoreszenzsignale den stärksten Signalen in der „steady state“ Phase entsprechen, aber aufgrund der generell niedrigeren Signalintensität sind diese hier nur als vereinzelte „Signalspitzen“ detektierbar. Auch die beobachtete Latenzphase vor Detektion der ersten Signale spricht für eine sich langsam aufbauende Rezeptorpopulation an der Zelloberfläche und steht damit in der Theorie der Clusterentwicklung anderer Zelltypen ähnlich gegenüber.

Nachdem die pH-Abhängigkeit der KDELR/Liganden-Interaktion schon länger bekannt ist, konnten neuere Studien durch Analysen hochauflösender Röntgenkristallstrukturen von KDELR2 in *G. gallus* die molekularen Grundlagen näher aufklären (Bräuer *et al.*, 2019; Wu & Rapoport, 2021). Es stellte sich im Laufe der vorliegenden Arbeit folglich die Frage, inwiefern die Rezeptor/Liganden-Interaktion an der Zelloberfläche ebenfalls pH-abhängig verläuft. Vor allem die damit einhergehende Konformationsänderung und Initiierung der Internalisierung der Rezeptoren stellt einen interessanten Aspekt dar. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Clusterbildung vom pH-Wert, welche bisherige Untersuchungen zur Ligandenbindung im ER/Golgi-Bereich bestätigt (Wilson *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2020; Gerondopoulos *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2024). Es konnte bei Verringerung des pH-Wertes eine schnellere Entwicklung der Cluster gezeigt werden, sodass ebenfalls auf Ebene der PM von einer effizienteren Bindung der Liganden

unter diesen Bedingungen ausgegangen werden kann. Auch die steigende Zahl der unterschiedlich großen Cluster lässt auf eine zeitlich früher stattfindende Clusterbildung schließen, sodass insgesamt auch an der PM der pH maßgeblich für die KDELR/Liganden-Interaktion zu sein scheint. Bei höheren pH-Werten ist die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor in ihrer Affinität nicht ausreichend stark, sodass das Retentionsmotiv nicht ausreichend tief in die Bindetasche geleitet wird. Da bei zu hohen pH-Werten His¹² nicht protoniert vorliegt, wird das Motiv durch die fehlenden Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen nicht fest im Rezeptor verankert, wodurch damit einhergehend keine andauernde Restrukturierung des Rezeptors erfolgt (Wu *et al.*, 2020; Gerondopoulos *et al.*, 2021). Unter suboptimalen pH-Werten könnte somit die Bindung nicht stabil genug sein, sodass es zu einer Dissoziation und einem Wechsel des Rezeptors in den Apo-Zustand kommt (Wu *et al.*, 2024). Geht man davon aus, dass eine dauerhafte Konformationsänderung für Clustering notwendig ist, würde dies die unterschiedliche Anzahl und Intensität der Cluster bei den pH-Werten 6,4-6,8 erklären. Während die stärker reduzierenden Bedingungen durch intensivere Bindung des Liganden ein dauerhaft effizientes Clustering erlauben, ist dies bei höheren pH-Werten nicht in gleichem Ausmaß sichtbar. Bei pH-Werten über 7,4 konnte keine Clusterbildung mehr beobachtet werden. Da im extrazellulären Medium Liganden im Überschuss vorhanden waren, sollte aus stochastischen Gründen beständig eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen Kontakt der Rezeptoren mit den Liganden vorliegen. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine Clusterbildung nur als Folge der stabilen Konformationsänderung initiiert werden könnte. Es ist jedoch fraglich, ob die Strukturänderung alleine ausreichend ist, um an der Zelloberfläche eine Oligomerisierung zu erlauben oder ob zytosolische Transportbestandteile, wie etwa bei der Clathrin-vermittelten Endozytose, mit den Rezeptoren interagieren und so die Clusterbildung durchführen.

Die Oligomerisierung von Zelloberflächenrezeptoren stellt ein vielfach beschriebenes Phänomen dar. Nach Ligandenbindung di- oder oligomerisieren eine Reihe von Rezeptoren, wie etwa G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), an der Zelloberfläche und lösen so letztendlich eine Signaltransduktion oder Internalisierung aus (Sánchez & Tampé, 2023). Dies umfasst bspw. Hormon- oder Wachstumsfaktor-bindende Rezeptoren, wie den „epidermal growth factor receptor“ (EGFR), aber auch Integrine, Cadherine und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Heldin, 1995; Murai, 2024). Die Gründe für diesen Prozess sind vielfältig und können bspw. zu einer breiten Diversität in der Ligandenerkennung führen oder die Interaktion mit weiteren Zelloberflächenproteinen ermöglichen (Lemmon & Schlessinger, 1994; Murai, 2024). Insbesondere für den Aspekt einer Signaltransduktion scheint das

Clustering eine wichtige Rolle einzunehmen. Es wird beschrieben, dass hierdurch bspw. die Sensitivität und Spezifität der Signalübertragung erhöht wird, aber ebenfalls eine Synchronisation und Förderung der simultanen Internalisierung einer hohen Zahl von Liganden stattfindet (Bray *et al.*, 1998, Duke & Bray, 1999; Chan *et al.*, 2001; Groff & Smith, 2008; Vanamee & Faustman, 2023). Durch die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit von KDELRs zu GPCRs könnten Ähnlichkeiten im Clusterverhalten vermutet werden. Für beide sind Di- und Oligomerisierungsprozesse beschrieben, wobei sich GPCRs in Clustern von bis zu 500 Rezeptoren zusammenlagern können und so Signaltransduktionen modulieren (Palczewski, 2010; Milligan *et al.*, 2019; Sánchez & Tampé, 2023). Eine Vielzahl von Zelloberflächenproteinen kann gezielt in konzentrierten Bereichen der Plasmamembran nachgewiesen werden, wobei sich insbesondere GPCRs in „clathrin-coated pits“ sammeln und dort „hot spots“ mit einer Clustergröße von bis zu mehreren 100 nm ausbilden können. (Lillemeier *et al.*, 2006; Sungkaworn *et al.*, 2017).

Durch die Betrachtung des Clusterings stellt sich unweigerlich die Frage, warum dieses an der Zelloberfläche beobachtet werden kann, im Golgi aber bislang nicht beschrieben wurde. Im Golgi wird der COPII-vermittelte Transport nach Ligandenbindung an den Rezeptor initiiert. Durch die damit einhergehende Konformationsänderung wird letztendlich TM7 im Zytosol so bewegt, dass ein im Apo-Zustand verborgenes di-Lysin-Motiv exponiert wird, welches den retrograden Transport über die COPII-Maschinerie ermöglicht (Bräuer *et al.*, 2019). Während im Golgi so bereits einzelne Rezeptor/Liganden-Komplexe erkannt und transportiert werden können, scheint an der Zelloberfläche eine bislang unbekannt Zahl an aktiven Rezeptoren benötigt zu werden. Zwar wird beschrieben, dass die Rezeptoren nach Aktivierung und PKA-abhängiger Phosphorylierung im Golgi Dimere oder Oligomere ausbilden können, jedoch findet keine umfangreiche Clusterbildung statt (Aoe *et al.*, 1997; Cabrera *et al.*, 2003). Dies impliziert, dass die Funktionen der KDELRs im Golgi und an der Zelloberfläche grundlegend verschieden sein könnten: Durch die zwingend notwendige Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase ist es auch nachvollziehbar, dass aus dem ER entkommene Chaperone effizient zurückgeführt werden müssen. Dieser Mechanismus muss unabhängig von den physiologischen Zuständen der Zelle dauerhaft aktiv sein und gewährleisten, dass KDELRs nach Ligandenbindung schnell und gezielt in das ER zurücktransportiert und im Anschluss unmittelbar zum Golgi retourniert werden. Im ER sind unter Normalbedingungen die Hauptinteraktionspartner von KDELRs PDI, Calreticulin und BiP in etwa 5-10 μM Konzentration nachweisbar (Gerondopoulos *et al.*, 2021). Folglich ist es fraglich, ob die Endozytose einzelner fälschlicherweise sezernierter Chaperone von der Zelloberfläche bis hin

zum ER einen physiologisch sinnvollen Aufwand bedeutet. Ein präendozytäres Clustering würde hingegen die Zahl der Liganden erhöhen und somit die Effizienz eines einzelnen Transportvorgangs deutlich verbessern.

Da KDELR-Liganden prinzipiell nur unter nicht nativen Umständen vermehrt sezerniert werden, könnte das KDELR-Clustering auch eine Sensortätigkeit darstellen. Eine Reihe von ER-Stress-Situationen stellen bspw. Bedingungen dar, welche mit der Sezernierung von löslichen ER-Proteinen oder neuroprotektiven Proteinen wie MANF/CDNF einhergehen (Yamamoto *et al.*, 2003; Henderson *et al.*, 2013; Dossat *et al.*, 2024; Löhelaid *et al.*, 2024). Ebenso könnte auch eine Beeinträchtigung der zellulären Integrität, etwa bei Gewebsverletzungen, zur Freisetzung von ER-ständigen Proteinen führen, welche durch die kleine Fraktion von KDELRs an der Zelloberfläche detektiert werden. Zellen könnte es so ermöglicht werden, Signalketten zu initiieren, die sie auf Stresssituationen vorbereiten. Insbesondere für stationäre gewebebildende Zelltypen könnte dies einen wichtigen Mechanismus darstellen. Ein solches System existiert bereits durch MAPK-Signalkaskaden, welche Proliferation, „survival“ und Differenzierungen von Zellen regulieren. Hierbei werden extrazelluläre Signale von einem System aus Oberflächenrezeptoren über mehrere Kinasen in das Zellinnere transduziert und passen Zellen auf diese Weise an ihre extrazelluläre Umgebung an. Da für KDELRs bereits die Fähigkeit zur Modulierung von MAP-Kinase-Signalwegen (JNK1, p38) beschrieben wurde, wäre eine Verstärkung oder Modifikation entsprechender Signaltransduktionen von der Zelloberfläche nicht auszuschließen (Yamamoto *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2022).

Im Falle einer Sensorfunktion wäre es für Zellen allerdings wenig sinnvoll, aufgrund jedes einzelnen potenziellen KDELR-Liganden umfassende Vorbereitungen auf Stresssituationen einzuleiten. Ein präendozytäres Clustering von KDELRs würde so die Reizschwelle für eine tatsächliche Signalübertragung erhöhen und nur bei einer ausreichenden Anzahl von extrazellulären Liganden eine entsprechende Information in das Zellinnere transduzieren (Cebeacauer *et al.*, 2010; Bray *et al.*, 1998; Caré & Soula, 2011). Die geringe Anzahl an PM-lokalisierten KDELRs könnte folglich als eine Art Sensor auf der Zelloberfläche fungieren, welcher im akuten Bedarfsfall unterstützende KDELRs an die PM rekrutiert. Dies wäre auch eine Erklärung, warum sich KDELR-Clustering in verschiedenen Makrophagenzelllinien evolutionär nicht als ein allgemein vorhandener Mechanismus etabliert haben könnte: Makrophagen haben als professionelle phagozytierende Zellen eine Vielzahl an Rezeptoren an ihrer Oberfläche (TLRs, Scavenger, Dectin, u.a.), um ihre Umgebung permanent zu analysieren und eventuelle Pathogene frühzeitig zu erkennen und zu eliminieren. Zudem ist

dieser Zelltyp vermehrt in Umgebungen lokalisiert, die ein erhöhtes Stresspotential aufweisen. Ein auf KDELR-Clustering basierendes Sensorsystem wäre daher für diesen Zelltyp nicht hilfreich, sondern mitunter sogar eher hinderlich für dessen eigentliche Funktion (Murray & Wynn, 2011; Goodridge *et al.*, 2011).

KDELR-Dynamiken unter Stressbedingungen

In dieser Arbeit wurde ein System etabliert, welches eine Darstellung der oberflächenlokalisierten KDELRs mittels IF erlaubt. Hierzu wurden N-terminal markierte Varianten stabil in das Genom von Flp-InTM T-RExTM 293-Zellen integriert und deren Expression, Funktion und Lokalisation sowohl intrazellulär als auch an der Zelloberfläche erfolgreich bestätigt. Mit diesen Varianten sollten nähere Einblicke in die Dynamiken der KDELRs gewonnen werden, welche mit dem bisherigen Versuchsaufbau in den Clusterexperimenten nicht untersucht werden konnten. Bisher ist die Frage ungeklärt, inwiefern eine Internalisierung von Liganden mit einer Anpassung der KDELR-Transportrate zur Zelloberfläche einhergeht. Zwar ist eine Beteiligung von KDELRs als stressinduzierte Komponente der UPR und einer Relokalisation von KDELR1 in das Lysosom oder andere Organellen beschrieben, jedoch ist unbekannt, ob Stresssituationen auch zu einem KDELR-Transport zur Zelloberfläche führen (Trychta *et al.*, 2018; Yamamoto *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2022). In einem ersten Ansatz wurde deshalb ER-Stress durch Zugabe des SERCA-Inhibitors Thapsigargin induziert und die Zelloberflächenlokalisation der drei KDELRs mit derjenigen in ungestressten Zellen verglichen. Es konnte dabei eine Zunahme der Konzentration aller Rezeptor-Varianten an der PM beobachtet werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Umverteilung der intrazellulären KDELRs unabhängig vom Subtyp stattfinden könnte. Die Verteilung der hauptsächlich Golgi-lokalisierten KDELRs hin zur Zellperipherie könnte einen nicht fest regulierten Prozess darstellen, welcher quasi als Nebeneffekt aufgrund vermehrter intrazellulärer Transportereignisse stattfindet. Durch Thapsigargin wurde in diesem Versuch ein Ca²⁺-induzierter Ausstrom von löslichen ER-Proteinen bis hin zu deren Sekretion verursacht (Trychta *et al.*, 2018; Dossat *et al.*, 2024). Spekulativ könnte dies zu einer akuten Übersättigung des frühen sekretorischen „Pathways“ und der KDELRs durch den massenhaften Transport von Proteinen führen, wobei die damit einhergehenden Membranströme zu einer simultanen passiven Verteilung der Rezeptoren in periphere Zellbereiche und zu PM führen könnten. Zumindest wurde bereits beschrieben, dass sich unter Stressbedingungen die Verteilung der Rezeptoren stark zum TGN hin verschiebt (Griffiths *et al.*, 1994). Auch wäre eine Interaktion der Rezeptoren mit ihren Liganden denkbar, wobei während dieser akuten Überbelastung kein Rücktransport initiiert werden

kann, sondern ein indirekter Transport der Rezeptoren zur PM durchgeführt wird. Dieses Szenario würde also insgesamt eine „Autoverteilung“ der Rezeptoren suggerieren, wobei die Rezeptoren teilweise direkt oder indirekt ihren Liganden in die Zellperipherie folgen. Da dies im Experiment alle KDELR-Subtypen in ähnlichem Maße betrifft, können auch Parallelen zu den Clustering-Experimenten mit KDELR-KO-Zellen gezogen werden. KDELRs sind in ihrer Funktion folglich stark komplementär und auch ihre intrazelluläre Verteilung wäre demnach primär Liganden-abhängig. Der Überschuss an KDELR-Liganden scheint in Verbindung mit dem Retentionskreislauf der Rezeptoren großen Einfluss auf deren intrazelluläre Verteilung zu haben, sodass die Rezeptoren nur selten in die Zellperipherie gelangen. Diese peripheren Rezeptoren könnten also einen sekundären Startpunkt der Retention darstellen. Insbesondere die außergewöhnlich hohe Bindefähigkeit der KDELRs bei niedrigen pH-Werten würde diese vereinzelt Interaktionen sogar optimieren, da auch eine äußerst effiziente Bindung bis hin zum „late“-Endosom bei pH 5 möglich wäre (Bräuer *et al.*, 2019; Casey *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2024). Demgegenüber stehen einige Publikationen, die einen näheren Einblick in die Kontrolle der intrazellulären Lokalisation der Rezeptoren geben. Neben der Liganden-abhängigen Verteilung im ER/Golgi-Bereich ist zumindest die Lokalisation von KDELR1 im *cis*-Golgi auch durch seine temporäre Assoziation mit ACBD3 („Acyl-CoA-binding domain-containing protein 3“) bedingt. Dieses reguliert inhibitorisch die Aktivität des cAMP/PKA-Signalwegs und verhindert so, dass ungebundene Rezeptoren in das ER transportiert werden (Yue *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2023; Jia *et al.*, 2023). Eine Depletion dieses Proteins führt sogar zu einem vollständigen Zusammenbruch des Golgi-Pools an KDELR1 (Yue *et al.*, 2021). Des Weiteren wurde berichtet, dass durch eine verringerte ACBD3-Aktivität zusätzlich Rab4a-assoziierte Transportvorgänge von KDELR1 an tubulären Arf1-abhängigen Golgi-Ausläufern in Richtung PM stattfinden könnten, welche unabhängig von den bisher beschriebenen PKA- oder Src-Signalwegen ablaufen (Tan *et al.*, 2023). Inwiefern dies allerdings spezifisch für KDELR1 ist oder ob dies gleichermaßen für alle Paraloge gilt, wurde in diesen Studien nicht untersucht.

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass KDELR1-KO-Zellen in ihrer Fähigkeit zur PDI-Retention beeinträchtigt sind. Zusätzlich stellt ein KO von KDELR1 einen substanziellen Eingriff in das Transkriptom von HAP1-Zellen dar, auch jenseits der offensichtlichen KDELR-assoziierten Funktionen (Blum *et al.*, 2019). KDELR2 und KDELR3 scheinen in KDELR1-KO-Zellen die Funktion des fehlenden Rezeptors nicht vollständig kompensieren zu können. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten KDELR-KO-Zelllinien während ihrer Kultivierung distinkte Unterschiede zu wildtypischen HAP1-Zellen, weshalb grundlegende

Untersuchungen durchgeführt wurden. Dies beinhaltete eine Analyse der KDELR-Expression in allen HAP1-Zelllinien sowie Proliferationsassays unter Normal- und ER-Stressbedingungen. In wildtypischen HAP1-Zellen konnte ein vergleichbares Level von KDELR1 und KDELR2 detektiert werden, während KDELR3, wie bei anderen Zelllinien, nur in sehr geringer Anzahl vorhanden ist. Auch der KO von KDELR1 und KDELR2 in den jeweiligen Zelllinien konnte bestätigt werden. Es zeigte sich in vergleichenden Analysen jedoch keine Anpassung der Expression der verbliebenen Rezeptoren, um den KO zu kompensieren. Der KO von KDELR1 führte im Gegenteil sogar zu weniger KDELR2 und KDELR3 Transkripten, während ein KDELR2-KO interessanterweise die Expression von KDELR3 verstärkte. Prinzipiell könnten Zellen einzelne KDELR-Typen nutzen, um funktionell den Verlust anderer KDELRs zu kompensieren. Da keine Anpassung der Transkription nach erfolgtem KO dahingehend nachgewiesen werden konnte, lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass trotz der hohen Sequenzähnlichkeiten definierte Unterschiede in der Funktion einzelner Paraloge existieren müssen. Aufgrund der hier bereits diskutierten Überschneidungen bezüglich der Fähigkeit, KDELR-ähnliche Liganden zu binden, sollten die funktionellen Differenzen der KDELRs eher im Bereich der Signaltransduktion liegen. Für eine erfolgreiche ER-Retention sollte es nicht ausschlaggebend sein, ob KDELR1 oder KDELR2 ein Chaperon zurück in das ER transportiert, jedoch könnten die damit einhergehenden Signalkaskaden gänzlich differentielle Auswirkungen haben. Eine Regulierung bezüglich des zelltypspezifischen Verhältnisses zwischen Liganden und KDELR-Subtypen würde so auch die unterschiedlichen KDELR-Expressionsmuster erklären.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HeLa-Zellen alle drei KDELRs unter ER-Stressbedingungen vermehrt exprimiert werden, während HAP1-Zellen tendenziell nur KDELR2 leicht verstärkt exprimierten. Andere Studien zeigten ebenfalls eine vielfältige Reaktion auf ER-Stress: Während CHO-Zellen mit einer verstärkten Expression aller KDELRs reagieren, versuchen HEK293- oder SH-SY5Y-Zellen solche Bedingungen durch verstärkte Expression von KDELR2 und KDELR3 zu kompensieren (Samy *et al.*, 2020; Trychta *et al.*, 2018). Diese unterschiedliche Anpassung der KDELRs unter ER-Stressbedingungen würde so darauf hinweisen, dass Zellen bestrebt sind, ein bestimmtes KDELR/Liganden-Verhältnis aufzubauen. Ebenfalls wäre es auch möglich, dass durch die Expression von bestimmten KDELR-Subtypen vermehrt damit assoziierte Signalwege aktiviert werden sollen. Dieser Aspekt ist vor allem in Bezug auf KDELR3 interessant, der durch die geringe Transkriptzahl eher weniger eine rückführende Funktion übernehmen,

sondern vorrangig für eine Initiierung bestimmter Signalwege verantwortlich sein könnte. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass zwischen den Rezeptortypen bezüglich ihrer Expression kein genereller „crosstalk“ stattfindet, sondern dass diese eher durch den Zelltyp definiert ist. Dadurch ergeben sich eine Reihe pathologischer Zustände, welche auf der Fehlregulierung oder Dysfunktion einzelner KDELRs basieren und nicht durch andere KDELRs kompensiert werden können (Kamimura *et al.*, 2015; Siggs *et al.*, 2015; van Dijk *et al.*, 2020; Efthymiou *et al.*, 2021).

Dass in HAP1-Zellen die Expression anderer KDELRs nach KO nicht umfassend kompensiert wird, erlaubt eine genauere Interpretation der in dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsexperimente sowie der Rolle einzelner KDELR-Subtypen unter Normal- und Stressbedingungen. Ein Verlust von KDELR1 führte zu einer deutlichen Einschränkung der Zellteilung, während der KO von KDELR2 ähnliche Proliferationsraten wie wildtypische Zellen aufzeigte. Unter Thapsigargin-induzierten Stressbedingungen hingegen zeigten beide KO-Zelllinien eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Stresstoleranz, wobei KDELR1-KO-Zellen insgesamt vitaler waren als KDELR2-KO-Zellen. Für HAP1 scheint KDELR1 folglich unter Normalbedingungen entscheidende Funktionen einzunehmen, während ein KO von KDELR2 unter Stressbedingungen schwerwiegendere Folgen hat. Dies steht im Einklang mit den durchgeführten Expressionsanalysen, bei denen HAP1-Zellen durch eine Thapsigarginbehandlung mit verstärkter KDELR2 Expression reagierten. Dies könnte darauf hinweisen, dass unter ER-Stressbedingungen entweder die Interaktion von KDELR2 mit seinen Liganden effizienter ist oder dieser Rezeptor wichtige, bisher unbeschriebene, stressspezifische Funktionen ausübt. Es konnte in dieser Arbeit jedoch nicht ermittelt werden, ob dies in Verbindung mit der Affinität zu spezifischen KDELR2-Liganden oder KDELR2-assoziierten Signalketten steht. Zudem ist von diesen Experimenten nur bedingt eine Aussage für andere Zelltypen möglich, da die Expression der KDELRs unter Stressbedingungen zelltypspezifisch stark variiert.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit ein Versuch unternommen werden, KDELRs an der Zelloberfläche zu markieren, um deren Dynamik auch direkt zu untersuchen. Hierfür wurden N-terminal HA-markierte KDELR-Varianten überexprimiert und deren Lokalisation auf der Zelloberfläche überprüft, wobei im Anschluss eine Behandlung mit einem artifiziellen Liganden erfolgte. Es konnte bei allen Rezeptorvarianten durch die Peptidzugabe nach 30 min eine Internalisierung eines Großteils der Zelloberflächensignale beobachtet werden, wobei weiterhin schwächere Signale an der PM sichtbar waren. Diese hier erzeugte Momentaufnahme könnte einen Zeitpunkt darstellen, in dem weite Teile der

Zelloberflächenrezeptoren durch die Peptidzugabe internalisiert wurden und nur kleinere Cluster auf der Zelloberfläche zurückblieben.

Bisher existieren nur wenige Publikationen, welche sich mit der Zelloberflächenlokalisierung von KDELRs und deren Endozytose beschäftigen. Insbesondere über die molekularen Hintergründe der Internalisierung ist bislang wenig bekannt. Da in Hefe für den HDEL-Rezeptor eine Clathrin-vermittelte Endozytose (CvE) beschrieben wurde, liegt ein analoger Mechanismus in Säugerzellen nahe, insbesondere bei Betrachtung der starken Konservierung der H/KDELRs bezüglich ihrer Funktion und Struktur. Neuere Studien liefern in der Tat erste Evidenz für eine CvE von KDELRs in Säugerzellen, wobei Vesikel im Anschluss entlang von Zytoskelettbestandteilen wie Aktinfilamenten und Mikrotubuli transportiert werden (Becker *et al.*, 2016b). Auch wurde eine erste Beteiligung von Rab-Proteinen im Laufe dieser Arbeit beschrieben, welche die CvE und das Recycling von Rezeptoren katalysieren könnten (Jia *et al.*, 2021). Die Initiierung der CvE wird über eine zytosolische Aminosäuresequenz vermittelt. Am häufigsten sind hierbei YXX Φ und [FY]XNPX[YF] zu finden, welche direkt mit der μ 2-Untereinheit von AP2-Adaptoren interagieren (Traub, 2009; Ohno *et al.*, 1995). Der C-Terminus von KDELRs wäre aufgrund seiner dominanten Positionsänderung nach Ligandenbindung prädestiniert für eine solche Erkennungssequenz, jedoch ist dort keines dieser Motive offensichtlich. Interessanterweise ist jedoch am Übergang zum zweiten zytosolischen Loop und am Ende der siebten TMD aller humanen KDELRs ein ähnliches Motiv zu finden, wobei die Zugänglichkeit für zytosolische Proteine relativ ungünstig sein sollte. Rein statistisch würde die Oligomerisierung aus mehreren aktiven Rezeptoren die Chance erhöhen, dass eine Erkennung dieses nur teilweise exponierten Motivs bspw. durch den AP2-Komplex stattfindet, wodurch die Clusterbildung erklärt werden könnte. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass KDELRs einen ähnlichen Endozytosemechanismus wie klassische GPCRs durchlaufen. GPCRs werden durch ihre Liganden-induzierte Aktivierung mit anschließender Oligomerisierung zytosolisch an Serin- bzw. Threoninresten phosphoryliert oder ubiquitiniert, wodurch die Aktivierung der damit assoziierten G-Proteine verstärkt stattfindet (Luttrell, 2006; Kelly *et al.*, 2008). Phosphorylierte oder ubiquitinierte Rezeptoren können von einer Reihe alternativer Adapterproteine, wie bspw. β -Arrestine und Epsin-basierte Adapter, erkannt und in „clathrin-coated pits“ zusammengelagert werden (Miller & Lefkowitz, 2001).

Ebenso wäre ein bisher noch nicht beschriebener Interaktionspartner möglich, welcher mit allen drei KDELRs interagieren kann und so die Clusterbildung und Internalisierung initiiert. Im Einklang mit dieser Hypothese berichtet eine aktuelle Studie, welche unmittelbar vor

Abschluss der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde, dass KDELRs in der Tat vor ihrer Internalisierung mit anderen Rezeptoren interagieren. Hierin wird eine Oligomerisierung von KDELRs mit dem ebenfalls zelloberflächenlokalisiertem EGF-Rezeptor sowie die anschließende Clathrin-abhängige Endozytose dieses Proteinclusters beschrieben. Interessanterweise wird vermutet, dass die Interaktion über den nur nach Ligandenbindung exponierten C-Terminus der KDELRs stattfindet, wodurch die Rezeptoren indirekt über EGFRs mit der Clathrin-Endozytosemaschinerie kommunizieren könnten (Jia *et al.*, 2024). EGF-Rezeptoren bilden nach Ligandenbindung Homo- oder Heterodimere und wurden ebenfalls in Clustern mit Größen von bis zu 200 nm auf der Zelloberfläche beschrieben (Jahnke *et al.*, 2024; Zhang & Reinhard, 2019; Gao *et al.*, 2015). Auch die Formation in „hot spots“ der Plasmamembran konnte beobachtet werden, sodass diese Veröffentlichungen mit den hier vorgestellten Ergebnissen des KDELR-Clusterings übereinstimmen könnten (Xu *et al.*, 2022).

KDELR-Transport und die Beteiligung von Rab-Proteinen

Das abschließende Kapitel dieser Arbeit behandelt potenzielle Interaktionspartner der KDELRs bei intrazellulären Transportvorgängen. Die Familie der Rab-Proteine und ihre Effektoren stellen während des gesamten vesikulären Transports einen der wichtigsten molekularen Bestandteile dar, indem sie als „Master Regulatoren“ an allen Schritten von der Bildung über den Transport bis hin zur Verschmelzung der Vesikel beteiligt sind (Zerial & McBride, 2001). Sie definieren den Herkunfts- wie auch den Zielort von Transportvesikeln, wodurch sich kontrollierte Transportvorgänge, bspw. vom Golgi zur PM oder vom Golgi zum Endosom, unterscheiden lassen. Rabs eignen sich deshalb als Marker für Organellen oder können als Indikatoren für potenzielle Transportprozesse herangezogen werden (Soldati & Schliwa, 2006; Zerial & McBride, 2001).

Der Fokus der abschließenden Experimente dieser Arbeit lag auf der Detektion von potenziellen Transportvorgängen der KDELRs in peripheren Zellbereichen, wie etwa dem endosomalen Kompartiment. Experimentell wurde hierbei eine IF-basierte Analyse der Colokalisation von HA-Epitop- oder mCherry-markierten KDELR-Varianten und eGFP-gekoppelten Rab-Proteinen verwendet. Für ausgewählte Rezeptor/Rab-Kombinationen wurde ein „Live Cell Imaging“-Verfahren angewandt, bei dem die dynamische Lokalisationsänderung der Proteine nach Zugabe eines extrazellulär applizierten KDELR-Liganden untersucht wurde. In den hier durchgeführten Experimenten konnte eine starke Colokalisation bei einer Vielzahl von Rab-Proteinen (Rab1a, -5b, -6a, -7a, -22a, -31) mit den drei KDELRs in Golgi-Bereichen detektiert werden, was aus der bereits beschriebenen

Lokalisation der KDELRs dort resultiert und folglich zu erwarten war. Die im ERGIC-TGN untersuchten Transportvorgänge sind eng mit diesen Rabs assoziiert und führen daher ebenfalls zu starken Ansammlungen dieser Proteine in den Membranen dieser Bereiche. Mögliche Golgi-PM-Transportvorgänge konnten durch die Coexpression von Rab10 in potenziellen sekretorischen Vesikeln für alle KDELRs detektiert werden, während eine Rab11a-Colokalisation nur für KDELR1 und KDELR2 beobachtet wurde. Dies könnte auf gezielte Transportvorgänge von KDELRs direkt zur PM hinweisen, wobei im Laufe dieser Arbeit veröffentlichte Studien in der Tat die Beteiligung von Rab11 beim Recycling von endozytiertem KDELR1 bestätigen (Jia *et al.*, 2021). In endosomalen Kompartimenten konnte eine weitere Vielzahl an vesikulären Colokalisationen von KDELRs und Rab-Proteinen beobachtet werden, wodurch sich erstmals komplexere Transportwege der drei verschiedenen KDELRs vermuten lassen. Während für alle KDELRs mögliche exozytäre Transportvorgänge über Rab3a und Rab4a dokumentiert wurden, scheinen Rab14, -22a und -31 möglicherweise spezifische Interaktionspartner für KDELR2 und KDELR3 zu sein. Hieraus lässt sich eine erste Spezifität des KDELR-Transportes ableiten, wobei vor allem KDELR1 weniger an endosomalen Transportvorgängen beteiligt zu sein scheint.

Aufbauend auf diesen Experimenten sollte durch Zugabe eines KDELR-Liganden versucht werden, dynamische Änderungen der Colokalisation in einem „Live Cell Imaging“-Setup zu dokumentieren, um aktive Transportprozesse abzubilden. Hierbei konnte eine Beteiligung von Rab5b, -6a und -10 bei Transportvorgängen nach Internalisierung von KDELR-Liganden von der Zelloberfläche gezeigt werden. Im Falle von Rab5b könnte eine Reorganisation des *cis*-Golgi-Pools an KDELRs hin zum *trans*-Golgi als Vorbereitung für einen verstärkten Golgi-PM-Transport interpretiert werden. Aber auch direkte Transportvorgänge in peripheren Zellbereichen unter Beteiligung von Rab6a und Rab10 konnten dargestellt werden, wobei speziell für Rab10 bereits eine Rolle beim postendozytären Transport von KDELR1 beschrieben wurde (Jia *et al.*, 2021). Ein auf „BioID-proximity labeling“ basierendes potenzielles Interaktom von KDELR1 zeigte zudem, dass zumindest für KDELR1 eine mögliche Transportinteraktion von Rab6a, aber auch von den ebenfalls beschriebenen Rab10, -11a und 14, bestätigt werden kann (Yue *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2021). Die hier durchgeführten Colokalisationsstudien geben somit weitere Hinweise auf KDELR-Transporte in der Zellperipherie, welche in zukünftigen Studien näher untersucht werden sollten. Die Tatsache, dass die Zelloberflächenlokalisation der KDELRs immer mehr in den Fokus aktueller Publikationen rückt, legt auch eine nähere Aufklärung der damit einhergehenden Dynamik, nicht nur auf Ebene der PM, sondern auch innerhalb der Zelle nahe.

Ausblick

Durch die immer stärker werdende Evidenz für die Beteiligung von KDELRs an der korrekten Funktion umfassender zellulärer Vorgänge, liegt es nahe insbesondere zelloberflächenlokalisierte Rezeptoren zukünftig als molekulare Ziele für Therapeutika für verschiedenste pathophysiologische Zustände in Betracht zu ziehen. Vorangehend müssen zunächst grundlegende Aspekte der Rolle von KDELRs an der Zelloberfläche weiter erläutert und die damit in Verbindung stehenden Transportwege näher untersucht werden.

Während in dieser Arbeit weitere Einblicke in die Entwicklung von KDELR-Clustern an der PM verschiedener Zelltypen gewonnen werden konnten, sind vor allem die molekularen Grundlagen der Zelloberflächenlokalisation noch unzureichend erforscht. Durch die Analyse des Clusterings in weiteren Zelltypen sollten Hinweise auf eine gewebespezifische Funktion des Clusterings bzw. der KDELRs gefunden werden. Besonders der unterschiedlich ausgeprägte, gezielte Transport von KDELRs zur Zelloberfläche impliziert, dass manche Zelltypen diesen Vorgang evolutionär optimiert haben. So könnte bspw. die Untersuchung weiterer Immunzellen wie Dendritischen Zellen, Granulozyten und Lymphozyten Hinweise auf eine zelltypspezifische Funktion des Clusterings geben. Auch die Untersuchung weiterer neuronaler Zellen könnte im Hinblick auf die Internalisierung von neuroprotektiven Proteinen für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung sein.

Es ist bekannt, dass KDELRs eine wichtige Rolle im ER und Golgi als Teil der Stressantwort einnehmen (Wires *et al.*, 2021). Auch die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Lokalisation der Rezeptoren an der PM nach induziertem ER-Stress scheint eine physiologisch sinnvolle Funktion zu haben. Jedoch ist ungeklärt, inwiefern dies ein Thapsigargin-induziertes Artefakt ist oder eine allgemeine zelluläre Reaktion darstellt. Weitere Experimente mit unterschiedlichen ER-Stressoren wie Tunicamycin oder Brefeldin A könnten hier nähere Einblicke liefern und auch weitere physiologische Rollen der KDELRs aufklären. Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf eine zelltypspezifische Regulation der KDELR Expression. Daher wären weiterführende Untersuchungen zusätzlicher Zelltypen bezüglich ihrer stressinduzierten Expression der KDELRs von besonderem Interesse. Vor allem die verstärkte Expression von KDELR3 unter Stressbedingungen wirft deutliche Fragen hinsichtlich seiner Rolle in Normal-, aber auch Stresssituationen auf. Durch die generell nur geringe Transkriptzahl dieses Rezeptors lassen sich hochspezifische funktionelle Eigenschaften vermuten. Insbesondere die Untersuchung von Herzgewebe, in welchem die KDELR3-Expression außergewöhnlich hoch zu sein scheint, stellt einen interessanten Ansatz dar (Trychta *et al.*, 2018).

Die Assoziation der KDELRs mit verschiedenen G-Proteinen impliziert auch die Beteiligung an Signalkaskaden nach Ligandenbindung an der Zelloberfläche (Giannotta *et al.*, 2012; Cancino *et al.*, 2014; Soli *et al.*, 2017). Hierbei wäre insbesondere eine Untersuchung auf veränderte Transportströme der intrazellulären Membranen denkbar, welche auch zu einem verstärkten KDELR-Transport zur Zelloberfläche führen und so eine Art Autoamplifikation des Rezeptor-Pools an der Zelloberfläche darstellen könnten. Da basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit eine Sensorfunktion der KDELRs auf der Zelloberfläche vermutet werden kann, könnte dies durch eine vergleichende KDELR-Expressionsanalyse vor und nach Ligandengabe untersucht werden. Sollte etwa die Expression aufgrund der Interaktionen mit extrazellulären Liganden verändert werden, könnte dies eine Stresssensortätigkeit bestätigen. Eine Markierung konstitutiv wildtypisch exprimierter KDELRs könnte auf genomischer Ebene durch CRISPR/Cas-basiertes Einfügen von Epitopen oder Fluorophoren durchgeführt werden, sodass in zukünftigen Experimenten Einflüsse der Lokalisation aufgrund einer Überexpression vermieden werden können. Die hier gewonnene Erkenntnis, dass eine Vielzahl von Rab-Proteinen beim Transport von KDELRs in endosomalen Zellbereichen beteiligt sein könnte, sollte etwa in „Pulldown-Assays“ näher überprüft werden, in welchen die Interaktion von Rabs und damit assoziierten Effektor-Proteinen mit den KDELRs definierter untersucht werden kann.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden KDELRs und deren Funktionen an der Zelloberfläche untersucht, wobei insbesondere die Dynamiken bezüglich ihrer PM-Lokalisation im Fokus standen. Erste Vorarbeiten zeigten in HeLa-Zellen eine Clusterbildung von KDELRs als Reaktion auf die Bindung von extrazellulären Rezeptor-Liganden (Becker *et al.*, 2016b).

Diese Untersuchungen sollten in der vorliegenden Arbeit auf verschiedene Zelltypen unterschiedlicher Spezies (human und murin) ausgeweitet werden. Unter Verwendung einer modifizierten Variante des A/B-Toxins Rizin wurden verschiedene humane und murine Zelltypen mittels „Live Cell Imaging“ auf ihre Clusterbildung überprüft. Darauf aufbauend konnte in Kooperation mit der AG Santen mithilfe der experimentell ermittelten Daten und Monte-Carlo-Simulationen ein Modell erstellt werden, welches den mathematischen Zusammenhang zwischen den beobachteten Clustersignalen an der Zelloberfläche und KDELR-Transportraten herstellen konnte. Stehen die Endo- und Exozytoseraten in einem geeigneten Verhältnis, kann die KDELR-Clusterentwicklung in drei Phasen durchlaufen werden: Einer transienten Phase ohne detektierbares Signal, einer Wachstumsphase und einer „steady state“-Phase, in der die Clustersignale um einen Mittelwert schwanken.

Durch die Betrachtung der zeitlichen Fluoreszenzentwicklung konnte ebenfalls mathematisch hergeleitet werden, dass der Transport zur Oberfläche an gezielte Mikrodomänen („hot spots“) der PM stattfindet, wobei die Effizienz zelltypabhängig variierte. Während HeLa-Zellen bis zum Cluster-Maximum einen nahezu optimal gerichteten Rezeptortransport zur Oberfläche zeigten, schien dieser in HEK293-Zellen wesentlich zufälliger abzulaufen. Lediglich Makrophagen beider Spezies zeigten nach Ligandenapplikation kein detektierbares Clustering. In diesem Zelltyp könnte laut Modell die Endozytoserate zu hoch und/oder die KDELR-Transportrate zur PM zu niedrig sein, um eine nachhaltige Clusterentwicklung über die transiente Phase hinaus zu gewährleisten. Das „Cycling“-Modell lässt ebenso vermuten, dass aufgrund des experimentellen Setups ein Clustering in Makrophagen aufgrund des eGFP-Hintergrundes nicht detektierbar und/oder die Signalintensität der Cluster zu gering sein könnte. qPCR-basierte Expressionsanalysen wurden durchgeführt, um die Menge an KDELR-Rezeptoren insbesondere in Makrophagen mit clusternden Zelltypen zu vergleichen. Hierbei konnten unterschiedliche Expressionsmuster der drei KDELR-Subtypen festgestellt werden, wobei jedoch keine direkte Korrelation zwischen Clustering und relativer Expression detektiert wurde. Insgesamt verfügen Makrophagen über eine vergleichbare Anzahl KDELRs, lediglich für KDELR3 konnte eine schwächere Expression ermittelt werden. Aufgrund der sehr niedrigen Expression über alle Zelltypen hinweg ist ein Zusammenhang mit dem

Zelloberflächenclustering allerdings eher unwahrscheinlich. Abschließende Experimente zeigten jedoch, dass durch eine verringerte Temperatur durchaus Cluster mit niedriger Intensität bei RAWBlue-Makrophagen nachgewiesen werden können. Die verringerte Temperatur könnte zu einer verminderten Endozytoserate führen und folglich der im „Cycling“-Modell hergeleiteten Bedingungen entsprechen, unter denen eine Clusterbildung detektierbar ist. Zudem konnte in HeLa-Zellen auch die pH-Abhängigkeit der Clusterformierung an der Zelloberfläche gezeigt werden.

Durch die kommerziell erhältlichen HAP1-basierten KDELR-Knockout-Zelllinien entstand die Möglichkeit, erstmals die Clusterformation in Zellen mit deletiertem KDELR1 bzw. -2 zu überprüfen. Hierbei konnte allerdings nicht eindeutig verifiziert werden, inwiefern ein KO von KDELR1 oder KDELR2 die Clusterbildung und -entwicklung beeinflusst. Nachdem eine Expressionsanalyse der HAP1-Zellen zunächst den KO der jeweiligen Rezeptoren bestätigte konnte, wurden weitere Experimente bezüglich einer potenziellen Expressionsänderung der KDELRs nach induziertem ER-Stress durchgeführt. Durch die Beteiligung von KDELRs an der allgemeinen Stressantwort sollte die Rolle der Rezeptor-Paralogue unter Normal- und Stresssituationen näher beleuchtet werden (Yamamoto *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2017; Trychta *et al.*, 2018; Trychta *et al.*, 2022; Wires *et al.*, 2021). Der Knockout von KDELR1 schien unter Normalbedingungen erhebliche Einflüsse auf zelluläre Prozesse zu nehmen, was sich in einer verminderten Zellgröße und einer erniedrigten Proliferationsrate äußerte. Eine qPCR-basierte Analyse zeigte zudem, dass Thapsigargin-induzierter ER-Stress mit einer verstärkten KDELR2-Expression in HAP1-Zellen einhergeht. KDELR2-KO-Zellen zeigten tatsächlich eine verminderte Stressresilienz, was abermals auf die Rolle des Rezeptors unter Stressbedingungen hindeutet.

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit stabil transfizierte Säugerzellen etabliert, welche die Dynamik von KDELRs an der Zelloberfläche unter Stressbedingungen abbilden können. Sequenzen für KDELR-Varianten, welche ein Hämagglutinin-basiertes Antigen-Tag im extrazellulären Loop beinhalten, wurden erfolgreich in das Genom von Flp-In™ T-REx™ 293-Zellen integriert und deren Expression, Funktionalität, Lokalisation und IF-basierte Detektierbarkeit erfolgreich verifiziert. Im Anschluss konnte eine Zunahme von PM-lokalisierten KDELRs nach Induktion von ER-Stress gezeigt werden. Ebenso wurden diese Zelllinien für erste Einblicke in die Rezeptordynamik nach Ligandengabe verwendet, wobei nach 30-minütiger Behandlung mit einem KDELR-spezifischen Peptid eine Internalisierung eines Großteils der Rezeptoren nachgewiesen werden konnte.

Die zugrundeliegenden Mechanismen des Transports von KDELRs in die Zellperipherie sind weitestgehend unbekannt. Zwar wurden erste Studien bezüglich der Rezeptorinternalisierung und des postendozytären Transports veröffentlicht, jedoch ist dieser Aspekt in der Forschung bislang unterrepräsentiert (Jia *et al.*, 2021). Mithilfe eines bisher unveröffentlichten KDELR-Interaktoms (Becker, persönliche Mitteilung) wurden diverse Rab-Proteine, die „Master Regulatoren“ für intrazellulären Proteintransport, als potenzielle transportspezifische Interaktionspartner der KDELRs identifiziert. In dieser Arbeit konnte diese Beobachtung mit Hilfe von Colokalisationsstudien mit speziell hierfür hergestellten, stabil transfizierten Zelllinien nicht nur bestätigt werden, sondern es konnten auch weitere Einblicke in die hypothetische Beteiligung der Rab-Proteine am Transport aller KDELR-Subtypen fernab von ER und Golgi gewonnen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen somit die umfassende Bedeutung der KDELRs auch jenseits ihrer ursprünglichen Beschreibung als Retentionsvermittler zwischen Golgi und ER. Die komplexen Dynamiken auf der Zelloberfläche lassen noch weitere Funktionen dieser vielfältigen Rezeptoren vermuten und bieten auch weiterhin großes Potential und vielversprechende Untersuchungsansätze für künftige Studien.

Literaturverzeichnis

- Abrams EW, Cheng YL, Andrew DJ (2013). Drosophila KDEL receptor function in the embryonic salivary gland and epidermis. *PLoS One*. 8(10):e77618. doi:10.1371/journal.pone.0077618
- Altenhofen D, Khuong JM, Kuhn T, Lebek S, Görigk S, Kaiser K, Binsch C, Griess K, Knebel B, Belgardt BF, Cames S, Eickelschulte S, Stermann T, Rasche A, Herwig R, Weiss J, Vogel H, Schürmann A, Chadt A, Al-Hasani H (2023). E96V Mutation in the *Kdelr3* Gene Is Associated with Type 2 Diabetes Susceptibility in Obese NZO Mice. *Int J Mol Sci*.24(1):845. Published 2023 Jan 3. doi:10.3390/ijms24010845
- Agola JO, Jim PA, Ward HH, Basuray S, Wandinger-Ness A (2011). Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. *Clin Genet*. 80(4):305-318. doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01724.x
- Agrawal NJ, Nukpezah J, Radhakrishnan R (2010). Minimal mesoscale model for protein-mediated vesiculation in clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Comput Biol*. 6(9):e1000926. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000926. PMID: 20838575; PMCID: PMC2936510
- Alanen HI, Raykhel IB, Luukas MJ, Salo KE, Ruddock LW (2011). Beyond KDEL: the role of positions 5 and 6 in determining ER localization. *J Mol Biol*. 409(3):291-297. doi:10.1016/j.jmb.2011.03.070
- Ande SR, Nguyen KH, Grégoire Nyomba BL, Mishra S (2016). Prohibitin-Induced, Obesity-Associated Insulin Resistance and Accompanying Low-Grade Inflammation Causes NASH and HCC. *Sci. Rep*. 6:23608. doi:10.1038/srep23608
- Aoe T, Cukierman E, Lee A, Cassel D, Peters PJ, Hsu VW (1997). The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *EMBO J*.16(24):7305-7316. doi:10.1093/emboj/16.24.7305
- Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moisewitsch F, Yamada KM, Mueller SC (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res*. 66(6):3034-3043. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2177
- Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J (2005). Ricin Poisoning: A Comprehensive Review. *JAMA*. 294(18):2342–2351. doi:10.1001/jama.294.18.2342

- Bainter W, Platt CD, Park SY, Stafstrom K, Wallace JG, Peters ZT, Massaad MJ, Becuwe M, Salinas SA, Jones J, Beaussant-Cohen S, Jaber F, Yang JS, Walther TC, Orange JS, Rao C, Rakoff-Nahoum S, Tsokos M, Naseem SUR, Al-Tamemi S, Chou J, Hsu VW, Geha RS (2021). Combined immunodeficiency due to a mutation in the $\gamma 1$ subunit of the coat protein I complex. *J Clin Invest.* 131(3):e140494. doi:10.1172/JCI140494
- Bajaj R, Kundu ST, Grzeskowiak CL, Fradette JJ, Scott KL, Creighton CJ, Gibbons DL (2020). IMPAD1 and KDELR2 drive invasion and metastasis by enhancing Golgi-mediated secretion. *Oncogene.*39(37):5979-5994. doi:10.1038/s41388-020-01410-z
- Balch WE, McCaffery JM, Plutner H, Farquhar MG (1994). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 76(5):841-852. doi:10.1016/0092-8674(94)90359-x
- Barlowe CK & Miller EA (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics.* 193(2):383-410. doi:10.1534/genetics.112.142810
- Barlowe C & Schekman R (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365(6444):347-349. doi:10.1038/365347a0
- Barr F & Lambright DG (2010). Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol.* 22(4):461-470. doi:10.1016/j.ceb.2010.04.007
- Bartels AK, Göttert S, Desel C, Schäfer M, Krossa S, Scheidig AJ, Grötzinger J, Lorenzen I (2019). KDEL Receptor 1 Contributes to Cell Surface Association of Protein Disulfide Isomerases. *Cell Physiol Biochem.* 52(4):850-868. doi:10.33594/000000059
- Bauer A, Santen L, Schmitt MJ, Shaebani MR, Becker B (2020). Cell-type-specific differences in KDEL receptor clustering in mammalian cells. *PLoS One.* 15(7):e0235864. Published 2020 Jul 9. doi:10.1371/journal.pone.0235864
- Becker B (2012). Untersuchungen zur Endozytose und zum intrazellulären Transportweg von Ricin A (RTA) in Säuger- und Hefezellen. *Dissertation.* Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes
- Becker B, Blum A, Gießelmann E, Dausend J, Rammo D, Müller NC, Tschacksch E, Steimer M, Spindler J, Becherer U, Rettig J, Breinig F, Schmitt MJ (2016a). H/KDEL receptors mediate host cell intoxication by a viral A/B toxin in yeast. *Sci Rep.* 6:31105. doi:10.1038/srep31105
- Becker B, Shaebani MR, Rammo D, Bubel T, Santen L, Schmitt MJ (2016b). Cargo binding promotes KDEL receptor clustering at the mammalian cell surface. *Sci Rep.* 6:28940. doi:10.1038/srep28940

- Berger M, Manghi M, Destainville N (2016). Nanodomains in Biomembranes with Recycling. *J Phys Chem B*. 120(40):10588-10602. doi:10.1021/acs.jpcc.6b07631
- Blum A (2018). Lokalisation und Funktion von KDEL-Rezeptoren in Hefe- und Säugerzellen. *Dissertation*. Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes
- Blum A, Khalifa S, Nordström K, Simon M, Schulz MH, Schmitt MJ (2019). Transcriptomics of a KDEL1 knockout cell line reveals modulated cell adhesion properties. *Sci Rep*. 9(1):10611. Published 2019 Jul 23. doi:10.1038/s41598-019-47027-5
- Bowden ET, Onikoyi E, Slack R, Myoui A, Yoneda T, Yamada KM, Mueller SC (2006). Colocalization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 312(8):1240-1253. doi:10.1016/j.yexcr.2005.12.012
- Bräuer P, Parker JL, Gerondopoulos A, Zimmermann I, Seeger MA, Barr FA, Newstead S (2019). Structural basis for pH-dependent retrieval of ER proteins from the Golgi by the KDEL receptor. *Science*. 363(6431):1103-1107. doi:10.1126/science.aaw2859
- Bray D, Levin MD, Morton-Firth CJ (1998). Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature*. 393(6680):85-88. doi:10.1038/30018
- Breitmeier G (2020). Untersuchungen zur Zelloberflächenlokalisation des KDEL-Rezeptors 1 in verschiedenen Säugerzelllinien. *Bachelorarbeit*. Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes
- Brunger AT, Cipriano DJ, Diao J (2015). Towards reconstitution of membrane fusion mediated by SNAREs and other synaptic proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 50(3):231-241. doi:10.3109/10409238.2015.1023252
- Bultema JJ, Ambrosio AL, Burek CL, Di Pietro SM (2012). BLOC-2, AP-3, and AP-1 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles. *J Biol Chem*. 287(23):19550-19563. doi:10.1074/jbc.M112.351908
- Cabrera M, Muñoz M, Hidalgo J, Vega L, Martín ME, Velasco A (2003). The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus [published correction appears in *Mol Biol Cell*. 2004;15(1):preceding Table of Contents]. *Mol Biol Cell*. 14(10):4114-4125. doi:10.1091/mbc.e03-04-0194
- Cancino J, Capalbo A, Di Campli A, Giannotta M, Rizzo R, Jung JE, Di Martino R, Persico M, Heinklein P, Sallese M, Luini A (2014). Control systems of membrane transport at the interface between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Dev Cell*. 30(3):280-294. doi:10.1016/j.devcel.2014.06.018

- Cancino J, Jung JE, Luini A (2013). Regulation of Golgi signaling and trafficking by the KDEL receptor. *Histochem Cell Biol.* 140(4):395-405. doi:10.1007/s00418-013-1130-9
- Capitani M & Sallese M (2009). The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett.* 583(23):3863-3871. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.053
- Caras I, Tucureanu C, Lerescu L, Pitica R, Melinceanu L, Neagu S, Salageanu A (2011). Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: in vitro models of macrophage-tumor environment interaction. *Tumori.* 97(5):647-654. doi:10.1177/030089161109700518
- Caré BR & Soula HA (2011). Impact of receptor clustering on ligand binding. *BMC Syst Biol.* 5:48. Published 2011 Mar 31. doi:10.1186/1752-0509-5-48
- Casey JR, Grinstein S, Orlowski J (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(1):50-61. doi:10.1038/nrm2820
- Cebecauer M, Spitaler M, Sergé A, Magee AI (2010). Signalling complexes and clusters: functional advantages and methodological hurdles. *J Cell Sci.* 123(Pt 3):309-320. doi:10.1242/jcs.061739
- Cela I, Dufrusine B, Rossi C, Luini A, De Laurenzi V, Federici L, Sallese M (2022). KDEL Receptors: Pathophysiological Functions, Therapeutic Options, and Biotechnological Opportunities. *Biomedicines.* 10(6):1234. Published 2022 May 25. doi:10.3390/biomedicines10061234
- Chaddock JA & Roberts LM (1993). Mutagenesis and kinetic analysis of the active site Glu177 of ricin A-chain. *Protein Eng.* 6(4):425-431. doi:10.1093/protein/6.4.425
- Chan C, George AJ, Stark J (2001). Cooperative enhancement of specificity in a lattice of T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(10):5758-5763. doi:10.1073/pnas.101113698
- Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell.* 62(2):317-329. doi:10.1016/0092-8674(90)90369-p
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature.* 468(7323):527-532. doi:10.1038/nature09606
- Chen Y & Lippincott-Schwartz J (2013). Rab10 delivers GLUT4 storage vesicles to the plasma membrane. *Commun Integr Biol.* 6(3):e23779. doi:10.4161/cib.23779

- Collins JE, Wright CL, Edwards CA, Davis MP, Grinham JA, Cole CG, Goward ME, Aguado B, Mallya M, Mokrab Y, Huckle EJ, Beare DM, Dunham I (2004). A genome annotation-driven approach to cloning the human ORFeome. *Genome Biol.* 5(10):R84. doi:10.1186/gb-2004-5-10-r84
- Danilova T & Lindahl M (2018). Emerging Roles for Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor (MANF) in Pancreatic Beta Cells and Diabetes. *Front Physiol.* 9:1457. Published 2018 Oct 16. doi:10.3389/fphys.2018.01457
- Dausend J (2010). In vivo Topologie und Lokalisation des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p und dessen Funktion bei der Endozytose des viralen K28-Toxins in Hefe. *Dissertation. Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes*
- Dean N & Pelham HR (1990). Recycling of proteins from the Golgi compartment to the ER in yeast. *J Cell Biol.* 111(2):369-377. doi:10.1083/jcb.111.2.369
- De Matteis MA, Santini G, Kahn RA, Di Tullio G, Luini A (1993). Receptor and protein kinase C-mediated regulation of ARF binding to the Golgi complex. *Nature.* 364(6440):818-821. doi:10.1038/364818a0
- Diekmann Y, Seixas E, Gouw M, Tavares-Cadete F, Seabra MC, Pereira-Leal JB (2011). Thousands of rab GTPases for the cell biologist. *PLoS Comput Biol.* 7(10):e1002217. doi:10.1371/journal.pcbi.1002217
- Dossat AM, Trychta KA, Glotfelty EJ, Hinkle JJ, Fortunato LV, Gore LN, Richie CT, Harvey BK (2024). Excitotoxic glutamate levels cause the secretion of resident endoplasmic reticulum proteins. *J Neurochem.* Published online. doi:10.1111/jnc.16093
- Duke TA & Bray D (1999). Heightened sensitivity of a lattice of membrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(18):10104-10108. doi:10.1073/pnas.96.18.10104
- Efthymiou S, Herman I, Rahman F, Anwar N, Maroofian R, Yip J, Mitani T, Calame DG, Hunter JV, Sutton VR, Yilmaz Gulec E, Duan R, Fatih JM, Marafi D, Pehlivan D, Jhangiani SN, Gibbs RA, Posey JE; SYNAPS Study Group; Maqbool S, Lupski JR, Houlden H (2021). Two novel bi-allelic KDELR2 missense variants cause osteogenesis imperfecta with neurodevelopmental features. *Am J Med Genet A.* 185(7):2241-2249. doi:10.1002/ajmg.a.62221
- Eisfeld K, Riffer F, Mentges J, Schmitt MJ (2000). Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol.* 37(4):926-940. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02063.x

- Gao J, Wang Y, Cai M, Pan Y, Xu H, Jiang J, Ji H, Wang H (2015). Mechanistic insights into EGFR membrane clustering revealed by super-resolution imaging. *Nanoscale*.7(6):2511-2519. doi:10.1039/c4nr04962d
- Gerondopoulos A, Bräuer P, Sobajima T, Wu Z, Parker JL, Biggin PC, Barr FA, Newstead S (2021). A signal capture and proofreading mechanism for the KDEL-receptor explains selectivity and dynamic range in ER retrieval. *Elife*. 10:e68380. Published 2021 Jun 17. doi:10.7554/eLife.68380
- Giannotta M, Fragassi G, Tamburro A, Vanessa C, Luini A, Sallese M (2015). Prohibitin: A Novel Molecular Player in KDEL Receptor Signalling. *Biomed Res Int*. 319454. doi:10.1155/2015/319454
- Giannotta M, Ruggiero C, Grossi M, Cancino J, Capitani M, Pulvirenti T, Consoli GM, Geraci C, Fanelli F, Luini A, Sallese M (2012). The KDEL receptor couples to Gαq/11 to activate Src kinases and regulate transport through the Golgi. *EMBO J*. 31(13):2869-2881. doi:10.1038/emboj.2012.134
- Gimeno RE, Espenshade P, Kaiser CA (1995). SED4 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J Cell Biol*. 131(2):325-338. doi:10.1083/jcb.131.2.325
- Gomez-Navarro N & Miller E (2016). Protein sorting at the ER-Golgi interface. *J Cell Biol*. 215(6):769-778. doi:10.1083/jcb.201610031
- Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, Bose N, Chan AS, Magee AS, Danielson ME, Weiss A, Vasilakos JP, Underhill DM (2011). Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature*. 472(7344):471-475. doi:10.1038/nature10071
- Griffiths G, Ericsson M, Krijnse-Locker J, Nilsson T, Goud B, Söling HD, Tang BL, Wong SH, Hong W (1994). Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J Cell Biol*. 127(6 Pt 1):1557-1574. doi:10.1083/jcb.127.6.1557
- Groff JR & Smith GD (2008). Ryanodine receptor allosteric coupling and the dynamics of calcium sparks. *Biophys J*. 95(1):135-154. doi:10.1529/biophysj.107.119982
- Groß M (2022). Relative Quantifizierung von KDEL-Rezeptoren auf der Oberfläche von verschiedenen Säugerzelllinien und Analyse der Internalisierungs- bzw. Recyclingraten von KDELRs. *Masterarbeit*. Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes

- Hamada H, Suzuki M, Yuasa S, Mimura N, Shinozuka N, Takada Y, Suzuki M, Nishino T, Nakaya H, Koseki H, Aoe T (2004). Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 24(18):8007-8017. doi:10.1128/MCB.24.18.8007-8017.2004
- Hardwick KG, Boothroyd JC, Rudner AD, Pelham HR (1992). Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *EMBO J.* 11(11):4187-4195. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05512.x
- Hardwick KG, Lewis MJ, Semenza J, Dean N, Pelham HR (1990). ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO J.* 9(3):623-630. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08154.x
- Hardwick KG & Pelham HR (1992). SED5 encodes a 39-kD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex. *J Cell Biol.* 119(3):513-521. doi:10.1083/jcb.119.3.513
- Heldin CH (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell.* 80(2):213-223. doi:10.1016/0092-8674(95)90404-2
- Henderson MJ, Richie CT, Airavaara M, Wang Y, Harvey BK (2013). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. *J Biol Chem.* 288(6):4209-4225. doi:10.1074/jbc.M112.400648
- Hetz C & Saxena S (2017). ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol.* 13(8):477-491. doi:10.1038/nrneurol.2017.99
- Hsu VW, Shah N, Klausner RD (1992). A brefeldin A-like phenotype is induced by the overexpression of a human ERD-2-like protein, ELP-1. *Cell.* 69(4):625-635. doi:10.1016/0092-8674(92)90226-3
- Huber LA, Pimplikar S, Parton RG, Virta H, Zerial M, Simons K (1993). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasmamembrane. *J Cell Biol.* 1993;123(1):35-45. doi:10.1083/jcb.123.1.35
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Pagni M, Sigrist CJ (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* 34:D227-D230. doi:10.1093/nar/gkj063
- Hutagalung AH & Novick PJ (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev.* 91(1):119-149. doi:10.1152/physrev.00059.2009

- Hyttinen JM, Niittykoski M, Salminen A, Kaarniranta K (2013). Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(3):503-510. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.11.018
- Jackson LP, Lewis M, Kent HM, Edeling MA, Evans PR, Duden R, Owen DJ (2012). Molecular basis for recognition of dilysine trafficking motifs by COPI. *Dev Cell*. 23(6):1255-1262. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.017
- Jackson ME, Simpson JC, Girod A, Pepperkok R, Roberts LM, Lord JM (1999). The KDEL retrieval system is exploited by Pseudomonas exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 112 (Pt 4):467-475. doi:10.1242/jcs.112.4.467
- Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 9(10):3153-3162. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07513.x
- Jahn R & Scheller RH (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(9):631-643. doi:10.1038/nrm2002
- Jahnke K, Struve N, Hofmann D, Gote MJ, Bach M, Kriegs M, Hausmann M (2024). Formation of EGFRwt/EGFRvIII homo- and hetero-dimers in glioblastoma cells as detected by single molecule localization microscopy. *Nanoscale*. Published online July 29, 2024. doi:10.1039/d4nr01570c
- Jardetzky O (1966). Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*. 211(5052):969-970. doi:10.1038/211969a0
- Jia J, Tang S, Yue X, Jing S, Zhu L, Tan C, Gao J, Du Y, Lee I, Qian Y (2023). An A-kinase anchoring protein (ACBD3) coordinates traffic-induced PKA activation at the Golgi. *J Biol Chem*. 299(5):104696. doi:10.1016/j.jbc.2023.104696
- Jia J, Yue X, Zhu L, Jing S, Wang Y, Gim B, Qian Y, Lee I (2021). KDEL receptor is a cell surface receptor that cycles between the plasma membrane and the Golgi via clathrin-mediated transport carriers. *Cell Mol Life Sci*. 78(3):1085-1100. doi:10.1007/s00018-020-03570-3
- Jia J, Zhu L, Yue X, Tang S, Jing S, Tan C, Du Y, Gao J, Lee I, Qian Y (2024). Crosstalk between KDEL receptor and EGF receptor mediates cell proliferation and migration via STAT3 signaling. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):140. Published 2024 Feb 20. doi:10.1186/s12964-024-01517-w

- Jin H, Komita M, Aoe T (2017). The Role of BiP Retrieval by the KDEL Receptor in the Early Secretory Pathway and its Effect on Protein Quality Control and Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci.* 10:222. Published 2017 Jul 17. doi:10.3389/fnmol.2017.00222
- Junutula JR, De Mazière AM, Peden AA, Ervin KE, Advani RJ, van Dijk SM, Klumperman J, Scheller RH (2004). Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol Biol Cell.* 15(5):2218-2229. doi:10.1091/mbc.e03-10-0777
- Kamimura D, Katsunuma K, Arima Y, Atsumi T, Jiang JJ, Bando H, Meng J, Sabharwal L, Stofkova A, Nishikawa N, Suzuki H, Ogura H, Ueda N, Tsuruoka M, Harada M, Kobayashi J, Hasegawa T, Yoshida H, Koseki H, Miura I, Wakana S, Nishida K, Kitamura H, Fukada T, Hirano T, Murakami M (2015). KDEL receptor 1 regulates T-cell homeostasis via PP1 that is a key phosphatase for ISR. *Nat Commun.* 6:7474. Jun 17. doi:10.1038/ncomms8474
- Kelly E, Bailey CP, Henderson G (2008). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1(Suppl 1):S379-S388. doi:10.1038/sj.bjp.0707604
- Khan ES, Sankaran S, Paez JI, Muth C, Han MKL, Del Campo A (2019). Photoactivatable Hsp47: A Tool to Regulate Collagen Secretion and Assembly [retracted in: *Adv Sci (Weinh)*. 2023 Aug;10(23):e2304457]. *Adv Sci (Weinh)*. 6(9):1801982. Published 2019 Feb 28. doi:10.1002/advs.201801982
- Khan SM, Sung JY, Hébert TE (2016). Gβγ subunits-Different spaces, different faces. *Pharmacol Res.* 111:434-441. doi:10.1016/j.phrs.2016.06.026
- Klöpffer TH, Kienle N, Fasshauer D, Munro S (2012). Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol.* 10:71. Published 2012 Aug 8. doi:10.1186/1741-7007-10-71
- Lamber EP, Siedenbueg AC, Barr FA (2019). Rab regulation by GEFs and GAPs during membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol.* 59:34-39. doi:10.1016/j.ceb.2019.03.004
- Lemmon MA & Schlessinger J (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci.* 19(11):459-463. doi:10.1016/0968-0004(94)90130-9
- Lencer WI, Constable C, Moe S, Jobling MG, Webb HM, Ruston S, Madara JL, Hirst TR, Holmes RK (1995). Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol.* 131(4):951-962. doi:10.1083/jcb.131.4.951

- Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Démollière C, Duden R, Emr SD, Riezman H, Cosson P (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*. 79(7):1199-1207. doi:10.1016/0092-8674(94)90011-6
- Levin A, Reznichenko A, Witasp A, Liu P, Greasley PJ, Sorrentino A, Blondal T, Zambrano S, Nordström J, Bruchfeld A, Barany P, Ebefors K, Erlandsson F, Patrakka J, Stenvinkel P, Nyström J, Wernerson A (2020). Novel insights into the disease transcriptome of human diabetic glomeruli and tubulointerstitium. *Nephrol Dial Transplant*. 35(12):2059-2072. doi:10.1093/ndt/gfaa121
- Lewis MJ & Pelham HR (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature*. 348(6297):162-163. doi:10.1038/348162a0
- Lewis MJ & Pelham HR (1992a). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*. 68(2):353-364. doi:10.1016/0092-8674(92)90476-s
- Lewis MJ & Pelham HR (1992b). Sequence of a second human KDEL receptor. *J Mol Biol*. 226(4):913-916. doi:10.1016/0022-2836(92)91039-r
- Li G & Marlin MC (2015). Rab family of GTPases. *Methods Mol Biol*. 1298:1-15. doi:10.1007/978-1-4939-2569-8_1
- Li S, Spooner RA, Allen SC, Guise CP, Ladds G, Schnöder T, Schmitt MJ, Lord JM, Roberts LM (2010). Folding-competent and folding-defective forms of ricin A chain have different fates after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 21(15):2543-2554. doi:10.1091/mbc.e09-08-0743
- Li P, Cui P, Yue Q, Xu Z, Liu Z (2024). Exploring the potential biological significance of KDELR family genes in lung adenocarcinoma. *Sci Rep*. 14(1):14820. Published 2024 Jun 27. doi:10.1038/s41598-024-65425-2
- Liao Z, She C, Ma L, Sun Z, Li P, Zhang X, Wang P, Li W (2019). KDELR2 Promotes Glioblastoma Tumorigenesis Targeted by HIF1a via mTOR Signaling Pathway. *Cell Mol Neurobiol*. 39(8):1207-1215. doi:10.1007/s10571-019-00715-2
- Lillemeier BF, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS, Davis MM (2006). Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(50):18992-18997. doi:10.1073/pnas.0609009103
- Löhelaid H, Saarma M, Airavaara M (2024). CDNF and ER stress: Pharmacology and therapeutic possibilities. *Pharmacol Ther*. 254:108594. doi:10.1016/j.pharmthera.2024.108594

- Lukovic D, Gugerell A, Zlabinger K, Winkler J, Pavo N, Baranyai T, Giricz Z, Varga ZV, Riesenhuber M, Spannbaauer A, Traxler D, Jakab A, Garamvölgyi R, Petnehazy Ö, Pils D, Tóth L, Schulz R, Ferdinandy P, Gyöngyösi M (2019). Transcriptional Alterations by Ischaemic Postconditioning in a Pig Infarction Model: Impact on Microvascular Protection. *Int J Mol Sci.* 20(2):344. Published 2019 Jan 15. doi:10.3390/ijms20020344
- Luttrell LM (2006). Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol.* 332:3-49. doi:10.1385/1-59745-048-0:1
- Ma S, Sa L, Zhang J, Jiang K, Mi B, Shan L (2023). KDELR2 as a diagnostic and prognostic biomarker of bladder urothelial carcinoma and its correlation with immune infiltration. *Genet Mol Biol.* 46(3):e20230002. Published Sep 25. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2023-0002
- Maciel L, de Oliveira DF, Mesquita F, Souza HADS, Oliveira L, Christie MLA, Palhano FL, Campos de Carvalho AC, Nascimento JHM, Foguel D (2021). New Cardiomyokine Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by PI3K-AKT Pathway Via a Putative KDEL-Receptor Binding. *J Am Heart Assoc.* 10(1):e019685. doi:10.1161/JAHA.120.019685
- Majoul I, Straub M, Hell SW, Duden R, Söling HD (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell.* 1(1):139-153. doi:10.1016/s1534-5807(01)00004-1
- Manos PD, Ratanasirintrawoot S, Loewer S, Daley GQ, Schlaeger TM (2011). Live-cell immunofluorescence staining of human pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.*;Chapter 1:. doi:10.1002/9780470151808.sc01c12s19
- Mao H, Nian J, Wang Z, Li X, Huang C (2020). KDELR2 is an unfavorable prognostic biomarker and regulates CCND1 to promote tumor progression in glioma. *Pathol Res Pract.* 216(7):152996. doi:10.1016/j.prp.2020.152996
- Marie KL, Sassano A, Yang HH, Michalowski AM, Michael HT, Guo T, Tsai YC, Weissman AM, Lee MP, Jenkins LM, Zaidi MR, Pérez-Guijarro E, Day CP, Ylaya K, Hewitt SM, Patel NL, Arnheiter H, Davis S, Meltzer PS, Merlino G, Mishra PJ (2020). Melanoblast transcriptome analysis reveals pathways promoting melanoma metastasis. *Nat Commun.* 11(1):333. Published 2020 Jan 16. doi:10.1038/s41467-019-14085-2
- Martin ME, Hidalgo J, Rosa JL, Crottet P, Velasco A (2000). Effect of protein kinase A activity on the association of ADP-ribosylation factor 1 to golgi membranes. *J Biol Chem.* 275(25):19050-19059. doi:10.1074/jbc.275.25.19050

- Mathews EA, Stroud D, Mullen GP, Gavriilidis G, Duerr JS, Rand JB, Hodgkin J (2021). Allele-specific suppression in *Caenorhabditis elegans* reveals details of EMS mutagenesis and a possible moonlighting interaction between the vesicular acetylcholine transporter and ERD2 receptors. *Genetics*. 218(4):iyab065. doi:10.1093/genetics/iyab065
- Maziveyi M & Alahari SK (2017). Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue. *Oncotarget*. 8(29):48471-48487. doi:10.18632/oncotarget.17265
- Medrano-Soto A, Ghazi F, Hendargo KJ, Moreno-Hagelsieb G, Myers S, Saier MH Jr (2020). Expansion of the Transporter-Opson-G protein-coupled receptor superfamily with five new protein families. *PLoS One*. 15(4):e0231085. Published 2020 Apr 22. doi:10.1371/journal.pone.0231085
- Miller WE & Lefkowitz RJ (2001). Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Curr Opin Cell Biol*. 13(2):139-145. doi:10.1016/s0955-0674(00)00190-3
- Milligan G, Ward RJ, Marsango S (2019). GPCR homo-oligomerization. *Curr Opin Cell Biol*. 57:40-47. doi:10.1016/j.ceb.2018.10.007
- Mizuno M & Singer SJ (1993). A soluble secretory protein is first concentrated in the endoplasmic reticulum before transfer to the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(12):5732-5736. doi:10.1073/pnas.90.12.5732
- Mizuno-Yamasaki E, Rivera-Molina F, Novick P (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem*. 81:637-659. doi:10.1146/annurev-biochem-052810-093700
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Müller MP & Goody RS (2018). Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI. *Small GTPases*. 9(1-2):5-21. doi:10.1080/21541248.2016.1276999
- Munro S & Pelham HR (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 48(5):899-907. doi:10.1016/0092-8674(87)90086-9
- Murai, T (2024). Transmembrane signaling through single-spanning receptors modulated by phase separation at the cell surface. *Eur J Cell Biol*. 103(2):151413. doi:10.1016/j.ejcb.2024.151413
- Murray PJ & Wynn TA (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 11(11):723-737. Published 2011 Oct 14. doi:10.1038/nri3073

- Newstead S & Barr F (2020). Molecular basis for KDEL-mediated retrieval of escaped ER-resident proteins - SWEET talking the COPs. *J Cell Sci.* 133(19):jcs250100. Published 2020 Oct 9. doi:10.1242/jcs.250100
- Nishimura N & Balch WE (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science.* 277(5325):556-558. doi:10.1126/science.277.5325.556
- Oh-Hashi K, Tanaka K, Koga H, Hirata Y, Kiuchi K (2012). Intracellular trafficking and secretion of mouse mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Biochem.* 363(1-2):35-41. doi:10.1007/s11010-011-1155-0
- Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino JS (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science.* 269(5232):1872-1875. doi:10.1126/science.7569928
- Olsnes S (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon.* 44(4):361-370. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.003
- Orci L, Stamnes M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Söllner TH, Rothman JE (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell.* 90(2):335-349. doi:10.1016/s0092-8674(00)80341-4
- Palczewski K (2010). Oligomeric forms of G protein-coupled receptors (GPCRs). *Trends Biochem Sci.* 35(11):595-600. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.002
- Pearse BM (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73(4):1255-1259. doi:10.1073/pnas.73.4.1255
- Pelham HR (1988). Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* 7(4):913-918. doi:10.1002/j.1460-2075.1988.tb02896.x
- Pelham HR (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 15(12):483-486. doi:10.1016/0968-0004(90)90303-s
- Pelham HR, Hardwick KG, Lewis MJ (1988). Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J.* 7(6):1757-1762. doi:10.1002/j.1460-2075.1988.tb03005.x
- Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, Peaire AE, Shridhar V, Smith DI, Kelly J, Durocher Y, Commissiong JW (2003). MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci.* 20(2):173-188. doi:10.1385/jmn:20:2:173

- Pfeffer S & Aivazian D (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(11):886-896. doi:10.1038/nrm1500
- Pfeffer SR (2009). Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS Lett.* 583(23):3811-3816. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.075
- Pfeffer SR (2011). Entry at the trans-face of the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(3):a005272. Published 2011 Mar 1. doi:10.1101/cshperspect.a005272
- Pulvirenti T, Giannotta M, Capestrano M, Capitani M, Pisanu A, Polishchuk RS, San Pietro E, Beznoussenko GV, Mironov AA, Turacchio G, Hsu VW, Sallese M, Luini A (2008). A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway. *Nat Cell Biol.* 10(8):912-922. doi:10.1038/ncb1751
- Pylypenko O, Hammich H, Yu IM, Houdusse A (2018). Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into Rab functional diversity. *Small GTPases.* 9(1-2):22-48. doi:10.1080/21541248.2017.1336191
- Qi Z & Chen L (2019). Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. *Adv Exp Med Biol.* 1206:167-177. doi:10.1007/978-981-15-0602-4_8
- Rammo D (2017). KDEL-Rezeptor-Trafficking und Rezeptor/Liganden-Dynamik in Säugerzellen. *Dissertation.* Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes
- Raykhel I, Alanen H, Salo K, Jurvansuu J, Van DN, Latva-Ranta M, Ruddock L (2007). A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol.* 179(6):1193-1204. doi:10.1083/jcb.200705180
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 459(7245):356-363. doi:10.1038/nature08144
- Ruggiero C, Fragassi G, Grossi M, Picciani B, Di Martino R, Capitani M, Buccione R, Luini A, Sallese M (2015). A Golgi-based KDEL-dependent signalling pathway controls extracellular matrix degradation. *Oncotarget.* 6(5):3375-3393. doi:10.18632/oncotarget.3270
- Ruggiero C, Grossi M, Fragassi G, Di Campli A, Di Ilio C, Luini A, Sallese M (2017). The KDEL receptor signalling cascade targets focal adhesion kinase on focal adhesions and invadopodia. *Oncotarget.* 9(12):10228-10246. Published 2017 Dec 19. doi:10.18632/oncotarget.23421
- Sallese M, Giannotta M, Luini A (2009). Coordination of the secretory compartments via inter-organelle signalling. *Semin Cell Dev Biol.* 20(7):801-809. doi:10.1016/j.semdb.2009.04.004

- Sánchez MF, Tampé R (2023). Ligand-independent receptor clustering modulates transmembrane signaling: a new paradigm. *Trends Biochem Sci.*48(2):156-171. doi:10.1016/j.tibs.2022.08.002
- Samy A, Kaneyoshi K, Omasa T (2020). Improvement of Intracellular Traffic System by Overexpression of KDEL Receptor 1 in Antibody-Producing CHO Cells. *Biotechnol J.* 15(6):e1900352. doi:10.1002/biot.201900352
- Saudek V (2012). Cystinosin, MPDU1, SWEETs and KDELR belong to a well-defined protein family with putative function of cargo receptors involved in vesicle trafficking. *PLoS One.* 7(2):e30876. doi:10.1371/journal.pone.0030876
- Scheel AA & Pelham HR (1998). Identification of amino acids in the binding pocket of the human KDEL receptor. *J Biol Chem.* 273(4):2467-2472. doi:10.1074/jbc.273.4.2467
- Schu P (2001). Vesicular protein transport. *Pharmacogenomics J.* 1(4):262-271. doi:10.1038/sj.tpj.6500055
- Segev N (2001). Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 13(4):500-511. doi:10.1016/s0955-0674(00)00242-8
- Semenza JC, Hardwick KG, Dean N, Pelham HR (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell.* 61(7):1349-1357. doi:10.1016/0092-8674(90)90698-e
- Sharpe HJ, Stevens TJ, Munro S (2010). A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell.* 142(1):158-169. doi:10.1016/j.cell.2010.05.037
- Siggs OM, Popkin DL, Krebs P, Li X, Tang M, Zhan X, Zeng M, Lin P, Xia Y, Oldstone MB, Cornall RJ, Beutler B (2015). Mutation of the ER retention receptor KDELRL1 leads to cell-intrinsic lymphopenia and a failure to control chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(42):E5706-E5714. doi:10.1073/pnas.1515619112
- Sikorski RS & Hieter P (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122(1):19-27. doi:10.1093/genetics/122.1.19
- Solis GP, Bilousov O, Koval A, Lüchtenborg AM, Lin C, Katanaev VL (2017). Golgi-Resident Gαo Promotes Protrusive Membrane Dynamics. *Cell.* 170(5):939-955.e24. doi:10.1016/j.cell.2017.07.015
- Spooner RA & Lord JM (2015). Ricin trafficking in cells. *Toxins (Basel).* 7(1):49-65. Published Jan 9. doi:10.3390/toxins7010049

- Stenmark H (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(8):513-525. doi:10.1038/nrm2728
- Sungkaworn T, Jobin ML, Burnecki K, Weron A, Lohse MJ, Calebiro D (2017). Single-molecule imaging reveals receptor-G protein interactions at cell surface hot spots. *Nature.* 550(7677):543-547. doi:10.1038/nature24264
- Tan C, Du Y, Zhu L, Jing S, Gao J, Qian Y, Yue X, Lee I (2023). KDEL Receptor Trafficking to the Plasma Membrane Is Regulated by ACBD3 and Rab4A-GTP. *Cells.* 12(7):1079. Published 2023 Apr 4. doi:10.3390/cells12071079
- Tapia D, Jiménez T, Zamora C, Espinoza J, Rizzo R, González-Cárdenas A, Fuentes D, Hernández S, Cavieres VA, Soza A, Guzmán F, Arriagada G, Yuseff MI, Mardones GA, Burgos PV, Luini A, González A, Cancino J (2019). KDEL receptor regulates secretion by lysosome relocation- and autophagy-dependent modulation of lipid-droplet turnover. *Nat Commun.* 10(1):735. Published 2019 Feb 13. doi:10.1038/s41467-019-08501-w
- Tapia D, Cavieres VA, Burgos PV, Cancino J (2023). Impact of interorganelle coordination between the conventional early secretory pathway and autophagy in cellular homeostasis and stress response. *Front Cell Dev Biol.* 11:1069256. Published Apr 21. doi:10.3389/fcell.2023.1069256
- Townsley FM, Wilson DW, Pelham HR (1993). Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J.* 12(7):2821-2829. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05943.x
- Traub LM (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(9):583-596. doi:10.1038/nrm2751
- Trischler M, Stoorvogel W, Ullrich O (1999). Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J Cell Sci.* 112 (Pt 24):4773-4783. doi:10.1242/jcs.112.24.4773
- Truong Quang BA, Mani M, Markova O, Lecuit T, Lenne PF (2013). Principles of E-cadherin supramolecular organization in vivo. *Curr Biol.* 23(22):2197-2207. doi:10.1016/j.cub.2013.09.015
- Trychta KA, Bäck S, Henderson MJ, Harvey BK (2018). KDEL Receptors Are Differentially Regulated to Maintain the ER Proteome under Calcium Deficiency. *Cell Rep.* 25(7):1829-1840.e6. doi:10.1016/j.celrep.2018.10.055

- Trychta KA, Xie B, Verma RK, Xu M, Shi L, Harvey BK (2021). Computational Modeling of C-Terminal Tails to Predict the Calcium-Dependent Secretion of Endoplasmic Reticulum Resident Proteins. *Front Chem.* 9:689608. Published Jun 29. doi:10.3389/fchem.2021.689608
- Trychta KA, Harvey BK (2022). Caffeine and MDMA (Ecstasy) Exacerbate ER Stress Triggered by Hyperthermia. *Int J Mol Sci.*23(4):1974. Published Feb 10. doi:10.3390/ijms23041974
- Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol.* 135(4):913-924. doi:10.1083/jcb.135.4.913
- Van Der Sluijs P, Hull M, Zahraoui A, Tavitian A, Goud B, Mellman I (1991). The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(14):6313-6317. doi:10.1073/pnas.88.14.6313
- van Dijk FS, Semler O, Etich J, Köhler A, Jimenez-Estrada JA, Bravenboer N, Claeys L, Riesebos E, Gegic S, Piersma SR, Jimenez CR, Waisfisz Q, Flores CL, Nevado J, Harsevoort AJ, Janus GJM, Franken AAM, van der Sar AM, Meijers-Heijboer H, Heath KE, Lapunzina P, Nikkels PGJ, Santen GWE, Nüchel J, Plomann M, Wagener R, Rehberg M, Hoyer-Kuhn H, Eekhoff EMW, Pals G, Mörgelin M, Newstead S, Wilson BT, Ruiz-Perez VL, Maugeri A, Netzer C, Zaucke F, Micha D (2020). Interaction between KDELR2 and HSP47 as a Key Determinant in Osteogenesis Imperfecta Caused by Bi-allelic Variants in KDELR2. *Am J Hum Genet.* 107(5):989-999. doi:10.1016/j.ajhg.2020.09.009
- Vanamee ÉS, Faustman DL (2023). The benefits of clustering in TNF receptor superfamily signaling. *Front Immunol.* 14:1225704. Published 2023 Aug 17. doi:10.3389/fimmu.2023.1225704
- Wandinger-Ness A & Zerial M (2014). Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(11):a022616. Published 2014 Oct 23. doi:10.1101/cshperspect.a022616
- Wang P, Li B, Zhou L, Fei E, Wang G (2011). The KDEL receptor induces autophagy to promote the clearance of neurodegenerative disease-related proteins. *Neuroscience.* 190:43-55. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.008
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner TH, Rothman JE (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell.* 92(6):759-772. doi:10.1016/s0092-8674(00)81404-x

- Wei H, Ma W, Lu X, Liu H, Lin K, Wang Y, Ye Z, Sun L, Huang Z, Pan T, Zhou Z, Cheng EY, Zhang H, Gao P, Zhong X (2021). KDELR2 promotes breast cancer proliferation via HDAC3-mediated cell cycle progression. *Cancer Commun (Lond)*. 41(9):904-920. doi:10.1002/cac2.12180
- Weinberg J & Drubin DG (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol*. 22(1):1-13. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.001
- White J, Johannes L, Mallard F, Girod A, Grill S, Reinsch S, Keller P, Tzschaschel B, Echard A, Goud B, Stelzer EH (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells [published correction appears in *J Cell Biol* 2000 Jan 10;148(1):followi]. *J Cell Biol*. 147(4):743-760. doi:10.1083/jcb.147.4.743
- Wilson DW, Lewis MJ, Pelham HR (1993). pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J Biol Chem*. 268(10):7465-7468
- Wires ES, Trychta KA, Kennedy LM, Harvey BK (2021). The Function of KDEL Receptors as UPR Genes in Disease. *Int J Mol Sci*. 22(11):5436. Published 2021 May 21. doi:10.3390/ijms22115436
- Wu X & Rapoport TA (2021). Cryo-EM structure determination of small proteins by nanobody-binding scaffolds (Legobodies). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 118(41):e2115001118. doi:10.1073/pnas.2115001118
- Wu Z, Newstead S, Biggin PC (2020). The KDEL trafficking receptor exploits pH to tune the strength of an unusual short hydrogen bond. *Sci Rep*. 10(1):16903. Published 2020 Oct 9. doi:10.1038/s41598-020-73906-3
- Wu Z, Smith K, Gerondopoulos A, Sobajima T, Parker JL, Barr FA, Newstead S, Biggin PC (2024). Molecular basis for pH sensing in the KDEL trafficking receptor. *Structure*. 32(7):866-877.e4. doi:10.1016/j.str.2024.03.013
- Xiang C, Wang Y, Zhang H, Han F (2017). The role of endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disease. *Apoptosis*. 22(1):1-26. doi:10.1007/s10495-016-1296-4
- Xie C, Yue S, Li X, Li Z, Li W, Huang G, Ma G, Liu W, Wang Y, Zhang Y (2022). A Linarin Derivative Protects against Ischemia-Induced Neuronal Injury in Mice by Promoting Cerebral Blood Flow Recovery via KDELR-Dependent CSPG4 Activation. *Oxid Med Cell Longev*.2022:6434086. Published Jul 26. doi:10.1155/2022/6434086
- Xu G, Li S, Xie K, Zhang Q, Wang Y, Tang Y, Liu D, Hong Y, He C, Liu Y (2012). Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity. *Plant J*. 72(1):57-69. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05053.x

- Xu H, Zhang J, Zhou Y, Zhao G, Cai M, Gao J, Shao L, Shi Y, Li H, Ji H, Zhao Y, Wang H (2022). Mechanistic Insights into Membrane Protein Clustering Revealed by Visualizing EGFR Secretion. *Research (Wash D C)*.2022:9835035. Published Oct 16. doi:10.34133/2022/9835035
- Yamamoto K, Fujii R, Toyofuku Y, Saito T, Koseki H, Hsu VW, Aoe T (2001). The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 20(12):3082-3091. doi:10.1093/emboj/20.12.3082
- Yamamoto K, Hamada H, Shinkai H, Kohno Y, Koseki H, Aoe T (2003). The KDEL receptor modulates the endoplasmic reticulum stress response through mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *J Biol Chem*. 278(36):34525-34532. doi:10.1074/jbc.M304188200
- Yeagle PL (2016). The Membranes of cells (third edition), Chapter 15 - Membrane Receptors doi:10.1016/B978-0-12-800047-2.00015-2
- Yee DC, Shlykov MA, Västermark A, Reddy VS, Arora S, Sun EI, Saier MH Jr (2013). The transporter-opsin-G protein-coupled receptor (TOG) superfamily. *FEBS J*. 280(22):5780-5800. doi:10.1111/febs.12499
- Yue X, Qian Y, Zhu L, Gim B, Bao M, Jia J, Jing S, Wang Y, Tan C, Bottanelli F, Ziltener P, Choi S, Hao P, Lee I (2021). ACBD3 modulates KDEL receptor interaction with PKA for its trafficking via tubulovesicular carrier. *BMC Biol*. 19(1):194. Published 2021 Sep 7. doi:10.1186/s12915-021-01137-7
- Zhang S, Reinhard BM (2019). Characterizing Large-Scale Receptor Clustering on the Single Cell Level: A Comparative Plasmon Coupling and Fluorescence Superresolution Microscopy Study [published correction appears in *J Phys Chem B*. Sep 26;123(38):8166. doi: 10.1021/acs.jpcc.9b08396]. *J Phys Chem B*. 2019;123(26):5494-5505. doi:10.1021/acs.jpcc.9b05176
- Zerial M & McBride H (2001). Rab proteins as membrane organizers [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol* Mar;2(3):216]. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(2):107-117. doi:10.1038/35052055
- Zhu J, Chen H, Le Y, Guo J, Liu Z, Dou X, Lu D (2022). Salvianolic acid A regulates pyroptosis of endothelial cells via directly targeting PKM2 and ameliorates diabetic atherosclerosis. *Front Pharmacol*.13:1009229. Nov 8. doi:10.3389/fphar.2022.1009229

Danksagung

Zuallererst gilt mein herzlichster Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred J. Schmitt, in dessen Arbeitsgruppe ich nicht nur bereits meine Bachelor- und Masterarbeit mit Freude abschließen durfte, sondern der mir auch die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit an diesem Lehrstuhl durchzuführen. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen!

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Uli Müller für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitschaft, Expressionsanalysen in seinen Laboren durchführen zu dürfen. Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Reza Shaebani und Prof. Dr. Ludger Santen für die Kooperation im Rahmen des SFB 1027. Mein Dank gilt auch den Mitgliedern des IRTG, vor allem den Organisatoren, Veranstaltern und Teilnehmern von zahlreichen interessanten Vorträgen, Tagungen und Workshops.

Abschließend bedanke ich mich selbstverständlich bei meinen Studentinnen Galina und Michaela sowie bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der gesamten AG Schmitt. Ohne eure Vorarbeit, Hilfe, Kritik, Unterstützung und Ratschläge wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.