

Lokalisation und Funktion von KDEL-Rezeptoren in Hefe- und Säugerzellen

Dissertation

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

von

Master of Science

Andrea Elisabeth Blum

Saarbrücken

2018

Tag des Kolloquiums: 07.09.2018
Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick
Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Schmitt
Prof. Dr. Martin Simon
Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller
Akademischer Mitarbeiter: Dr. Gilles Gasparoni

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abstract	8
1. Einleitung	10
1.1. Vesikeltransport in Eukaryonten	10
1.2. Struktur und Lokalisation des KDELR	13
1.3. Regulierung des intrazellulären Membrantransports durch KDELRs.....	15
1.4. Weitere Funktionen des KDELR.....	18
1.5. Ziele der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Organismen.....	23
2.1.1. Bakterien	23
2.1.2. Hefen.....	23
2.1.3. Säugerzellen.....	23
2.2. Kultivierung.....	24
2.2.1. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	24
2.2.1.1. Bakterien	24
2.2.1.2. Hefen.....	25
2.2.1.2. Säugerzellen	26
2.2.2. Kryokulturen	26
2.2.2.1. Bakterien und Hefen	26
2.2.2.2. Einfrieren von Säugerzellen.....	27
2.2.2.3. Auftauen von Säugerzellen	27
2.3. Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1. Plasmide.....	27
2.3.2. Oligonukleotide.....	29
2.3.3. DNA Isolierung.....	31
2.3.3.1. Alkalische Lyse.....	31
2.3.3.2. Mini Prep	32
2.3.3.3. Midi Prep	32
2.3.3.4. Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen	32
2.3.3. RNA-Isolierung aus Säugerzellen.....	32
2.3.4. cDNA-Synthese	33

2.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	34
2.3.5.1. Nano Drop.....	34
2.3.5.2. Qubit	34
2.3.6. Restriktion von Plasmid-DNA	34
2.3.7. Agarosegelelektrophorese	34
2.3.8. DNA-Isolierung aus Agarosegelen	35
2.3.9. Ligation	35
2.3.10. Transformationsmethoden	35
2.3.10.1. Bakterien	35
2.3.10.2. Hefen.....	36
2.3.10.3. Transfektion von Säugerzellen.....	37
2.3.11. Polymerasekettenreaktion	37
2.3.11.1. Standard-PCR	37
2.3.11.2. qPCR.....	39
2.3.12. AccepTor TM -Cloning	40
2.3.13. pYES2.1 TOPO [®] TA-Cloning	40
2.4. Proteinbiochemische Methoden	40
2.4.1. Zellaufschlussmethoden.....	40
2.4.1.1. Zellaufschluss von Hefezellen	40
2.4.1.2. Zellaufschluss von Säugerzellen.....	41
2.4.2. Gewinnung von Proteinproben aus Zellkulturüberstand	42
2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.4.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.4.5. Western Blot-Analyse	44
2.5. Hefespezifische Methoden	45
2.5.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl	45
2.5.2. FOA-Selektion	45
2.6. Säugerspezifische Methoden	46
2.6.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl	46
2.6.2. MTT-Assay	46
2.6.3. Indirekte Immunfluoreszenz	47
2.7. Mikroskopie.....	48
2.7.1. CLSM.....	48
2.7.2. TEM zum Nachweis der Erd2p-Plasmamembranlokalisation	48

2.7.3. REM zur Analyse der KDELR1-Plasmamembranlokalisation.....	49
2.8. CRISPR/Cas9-vermittelter Gen-KO.....	50
2.9. Transkriptomanalyse	53
3. Ergebnisse	55
3.1.1. Nachweis der KDELR-Lokalisation an der Plasmamembran von Hefezellen.....	56
3.1.2. Nachweis der KDELR1-Lokalisation an der Plasmamembran von HeLa-Zellen.....	59
3.2. Charakterisierung des C-terminalen Lysin-Clusters als Retentionsmotiv.....	61
3.2.1. Analyse der Retentionsfunktion des Erd2p-C-Terminus in Hefezellen.....	61
3.2.2. Analyse der Retentionsfunktion des KDELR1-C-Terminus in Säugerzellen.....	63
3.2.3. Vergleichende Lokalisation verschiedener KDELR1-Varianten.....	65
3.3. CRISPR/Cas9-vermittelter KO der KDELRs in Säugerzellen.....	67
3.3.1. HDR-basierte CRISPR/Cas9-Technologie	67
3.3.2. NHEJ-basierte CRISPR/Cas9-Technologie.....	70
3.3.3. Genomische Charakterisierung der KDELR-KO Zelllinien.....	76
3.3.4. Veränderung des Transkriptoms durch einen KDELR-KO	79
3.3.4.1. Transkriptomanalyse von HAP1-Zellen	79
3.3.4.2. Quantitative RT-PCR zur Analyse des KDELR2- und KDELR3-KO	85
3.3.4. Charakterisierung der KDELR-KO Zelllinien bezüglich der Sekretion von PDI ..	87
3.3.5. Charakterisierung der KDELR-KO Zelllinien bezüglich ihrer Reaktion auf ER- Stress	89
3.3.6. Morphologische Analyse der HAP1-Zellen.....	92
3.4. Einfluss einer KDELR-Überexpression auf die UPR-Aktivierung in Hefe	93
4. Diskussion	99
Lokalisation und Retention des KDELR	100
CRISPR/Cas9-vermittelter KDELR-KO	104
Charakterisierung der KDELR-KO Zelllinien	107
Ausblick.....	116
Zusammenfassung.....	118
Literaturverzeichnis.....	120
Danksagung.....	132
Anhang	134

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	„binding immunoglobulin protein“
bp	Basenpaare
Cas	„CRISPR-associated“
cDNA	„copy DNA“
CLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
COP	„coat protein complex“
CRISPR	„clustered regularly interspaced short palindromic repeats“
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d/o	„drop-out“
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
DEG	Differenziell exprimierte Gene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
eGFP	„enhanced green fluorescence protein“
ECM	Extrazelluläre Matrix
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERD	„ER-retention defective“
FAK	“focal adhesion kinase”
FCS	Fötale Kälberserum
FOA	5-Fluororotsäure
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	„Guanine nucleotide exchange factor“
GLUT1	Glukosetransporter 1
GO	“Gene Ontology”
GPCR	„G-Protein-coupled receptor“
G-Protein	GTP-bindendes Protein
gRNA	„guide RNA“
GTP	Guanosintriphosphat
HDR	„homolgy-directed repair“
IRE1	„Inositol-requiring enzyme 1”
JNK1	„c-Jun amino-terminal kinase 1”

Kan	Kanamycin
KDEL	KDEL-Rezeptor
KO	knock-out
LB	„lysogeny broth“
MANF	„mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor“
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
mRNA	„messenger RNA“
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NHEJ	„non-homologous end joining“
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PKA	Proteinkinase A
PM	Plasmamembran
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFP	„red fluorescent protein“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFK	„Src-family kinase“
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TF	Transkriptionsfaktor
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TPM	„transcripts per million“
UPR	„unfolded protein response“
WT	Wildtyp

Abstract

A/B toxins such as cholera toxin, *Pseudomonas* exotoxin and yeast killer toxin K28 contain a KDEL-like motif at either subunit which ensures retrograde toxin transport through the secretory pathway of a target cell. Intoxication and host cell entry is initiated by toxin binding to plasma membrane (PM) receptors where the yeast KDEL receptor (KDELR) was recently identified as receptor of K28. Consistent with its function at the cell surface, electron microscopy was performed to support PM co-localization of KDELRs in yeast and mammals. To identify how a major KDELR fraction is retained in the secretory pathway, the C-terminal lysine cluster of KDELRs was confirmed to play an important role for ER retention in yeast and mammalian cells. As KDELRs function as GPCRs in the regulation of vesicle trafficking, a similar signalling function after cargo binding at the cell surface is assumed. To address such novel functions, CRISPR/Cas9-mediated KDELR knock-out (KO) cell lines were generated. While KDELR1-KO inhibited HEK293 cell survival, the generation of KDELR2- and KDELR3-KO cell lines was successful. Characterization of commercial KDELR1-KO HAP1 cells revealed a strong sensitivity under ER stress conditions and an increased secretion of PDI. Additionally, transcriptome analysis showed alterations in the expression of genes whose products are involved in developmental processes, cell adhesion and extracellular matrix functions.

A/B-Toxine wie das Cholera-Toxin, *Pseudomonas*-Exotoxin und das Hefe-Killertoxin K28 enthalten ein KDEL-ähnliches Motiv an einer ihrer Untereinheiten, welches den retrograden Toxintransport durch den Sekretionsweg der Zielzelle ermöglicht. Ihr Eindringen wird durch die Bindung an Plasmamembran (PM)-Rezeptoren initiiert, wobei der KDEL-Rezeptor (KDELR) als PM-Rezeptor von K28 identifiziert werden konnte. Im Zusammenhang mit dieser Funktion an der Zelloberfläche wurde eine Co-Lokalisation des KDELR in der PM von Hefe- und Säugerzellen durch Elektronenmikroskopie bestätigt. Untersuchungen bezüglich der KDELR-Retention im Sekretionsweg konnten eine entscheidende Rolle des C-terminalen Lysin-Clusters in Hefe- und Säugerzellen bestärken. Da KDELRs bei der Regulation von Transportprozessen als GPCRs agieren, kann auch eine ähnliche Signalfunktion nach extrazellulärer Ligandenbindung angenommen werden. Zur Analyse solcher neuer Funktionen wurden mittels CRISPR/Cas9-Technologie KDELR-KO Zelllinien hergestellt. Während die Generierung eines KDELR2- und KDELR3-KOs gelang, verhinderte der KDELR1-KO das Überleben von HEK293-Zellen. Die Charakterisierung einer kommerziellen KDELR1-KO

HAP1-Zelllinie zeigte eine erhöhte Sensitivität bei ER-Stress sowie eine verstärkte PDI-Sekretion. Zusätzlich konnten mittels Transkriptomanalyse Veränderungen in Entwicklungsprozessen, Zelladhäsion sowie Komponenten der Extrazellulären Matrix nachgewiesen werden.

1. Einleitung

1.1. Vesikeltransport in Eukaryonten

Eukaryontische Zellen repräsentieren ein dynamisches System aus verschiedenen Kompartimenten, deren Funktionen weitgehend durch die spezifische Zusammensetzung der beteiligten Organellen gewährleistet werden. Der gerichtete Transport von Proteinen und Lipiden ist demnach zur Aufrechterhaltung der Zellfunktionen entscheidend. Sekretorische Proteine oder Proteine des Membransystems stellen fast ein Drittel des gesamten Proteoms dar. Ihr Transport entlang des sekretorischen Weges bis hin zum Wirkungsort erfolgt über Vesikel, die anhand ihrer Hüllproteine in drei Hauptgruppen eingeteilt werden. COPII-umhüllte Vesikel sind für den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Komplex verantwortlich, während Vesikel mit COPI-Hülle den retrograden Transport vom cis-Golgi zum ER ermöglichen (Barlowe *et al.*, 1994; Letourneur *et al.*, 1994; Malhotra *et al.*, 1989). Der vom Trans-Golgi-Netzwerk und der Plasmamembran ausgehende Transport zu Lysosomen oder Endosomen wird durch Vesikel mit Clathrin-Hülle gewährleistet (Pearse, 1976). Das Sortieren der Cargo-Proteine in die entsprechenden Transportvesikel basiert auf spezifischen Signalen, die von Adapter-Komponenten der Hüllproteine erkannt und gebunden werden. Membran-durchspannende Rezeptoren vermitteln dabei das Sortieren von löslichen Proteinen des Sekretionswegs, deren Signale aufgrund der Membranbarriere nicht direkt von zytosolischen Hüllproteinadaptern erkannt werden können. Diese Rezeptoren enthalten sowohl luminalen Bereiche zur Bindung der Cargo-Proteine als auch zytosolische Domänen, die als Bindestellen der Hüllproteine fungieren.

Allgemein lässt sich der Vesikeltransport, wie von Bonifacino und Glick beschrieben, in sieben Schritte unterteilen (Bonifacino & Glick, 2004). Im ersten Schritt („Initiation“) erfolgen die Rekrutierung der beteiligten Hüllkomponenten zur entsprechenden Synthesestelle des Donor-Kompartiments sowie die Akkumulation von Cargoproteinen. Die Initiation wird durch Aktivierung Membran-assoziiierter GTPasen oder Phosphoinositide ausgelöst. Beim anschließenden „Budding“ werden die Hüllkomponenten an die Membran angelagert und die Membranbeugung wird eingeleitet. Die Cargoproteine werden an dieser Stelle der Vesikelsynthese konzentriert. Der nächste Schritt („Scission“) beschreibt die Abschnürung des Vesikels von der Donor-Membran, die durch die beteiligten Hüllproteine oder akzessorische Proteine vermittelt wird. Das anschließende „Uncoating“ wird durch die Inaktivierung der entsprechenden GTPasen beziehungsweise die Hydrolyse der Phosphoinositide ausgelöst. Die Hüllproteine werden dabei von den Vesikeln entfernt und zur

Gewährleistung weiterer Vesikelsynthesen recycelt. Im fünften Schritt („Tethering“) wird das Vesikel, geleitet vom Zytoskelett, zum Zielkompartiment transportiert und an dessen Membran gebunden. Das anschließende „Docking“ des Vesikels an der Zielmembran erfolgt durch das spezifische Binden von SNARE („soluble *N*-Ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor“)-Proteinen, welche auch die letztendliche „Fusion“ von Vesikel- und Zielmembran vermitteln (McNew *et al.*, 2000). Entsprechend der jeweiligen Vesikel- und Cargoart sind verschiedene Proteine an der Vesikelentstehung beteiligt.

Das Hüllprotein Clathrin repräsentiert ein Hexamer aus drei schweren und drei leichten Ketten, die ein polyedrisches Gittergerüst bilden (Crowther & Pearse, 1981; Vigers *et al.*, 1986). Da Clathrin selbst nicht mit der Membran interagieren kann, wird die Vesikelbildung durch verschiedene Adapterkomplexe vermittelt, die Bindestellen für Clathrin sowie für Membrankomponenten enthalten. Clathrin-Adapter sind meist periphere Membranproteine und ihre Rekrutierung erfolgt durch aktivierte Membran-assoziierte G-Proteine der Arf/Ar1/Sar- und Rab-Familien oder mit Hilfe kurzlebiger Phospholipid-Spezies wie Phosphatidylinositol-Phospholipiden (PIPs). Einen gut charakterisierten Clathrin-Adapter stellt der AP2-Komplex dar, der für die Generierung endozytotischer Vesikel verantwortlich ist, die von der Plasmamembran zum frühen Endosom transportiert werden. AP2 besteht aus vier Untereinheiten, wobei α und $\beta 2$ als große, $\mu 2$ als mittlere und $\sigma 2$ als kleine Untereinheit bezeichnet werden. Die beiden großen Untereinheiten werden in eine große N-terminale „trunk“-Domäne und eine kleinere C-terminale „appendage“-Domäne unterteilt, die durch eine unstrukturierte Linker-Sequenz verknüpft sind (Shih *et al.*, 1995). Die Linker-Sequenz der β -Untereinheit beinhaltet eine kurze lineare Sequenz aus fünf Aminosäuren (L Φ x Φ [DE], wobei Φ einen hydrophoben Rest darstellt), die als Bindestelle für Clathrin dient und als Clathrin-Box bezeichnet wird (Dell'Angelica *et al.*, 1998). Die Bindung der Cargo-Proteine erfolgt an der $\mu 2$ -Untereinheit und basiert auf einem Yxx Φ - oder xxxL[LI]-Erkennungsmotiv innerhalb der Cargo-Sequenz (Owen, 1998). Nach der Rekrutierung des AP2-Komplexes zur Membran durch Bindung an PI_(4,5)P₂ und Synaptotagmin (Li *et al.*, 1995) findet eine AAK1-vermittelte Phosphorylierung von Thr156 der $\mu 2$ -Untereinheit statt. Aufgrund der daraus resultierenden Konformationsänderung wird die Yxx Φ -Bindestelle zugänglich, sodass die Cargo-Selektion und Verpackung erfolgen können (Conner & Schmid, 2002).

Die Generierung von COPII-Vesikeln erfolgt an „ER-Exit sites“ (ERES) und wird durch die Sec12-vermittelte Aktivierung des G-Proteins Sar1 initiiert (Barlowe & Schekman, 1993). Aktiviertes Sar1-GTP rekrutiert ein Dimer aus Sec23 und Sec24 zur Ausbildung eines „prebudding“ Komplexes, bevor die Rekrutierung des Sec13/Sec31-Tetramers erfolgt

(Barlowe *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1998). Durch Sec13/31 wird die Membranbeugung eingeleitet während Sec23/24 die Cargo-Selektion vermittelt (Stagg *et al.*, 2006). Sec24 repräsentiert das Cargo-Adapterprotein der COPII-Hülle, wobei die Cargo-Diversität durch mehrere Bindestellen gewährleistet wird, die unterschiedliche Signale erkennen (Mancias & Goldberg, 2008; Miller *et al.*, 2002). Verschiedene Isoformen der Sec24-Untereinheiten mit variierenden Spezifitäten tragen ebenfalls zur Erkennung eines breiten Cargo-Spektrums bei (Roberg *et al.*, 1999). Die Generierung von COPII- und COPI-Vesikeln ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

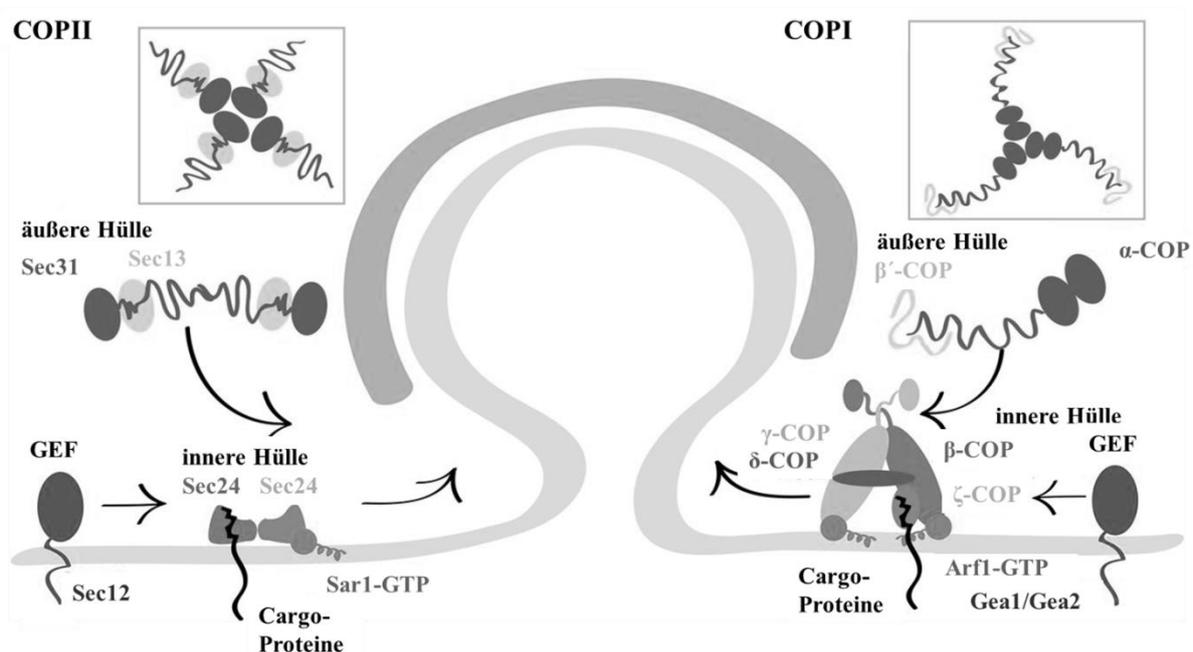


Abbildung 1: Synthese von COPI- und COPII-Vesikeln im sekretorischen System. Die Generierung der COPII-Hülle (linker Abbildungsbereich) wird in Folge der Aktivierung des G-Proteins Sar1 durch den Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (GEF) Sec12 initiiert. Sar1-GTP rekrutiert ein Dimer aus Sec23 und Sec24, der einen Bestandteil der “inneren Hülle” repräsentiert und die Cargo-Selektion vermittelt. Durch die anschließende Rekrutierung eines Sec13/Sec23-Tetramers, der die äußere Hülle der COPII-Vesikel bildet, wird die Membranbeugung eingeleitet. Die Assemblierung der COPI-Hülle (rechter Abbildungsbereich) wird durch die Aktivierung von Arf1 ausgelöst, welche von den GEFs Gea1 und Gea2 katalysiert wird. Aktives Arf1-GTP rekrutiert die COPI-Hülle (Coatomer) als vollständigen Komplex zur Membran. Dieser Komplex lässt sich in zwei Untereinheiten einteilen, wobei ein Tetramer aus β , γ , δ und ζ die “innere Hülle” repräsentiert und die “äußere Hülle” durch ein $\alpha/\beta'/\epsilon$ - Trimer gebildet wird. (Verändert nach Barlowe & Miller, 2013).

Die COPI-Hülle (Coatomer) wird als vollständiger Komplex zur Membran rekrutiert und besteht aus sieben Untereinheiten (α , β , β' , γ , δ , ϵ und ζ -COP), die sich zu zwei Komplexeinheiten verbinden: der B-Komplex wird aus einem $\alpha/\beta'/\epsilon$ -Trimer und der F-Komplex durch ein $\beta/\gamma/\delta/\zeta$ -Tetramer gebildet (Hara-Kuge *et al.*, 1994; Waters *et al.*, 1991). Die Regulierung

des COPI-vermittelten retrograden Transports erfolgt durch die GTPase Arf1, die in aktiver Form an der γ -Untereinheit des Coatomers bindet. Eine weitere Arf1-Bindestelle befindet sich an der β -Untereinheit des Coatomers, sodass die Membranbindung des Komplexes durch jeweils zwei Arf1-Moleküle vermittelt wird (Serafini *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 2012). Die Bindung der Cargo-Proteine am Coatomer erfolgt in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Retentionsmotive. Die β -Propeller Domänen von α -COPI und β' -COPI dienen als Interaktionsseite zur Rückführung ER-residenter Membranproteine mit di-Lysin-Motiven (Jackson *et al.*, 2012), während die β - und δ -Untereinheiten entscheidend zur Sortierung von Membranproteinen mit Arginin-basierten Retentionssignalen beitragen (Michelsen *et al.*, 2007). Lösliche ER-residente Proteine können aufgrund der Membranbarriere nicht direkt mit Coatomer-Komponenten interagieren. Daher erfolgt die Erkennung des C-terminalen Retentionsmotivs (Lys-Asp-Glu-Leu) mit Hilfe von KDEL-Rezeptoren, die eine Verbindung zum Coatomer vermitteln (Munro & Pelham, 1987; Semenza *et al.*, 1990). KDELRs stellen Transmembranproteine dar, die auf luminaler Seite eine Bindestelle für KDEL-Cargo besitzen und zytosolische Bereiche zur Interaktion mit Coatomer-Komponenten aufweisen (Majoul *et al.*, 2001). Die Bindung der Cargo-Proteine ist dabei abhängig vom vorliegenden pH-Wert. Während der leicht saure pH-Wert im Golgi die Bindung der Liganden am KDELR begünstigt, führt der neutrale pH-Wert im ER zu einer Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes (Wilson *et al.*, 1993). Das Binden von KDEL-Cargo führt zu einer Interaktion des KDELR mit dem Arf1-aktivierenden Arf-GAP („GTPase-activating protein“), was in einer Rekrutierung von Arf1 und Coatomer-Komponenten resultiert (Aoe *et al.*, 1997; Cukierman *et al.*, 1995). Die Phosphorylierung von Serin209 am zytosolischen C-Terminus des KDELR sowie die Präsenz eines intakten C-terminalen di-Lysin-Motivs gewährleisten die Interaktion des Rezeptors mit Arf-GAP und dem Coatomer (Cabrera *et al.*, 2003). Nach erfolgtem Rücktransport und Dissoziation des Liganden wird der KDELR über COPI-vermittelten Transport zurück zum Golgi recycelt (Townsend *et al.*, 1993).

1.2. Struktur und Lokalisation des KDELR

Der KDELR wurde erstmals in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Produkt des *ERD2*-Gens beschrieben (Semenza *et al.*, 1990). Durch eine Analyse von Hefemutanten mit Defekten im Retentionssystem wurden zwei Gene identifiziert, die für eine effiziente Rückführung löslicher ER-residenter Proteine notwendig sind. Diese Gene wurden als *ERD1* und *ERD2* („ER-retention defective“) bezeichnet (Hardwick *et al.*, 1990). Während *ERD1* kein essentielles Gen repräsentiert, dessen Deletion wahrscheinlich in einer leichten

Veränderung der Golgi-Struktur und dadurch bedingten pleiotropen Effekten bei schnellem Zellwachstum resultiert, ist der Verlust von *ERD2* in Hefen letal (Hardwick *et al.*, 1990; Semenza *et al.*, 1990). Das *ERD2*-Gen codiert für ein integrales Membranprotein, welches die Effizienz und Kapazität des Retentionssystems bestimmt. Eine reduzierte *ERD2*-Expression führt zu einer verstärkten Sekretion löslicher ER-residenter Proteine, die in Hefen eine C-terminale HDEL-Retentionssequenz besitzen, wohingegen ihre Rückführung in *ERD2*-überexprimierenden Hefen verstärkt wird (Semenza *et al.*, 1990). In Säugerzellen wird die Retention bevorzugt über KDEL-Motive vermittelt, wobei die Präsenz von drei homologen Rezeptoren (KDELR1, KDELR2 und KDELR3) mit unterschiedlichen Spezifitäten ein breiteres Spektrum an Retentionsmotiven gewährleistet (Lewis & Pelham, 1990, 1992b; Raykhel *et al.*, 2007). KDELR1, der generell die stärkste Expression aufweist, bevorzugt zwar das klassische KDEL-Motiv, zeigt aber auch eine hohe Affinität für eine Vielzahl an Motivvarianten. Der etwas geringer exprimierte KDELR2 scheint dagegen auf HXEL-Motive spezialisiert zu sein. KDELR3 wird am schwächsten exprimiert und erkennt, ähnlich wie KDELR1, eine Vielzahl von Sequenzmotiven, wobei eine Präferenz für HDEL besteht (Raykhel *et al.*, 2007). Die Aminosäuresequenz der drei KDELRs weist eine Übereinstimmung von 73,0-83,5 % auf und beinhaltet sieben hydrophobe Bereiche, welche die Transmembrandomänen der Rezeptoren definieren. Der N-Terminus des Proteins befindet sich im Lumen, während der C-Terminus in das Zytosol ragt (Raykhel *et al.*, 2007; Townsley *et al.*, 1993, Abbildung 2). Eine mögliche Bindestelle für KDEL-tragende Proteine wurde im luminal gelegenen Loop zwischen Transmembrandomäne zwei und drei beschrieben (Lewis & Pelham, 1992a; Townsley *et al.*, 1993).

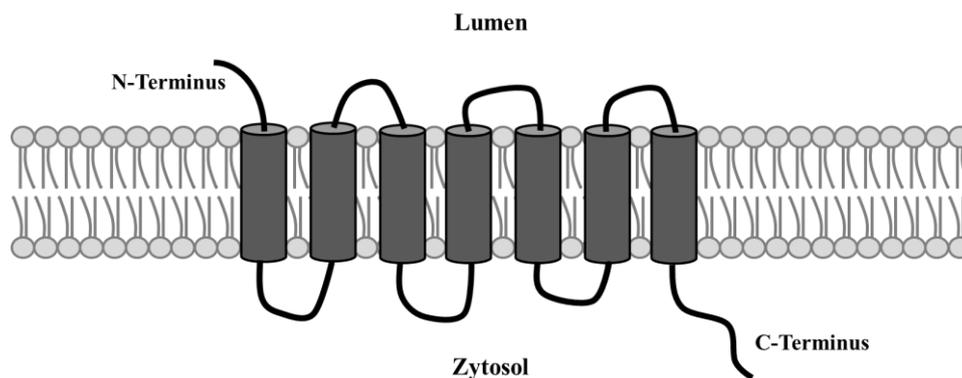


Abbildung 2: Strukturmodell des KDELR: sieben Transmembrandomänen durchspannen die Membran, der N-Terminus befindet sich im Lumen von ER und Golgi, der C-Terminus im Zytosol (erstellt nach Townsley *et al.*, 1993).

Dieses üblicherweise verwendete Modell steht einer alternativen Strukturvorhersage gegenüber, die auf N-Glykosylierungsstudien basiert. Hier wird der Rezeptor mit sechs

Transmembrandomänen dargestellt, wobei sich sowohl N- als auch C-Terminus im Zytosol befinden. Die zweite hydrophobe Domäne durchspannt in diesem Modell die Membran nicht vollständig, sondern liegt auf luminaler Seite eingebettet in der Membran (Singh *et al.*, 1993). KDELRs sind hauptsächlich in der Golgi-Membran sowie der Membran des intermediären Kompartiments lokalisiert (Griffiths *et al.*, 1994). Ihre Aktivierung durch Liganden-Bindung sowie eine durch Überexpression verursachte Autoaktivierung resultieren in einer Umverteilung der Lokalisation zum ER (Hsu *et al.*, 1992; Pulvirenti *et al.*, 2008). Sowohl in Hefen als auch in Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass KDELRs zumindest im Überexpressionssystem in der Plasmamembran co-lokalisieren und die Bindung extrazellulärer Liganden ermöglichen. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass die Präsenz von extrazellulärem KDEL-Cargo zu einer gerichteten Umverteilung der Rezeptor-Lokalisation zur Plasmamembran und einer dortigen Cluster-Bildung führt (Becker *et al.*, 2016; Becker *et al.*, 2016; Henderson *et al.*, 2013).

1.3. Regulierung des intrazellulären Membrantransports durch KDELRs

Das sekretorische System von Eukaryonten gewährleistet den ständigen Austausch von Proteinen und Membrankomponenten zwischen den Organellen einer Zelle sowie die Kommunikation benachbarter Zellen. Das ER repräsentiert dabei das größte Transportorganell, welches im Vergleich zum Golgi ein immenses Membranvolumen bereitstellt (Griffiths *et al.*, 1984). Der anterograde Membrantransport vom ER zum Golgi muss daher durch einen retrograd gerichteten Transport ausgeglichen werden, damit die Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur ermöglicht wird (Martínez-Menárguez *et al.*, 1999; Wieland *et al.*, 1987). Eine strenge Regulierung dieser Transportprozesse ist dementsprechend zum Erhalt der Zellhomöostase entscheidend. Diese Regulierung kann unter anderem durch Signal-Transduktionen erfolgen, woran oftmals G-Proteine und ihre assoziierten Rezeptoren beteiligt sind. GPCRs („G-protein coupled receptors“) stellen die größte Rezeptor-Familie in Säugerzellen dar. Ihre Haupteffektoren repräsentieren heterotrimere G-Proteine, die aus einer α -, β - und γ -Untereinheit bestehen. Die α -Untereinheit ist für die Bindung von Guanin-Nukleotiden verantwortlich. In GDP-gebundener Form interagiert das heterotrimere G-Protein mit seinem entsprechenden Rezeptor, der als Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (GEF, „Guanine nucleotide exchange factor“) agiert. Der Austausch von GDP zu GTP bewirkt eine Dissoziation des G-Proteins in α -GTP und ein β/γ -Dimer, welches nun andere Proteine binden und zur Weiterleitung des Signals aktivieren kann. Nach erfolgter Hydrolyse von GTP an der α -Untereinheit re-assoziert das Heterotrimer und kann für weitere Zyklen der

Signaltransduktion von seinem Rezeptor gebunden werden (Gilman, 1984; Sternweis & Robishaw, 1984).

Die Rückführung ER-residenter Proteine wurde lange Zeit als Hauptfunktion des KDELRs betrachtet. Da eine Δ *erd2*-Deletion in Hefen phänotypisch zu einer Akkumulation intrazellulärer Membranen und einer Inhibierung der Proteinsekretion führt, wurde bereits vermutet, dass die Retentionsfunktion des Rezeptors auch mit der Regulation des anterograden Membrantransports in Verbindung stehen könnte (Semenza *et al.*, 1990). Der schwere Wachstumsdefekt, der das Überleben der Δ *erd2*-Hefemutanten verhindert, kann durch die Überexpression von *SED*-Genen („suppressors of *erd2*-deletion“) kompensiert werden. Eines dieser Gene codiert beispielsweise für den Guanin-Nukleotid Austauschfaktor Sec12p, der die Aktivierung von Sar1p katalysiert und somit maßgeblich an der Regulation des COPII-vermittelten Transports beteiligt ist (Barlowe & Schekman, 1993; Hardwick *et al.*, 1992). Die Kompensation des Wachstumsdefekts erfolgt also wahrscheinlich auf Ebene des intrazellulären Membrantransports, was eine essentielle Beteiligung des KDELRs in diesem Bereich nahelegt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu GPCRs wurde eine vergleichbare Wirkungsweise des KDELRs als Antwort auf das Binden von KDEL-Cargo in Säugerzellen angenommen und bestätigt (Cancino *et al.*, 2014; Giannotta *et al.*, 2012). Hinsichtlich dieser Signalfunktion konnte zunächst gezeigt werden, dass die Liganden-Bindung am KDELR zu einer Phosphorylierung von Golgi-lokalisierten SFKs („Src-family kinases“) und der Aktivierung des intra-Golgi-Transports führt (Pulvirenti *et al.*, 2008). Eine direkte Interaktion des KDELR mit dem Golgi-lokalisierten G-Protein Gq wurde anschließend bestätigt. Die Bindung von KDEL-Cargo führt zu einer KDELR-abhängigen Aktivierung von Gq, wodurch die SFK-Aktivierung und der anterograde Transport vermittelt werden (Giannotta *et al.*, 2012). Analog zu diesem KDELR-Gq-SFK-Signalweg wird durch den anterograden ER zu Golgi-Transport ein weiterer KDELR-abhängiger Signalweg aktiviert. Eine Interaktion des KDELRs mit dem Golgi-lokalisierten G-Protein Gs führt zur Aktivierung einer spezifischen Adenylatzyklase (ADCY9) und cAMP-Signalling, was anschließend in einer Stimulierung von PKA (Protein-Kinase A) resultiert. PKA katalysiert infolgedessen die Phosphorylierung von Proteinen, die den retrograden Transport vom Golgi zum ER regulieren, sodass zu einem Gleichgewicht beider Transportwege beigetragen wird. Zusätzlich aktiviert PKA Transkriptionsfaktoren wie CREB1 („cAMP response element binding protein 1“), was in einer verstärkten Expression von Genen resultiert, die sowohl den retrograden als auch den anterograden Transport im sekretorischen System steuern. Dadurch wird eine längerfristige Kontrolle der Transportwege gewährleistet (Cancino *et al.*, 2014). Eine weitere Komponente

der KDELR-abhängigen Transportregulation stellt das multifunktionelle Protein Prohibitin-1 dar, das hauptsächlich in der inneren Membran von Mitochondrien lokalisiert ist (Nijtmans *et al.*, 2002). In geringer Menge co-lokalisiert Prohibitin-1 in der Golgi-Membran und fungiert dort als direkter Interaktionspartner des KDELR. Seine Abwesenheit verursacht eine Umverteilung der KDELR-Lokalisation zum ER, wodurch die KDELR-abhängige Aktivierung von SFKs verhindert und der anterograde Transport vom Golgi zur Plasmamembran blockiert wird. Prohibitin-1 ist also maßgeblich an der KDELR-SFK-vermittelten Aktivierung des anterograden Transports beteiligt (Giannotta *et al.*, 2015).

In einer eher untypischen Weise für GPCRs reguliert der KDELR den Transportweg vom Golgi zur Plasmamembran zusätzlich durch die Interaktion mit der Golgi-lokalisierten monomeren α -Untereinheit $G\alpha_o$. Diese Interaktion eines GPCRs mit der $G\beta\gamma$ -freien α -Untereinheit eines G-Proteins stellt einen bisher einzigartigen Mechanismus dar. Der KDELR liegt dabei in einem Protein-Komplex mit $G\alpha_o$, den GTPasen Rab1/Rab3 sowie α GDI („GDP dissociation inhibitor“), einem Inhibitor der Rab-Aktivierung vor. Das Binden von KDEL-Cargo am KDELR führt zu einer Aktivierung von $G\alpha_o$, was in der Dissoziation des Rab1/Rab3- α GDI-Komplexes resultiert. Dadurch wird die Aktivierung von Rab1/Rab3 ermöglicht und der anterograde Transport vom Golgi zur Plasmamembran stimuliert. Da bereits bekannt ist, dass aktivierte KDELRs eine Rekrutierung von Transport-relevanten Proteinen vermitteln, wäre auch eine KDELR-abhängige Rekrutierung von Rab-GEFs zur direkten Unterstützung der Rab-Aktivierung möglich (Majoul *et al.*, 2001; Solis *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 1994). In Abbildung 3 ist die Wirkungsweise des KDELRs als GPCR schematisch zusammengefasst.

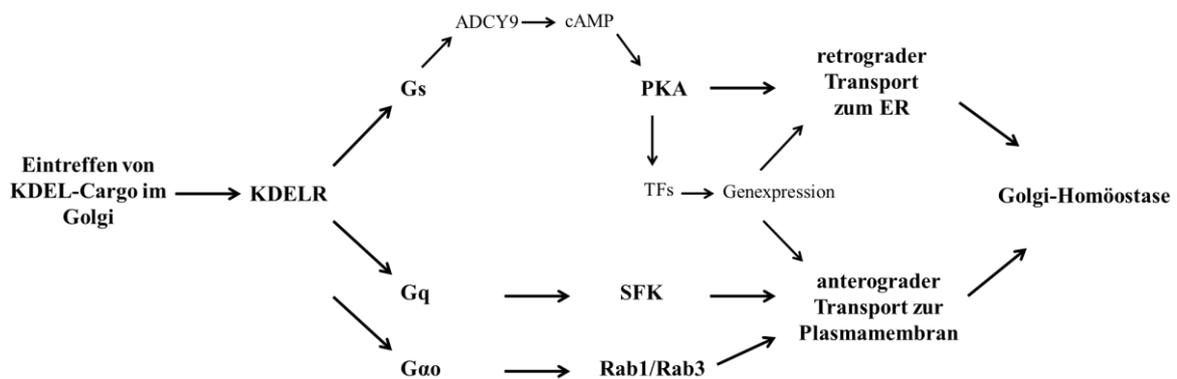


Abbildung 3: Schematische Darstellung der KDELR-vermittelten Signalkaskade zum Erhalt der Golgi-Homöostase: Durch das Eintreffen von KDEL-Cargo im Golgi erfolgt eine Aktivierung des KDELR, der über eine Interaktion mit den G-Proteinen Gs und Gq sowie $G\alpha_o$ verschiedene Signalwege reguliert. Über Gs erfolgt eine Aktivierung von PKA, die eine direkte Phosphorylierung von Komponenten der retrograden Transportmaschinerie katalysiert und durch die Phosphorylierung

von Transkriptionsfaktoren (TFs) die Expression von Genen hochreguliert, welche sowohl am retrograden als auch am anterograden Vesikeltransport beteiligt sind. Die Interaktion mit Gq resultiert in einer direkten SFK-vermittelten Aktivierung von anterograden Transportprozessen, ebenso wie eine Interaktion mit G α_o , die eine Aktivierung von Rab1/Rab3 ermöglicht und somit ebenfalls den anterograden Transport zur Plasmamembran fördert. Durch diese exakte Regulation beider Transportmechanismen wird ein Gleichgewicht des retrograden und anterograden Transports und somit die Aufrechterhaltung der Golgi-Homöostase gewährleistet (erstellt nach Giannotta *et al.*, 2012; Cancino *et al.*, 2014; Solis *et al.*, 2017).

Insgesamt erfolgt die Regulierung der intrazellulären Transportprozesse über komplexe Mechanismen, die durch streng kontrollierte Signalkaskaden miteinander verbunden sind. Der KDELR repräsentiert dabei einen Traffick-Sensor, welcher über die Menge an KDELR-Cargo, die den Golgi erreicht, das Ausmaß der aktuellen Transportlage erfassen kann. Aufgrund der KDELR-abhängigen Aktivierung verschiedener Signalwege wird die Kapazität der retrograden und anterograden Transportprozesse zum Erhalt eines Gleichgewichts an die jeweiligen Bedürfnisse der Zelle angepasst.

1.4. Weitere Funktionen des KDELR

In Zusammenhang mit der Rückführung löslicher ER-residenter Proteine sowie der Regulierung intrazellulärer Transportmechanismen stehen weitere Funktionen des KDELR. So trägt er beispielsweise entscheidend zu einer effektiven Antwort der Zellen auf ER-Stress bei, was auch das Zellschicksal erheblich beeinflussen kann. ER-Stress entsteht durch eine erhöhte Anzahl an fehlerhaft gefalteten Proteinen im ER und führt zur Aktivierung einer Stressantwort (UPR, „unfolded protein response“). In Säugerzellen wird diese Stressantwort durch die Transmembranproteine IRE1, ATF6 und PERK vermittelt, die als Stress-Sensoren agieren und mithilfe ihrer luminalen Domänen die Menge an falsch gefalteten Proteinen im ER erfassen können (Cox *et al.*, 1993; Harding *et al.*, 1999; Haze *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2006). Infolge ihrer Aktivierung werden Signalkaskaden ausgelöst, die zu einer verstärkten Expression von Chaperonen und Proteinen, die an der Protein- und Lipid-Biosynthese beteiligt sind, führen (Cox *et al.*, 1997; Kozutsumi *et al.*, 1988). Dadurch wird die Faltungskapazität des ER der erhöhten Proteinmenge angepasst. Gleichzeitig wird die Proteintranslation vermindert, sodass die Belastung der Faltungsmaschinerie reduziert wird (Harding *et al.*, 2001). Wenn das Gleichgewicht der Zelle durch diese Maßnahmen nicht wiederhergestellt werden kann, werden Autophagie- und Apoptoseprozesse aktiviert, um den Schutz des Gesamtorganismus zu gewährleisten (Bernales *et al.*, 2006; Zinszner *et al.*, 1998). Die Aktivierung der UPR wird mit einigen Krankheitsbildern, wie neurodegenerativen, Krebs- und Stoffwechselerkrankungen assoziiert und stellt einen wichtigen Angriffspunkt für mögliche Behandlungsstrategien dar (Holtz & O'Malley, 2003; Hoozemans *et al.*, 2005; Ma

& Hendershot, 2004; Ozcan *et al.*, 2004). Die Beteiligung des KDELr an der Stressantwort basiert nicht nur indirekt auf der Rückhaltung von ER-Chaperonen an ihrem Wirkungsort, sondern kann beispielsweise durch eine direkte KDELr-abhängige Aktivierung von p38-MAP-Kinasen („p38 mitogen-activated protein kinase“) und JNK1 („c-Jun amino-terminal kinase 1“) erfolgen, welche eine Schlüsselrolle im downstream-Signalling der ER-Stressantwort spielen (Raingeaud *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 2003). Das Expressionslevel des KDELr ist dabei auch für das Ausmaß der Stressantwort entscheidend. Eine Überexpression kann die partielle Redistribution der KDELr-Lokalisation zum Lysosom und infolgedessen eine MEK1/ERK („mitogen extracellular kinase 1“/ „extracellular signal-regulated kinases“-)abhängige Autophagie-Aktivierung auslösen. Da bereits bekannt ist, dass das MEK1/ERK-Signalling über Src-Kinasen gesteuert werden kann und dass der KDELr mit Src-Kinasen interagiert, wird ein KDELr-Src-MEK1/ERK-vermittelter Signalweg vermutet (Cho *et al.*, 2005; Pulvirenti *et al.*, 2008). In Zusammenhang mit dieser KDELr-abhängigen Autophagie-Aktivierung wurde auch gezeigt, dass eine Überexpression von Proteinen, die mit neurodegenerativen Krankheiten assoziiert werden (beispielsweise SOD1, α -Synuclein, Huntingtin), zu einer Hochregulierung der KDELr-mRNA führt. Dementsprechend kann eine Überexpression des KDELr die Menge solcher akkumulierender Proteine, zum Beispiel durch Autophagie-Aktivierung, reduzieren. Die Tatsache, dass ER-Stress ebenfalls das mRNA-Level des KDELr erhöht, steht mit dieser Beobachtung im Einklang (Wang *et al.*, 2011).

In Bezug zu ER-Stressbedingungen steht außerdem eine Beteiligung des KDELr an der Ausbildung von Invadopodia und dem Abbau der Extrazellulären Matrix in Krebszellen. Diese Zellen weisen oftmals eine erhöhte ER-Stressantwort auf, was in einer verstärkten Expression von Chaperonen und damit einer Aktivierung des KDELr resultiert. Die anschließende KDELr1-abhängige Aktivierung der Src-Kinase führt zu einer Phosphorylierung von Cortactin und ASAP1 in den Invadopodia-Bereichen und fördert somit den Abbau der Extrazellulären Matrix, was einen Schlüsselprozess bei der Tumor-Invasion darstellt (Artym *et al.*, 2006; Bharti *et al.*, 2007; Bowden *et al.*, 2006; Ruggiero *et al.*, 2014; Taipale & Keski-Oja, 1997). Eine weitere Beteiligung an der ER-Stressantwort erfolgt über die Interaktion des KDELr mit dem neuroprotektiven Protein MANF („mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor“). Hierbei handelt es sich um einen neurotrophen Faktor, der infolge von ER-Stress sezerniert wird und sich positiv auf das Überleben der neuronalen Zellen auswirkt (Petrova *et al.*, 2003). MANF besitzt eine C-terminale RTDL-Sequenz, die eine Bindung am KDELr und somit eine ER-Retention unter normalen Bedingungen ermöglichen kann. Bei

ER-Stress findet eine erhöhte Expression von Chaperonen statt, deren KDEL-Motive eine stärkere Affinität zum KDELR aufweisen, wodurch die MANF-Sekretion verstärkt wird (Oh-Hashi *et al.*, 2012). Da eine direkte, Ca^{2+} -abhängige Interaktion von MANF mit dem ER-Chaperon BiP nachgewiesen wurde und diese Interaktion entscheidend zur MANF-Retention beiträgt, könnte auch eine indirekte BiP/KDELR-vermittelte Retention vorliegen (Glembotski *et al.*, 2012). Ob das C-terminale RTDL-Motiv notwendig zur ER-Retention ist und wie die genaue Wirkung des sezernierten MANF erfolgt, ist bisher unklar und wahrscheinlich abhängig vom vorliegenden Zelltyp (Mätlik *et al.*, 2015). Eine Studie von Henderson *et al.* konnte jedoch zeigen, dass die MANF-Bindung an der Zelloberfläche der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y von Plasmamembran-lokalisierten KDELRS vermittelt wird und dass die C-terminale RTDL-Sequenz für diesen Prozess entscheidend ist (Henderson *et al.*, 2013). Es wäre also denkbar, dass durch extrazelluläre MANF-Bindung eine KDELR-vermittelte Signalkaskade aktiviert wird, die zu verstärkter Zellprotektion führt.

In T-Zellen trägt der KDELR auch zur negativen Regulierung der Stressantwort bei. Dabei findet eine Interaktion mit der Protein Phosphatase 1 (PP1) statt, die wahrscheinlich an der ersten zytosolischen Loopregion des Rezeptors erfolgt. PP1 repräsentiert einen negativen Regulator der Stressantwort, der die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors eIF2 α vermittelt (Harding *et al.*, 2009). Eine Mutation von KDEL1, welche die Bindung von PP1 verhindert, führt demnach zu einer verstärkten Stressantwort und resultiert in einer erhöhten Apoptoserate (Kamimura *et al.*, 2015). Diese Effekte einer KDELR-Disfunktion können durch ein verstärktes T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signalling kompensiert werden (Kamimura *et al.*, 2016). Zur Ergänzung dieser vielzähligen *in vitro* Studien wurde auch die physiologische Rolle des KDELR durch Charakterisierung einer Mauslinie mit mutiertem *KDEL1*-Gen untersucht. Diese Mäuse zeigen eine Zell-intrinsische Lymphopenie sowie eine erhebliche Reduktion in der Anzahl an B- und NK („natural killer“-)T-Zellen. Die Expression von TCRs in T-Zellen ist ebenfalls deutlich vermindert, wohingegen eine verstärkte CD44-Expression vorliegt. Dementsprechend besitzen die Mäuse eine stark geschwächte Immunantwort auf virale Infektionen (Siggs *et al.*, 2015). Je nach vorliegendem Zelltyp und entsprechender Präsenz spezifischer Interaktionspartner scheinen also auch die Auswirkungen der KDELR-Funktionen beziehungsweise Fehlfunktion variieren zu können.

Die Transportfunktion des KDELR kann von zellfremden Organismen und Proteinen ausgenutzt werden. Das Dengue-Virus interagiert beispielsweise mit KDELRS im ER, um seinen anterograden Transport zum Golgi zu ermöglichen (Li *et al.*, 2015). Einige A/B-Toxine wie das Cholera Toxin, *Pseudomonas*-Exotoxin A und das Hefe-Killertoxin K28

tragen ein KDEL-ähnliches Motiv an einer ihrer Untereinheiten, das jeweils den retrograden Toxintransport durch den Sekretionsweg ermöglicht (Eisfeld *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 1999; Lencer *et al.*, 1995). Im Falle des Hefetoxins K28 vermittelt das C-terminale HDEL-Motiv der β -Untereinheit nicht nur den retrograden Transport vom Golgi zum ER, sondern auch dessen Bindung an der Plasmamembran der Zielzelle sowie die endozytotische Internalisierung. Diese Studien lieferten erstmals Hinweise für eine Lokalisation des KDEL an der Plasmamembran von Hefen und lassen weitere bisher unbekannt Funktionen von Plasmamembran-lokalisierten KDELs vermuten (Becker *et al.*, 2016).

1.5. Ziele der Arbeit

Das sekretorische System in Eukaryonten ermöglicht den Transport von Proteinen und Membrankomponenten zu ihrem Wirkungsort. Dieser Transport erfolgt über spezifische Vesikel und unterliegt strengen Kontrollmechanismen, die das Gleichgewicht der Zelle gewährleisten. Einen wichtigen Bestandteil dieses Kontrollsystems repräsentiert der KDELR, der sowohl für die Retention löslicher ER-residenter Proteine verantwortlich ist, als auch die Regulation des retrograden und anterograden Vesikeltransports vermittelt. In diesem Zusammenhang ist der KDELR auch maßgeblich an der Reaktion der Zelle auf ER-Stressbedingungen beteiligt. Entsprechend dieser Funktionen lokalisiert der KDELR hauptsächlich in den Membranen von Golgi, ER und intermediärem Kompartiment. Neuere Studien geben Hinweise auf eine Co-Lokalisation des Rezeptors in der Plasmamembran, was bisher unbekannte Funktionen des KDELR nach extrazellulärer Ligandenbindung vermuten lässt. In dieser Arbeit sollte daher die Plasmamembran-Lokalisation des KDELR in Hefe- und Säugerzellen mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Zur weiteren Analyse der KDELR-Lokalisation sollte der C-Terminus beziehungsweise das C-terminal lokalisierte Lysin-Cluster bezüglich seiner Funktion als KKXX-ähnliches Retentionssignal in Hefe- und Säugerzellen charakterisiert werden. Da die Analysen zur Rezeptorlokalisierung nur mit getaggtten KDELR-Varianten erfolgen können, sollte zusätzlich die Rolle der Tag-Position innerhalb der Rezeptorsequenz untersucht werden.

Sowohl die Lokalisation als auch die Funktion des KDELR können durch dessen Expressionslevel beeinflusst werden. Eine zusätzliche Expression getaggtter Rezeptorvarianten führt zu einer unnatürlich hohen Anzahl an KDELRs in den verwendeten Säugerzelllinien und kann das Ergebnis der Experimente beeinflussen. Außerdem wird eine Analyse von KDELR-Mutanten durch die Präsenz der endogenen Rezeptoren erschwert. Daher sollten in dieser Arbeit unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Technologie humane Zelllinien mit einem KDELR1-, KDELR2- beziehungsweise KDELR3-KO („knock-out“) generiert werden. Die anschließende Charakterisierung sollte vor allem bezüglich ihrer Retentionsfunktion sowie ihrer Reaktion auf ER-Stress erfolgen. Eine Transkriptomanalyse sollte zusätzliche Hinweise auf die Auswirkungen eines KDELR1-Verlusts geben.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

2.1.1. Bakterien

Tabelle 1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Tabelle 1: Verwendete *Escherichia coli* Stämme, deren Genotyp und Herkunft.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
Top 10	<i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <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</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <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</i> - <i>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</i> + <i>B</i> + <i>lacIq</i> <i>Z</i> Δ <i>M15</i> :: <i>Tn 10</i> + (<i>TetR</i>)	Novagen

2.1.2. Hefen

In Tabelle 2 sind die verwendeten Hefestämme aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme, deren Genotyp und Herkunft.

Hefestamm	Genotyp	Herkunft
BY4742	<i>MAT</i> α <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>lys2</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0	Open Biosystems
YA12	<i>MAT</i> α <i>ade2</i> <i>ade3</i> <i>his3</i> -200 <i>leu2</i> -3,112 <i>ura3</i> - 52 <i>TRP1</i> <i>erd2</i> - <i>Nco</i> mit Plasmid <i>pYA12</i> (<i>2</i> μ <i>URA3</i> <i>ADE3</i> <i>SEC12</i>)	Pelham, Semenza <i>et al.</i> , 1990
Δ <i>end3</i>	<i>MAT</i> α <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>lys2</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 Δ <i>end3</i>	Open Biosystems

2.1.3. Säugerzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Säugerzellen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Säugerzelllinien, deren Eigenschaften und Herkunft.

Zelllinie	Eigenschaften	Herkunft
HeLa ATCC	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	AG Walter
HeLa KDELRL1-KO monoallelisch	HeLa-Zellen mit monoallelischem KDELRL1-KO, hergestellt durch Co-Transfektion mit CRISPR/Cas9 KDELRL1-KO und dem entsprechenden HDR-Plasmid (SantaCruz Biotechnology)	Diese Arbeit
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen	AG Zimmermann
HEK293 KDELRL1-KO monoallelisch	HEK293-Zellen mit monoallelischem KDELRL1-KO, hergestellt durch Co-Transfektion mit CRISPR/Cas9 KDELRL1-KO und dem entsprechenden HDR-Plasmid	Diese Arbeit

	(SantaCruz Biotechnology)	
HEK293 KDEL2-KO	HEK293-Zellen mit GGAGT-Deletion in Exon 3 des KDEL2-Gens auf beiden Allelen, Leserasterverschiebung führt zu Stopp-Codon (TAA) in Exon 3, hergestellt durch Co-Transfektion mit pGS-gRNA2.3-Neo und pcDNA3.3-Cas9-2A-eGFP (GeneScript)	Diese Arbeit
HEK293 KDEL3-KO	HEK293-Zellen mit heteroallelischer „C“-Deletion beziehungsweise „C“-Insertion in Exon 2 des KDEL3-Gens, Leserasterverschiebung führt zu Stopp-Codon in Exon 2 beziehungsweise 3, hergestellt durch Co-Transfektion mit pGS-gRNA3.2-Neo und pcDNA3.3-Cas9-2A-eGFP (GeneScript)	Diese Arbeit
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen, klonale Sublinie von SK-N-SH-Zellen	Sigma-Aldrich
HAP1	Fibroblasten-ähnliche, adhärente, humane Zelllinie, haploid, gewonnen aus der „Male Chronic Myelogenous Leukemia“ (CML)- Zelllinie KBM-7	Horizon
HAP1 KDEL1-KO	HAP1-Zellen mit „T“-Insertion 3 Nukleotide nach Start-Codon, Leserasterverschiebung führt zu einem Stopp-Codon in Exon 2, hergestellt mittels CRISPR/Cas9-KO-Technologie	Horizon

2.2. Kultivierung

2.2.1. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Alle Nährmedien und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit H₂O_{dest.} angesetzt.

2.2.1.1. 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 Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

X-Gal-Stammlösung

X-Gal 20 mg/ml

In Dimethylformamid

Die Lösung wurde im Dunkeln bei -20 °C gelagert.

IPTG-Stammlösung

IPTG 100 mM

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Die Bakterienkulturen wurden in flüssigem LB-Medium in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Plasmid-haltige Bakterien wurden durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin beziehungsweise 25 µg/ml Kanamycin selektiert. Zur Selektion auf LB-Agarplatten wurden zuvor 40 µl der entsprechenden Antibiotikum-Stammlösung mit 160 µl sterilem Wasser ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte in einem 37 °C-Inkubator.

2.2.1.2. 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 (für Platten) 1,5 %

Lösung B:

Ammoniumsulfat 0,5 %

d/o-Mix 0,087 %

Lösung C:

YNB 0,17 %

Die Lösungen A und B wurden getrennt autoklaviert. Lösung C wurde sterilfiltriert und die Lösungen wurden gemischt.

Die Kultivierung der Hefen erfolgte in YPD-Medium beziehungsweise dem entsprechenden d/o-Medium in einem Schüttelinkubator bei 30 °C und 220 rpm. Zur Kultivierung auf Agarplatten wurden die Hefen in einem 30 °C Brutschrank inkubiert.

2.2.1.2. Säugerzellen

Zellkulturmedium

DMEM/IMDM	90 %
Fötale Kälberserum	10 %
Pen/Strep	1,0 %

Das Zellkulturmedium wurde bei 4 °C gelagert.

Zur Kultivierung von Säugerzellen wurde „Dulbecco´s Modified Eagle Medium“ (DMEM), beziehungsweise „Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium“ (IMDM) verwendet, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt wurde. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank (HeraCell150, Thermo Scientific) bei 37 °C und 5 % CO₂ in beschichteten 25 cm² beziehungsweise 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner bio-one). Zur Passagierung konfluenter Zellen wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der adhärenente Zellrasen mit 1 x PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 x Trypsin/EDTA und anschließender Inkubation im Brutschrank, deren Dauer je nach Zelllinie zwischen 2 min und 5 min variierte. Die Reaktion wurde durch Zugabe des FCS-haltigen Zellkulturmediums abgestoppt, die Zellen resuspendiert und entsprechend der gewünschten Splitrate wurde ein Teil der Zellsuspension in eine Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

2.2.2. Kryokulturen

2.2.2.1. Bakterien und Hefen

Zur Herstellung einer Kryokultur wurden 1 ml einer Übernachtskultur mit 1 ml sterilem Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.2. Einfrieren von Säugerzellen

Einfriermedium:

FCS	60 %
DMSO	20 %
DMEM/IMDM	20 %

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden konfluente Zellen mit 1 x PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 x Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Resuspension in Zellkulturmedium wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und die Zellsuspension wurde 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet in 900 µl DMEM beziehungsweise IMDM je 2x10⁶ Zellen resuspendiert. Nach langsamer Zugabe von Einfriermedium im Verhältnis 1:1 wurden 1,8 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt. Durch Verwendung einer Einfrierbox (CryoSave™, Scienceware) wurde ein schonendes Herabkühlen der Zellen bei -80 °C für 24 h gewährleistet, bevor die langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff erfolgte.

2.2.2.3. Auftauen von Säugerzellen

Zum Auftauen wurden die Kryokulturen in einem 37 °C Wasserbad inkubiert und anschließend in ein 15 ml Falcon mit 3,2 ml Zellkulturmedium gegeben. Nach 5 min Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension in eine 25 cm² Zellkulturflasche zur anschließenden Kultivierung im Brutschrank überführt.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Plasmide

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Plasmide, deren Eigenschaften und Herkunft.

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pSTBlue1	Erlaubt Klonierung eines Taq-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 Klonierung eines Taq-amplifizierten PCR-Produkts, 2µ „origin of replication“, <i>GALI</i> - Promotor	Invitrogen
pRS315	CEN6, ARSH4, <i>LEU2</i> -Marker, ori, f1 origin, lacZ, <i>Amp^R</i> -Gen	Sikorski & Hieter, 1989
pRS316	“shuttle”-Vektor mit “yeast centromer	Sikorski & Hieter,

	sequence”(CEN), “autonomously replicating sequence” (ARS), <i>URA3</i> - und <i>Amp^R</i> -Gen	1989
pESC-LEU	“shuttle”-Vektor mit 2μ “origin of replication”, <i>LEU2</i> - und <i>Amp^R</i> -Gen, GAL1- oder GAL10-Promotor	Straragene
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	Blum, 2012
pRS315 Erd2	pRS315 mit <i>ERD2</i> -Gen	Dausend, 2010
pRS316 Erd2-V5	pRS316 mit V5-getaggtm <i>ERD2</i> -Gen	Blum, 2012
pESC-LEU Erd2	pESC-LEU mit <i>ERD2</i> -Gen	Dausend, 2010
pRS315 KDELRL1-AS	pRS315 zur Expression der alternativen KDELRL1-Spleißvariante	Diese Arbeit
pJC104-UPRE-LacZ	pJC104 mit pPGK Promotor, <i>URA3</i> -Gen, <i>Amp^R</i> -Gen, <i>lacZ</i> -Gen unter der Kontrolle eines UPRE-Elementes	Cox & Walter, 1996
pYES Can1mCh	pYES2.1/V5-His-TOPO mit mCherry-getaggtm <i>CAN1</i> -Gen, einkloniert über <i>XhoI/BamHI</i>	Lauer, 2016
pYES Can1mCh-KKAA	pYES2.1/V5-His-TOPO mit mCherry-getaggtm <i>CAN1</i> -Gen und angefügter KKAA-Sequenz	Lauer, 2016
pYES Can1mCh-Erd2Cterm	pYES2.1/V5-His-TOPO mit mCherry-getaggtm <i>CAN1</i> -Gen und angefügter <i>ERD2</i> -Gensequenz (C-Terminus)	Lauer, 2016
pYES Can1mCh-ErdCterm ^{4K/A}	pYES2.1/V5-His-TOPO mit mCherry-getaggtm <i>CAN1</i> -Gen und angefügter <i>ERD2</i> -Gensequenz mit Substitution der vier C-terminalen Lysinreste zu Alanin	Lauer, 2016
pcDNA3.1 GLUT1mCh	pcDNA3.1 mit mCherry-getaggtm <i>GLUT1</i> -Gen, einkloniert über <i>HindIII/BamHI</i>	Rebecchi, 2018
pcDNA3.1 GLUT1mCh-KKAA	pcDNA3.1 mit mCherry-getaggtm <i>GLUT1</i> -Gen und angefügter KKAA-Gensequenz, einkloniert über <i>HindIII/BamHI</i>	Rebecchi, 2018
pcDNA3.1 GLUT1mCh-Erd21Cterm	pcDNA3.1 mit mCherry-getaggtm <i>GLUT1</i> -Gen und angefügter <i>ERD21</i> -Gensequenz (C-Terminus), einkloniert über <i>HindIII/BamHI</i>	Rebecchi, 2018
pcDNA3.1 GLUT1mCh-Erd21Cterm ^{4K/A}	pcDNA3.1 mit mCherry-getaggtm <i>GLUT1</i> -Gen und angefügter <i>ERD21</i> -Gensequenz (C-Terminus) mit Substitution der Lysinreste zu Alanin, einkloniert über <i>HindIII/BamHI</i>	Rebecchi, 2018
pcR259 ER-GFP-KDEL	pcR259 (CMV-Promotor, <i>Amp^R</i> -Gen) zur Expression von GFP mit einem Signalpeptid zur ER-Lokalisation und C-terminaler KDEL-Sequenz	AG Rettig
pcDNA3.3-Cas9-2A-eGFP	pcDNA3.3 zur Expression von humanem Cas9, gekoppelt an eGFP über 2A-Peptid, <i>Amp^R</i> -Gen, pUC ori, CMV-Promotor	GeneScript
pGS-gRNA1.1-Neo	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA1.1 (GGGTGAAGTCATGATTGACC), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	GeneScript
pGS-gRNA1.2-	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA1.2	GeneScript

Neo	(GGTCGAAGAAGCCCTCGAAA), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	
pGS-gRNA1.3-Neo	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA1.3 (GATCTGGCGCTACCATTTCG), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	GeneScript
pGS-gRNA2.1-Neo	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA2.1 (GGATGACGATGGCCGCCAGG), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	GeneScript
pGS-gRNA2.2-Neo	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA2.2 (GATGACGATGGCCGCCAGGT), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	GeneScript
pGS-gRNA2.3-Neo	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA2.3 (GGACCACCAGAACTCCACT), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	GeneScript
pGS-gRNA3.1-Neo	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA3.1 (GCAGCAAGATCATGGCCAGG), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	GeneScript
pGS-gRNA3.2-Neo	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA3.2 (GAACAGGTCCAGGTACCTGG), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	GeneScript
pGS-gRNA3.3-Neo	pGS-gRNA-Neo zur Expression von gRNA3.3 (GGACCAGAAGAACTCCAGG), <i>Amp^R</i> -Gen, <i>Neo^R</i> -Gen, U6-Promotor	GeneScript
CRISPR/Cas9 KDELRL1-KO Plasmid	Plasmid zur Expression einer KDELRL1-gRNA unter Kontrolle eines U6-Promotors bei gleichzeitiger Expression von Cas9, gekoppelt an eGFP über ein 2A-Peptid unter Kontrolle eines CMV-Promotors, <i>Amp^R</i> -Gen	SantaCruz Biotechnology
HDR-Plasmid (KDELRL1)	Homology-directed repair-Plasmid zur Insertion von RFP und Puromycin ^R an der Stelle des möglichen Doppelstrangbruches im <i>KDELRL1</i> -Gen, EF1a-Promotor, LoxP recombination sites	SantaCruz Biotechnology
pcDNA3.1 KDELRL1mCherry	pcDNA3.1 zur Expression einer KDELRL1-Varainte mit C-terminaler mCherry-Fusion	Rammo, 2012
pcDNA3.1 KDELRL1-D-HA-G	pcDNA3.1 zur Expression einer KDELRL1-Variante mit HA-Tag im zytosolischen Loop3 zwischen den Aminosäuren D87 und G88	Diese Arbeit

2.3.2. Oligonukleotide

Tabelle 5 zeigt die zur PCR verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 5: Verwendete Primer, deren Sequenz und Amplifikat.

Primer	Sequenz	Amplifikat
5'Erd21	GAGCTCGAATTCATGAATCTCTTCCGATTCC TGGGAGAC	KDELRL1 cDNA
3'Erd21	GGATCCGTCGACCTATGCCGGCAAACCTCAA CTTCTTCC	KDELRL1 cDNA
5'Erd22	GAGCTCGAATTCATGAACATTTCCGGCTG	KDELRL2 cDNA

	ACTGGG	
3'Erd22	GGATCCGTCGACTTATGCTGGCAAACCTGAGCTTCTTTCC	KDEL2 cDNA
5'Erd23	GAGCTCGAATTCATGAACGTGTTCCGAATCCTCGG	KDEL3 cDNA
3'Erd23	GGATCCGTCGACTCAGATTGGCATTGGAAGACTTAACTTCTTTC	KDEL3 cDNA
5' RT-PCR-HAC1	CTGGCTGACCACGAAGACGC	HAC1 cDNA
3' RT-PCR-HAC1	TTGTCTTCATGAAGTGATGA	HAC1 cDNA
5' RT-PCR-ACT	ATTCTGAGGTTGCTGCTTTG	β-Actin cDNA
3' RT-PCR-ACT	GTGGTGAACGATAGATGGAC	β-Actin cDNA
Oligo-dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	mRNA zur cDNA Synthese
5'Xho-Can1	CTCGAGATGACAAATTCAAAGAAGAACGC CGAC	Can1-mCh-KKAA Can1-mCh-Erd2 Can1-mCh-Erd2 ^{4K/A}
3'mCherry-KKXX	GGATCCGTCGACTTAAGCAGCCTTCTTCTTG TACAGCTCGTCCATGCCG	Can1-mCh-KKAA
3'mCherry-Erd2	GGATCCGTCGACTTATTTTGGCAGTTTGAAA CCCTTTCCTCTGATGACTTTAGTCTTGTACA GCTCGTCCATGCCG	Can1-mCh-Erd2
3'mCherry-Erd2 ^{4K/A}	GGATCCGTCGACTTAAGCTGGCAGAGCGAA ACCAGCTCCTCTGATGACAGCAGTCTTGTAC AGCTCGTCCATGCCG	Can1-mCh-Erd2 ^{4K/A}
5'KpnIHindIII-GLUT1	GGTACCAAGCTTATGGAGCCCAGCAGCAAG AAGC	GLUT1-mCh-KKAA GLUT1-mCh-Erd21Cterm GLUT1-mCh-Erd21Cterm ^{4K/A}
3'BamNot-mCherry-KKAA	GCGGCCGCGGATCCTCAGGCGGCCTTCTTCT TGTACAGCTCGTCCATGCCG	GLUT1-mCh-KKAA
3'BamNot-mCherry-Erd21Cterm	GCGGCCGCGGATCCTCATGCCGGCAAACCTC AACTTCTTCCCCTTTAGGACTTTGGTCTTGT ACAGCTCGTCCATGCCG	GLUT1-mCh-Erd21Cterm
3'BamNot-mCherry-Erd21Cterm ^{4K/A}	GCGGCCGCGGATCCTCATGCCGGCAAACCTC AAGGCGGCCCGGCTAGGACGGCGGTCTTG TACAGCTCGTCCATGCCG	GLUT1-mCh-Erd21Cterm ^{4K/A}
5'KDEL1-ex3	CCCCCTCCTCAGGTGGTCTACATAGCCTGCT CCTTACCA	KDEL1, Exon 3
3'KDEL1-ex3	ACTGAACTTATGCATCCTAAAATAAGGCAG TTTGGGCACA	KDEL1, Exon 3
5'KDEL1-ex4	TGGACCTTCTCCATCTACCTGGAGTCAGTGG CCATCTTGC	KDEL1, Exon 4
3'KDEL1-ex4	CCCAGTCCCCAGGGAGGGCAGGAGCTGCAG AAATAGGAGG	KDEL1, Exon 4

5'KDEL2-ex3	GTAGGTTATCTACCTTGCCTGCTCCTATGCC ACAGTGTAC	KDEL2, Exon 3
3'KDEL2-ex3	CATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTG	KDEL2, Exon 3
5'KDEL3-ex1	ATGAACGTGTTCCGAATCCTCGGCG	KDEL3, Exon 1
3'KDEL3-ex1	CCGGAGTCCCCACCCTGAGCAGACACCTGG A	KDEL3, Exon 1
5'KDEL3-ex2	TGTCTACCCTTGGCCACAGGCATCTCTGGGA	KDEL3, Exon 2
3'KDEL3-ex2	TGTCCTCATTTTTGCACGAGGACACTGACAT ACAAAGA	KDEL3, Exon 2
5'KDEL3-ex3	TTAGGTGGTTTTTCTCCTCTGTGCCTATGTT ACAGTGTAC	KDEL3, Exon 3
3'KDEL3-ex3	TACATGAGTAATGGTCACAGTTGTAAGCAG AAGGCAAGCC	KDEL3, Exon 3
5'qPCR-GAPDH	TTCGACAGTCAGCCGCATCT	GAPDH, qPCR
3'qPCR-GAPDH	GCCCAATACGACCAAATCCGTT	GAPDH, qPCR
5'qPCR-β-Actin	TGCGTGACATTAAGGAGAAG	β-Actin, qPCR
3'qPCR-β-Actin	GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT	β-Actin, qPCR
5'qPCR- KDEL1	CACAGCCATTCTGGCGTTCCTG	KDEL1, Exon 3,4-spanned, qPCR
3'qPCR- KDEL1	CCATGAACAGCTGCGGCAAGAT	KDEL1, Exon 3,4-spanned, qPCR
5'qPCR- KDEL2	CTGGTCTTCACAACTCGTTACCTGGATC	KDEL2, Exon 2,3-spanned, qPCR
3'qPCR- KDEL2	CAGGTAGATCAGGTACACTGTGGCATAGG	KDEL2, Exon 2,3-spanned, qPCR
5'qPCR- KDEL3	CTTCTGGTCCCAGTCATTGGCCT	KDEL3, Exon 3,4-spanned, qPCR
3'qPCR- KDEL3	GGGGCAGGATAGCCACTGATTCC	KDEL3, Exon 3,4-spanned, qPCR

2.3.3. DNA Isolierung

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 %

Der pH-Wert wurde mit KOH-Plätzchen auf 4,8 eingestellt.

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde die alkalische Lyse verwendet (Bimboim & Doly, 1979). Dazu wurden 1,5 ml einer frischen Übernachtskultur 20 s in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung und Invertieren erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 5 min. Anschließend wurden 150 µl KAc-Lösung zugegeben und 3 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 800 µl Ethanol zugegeben und erneut 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem H₂O resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.3.3.2. Mini Prep

Durch Verwendung des Plasmid Miniprep Kits „innuPrep“ (Analytik Jena) wurde Plasmid-DNA aus Bakterien isoliert und über eine Säule mit Silikamembran aufgereinigt, um hochreine Plasmid-DNA zu erhalten. Die Präparation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die gewonnene DNA bei -20 °C gelagert.

2.3.3.3. Midi Prep

Durch Verwendung des GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kits (Sigma) konnten größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA aus Bakterien isoliert werden. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers und die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.3.4. Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen

Zur Gewinnung genomischer DNA wurden 10 µl Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und nach kurzer Zentrifugation bei 13.000 rpm mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden in sterilem H₂O aufgenommen und durch Lagerung bei -80 °C aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde zur Amplifikation der genomischen DNA verwendet.

2.3.3. RNA-Isolierung aus Säugerzellen

Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in einer der Zellzahl angepassten Menge TRIzol® Reagent (life technologies) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben und durch Schütteln gemischt. Nach

erneuter Inkubation bei RT für 2 min wurde 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die flüssige obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Anschließend wurden 10 min bei RT inkubiert und 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet 5 bis 10 min an der Luft getrocknet und in 20 bis 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert wurde, erfolgte ein Inkubationsschritt bei 55 °C im Heizblock von 10 bis 15 min. Die RNA wurde bei -70 °C gelagert.

Zur Gewinnung hochreiner RNA wurde das Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.4. cDNA-Synthese

Die Herstellung von cDNA erfolgte durch reverse Transkription der isolierten RNA. Dazu wurden zunächst folgende Komponenten gemischt:

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

Der Ansatz wurde 5 min bei 70 °C und anschließend weitere 5 min auf Eis inkubiert. Zur Durchführung der reversen Transkription wurden dann die folgenden Enzyme und der entsprechende Reaktionspuffer zugegeben:

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

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler bei folgendem Programm:

40 °C	1 h
70 °C	15 min
4 °C	∞

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

2.3.5.1. Nano Drop

Zur Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen wurde der NanoDrop 2000c (PEQLAB Biotechnologie) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.5.2. Qubit

Die exakte Bestimmung geringer DNA-Konzentrationen erfolgte in einem Qubit Fluorometer unter Verwendung des „High Sensitivity Kits“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

2.3.6. Restriktion von Plasmid-DNA

Zum Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Thermo Scientific beziehungsweise Roche verwendet. Der Standard-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Restriktionspuffer	2,0 µl
Restriktionsenzym I	0,4 µl
Restriktionsenzym II	0,4 µl
RNAse A	0,1 µl
DNA	1,5 µl
H ₂ O steril	ad 20 µl

Je nach Enzymkombination wurden der entsprechende Puffer und die jeweilige Menge an Enzymen den Herstellerangaben entnommen. Der Ansatz wurde etwa 2 h bei 37 °C inkubiert und zur Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.7. 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 %

Zur Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Dabei wurden 1 %ige beziehungsweise 2 %ige Agarosegele verwendet, wobei die entsprechende Menge an Agarose durch Aufkochen in 1 x TBE gelöst wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei 160 V und 400 mA unter Verwendung von 1 x TBE als Elektrophoresepuffer. Die Proben wurden zuvor mit 20 % GLB versetzt. Zur Färbung der DNA Fragmente wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (2,5 µg/ml) inkubiert. Die Analyse erfolgte durch das „ChemiDoc XRS system“ und die Software „Quantity One 4.6.2“ der Firma Biorad.

2.3.8. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Reisolierung von DNA aus Agarosegelen wurde unter Verwendung des „E.N.Z.A. gel extraction kits“ (Omega) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.9. Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten, die zuvor mit kompatiblen Restriktionsenzymen behandelt wurden, wurden die T4-DNA-Ligase und der entsprechende Puffer der Firma Thermo Scientific verwendet. Die zu ligierenden DNA Fragmente wurden nach Auftrennung im Agarosegel und Reisolierung in etwa gleichem Verhältnis in einem Gesamtvolumen von 17 µl gemischt und es wurden 2 µl Puffer sowie 1 µl Ligase zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und zur Reduktion des Salzgehaltes 1 h gegen 10 %iges Glycerin dialysiert (0,025 µm Dialysefilter, Millipore). Anschließend konnte der dialysierte Ligationsansatz zur Elektroporation verwendet werden.

2.3.10. Transformationsmethoden

2.3.10.1. Bakterien

SOC Medium

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

Magnesiumchlorid	10 mM
Magnesiumsulfat	2,5 mM

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen von *E. coli* wurde LB Medium 1 %ig mit einer frischen Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD von etwa 0,7 kultiviert. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10 % sterilem Glycerin wurde das Zellpellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 min bei 8.000 rpm und 4 °C. Anschließend wurde das Pellet in etwa gleichem Volumen 10 % Glycerin resuspendiert, zu 40 µl aliquotiert und die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden 40 µl der Zellen mit etwa 100 ng Plasmid-DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette (Biorad) gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des „GenePulser Xcell™“ (Biorad) bei 200 Ω, 2,5 kV/cm und 2,5 µF. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Der Ansatz wurde auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

2.3.10.2. Hefen

TE-Puffer (10 x)

Tris-HCl, pH 7,5	100 mM
Na ₂ EDTA	10 mM

Lithiumacetat (10 x)

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

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

PEG-Lösung (50 %)

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

Lithiumacetat-TE-Lösung

10 x TE-Puffer	10 %
10 x Lithiumacetat	10 %

H ₂ O steril	80 %
-------------------------	------

PEG-Lösung

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

Zur Hefetransformation wurde 1 ml einer Übernachtskultur 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 500 µl Lithiumacetat-TE-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl Lithiumacetat-TE-Lösung resuspendiert und es wurden 10 µl Carrier-DNA, 200-300 ng Plasmid-DNA und 3 µl 10 x Lithiumacetat gemischt und zu den Zellen gegeben. Nach Zugabe von 600 µl PEG-Lösung wurde der Ansatz 30 min bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C und ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13.000 rpm. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl 1 x TE-Puffer gewaschen, in 500 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen und auf einer entsprechenden d/o-Platte ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C im Brutschrank für mehrere Tage.

2.3.10.3. Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte unter Verwendung des „FuGENE[®] HD Transfection Reagent“ (Promega) nach Angaben des Herstellers.

2.3.11. Polymerasekettenreaktion

2.3.11.1. Standard-PCR

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde das „FastStart High Fidelity PCR System“ (ROCHE) mit folgendem Reaktionsansatz verwendet:

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 steril	ad 50 µl

Die PCR erfolgte im Thermocycler „Mastercycler“ (Eppendorf) nach folgendem Programm:

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 PCR-Ansatz und das Programm wurden je nach Länge des Amplifikats oder Eigenschaften der Primer angepasst. Der Erfolg der Amplifikation wurde im Agarosegel überprüft.

Bei Verwendung genomischer DNA als Template wurde das „Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase“-Kit (Thermo Scientific) mit folgendem Standardansatz eingesetzt:

HF Puffer	10 µl
Primer forward (10 mM)	1,5 µl
Primer reverse (10 mM)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
Polymerase	0,25 µl
genomische DNA	200-300 ng
H ₂ O steril	ad 50 µl

Folgendes Programm wurde im Thermocycler zur Reaktion verwendet:

98 °C	3 min	
95 °C	20 s	} 50 Zyklen
72 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Die Menge an genomischer DNA sowie die Annealing-Temperatur des PCR-Programms wurden bei jeder Reaktion angepasst und der Erfolg der Reaktion wurde im Agarosegel überprüft.

Zur direkten Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.11.2. qPCR

Zur quantitativen PCR wurde der „5 x Hot-Start-Taq² qPCR *EvaGreen*® Mix“ (Axon) in folgendem Ansatz verwendet:

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

Die PCR erfolgte in einem „CFX Connect™ Real-Time System“ (Biorad) unter Verwendung der Analyse-Software „CFX Manager 3.1“ (Biorad) mit folgendem Programm:

95 °C	12 min	
95 °C	15 s	} 40 Zyklen
60 °C	20 s	
72 °C	20 s	
65 °C	5 s	
95 °C	5 s	

Die Annealing Temperatur wurde je nach Primer angepasst und die notwendige Primermenge wurde zuvor für jeden Primer analysiert. Dazu wurden PCR-Ansätze mit einer cDNA-Verdünnungsreihe (1:10, 1:100 und 1:1000) durchgeführt und anhand der gemessenen Ct-Werte eine Gerade erstellt. Mit Hilfe der Steigung (m) der Geraden wurde die Effizienz $E=10^{(-1/m)}$ errechnet, die etwa 2,0 entsprechen sollte, sodass in etwa eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus gewährleistet wird. Die Menge an Primer wurde dann variiert, bis für jeden Primer eine zufriedenstellende Effizienz ($2,0 \pm 0,2$) bestimmt werden konnte.

Für die quantitative Analyse wurden jeweils drei biologische Replikate der Proben und zwei bis drei technische Replikate des PCR-Ansatzes analysiert. Die Werte wurden auf ein Haushaltsgen (β -Actin oder GAPDH) normiert (ΔCt) und, wenn erwünscht, auf den entsprechenden Wildtyp ($\Delta\Delta Ct$). Zur Bestimmung des „fold change“ wurde die Effizienz der

jeweiligen Primer mit den entsprechenden $\Delta\Delta C_t$ -Werten potenziert und der Logarithmus des erhaltenen Werts gebildet.

2.3.12. AccepTor™-Cloning

Zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten in den Vektor pST-Blue wurde das „AccepTor™-Cloning“-Kit (Novagen) verwendet. Dabei wurden 0,5 µl Vektor, 2 µl des reisolierten PCR-Produkts und 2,5 µl Ligations-Premix vorsichtig gemischt und 1 h bei 16 °C inkubiert. 1 µl des Ansatzes wurde anschließend zu auf Eis aufgetauten „NovaBlue Single“-Zellen gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 s in einem Wasserbad bei 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen 30 min bei 37 °C und 220 rpm inkubiert und anschließend auf einer LB-Platte ausplattiert, die zuvor mit 20 µl Kanamycin-Stammlösung, 40 µl X-Gal-Stammlösung, 20 µl IPTG-Stammlösung und 120 µl sterilem H₂O versehen wurde. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank über Nacht. Ein Auftreten von weißen Klonen deutet auf die erfolgreiche Insertion des PCR-Produkts hin, während die Entstehung von blauen Kolonien auf ein intaktes β -Galaktosidase-Gen und somit keine erfolgreiche Insertion des PCR-Produkts schließen lässt.

2.3.13. pYES2.1 TOPO® TA-Cloning

Die Verwendung des „pYES2.1 TOPO® TA-Cloning“ Kits (Invitrogen) ermöglicht eine direkte Klonierung von PCR-Produkten mit Adenosin-Überhängen in den Hefe-Expressionsvektor pYES. Die Ligation sowie die nachfolgende Transformation chemisch kompetenter TOP10 F' Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Zellaufschlussmethoden

2.4.1.1. Zellaufschluss von Hefezellen

Proteaseinhibitor-Stammlösung

Eine Tablette des „protease inhibitor cocktail with EDTA“ (Roche) wurde jeweils in 2 ml sterilem H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

SUMEB-Puffer

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

MOPS wurde sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren dazu gegeben.

Zum Aufschluss wurden 5 ml einer frischen *S. cerevisiae* Übernachtskultur 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und einmal mit sterilem H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl SUMEB-Puffer mit 10 % Proteaseinhibitor-Stammlösung resuspendiert und es wurden etwa 0,15 g Glasperlen zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Homogenisator (Precellys[®] Evolution) nach folgendem Programm:

6000 rpm	20 s	} 3-fache Wiederholung
Pause	30 s	

Der Ansatz wurde 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, 5 min bei 70 °C inkubiert und der Überstand wurde zur SDS-PAGE eingesetzt.

Bei der Durchführung des Zellaufschlusses zum Nachweis der Expression eines Hac1p-abhängigen Reportergens wurde das Zellpellet mit 1 x PBS gewaschen und in 1 x PBS mit 10 % Proteaseinhibitor-Stammlösung im Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und es wurden 6 µl X-Gal-Lösung (62 µg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde an einem Drehrad für 30 min bei 30 °C inkubiert und die erfolgte Farbreaktion fotografisch dokumentiert.

2.4.1.2. Zellaufschluss von Säugerzellen

IP-Puffer

Tris-HCl, pH 7,8	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
Nonidet P-40	1,0 %
Benzamidin	10 mM

N-Ethylmaleimid	5,0 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1,0 mM

Der Puffer wurde vor dem Gebrauch mit 10 % Proteaseinhibitor-Stammlösung versetzt.

Die adhärenen Zellen wurden einmal mit 1 x PBS gewaschen und es wurde je nach Zellzahl ein möglichst geringes Volumen an IP-Puffer zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschale abgeschabt und die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 10 min Inkubation auf Eis und mehrmaligem Vortexen wurde 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 70 °C inkubiert, bevor der Ansatz zur SDS-PAGE verwendet wurde.

2.4.2. Gewinnung von Proteinproben aus Zellkulturüberstand

Zur Analyse der Proteinsekretion in KDEL-R-KO-Mutanten wurde das Verhältnis an KDEL-tragenden Proteinen im Zellkulturmedium der Mutanten zum Wildtyp verglichen. Dazu wurde jeweils die gleiche Zellzahl ausgesät und 24 h in Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 24 h in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Das Medium wurde abgenommen, 48 h bei 4 °C gegen 1 x PBS dialysiert (Dialyseschlauch: ZelluTrans T2, Ausschlussgrenze 5 kDa, Roth) und durch Zentrifugation mittels Vivaspin20 (Ausschlussgrenze 5 kDa, Sartorius) auf etwa 500 µl eingengt. Anschließend wurde der Gesamtproteingehalt ermittelt, von jeder Probe die gleiche Proteinmenge mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte entweder im Nanodrop 2000c (PEQLAB) oder unter Verwendung des „PierceTM BCA Protein Assay Kits“ (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben.

2.4.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tris-HCl/SDS

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

3 x 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	

Bei Verwendung von reduzierendem Probenpuffer wurden 5 % Mercaptoethanol zugegeben.

5 x Anodenpuffer

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

5 x Kathodenpuffer

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

Zur SDS-PAGE wurden 10 %ige Tris/Tricin-Gele, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, nach folgendem Ansatz hergestellt:

Trenngel

Rotiophoresegel 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

Rotiophoresegel 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

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit 2-Propanol beschichtet. Nach der Auspolymerisierung wurde das 2-Propanol abgenommen und das Sammelgel gegossen.

Die vorbereiteten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und mit Hilfe des „Mini-Protean II“ Systems (Biorad) zunächst bei 80 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach etwa 15 min wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Zum Größenvergleich wurden 7 µl Marker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific) auf jedes Gel aufgetragen.

2.4.5. Western Blot-Analyse

Transferpuffer

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

10 x TBS

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

Waschpuffer

10 x TBS	10 %
Tween20	0,05 %

Blocking-Puffer

Magermilch/BSA	5,0 % / 3,0 %
In Waschpuffer	

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels „Semi-dry-blotting“ elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roche) übertragen. Dazu wurde die Membran zuerst 2 min in Methanol und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Die verwendeten Filterpapiere (3 mm, Biorad) sowie das SDS-Gel wurden ebenfalls etwa 10 min in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte in einer „Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell“ (Biorad) für 90 min bei 50 mA pro Gel, wobei die Spannung auf 15 V begrenzt und die Filterpapiere jeweils zwischen Membran beziehungsweise SDS-Gel und die Elektroden gelegt wurden. Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht

bei 4 °C in Blocking-Puffer inkubiert. Die Bindung des in Blocking-Puffer verdünnten primären Antikörpers erfolgte für 1 h bei 20 °C. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen und 1 h bei 20 °C mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der ebenfalls in Blocking-Puffer verdünnt wurde. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung des „SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ Kits (Thermo Scientific), die mit Hilfe des „Amersham Imager 600“ (GE Healthcare) dokumentiert wurde.

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper, deren Verdünnung und Herkunft

Antikörper (Organismus)	Verdünnung	Herkunft
Anti-V5 (Maus)	1:1000	Biorad
Anti-HA (Ratte)	1:1000 (WB), 1:500 (IF)	Roche
Anti-Pdi1 (Maus)	1:1000	abcam
Anti-β-Actin	1:1000	abcam
Anti-Kar2p (Kaninchen)	1:10000	R. Scheckman
Anti-Rpn12 (Kaninchen)	1:2000	AG Römisch
Anti-Maus-HRP	1:10000	Sigma
Anti-Kaninchen-HRP	1:10000	Sigma
Anti-Ratte-FITC	1:100	Sigma
Anti-Ratte-Gold (10 nm)	1:100	Sigma

2.5. Hefespezifische Methoden

2.5.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die optische Dichte der Hefekultur ermittelt. Dazu wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm die Extinktion in einem Spektrometer („Ultrospec 2100 pro“, Amersham Bioscience) bestimmt und davon ausgehend die Zellzahl errechnet.

2.5.2. FOA-Selektion

5-FOA d/o-Medium

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

Die Herstellung von 5-FOA-Agar mit einer 5-FOA-Endkonzentration von 0,1 % erfolgte durch Mischen einer sterilfiltrierten 0,2 %igen 5-FOA-Stammlösung mit dem entsprechenden doppelt konzentrierten d/o-Medium im Verhältnis 1:1.

Zur FOA-Selektion wurde der Hefestamm YA12 verwendet, der keine funktionelle *ERD2*-Variante exprimiert. Der Wachstumsdefekt dieser $\Delta erd2$ Mutante wird durch die Überexpression von *SEC12* durch ein *URA3*-tragendes Plasmid kompensiert. Der YA12-Stamm wurde zur Selektion mit einem Plasmid mit *LEU2*-Marker und der zu testenden *ERD2*-Variante transformiert, auf die FOA-Platten getropft und etwa 5 d bei 30 °C inkubiert. Da das Genprodukt von *URA3* die Umsetzung von 5-FOA zu toxischem 5-Fluoracil katalysiert, können auf FOA-haltigem Medium nur Hefen überleben, die das *URA3*-Plasmid eliminieren. Da mit diesem Verlust auch die Kompensation der $\Delta erd2$ Mutation durch *SEC12*-Überexpression verloren geht, können nur solche Hefen wachsen, die eine funktionelle *ERD2*-Variante über das *LEU2*-Plasmid exprimieren.

2.6. Säugerspezifische Methoden

2.6.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer mit 0,1 mm Kammertiefe. Die Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen, mit 1 x Trypsin/EDTA abgelöst und nach Zugabe von Zellkulturmedium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden zur Auszählung von je vier Großquadraten verwendet und die Gesamtzellzahl pro ml mit folgender Gleichung errechnet:

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

2.6.2. MTT-Assay

MTT-Lösung

MTT	0,4 g/l
(Endkonzentration pro Well, gelöst in 1 x PBS)	

Solubilisierungslösung

Isopropanol	89,6 %
HCl	0,4 %
Triton X-100	10 %

Die Ermittlung der Zellvitalität erfolgte mittels MTT-Assay (Mosmann, 1983), wobei die Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität als indirektes Maß der Zellvitalität herangezogen wurde. Das gelbe, wasserunlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) wird in metabolisch aktiven Zellen zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazan-Derivat reduziert, dessen Absorption nach Solubilisierung bei 570 nm detektiert werden kann.

Zur Analyse der Zellvitalität wurden je 5×10^4 Zellen in Wells einer 96-Well-Platte in Phenolrot-freiem Medium ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h erfolgte, sofern notwendig, eine Behandlung mit Zellstress-fördernden Substanzen (Thapsigargin, Tunicamycin (Sigma Aldrich) in verschiedenen Konzentrationen) und den entsprechenden Kontrollen für 24 h. Anschließend wurden 20 µl MTT-Lösung (Endkonzentration 0,4 g/l) in jedes Well gegeben und 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl Solubilisierungslösung und 24 h Inkubation unter leichtem Schütteln bei 20 °C wurden die entstehenden Kristalle gelöst. Die spektralphotometrische Messung erfolgte bei 570 nm mittels „SpectraMax® Pradigm® Multi-Mode Microplate Platform“ (Molecular Devices) unter Verwendung der „Multi-Mode Analysis Software 2010“ (Molecular Devices).

2.6.3. Indirekte Immunfluoreszenz

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

Die Vorbereitung von Säugerzellen zur indirekten Immunfluoreszenz erfolgte 48 h nach der Transfektion. Das Medium wurde dazu abgenommen und die Zellen wurden einmal mit Ca²⁺-Ringerlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei RT mit 3 % Formaldehyd (in Ca²⁺-Ringerlösung) fixiert und erneut zweimal mit Ca²⁺-Ringerlösung gewaschen. Die darauffolgende Permeabilisierung erfolgte durch Inkubation mit 0,1 % Triton-X-100 (in Ca²⁺-Ringerlösung) für 5 bis 10 min. Die Zellen wurden erneut mit Ca²⁺-Ringerlösung gewaschen und 1 h bei RT in 2 % BSA (in PBS) inkubiert. Anschließend

erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in 2 % BSA in PBS) für 1 h bei RT und nach drei Waschschritten mit PBS folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 30 min. Die Zellen wurden sechsmal mit PBS gewaschen und zur Mikroskopie eingesetzt.

2.7. Mikroskopie

2.7.1. CLSM

Die mikroskopische Analyse von Zellen erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM 710 META, Carl Zeiss) unter Verwendung der Objektive C-Apochromat 63x (1.20 W Korr M27-Objektiv) und EC Plan-Neofluar 100x sowie der Filter „mCherry Ch2:578-673“ und „GFP ChS1:496-554“. Zur weiteren Analyse der Aufnahmen wurde die Software ZenBlack 2.1 (Zeiss) herangezogen.

2.7.2. TEM zum Nachweis der Erd2p-Plasmamembranlokalisation

Zum Nachweis der Erd2p-Plasmamembranlokalisation wurden Hefen verwendet, die eine 10xHA-getaggte *ERD2*-Variante vom natürlichen chromosomalen *ERD2*-Lokus exprimieren. Dazu wurde der wildtypische Hefestamm BY4742 sowie die Endozytosemutante $\Delta end3$ mit der in Tabelle 7 gezeigten Sequenz transformiert und die erfolgreiche homologe Rekombination durch Selektion in Ura-d/o-Medium bestätigt.

Tabelle 7: Zur homologen Rekombination verwendete Gensequenz: Restriktionsschnittstelle für *EcoRI* (Kleinbuchstaben), C-terminale *ERD2*-Sequenz ohne Stopp-Codon, Linker (Kleinbuchstaben), Gensequenz für zehn HA-Tags mit angefügtem Stopp-Codon (unterstrichen), *ADHI*-Terminator, *URA3*-Gensequenz mit vorgeschaltetem Promotor (unterstrichen) und nachfolgendem Terminator (unterstrichen), UTR-Sequenz, Restriktionsschnittstelle für *EcoRI* (Kleinbuchstaben)

ERD2-10xHA-URA3-Kassette
<pre> gaattcACTGTCATTATATTTTTGCCATGGGATTATACAGAGCATTGTATATTCCCTAACTGGATTGGAGGTACAG CACGGAAGATAAAAAATTGGACAAGATTGCCTTCTTCGCGGGACTTTTGCAAACCTCTGTTGACTCTGATTICT TTTACATTTACTACACTAAAGTCATCAGAGGAAAGGGTTTCAAACCTGCCAAAaggaggcggTATCCCATATGATGTT CCAGATTATGCTTATCCCATATGATGTTCCAGATTATGCTTATCCCATATGATGTTCCAGATTATGCTTATCCCATAT GATGTTCCAGATTATGCTTATCCCATATGATGTTCCAGATTATGCTTATCCCATATGATGTTCCAGATTATGCTTAT CCATATGATGTTCCAGATTATGCTTATCCCATATGATGTTCCAGATTATGCTTATCCCATATGATGTTCCAGATTAT GCTTATCCCATATGATGTTCCAGATTATGCTTAAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATTAATAAAGTT ATAAAAAAATAAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTAAACGAAAATCTTATTCTTGAGTAA CTCTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTCTCAGGTATAGTATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCGACATGGAGG CCCAGAATACCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGGCATGATGTGACTGTGCGCCCGTACATTTAG CCCATACATCCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATGGCCGCACGGCGCGAAGCAAAAATTACGG CTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGAAACGCTCCCCTCACAGACGCGTTGAATTGTCCCCACGCCGCGCCC CTGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTCATATACTTCTTTTAAAATCTTGCTA GGATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAACAACCATGTGCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCTAC TCATCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACAACACTGTGTGCTTCATTGG ATGTTTCGTACCACCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCTCCAAAATTTGTTTACTAAAAACACAT </pre>

```

GTGGATATCTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAGGCATTATCCGCCAAGTACAATTT
TTTACTCTTCCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGGTAATACAGTCAAATTGCAGTACTCTGCGGGTGTATACA
GAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGGGCCAGGTATTGTTAGCGGTTTGAAGCA
GGCGGCGGAAGAAGTAACAAAGGAACCTAGAGGCCTTTTGATGTTAGCAGAATTGTCATGCAAGGGCTCCCTA
GCTACTGGAGAATATACTAAGGGTACTGTTGACATTGCGAAGAGCGACAAAGATTTTGTATCGGCTTTATTGC
TCAAAGAGACATGGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGGTTTAGATGAC
AAGGGAGACGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTG
TTGGAAGAGGACTATTTGCAAAGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCTGGG
AAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAAACTAATCAGTACTGACAATAAAAAAGATTCTTGTTTTCAAGAAC
TTGTCATTTGTATAGTTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTAATCAAATGTTAGCGTGATTATATTTTTTTCG
CCTCGACATCATCTGCCCAGATGCGAAGTTAAGTGCAGCAAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATGTGAATG
CTGGTCGCTATACTGAACCTGTTTTAAATAGTGTTCGCGCAATATATACAAATTTCAATATATCAATGCTATA
CCAAAAGAAAAAAAATAACATAAAATTGATGTTGATATTGGTCTATTCTTTTTATACTATGATATGTATGCA
TTAATCTCTTTTAGCTCATAAAATCTTTCCTTACACCATCCTTGGTGACAATAAGGATTTCCAGCCgaattc

```

Die Expression von *ERD2-10xHA* wurde zusätzlich auf Proteinebene im Western Blot nachgewiesen.

Die Analyse der Plasmamembran-Lokalisation wurde mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie im „Department of Cell Biology“ der „University of Groningen“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fulvio Reggiori durchgeführt. Dazu wurden die Hefezellen fixiert und in Gelatine eingebettet, bevor Ultradünnschnitte zur Immunogoldfärbung und der anschließenden Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) angefertigt wurden (Griffith & Reggiori, 2009). Als primär-Antikörper wurde ein monoklonaler anti-HA Antikörper (Sigma) in 1:200-facher Verdünnung eingesetzt.

2.7.3. REM zur Analyse der KDELR1-Plasmamembranlokalisierung

Zur Analyse der Plasmamembranlokalisierung von KDELR1 wurden HeLa-Zellen mit pcDNA3.1 KDELR1-D-HA-G transfiziert. Nach 48 h erfolgte ein Immunostaining mit primären anti-HA (1:500) und Gold-markierten sekundären Antikörpern (1:100). Die Elektronenmikroskopie wurde am Leibniz-Institut für Neue Materialien (INM, Universität des Saarlandes) in Kooperation mit Dr. Marcus Koch durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst durch einen Alkoholaustausch mit aufsteigender Alkoholreihe entwässert:

30%	10 min
50%	10 min
70%	10 min
80%	10 min
90%	10 min
96%	10 min
100%	15 min, 2-fache Wiederholung

Zur darauffolgenden Trocknung wurden die Zellen 15 min mit Hexamethyldisilazan (HMDS, 1:1 verdünnt) versetzt und zweimal 15 min in reinem HMDS inkubiert. Nach diesen Inkubationsschritten wurde HMDS dünn auf die Zellen aufgetragen und unter einem Abzug vollständig verdunstet. Anschließend wurden die Proben auf ein doppelseitiges Kohlepad geklebt und zur Generierung einer leitfähigen Oberfläche mit Kohlenstoff beschichtet (JEOL JEC-530 Carbon Coater, 5 s, 5 A). Die Analyse erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop vom Typ FEI Quanta 400 FEG im Hochvakuum, wobei Sekundärelektronen- (ETD-Detektor) und Rückstreuerelektronenaufnahmen (SSD-Detektor) bei 20 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen wurden.

2.8. CRISPR/Cas9-vermittelter Gen-KO

Die CRISPR/Cas9-Technologie stellt eine effiziente Methode zur Veränderung genomischer DNA („Genome Editing“) dar, deren Ursprung auf die Entdeckung eines adaptiven antiviralen Abwehrmechanismus von Bakterien und Archaea zurückzuführen ist. Bereits 1987 wurde das Auftreten repetitiver Sequenzen im Genom von Bakterien beschrieben (Ishino *et al.*, 1987), die Funktion dieser CRISPR („Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“)-Elemente als antivirales „Immunsystem“ im Zusammenspiel mit Nukleasen der Cas-Familie konnte jedoch erst im Jahr 2007 ermittelt werden (Barrangou *et al.*, 2007). Die CRISPR-Elemente bestehen aus kurzen, palindromischen Sequenzwiederholungen (Repeat-Sequenzen), welche von „Spacer-Sequenzen“ unterbrochen werden, die Einlagerungen von Virus-DNA-Fragmenten repräsentieren und im Virusgenom als „Protospacer“ bezeichnet werden. (Mojica *et al.*, 2005). Die CRISPR-Bereiche werden zunächst in lange RNA-Sequenzen („pre-crRNA“) transkribiert und anschließend prozessiert. Der reife Komplex aus crRNA und Cas-Protein bindet dann an die zur Spacer-RNA komplementären Protospacersequenzen im Virusgenom. Die effiziente Bindung und Aktivität der Cas-Endonuklease wird durch das Angrenzen von kurzen „Protospacer Adjacent Motifs“ (PAM)-Sequenzen am Protospacer ermöglicht, sodass das spezifische Schneiden des Virusgenoms gewährleistet wird (Mojica *et al.*, 2009).

Zur gezielten Veränderung genomischer DNA-Bereiche wird die „Spacer-RNA“ durch eine als „guide-RNA“ oder „gRNA“ genannte Sequenz ersetzt, welche homolog zu der Zielsequenz in der genomischen DNA ist. Diese Zielsequenz sollte neben einer spezifischen PAM-Sequenz für die verwendete Endonuklease lokalisiert sein. Die in dieser Arbeit

verwendete Cas9-Endonuklease aus *Streptococcus pyogenes* erkennt „NGG“ als PAM-Sequenz (Anders *et al.*, 2014). Zur Herstellung von KDEL-R-KO Zelllinien wurden dementsprechend Exon-Sequenzen der KDEL-Rs als „gRNAs“ gewählt, die neben einer NGG-Sequenz lokalisiert sind. Zur Generierung eines vollständigen Gen-KO wurden Exon-Sequenzen präferiert, die in allen bekannten Spleißvarianten der entsprechenden KDEL-Rs enthalten sind. Die weitere Selektion der gRNAs erfolgte unter Verwendung des Tools E-CRISP (www.e-crisp.org), das eine direkte Evaluation der möglichen gRNA-Sequenzen hinsichtlich ihrer off-Target Vorhersage ermöglicht. Tabelle 8 zeigt die gewählten gRNA-Sequenzen.

Tabelle 8: gRNA-Sequenzen, deren Bezeichnung, Lokalisation, Sequenz und Vorhersage der möglichen off-Target Anzahl unter Angabe der variierenden Basenzahl (mismatch). Die Auswahl erfolgte mit Hilfe des Tools E-CRISP.

Zielgen	Exon	gRNA-Bezeichnung	Sequenz (*E-CRISP) und PAM	off-Targets mit 1/2/3 mismatches
KDEL-R1	3	gRNA1.1	GGGTGAAGTCATGATTGACC AGG	0/1/3
KDEL-R1	4	gRNA1.2	GGTCGAAGAAGCCCTCGAAA TGG	0/0/1
KDEL-R1	4	gRNA1.3	GATCTGGCGCTACCATTTTCG AGG	0/0/0
KDEL-R2	1	gRNA2.1	GGATGACGATGGCCGCCAGG TGG	0/0/4
KDEL-R2	1	gRNA2.2	GATGACGATGGCCGCCAGGT GGG	0/0/3
KDEL-R2	3	gRNA2.3	GGACCACCAGAACTCCACT CGG	0/0/9
KDEL-R3	1	gRNA3.1	GCAGCAAGATCATGGCCAGG AGG	0/2/18
KDEL-R3	2	gRNA3.2	GAACAGGTCCAGGTACCTGG TGG	0/1/34
KDEL-R3	3	gRNA3.3	GGACCAGAAGAACTCCAGG CGG	0/0/15

Nach erfolgter Auswahl wurden die gRNA-Sequenzen jeweils in dem Vektor pGS-gRNA-Neo (GeneScript, Abbildung 4 A) bestellt. Die gRNA-Sequenz ist dabei vor einer als „Scaffold“ bezeichneten Sequenz lokalisiert, die sowohl eine Repeat-Sequenz, als auch die entsprechende tracr-Sequenz beinhaltet, die komplementär zur Repeat-Sequenz ist und von Cas9 zur Bindung und Prozessierung benötigt wird. Diese artifizielle Kombination aus crRNA und tracrRNA wird auch als „single guide RNA“ (sgRNA) bezeichnet und steht in diesem Vektor unter Kontrolle eines U6-Promotors. Zur Cas9-Expression wurde der Vektor

pcDNA3.3-Cas9-2A-eGFP (GeneScript, Abbildung 4 B) verwendet, der die Expression der Cas9-Endonuklease von einem CMV-Promotor gewährleistet, wobei Cas9 über ein 2A-Peptid an eGFP gekoppelt ist. In transfizierten Zellen liegt somit die gleiche Menge an Cas9 und eGFP vor, wodurch Zellen mit hoher Cas9-Expression aufgrund ihrer starken grünen Fluoreszenz selektiert werden können.

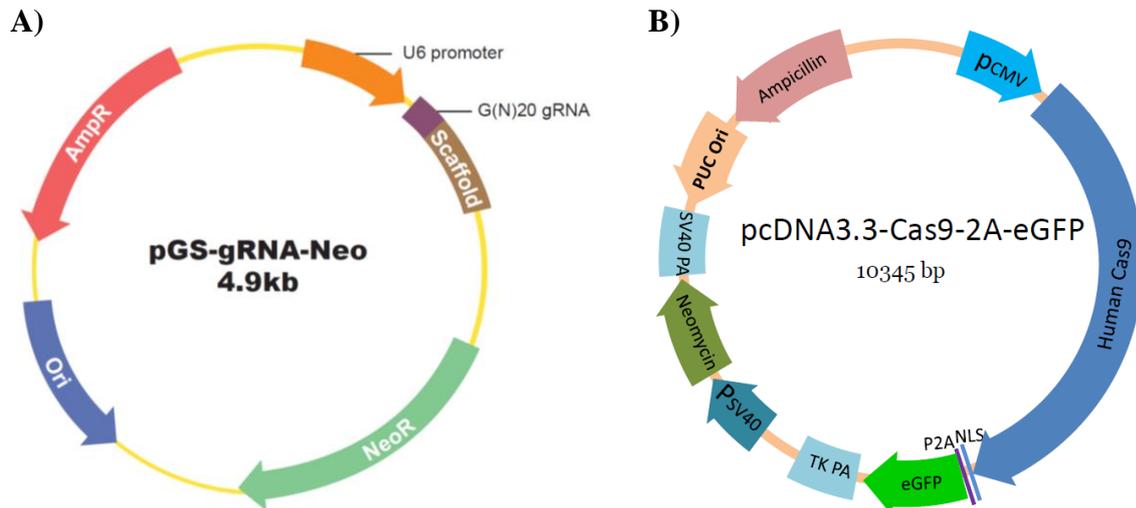


Abbildung 4: Zum CRISPR/Cas9-vermittelten KDEL R-KO verwendete Vektoren (GeneScript): A) pGS-gRNA-Neo zur Expression der entsprechenden gRNAs unter Kontrolle eines U6-Promotors. B) pcDNA3.3-Cas9-2A-eGFP zur Expression von Cas9, gekoppelt an eGFP über ein 2A-Peptid unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.

Zur Herstellung der KO Zelllinien wurden HEK293-Zellen unter Verwendung des „FuGene Transfection Reagent“ (Promega) jeweils mit beiden Plasmiden co-transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte das Sortieren („Fluorescence-Activated Cell Sorting“, (FACS), MoFlo, Beckman Coulter (Dr. Stephan Philipp, UKS Homburg)) von einzelnen Zellen mit einer zuvor definierten Fluoreszenzintensität in Wells einer 96-Well-Platte, in die Zellkulturmedium vorgelegt wurde. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert, bis die entstanden Kolonien groß genug waren, um in 24-Well-Platten umgesetzt zu werden. Sobald eine ausreichende Menge an Zellen aus einer Kolonie heran gewachsen war, wurden Kryokulturen zur längerfristigen Lagerung angelegt. Während der Umsetzung aus den 96-Well-Platten wurden einige Zellen zur DNA-Isolierung separiert. Die entsprechenden Bereiche der genomischen DNA wurden mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte nach Aufreinigung sequenziert (GATC-Biotech, Konstanz). Ein erfolgreicher KO äußert sich durch das Auftreten kurzer Insertionen oder Deletionen downstream der PAM-Sequenz, welche durch Leserasterverschiebung zur Entstehung eines vorzeitigen Stopp-

Codons führen und bei der Reparatur („Non-homologous end joining“) des Doppelstrangbruchs entstanden sind.

Bei Verwendung des HDR („homology-directed repair“)-basierten CRISPR/Cas9-Systems von SantaCruz Biotechnology wurden HeLa-Zellen mit dem gRNA- und Cas9-exprimierenden KO-Plasmid sowie dem entsprechenden HDR-Plasmid co-transfiziert. Durch homologe Rekombination erfolgt die Insertion eines RFP- und eines Puromycin^R-Gens an der Stelle des Doppelstrangbruchs. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Puromycin-haltigem Medium selektiert. Zur Gewinnung von Einzelzellkolonien wurden die Zellen so weit verdünnt, dass etwa 0,3 Zellen/Well in Wells einer 96-Well-Platte ausgesät wurden. Die entstandenen Kolonien wurden kultiviert und zur längerfristigen Lagerung wurden Kryokulturen angelegt. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels PCR mit gRNA-flankierenden Primern. Bei erfolgreichem KDELR1-KO sollte durch die Insertion der RFP- und Puromycin^R-Gene ein deutlich größeres PCR-Produkt auftreten.

2.9. Transkriptomanalyse

Zur Untersuchung der KDELR-Funktionen wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Dabei wurden wildtypische HAP1-Zellen, HAP1-Zellen mit KDELR1-KO und wildtypische HAP1-Zellen nach 30 min Behandlung mit einem KDELR-Peptid miteinander verglichen.

Die Zellen wurden dazu jeweils in Triplikaten in 6-Well-Platten mit IMDM-Zellkulturmedium ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung durch Zugabe von KDELR-Peptid (YTSEKDEL (GeneScript), gelöst in sterilem H₂O, 1 mM Endkonzentration, 30 min) beziehungsweise der entsprechenden Menge an sterilem H₂O bei den unbehandelten Proben.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research), wobei auch ein DNase-Verdau durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Integrität der RNA in einem Agarosegel überprüft.

Die Präparation der cDNA-Banken erfolgte unter Verwendung des „NEBNext[®] Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Mudules“ (#E7490S) sowie des „NEBNext[®] Ultra[™] II Directional RNA Library Prep Kits for Illumina[®]“ (#E7760S) und der „NEBNext[®] Multiplex Oligos für Illumina[®]“ (Index Primer Set 1, #E7335S, New England BioLabs) nach Angaben des Herstellers. Zu Beginn der Präparation wurden 1000 ng total-RNA eingesetzt und bei der

mRNA-Fragmentierung Fragmente von etwa 200 bp generiert. Aufgrund der eingesetzten Menge an total-RNA wurde beim „PCR-Enrichment of Adaptor Ligated DNA“ eine Zyklenzahl von 8 gewählt.

Anschließend wurden die DNA-Konzentrationen der cDNA-Banken durch Qubit-Messung ermittelt und die Qualität der cDNA-Banken in einem Bioanalyzer (Agilent Bioanalyzer 2100, DNA High Sensitivity Chip) überprüft. Die Sequenzierung der Proben erfolgte mit einem „HiSeq 2500 Sequencing System“ (Illumina) im High-Output Modus (1 x 100 single end reads).

3. Ergebnisse

In eukaryontischen Zellen werden sekretorische Proteine und Membranproteine während beziehungsweise nach ihrer Translation in das ER transportiert, wo ihre Faltung sowie erste post-translationale Modifikationen stattfinden. Anschließend erfolgt ihre Verpackung in COPII-Vesikel, die den anterograden Transport vom ER zum Golgi vermitteln. Im Golgi werden weitere Modifikationen der O- und N-Glykosylierungen katalysiert und die reifen Proteine werden in spezifische Vesikel sortiert, die den gerichteten Transport zu ihrem Wirkungsort sicherstellen (Palade, 1975). ER-residente Proteine werden ebenfalls zum Golgi transportiert, damit ihre vollständige Reifung erfolgen kann. Ihre Rückführung zum ER wird durch kurze Sequenzmotive ermöglicht, welche eine Verpackung in COPI-Vesikel und den retrograden Transport vermitteln. Die Erkennung von ER-Membranproteinen erfolgt dabei über zytosolisch lokalisierte di-Lysin Motive (KKXX), die direkt von Komponenten der COPI-Hülle gebunden werden (Jackson *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 1990). Lösliche ER-residente Proteine besitzen C-terminale KDEL-Motive, können aber aufgrund der Membranbarriere nicht von zytosolischen COPI-Proteinen erkannt werden. Daher wird ihre Retention und Rückführung durch KDEL-Rezeptoren (KDELRs) ermöglicht, die eine Interaktion der COPI-Hülle mit den KDEL-Cargoproteinen vermitteln (Munro & Pelham, 1987). KDELRs repräsentieren Membranproteine mit sieben Transmembran-Domänen; ihr N-Terminus befindet sich im Lumen, während der C-Terminus in das Zytosol ragt. Die Bindung der KDEL-Proteine erfolgt wahrscheinlich im luminal lokalisierten Loop zwischen den Membrandomänen zwei und drei des Rezeptors und wird durch den leicht sauren pH-Wert des Golgis begünstigt (Townsend *et al.*, 1993). Der zytosolische C-Terminus des Rezeptors dient als Bindestelle von COPI-Proteinen, wobei eine Phosphorylierung von Serin209 sowie ein intaktes Lysin-Cluster entscheidend sind (Cabrera *et al.*, 2003). Nach erfolgtem Rücktransport dissoziieren die KDEL-Proteine aufgrund des neutralen pH-Werts im ER von ihrem Rezeptor und der KDELR wird über COPII-Vesikel zurück zum Golgi recycelt (Wilson *et al.*, 1993). Neben dieser Retentionsfunktion agieren KDELRs auch als GPCRs („G-protein coupled receptors“) und aktivieren nach Ligandenbindung Golgi-lokalisierte G-Proteine. Dadurch werden Signalkaskaden ausgelöst, welche die Regulation der retrograden und anterograden Transportprozesse steuern und somit zur Golgi-Homöostase beitragen (Cancino *et al.*, 2014; Giannotta *et al.*, 2012). Die Signalfunktion des KDELR beeinflusst auch die Antwort der Zellen auf ER-Stress, sodass ein breites Wirkungsspektrum des Rezeptors vorliegt, das je nach Zelltyp und gegenwärtiger Bedingungen unterschiedliche Effekte hervorrufen kann (Cho *et al.*, 2005; Kamimura *et al.*, 2015; Ruggiero *et al.*, 2014; Yamamoto

et al., 2003). Die Lokalisation des KDELR ist entsprechend seiner Funktion hauptsächlich auf die Membranen von Golgi und intermediärem Kompartiment konzentriert, wobei durch Aktivierung eine Redistribution zum ER erfolgt (Griffiths *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1992; Pulvirenti *et al.*, 2008). Zusätzlich wird eine geringe KDELR-Fraktion in der Plasmamembran vermutet, was weitere Funktionen des Rezeptors nach extrazellulärer Ligandenbindung implizieren könnte (Becker, *et al.*, 2016; Henderson *et al.*, 2013).

Der Nachweis der KDELR-Lokalisation in der Plasmamembran von Hefe- und Säugerzellen sollte in der vorliegenden Arbeit mittels Elektronenmikroskopie erfolgen und zur weiteren Analyse der Rezeptor-Lokalisation im Sekretionsweg das C-terminale Lysin-Cluster hinsichtlich seiner Funktion als KKXX-ähnliches Retentionsmotiv in Hefe- und Säugerzellen charakterisiert werden. Zur Untersuchung weiterer KDELR-Funktionen sollten unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Technologie humane Zelllinien mit jeweils einem knockout der drei homologen KDELRs (KDELR1, KDELR2 und KDELR3) hergestellt werden. Anschließend sollte eine Charakterisierung dieser Zelllinien hinsichtlich ihrer Retentionsfunktion und ihrer Reaktion auf ER-Stress erfolgen sowie zur weiteren Analyse auch das Transkriptom der Zellen auf mögliche Veränderungen untersucht werden.

3.1.1. Nachweis der KDELR-Lokalisation an der Plasmamembran von Hefezellen

Zum Nachweis der Plasmamembran-Lokalisation des KDELR in Hefe wurde die genomische Sequenz des Rezeptors durch zehn HA-Tags ergänzt. Somit erfolgte die Analyse des Rezeptors unter Verwendung seines natürlichen Expressionslevels und wurde nicht durch eine Überexpression beeinflusst. Zur Herstellung dieser Rezeptorvarianten wurde eine Kassetten verwendet, die an ihrem 5'-Ende durch die C-terminale *ERD2*-Sequenz und an ihrem 3'-Ende durch einen Teil der genomischen 3'-UTR-Sequenz flankiert wird. Das Stopp-Codon am Ende der *ERD2*-Sequenz wurde in der Kassetten entfernt und direkt durch eine Gensequenz für zehn HA-Tags mit anschließendem Stopp-Codon ergänzt. Zur Selektion der Hefen mit erfolgreicher Insertion wurde zusätzlich ein *URA3*-Gen in die Kassetten integriert. Mit dieser Genkassetten wurden anschließend wildtypische Hefen (BY4742) sowie eine Endozytose-Mutante ($\Delta end3$) transformiert und die Hefen mit erfolgter homologer Rekombination wurden durch Kultivierung in URA-d/o-Medium selektiert. Die jeweilige Expression von *ERD2-10xHA* wurde mittels Western Blot bestätigt. Anschließend wurden die Hefen im „Department of Cell Biology“ der „University of Groningen“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fulvio Reggiori mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie hinsichtlich ihrer KDELR-

Lokalisation analysiert. In Abbildung 5 sind vier Beispiele der Mikroskopie-Ergebnisse wildtypischer Zellen dargestellt.

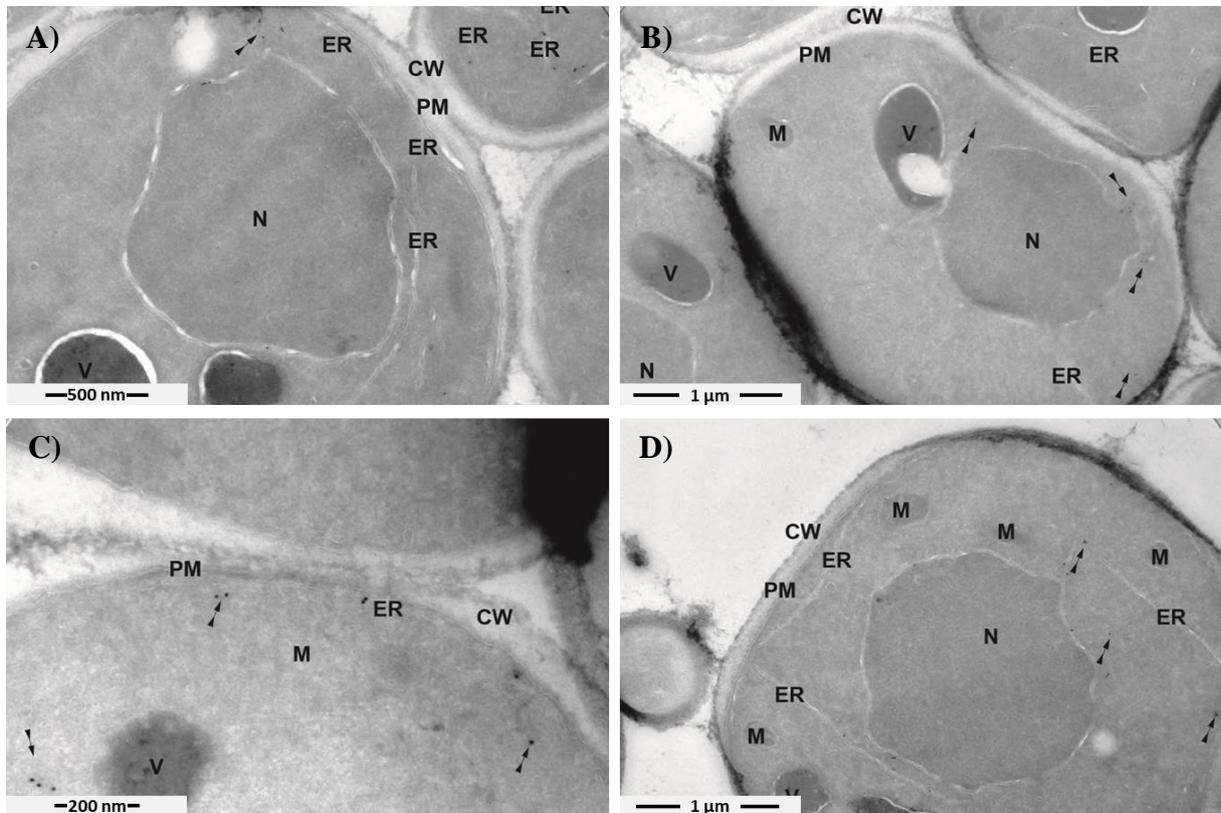


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen wildtypischer Hefezellen (BY4742) zur Analyse der KDELRLokalisation. Die Hefen exprimieren eine zehnfach HA-getaggte Rezeptorvariante von ihrem genomischen *ERD2*-Lokus und wurden in URA-d/o-Medium kultiviert. Zur Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Hefen fixiert, in Gelatine eingebettet und es wurden Ultradünnschnitte zur Immunogoldfärbung angefertigt. Als primär-Antikörper wurde ein monoklonaler anti-HA-Antikörper in 1:200-facher Verdünnung verwendet. Die Detektion erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop JEM-1010 (JEOL) mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. A) Horizontale Feldbreite: 3 µm, Vergrößerung: 46.000x; B),D) Horizontale Feldbreite: 4,3 µm; Vergrößerung: 33.000x; C) Horizontale Feldbreite: 1,5 µm; Vergrößerung: 93.000x. Detektierte KDELRLs sind durch Doppel-Pfeile markiert. CW: Zellwand; ER: Endoplasmatisches Retikulum; M: Mitochondrium, N: Nucleus, PM: Plasmamembran; V:Vakuole.

In Abbildung 5 lässt sich erkennen, dass einige der gelabelten Rezeptoren, die in der Abbildung mit Doppel-Pfeilen markiert sind, in ER-Strukturen nahe des Nucleus lokalisiert waren. Zusätzlich konnten Rezeptoren in ER-Strukturen unterhalb der Plasmamembran detektiert werden. In manchen Zellen wurden auch KDELRLs an der Plasmamembran nachgewiesen. Jedoch war das Labelling der Rezeptoren im Allgemeinen zu gering, um eine statistische Aussage über das Verhältnis intrazellulärer Rezeptoren zu Rezeptoren an der Plasmamembran treffen zu können (Prof. Dr. Fulvio Reggiori, persönliche Mitteilung).

Abbildung 6 zeigt vier exemplarische Bilder der mikroskopischen Aufnahmen unter Verwendung der Endozytose-Mutante $\Delta end3$.

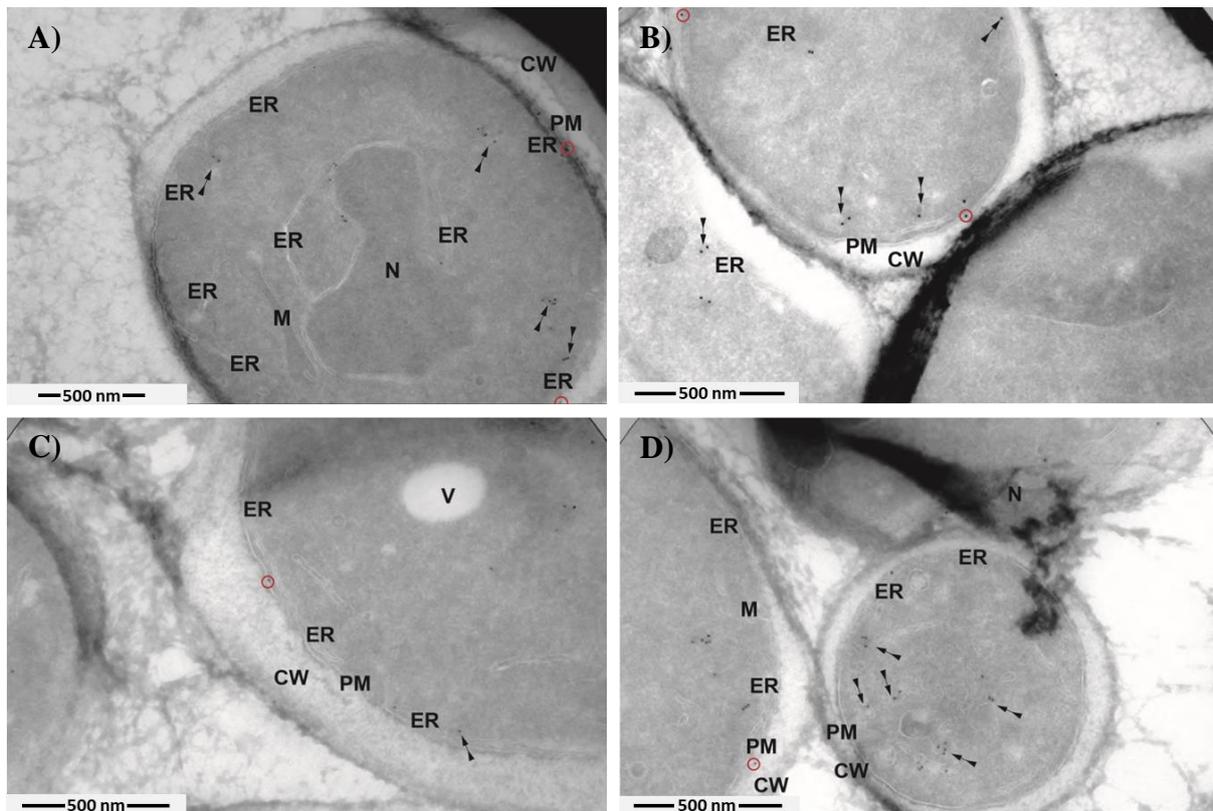


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Endozytose-Mutante ($\Delta end3$) zur Analyse der KDELR-Lokalisation. Die Hefen exprimieren eine zehnfach HA-getaggte Rezeptorvariante von ihrem genomischen *ERD2*-Lokus und wurden in URA-d/o-Medium kultiviert. Zur Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Hefen fixiert, in Gelatine eingebettet und es wurden Ultradünnschnitte zur Immunogoldfärbung angefertigt. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler anti-HA-Antikörper in 1:200-facher Verdünnung verwendet. Die Detektion erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop JEM-1010 (JEOL) mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. A) Horizontale Feldbreite: 3 μm , Vergrößerung: 46.000x; B), C), D) Horizontale Feldbreite: 2,1 μm ; Vergrößerung: 66.000x. Detektierte KDELRs sind durch Doppel-Pfeile markiert. CW: Zellwand; ER: Endoplasmatisches Retikulum; M: Mitochondrium, N: Nukleus, PM: Plasmamembran; V: Vakuole.

Aus Abbildung 6 geht ebenfalls eine KDELR-Lokalisation in ER-Strukturen hervor, wobei im Vergleich zu wildtypischen Zellen die Präsenz in der Nähe des Nukleus vermindert und unterhalb der Plasmamembran leicht erhöht war. Rezeptoren, die sich direkt in der Plasmamembran befanden, sind mit roten Kreisen markiert und traten in der Endozytose-Mutante etwas häufiger auf. Die Plasmamembran-Lokalisation des KDELR in Hefen konnte also nachgewiesen werden, obwohl aufgrund des geringen Labellings der Gesamtzahl der Rezeptoren in einer Zelle die prozentuale Verteilung an der Plasmamembran nicht ermittelt werden konnte. Die verstärkte Lokalisation von KDELRs in Bereichen der Plasmamembran

der $\Delta end3$ Mutante könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass KDELRs auf Ebene der Plasmamembran endozytotisch internalisiert werden (Becker *et al.*, 2016).

3.1.2. Nachweis der KDELR1-Lokalisation an der Plasmamembran von HeLa-Zellen

In Säugerzellen sollte die Plasmamembran-Lokalisation von KDELR1 ebenfalls mittels Elektronenmikroskopie adressiert werden. Da hier keine einfache Integration einer getaggen Variante im genomischen KDELR1-Lokus erfolgen konnte, wurden die verwendeten HeLa-Zellen mit einer HA-getaggen KDELR1-Variante transfiziert. Diese Plasmid-getriebene Expression entspricht zwar nicht dem natürlichen Expressionslevel des Rezeptors, sie ist jedoch aufgrund eines fehlenden KDELR1-spezifischen Antikörpers zur Detektion einer getaggen Variante notwendig. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und zum Immunostaining mit primären anti-HA Antikörpern und Goldmarkierten sekundären Antikörpern verwendet. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet und ebenfalls der Immunogold-Färbung unterzogen, sodass die KDELR1-Spezifität eines Signals in den transfizierten Zellen überprüft werden konnte. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde am Leibniz-Institut für Neue Materialien (INM, Universität des Saarlandes) in Kooperation mit Dr. Marcus Koch durchgeführt, wobei Sekundärelektronen- und Rückstreuelektronenaufnahmen bei 20 kV Beschleunigungsspannung erzeugt wurden. In KDELR1-HA transfizierten Zellen konnte eine Vielzahl an Goldpartikeln nachgewiesen werden, während bei untransfizierten Zellen nur vereinzelt Goldpartikel aufzufinden waren, die wahrscheinlich durch die abschließenden Waschschrte des Immunostainings nicht vollständig entfernt wurden. Da ein Nachweis der KDELR1-Lokalisation an der Plasmamembran im Fokus dieser Untersuchung stand, wurden hauptsächlich Aufnahmen an den Randbereichen der Zellen und zwischen Zell-Kontaktstellen angefertigt. In Abbildung 7 ist das Ergebnis dieser Analyse exemplarisch an einer Zelle dargestellt.

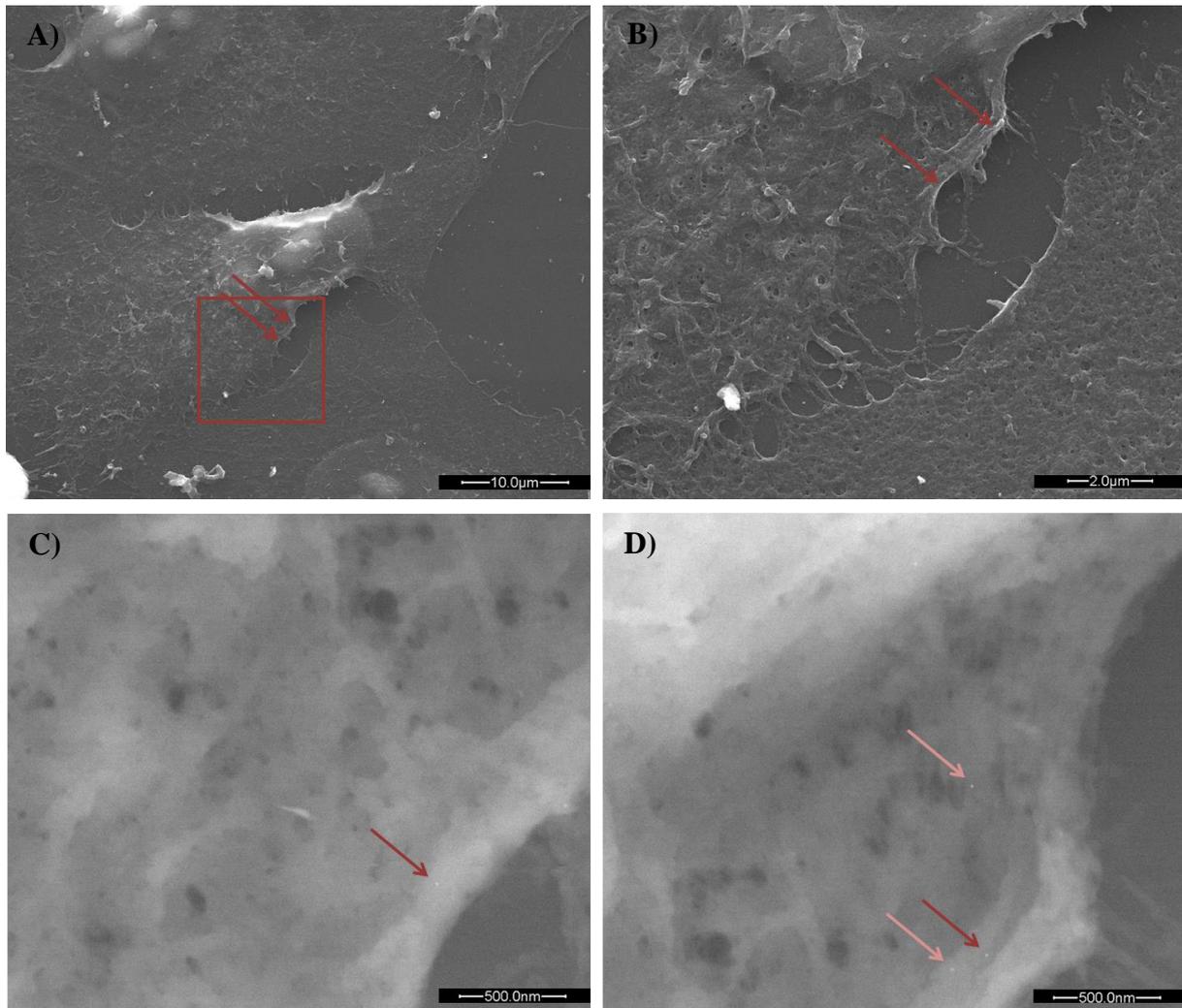


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen zur Analyse der KDEL1-Lokalisation. Die Zellen wurden 48 h nach ihrer Transfektion mit KDEL1-HA einem Immunostaining unterzogen, wobei anti-HA (primärer Antikörper, 1:500 verdünnt) und Goldmarkierte sekundäre Antikörper verwendet wurden. Zur Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie wurden die Proben entwässert, getrocknet und zur Generierung einer leitfähigen Oberfläche mit Kohlenstoff beschichtet. Die Detektion erfolgte an einem Rasterelektronenmikroskop (FEI Quanta 400 FEG) im Hochvakuum, wobei Sekundärelektronen-(ETD-Detektor) und Rückstreuerelektronenaufnahmen (SSD-Detektor) bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV generiert wurden. A) Sekundärelektronen-Aufnahme unter 5.000-facher Vergrößerung, Abbildungsbereich B ist hier durch ein rotes Rechteck markiert, die Lokalisation der in Abbildungsteil C und D sichtbaren Goldpartikel ist mit roten Pfeilen angedeutet. B) Sekundärelektronen-Aufnahme unter 20.000-facher Vergrößerung, die Lokalisation der in Abbildungsteil C und D sichtbaren Goldpartikel ist mit roten Pfeilen angedeutet. C), D) Rückstreuerelektronen-Aufnahmen unter 100.000-facher Vergrößerung, die detektierten Goldpartikel wurden mit roten Pfeilen markiert.

Abbildung 7 zeigt, dass einige Goldpartikel direkt in den äußersten Randbereichen von HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnten. Diese Beobachtung wurde bei der Untersuchung weiterer Zellen bestätigt und bekräftigt somit eine KDEL1-Lokalisation in der Plasmamembran von Säugerzellen.

3.2. Charakterisierung des C-terminalen Lysin-Clusters als Retentionsmotiv

Ergänzend zu den Untersuchungen von Cabrera *et al.* (2003) sollte der C-Terminus des KDELR hinsichtlich seiner Relevanz für die ER-Retention in Hefe- und Säugerzellen analysiert werden. In beiden Spezies enthält die C-terminale KDELR-Sequenz vier Lysin-Reste, die bei KDELR1 in Säugerzellen ein di-Lysin-Motiv bilden (Abbildung 8).

Erd2p: TKVIRGKGFKLPK
KDELR1: TKVLKGGKLSLPA

Abbildung 8: Vergleichende Darstellung der C-terminalen KDELR-Sequenz in Hefe (Erd2p) und im Säuger (KDELR1). Die vier Lysin-Reste sind jeweils in grau hervorgehoben.

Da es vor allem in Hefen aufgrund ihrer geringen Größe schwierig ist, die Lokalisation von Proteinen im Sekretionsweg zu unterscheiden, wurden Plasmamembran-lokalisierte Proteine als Reporter genutzt. Ihre Rückhaltung im Sekretionsweg sollte deutlicher zu erkennen sein. Zur Analyse wurden die Reporterproteine mit mCherry fusioniert und C-terminal mit einem klassischen Retentionsmotiv (KCAA) beziehungsweise dem C-Terminus des KDELR verlängert. Zur Charakterisierung des Lysin-Clusters wurde zusätzlich eine Variante mit C-terminaler KDELR-Sequenz hergestellt, bei der die Lysin-Reste zu Alanin substituiert wurden.

3.2.1. Analyse der Retentionsfunktion des Erd2p-C-Terminus in Hefezellen

Zur Untersuchung des Erd2p-C-Terminus bezüglich seiner Funktion bei der ER-Retention in Hefen wurde die Plasmamembran-lokalisierte Arginin-Permease Can1p als Reporter verwendet. Die entsprechenden Can1p-mCherry Fusions-Konstrukte wurden mittels PCR hergestellt und in den Expressions-Vektor pYES kloniert. Nach Transformation wildtypischer Hefen (BY4742) wurde die Expression in Galaktose-haltigem Medium induziert. Die jeweiligen Can1p-mCherry Varianten sind in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

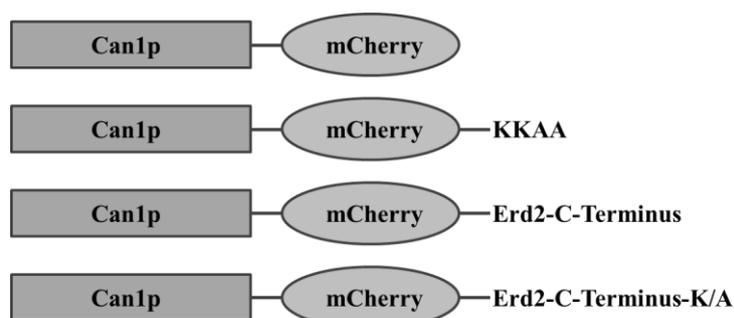


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Can1p-mCherry Konstrukte: Can1p-mCherry, Can1p-mCherry mit Fusion eines klassischen Retentionsmotivs (Can1p-mCherry-KKAA), Can1p-mCherry mit Fusion der C-terminalen Erd2p-Sequenz (Can1p-mCherry-Erd2-C-Terminus) und Can1p-mCherry mit Fusion der C-terminalen Erd2p-Sequenz mit Austausch der Lysin-Reste zu Alanin (Can1p-mCherry-Erd2-C-Terminus-K/A). Die Klonierung der Konstrukte erfolgte im Rahmen der Master-Arbeit von Anna Lauer (2016).

Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie analysiert (Abbildung 10).

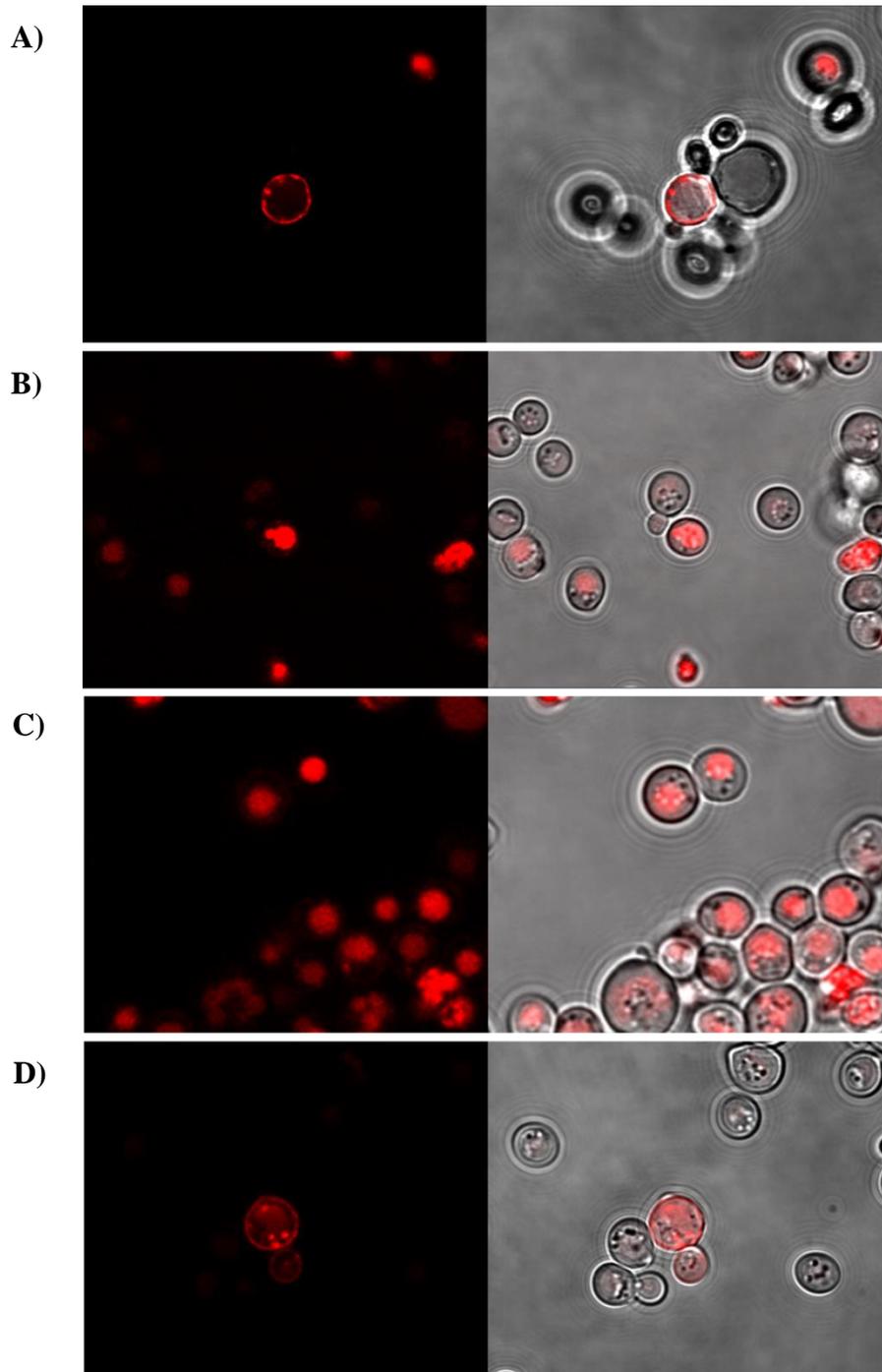


Abbildung 10: CLSM-Aufnahmen von Hefezellen (BY4742) nach Expression der entsprechenden Can1p-mCherry Variante (rot). Objektiv: EC Plan-Neofluar 100x, Filter „mCherry Ch2:578-673“. A)

Can1p-mCherry, B) Can1p-mCherry-KKAA, C) Can1p-mCherry-Erd2-C-Terminus, D) Can1p-mCherry-Erd2-C-Terminus-K/A. Die Bilder wurden im Rahmen der Master-Arbeit von Anna Lauer (2016) aufgenommen.

In Abbildung 10 A lässt sich die natürliche Plasmamembran-Lokalisation von Can1p-mCherry erkennen. Das Anfügen der klassischen Retentionssequenz KKAA sowie des Erd2-C-Terminus führten zu einer Redistribution der Can1p-Lokalisation in das Zellinnere (Abbildung 10 B und C). Die Substitution der Lysin-Reste in der C-terminalen Erd2-Sequenz durch Alanin resultierte erneut in einer verstärkten Plasmamembran-Lokalisation der entsprechenden Can1p-Variante (Abbildung 10 D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der C-Terminus von Erd2p beziehungsweise dessen C-terminal lokalisiertes Lysin-Cluster eine Retention von Proteinen im Sekretionsweg vermitteln können. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch die Rückführung des KDEL-R durch die Lysin-Reste ermöglicht wird, auch wenn diese in Hefen kein klassisches KKXX-Motiv repräsentieren.

3.2.2. Analyse der Retentionsfunktion des KDEL-R1-C-Terminus in Säugerzellen

Aufbauend auf den Ergebnissen in Hefen sollte anschließend die Relevanz der C-terminalen KDEL-R1-Sequenz in Säugerzellen bezüglich der Retention untersucht werden. Dazu wurde der Plasmamembran-lokalisierte Glukosetransporter GLUT1 als Reporter gewählt und die entsprechenden GLUT1-mCherry Fusionskonstrukte mittels PCR amplifiziert. Zur anschließenden Expression in Säugerzellen wurde der Vektor pcDNA3.1 verwendet. In Abbildung 11 sind die jeweiligen GLUT1-mCherry Varianten dargestellt.

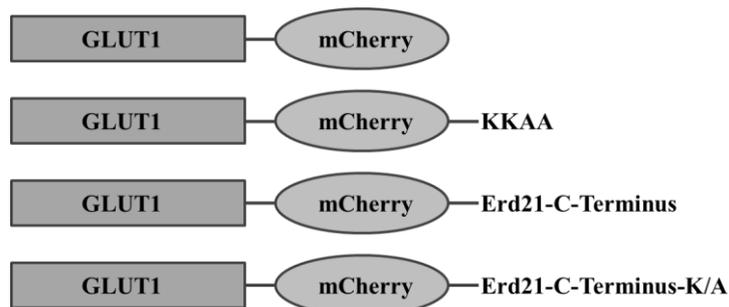


Abbildung 11: Schematische Darstellung der GLUT1-mCherry Konstrukte: GLUT1-mCherry, GLUT1-mCherry mit Fusion eines klassischen Retentionsmotivs (GLUT1-mCherry-KKAA), GLUT1-mCherry mit Fusion der C-terminalen Erd21-Sequenz (GLUT1-mCherry-Erd21-C-Terminus) und GLUT1-mCherry mit Fusion der C-terminalen Erd21-Sequenz mit Austausch der Lysin-Reste gegen Alanine (GLUT1-mCherry-Erd21-C-Terminus-K/A). Die Klonierung dieser Konstrukte wurde im Rahmen der Masterarbeit von Valeria Rebecchi (2018) durchgeführt.

Zur Untersuchung der Lokalisation wurden HeLa-Zellen mit den jeweiligen GLUT1-mCherry Varianten sowie einem eGFP-KDEL-Konstrukt als ER-Marker co-transfiziert. 48 h nach der

Transfektion erfolgte die Analyse am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (CLSM). In Abbildung 12 sind exemplarische Aufnahmen der Zellen gezeigt.

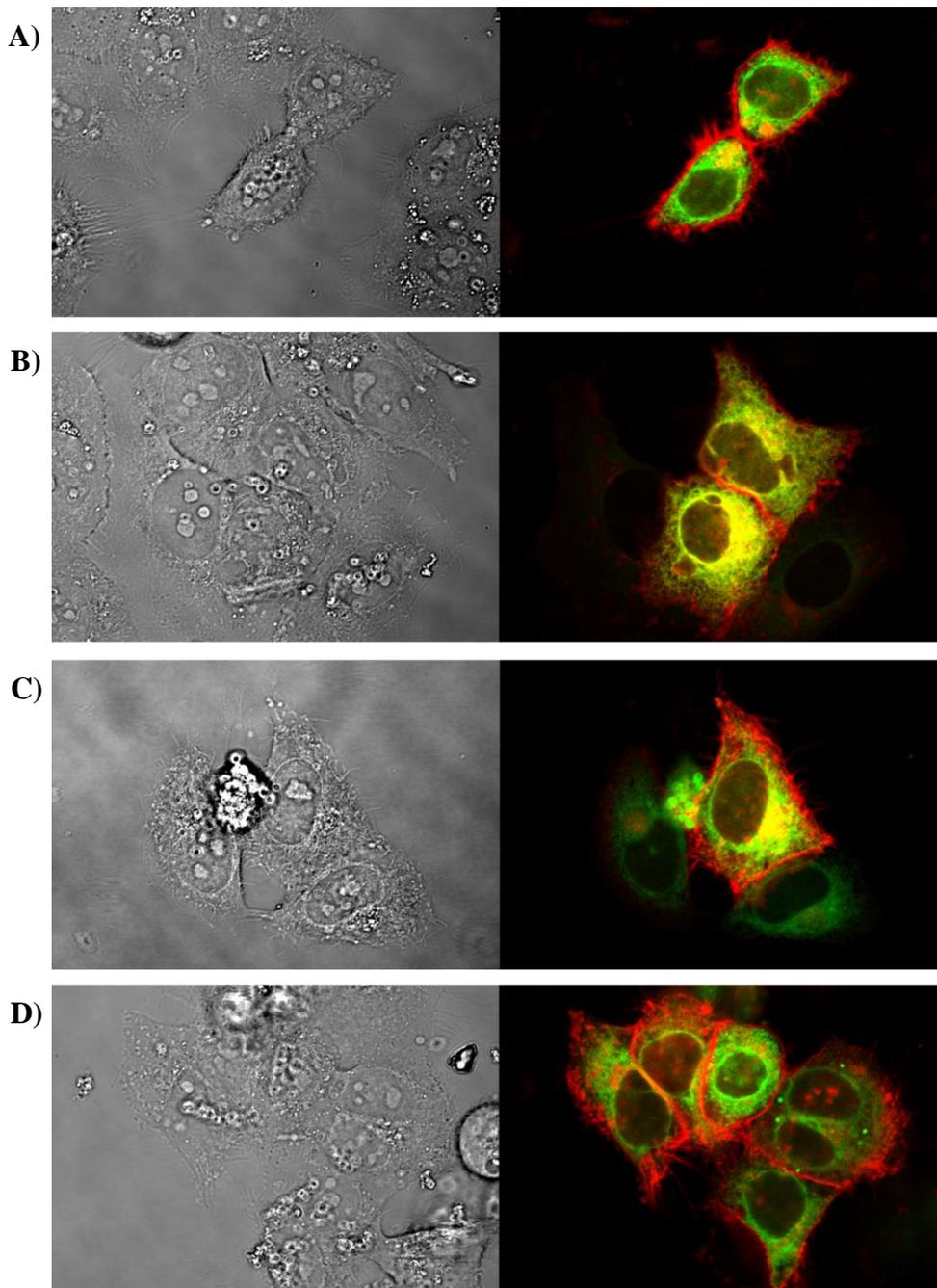


Abbildung 12: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Expression von eGFP-KDEL (grün) und der entsprechenden GLUT1-mCherry Variante (rot). Objektiv: C-Apochromat 63x, Filter: „mCherry Ch2:578-673“ und „GFP ChS1:496-554“. A) GLUT1-mCherry, B) GLUT1-mCherry-KKAA, C) GLUT1-mCherry-Erd21-C-Terminus, D) GLUT1-mCherry-Erd21-C-Terminus-K/A.

Abbildung 12 A zeigt eine deutliche Plasmamembran-Lokalisation von GLUT1-mCherry sowie eine geringe Co-Lokalisation im sekretorischen Weg. Durch Anfügen des Retentionsmotivs KKAA verringerte sich die Intensität der mCherry-Fluoreszenz an der

Plasmamembran und es trat eine verstärkte Co-Lokalisation mit eGFP-KDEL auf, was auf eine überwiegende Rückhaltung des GLUT1-mCherry-KKAA Fusionsproteins schließen lässt (Abbildung 12 B). Auch das Anfügen des Erd21-C-Terminus führte zu einer vermehrten Co-Lokalisation mit eGFP-KDEL, welche in diesem Fall nicht ganz so ausgeprägt war wie unter Verwendung der KKAA-Variante, aber deutlicher auftrat als bei GLUT1-mCherry (Abbildung 12 C). Die Aufnahmen der GLUT1-mCherry-Erd21-C-Terminus-K/A Variante zeigten dagegen kaum gelbe Strukturen, die auf eine Co-Lokalisation mit eGFP-KDEL hindeuten, sodass die C-terminalen Lysin-Reste wahrscheinlich für die erfolgreiche Retention entscheidend sind (Abbildung 12 D). Auch wenn die Effekte in Säugerzellen nicht ganz so deutlich ausfielen wie in Hefen, scheint der C-Terminus des humanen KDELRL zumindest teilweise eine Retention von GLUT1 im Sekretionsweg bewirken zu können.

3.2.3. Vergleichende Lokalisation verschiedener KDELRL1-Varianten

Zur Analyse der KDELRL-Lokalisation müssen getaggte Rezeptor-Varianten verwendet werden, da kein KDELRL-spezifischer Antikörper zur Verfügung steht. In vorherigen Studien wurden meist C-terminal getaggte Rezeptoren eingesetzt, wobei vor allem Fusionen mit den fluoreszierenden Proteinen mCherry oder eGFP sowie mit dem Epitop-Tag V5 untersucht wurden. Da der C-Terminus des KDELRL wahrscheinlich für dessen korrekte Lokalisation entscheidend ist (Cabrera *et al.*, 2003), könnte besonders die C-terminale Fusion des verhältnismäßig großen Fluoreszenzproteins mCherry eine Fehllokalisierung auslösen. Zur Adressierung dieser Fragestellung wurde daher eine KDELRL1-Variante mit HA-Tag hergestellt, das sich im zytosolisch lokalisierten Loop 3 des Rezeptors zwischen den Aminosäuren D87 und G88 befindet. Diese HA-getaggte KDELRL1-Variante wurde mit KDELRL1-mCherry in HeLa-Zellen co-exprimiert und nach erfolgtem Immunostaining mit anti-HA Antikörpern zur vergleichenden Analyse der Lokalisation beider KDELRL1-Konstrukte am CLSM eingesetzt (Abbildung 13).

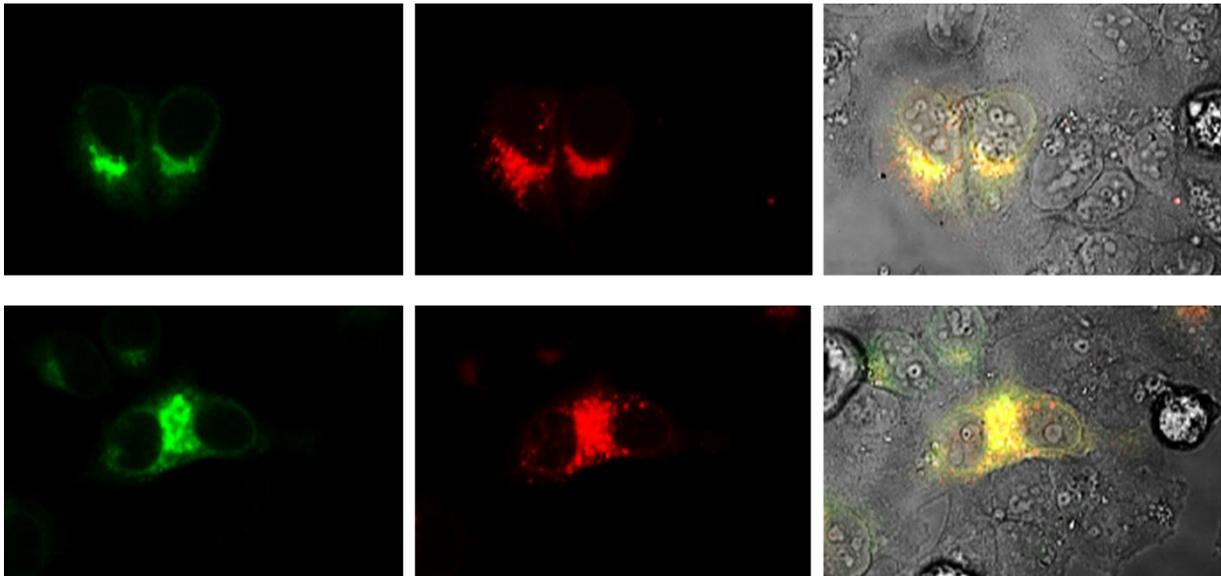


Abbildung 13: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Co-Expression von KDELR1-HA (grün) und KDELR1-mCherry (rot). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion fixiert, permeabilisiert und KDELR1-HA mit anti-HA Antikörpern (1:500) sowie FITC-gekoppelten Sekundäntikörpern markiert. Die Aufnahmen erfolgten unter Verwendung des Objektivs C-Apochromat 63x und der Filter „GFP ChS1:496-554“ zur Detektion von FITC sowie „mCherry Ch2:578-673“.

In Abbildung 13 sind zwei exemplarische Aufnahmen der vergleichenden KDELR1-Lokalisation gezeigt. Es lässt sich erkennen, dass eine deutliche Co-Lokalisation der beiden Varianten in ER/Golgi-Strukturen vorlag. Dennoch war die Lokalisation der HA-getaggten KDELR1-Variante etwas konzentrierter und strukturierter, während die KDELR1-mCherry-Signale weiter verteilt und eher punktuell erschienen. Zur Untersuchung, ob diese Beobachtung auf die Maskierung eines potentiellen C-terminalen Retentionsmotivs zurückzuführen ist, wurden KDELR-mCherry Varianten mit KCAA-Fusion, erneuter Fusion des KDELR-C-Terminus sowie seiner K/A-substituierten Variante hergestellt und ihre Lokalisation mittels CLSM analysiert. Es konnte weder in Hefen noch in humanen Zellen ein deutlicher Unterschied in der Lokalisation der entsprechenden Konstrukte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), sodass die mCherry-Fusion die Erkennung der C-terminalen KDELR-Sequenz nicht zu verhindern scheint. Der leichte Unterschied zur Lokalisation der KDELR1-HA Variante könnte daher eher durch die Größe des entstandenen KDELR1-mCherry Fusionsproteins bedingt sein, als durch die Maskierung eines möglichen Retentionsmotivs. Zur Analyse der KDELR-Lokalisation scheinen sich Varianten mit kleinen Epitop-Tags also besser zu eignen, als KDELR-Varianten mit einer Fluoreszenzprotein-Fusion.

3.3. CRISPR/Cas9-vermittelter KO der KDELRs in Säugerzellen

3.3.1. HDR-basierte CRISPR/Cas9-Technologie

Zur Herstellung einer KDELR1-KO Zelllinie wurde zuerst ein HDR („homology-directed repair“)-basiertes System von SantaCruz Biotechnology verwendet. Dieses System beinhaltet ein knock-out (KO)-Plasmid, das sowohl die gRNA- als auch die Cas9-Sequenz enthält, sowie ein HDR-Plasmid, das durch homologe Rekombination die Insertion eines RFP- und eines Puromycin-Resistenz-Gens (Puromycin^R-Gen) an der Stelle des DNA-Doppelstrangbruchs ermöglicht. Dazu wurde ein Gemisch aus drei KO-Plasmiden mit jeweils unterschiedlichen gRNA-Sequenzen von SantaCruz bestellt sowie ein Gemisch der entsprechenden HDR-Plasmide. Die gRNAs wurden dabei ebenfalls von der Firma gewählt und befinden sich in Exon 2 (gRNA1 und gRNA2) und Exon 4 des *KDELR1*-Gens. Zur Generierung der KO Zelllinie wurden HeLa-Zellen mit beiden Plasmid-Gemischen co-transfiziert und 48 h nach der Transfektion durch Puromycin-haltiges Medium selektiert. Anschließend wurden je 0,3 Zellen pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät, um Einzelzellkolonien zu erhalten. Hieraus resultierten neun Kolonien, die hinsichtlich eines KDELR1-KO untersucht wurden. Zur Analyse wurde genomische DNA isoliert und als PCR-Template eingesetzt. Durch Verwendung von Primern, welche die jeweiligen gRNA-Bereiche flankieren, sollte eine RFP/Puromycin^R-Insertion und somit ein erfolgreicher KDELR1-KO identifiziert werden. Die Analyse wurde allerdings durch einige unspezifische PCR-Produkte im Bereich der ersten beiden gRNAs erschwert. Der Bereich der dritten gRNA konnte spezifisch amplifiziert werden. Jedoch trat bei jeder Kolonie ein kleines PCR-Produkt auf, das auf ein intaktes *KDELR1*-Gen in diesem Bereich schließen lässt, sodass bestenfalls ein monoallelischer KO vorliegen könnte (Daten nicht gezeigt). Da das gleichzeitige Targeting von drei unterschiedlichen KDELR1-Bereichen eine genaue Analyse erheblich erschwert, wurde das Experiment unter Verwendung eines einzelnen KO-Plasmids sowie dem entsprechenden HDR-Plasmid wiederholt. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Amplifikation des Exon 2-Bereiches sowie der Präsenz einer alternativen KDELR1-Spleißvariante, die am Ende von Exon 2 beginnt und von einem KO durch gRNA1 oder gRNA2 nicht betroffen wäre, wurden KO- und HDR-Plasmide für einen gRNA3-vermittelten KO bestellt. Nach erneuter Transfektion von HeLa-Zellen, Selektion in Puromycin-haltigem Medium und Aussäen von einzelnen Zellen in Wells einer 96-Well Platte konnten 13 Kolonien zum Wachstum gebracht werden, deren genomische DNA anschließend hinsichtlich eines KDELR1-KO untersucht wurde (Abbildung 14).

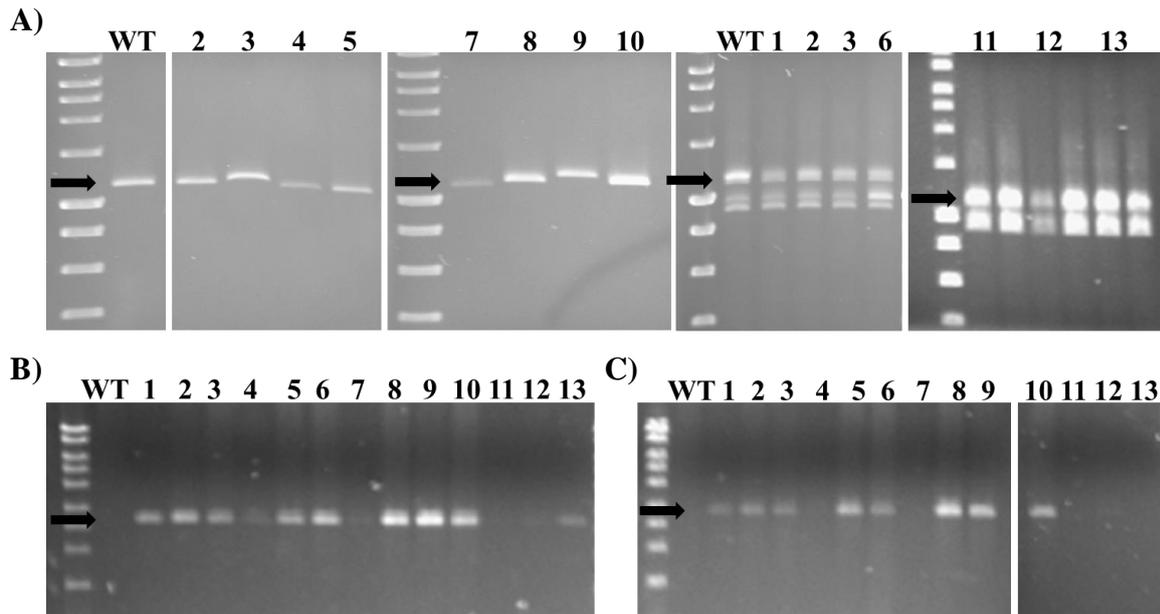


Abbildung 14: PCR-Analyse potentieller KDELRL1-KO Kolonien. A) PCR mit Primern zur Amplifikation von Exon 4 der genomischen KDELRL1-DNA (1176 bp ohne Insert, 3903 bp mit Insert), B) PCR mit Primern zur Amplifikation der RFP/Puromycin^R-Kassette (2735 bp), C) PCR mit 5'-Primer zur Amplifikation der RFP/Puromycin^R-Kassette und 3'-Primer zur Amplifikation von Exon 4 der genomischen KDELRL1-DNA (etwa 2900 bp). Die Größe der entsprechenden PCR-Produkte ist jeweils durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

In Abbildung 14 A) lässt sich erkennen, dass alle untersuchten Kolonien ein intaktes *KDELRL1*-Gen aufwiesen, da ein PCR-Produkt von etwa 1176 bp entstand, was der Größe des amplifizierten Bereiches ohne Insertion entspricht. Die Analyse der RFP/Puromycin^R-Insertion machte deutlich, dass bei den Kolonien 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9 und 10 eine homologe Rekombination stattgefunden hat (Abbildung 14 B). Auch bei den Kolonien 4, 7, 12 und 13 ließen sich schwache Signale bei etwa 2735 bp erkennen, die auf eine Insertion der RFP/Puromycin^R-Kassette hindeuten. Aus Abbildung 14 C geht hervor, dass diese Insertion zumindest bei den Kolonien 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9 und 10 an der gewünschten Position stattgefunden hat, was auf eine erfolgreiche Disruption des *KDELRL1*-Gens schließen lässt. Da bei diesen Kolonien sowohl ein intakter Exon 4-Bereich des *KDELRL1*-Gens als auch eine Insertion in diesem Bereich gezeigt werden konnte, lag hier wahrscheinlich ein monoallelscher KDELRL1-KO vor.

Der Versuch wurde zusätzlich mit HEK293-Zellen durchgeführt, deren Vereinzelung jedoch nicht gelang. Nach der Selektion mit Puromycin-haltigem Medium sollten dennoch nur Zellen vorliegen, bei denen eine Insertion der RFP/Puromycin^R-Kassette und somit ein möglicher KDELRL1-KO stattgefunden hat. Daher wurde auch hier eine PCR-Analyse mit Primern

durchgeführt, die den Bereich der gRNA-Sequenz flankieren sowie PCRs zur Detektion der inserierten Kasette (Abbildung 15).

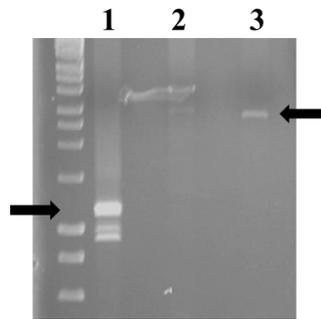


Abbildung 15: PCR-Analyse einer potentiellen KDELRL1-KO Kultur von HEK293-Zellen. Spur 1: PCR mit Primern zur Amplifikation von Exon 4 der genomischen KDELRL1-DNA (1176 bp ohne Insert, 3903 bp mit Insert), Spur 2: PCR mit Primern zur Amplifikation der RFP/Puromycin^R-Kasette (2735 bp), Spur 3: PCR mit 5'-Primer zur Amplifikation der RFP/Puromycin^R-Kasette und 3'-Primer zur Amplifikation von Exon 4 der genomischen KDELRL1-DNA (etwa 2900 bp). Die Größe der entsprechenden PCR-Produkte ist jeweils durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Abbildung 15 zeigt, dass sowohl ein PCR-Produkt entstanden ist, welches auf ein intaktes *KDELRL1*-Gen schließen lässt (Spur 1), als auch ein PCR-Produkt, das auf eine erfolgreiche Insertion der RFP/Puromycin^R-Kasette hindeutet (Spur 3). Die Variation in der Signalstärke der jeweiligen PCR-Produkte könnte auf eine unterschiedliche Effizienz der jeweiligen PCR-Reaktionen zurückgeführt werden, die sowohl durch die verschiedenen Primer als auch die Differenz in der Größe der PCR-Produkte bedingt sein könnte. Da die Analyse jedoch nicht mit einer homologen Einzelkolonie durchgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Zellen ohne Insertion beziehungsweise mit einer Insertion außerhalb des *KDELRL1*-Gens in der generierten Kultur vorhanden waren.

Zur Untersuchung der Auswirkung des monoallelischen KDELRL1-KO auf den mRNA-Gehalt der KDELRLs wurde mRNA von wildtypischen HeLa- beziehungsweise HEK293-Zellen sowie den entsprechenden monoallelischen KDELRL1-KO Zellen isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. Anschließend wurde jeweils die gleiche Menge an cDNA zur Amplifikation der drei KDELRLs mittels PCR verwendet. In Abbildung 16 sind die erhaltenen PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung gezeigt.



Abbildung 16: PCR-Amplifikation von KDELR1, KDELR2 und KDELR3 aus cDNA wildtypischer und monoallelischer KDELR1-KO Zellen. Nach erfolgter mRNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde jeweils die gleiche Menge an cDNA zur PCR-Reaktion eingesetzt. Spur 1: KDELR1 in wildtypischen HeLa-Zellen, Spur 2: KDELR1 in monoallelischen KDELR1-KO HeLa-Zellen, Spur 3: KDELR1 in wildtypischen HEK293-Zellen, Spur 4: KDELR1 in monoallelischen KDELR1-KO HEK293-Zellen, Spur 5: KDELR2 in wildtypischen HeLa-Zellen, Spur 6: KDELR2 in monoallelischen KDELR1-KO HeLa-Zellen, Spur 7: KDELR2 in wildtypischen HEK293-Zellen, Spur 8: KDELR2 in monoallelischen KDELR1-KO HEK293-Zellen, Spur 9: KDELR3 in wildtypischen HeLa-Zellen, Spur 10: KDELR3 in monoallelischen KDELR1-KO HeLa-Zellen, Spur 11: KDELR3 in wildtypischen HEK293-Zellen, Spur 12: KDELR3 in monoallelischen KDELR1-KO HEK293-Zellen. Die Größe des entsprechenden PCR-Produkts (636 bp) ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Das Ergebnis der PCR-Amplifikation zeigt, dass sowohl in den monoallelischen KDELR1-KO HeLa- als auch HEK293-Zellen weniger KDELR1-mRNA vorlag als in den entsprechenden wildtypischen Zellen. Die Menge an KDELR2- und KDELR3-mRNA schien dagegen nicht zu variieren, wobei alle Zelllinien eine sehr geringe Menge an KDELR3-mRNA aufwiesen. Eine quantitative Analyse konnte mit dieser Methode jedoch nicht erfolgen, da keine möglichen Unterschiede in der Effizienz der Primer sowie der einzelnen Reaktionsansätze berücksichtigt wurden. Eine Reduktion der KDELR1-mRNA in den jeweiligen monoallelischen KO Zelllinien konnte aber erfolgreich demonstriert werden.

3.3.2. NHEJ-basierte CRISPR/Cas9-Technologie

Aufgrund der beobachteten Schwierigkeiten unter Verwendung der HDR-basierten CRISPR/Cas9-Methode wurde eine andere Strategie für die weiteren Versuche zur Generierung einer vollständigen KDELR1-KO Zelllinie gewählt. Diese beruht auf der Reparatur des erzeugten DNA-Doppelstrangbruchs durch nicht-homologes Endjoining (NHEJ), wobei meistens kleine Insertionen oder Deletionen stattfinden, die eine Verschiebung des Leserasters zur Folge haben. Zur Transfektion wurden zwei Plasmide verwendet, von denen eines die gRNA-Sequenz enthält und das andere für die Cas9-Endonuklease codiert, die über ein 2-A-Peptid an eGFP gekoppelt ist. Somit liegt in einer Zelle immer die gleiche Menge an Cas9 und eGFP vor, sodass Zellen mit einer starken Cas9-Expression über eine intensive grüne Fluoreszenz identifiziert werden können. Die Auswahl

der gRNA-Sequenzen erfolgte mithilfe des Tools E-CRISP, das aus einer gegebenen Sequenz mögliche gRNA-Sequenzen für die gewählte Cas9-Endonuklease ermittelt und diese bezüglich ihrer off-Target Vorhersage bewertet. Da eine alternative Spleißvariante von KDELR1 existiert, deren Startcodon am Ende von Exon 2 lokalisiert ist, wurden die ersten beiden Exons der genomischen KDELR1-DNA als mögliche Target-Sequenzen ausgeschlossen. Die drei ausgewählten gRNAs befinden sich in Exon 3 und Exon 4 der Rezeptorsequenz und sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: gRNAs zur Generierung eines KDELR1-KO, deren Bezeichnung, Lokalisation, Sequenz und Vorhersage der möglichen off-Target Sequenzen unter Angabe der variierenden Basenzahl (mismatch). Die Auswahl erfolgte mit Hilfe des Tools E-CRISP.

Zielgen	Exon	gRNA-Bezeichnung	Sequenz (*E-CRISP) und PAM	off-Targets mit 1/2/3 mismatches
KDELR1	3	gRNA1.1	GGGTGAAGTCATGATTGACC AGG	0/1/3
KDELR1	4	gRNA1.2	GGTCGAAGAAGCCCTCGAAA TGG	0/0/1
KDELR1	4	gRNA1.3	GATCTGGCGCTACCATTTCG AGG	0/0/0

Die gewählten gRNA-Sequenzen wurden im Plasmid pGS-gRNA-Neo der Firma GeneScript bestellt, ebenso das Cas9-exprimierende Co-Plasmid pcDNA3.3-Cas9-2A-eGFP. Zur Versuchsdurchführung wurden HeLa-Zellen mit pcDNA3.3-Cas9-2A-eGFP sowie jeweils einem der drei pGS-gRNA-Neo Plasmide co-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit der stärksten grünen Fluoreszenz unter Verwendung eines Cell-Sorters in Wells einer 96-Well Platte vereinzelt. Für jede der drei gRNAs wurden drei 96-Well Platten mit einzelnen Zellen versehen. Aus diesen etwa 846 einzelnen Zellen sind insgesamt nur 24 Kolonien entstanden, wobei zwölf aus pGS-gRNA1.1-Neo-transfizierten Zellen hervorgingen und jeweils sechs aus pGS-gRNA1.2-Neo- beziehungsweise pGS-gRNA1.3-Neo-transfizierten Zellen. Die jeweiligen Target-Bereiche der entstandenen Kolonien wurden mittels PCR amplifiziert und zur Analyse eines möglichen KO sequenziert. Jedoch wiesen alle 24 Kolonien wildtypische Sequenzen auf, sodass kein erfolgreicher KDELR1-KO stattgefunden hat. Aufgrund der geringen Kolonien-Anzahl wurde in Erwägung gezogen, dass ein KDELR1-KO letal sein könnte und deshalb nur diejenigen Zellen überlebt haben, bei denen kein KO stattgefunden hat. Daher wurden für den nächsten Versuchsansatz zusätzlich gRNAs gewählt, die einen KO von KDELR2 und KDELR3 vermitteln und in Tabelle 10 dargestellt sind.

Tabelle 10: gRNAs zur Generierung eines KDELR2- beziehungsweise KDELR3-KO, deren Bezeichnung, Lokalisation, Sequenz und Vorhersage der möglichen off-Target Sequenzen unter Angabe der variierenden Basenzahl (mismatch). Die Auswahl erfolgte mit Hilfe des Tools E-CRISP.

Zielgen	Exon	gRNA-Bezeichnung	Sequenz (*E-CRISP) und PAM	off-Targets mit 1/2/3 mismatches
KDELR2	1	gRNA2.1	GGATGACGATGGCCGCCAGG TGG	0/0/4
KDELR2	1	gRNA2.2	GATGACGATGGCCGCCAGGT GGG	0/0/3
KDELR2	3	gRNA2.3	GGACCACCAGAACTCCACT CGG	0/0/9
KDELR3	1	gRNA3.1	GCAGCAAGATCATGGCCAGG AGG	0/2/18
KDELR3	2	gRNA3.2	GAACAGGTCCAGGTACCTGG TGG	0/1/34
KDELR3	3	gRNA3.3	GGACCAGAAGAACTCCAGG CGG	0/0/15

Nach erneuter Transfektion von HeLa- beziehungsweise HEK293-Zellen und Sorten der Zellen mit einer starken grünen Fluoreszenz, konnte bei allen transfizierten Zellen erneut ein starkes Zellsterben beobachtet werden, während untransfizierte Zellen nach einiger Zeit adhärirten. Da die Letalität eines KDELR2- beziehungsweise KDELR3-KO unwahrscheinlich ist, könnte eine zu starke Cas9-Aktivität für das Sterben der Zellen verantwortlich sein. Daher wurden im folgenden Versuch nach Transfektion von HEK293-Zellen die Bedingungen beim Sorten geändert und neben stark grün fluoreszierenden Zellen auch 96-Well Platten mit einzelnen Zellen versehen, die eine mittlere und eine schwache Fluoreszenzintensität aufwiesen. Die Zellen wurden anschließend kultiviert und die Anzahl an entstandenen Kolonien für jede Sorting-Bedingung ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt.

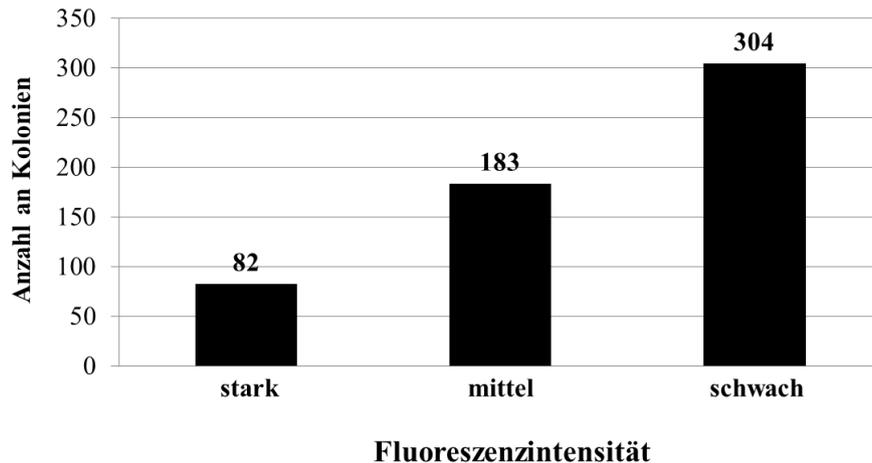


Abbildung 17: Gesamtzahl der Kolonien von HEK293-Zellen in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität. Die Anzahl der Kolonien wurde für jede Bedingung (starke, mittlere und schwache eGFP-Fluoreszenzintensität) ermittelt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Die maximale Anzahl an möglichen Kolonien für jede Bedingung betrug 846, da für jeden der drei Rezeptoren jeweils drei verschiedene gRNAs gewählt wurden.

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass nur wenige der stark grün fluoreszierenden Zellen zu Kolonien heran gewachsen sind, während mehr als doppelt so viele Kolonien aus Zellen mit einer mittel starken Fluoreszenzintensität entstanden waren. Die Anzahl der Kolonien aus schwach fluoreszierenden Zellen war wiederum deutlich höher als aus Zellen mit einer mittel starken Fluoreszenz. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Zellsterben mit einer zu starken Cas9-Expression korreliert, die eventuell eine vermehrte Ansteuerung von off-Targets verursachen könnte.

Anschließend wurde ein großer Teil der Kolonien mittels PCR und Sequenzierung bezüglich eines KDELR-KO analysiert. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Sequenzierungen von Kolonien mit einem möglichen KDELR1-KO zusammengefasst.

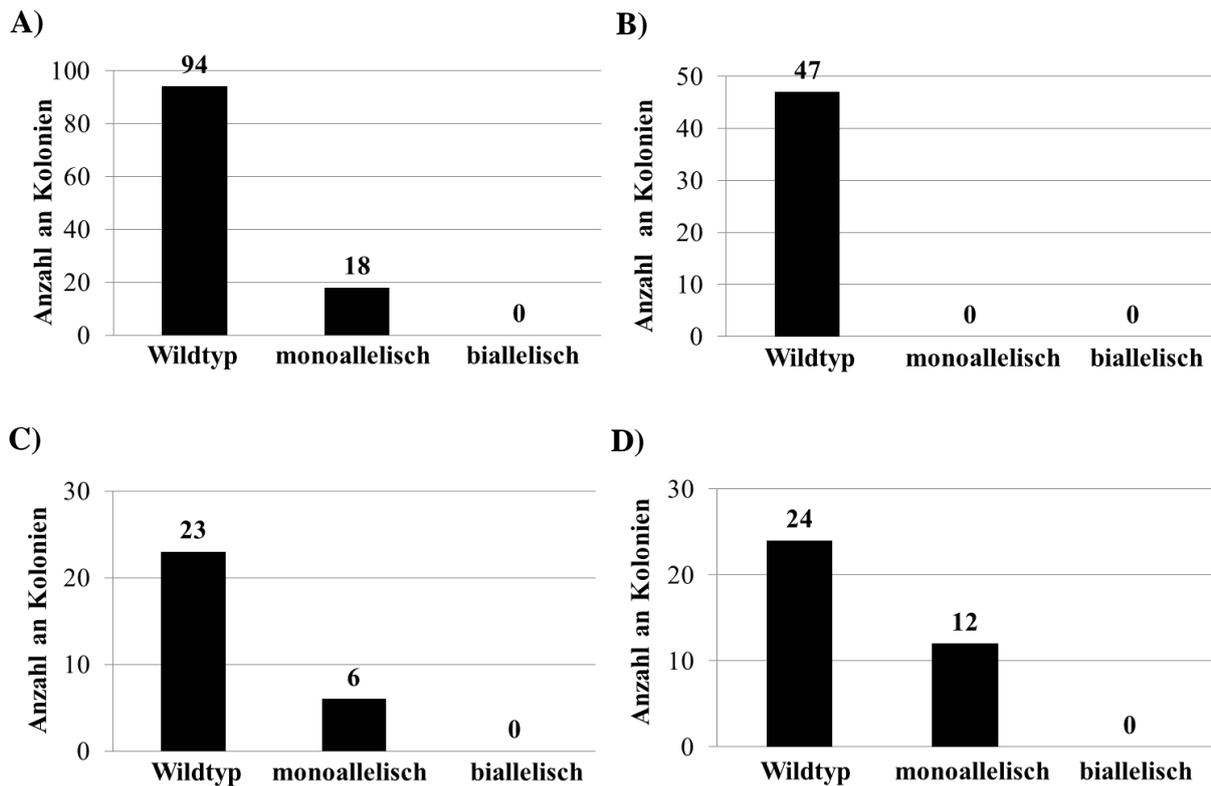


Abbildung 18: Zusammenstellung der Sequenzierungsergebnisse von HEK293-Kolonien mit einem möglichen KDELRL1-KO. A) Gesamtergebnis der KDELRL1-Sequenzierung, B) Ergebnis der Sequenzierungen für Target 1, C) Ergebnis der Sequenzierungen für Target 2, D) Ergebnis der Sequenzierungen für Target 3. „Wildtyp“: Kolonien mit wildtypischen Sequenzen, „monoallelisch“: Kolonien mit Mutationen auf einem Allel, „biallelisch“: Kolonien mit Mutationen auf beiden Allelen.

Abbildung 18 zeigt, dass insgesamt 112 Kolonien sequenziert wurden, von denen 94 eine wildtypische Sequenz und 18 Kolonien Mutationen auf einem Allel aufwiesen. Keine der Kolonien zeigte eine Mutation in der KDELRL1-Sequenz auf beiden Allelen. Bei Betrachtung der drei unterschiedlichen Targetsequenzen, die von den jeweiligen gRNAs adressiert wurden fällt auf, dass bei Target 1 keine Mutationen auftraten. gRNA1.1 scheint also kein effizientes Cas9-Targeting vermitteln zu können. Da sowohl bei Target 2 als auch bei Target 3 Mutationen stattgefunden haben, scheinen gRNA1.2 und gRNA1.3 einen KDELRL1-KO vermitteln zu können. Das Ausbleiben von Mutationen auf beiden Allelen könnte auf eine Letalität des KDELRL1-KO in HEK293-Zellen hindeuten.

Die Sequenzierungsergebnisse der Kolonien mit einem möglichen KDELRL2-KO sind in Abbildung 19 zusammengefasst und beschränken sich auf Target 3, da keine erfolgreiche PCR-Amplifikation des Target 1- und Target 2-Bereichs möglich war.

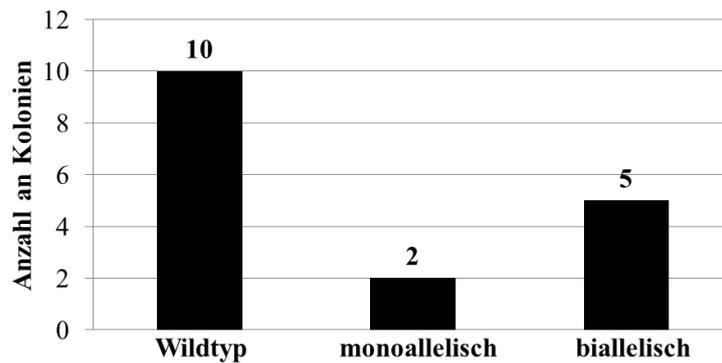


Abbildung 19: Sequenzierung von HEK293-Kolonien mit möglichem KDEL R2-KO im Bereich von Target 3. „Wildtyp“: Kolonien mit wildtypischen Sequenzen, „monoallelisch“: Kolonien mit Mutationen auf einem Allel, „biallelisch“: Kolonien mit Mutationen auf beiden Allelen.

Aus Abbildung 19 geht hervor, dass fünf Kolonien Mutationen in der KDEL R2-Sequenz auf beiden Allelen aufwiesen. Die Generierung einer KDEL R2-KO Zelllinie war also erfolgreich. Die Tatsache, dass von nur 17 getesteten Kolonien, fünf Kolonien biallelische Mutationen enthielten, unterstützt die Vermutung der Letalität eines KDEL R1-KO, da hier bei 112 untersuchten Kolonien keine biallelischen Mutationen auftraten.

In Abbildung 20 ist das Ergebnis der Sequenzierung von Kolonien mit einem möglichem KDEL R3-KO dargestellt.

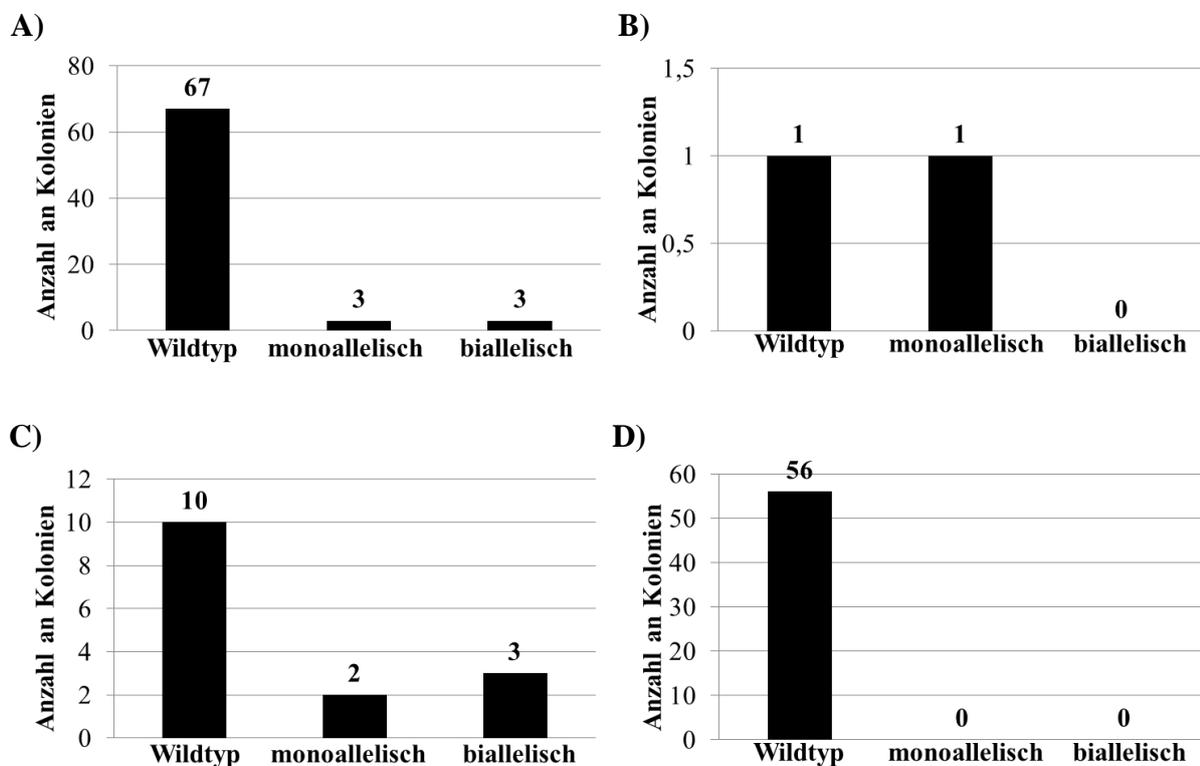


Abbildung 20: Zusammenstellung der Sequenzierungsergebnisse von HEK293-Kolonien mit einem möglichem KDEL R3-KO. A) Gesamtergebnis der KDEL R3-Sequenzierungen, B) Ergebnis der Sequenzierungen für Target 1, C) Ergebnis der Sequenzierung für Target 2, D) Ergebnis der

Sequenzierung für Target 3. „Wildtyp“: Kolonien mit wildtypischen Sequenzen, „monoallelisch“: Kolonien mit Mutationen auf einem Allel, „biallelisch“: Kolonien mit Mutationen auf beiden Allelen.

Abbildung 20 zeigt, dass drei Kolonien mit Mutationen in der KDEL3-Sequenz auf beiden Allelen identifiziert werden konnten. Somit ist die Herstellung einer KDEL3-KO Zelllinie ebenfalls gelungen. Bei Betrachtung der Sequenzierungen von Target 3-Bereichen fällt auf, dass nur wildtypische Kolonien vorlagen. gRNA3.3 scheint demnach kein gezieltes Targeting der Cas9-Endonuklease vermitteln zu können, während sich gRNA3.1 und gRNA3.2 als funktionell erwiesen.

3.3.3. Genomische Charakterisierung der KDEL3-KO Zelllinien

Da die Generierung einer KDEL1-KO HEK293-Zelllinie nicht erfolgreich war, wurde zur Charakterisierung eine HAP1-Zelllinie mit KDEL1-KO von der Firma Horizon bestellt. Hierbei handelt es sich um eine Fibroblasten-ähnliche, haploide Zelllinie aus einem Leukämie-Isolat. Diese KDEL1-KO Zelllinie wurde ebenfalls unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Technologie hergestellt, wobei die Target-Sequenz direkt am Beginn von Exon 1 lokalisiert ist. Zur Verifizierung der beschriebenen Mutation wurde der Bereich der genomischen DNA mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 21 dargestellt.

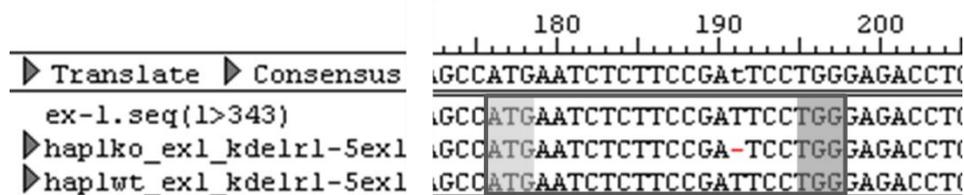


Abbildung 21: Sequenzierung des KDEL1-Lokus in HAP1-Zellen nach Alignment mit der Software *SeqMan*. Die obere Sequenz (ex-1) repräsentiert die Vergleichssequenz, die mittlere Sequenz (haplko) zeigt das Sequenzierungsergebnis der KDEL1-KO HAP1-Zelllinie und die untere Sequenz (haplwt) das der wildtypischen HAP1-Zelllinie. Die Deletion von „T“ in der mittleren Sequenz ist durch einen roten Bindestrich gekennzeichnet. Die jeweiligen Start-Codons zu Beginn der Rezeptorsequenz sind hellgrau, die PAM-Sequenz der Cas9-Endonuklease dunkelgrau hinterlegt. Die Targetsequenz der gRNA mit anschließender PAM-Sequenz ist dunkelgrau umrandet.

Die Sequenzierung der KDEL1-KO Zelllinie zeigte eine Deletion der Base „T16“, welche zu einer Verschiebung des Leserasters und dadurch zu einem vorzeitigen Stopp-Codon am Ende von Exon 2 der Rezeptorsequenz führen sollte. Die Zellen sollten also nicht in der Lage sein, ein vollständiges KDEL1-Protein zu synthetisieren. Da die generierte Mutation jedoch nicht die alternative Spleißvariante von KDEL1 beeinträchtigt, die eine verkürzte KDEL1-

Version mit Start-Codon am Ende von Exon 2 darstellt, kann die Präsenz einer zumindest teilweise funktionellen KDELR1-Variante nicht ausgeschlossen werden. Dies würde auch das Überleben der HAP1-Zellen mit KDELR1-KO im Unterschied zum möglicherweise letalen KDELR1-KO in HEK293-Zellen erklären, in denen die generierte Mutation auch die Spleißvariante betreffen würde. Zur Überprüfung der Funktionalität dieser Spleißvariante wurde die entsprechende cDNA-Sequenz in den hefespezifischen Expressionsvektor pRS315 kloniert und zur Transformation der $\Delta erd2$ -Mutante YA12 verwendet. Anschließend wurde eine FOA-Selektion durchgeführt, wobei das *SEC12*-exprimierende Plasmid eliminiert wird, das den letalen *ERD2*-Verlust dieser Mutante kompensiert, sodass nur Hefen mit einer funktionellen *ERD2*-Variante im pRS315-Vektor überleben können. Das Ergebnis der FOA-Selektion ist in Abbildung 22 dargestellt.

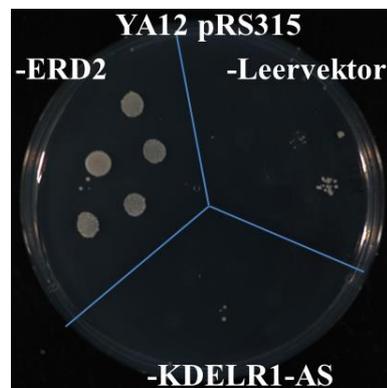


Abbildung 22: Ergebnis der FOA-Selektion. Der Hefestamm YA12 wurde mit dem Plasmid pRS315 zur Expression der alternativen KDELR1-Spleißvariante (KDELR1-AS) transformiert und zur FOA-Selektion eingesetzt. Als Kontrollen wurden zusätzlich Transformanten mit dem entsprechenden Leervektor sowie einer pRS315 Variante mit wildtypischer *ERD2*-Sequenz verwendet. Das Wachstum der Kolonien wurde nach fünf Tagen Inkubation bei 30 °C dokumentiert.

Die FOA-Selektion zeigte, dass nur Hefen mit *ERD2*-Expression Kolonien gebildet haben, während Hefen mit Leervektor und pRS315 KDELR1-AS kein Wachstum aufwiesen. Dieses Ergebnis würde darauf hindeuten, dass die alternative Spleißvariante zumindest den Verlust von Erd2p in Hefen nicht alleine kompensieren kann. Allerdings kann hiermit nicht ausgeschlossen werden, dass diese verkürzte KDELR1-Variante das Überleben von Säugerzellen mit KDELR1-KO sichern könnte, die zusätzlich noch eine *KDELR2*- und *KDELR3*-Expression aufweisen. Zur Analyse der alternativen Spleißvariante in HAP1-Zellen wurden die Zellen mit einer mCherry-getaggten Variante transfiziert. Es konnte jedoch keine Expression nachgewiesen werden, was auch einen Grund für das Ergebnis der FOA-Selektion darstellen könnte. Aufgrund des fehlenden Antikörpers konnte hier die Expression der ungetaggten Variante jedoch nicht überprüft werden, sodass eine nähere Charakterisierung der

vorzeitigen Stopp-Codons am Ende von Exon 3 resultiert und die Expression einer vollständigen KDELR2-Variante in diesen Zellen verhindert.

Zur Analyse des KDELR3-KO in HEK293-Zellen wurde ebenfalls eine Kolonie gewählt. Da hier allerdings nur Kolonien mit unterschiedlichen Mutationen auf beiden Allelen vorlagen, war das Ergebnis der Sequenzierung im Vergleich zur KDELR2-Mutation nicht so einfach zu interpretieren (Abbildung 24).

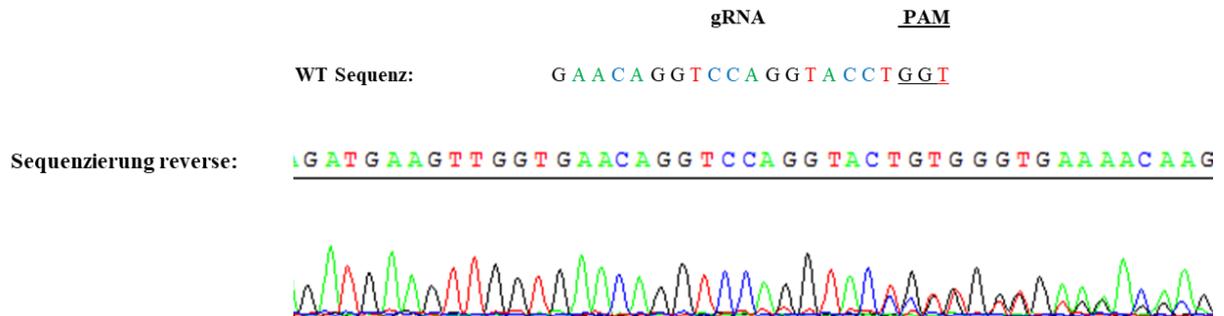


Abbildung 24: Sequenzierungsergebnis der gewählten Kolonie zur Analyse eines KDELR3-KO. Dargestellt ist die reverse Sequenzierung der Target-Sequenz mit den entsprechenden Sequenzierungs-Peaks sowie die wildtypische Vergleichssequenz.

Die Sequenzierung der gewählte Kolonie wies auf einem Allel eine Deletion der Base „C“ und auf dem anderen Allel eine Insertion der Base „C“ auf. Da ab dieser Stelle zwei unterschiedliche Sequenzen vorlagen, traten gleichzeitig Peaks für zwei verschiedene Basen auf. Die Deletion sollte dabei ein vorzeitiges Stopp-Codon am Ende von Exon 2 und die Insertion ein Stopp-Codon in Exon 3 der KDELR3-Sequenz verursachen. Die Expression einer vollständigen KDELR3-Variante sollte daher in dieser Zelllinie nicht erfolgen können.

3.3.4. Veränderung des Transkriptoms durch einen KDELR-KO

3.3.4.1. Transkriptomanalyse von HAP1-Zellen

Zur Analyse der Auswirkung eines KDELR1-KO wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt, wobei wildtypische HAP1-Zellen mit der KDELR1-KO Zelllinie verglichen wurden. Zusätzlich wurde ein Vergleich zwischen wildtypischen HAP1-Zellen und wildtypischen HAP1-Zellen, die 30 min mit 1 mM YTSEKDEL-Peptid behandelt wurden durchgeführt. Durch die Inkubation mit diesem KDEL-tragenden Liganden sollten mögliche KDELRs an der Plasmamembran aktiviert werden, was zu einer Stimulierung von Signalkaskaden und möglicherweise zu einer Veränderung des Transkriptoms führen könnte (Pelham *et al.*, 1993; Henderson *et al.*, 2013). Zum Vergleich dieser drei Proben wurden

jeweils biologische Triplikate zur mRNA-Isolierung hergestellt. Anschließend wurden cDNA-Banken generiert und mittels „Illumina Sequencing“ analysiert. Die Auswertung der Transkriptomanalyse erfolgte in Kooperation mit Dr. Marcel Schulz (High-throughput Genomics & Systems Biology, Max-Planck-Institut für Informatik).

3.3.4.1.1. Vergleich wildtypischer HAP1-Zellen und Peptid-behandelter HAP1-Zellen

Die YTSEKDEL-behandelten Zellen zeigten keine deutliche Veränderung des Transkriptoms im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine signifikante Deregulierung (adjusted p-value < 0,05) konnte hier lediglich für fünf Gene ermittelt werden, die weder untereinander noch bezüglich einer möglichen Auswirkung der Peptid-Behandlung in Zusammenhang gebracht werden konnten (Tabelle 11).

Tabelle 11: Differenziell regulierte Gene in HAP1-Zellen nach 30 min Behandlung mit dem Peptid YTSEKDEL. Gezeigt sind die Gen-ID, der Gen-Name, Name und Funktion des entsprechenden Proteins sowie Fold-Change und adjusted p-value.

Gen-ID	Gen-Name	Protein	Funktion	Fold-Change	Adjusted p-value
ENSG0000099715.14	PCDH11Y	Protocadherin 11 Y	Entwicklung von Nervenzellen	2,459	0,0000937
ENSG00000205704.6	LINC00634	-	„Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 634“	-4,410	0,0007201
ENSG00000267173.1	AC245748.1	AC245748.1	Nicht charakterisiert	7,448	0,0007201
ENSG00000280807.2	TUBGCP5	Gamma-tubulin complex component 5	Mikrotubuli Nukleation am Centrosom	-7,529	0,0008469
ENSG00000076555.15	ACACB	Acetyl-CoA Carboxylase	Fettsäuresynthese	-1,101	0,0015899

Die durchgeführte Analyse zeigte, dass eine Peptid-Behandlung keinen deutlichen Einfluss auf das Transkriptom von HAP1-Zellen nahm. Es wäre möglich, dass das Peptid durch Endozytose internalisiert wird oder dass durch KDELR-Bindung an der Zelloberfläche eine Signalkaskade ausgelöst wird, die zwar eine zelluläre Antwort generiert, aber dabei keine Veränderung des Transkriptoms bewirkt. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch eine kürzere beziehungsweise längere Peptid-Inkubationszeit, eine Variation der Peptidkonzentration oder die Verwendung einer anderen Zelllinie auch eine Veränderung des Transkriptoms hätte auftreten können.

3.3.4.1.2. Vergleich wildtypischer HAP1-Zellen und KDELR1-KO Zellen

Der Vergleich wildtypischer HAP1-Zellen mit KDELR1-KO Zellen wies dagegen 370 differenziell regulierte Gene (DEGs, adjusted p-value < 0,05) auf, sodass eine deutliche Veränderung des Transkriptoms vorlag (siehe Anhang, Tabelle A2). Die Varianz der KDELR1-KO Zellen gegenüber wildtypischer HAP1-Zellen ist in Abbildung 25 durch eine Principal Component Analyse (PCA) dargestellt.

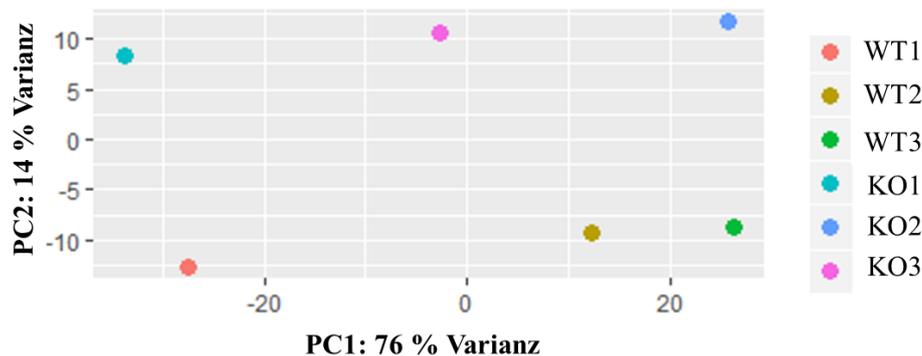


Abbildung 25: Principal Component Analyse zur Darstellung der Varianz zwischen den jeweiligen Proben. Verglichen wurden die Triplikate der wildtypischen HAP1-Zellen (WT1, WT2, WT3) und die Triplikate der KDELR1-KO HAP1-Zellen (KO1, KO2, KO3).

Abbildung 25 zeigt eine deutliche Abgrenzung der KDELR1-KO Proben zu den Proben wildtypischer HAP1-Zellen (PC2), sodass eine erhebliche Auswirkung des KDELR1-KO auf das Transkriptom der Zellen nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich war eine Varianz zwischen den jeweiligen Triplikaten erkennbar (PC1), die unter jeder Bedingung etwa gleich stark ausgeprägt war und sich eventuell auf Batch-Effekte bei der Probenvorbereitung zurückführen lassen könnte.

Eine genauere Darstellung der Auswirkung des KDELR1-KO erfolgte durch die Erstellung eines MA-Plots, der den Mittelwert der normalisierten Counts in Abhängigkeit vom entsprechenden Fold-Change präsentiert (Abbildung 26).

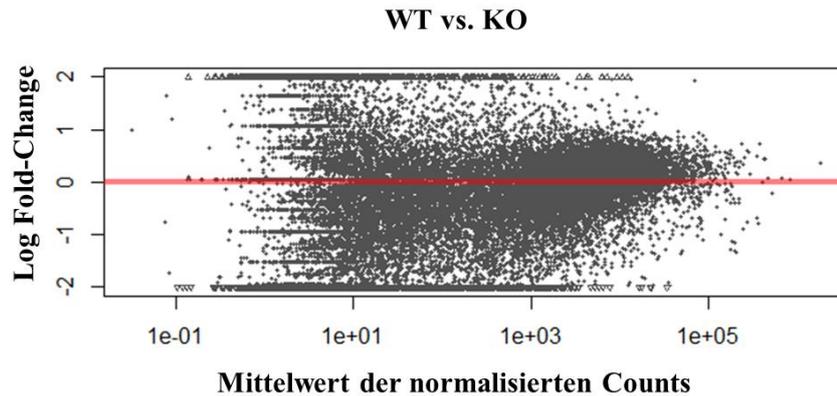


Abbildung 26: MA-Plot zur Veranschaulichung des Effekts eines KDELR1-KO auf das Transkriptom von HAP1-Zellen im Vergleich zu wildtypischen HAP1-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten Counts in Abhängigkeit vom entsprechenden Fold-Change.

In Abbildung 26 lässt sich erkennen, dass einige Transkripte eine deutliche Veränderung in ihrer Anzahl im Vergleich zu wildtypischen Zellen aufwiesen (Fold-Change < -2 beziehungsweise > 2) und dass viele dieser Transkripte auch in ausreichender Menge vorlagen, um einen relevanten Effekt durch diese Veränderung erzeugen zu können. Das Transkriptom der KDELR1-KO Zellen zeigte demnach wesentliche Unterschiede im Vergleich zu wildtypischen HAP1-Zellen.

Zur vertiefenden Untersuchung der DEGs wurde eine GO („Gene Ontology“) -Analyse durchgeführt, die neun signifikant veränderte Terme identifizierte: „developmental process“, „extracellular matrix component“, „biological adhesion“, „multicellular organismal process“, „cellular developmental process“, „extracellular matrix“, „regulation of cell adhesion“, multicellular organism development“ und „glycosaminoglycan binding“. Unter Verwendung des Tools REVIGO (Supek *et al.*, 2011) wurden diese in drei interaktiven Grafiken visualisiert, welche in Abbildung 27 gemeinsam dargestellt sind.

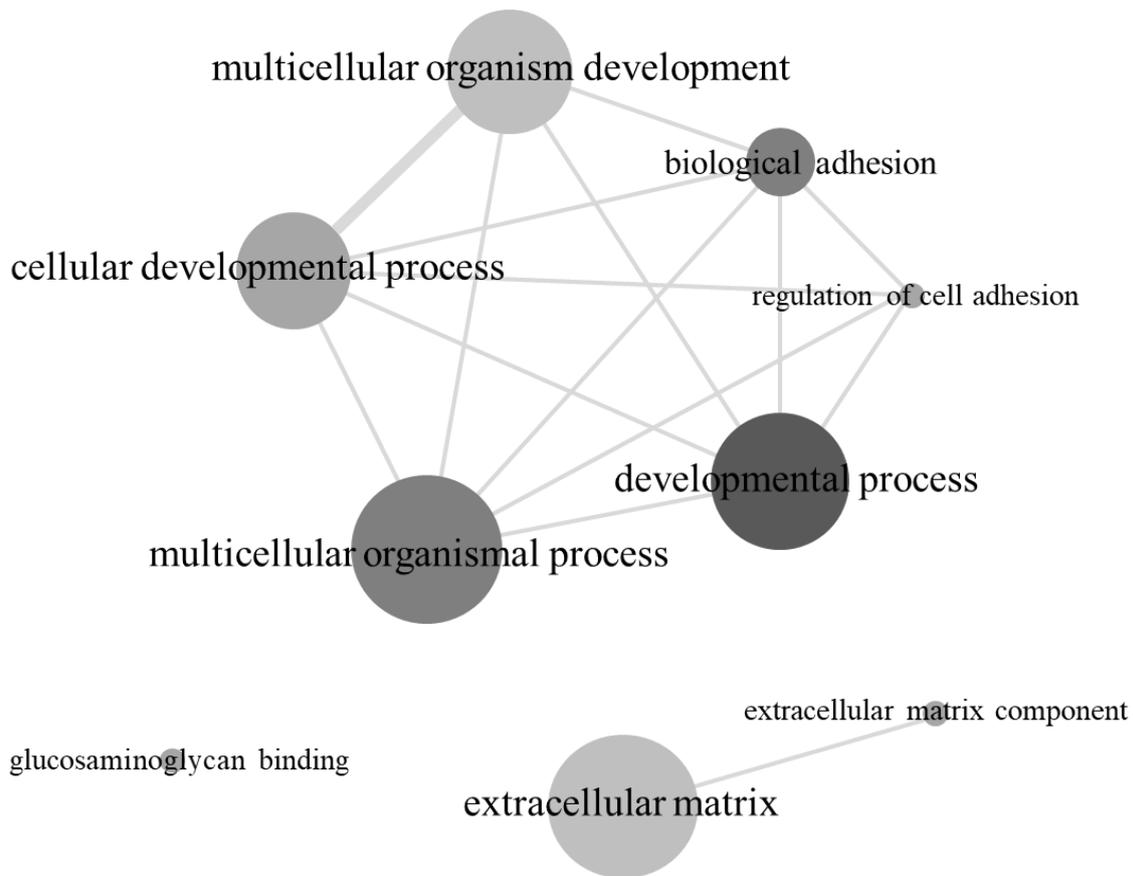


Abbildung 27: Visualisierung signifikant veränderter GO-Terme in KDEL R1-KO Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen. Die in der GO-Analyse signifikant veränderten GO-Terme (adjusted p-value < 0,001) wurden bei REViGO gemeinsam mit ihren adjusted p-values zur Erstellung der interaktiven Grafiken eingegeben („allowed similarity“: medium (0,7), „database“: homo sapiens, „semantic similarity measure“: SimRel). Die Größe der Kreise spiegelt die Frequenz des entsprechenden GO-Terms in der verwendeten Datenbank wider, während intensivere Graustufen eine höhere Signifikanz in der GO-Analyse repräsentieren. Ähnliche GO-Terme sind durch Linien miteinander verbunden, wobei die Linienbreite den Grad der Ähnlichkeit aufzeigt.

Aus Abbildung 27 geht hervor, dass sechs der neun signifikant veränderten GO-Terme miteinander vernetzt sind. Es handelt sich hierbei vor allem um Prozesse, welche die Entwicklung und Adhäsion von Zellen regulieren. Bezüglich der Entwicklungsprozesse kann anhand der Größe der Kreise erkannt werden, dass die Frequenz dieser GO-Terme in der verwendeten Datenbank sehr hoch ist, während die beiden GO-Terme, die mit der Zelladhäsion in Zusammenhang stehen, seltener auftreten.

Zusätzlich zu diesem Netzwerk ließ sich eine deutliche Veränderung von Prozessen erkennen, die in Zusammenhang mit der Extrazellulären Matrix stehen und einen Einfluss auf die Glycosaminoglycan-Bindung nehmen. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits angenommene Beteiligung des KDEL R an der Regulation der Extrazellulären Matrix-Degradation sowie der Zellinvasion (Ruggiero *et al.*, 2014) und liefern somit eine wichtige Grundlage für weitere Analysen hinsichtlich des Migrations- und Adhäsionsverhaltens der KDEL R1-KO Zellen. Da

sich in jedem dieser Prozesse sowohl Gene befanden, deren Expression hochreguliert war, als auch Gene mit verringerter Expression, wurde eine Tabelle erstellt, welche die entsprechenden DEGs der jeweiligen Prozesse mit ihrem Fold-Change auflistet (siehe Anhang, Tabelle A3).

3.3.4.1.3. Vergleich der mRNA-Level der drei KDELRs anhand der Transkriptomanalyse

Zur Charakterisierung der HAP1-Zelllinie bezüglich der KDELR-Expressionslevel wurden die TPMs (Transcripts Per Million) der drei Rezeptoren in wildtypischen Zellen und in KDELR1-KO Zellen verglichen und in Abbildung 28 A dargestellt. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der alternativen Spleißvarianten der drei Rezeptoren hinsichtlich ihrer Expressionslevel (Abbildung 28 B).

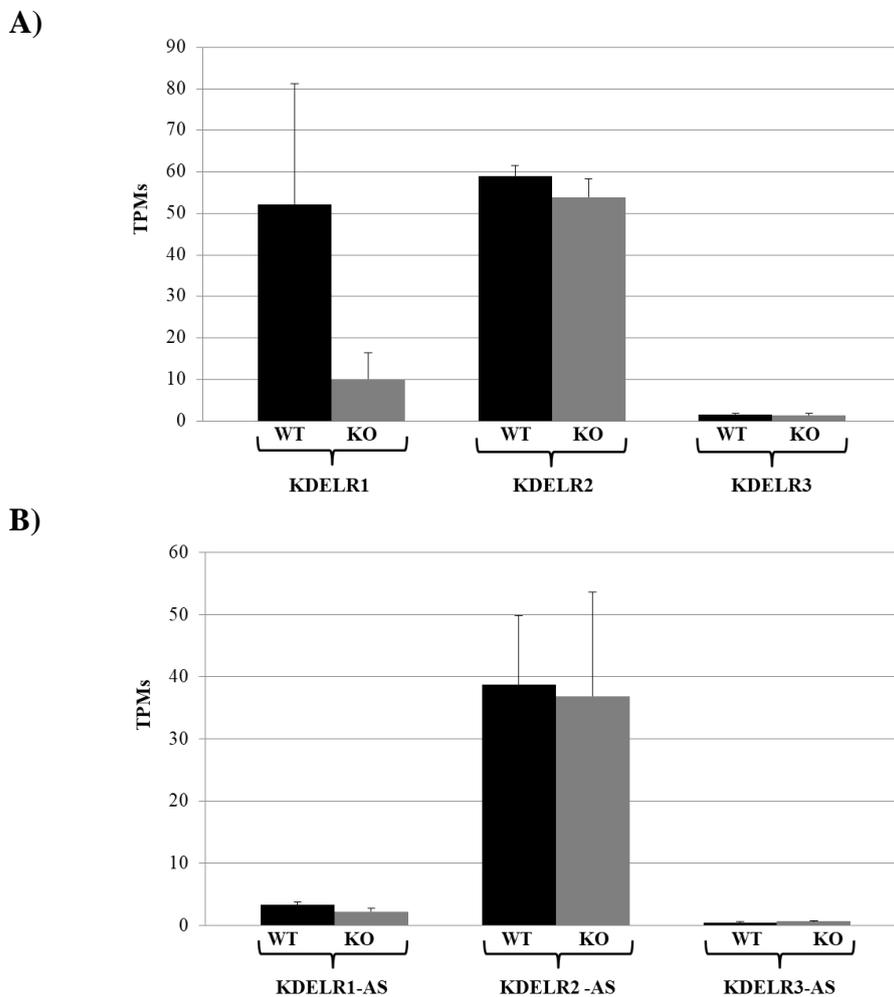


Abbildung 28: Vergleichende Darstellung der Expressionslevel der drei KDELRs (A) sowie deren Spleißvarianten (B) in wildtypischen HAP1-Zellen und KDELR1-KO Zellen. Dargestellt sind die TPM-Mittelwerte der Triplikate und deren Standardabweichungen.

Abbildung 28 zeigt, dass die Menge der KDELR1-mRNA in KDELR1-KO Zellen erheblich verringert war, während die Expressionslevel von KDELR2 und KDELR3 keinen Unterschied in KDELR1-KO zu wildtypischen Zellen aufwiesen. Insgesamt zeigte KDELR2 in HAP1-Zellen ein ähnliches beziehungsweise leicht höheres Expressionslevel wie KDELR1, während die Expression von KDELR3 vernachlässigbar gering war. Die Expressionslevel der alternativen Spleißvarianten schienen in KDELR1-KO Zellen und wildtypischen Zellen ebenfalls nicht zu differieren, wobei eine insgesamt starke Präsenz der alternativen Spleißvariante von KDELR2 in HAP1-Zellen auffiel, die annähernd vergleichbar mit der von KDELR1 und KDELR2 war. Es wäre möglich, dass KDELR2 in HAP1-Zellen insgesamt eine größere Bedeutung zukommt und daher der Verlust von KDELR1 besser ausgeglichen werden kann als in anderen Zelllinien.

3.3.4.2. Quantitative RT-PCR zur Analyse des KDELR2- und KDELR3-KO

Die Auswirkungen des KDELR2- beziehungsweise KDELR3-KO in HEK293-Zellen bezüglich einer möglichen Veränderung des mRNA-Gehalts der beiden verbleibenden KDELRs wurden mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Dazu wurde jeweils mRNA von biologischen Triplikaten wildtypischer HEK293-Zellen, KDELR2- sowie KDELR3-KO Zellen isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA diente als Template für die quantitative RT-PCR, wobei jeweils Primer für β -Actin, KDELR1, KDELR2 und KDELR3 verwendet wurden. In Abbildung 29 ist das Ergebnis der Analyse dargestellt.

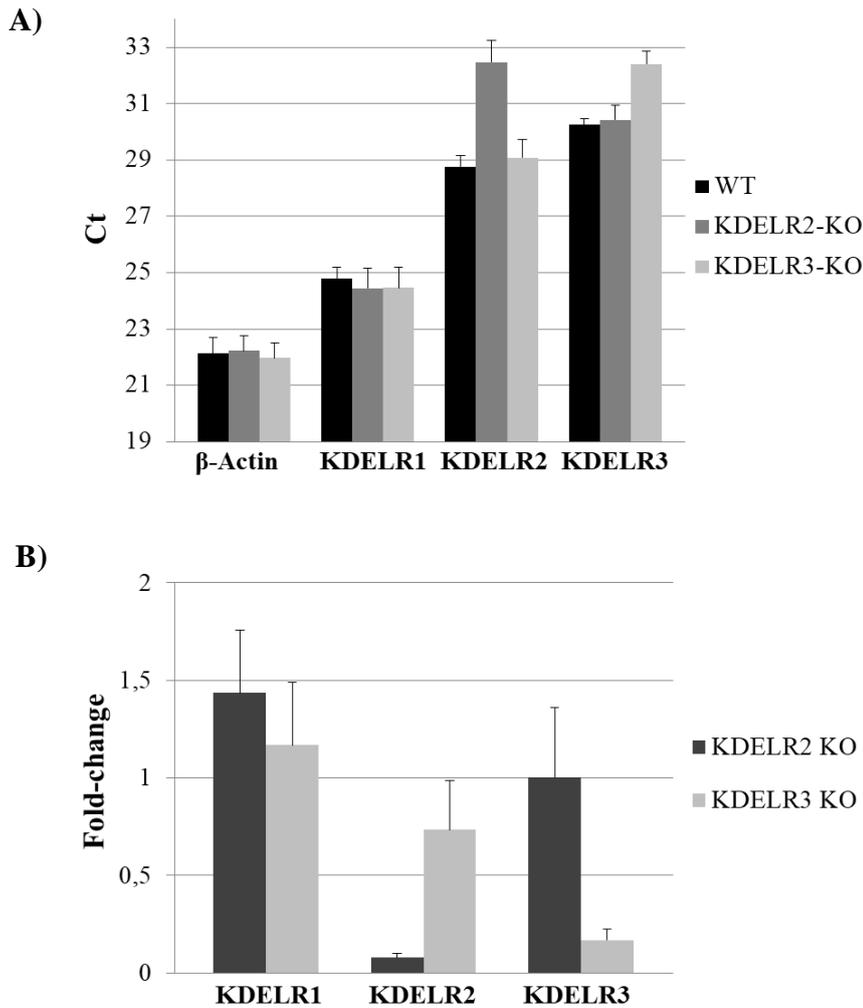


Abbildung 29: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR wildtypischer HEK293-Zellen, KDELR2-KO Zellen sowie KDELR3-KO Zellen. A) Darstellung der Ct-Werte für β -Actin, KDELR1, KDELR2 und KDELR3 nach Normierung anhand der entsprechenden Primer-Effizienzen. B) Darstellung von Fold-changes der KDELR-Expression in KDELR2- und KDELR3-KO Zellen nach Normierung auf β -Actin und wildtypische Bedingungen ($\Delta\Delta$ Ct). Zur Errechnung des Fold-changes wurde die zuvor ermittelte Effizienz der jeweiligen Primer mit dem entsprechenden $\Delta\Delta$ Ct-Wert potenziert und der Logarithmus gebildet. Das Expressionslevel in wildtypischen Zellen entspricht somit jeweils einem Wert von 1.

Aus Abbildung 29 A) geht hervor, dass KDELR1 die stärkste Expression unter den drei KDELRs aufwies, da der Ct-Wert nach weniger Zyklen erreicht war als bei KDELR2 und KDELR3. Die Expression von KDELR2 war deutlich schwächer als die von KDELR1, und KDELR3 zeigte wiederum ein geringeres Expressionslevel als KDELR2. Zusätzlich lässt sich erkennen, dass KDELR2 und KDELR3 in den entsprechenden KO Zelllinien kaum nachzuweisen waren. Abbildung 29 B) zeigt, dass ein 0,076-facher KDELR2-mRNA-Gehalt in der KDELR2-KO Zelllinie im Vergleich zu wildtypischen Zellen vorlag. Die mRNA-Menge von KDELR3 in der KDELR3-KO Zelllinie entsprach etwa dem 0,16-fachen, verglichen mit wildtypischen Zellen. KDELR1 zeigte in keiner der KO Zelllinien einen signifikanten Unterschied zu seiner Expression in wildtypischen Zellen, ebenso wie KDELR3

in der KDELR2-KO Zelllinie und KDELR2 in KDELR3-KO Zellen. Die Analyse bestätigt also den erfolgreichen KO von KDELR2 und KDELR3 in den entsprechenden KO Zelllinien, während keine signifikanten Veränderungen in der Expression der jeweils verbleibenden Rezeptoren zur Kompensation vorlagen.

3.3.4. Charakterisierung der KDELR-KO Zelllinien bezüglich der Sekretion von PDI

Da ein Verlust des KDELR zu einer verstärkten Sekretion von KDEL-Liganden führen sollte, wurde der Kulturüberstand von wildtypischen HAP1-Zellen und KDELR1-KO Zellen bezüglich ihres Gehalts an Proteindisulfidisomerase (PDI) untersucht. Dazu wurde jeweils die gleiche Anzahl an Zellen ausgesät und 24 h inkubiert, um das Adhärenz zu ermöglichen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch FCS-freies Medium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde der Überstand gegen 1 x PBS dialysiert und mittels Zentrifugation über eine VivaSpin-Säule eingengt. Nach Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurde jeweils etwa die gleiche Proteinmenge mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot unter Verwendung von anti-PDI und anti- β -Actin Antikörpern analysiert. Die Signalintensitäten wurden jeweils auf β -Actin normiert und in einem Balkendiagramm vergleichend dargestellt, das in Abbildung 30 gemeinsam mit dem entsprechenden Western Blot gezeigt ist.

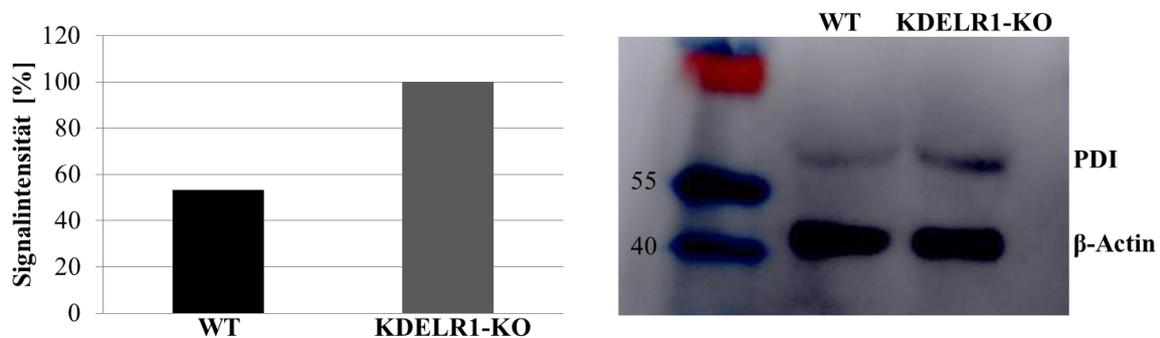


Abbildung 30: Vergleich der extrazellulären Menge an PDI in HAP1-Zellen. Dargestellt ist die PDI-Signalintensität im Überstand wildtypischer Zellen im Vergleich zu KDELR1-KO Zellen. Die Signale wurden auf die Intensität des jeweiligen β -Actin Signals normiert und vergleichend in einem Balkendiagramm dargestellt. Der entsprechende Western Blot zeigt neben der Signale für β -Actin (etwa 42 kDa) und PDI (etwa 60 kDa) die Marker-Banden bei 40 kDa und 55 kDa.

Aus Abbildung 30 geht hervor, dass die PDI-Sekretion in KDELR1-KO Zellen etwa doppelt so stark ausfiel wie in wildtypischen Zellen. Die angenommene vermehrte Sekretion eines KDEL-Liganden konnte in diesem Experiment also bestätigt werden.

Eine mögliche Auswirkung der verstärkten PDI-Sekretion auf den intrazellulären PDI-Gehalt wurde anschließend ebenfalls adressiert. Dazu wurde jeweils die gleiche Menge an wildtypischen HAP1-Zellen und KDELR1-KO Zellen aufgeschlossen und mittels Western

Blot hinsichtlich ihres PDI-Gehalts analysiert. Nach Normierung auf die jeweilige Signalintensität von β -Actin wurde das Ergebnis in einem Balkendiagramm vergleichend dargestellt (Abbildung 31).

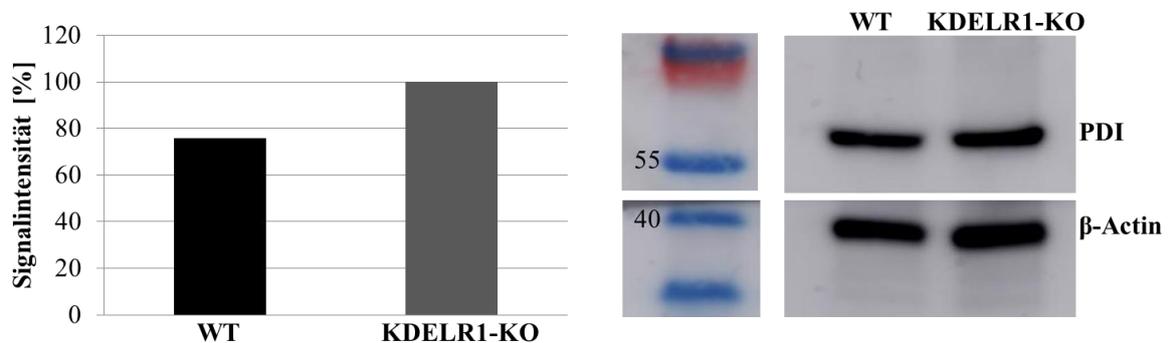


Abbildung 31: Vergleich der intrazellulären Menge an PDI in HAP1-Zellen. Dargestellt ist die PDI-Signalintensität nach Zellaufschluss wildtypischer Zellen im Vergleich zu KDELR1-KO Zellen. Die Signale wurden auf die Intensität des jeweiligen β -Actin Signals normiert und vergleichend in einem Balkendiagramm dargestellt. Der entsprechende Western Blot zeigt neben den Signalen für β -Actin (etwa 42 kDa) und PDI (etwa 60 kDa) die Marker-Banden bei 40 kDa und 55 kDa.

Abbildung 31 zeigt, dass auch der intrazelluläre Gehalt an PDI in KDELR1-KO Zellen leicht erhöht war. Es wäre möglich, dass die Zelle der verstärkten PDI-Sekretion durch eine vermehrte Expression oder einen verringerten Abbau entgegen wirkt. Die Ergebnisse beider Versuche konnten durch eine Wiederholung der Experimente bestätigt werden.

Zur Untersuchung der entsprechenden Effekte durch einen KDELR2- beziehungsweise KDELR3-KO wurden die Experimente ebenfalls mit wildtypischen HEK293-Zellen, KDELR2- und KDELR3-KO Zellen durchgeführt. In Abbildung 32 ist das Ergebnis der beiden Versuche dargestellt.

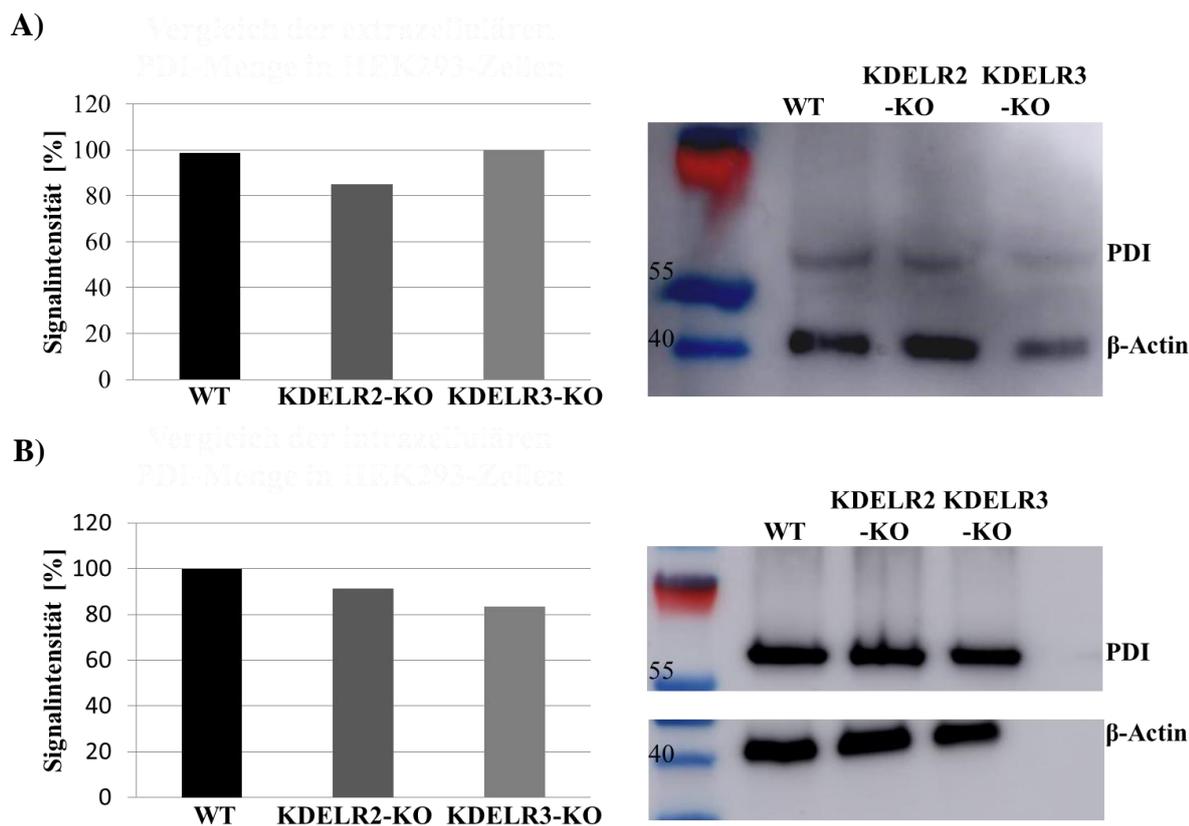


Abbildung 32: Vergleich der Menge an intrazellulärer und sezernierter PDI in HEK293-Zellen. A) Dargestellt ist die PDI-Signalintensität im Überstand wildtypischer Zellen im Vergleich zu KDEL2- und KDEL3-KO Zellen. Die Signale wurden auf die Intensität des jeweiligen β -Actin Signals normiert und vergleichend in einem Balkendiagramm dargestellt. Der entsprechende Western Blot zeigt neben den Signalen für β -Actin (etwa 42 kDa) und PDI (etwa 60 kDa) die Marker-Banden bei 40 kDa und 55 kDa. B) Dargestellt ist die PDI-Signalintensität nach Zellaufschluss wildtypischer Zellen im Vergleich zu KDEL2- und KDEL3-KO Zellen. Die Signale wurden auf die Intensität des jeweiligen β -Actin Signals normiert und vergleichend in einem Balkendiagramm dargestellt. Der entsprechende Western Blot zeigt neben den Signalen für β -Actin (etwa 42 kDa) und PDI (etwa 60 kDa) die Marker-Banden bei 40 kDa und 55 kDa.

In Abbildung 32 lässt sich erkennen, dass weder der extrazelluläre noch der intrazelluläre PDI-Gehalt durch einen KDEL2- beziehungsweise KDEL3-KO erheblich beeinflusst wurden. Die Retention von PDI scheint also hauptsächlich durch KDEL1 zu erfolgen, der auch die höchste Affinität für das klassische KDEL-Motiv am C-Terminus von PDI besitzt. Auch diese Ergebnisse konnten bei einer Wiederholung des Experiments reproduziert werden.

3.3.5. Charakterisierung der KDEL2-KO Zelllinien bezüglich ihrer Reaktion auf ER-Stress

Zur Untersuchung der Auswirkung eines KDEL1-KO auf ER-Stressbedingungen wurden wildtypische HAP1-Zellen sowie KDEL1-KO Zellen 24 h mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin beziehungsweise der entsprechenden Menge an DMSO behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay ermittelt, wobei die Vitalität der DMSO-

Kontrollen als 100 % gesetzt wurde. In Abbildung 33 ist die Reaktion der wildtypischen HAP1-Zellen und der KDELR1-KO Zellen vergleichend dargestellt.

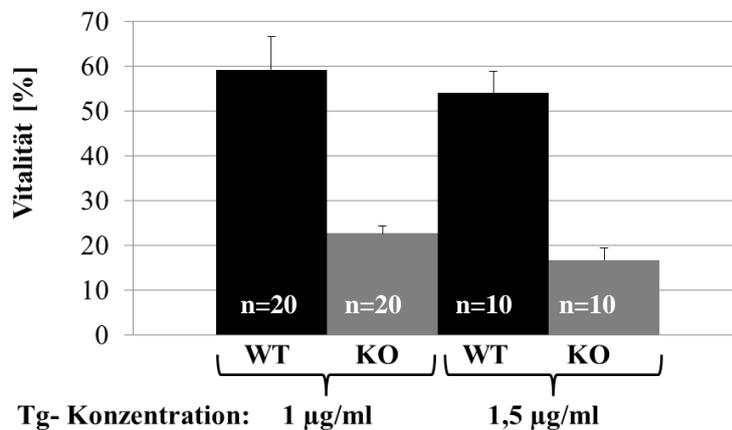


Abbildung 33: Reaktion der HAP1-Zellen auf ER-Stress. Dargestellt ist die Zellvitalität wildtypischer HAP1-Zellen (schwarz) sowie die Vitalität der KDELR1-KO Zellen (grau) nach Behandlung mit Thapsigargin (1 µg/ml beziehungsweise 1,5 µg/ml) für 24 h. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels MTT-Assay, wobei die Vitalität der DMSO-Kontrollen als 100 % angenommen wurde.

Aus Abbildung 33 geht hervor, dass die KDELR1-KO Zellen deutlich sensibler auf ER-Stress reagierten als wildtypische Zellen. Nach Behandlung mit 1 µg/ml Thapsigargin betrug die Vitalität wildtypischer Zellen etwa 60 %, wohingegen die Vitalität der KDELR1-KO Zellen bei etwa 20 % lag. Ein vergleichbarer Effekt trat durch die Behandlung mit 1,5 µg/ml Thapsigargin auf. Hier lag bei wildtypischen Zellen eine Vitalität von etwa 55 % vor, während KDELR1-KO Zellen nur etwa 15 % Vitalität zeigten. Der KDELR1-Verlust schien somit die Stressantwort der Zellen erheblich zu beeinflussen.

Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde untersucht, ob die verminderte Zellvitalität der KDELR1-KO Zellen bei ER-Stress durch eine Plasmid-getriebene Expression von KDELR1 kompensiert werden kann. Dazu wurden die Zellen mit 1 µg/ml beziehungsweise 1,5 µg/ml pcDNA3.1-KDELR1-HA transfiziert und nach 24 h mit 1 µg/ml und 1,5 µg/ml Thapsigargin behandelt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Analyse der Zellvitalität mittels MTT-Assay. Jedoch konnte keine Verbesserung der Zellvitalität bei transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten KDELR1-KO Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die transiente Transfektion der Zellen für dieses Experiment ungeeignet war. Mit dieser Methode lagen sowohl untransfizierte Zellen als auch Zellen mit einer sehr starken KDELR1-Expression vor, was den ER-Stress wiederum verstärkte. Daher konnte das natürliche KDELR1-Expressionslevel von wildtypischen Zellen nicht hergestellt und somit keine Kompensation des Stress-Effekts erreicht werden.

Da bereits eine leichte Verringerung der KDELR1-Menge die Stressantwort der Zellen beeinflussen könnte, wurden auch die generierten HeLa-Zellen mit monoallelischem KDELR1-KO bezüglich ihrer Reaktion auf Thapsigargin untersucht. Das Ergebnis des MTT-Assays ist in Abbildung 34 dargestellt.

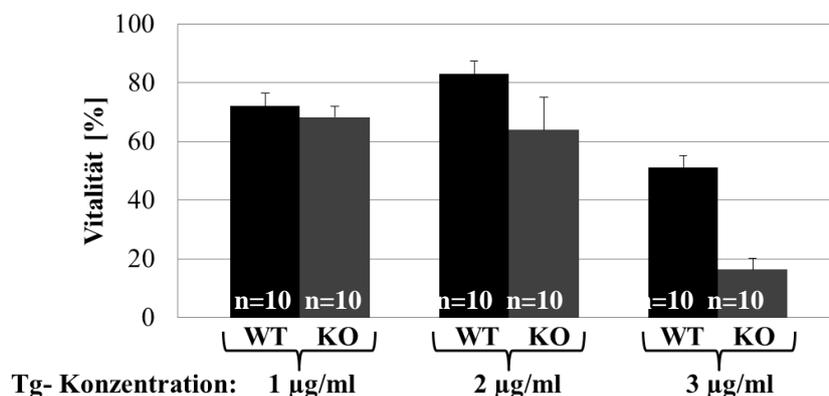


Abbildung 34: Reaktion der HeLa-Zellen auf ER-Stress. Dargestellt ist die Zellvitalität wildtypischer HeLa-Zellen (schwarz) sowie die Vitalität der monoallelischen KDELR1-KO Zellen (dunkelgrau) nach Behandlung mit Thapsigargin (1 µg/ml, 2 µg/ml beziehungsweise 3 µg/ml) für 24 h. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels MTT-Assay, wobei die Vitalität der DMSO-Kontrollen als 100 % angenommen wurde.

Aus Abbildung 34 geht hervor, dass auch der monoallelische KDELR1-KO die Reaktion der Zellen auf ER-Stress beeinflusste. Allerdings trat hier der Effekt erst bei höheren Thapsigargin-Konzentrationen auf. Während die Behandlung mit 1 µg/ml Thapsigargin noch keinen Unterschied zu wildtypischen Zellen bewirkte, wurde die Vitalität der monoallelischen KDELR1-KO Zellen nach Behandlung mit 3 µg/ml Thapsigargin um etwa 35 % im Vergleich zu wildtypischen Zellen vermindert. Da es sich um eine andere Zelllinie handelt, konnte hier kein direkter Vergleich mit den biallelischen KDELR1-KO Zellen erfolgen. Die wildtypischen Zellen beider Zelllinien wiesen jedoch nach Behandlung mit 1 µg/ml Thapsigargin eine ähnliche Vitalität auf (HAP1 etwa 60 %, HeLa etwa 70 %). Bei den HAP1 KDELR1-KO Zellen trat bei dieser Konzentration schon eine Verminderung der Vitalität um etwa 30 % im Vergleich zum Wildtyp auf, während die monoalleischen HeLa KDELR1-KO Zellen erst bei einer Thapsigargin-Konzentration von 3 µg/ml einen ähnlichen Effekt im Vergleich zu den entsprechenden wildtypischen Zellen zeigten. Dies deutet darauf hin, dass eine verminderte Menge an KDELR1 noch ausreichend war, um ein geringes Stresslevel zu regulieren. Bei einer verstärkten Stresssituation verhielten sich die monoallelischen KDELR1-KO Zellen jedoch ebenfalls deutlich sensitiver als wildtypische Zellen.

Die Analyse der HEK293-Zellen bezüglich ihrer ER-Stressantwort erwies sich als problematisch. Unter Verwendung von Thapsigargin zur Induktion von ER-Stress konnte mittels MTT-Assay keine deutliche Verminderung der Zellvitalität im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen erreicht werden. Daher wurde zur Behandlung der HEK293-Zellen Tunicamycin verwendet, welches durch eine Blockierung der N-Glykosylierung ER-Stress auslöst. Auch hier konnte erst unter Verwendung sehr hoher Tunicamycin-Konzentrationen eine leichte Verminderung der Zellvitalität mittels MTT-Assay nachgewiesen werden, die dann zur Untersuchung der KDELR2- und KDELR3-KO Zellen eingesetzt wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 35 dargestellt.

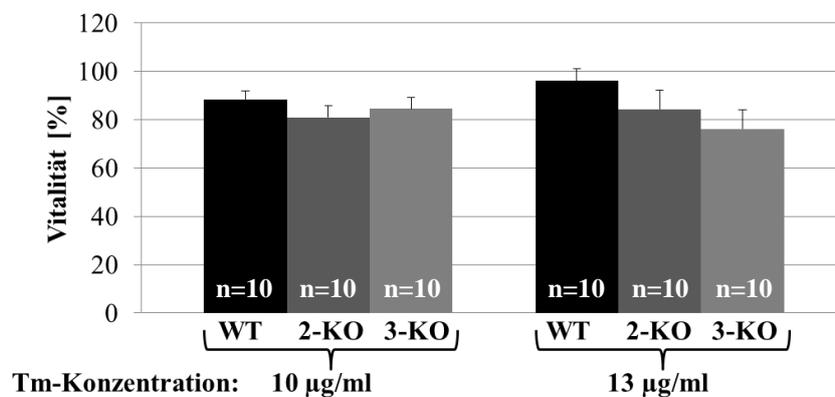


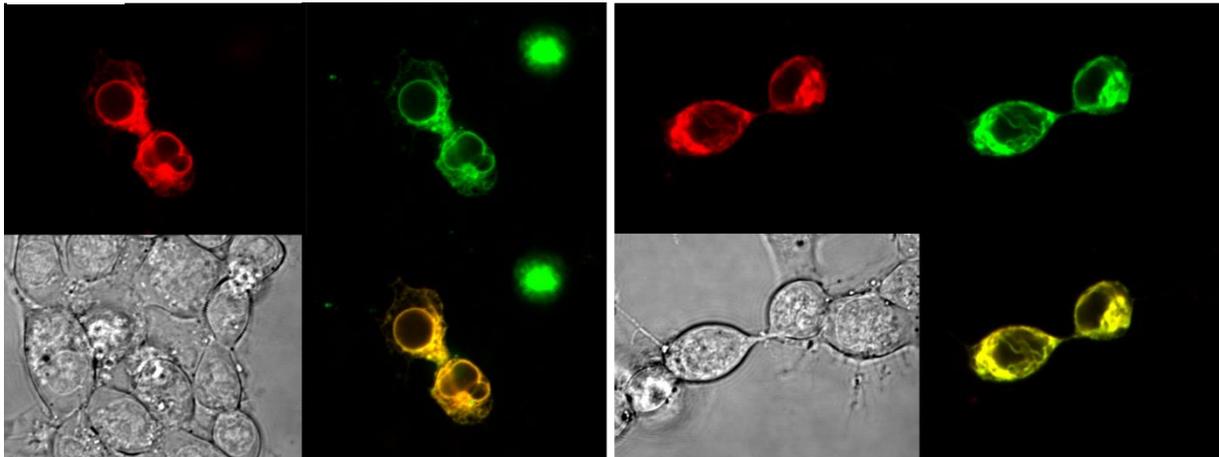
Abbildung 35: Reaktion der HEK293-Zellen auf ER-Stress. Dargestellt ist die Zellvitalität wildtypischer HEK293-Zellen (schwarz) sowie die Vitalität von KDELR2-KO Zellen (dunkelgrau) und KDELR3-KO Zellen (hellgrau) nach Behandlung mit Tunicamycin (10 µg/ml beziehungsweise 13 µg/ml) für 24 h. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels MTT-Assay, wobei die Vitalität der DMSO-Kontrollen als 100 % angenommen wurde.

Abbildung 35 zeigt, dass sowohl die KDELR2-KO Zellen als auch die KDELR3-KO Zellen nur eine sehr leichte Verminderung der Zellvitalität im Vergleich zu wildtypischen Zellen aufwiesen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der ausbleibende Effekt auf ein zu geringes ER-Stresslevel zurückzuführen ist, welches im Laufe der Experimente nicht verbessert werden konnte.

3.3.6. Morphologische Analyse der HAP1-Zellen

Zur Analyse der KDELR1-KO Zellen auf mögliche morphologische Unterschiede wurden sowohl wildtypische HAP1-Zellen als auch die KDELR1-KO Zellen mit Plasmiden zur Expression von eGFP-KDEL und tRFP-KDEL transfiziert. Anschließend wurden CLSM-Aufnahmen der Zellen angefertigt, welche in Abbildung 36 gezeigt sind.

A)



B)

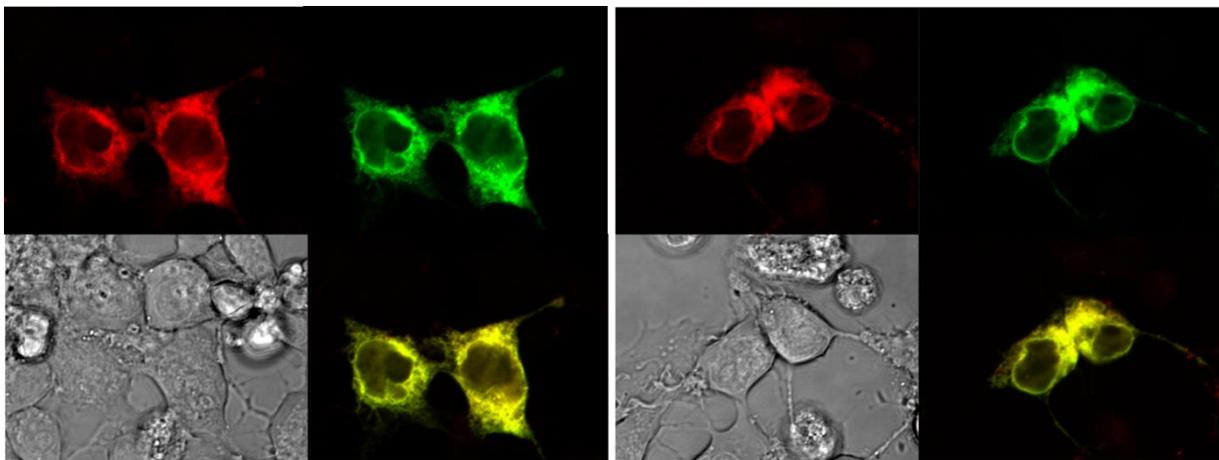


Abbildung 36: CLSM-Aufnahmen von HAP1-Zellen nach Expression von eGFP-KDEL (grün) und tRFP-KDEL (rot). Objektiv: C-Apochromat 63x, Filter: „mCherry Ch2:578-673“ und „GFP ChS1:496-554“. A) wildtypische HAP1-Zellen, B) HAP1-Zellen mit KDELR1-KO.

In Abbildung 36 lässt sich erkennen, dass beide ER-Marker co-lokalisierten und dass bezüglich der Struktur kein deutlicher Unterschied zwischen den KDELR1-KO und den wildtypischen HAP1-Zellen vorlag. Trotz des KDELR1-Verlusts schienen die Zellen somit noch in der Lage zu sein, die KDEL-tragenden Fluoreszenzproteine im Sekretionsweg zu halten.

3.4. Einfluss einer KDELR-Überexpression auf die UPR-Aktivierung in Hefe

In Säugerzellen sind KDELRs an der Regulation der Stressantwort beteiligt, wobei ihr Expressionslevel eine entscheidende Rolle spielt. Ihre Überexpression kann beispielsweise zu einer Aktivierung von Autophagie-Mechanismen führen (Wang *et al.*, 2011). Zur Untersuchung, ob eine Überexpression von *ERD2* in Hefen zu einer Aktivierung der UPR („unfolded protein response“) führt, wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Ségolène

Bompierre (2016) verschiedene Strategien heran gezogen. Da bei UPR-Aktivierung eine verstärkte Expression von Chaperonen erfolgt, wurde zuerst der Proteingehalt von Kar2p mittels Western Blot adressiert. Dazu wurde der Hefestamm BY4742 mit den Plasmiden pRS316 Erd2-V5 und pYES Erd2-V5 sowie den entsprechenden Leervektoren transformiert und zur Induktion der Expression in Galaktose-haltigem Medium kultiviert. Durch pRS316 Erd2-V5 sollte hierbei eine moderate Überexpression und durch pYES Erd2-V5 eine starke Überexpression des KDELR gewährleistet werden. Die Hefen mit den entsprechenden Leervektoren dienten als Negativkontrolle oder wurden zur Generierung von Positivkontrollen für drei Stunden mit 20 µg/ml Tunicamycin zur UPR-Aktivierung behandelt. Anschließend wurde jeweils die gleiche Zellzahl der Proben aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die jeweiligen Kar2p-Signalintensitäten wurden auf die Ladekontrolle Rpn12p normiert und die Steigerung der Signalintensitäten nach Tunicamycin-Behandlung beziehungsweise *ERD2*-Überexpression im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen in einem Balkendiagramm dargestellt. In Abbildung 37 sind das Ergebnis des Western Blots sowie das entsprechende Balkendiagramm gezeigt.

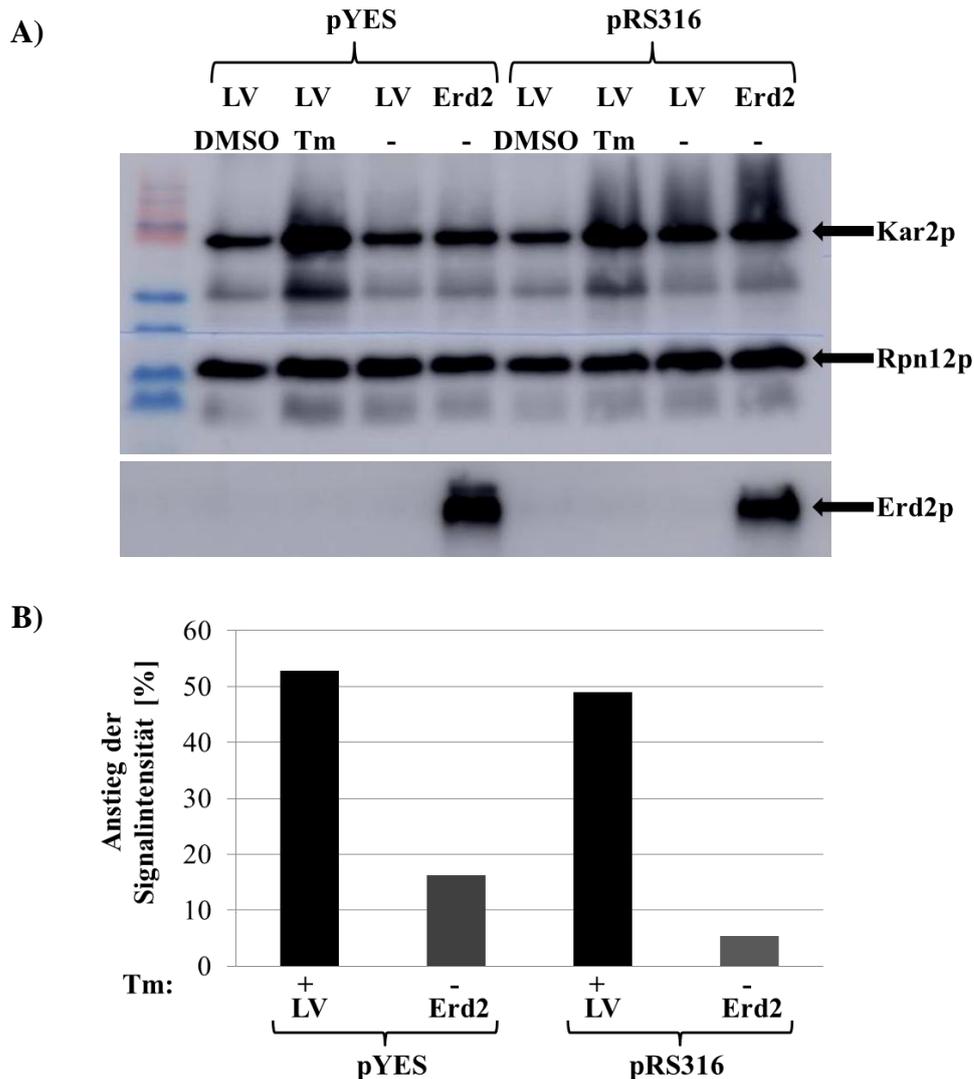


Abbildung 37: Auswirkung einer *ERD2*-Überexpression auf den Kar2p-Gehalt. A) Ergebnis des Western Blots: Der Hefestamm BY4742 wurde mit pRS316 Erd2-V5 beziehungsweise pYES Erd2-V5 sowie den entsprechenden Leervektoren (LV) transformiert und zur Induktion in Galaktose-haltigem Medium kultiviert. Als Positivkontrolle wurden Hefen mit Leervektoren drei Stunden mit 20 µg/ml Tunicamycin (Tm) behandelt und zur entsprechenden Kontrolle eine DMSO-Behandlung durchgeführt. Als Negativkontrolle der *ERD2*-überexprimierenden Hefen wurden unbehandelte Hefen mit den entsprechenden Leervektoren verwendet. Zum Zellaufschluss wurde jeweils die gleiche Zellzahl eingesetzt und das Zelllysate nach Auftrennung mittels SDS-PAGE im Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Kar2p Antikörpern sowie anti-Rpn12p Antikörpern zur Ladekontrolle. Zum Nachweis der *ERD2*-Überexpression wurden anti-V5 Antikörper verwendet. B) Vergleich der Signalintensitäten nach Tunicamycin-Behandlung beziehungsweise *ERD2*-Überexpression. Die Signalintensitäten von Kar2p wurden auf die jeweilige Signalintensität von Rpn12p normiert und mit der entsprechenden Kontrolle verglichen.

In Abbildung 37 lässt sich erkennen, dass die mit Tunicamycin behandelten Proben einen deutlich höheren Kar2p-Gehalt aufwiesen, als die entsprechenden DMSO-Kontrollen. Die Signalintensität war hier um etwa 50 % gesteigert. Auch die *ERD2*-überexprimierenden Zellen zeigten eine leicht erhöhte Menge an Kar2p im Vergleich zu ihren Leervektor-Kontrollen. Eine *ERD2*-Überexpression durch pRS316 resultierte in einem Anstieg der

Signalintensität um etwa 5 %, während eine stärkere *ERD2*-Überexpression durch pYES sogar zu einer Steigerung von etwa 16 % führte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch *ERD2*-Überexpression zumindest eine leichte Aktivierung der UPR erfolgte.

Zur weiteren Bestätigung dieser Annahme wurde ein Experiment durchgeführt, das auf dem Spleißen der mRNA des Transkriptionsfaktors Hac1p beruht. In Hefen wird nur die gespleißte Form der *HAC1* mRNA zu einem funktionellen Protein translatiert, das infolgedessen die Expression von UPR-Zielgenen aktivieren kann. Dieses Spleißen erfolgt durch den ER-Stresssensor Ire1p und stellt einen Indikator der UPR-Aktivierung dar. Zur Versuchsdurchführung wurden die bereits beschriebenen BY4742-Transformanten mit pRS316 Erd2-V5 und pYES Erd2-V5 verwendet und die Plasmid-getriebene *ERD2*-Überexpression durch Galaktose-haltiges Medium induziert. Hefen mit den entsprechenden Leervektoren dienten auch hier als Negativkontrolle beziehungsweise nach dreistündiger Behandlung mit 20 µg/ml Tunicamycin als Positivkontrolle der UPR-Aktivierung. Nach der erfolgten RNA-Isolierung wurde diese zur cDNA-Synthese eingesetzt, wobei durch Verwendung von Oligo-dT Primern das Umschreiben von mRNA mit Poly-A Überhängen gewährleistet wurde. Zur anschließenden PCR wurde jeweils die gleiche Menge an cDNA für die Amplifikation von *HAC1* und β -Actin eingesetzt. Das Ergebnis der PCR nach gelelektrophoretischer Auftrennung ist in Abbildung 38 dargestellt.

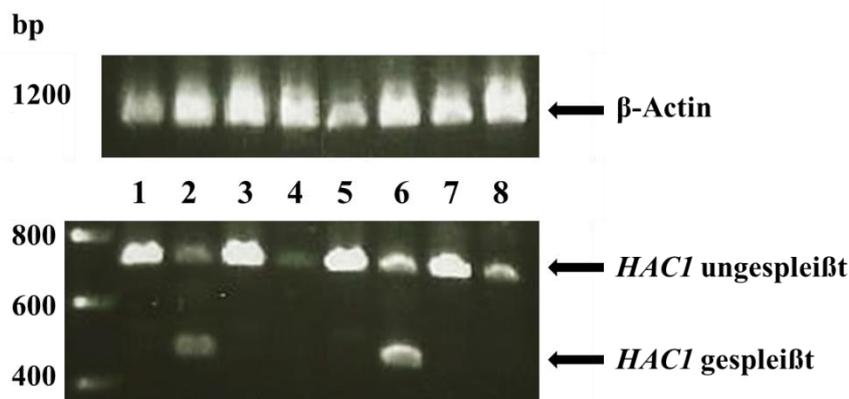


Abbildung 38: PCR zur Analyse des Spleißens von *HAC1*. Die Reaktion erfolgte mit Primern für *HAC1*, die sowohl die Amplifikation der ungespleißten Variante bei etwa 720 bp als auch der gespleißten Form bei etwa 470 bp ermöglichen. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich β -Actin (1200 bp) amplifiziert und es wurde jeweils die gleiche cDNA-Menge zur Reaktion eingesetzt. BY4742 1) pYES Leervektor mit DMSO behandelt, 2) pYES Leervektor mit 20 µg/ml Tunicamycin behandelt, 3) pYES Leervektor unbehandelt, 4) pYES Erd2-V5 unbehandelt, 5) pRS316 Leervektor mit DMSO behandelt, 6) pRS316 Leervektor mit 20 µg/ml Tunicamycin behandelt, 7) pRS316 Leervektor unbehandelt, 8) pRS316 Erd2-V5 unbehandelt.

Abbildung 38 zeigt, dass durch Tunicamycin-Behandlung ein Spleißen der *HAC1* mRNA ausgelöst wurde. Hier war die Signalstärke der ungespleißten *HAC1* mRNA bei 720 bp deutlich geringer als in den DMSO-Kontrollen und es trat zusätzlich ein Signal bei 470 bp auf, das die gespleißte *HAC1* mRNA repräsentiert. In den *ERD2*-überexprimierenden Hefen ließ sich keine gespleißte *HAC1* mRNA nachweisen, jedoch war das Signal der ungespleißten Variante ebenfalls deutlich geringer als in den entsprechenden Leervektor-Kontrollen. Dies könnte ebenfalls auf eine leichte Aktivierung der UPR hindeuten.

Eine mögliche Aktivierung der UPR durch *KDELR*-Überexpression wurde zusätzlich anhand der Expression eines Hac1p-abhängigen Reportergens analysiert. Dazu wurde das Plasmid pJC104 verwendet, welches das *LacZ*-Gen unter Kontrolle eines UPRE-Elements exprimiert. UPRE-Elemente werden durch den Transkriptionsfaktor Hac1p induziert, sodass der Nachweis einer β -Galaktosidase-Aktivität die UPR-Aktivierung impliziert. Dieser Nachweis kann durch Zugabe von X-Gal erfolgen, das durch β -Galaktosidase zu Galaktose hydrolysiert wird, wobei ein wasserunlöslicher, blauer Indigo-Farbstoff freigesetzt wird. Zur Durchführung dieses Versuches wurde der Hefestamm BY4742 mit den Plasmiden pJC104 und pRS315 Erd2 beziehungsweise pESC-LEU Erd2 co-transformiert und zur Induktion der *ERD2*-Expression in Galaktose-haltigem Medium kultiviert. Durch pESC-LEU sollte hier eine stärkere *ERD2*-Überexpression gewährleistet werden als durch pRS315. Die entsprechenden Leervektoren dienten als Negativkontrolle beziehungsweise nach dreistündiger Inkubation mit 20 μ g/ml Tunicamycin als Positivkontrolle der UPR-Induktion. Zur Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität wurde jeweils die gleiche Zellzahl aufgeschlossen und das Zelllysate nach Zugabe von 62 μ g/ml X-Gal an einem Drehrad bei 30 °C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die erfolgte Farbreaktion dokumentiert (Abbildung 39).

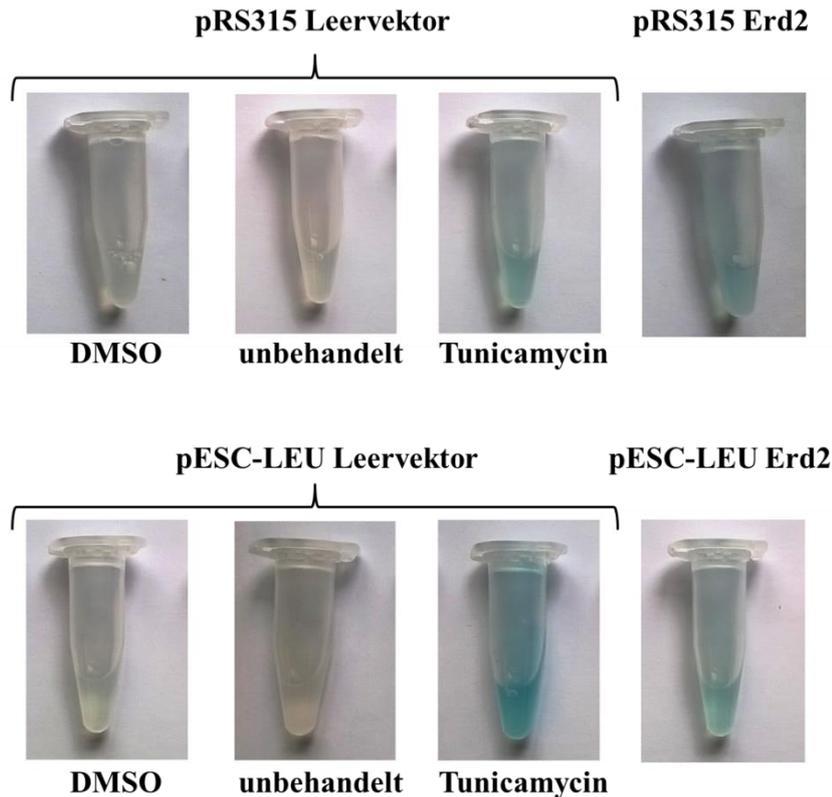


Abbildung 39: Nachweis einer Hac1p-abhängigen UPR-Aktivierung durch Expression des *LacZ*-Reportergens. Der Hefestamm BY4742 wurde mit den Plasmiden pJC104 UPRE-*LacZ*, pRS315 Erd2 beziehungsweise pESC-LEU Erd2 oder den entsprechenden Leervektoren co-transformiert und die *ERD2*-Überexpression durch Galaktose-haltiges Medium induziert. Als Positivkontrolle der UPR-Aktivierung wurden Hefen mit Leervektoren für drei Stunden mit 20 µg/ml Tunicamycin beziehungsweise DMSO zur Kontrolle inkubiert. Zur Untersuchung der β-Galaktosidase-Aktivität wurde jeweils die gleiche Zellzahl aufgeschlossen und das Zelllysate nach Zugabe von 62 µg/ml X-Gal an einem Drehrad bei 30 °C inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgte die Dokumentation der Farbreaktion.

Aus Abbildung 39 geht hervor, dass sowohl bei den Tunicamycin-behandelten Proben als auch bei den *ERD2*-überexprimierenden Proben eine deutliche Blaufärbung des Lysats auftrat, während die entsprechenden Kontrollen keine blaue Färbung zeigten. Die Überexpression von *ERD2* schien also eine Hac1p-abhängige Genexpression zu verursachen, was auf eine UPR-Aktivierung hindeutet.

Insgesamt bestätigen diese drei Versuchsansätze, dass durch eine Überexpression des KDELR in Hefen zumindest eine moderate Aktivierung der UPR erfolgt.

4. Diskussion

Der gerichtete Transport von Proteinen und Membranbestandteilen zu ihrem Wirkungsort ist für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen sowie zur Kommunikation mit benachbarten Zellen entscheidend. Die entsprechenden Cargo-Proteine enthalten dabei meist kurze Signalmotive, die ihre Verpackung in spezifische Transportvesikel zum Target-orientierten Transfer gewährleisten. Da dieser Vesikeltransport eine Weitergabe an umfangreichem Membranmaterial beinhaltet, müssen die Transportprozesse exakt reguliert und aufeinander abgestimmt sein, um den Erhalt der Zellstruktur sicher zu stellen.

Einen wichtigen Bestandteil dieses Regulationssystems repräsentiert der KDEL-Rezeptor (KDELRL), der erstmals in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* im Zuge eines Mutationsscreens identifiziert wurde und drei Homologe in Säugerzellen aufweist (Lewis & Pelham, 1992b; Raykhel *et al.*, 2007; Semenza *et al.*, 1990). Seine Funktion wurde in der Retention löslicher ER-residenter Proteine im ER beziehungsweise deren Rückführung vom Golgi zum ER beschrieben, die ein C-terminales KDEL-Motiv besitzen (Munro & Pelham, 1987). Der leicht saure pH-Wert des Golgi ermöglicht eine Bindung dieser Proteine am KDELRL, was zu ihrer Rückführung zum ER mittels COPI-umhüllter Vesikel führt. Im neutralen Milieu des ER dissoziieren die KDEL-tragenden Liganden von ihrem Rezeptor und der KDELRL wird über COPII-vermittelten Vesikeltransport zum Golgi recycelt (Townesley *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1993). Strukturanalysen legen ein KDELRL-Modell aus sieben Transmembrandomänen nahe, dessen N-Terminus im Lumen lokalisiert ist, während der C-Terminus in das Zytosol ragt (Townesley *et al.*, 1993). Ihre strukturelle Ähnlichkeit zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren sowie die Auswirkung von KDELRL-Mutationen ließen eine zusätzliche Signalfunktion des KDELRL hinsichtlich zellulärer Transportprozesse vermuten. Diese G-Protein-gekoppelte Signalfunktion konnte wenig später bestätigt und näher charakterisiert werden (Cancino *et al.*, 2014; Giannotta *et al.*, 2012). Einen wichtigen Bestandteil der KDELRL-abhängigen Signaltransduktion stellen die Golgi-residenten G-Proteine Gs und Gq dar. Das Eintreffen von KDEL-Proteinen im Golgi und ihr Binden an KDELRL1 resultiert in einer KDELRL-vermittelten Aktivierung von Gq, wodurch eine Phosphorylierung von SFKs („Src-family kinases“) erfolgt. Diese Kinasen katalysieren infolgedessen die Phosphorylierung von Proteinen der anterograden Transportmaschinerie und fördern somit den Vesikeltransport zur Plasmamembran (Giannotta *et al.*, 2012). An dieser KDELRL1-SFK-Signalkaskade ist auch Prohibitin-1 als Interaktionspartner von KDELRL1 maßgeblich beteiligt. In Abwesenheit von Prohibitin-1 verlagert sich die KDELRL1-Lokalisation zum ER, sodass eine Aktivierung der SFKs und somit der anterograde Transport

vermindert werden (Giannotta *et al.*, 2015). Zusätzlich kann der Vesikeltransport vom Golgi zur Plasmamembran durch eine für G-Proteine eher unübliche Interaktion des KDELR mit der monomeren α -Untereinheit $G\alpha_o$ reguliert werden, die in der Aktivierung von Rab-GTPasen resultiert (Solis *et al.*, 2017). Das anterorade Trafficking wird durch eine Interaktion des KDELR mit Gs ausgeglichen, welche ebenfalls nach Ligandenbindung erfolgt. Durch Gs-abhängige Aktivierung der Adenylatzyklase 9 und daraus resultierendem cAMP-Signalling wird eine Stimulation von PKA (Protein-Kinase A) bewirkt. PKA vermittelt sowohl eine direkte Initiierung retrograder Transportprozesse als auch eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die eine verstärkte Expression von Genen der retrograden und anterograden Transportmaschinerie veranlassen. Diese KDELR-abhängige Signaltransduktion verbindet also die Regulierung des retrograden und anterograden Transportwegs und ermöglicht somit die Aufrechterhaltung der Golgi-Homöostase (Cancino *et al.*, 2014).

Die Signalfunktion des KDELR ist auch an der Regulation der Stressantwort beteiligt und offenbart je nach vorliegendem Zelltyp ein breites Spektrum spezifischer Effekte (Henderson *et al.*, 2013; Kamimura *et al.*, 2015; Ruggiero *et al.*, 2014; P. Wang *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2003).

Lokalisation und Retention des KDELR

KDELRs sind hauptsächlich in den Membranen von Golgi, ER und dem intermediären Kompartiment lokalisiert, wobei sich ihre Verteilung durch Liganden-Bindung oder eine durch Überexpression induzierte Autoaktivierung in Richtung ER verschiebt (Griffiths *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1992; Pulvirenti *et al.*, 2008). Studien über das viral-codierte A/B-Toxin K28 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* lieferten erste Hinweise auf eine Plasmamembran-Lokalisation des KDELR in Hefen, wobei dieser als Sekundärrezeptor die endozytotische Internalisierung des Toxins einleitet (Becker *et al.*, 2016). K28 besitzt ein C-terminales HDEL-Motiv an seiner β -Untereinheit und wird, gebunden am KDELR, retrograd durch den Sekretionsweg zum ER transportiert (Eisfeld *et al.*, 2000). Nach erfolgter Translokation in das Zytoplasma dissoziieren die Untereinheiten des Toxins, sodass α einen Zellzyklusarrest und eine Hemmung der DNA-Synthese im Zellkern hervorrufen kann (Reiter *et al.*, 2005; Schmitt *et al.*, 1989). Die Plasmamembran-Lokalisation des KDELR in Hefen konnte in dieser Arbeit mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Das verstärkte Auftreten von Rezeptormolekülen an der Plasmamembran der Endozytose-Mutante $\Delta end3$ unterstützt zusätzlich die Annahme einer endozytotischen Internalisierung des Toxin-Rezeptor-Komplexes.

Auch in Säugerzellen wird eine Co-Lokalisation des KDELR in der Plasmamembran angenommen. Es wird vermutet, dass durch extrazelluläre Liganden-Bindung ein verstärkter Transport der Rezeptoren zur Plasmamembran und eine dortige Bildung von Clustern erfolgen (Becker *et al.*, 2016; Henderson *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Annahme einer KDELR1-Lokalisation in der Plasmamembran von Säugerzellen ebenfalls mittels Elektronenmikroskopie weiter bekräftigt werden. Diese neuen Erkenntnisse bezüglich der Rezeptorlokalisierung lassen auch bisher unbekannt Funktionen von KDELR1 an der Plasmamembran nach extrazellulärer Liganden-Bindung vermuten.

Während scheinbar eine geringere KDELR-Fraktion in der Plasmamembran co-lokalisiert, residiert der Großteil an Rezeptoren in den Membranen von Golgi und ER, sodass auch für den KDELR selbst ein Rückführungsmechanismus existieren muss. Die ER-Retention von Typ I-Membranproteinen erfolgt üblicherweise über C-terminale di-Lysin Motive (KKXX), die von COPI-Komponenten erkannt werden und die Verpackung in Vesikel sowie den retrograden Transport veranlassen (Jackson *et al.*, 2012). Auch der KDELR enthält Lysin-Reste in seiner C-terminalen Sequenz, wobei diese in Säugerzellen ein di-Lysin Motiv bilden (TKVLKGKKLSLPA), während in Hefen kein klassisches KKXX-Motiv vorliegt (TKVIRGKGFKLPK). Cabrera *et al.* (2003) konnten bereits zeigen, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung von Serin209 sowie die Präsenz eines intakten Lysin-Clusters notwendig für die Interaktion des KDELR mit Arf-GAP und Coatomer-Komponenten und somit für den retrograden Transport KDEL-tragender Proteine sind. Ein Austausch der C-terminalen Sequenz des Chemokin-Rezeptors CXCR4 mit der des KDELR konnte jedoch die Plasmamembran-Lokalisation von CXCR4 nicht verhindern. Es wurde daher vermutet, dass die C-terminale KDELR-Sequenz nicht für eine Rezeptor-Lokalisation im Golgi verantwortlich ist, aber dessen Rückführung zum ER ermöglicht. Dabei wird durch Ligandenbindung eine Phosphorylierung von Serin209 ausgelöst, die wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung führt und das ursprünglich verborgene di-Lysin Motiv zugänglich macht (Cabrera *et al.*, 2003). Durch diesen Mechanismus wird gewährleistet, dass der Rezeptor nur bei Liganden-Bindung zum ER-transportiert wird und im ungebundenen Zustand im Golgi residiert. Im Falle von CXCR4 blieb das Lysin-Cluster möglicherweise verborgen und konnte somit keine ER-Retention vermitteln.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, scheint die C-terminale Sequenz des Hefe-KDELR eine Retention der Plasmamembran-lokalisierten Arginin-Permease Can1p im Zellinneren bewirken zu können. Eine Substitution der Lysin-Reste gegen Alanine

ermöglichte wieder eine verstärkte Plasmamembran-Lokalisation des Can1p-Fusionsproteins, sodass das C-terminale Lysin-Cluster zur erfolgreichen Retention notwendig erscheint. Da die Sequenz des KDELR in Hefen keinen C-terminalen Serin-Rest für eine mögliche Phosphorylierung enthält und auch kein klassisches di-Lysin Motiv vorliegt, könnte ein abgewandelter Lysin-basierter Mechanismus der ER-Retention existieren. Es wäre möglich, dass durch Liganden-Bindung direkt eine Konformationsänderung des Rezeptors erfolgt, die zur Freilegung der Lysin-Reste führt. Im Falle des Can1p-Fusionsproteins könnten die Lysin-Reste der C-terminalen KDELR-Sequenz dauerhaft zugänglich sein, da eine andere Konformation des Gesamtproteins vorliegt.

Aufbauend auf der beobachteten Can1p-Retention wurde auch in Säugerzellen eine Retention des Plasmamembran-lokalisierten Glukose-Transporters GLUT1 durch Fusion der C-terminalen KDELR1-Sequenz analysiert. Wie im Falle von CXCR4 konnte auch hier eine Plasmamembran-Lokalisation von GLUT1 nicht verhindert werden. Jedoch führte auch das Anfügen eines klassischen KKXX-Motivs nicht zu einer vollständigen Retention, sondern lediglich zu einer Verminderung der Proteinmenge an der Plasmamembran und einer verstärkten Lokalisation im ER. Es wäre denkbar, dass eine vollständige Retention der Fusionsproteine aufgrund der hohen Proteinmenge durch die Plasmid-getriebene Expression nicht gewährleistet werden konnte. Die Retention von GLUT1-mCherry-KKXX war jedoch vergleichbar mit derjenigen der GLUT1-mCherry-Variante mit C-terminaler KDELR1-Sequenz, wohingegen eine entsprechende Variante mit Substitution der C-terminalen Lysin-Reste gegen Alanine keinen Unterschied zu der wildtypischen GLUT1-mCherry Lokalisation zeigte. Die von Cabrera *et al.* (2003) vermutete Retentions-Funktion des C-terminalen Lysin-Clusters von KDELR1 konnte also bestätigt werden. Die Zugänglichkeit dieses di-Lysin Motivs scheint ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Retentionseffizienz zu spielen. Durch eine Fusion an GLUT1-mCherry könnte die C-terminale KDELR1-Sequenz in einer anderen Konformation vorliegen als in der eigenen Rezeptorsequenz, sodass die Lysin-Reste auch ohne vorherige S209 Phosphorylierung erkannt werden könnten. Jedoch scheint diese Erkennung trotzdem schlechter zu erfolgen als eine direkte KKAA-Fusion, was auch an ihrer nicht ganz C-terminalen Lokalisation liegen könnte.

Allgemein wäre vorstellbar, dass die gesamte intrazelluläre Verteilung und Lokalisation der KDELR-Rezeptoren auf der Zugänglichkeit dieser Lysin-Reste basiert. Ein hypothetisches Modell hierfür ist in Abbildung 40 schematisch dargestellt.

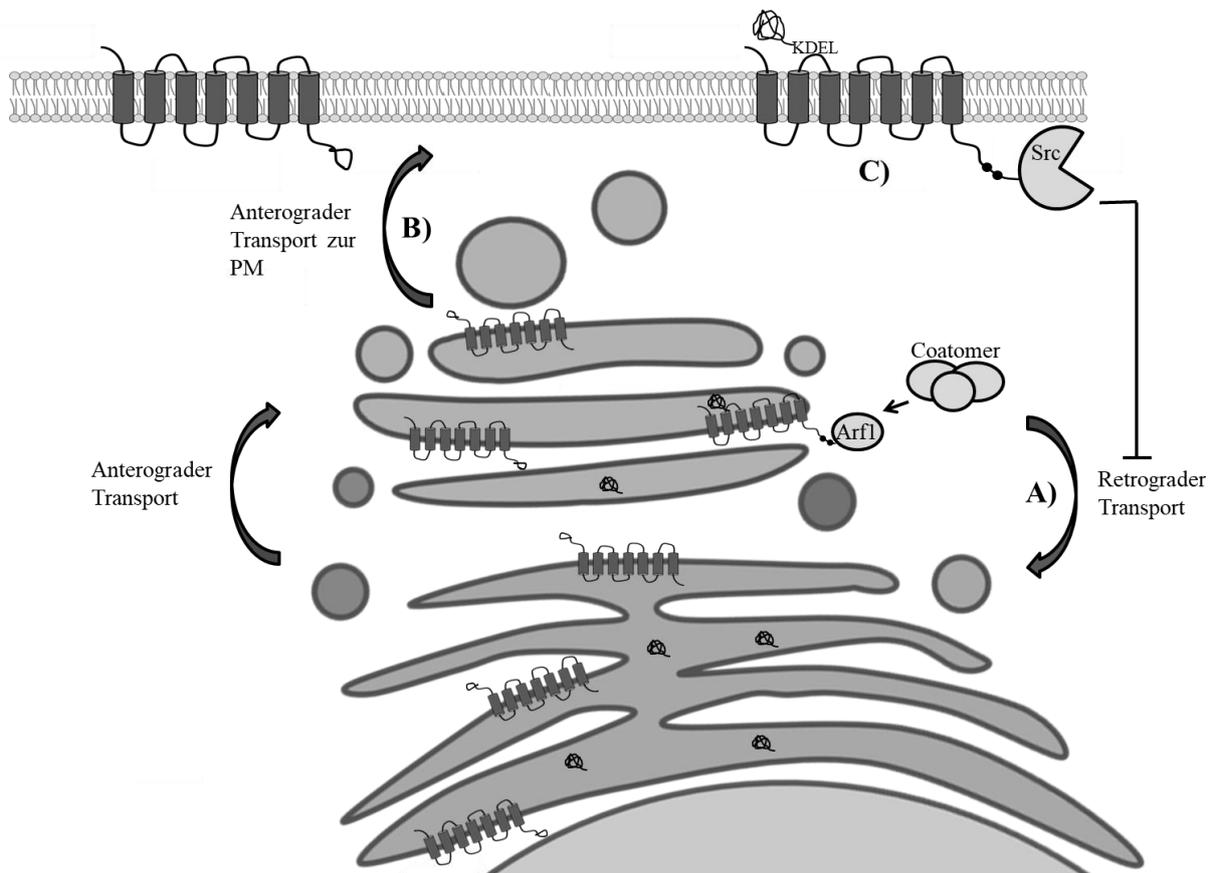


Abbildung 40: Hypothetisches Modell zum Einfluss der C-terminalen Lysinreste am KDELR auf dessen intrazelluläre Verteilung. A) Die Bindung von Liganden im Golgi führt zu einer Konformationsänderung des KDELR und zur Demaskierung des C-terminalen Lysin-Clusters, sodass eine Interaktion mit Arf-GAP und Coatomer-Komponenten sowie der retrograde Transport zum ER erfolgen können. Nach Rückführung und Dissoziation der Liganden werden die KDELRs anterograd zum Golgi zurück transportiert. B) Wenn keine Liganden-Bindung im Golgi stattfindet, bleibt das C-terminale Lysin-Cluster maskiert und der KDELR wird anterograd bis zur Plasmamembran (PM) transportiert. C) Durch eine Bindung extrazellulärer Liganden wird über eine Src-abhängige Signalkaskade der retrograde Transport blockiert und der anterograde Transport stimuliert, sodass die KDELR-Menge an der PM erhöht wird (erstellt nach Cabrera *et al.*, 2003, Gianotta *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2018).

Die KDELRs werden auf anterogradem Weg vom ER zum Golgi transportiert, wo durch Bindung von KDEL-Liganden eine Phosphorylierung sowie Freilegung des Lysin-Clusters erfolgt und die dadurch initiierte Retention zum ER eine weitere Sekretion verhindert. Wenn keine Liganden-Bindung stattfindet und das di-Lysin Motiv verborgen bleibt, können die Rezeptoren auch bis zur Plasmamembran gelangen, was ihre dortige Co-Lokalisation erklärt. Durch eine Bindung extrazellulärer Liganden könnte durch den KDELR selbst eine Signalkaskade ausgelöst werden, die seine dortige Präsenz verstärkt. Eine aktuelle Studie von Tsai *et al.* (2018) konnte zeigen, dass infolge von ER-Stress eine Aktivierung der Src-Kinase erfolgt, welche in einer Hemmung des retrograden Transports resultiert und somit eine verstärkte Sekretion von Chaperonen bewirkt. Dabei konnte auch eine Dispersion des

KDELRL von Golgi-Strukturen demonstriert werden (Tsai *et al.*, 2018). Da eine KDELRL-vermittelte Stimulation der Src-Kinase ebenfalls bekannt ist, könnte auch nach extrazellulärer Liganden-Bindung am KDELRL eine Src-Aktivierung ausgelöst werden, die in einer Inhibierung des retrograden Transports resultiert und somit einen verstärkten KDELRL-Transport zur Plasmamembran zur Folge hat (Giannotta *et al.*, 2012).

Aufgrund der Relevanz des C-terminalen Lysinclusters bezüglich der KDELRL-Retention könnte eine C-terminale Fusion des Fluoreszenzproteins mCherry eine korrekte Lokalisation des Rezeptors beeinflussen. Vergleichende Lokalisationsanalysen einer KDELRL-Variante mit C-terminalem mCherry-Tag und einer Rezeptorvariante mit HA-Tag in einem zytosolischen Loop-Bereich zeigten jedoch keine wesentlichen Unterschiede in der Lokalisation. Das C-terminale Lysin-Cluster scheint durch mCherry also nicht vollständig maskiert zu werden und daher die Retention des KDELRL nicht erheblich zu beeinflussen. Da KDELRL1-mCherry im Vergleich zu einer HA-getaggten Variante weniger strukturiert und eher punktuell in der Zelle vorlag, scheinen sich kleine Epitop-Tags zur Untersuchung des KDELRL jedoch besser zu eignen. Eine mCherry-Fusion verdoppelt die Größe des KDELRL und könnte dadurch seine Struktur und Funktion beeinflussen.

CRISPR/Cas9-vermittelter KDELRL-KO

Die Plasmamembran-Lokalisation des KDELRL könnte bisher unbekannt Signal-Funktionen des Rezeptors nach Liganden-Bindung implizieren. Zur Adressierung einer solchen Fragestellung sowie zur Analyse von KDELRL-Mutanten sollte in dieser Arbeit eine KDELRL1-KO Zelllinie unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Technologie generiert werden. Diese neuartige Methode zur gezielten Veränderung genomischer DNA („Genome Editing“) beruht auf einem adaptiven antiviralen Abwehrmechanismus von Bakterien und Archaea und wurde in den letzten Jahren zur Anwendung in verschiedenen Organismen adaptiert. Das Bakteriengenom beinhaltet kurze palindromische Sequenzwiederholungen (Repeat-Sequenzen), die von „Spacer-Sequenzen“ unterbrochen werden (Ishino *et al.*, 1987). Diese Bereiche werden als CRISPR („clustered regularly interspaced short palindromic repeats“)-Elemente bezeichnet und fungieren im Zusammenspiel mit Nukleasen der Cas-Familie als antivirales „Immunsystem“ (Barrangou *et al.*, 2007). Die Spacer-Sequenzen repräsentieren dabei eingelagerte DNA-Fragmente aus einem Virusgenom, wo sie als „Protospacer“ bezeichnet werden (Mojica *et al.*, 2005). Durch Transkription der CRISPR-Elemente entstehen zunächst lange RNA-Sequenzen (pre-crRNA), die je nach vorliegendem CRISPR/Cas-System in unterschiedlicher Weise prozessiert werden. In den Systemen I

und III erfolgt die Prozessierung durch die Endonuklease Cas6 und die crRNA kann direkt von Cas-Proteinen gebunden werden, die einen Komplex aus Adaptor-Proteinen um die crRNA bilden (Carte *et al.*, 2008). Während im Typ-III System die Bindung der Nuklease (Cas10) am Komplex direkt erfolgt, bindet die Nuklease im Typ-I System (Cas3) erst nach DNA-Bindung. System II, welches hauptsächlich zum Genome Editing verwendet wird, beinhaltet nur ein Cas-Protein (Cas9) und verwendet RNaseIII zur Prozessierung der pre-crRNA (Hale *et al.*, 2009). Zur Bindung von Cas9 und zur Prozessierung wird eine zusätzliche kleine RNA-Sequenz benötigt (tracrRNA), die komplementär zur Repeat-Sequenz ist, sodass durch Basenpaarung dsRNA entsteht, welche als RNaseIII Target dient (Deltcheva *et al.*, 2011). Durch diese unterschiedlichen Prozessierungsmechanismen entsteht jeweils ein reifer Komplex aus crRNA und dem entsprechenden Cas-Protein, welcher die zur Spacer-RNA komplementären Protospacersequenzen im Virusgenom bindet. Die effiziente Bindung und Aktivität der Cas-Endonuklease wird in den meisten Systemen durch das Angrenzen kurzer „Protospacer Adjacent Motif“ (PAM)- Sequenzen am Protospacer gewährleistet. Dadurch wird ein spezifisches Schneiden des Virusgenoms und somit ein Schutz der bakteriellen DNA garantiert (Mojica *et al.*, 2009; Semenova *et al.*, 2011).

Zur Anwendung im Genome Editing wird der Spacer durch eine Sequenz repräsentiert, die homolog zur Target-Sequenz in der genomischen DNA ist und als „guide-RNA“ oder „gRNA“ bezeichnet wird. Die Target-Sequenz des entsprechenden Gens sollte neben einer PAM-Sequenz lokalisiert sein, die spezifisch für die verwendete Cas9-Endonuklease ist. Neben dieser Voraussetzung sollte die Target-Sequenz auch hinsichtlich einer geringen off-Target Wahrscheinlichkeit ausgewählt werden. Dabei wird das Auftreten ähnlicher Sequenzen im gesamten Genom analysiert, die aufgrund einer hohen Sequenzübereinstimmung ebenfalls als Target dienen könnten und daher die Spezifität vermindern. Diese Möglichkeit des off-Targetings stellt eines der Hauptprobleme der Methode dar und steht daher im Fokus der laufenden Optimierungsstrategien. Einen vielversprechenden Ansatz stellt die Verwendung einer Cas9-Nickase-Mutante dar, die aufgrund der Punktmutation D10A innerhalb der Nuklease-Domäne Einzelstrangbrüche statt Doppelstrangbrüche katalysiert. Durch die gleichzeitige Expression mit zwei verschiedenen gRNAs, die entgegengesetzte DNA-Stränge in unmittelbarer Nähe anzielen, wird die Target-Spezifität erhöht und ein Doppelstrangbruch mit Überhängen generiert (Shen *et al.*, 2014). Bezüglich der DNA-Reparatur können generell zwei Mechanismen unterschieden werden. Durch HDR („homology-directed repair“) kann eine gezielte Insertion von Genen an der Stelle des Doppelstrangbruchs über homologe Rekombination ermöglicht werden (Smithies *et al.*, 1985). Dabei können beispielsweise auch

Marker-Gene wie Antibiotika-Resistenzgene oder Gene von Fluoreszenzproteinen eingebracht werden, die eine Vor-Selektion der Zellen mit möglichem KO erlauben. Im Hinblick auf eine Anwendung in der Gen-Therapie könnte diese Methode den KO eines mutierten Gens unter gleichzeitiger Insertion der unmutierten Gen-Variante beziehungsweise eine direkte Reparatur der vorhandenen Mutation realisieren (Chen *et al.*, 2011; Taketani *et al.*, 2017). Die Effizienz dieser HDR-Methode ist jedoch relativ gering, sodass in dieser Arbeit nach wiederholtem Ausbleiben eines biallelischen KDELR1-KO zur effizienteren NHEJ („non-homologous end joining“-)Strategie gewechselt wurde (Saleh-Gohari & Helleday, 2004). In humanen Zellen erfolgt die DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen mit kompatiblen Enden durch NHEJ etwa doppelt so effizient wie die von nicht-kompatiblen Enden, welche wiederum dreimal so effizient stattfindet wie eine homologe Rekombination. Zusätzlich ist die Dauer von NHEJ-Prozessen mit etwa 30 Minuten erheblich geringer als die der homologen Rekombination, die erst nach etwa sieben Stunden abgeschlossen ist (Mao *et al.*, 2008). Dieser Reparatur-Mechanismus durch NHEJ des Doppelstrangbruchs ist nicht fehlerfrei und führt meist zu kleinen Insertionen oder Deletionen (Indels), die eine Verschiebung des Leserasters und damit oftmals die Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons zur Folge haben (Ganesh *et al.*, 1993; Perez *et al.*, 2008). Die Vor-Selektion von Zellen mit einer hohen KO-Wahrscheinlichkeit erfolgte hier über die Stärke der Cas9-Expression, da bereits gezeigt wurde, dass Zellen mit einem hohen Cas9-Gehalt eine bessere KO-Effizienz aufweisen (Duda *et al.*, 2014). Durch eine gekoppelte Expression von Cas9 und GFP über ein 2A-Peptid unter Kontrolle eines CMV-Promotors wurde diese Selektion von Zellen mit einer hohen Cas9-Expression durch Sorten von stark grün fluoreszierenden Zellen gewährleistet. Unter Verwendung der gleichen Selektions-Methode wurde in den Studien von Duda *et al.* (2014) die KO-Effizienz des *KRAS*-Gens in Abhängigkeit zur GFP-Fluoreszenzintensität analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei nicht-gesorteten Zellen etwa 15 % der Allele Mutationen aufwiesen, während das gezielte Sorten von Zellen mit einer schwachen, mittleren beziehungsweise starken Fluoreszenzintensität zu Mutationen in etwa 24 %, 41 % beziehungsweise 59 % der Allele führte. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch ein vermehrtes Absterben der stark grün fluoreszierenden Zellen nach dem Sorten beobachtet werden, sodass keine KO Kolonien aus den Zellen mit starker Cas9-Expression generiert werden konnten. Es wäre möglich, dass der hohe Cas9-Gehalt in Kombination mit den verwendeten gRNAs ein erhöhtes off-Targeting zur Folge hatte, sodass durch eine starke Mutationsrate in der genomischen DNA das Überleben der Zellen verhindert wurde. Es konnte bereits gezeigt werden, dass unter Verwendung bestimmter gRNAs ein verstärktes off-

Targeting erfolgt und dass diese Effekte durch eine starke Cas9-Expression begünstigt werden (Cradick *et al.*, 2013; Duda *et al.*, 2014). Die optimalen Transfektions- und Sorting-Bedingungen können also je nach Target-Gen und Zelltyp variieren. Im Falle der genomischen *KDELR*-DNA liegen fünf relativ kurze Exon-Sequenzen vor, wobei unter Berücksichtigung der möglichen Spleißvarianten der drei *KDELR*s nur drei bis vier dieser Exon-Sequenzen als Target in Frage kommen. Die Auswahl an möglichen gRNAs ist also relativ gering, sodass auch gRNAs mit einer weniger guten off-Target Vorhersage akzeptiert werden mussten. In Kombination mit der hohen Transfektions-Effizienz der verwendeten Zelllinien könnte das Sorten von Zellen mit der stärksten Cas9-Expression in diesem Fall unvorteilhaft sein. Die Selektion von Zellen mit einer mittleren und sogar einer eher schwachen grünen Fluoreszenz verbesserte dagegen die Überlebensrate der Zellen deutlich und ermöglichte auch die erfolgreiche Generierung eines *KDELR2*- und *KDELR3*-KO. Obwohl zur Identifizierung eines *KDELR1*-KO 112 Kolonien sequenziert wurden, konnten keine biallelischen Mutationen detektiert werden. Da die Analyse von nur 17 möglichen *KDELR2*-KO Kolonien fünf mit biallelischen Mutationen aufwies und auch unter 73 möglichen *KDELR3*-KO Kolonien drei mit biallelischen Mutationen vorlagen, könnte das Ausbleiben eines biallelischen *KDELR1*-KO auf dessen Letalität hindeuten. Es wäre auch denkbar, dass die Zellen mit *KDELR1*-KO zwar unter normalen Umständen überlebensfähig wären, aber durch das Sorten und die Vereinzelung so stark gestresst wurden, dass ihr erneutes Adhärieren und eine anschließende Teilung nicht mehr möglich waren. Da *KDELR1* erheblich an der Regulierung der Stressantwort beteiligt ist, könnte ein Verlust des Rezeptors unter gleichzeitiger Erzeugung von Zellstress einen letalen Effekt hervorrufen.

Charakterisierung der *KDELR*-KO Zelllinien

Da die Herstellung einer *KDELR1*-KO HEK293-Zelllinie nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde zur Charakterisierung eine kommerziell erhältliche *KDELR1*-KO HAP1-Zelllinie heran gezogen. Dabei handelt es sich um Fibroblasten-ähnliche, haploide Zellen aus einem Leukämie-Isolat, die von der Firma Horizon zur Herstellung humaner KO Zelllinien verwendet werden. Aufgrund ihrer haploiden Eigenschaft vereinfachen diese Zellen die Generierung eines vollständigen Gen-KO, da keine monoallelischen Intermediate auftreten können (Essletzbichler *et al.*, 2014). Die *KDELR1*-KO Zellen weisen eine Deletion der Base T16 in Exon 1 der genomischen Rezeptorsequenz auf, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon am Ende von Exon 2 führt. Von dieser Mutation ist die alternative Spleißvariante von *KDELR1*, die eine verkürzte Version mit Start-Codon am Ende von Exon 2 repräsentiert,

nicht betroffen. Diese KDELR1-Isoform, die sich von der natürlichen KDELR1-Version durch Fehlen der ersten 62 Aminosäuren unterscheidet, wurde in einem cDNA-Screen des humanen Genoms identifiziert und als Protein-codierend bestätigt (Ota *et al.*, 2004). Bezüglich ihrer Funktionalität wurde diese alternative KDELR1-Variante bisher nicht weiter charakterisiert. Die Plasmid-getriebene Expression einer mCherry-getaggten Version konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, was jedoch auf die Größe von mCherry zurückgeführt werden könnte, die eine korrekte Strukturausbildung der viel kleineren alternativen KDELR1-Variante beeinflussen könnte. Ein Funktionalitätstest in Hefen zeigte, dass eine ungetaggte alternative KDELR1-Variante den Verlust von Erd2p nicht kompensieren kann. Allerdings kann hier aufgrund des fehlenden Antikörpers kein Expressionsnachweis der ungetaggten Version erfolgen und die Situation in Hefen kann nicht direkt auf Säugerzellen übertragen werden, bei denen die gleichzeitige Expression von KDELR2 und KDELR3 den kompensatorischen Effekt der alternativen KDELR1-Variante unterstützen könnte. Das anhand der Transkriptomanalyse nachweislich geringe Expressionslevel lässt jedoch eher vermuten, dass dieser alternativen KDELR1-Spleißvariante keine zentrale Bedeutung zukommt.

Eine weitere Erklärung für die Überlebensfähigkeit der KDELR1-KO HAP1-Zelllinie könnte eine schonendere Behandlung nach der Generierung des KO darstellen, die weniger Zellstress erzeugt. Da die Funktion von KDELR1 in verschiedenen Zelltypen bezüglich ihrer Relevanz bei der Stressantwort variiert und ein Verlust somit unterschiedliche Auswirkungen auf das Zellschicksal nehmen kann, wäre es möglich, dass HAP1-Zellen einen KDELR1-KO besser ausgleichen können als HEK293-Zellen (Kamimura *et al.*, 2015; Siggs *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2003). Ein Vergleich der jeweiligen Expressionslevel der drei KDELRs zeigte, dass der mRNA-Gehalt von KDELR2 in HAP1-Zellen in etwa dem von KDELR1 entspricht, während die Menge an KDELR1-mRNA in HEK293-Zellen dominiert. Eine bessere Kompensation des KDELR1-Verlusts durch HAP1-Zellen könnte daher auch durch die allgemein stärkere Präsenz und Relevanz von KDELR2 in dieser Zelllinie im Vergleich zu HEK293-Zellen erklärt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse zum Vergleich der KDELR1-KO Zellen mit wildtypischen HAP1-Zellen zeigte eine Veränderung von Prozessen, die mit Zellentwicklung und Adhäsion in Zusammenhang stehen. Ebenso konnte eine Änderung von Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) und der Glycosaminoglycan-Bindung nachgewiesen werden. Der Verlust von KDELR1 scheint somit einen erheblichen Einfluss auf

die Regulation extrazellulärer Bedingungen zu nehmen und demzufolge auch das Proliferations- und Migrationsverhalten der Zellen zu verändern. In diesem Zusammenhang wurde bereits eine Beteiligung von KDELR1 an der Regulierung der Extrazellulären Matrix-Degradation gezeigt, wobei eine Aktivierung von KDELR1 über eine Src-abhängige Signalkaskade die Phosphorylierung der Schlüsselproteine ASAP1 und Cortactin sowie die Invadopodia-Ausbildung triggert (Ruggiero *et al.*, 2014). Invadopodia stellen Aktin-haltige Ausstülpungen dar, welche die Degradation der ECM und dementsprechend auch die Adhäsion und Migration der Zellen vermitteln (Chen, 1989; Mueller & Chen, 1991). Aufgrund ihrer Interaktion mit der ECM weisen Invadopodia eine Vielzahl von Proteinen auf, die auch in fokalen Adhäsionen lokalisiert sind, welche die direkten Kontaktstellen der Zelle zur ECM repräsentieren (Heath & Dunn, 1978). Neben Integrinen und Bestandteilen des Zytoskelettes befinden sich darunter Signalproteine wie FAK („focal adhesion kinase“), die in die ECM-Invasion von Zellen involviert ist (Cance *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2009). Die Aktivierung von FAK in fokalen Adhäsionen erfolgt über eine KDELR/Src-abhängige Signalkaskade und auch die FAK-Rekrutierung zu Invadopodia-Bereichen wird durch KDELR-Signalling getriggert. Dort resultiert eine KDELR-vermittelte Phosphorylierung von Y397-FAK in einer Inhibierung der ECM-Degradation, sodass der KDELR/Src-stimulierten ECM-Degradation entgegen gewirkt wird (Ruggiero *et al.*, 2018). Diese Studien legen nahe, dass ein Verlust des KDELR einen Einfluss auf die Zelladhäsion, Migration und den Abbau der ECM haben könnte und unterstützen somit die Ergebnisse der Transkriptomanalyse.

Die Beteiligung des KDELR an der Regulation von Transportprozessen und der Stressantwort ließen auch in diesen Bereichen eine Veränderung des Transkriptoms von KDELR1-KO Zellen vermuten. Jedoch konnte keine signifikante Veränderung Transport- oder Stress-assoziiertes GO-Terme nachgewiesen werden. Auch eine gezielte Auswahl und Analyse entsprechender Gene zeigte keine signifikanten Veränderungen ihrer mRNA-Level. Es wäre jedoch möglich, dass der KDELR1-KO einen Einfluss auf diese Prozesse nimmt, ohne dabei eine direkte Veränderung des Transkriptoms zu bewirken. Die Präsenz von KDELR2 könnte aber auch zur Regulation des Vesikeltransports ausreichend sein. Da in diesem Fall keine verstärkten Stressbedingungen vorliegen würden, wäre auch das Ausbleiben einer Stressantwort erklärbar. KDELR2 scheint also den Verlust von KDELR1 bezüglich der Steuerung von Transportprozessen besser ausgleichen zu können als seine Funktionen hinsichtlich der Zelladhäsion, der Migration und des Abbaus der ECM. Eine exakte Interpretation der Transkriptomanalyse wird allerdings durch die Tatsache erschwert, dass bei den auftretenden Veränderungen nicht differenziert werden kann, ob diese einen direkten

Effekt des KDELR1-Verlusts oder eine Antwort der Zelle zum Ausgleich des Rezeptorverlusts repräsentieren.

Zur Charakterisierung des generierten KDELR2-KO in HEK293-Zellen wurde eine Kolonie mit Deletion der Basen GGAGT in Exon 3 der KDELR2-Sequenz auf beiden Allelen gewählt, die zur Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons am Ende von Exon 3 führt. Die Analyse des KDELR3-KO sollte durch Charakterisierung einer Kolonie mit Deletion der Base „C“ in Exon 2 der KDELR3-Sequenz auf einem Allel und Insertion der Base „C“ an der gleichen Stelle der KDELR3-Sequenz auf dem anderen Allel erfolgen. Die Deletion resultiert hier in einem vorzeitigen Stopp-Codon am Ende von Exon 2, während die Insertion die Entstehung eines Stopp-Codons in Exon 3 zur Folge hat. Da downstream dieser erzeugten Stopp-Codons weitere Exon-Junction-Komplexe vorliegen, sollte während der Translation durch „Nonsense-mediated mRNA Decay“ ein Abbau dieser mRNA erfolgen (Le Hir *et al.*, 2001; Losson & Lacroute, 1979). Mittels quantitativer PCR konnte bestätigt werden, dass in den jeweiligen KDELR2- und KDELR3-KO Zelllinien die entsprechende mRNA kaum noch vorhanden ist. Eine Hochregulation der beiden verbleibenden Rezeptoren konnte in keiner der beiden KO-Zelllinien beobachtet werden. Da das Expressionslevel insbesondere von KDELR3 allgemein sehr gering ist, wäre es möglich, dass keine Kompensation des Verlusts erforderlich ist. Eine Analyse des KDELR-Gehalts auf Proteinebene konnte aufgrund der fehlenden Antikörper nicht erfolgen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden sowohl kommerziell erhältliche anti-KDELR1, anti-KDELR2 und anti-KDELR3 Antikörper getestet, als auch wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Martin Jung (UKS Homburg) die Herstellung KDELR1-spezifischer Antikörper unter Verwendung verschiedener Peptidsequenzen versucht. Es konnten jedoch keine KDELR-spezifischen Signale im Western Blot detektiert werden. Eine mögliche Ursache für die Problematik bei der Antikörperherstellung könnte die Struktur des Rezeptors darstellen, die nur sehr kurze Sequenzbereiche außerhalb der Membran aufweist und somit die Auswahl eines geeigneten Antigens erschwert.

Zur weiteren Charakterisierung des KDELR-KO Phänotyps wurde die Sekretion des KDELR-tragenden Liganden PDI untersucht. Der Überstand von KDELR1-KO HAP1-Zellen wies etwa eine Verdopplung des extrazellulären PDI-Gehalts auf, während die KDELR2- und KDELR3-KO HEK293-Zellen keinen deutlichen Unterschied zur wildtypischen Situation zeigten. KDELR1, der auch die stärkste Affinität zum klassischen KDELR-Motiv von PDI aufweist, konnte also als Hauptinteraktionspartner bei der PDI-Retention bestätigt werden (Raykhel *et al.*, 2007). Intrazellulär konnte ebenfalls eine leichte Erhöhung des PDI-Gehalts

in den KDELR1-KO Zellen nachgewiesen werden, während in den KDELR2- und KDELR3-KO Zellen kein Unterschied zum entsprechenden Wildtyp vorlag. Auch in Hefen konnte bereits gezeigt werden, dass der Verlust von *ERD2* trotz einer erhöhten Sekretionsrate keine Verminderung des intrazellulären Kar2p/BiP-Gehalts zur Folge hatte und dass wahrscheinlich eine verstärkte Synthese von Kar2p/BiP zur entsprechenden Kompensation erfolgte (Semenza *et al.*, 1990). Die Expression einer KDELR1-Mutante mit Defekten in der Ligandenbindung (D169N) in HeLa-Zellen zeigte nach Tunicamycin-Behandlung ebenfalls eine verstärkte BiP-Sekretion im Vergleich zu Zellen mit wildtypischem Rezeptor, während der intrazelluläre BiP-Gehalt keine Veränderung aufwies. Ohne vorherige Tunicamycin-Behandlung konnte hier jedoch keine erhöhte Menge an BiP im Medium nachgewiesen werden. Da in diesem Fall zusätzlich zu der mutierten KDELR1-Variante auch die endogene KDELR1-Version in den Zellen vorlag, scheint in unbehandelten Zellen die endogene KDELR1-Menge zur BiP-Retention ausreichend gewesen zu sein. Durch die Behandlung mit Tunicamycin wurde infolge einer Aktivierung der Stressantwort die Expression von BiP hochreguliert, sodass die verbleibenden endogenen Rezeptoren, die größtenteils von der mutierten Variante verdrängt wurden, nicht mehr ausreichten, um eine effiziente Retention zu ermöglichen (Yamamoto *et al.*, 2003).

Die Transkriptomanalyse zur Charakterisierung der KDELR1-KO Zellen zeigte keine signifikante Veränderung der PDI-Expression im Vergleich zu wildtypischen HAP1-Zellen, die den sowohl intrazellulär als auch extrazellulär erhöhten Proteingehalt von PDI in KDELR1-KO Zellen bestätigen könnte. Es wäre allerdings auch möglich, dass die Regulation des PDI-Gehaltes hier auf translationaler Ebene erfolgt oder die Degradation von PDI zum Ausgleich des gesteigerten Verlusts gehemmt wird.

Die Beteiligung von KDELR1 an der Regulation der Stressantwort konnte ebenfalls mithilfe der KDELR1-KO Zelllinien bestätigt werden. Eine Behandlung mit der ER-Stress-induzierenden Substanz Thapsigargin führte zu einer starken Verminderung der Vitalität der KDELR1-KO HAP1-Zellen im Vergleich zu entsprechend behandelten wildtypischen Zellen. Durch den Verlust des KDELR scheinen die Zellen nicht mehr in der Lage zu sein, alle notwendigen Komponenten der Stressantwort zu aktivieren und Zellstress effizient entgegen zu wirken. Eine entsprechende Versuchsdurchführung mit monoallelischen KDELR1-KO HeLa-Zellen weist darauf hin, dass dieser Effekt wahrscheinlich mit der Menge an KDELRs und der Zellstress-Intensität korreliert. Hier konnte eine durch den monoallelischen KDELR1-KO verursachte Verminderung der Zellvitalität erst durch höhere Thapsigargin-

Konzentrationen erzielt werden. Es wäre jedoch in weiteren Versuchen notwendig, diese Beobachtung unter Verwendung der gleichen Zelllinie zu bestätigen. Auch die Untersuchungen von Yamamoto *et al.* konnten zeigen, dass die Expression der mutierten KDELR1-D169N-Variante in HeLa-Zellen zu einer gesteigerten Sensitivität bei ER-Stressbedingungen führte, während wildtypische Zellen diese Bedingungen noch tolerierten. Im Zuge dieser Studie konnte auch nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung des KDELR zu einer Verstärkung des MAP-Kinase Signallings führt und eine Expression der KDELR1-D169N-Mutante die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase sowie die Phosphorylierung von JNK1 vermindern (Yamamoto *et al.*, 2003). Diese selektive Inhibierung von p38 und JNK1, aber nicht JNK2 wurde auch in Makrophagen nach deren Behandlung mit dem Anthrax Letalfaktor beobachtet und hatte dort eine verstärkte Apoptoserate zur Folge (Park *et al.*, 2002). Die Beteiligung von MAP-Kinasen im downstream Signalling der UPR ist vielseitig und kann einen erheblichen Einfluss auf das Zellschicksal nehmen. Die Aktivierung von JNKs erfolgt über das ER-Stresssensorprotein IRE1, das eine Oligomerisierung von TRAF2 ermöglicht und infolgedessen eine Phosphorylierung von ASK1 und MKK4/7 auslöst (Ichijo *et al.*, 1997; Urano *et al.*, 2000). Die von den MAP-Kinase-Kinasen MKK4 und MKK7 katalysierte Phosphorylierung von JNK kann unterschiedliche Auswirkungen haben. Durch eine anschließende Phosphorylierung von c-Jun und die dadurch ausgelöste Expression von Adapt78 wird eine Inhibierung von Calcineurin und somit eine anti-apoptotische Wirkung erzeugt, obwohl das JNK-Signalling durch die direkte Aktivierung pro-apoptotischer Faktoren eher mit Stress-induziertem Zelltod in Verbindung steht (Li *et al.*, 2013; Nishitoh *et al.*, 2002; Verma & Datta, 2010; Zhao *et al.*, 2008). Die Aktivierung von p38 kann durch eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF6 und die damit verstärkte Expression von BiP ebenfalls sowohl das Überleben der Zellen fördern, als auch durch eine Aktivierung von CHOP zur Einleitung von Apoptose führen (Luo & Lee, 2002; Maytin *et al.*, 2001; Thuerauf *et al.*, 1998; Wang & Ron, 1996). Welches Zellschicksal letztendlich durch diese Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK ausgelöst wird, steht wahrscheinlich in Zusammenhang mit dem vorliegenden Zelltyp und vor allem mit der Art der Stress-Induktion. Neben p38 und JNK sind auch ERK-MAP-Kinasen an der Regulierung der UPR beteiligt. Ihre Aktivierung erfolgt ebenfalls über IRE1 und wird mit einer anti-apoptotischen Wirkung assoziiert (Nguyễn *et al.*, 2004). Eine KDELR1-abhängige Aktivierung des ERK-Signallings zur Induktion von Autophagie konnte ebenfalls bestätigt werden und erfolgt wahrscheinlich über eine Src-abhängige Signalkaskade (Wang *et al.*, 2011). Einen weiteren Zweig der UPR, an dessen Kontrolle KDELR1 beteiligt ist, stellt die Phosphorylierung von eIF2 α dar, die über den ER-

Stresssensor PERK vermittelt wird und durch eine folgende Verminderung der Translation sekretorischer Proteine zur Reduktion der ER-Belastung beiträgt. Von diesem Translationsstopp sind Proteine der Stressantwort selbst nicht betroffen, da ihre mRNA ein IRES („internal ribosome entry site“)- Motiv enthält und daher nicht alle Komponenten des pre-Initiationskomplexes zur Rekrutierung des Ribosoms benötigt (Fernandez *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2002). Die de-Phosphorylierung von eIF2 α wird durch PP1 katalysiert, deren Aktivierung KDELR1-vermittelt erfolgt (Harding *et al.*, 2009; Kamimura *et al.*, 2015). In T-Zellen führt die Expression einer Punktmutation-tragenden KDELR1-Variante (S123P) zu einer verminderten KDELR1-Interaktion mit PP1, was eine dauerhafte Stressreaktion zur Folge hat und somit die Apoptoserate der T-Zellen erhöht (Kamimura *et al.*, 2015). Insgesamt scheint die Beteiligung des KDELR an der Stressantwort eher zum Überleben der Zellen beizutragen, da der Funktionsverlust von KDELR1 die Sensitivität der Zellen bei Stress-Bedingungen und folglich deren Apoptoserate verstärkt.

Die Relevanz der KDELR-Menge hinsichtlich der Stressantwort konnte in dieser Arbeit auch durch Experimente in Hefen bestätigt werden, die auf eine leichte UPR-Aktivierung bei KDELR-Überexpression hindeuten. Da eine KDELR-Überexpression dessen Autoaktivierung und eine Umverteilung der Rezeptorlokalisierung zum ER bewirkt, könnte eine verminderte Präsenz von KDELRs im Golgi die effiziente Retention von Chaperonen verhindern (Pulvirenti *et al.*, 2008). Die verstärkte Sekretion von Chaperonen resultiert wiederum in einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine und somit in ER-Stress, was eine Aktivierung der UPR zur Folge hat (Kozutsumi *et al.*, 1988). Ein erhöhter Gehalt von KDELRs scheint demnach Zellstress auszulösen, während eine Verminderung der KDELR-Menge erst bei vorliegenden Stressbedingungen problematisch wird.

In Tabelle 12 sind die wesentlichen Erkenntnisse, die durch die Charakterisierung der KDEL2-KO Zelllinien in der vorliegenden Arbeit erlangt werden konnten, noch einmal als Übersicht zusammengefasst und in den literarischen Kontext der entsprechenden KDEL2-Funktionen eingeordnet.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung von KDEL2-KO Zelllinien unter Einordnung in den bereits aus der Literatur bekannten Funktionskontext.

Ergebnis der Charakterisierung	Entsprechender Literaturbezug
<ul style="list-style-type: none"> - bessere Kompensation eines KDEL2-KO durch HAP1-Zellen im Vergleich zu HEK293-Zellen - stärkere Präsenz von KDEL2 in dieser Zelllinie als möglicher Kompensationsvorteil - keine verstärkte Expression der beiden verbleibenden KDEL2s zum Ausgleich eines KDEL2-, 2-, oder 3-KO 	<ul style="list-style-type: none"> - unterschiedliche Auswirkungen eines KDEL2-Funktionsverlusts bei verschiedenen Zelltypen (Wang <i>et al.</i>, 2011; Kamimura <i>et al.</i>, 2015; Siggs <i>et al.</i>, 2015). - Variation der zellulären KDEL2-Menge beeinflusst das Zellschicksal (Yamamoto <i>et al.</i>, 2003; Wang <i>et al.</i>, 2011; Kamimura <i>et al.</i>, 2015; Siggs <i>et al.</i>, 2015).
<ul style="list-style-type: none"> - verstärkte Sensitivität der KDEL2-KO HAP1-Zellen gegenüber ER-Stressbedingungen - ähnlicher Effekt monoallelischer KDEL2-KO HeLa-Zellen bei höheren Thapsigargin-Konzentrationen 	<ul style="list-style-type: none"> - zelluläre KDEL2-Menge beeinflusst das Ausmaß der Stressantwort (Yamamoto <i>et al.</i>, 2003; Wang <i>et al.</i>, 2011). - Expression einer KDEL2-D169N-Mutante vermindert die Phosphorylierung von p38 MAP-Kinasen und JNK1 → gesteigerte Sensitivität von HeLa-Zellen bei ER-Stressbedingungen (Yamamoto <i>et al.</i>, 2003)
<ul style="list-style-type: none"> - verstärkte Sekretion von PDI in KDEL2-KO HAP1-Zellen, keine Veränderung beziehungsweise leichte Erhöhung des intrazellulären PDI-Gehalts - keine Beeinflussung der intrazellulären und extrazellulären PDI-Menge in HEK293-Zellen durch einen KDEL2-beziehungsweise KDEL3-KO 	<ul style="list-style-type: none"> - KDEL2s vermitteln die Retention löslicher ER-residenter Proteine (Munro & Pelham, 1987). - erhöhte Kar2p/BiP-Sekretion durch KDEL2-Verlust in Hefen, keine Veränderung des intrazellulären Kar2p/BiP-Gehalts (Semenza <i>et al.</i>, 1990). - Erhöhte BiP-Sekretion in HeLa-Zellen nach Expression einer KDEL2-D169N-Mutante erst unter ER-Stressbedingungen, keine Beeinflussung der intrazellulären BiP-Menge (Yamamoto <i>et al.</i>, 2003).

<ul style="list-style-type: none">- Veränderungen in Entwicklungsprozessen, Komponenten der Zelladhäsion und der Extrazellulären Matrix auf Transkriptomebene der KDELRL1-KO HAP1-Zellen	<ul style="list-style-type: none">- Beteiligung des KDELRL an der Regulierung der ECM-Degradation und Invadopodia-Ausbildung (Ruggiero <i>et al.</i>, 2014; Ruggiero <i>et al.</i>, 2018).
--	--

Ausblick

Im Fokus dieser Arbeit stand unter anderem die Analyse der KDELR-Lokalisation in Hefe- und Säugerzellen. Während ein Nachweis der Co-Lokalisation in der Plasmamembran erfolgreich durchgeführt werden konnte, erfolgte bisher keine Quantifizierung der dort lokalisierten Rezeptoren. Es wäre daher interessant, weitere elektronenmikroskopische Aufnahmen zu erzeugen, die Menge an intrazellulären Goldpartikeln und Goldpartikeln an der Plasmamembran zu vergleichen und statistisch auszuwerten. Hier wäre auch ein korrelatives Mikroskopie-Verfahren denkbar, bei dem durch vorherige Aufnahmen am CLSM eine Fluoreszenz-basierte Färbung der Plasmamembran oder des ER und somit eine genaue Lokalisation der Goldpartikel in der entsprechenden Zelle ermöglicht wird.

Durch einen weiteren Versuchsansatz könnte zusätzlich die Frage adressiert werden, welche Bedingungen die Rezeptor-Lokalisation beeinflussen. Dazu würde sich beispielsweise ein BRET („bioluminescence resonance energy transfer“-basiertes Assay eignen, bei dem ein stärkeres Signal messbar wird, je mehr Rezeptoren die Plasmamembran erreichen. Für diesen Versuch müsste ein Plasmamembran-lokalisiertes „Fänger“-Protein (beispielsweise K-Ras) mit einem Fluoreszenzprotein wie YFP fusioniert werden, während der KDELR in einer Fusion mit Luciferase als „Beute-Protein“ exprimiert wird. Durch Zugabe eines Substrats und den darauffolgenden Umsatz durch die Luciferase wird Energie frei, die einen Energietransfer auf YFP und somit dessen Anregung ermöglicht, wenn sich der KDELR in der direkten Nähe von K-Ras und somit in der Plasmamembran befindet. Die gemessene Absorption von YFP und dementsprechend das errechnete BRET-Signal sollten also mit erhöhter KDELR-Menge an der Plasmamembran ansteigen. Eine mögliche Bedingung, die in diesem Assay untersucht werden könnte, stellt beispielsweise eine Inkubation der Zellen mit KDELR-tragenden Liganden dar, die einen gerichteten Transport der KDELRs zur Plasmamembran bewirken könnten.

Die Generierung der KDELR-KO Zelllinien im Zuge dieser Arbeit liefert eine wichtige Grundlage für eine Vielzahl weiterer Experimente. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse legen eine weitere Charakterisierung der KDELR1-KO Zellen hinsichtlich ihrer Migration und Adhäsion nahe, die unter Verwendung von Scratch- und Adhäsionsassays erfolgen könnte. Bei der Durchführung des Adhäsionsassays könnten die verwendeten Platten mit verschiedenen Strukturproteinen wie Collagen und Laminin gecoatet werden, um gleichzeitig einen Hinweis für die Ursache eines möglichen Adhäsionsunterschiedes zwischen KDELR1-KO und wildtypischen Zellen zu erhalten. Zusätzlich wäre es sinnvoll einige Gene, die in der

Transkriptomanalyse eine starke Deregulation zeigten und funktionell mit Zelladhäsion oder der Extrazellulären Matrix in Zusammenhang stehen, auszuwählen und deren Proteinlevel in Western Blot Analysen zu adressieren. Eine zusätzliche Durchführung dieser Experimente mit KDELR2- und KDELR3-KO Zellen könnte zur Aufklärung funktioneller Unterschiede der drei Homologe beitragen, wobei das Vorliegen einer anderen Zelllinie beim KDELR1-KO bei einem solchen Vergleich berücksichtigt werden muss.

Es wäre ebenfalls interessant, in den entsprechenden KO Zellen ein zusätzliches siRNA-Silencing der verbleibenden Rezeptoren durchzuführen und nach einer Evaluierung der knock-down Effizienz und Dauer mittels quantitativer PCR den verstärkten Rezeptorverlust zum Beispiel durch Zellvitalitätsassays weiter zu charakterisieren. Vor allem in KDELR1-KO HAP1-Zellen wäre ein zusätzlicher knock-down von KDELR2 interessant und könnte einen erheblichen Einfluss auf die Zellhomöostase nehmen.

Zusammenfassung

Die Regulation des intrazellulären Vesikeltransports entlang des sekretorischen Wegs stellt einen fundamentalen Prozess zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dar. KDELRs repräsentieren einen wichtigen Bestandteil dieser Regulationsmechanismen, indem sie aufgrund ihrer Bindung löslicher ER-residenter Proteine im Golgi als Traffick-Sensor fungieren und infolgedessen sowohl anterograde Transportprozesse zur Plasmamembran als auch den retrograden Vesikeltransport zum ER aktivieren. Während die Aktivierung des retrograden Transports über eine Gs/PKA-vermittelte Signalkaskade verläuft, erfolgt die Stimulation des Plasmamembran-gerichteten Traffickings über eine Interaktion von KDELR1 mit dem G-Protein Gq und der daraus resultierenden Aktivierung von Src-Kinasen. Eine KDELR1-abhängige Src-Aktivierung steht zusätzlich im Zusammenhang mit der Ausbildung von Invadopodia und dem Abbau der Extrazellulären Matrix. In Abhängigkeit zu seiner Funktion als Traffick-Sensor wird der KDELR auch mit ER-Stress assoziiert und trägt aktiv zur Regulation der zellulären Stressantwort bei. Der vorliegende Zelltyp, das Expressionslevel des KDELR sowie dessen Lokalisation in der Zelle spielen hier eine wichtige Rolle bezüglich der Auswirkungen des KDELR-Signallings.

Während allgemein eine KDELR-Lokalisation in den Membranen von Golgi und ER vorherrschend ist, konnte in dieser Arbeit die Annahme einer Co-Lokalisation in der Plasmamembran von Hefen und Säugerzellen durch elektronenmikroskopische Analysen weiter bekräftigt werden. Zusätzlich wurde eine Relevanz des C-terminalen Lysin-Clusters bei der KDELR-Retention in Hefen und Säugerzellen durch Lokalisationsanalysen von Reporterproteinen bestätigt.

Im Zuge eines weitreichenden CRISPR/Cas9-Screenings konnte ein KDELR2- und KDELR-KO in HEK293-Zellen erfolgreich etabliert werden, während das Ausbleiben eines biallelischen KDELR1-KO auf dessen essentielle Bedeutung in HEK293-Zellen hinweist. Dieser Screen lieferte außerdem Hinweise auf ein erhöhtes Auftreten von off-Target Effekten bei einer zu starken Cas9-Expression, wodurch das Absterben der Zellen verstärkt und ein spezifischer Gen-KO erschwert wurde. Zur Charakterisierung eines KDELR1-KO in HAP1-Zellen wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt, die eine signifikante Veränderung von Prozessen der Zellentwicklung und Adhäsion sowie von Komponenten der Extrazellulären Matrix zeigte. Die Bedeutung von KDELR1 bezüglich der Regulation von Prozessen in der Extrazellulären Matrix konnte somit untermauert werden und bietet eine weitere Grundlage

für Analysen, die auch mit einer KDELR1-Lokalisation an der Plasmamembran in Verbindung gebracht werden könnten. Ein Vergleich der Expressionslevel der drei KDELRs mittels Transkriptomanalyse und quantitativer PCR zeigte, dass in keiner der KO-Zelllinien eine Hochregulation der beiden verbleibenden Rezeptoren zum Ausgleich erfolgte. Ein etwa gleich starkes Expressionslevel von KDELR1 und KDELR2 in HAP1-Zellen könnte die bessere Kompensation des KDELR1-Verlusts in dieser Zelllinie erklären, während die Menge an KDELR1-mRNA in HEK293-Zellen deutlich überwiegt. Diese Unterschiede der KDELR-Expressionslevel in verschiedenen Zelltypen unterstreichen die Annahme, dass die Relevanz der drei Rezeptoren je nach Zelllinie differiert und daher auch die Effekte eines KDELR1-Verlusts oder einer Überexpression variieren können.

Eine weitere Charakterisierung der KDELR-KO Zellen zeigte eine verstärkte Sekretion von PDI in KDELR1-KO Zellen, während der KDELR2- und KDELR3-KO den PDI-Gehalt im Zellkulturmedium nicht beeinflusste. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Sensitivität von KDELR1-KO Zellen gegenüber ER-Stressbedingungen nachgewiesen werden, was die Bedeutung von KDELR1 bei der Regulierung der zellulären Stressantwort unterstreicht. Eine Überexpression des KDELR in Hefen deutete auf eine Aktivierung der „unfolded protein response“ hin und unterstützt somit ebenfalls die Bedeutung der KDELR-Menge bezüglich einer Aufrechterhaltung der Zellhomöostase.

Insgesamt konnte mit dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der Lokalisation und des Wirkungsspektrums von KDELRs beigetragen werden. Die Generierung von KDELR-KO Zelllinien ermöglicht weiterhin eine Analyse neuer KDELR-Funktionen sowie von Funktionsunterschieden zwischen den drei KDELR-Homologen.

Literaturverzeichnis

- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, *513*(7519), 569–573.
- Aoe, T., Cukierman, E., Lee, A., Cassel, D., Peters, P. J., & Hsu, V. W. (1997). The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *EMBO Journal*, *16*(24), 7305–7316.
- Artym, V. V., Zhang, Y., Seillier-Moisewitsch, F., Yamada, K. M., & Mueller, S. C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: Defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Research*, *66*(6), 3034–3043.
- Barlowe, C. K., & Miller, E. A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, *193*(2), 383–410.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R. (1994). COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, *77*(6), 895–907.
- 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.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, *315*(5819), 1709–1712.
- Becker, B., Blum, A., Gießelmann, E., Dausend, J., Rammo, D., Müller, N. C., Tschacksch, E., Steimer, M., Spindler, J., Becherer, U., Rettig, J., Breinig, F., Schmitt, M. J. (2016). H/KDEL receptors mediate host cell intoxication by a viral A/B toxin in yeast. *Scientific Reports*, *6*, 31105.
- Becker, B., Shaebani, M. R., Rammo, D., Bubel, T., Santen, L., & Schmitt, M. J. (2016). Cargo binding promotes KDEL receptor clustering at the mammalian cell surface. *Scientific Reports*, *6*, 28940.
- Bernales, S., McDonald, K. L., & Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biology*, *4*(12), 2311–2324.
- Bharti, S., Inoue, H., Bharti, K., Hirsch, D. S., Nie, Z., Yoon, H.-Y., Artym, V., Yamada, K. M., Mueller, S. C., Barr, V. A., Randazzo, P. A. (2007). Src-dependent phosphorylation of ASAP1 regulates podosomes. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(23), 8271–8283.
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, *7*(6), 1513–1523.
- Bompierre, Ségolène (2016): Einfluss einer KDEL-Rezeptor Überexpression auf die UPR-

- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, *116*(2), 153-66.
- Bowden, E. T., Onikoyi, E., Slack, R., Myoui, A., Yoneda, T., Yamada, K. M., & Mueller, S. C. (2006). Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, *312*(8), 1240–1253.
- Cabrera, M., Muñiz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martín, M. E., & Velasco, A. (2003). The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(10), 4114–25.
- Cance, W. G., Harris, J. E., Iacocca, M. V., Roche, E., Yang, X. H., Chang, J., Simkins, S., Xu, L. H. (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: Correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clinical Cancer Research*, *6*(6), 2417–2423.
- Cancino, J., Capalbo, A., Di Campli, A., Giannotta, M., Rizzo, R., Jung, J. E., 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. *Developmental Cell*, *30*(3), 280–294.
- Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2008). Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes & Development*, *22*(24), 3489–3496.
- Chan, K. T., Cortesio, C. L., & Huttenlocher, A. (2009). Fak alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *Journal of Cell Biology*, *185*(2), 357–370.
- Chen, F., Pruett-Miller, S. M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., Collingwood, T. N., Frodin, M., Davis, G. D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nature Methods*, *8*(9), 753–757.
- Chen, W. -T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *Journal of Experimental Zoology*, *251*(2), 167–185.
- Cho, H., Choi, S. H., Hwang, K., Oh, S., Kim, H., Yoon, D., Choi, M. A., Lim, S., Song, H., Jang, Y., Kim, T. W. (2005). The Src/PLC/PKC/MEK/ERK signaling pathway is involved in aortic smooth muscle cell proliferation induced by glycated LDL. *Molecules and Cells*, *19*(1), 60–6.
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2002). Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology*, *156*(5), 921–929.
- Cox, J. S., Chapman, R. E., & Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular Biology of the Cell*, *8*(9), 1805–1814.

- Cox, J. S., Shamu, C. E., & Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 73(6), 1197–1206.
- Cox, J. S., & Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 87(3), 391–404.
- Cradick, T. J., Fine, E. J., Antico, C. J., & Bao, G. (2013). CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Research*, 41(20), 9584–9592.
- Crowther, R. A., & Pearse, B. M. F. (1981). Assembly and packing of clathrin into coats. *Journal of Cell Biology*, 91(3 D), 790–797.
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M., & Cassel, D. (1995). The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science*, 270(5244), 1999–2002.
- Dell'Angelica, E. C., Klumperman, J., Stoorvogel, W., & Bonifacino, J. S. (1998). Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science*, 280(5362), 431–434.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–7.
- Duda, K., Lonowski, L. A., Kofoed-Nielsen, M., Ibarra, A., Delay, C. M., Kang, Q., Yang, Z., Pruett-Miller, S. M., Bennett, E. P., Wandall, H. H., Davis, G. D., Hansen, S. H. & Frödin, M. (2014). High-efficiency genome editing via 2A-coupled co-expression of fluorescent proteins and zinc finger nucleases or CRISPR/Cas9 nickase pairs. *Nucleic Acids Research*, 42(10), e84.
- Eisfeld, K., Riffer, F., Mentges, J., & Schmitt, M. J. (2000). Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Molecular Microbiology*, 37(4), 926–940.
- Essletzbichler, P., Konopka, T., Santoro, F., Chen, D., Gapp, B. V., Kralovics, R., Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M. & Bürckstümmer, T. (2014). Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Research*, 24(12), 2059–2065.
- Fernandez, J., Bode, B., Koromilas, A., Alan Diehl, J., Krukovets, I., Snider, M. D., & Hatzoglou, M. (2002). Translation mediated by the internal ribosome entry site of the cat-1 mRNA is regulated by glucose availability in a PERK kinase-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 11780–11787.
- Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M. D., & Hatzoglou, M. (2002). Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 19198–19205.
- Ganesh, A., North, P., & Thacker, J. (1993). Repair and misrepair of site-specific DNA double-strand breaks by human cell extracts. *Mutation Research*, 299(3–4), 251–259.

- Giannotta, M., Fragassi, G., Tamburro, A., Vanessa, C., Luini, A., & Sallese, M. (2015). Prohibitin: A novel molecular player in KDEL receptor signalling. *BioMed Research International*, 2015, 319454.
- Giannotta, M., Ruggiero, C., Grossi, M., Cancino, J., Capitani, M., Pulvirenti, T., Consoli, G. M., 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 Journal*, 31(13), 2869–2881.
- Gilman, A. G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, 36(3), 577-9.
- Glembotski, C. C., Thuerauf, D. J., Huang, C., Vekich, J. A., Gottlieb, R. A., & Doroudgar, S. (2012). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 25893–25904.
- Griffith, J., & Reggiori, F. (2009). Ultrastructural analysis of nanogold-labeled endocytic compartments of yeast *Saccharomyces cerevisiae* using a cryosectioning procedure. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 57(8), 801–809.
- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse-Locker, J., Nilsson, T., Goud, B., Söling, H. D., Tang, B. L., Wong, S. H., & Hong, W. (1994). Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 127(6 I), 1557–1574.
- Griffiths, G., Warren, G., Quinn, P., Mathieu-Costello, O., & Hoppeler, H. (1984). Density of newly synthesized plasma membrane proteins in intracellular membranes. I. Stereological studies. *Journal of Cell Biology*, 98(6), 2133–2141.
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 139(5), 945–956.
- Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F. T., & Rothman, J. E. (1994). En Bloc incorporation of coatomer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *Journal of Cell Biology*, 124(6), 883–892.
- Harding, H. P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D. D., & Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *Perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Molecular Cell*, 7(6), 1153–1163.
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271–274.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.-J., Kaufman, R. J., & Ron, D. (2009). Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1832–7.

- Hardwick, K. G., Boothroyd, J. C., Rudner, A. D., & Pelham, H. R. (1992). Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *EMBO Journal*, *11*(11), 4187–95.
- Hardwick, K. G., Lewis, M. J., Semenza, J., Dean, N., & Pelham, H. R. (1990). ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO Journal*, *9*(3), 623–630.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(11), 3787–3799.
- Heath, J. P., & Dunn, G. A. (1978). Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. *Journal of Cell Science*, *29*, 197–212.
- Henderson, M. J., Richie, C. T., Airavaara, M., Wang, Y., & Harvey, B. K. (2013). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(6), 4209–4225.
- Holtz, W. A., & O'Malley, K. L. (2003). Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(21), 19367–19377.
- Hoozemans, J. J. M., Veerhuis, R., Van Haastert, E. S., Rozemuller, J. M., Baas, F., Eikelenboom, P., & Scheper, W. (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *110*(2), 165–172.
- Hsu, V. W., Shah, N., & Klausner, R. D. (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.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., & Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, *275*(5296), 90–94.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, *169*(12), 5429–5433.
- Jackson, L. P., Lewis, M., Kent, H. M., Edeling, M. A., Evans, P. R., Duden, R., & Owen, D. J. (2012). Molecular basis for recognition of dilysine trafficking motifs by COPI. *Developmental Cell*, *23*(6), 1255–1262.
- Jackson, M. E., Simpson, J. C., Girod, A., Pepperkok, R., Roberts, L. M., & Lord, J. M. (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. *Journal of Cell Science*, 112(4), 467–75.
- Jackson, M. R., Nilsson, T., & Peterson, P. A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal*, 9(10), 3153–3162.
- Kamimura, D., Arima, Y., Tsuruoka, M., Jiang, J. jing, Bando, H., Meng, J., Sabharwal, L., Stofkova, A., Nishikawa, N., Higuchi, K., Ogura, H., Atsumi, T., & Murakami, M. (2016). Strong TCR-mediated signals suppress integrated stress responses induced by KDELR1 deficiency in naive T cells. *International Immunology*, 28(3), 117–126.
- Kamimura, D., Katsunuma, K., Arima, Y., Atsumi, T., Jiang, J. J., 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. *Nature Communications*, 6, 7474.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.-J., & Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332(6163), 462–464.
- Lauer, Anna (2016). Vergleichende Analyse der Lokalisation mutanter KDEL-Rezeptor-Varianten in Säugerzellen und Untersuchung ihrer ER-Retention in Hefe. *Master-Arbeit, Universität des Saarlandes*.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., & Moore, M. J. (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Journal*, 20(17), 4987–4997.
- Lencer, W. I., Constable, C., Moe, S., Jobling, M. G., Webb, H. M., Ruston, S., Madara, J. L., Hirst, T. R., & Holmes, R. K. (1995). Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: Role of COOH-terminal KDEL. *Journal of Cell Biology*, 131(4), 951–962.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Démollière, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H., & Cosson, P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, 79(7), 1199–1207.
- Lewis, M. J., & Pelham, H. R. B. (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature*, 348(6297), 162–163.
- Lewis, M. J., & Pelham, H. R. B. (1992a). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*, 68(2), 353–364.
- Lewis, M. J., & Pelham, H. R. B. (1992b). Sequence of a second human KDEL receptor. *Journal of Molecular Biology*, 226(4), 913–916.
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z., Anderson, R. G. W., Brose, N., & Südhof, T. C. (1995). Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature*, 375(6532), 594–599.

- Li, M. Y., Grandadam, M., Kwok, K., Lagache, T., Siu, Y. L., Zhang, J. S., Sayteng, K., Kudelko, M., Qin, C. F., Olivo-Marin, J. C., Bruzzone, R., & Wang, P. G. (2015). KDEL receptors assist dengue virus exit from the endoplasmic reticulum. *Cell Reports*, *10*(9), 1496–1507.
- Li, X., Xu, C., & Yang, P. (2013). C-Jun NH2-terminal kinase 1/2 and endoplasmic reticulum stress as interdependent and reciprocal causation in diabetic embryopathy. *Diabetes*, *62*(2), 599–608.
- Losson, R., & Lacroute, F. (1979). Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(10), 5134–5137.
- Luo, S., & Lee, A. S. (2002). Requirement of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway for the induction of the 78 kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin heavy-chain binding protein by azetidine stress: activating transcription factor 6 as a target for stress-induced phosphorylation. *Biochemical Journal*, *366*(3), 787–795.
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: Friend or foe? *Nature Reviews Cancer*, *4*(12), 966–77.
- Majoul, I., Straub, M., Hell, S. W., Duden, R., & Söling, H. D. (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: Measurements in living cells using FRET. *Developmental Cell*, *1*(1), 139–153.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J. C., & Rothman, J. E. (1989). Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*, *58*(2), 329–336.
- Mancias, J. D., & Goldberg, J. (2008). Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery. *EMBO Journal*, *27*(21), 2918–2928.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair*, *7*(10), 1765–1771.
- Martínez-Menárguez, J. A., Geuze, H. J., Slot, J. W., & Klumperman, J. (1999). Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell*, *98*(1), 81–90.
- Mätlik, K., Yu, L. ying, Eesmaa, A., Hellman, M., Lindholm, P., Peränen, J., Galli, E., Anttila, J., Saarma, M., Permi, P., Airavaara, M., & Arumäe, U. (2015). Role of two sequence motifs of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in its survival-promoting activity. *Cell Death & Disease*, *6*, e2032.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., & Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*, *93*(2), 263–275.
- Maytin, E. V., Ubeda, M., Lin, J. C., & Habener, J. F. (2001). Stress-inducible transcription

- factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Experimental Cell Research*, 267(2), 193–204.
- McNew, J. A., Parlatl, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T. H., & Rothman, J. E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, 407(6801), 153–159.
- Michelsen, K., Schmid, V., Metz, J., Heusser, K., Liebel, U., Schwede, T., Spang, A., & Schwappach, B. (2007). Novel cargo-binding site in the β and δ subunits of coatamer. *Journal of Cell Biology*, 179(2), 209–217.
- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S., & Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO Journal*, 21(22), 6105–6113.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733–740.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Mueller, S. C., & Chen, W. T. (1991). Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *Journal of Cell Science*, 99(2), 213–225.
- Munro, S., & Pelham, H. R. B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48(5), 899–907.
- Nguyên, D. T., Kebache, S., Fazel, A., Wong, H. N., Jenna, S., Emadali, A., Lee, E. H., Bergeron, J. J., Kaufman, R. J., Larose, L., & Chevet, E. (2004). Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*, 15(9), 4248–60.
- Nijtmans, L. G. J., Artal Sanz, M., Grivell, L. A., & Coates, P. J. (2002). The mitochondrial PHB complex: Roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(1), 143–55.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., & Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes and Development*, 16(11), 1345–1355.
- Oh-Hashi, K., Tanaka, K., Koga, H., Hirata, Y., & Kiuchi, K. (2012). Intracellular trafficking and secretion of mouse mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 363(1–2), 35–41.
- Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., ... Sugano, S. (2004).

- Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nature Genetics*, 36(1), 40–45.
- Owen, D. J. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science*, 282(5392), 1327–1332.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H., & Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306(5695), 457–461.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189(4206), 867–867.
- Park, J. M., Greten, F. R., Li, Z. W., & Karin, M. (2002). Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science*, 297(5589), 2048–2051.
- Pearse, B. M. F. (1976). Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(4), 1255–1259.
- Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V. V., Lee, Y. L., Guschin, D. Y., Rupniewski, I., Waite, A. J., Carpenito, C., Carroll, R. G., Orange, J. S., Urnov, F. D., Rebar, E. J., Ando, D., Gregory, P. D., Riley, J. L., Holmes, M. C., & June, C. H. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 26(7), 808–816.
- Petrova, P. S., Raibekas, A., Pevsner, J., Vigo, N., Anafi, M., Moore, M. K., Peaire, A. E., Shridhar, V., Smith, D. I., Kelly, J., Durocher, Y., & Commissiong, J. W. (2003). MANF: A new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *Journal of Molecular Neuroscience*, 20(2), 173–187.
- Pulvirenti, T., Giannotta, M., Capestrano, M., Capitani, M., Pisanu, A., Polishchuk, R. S., San Pietro, E., Beznoussenko, G. V., Mironov, A. A., Turacchio, G., Hsu, V. W., Sallese, M., & Luini, A. (2008). A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway. *Nature Cell Biology*, 10(8), 912–922.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7420–7426.
- Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Van, D. N., Latva-Ranta, M., & Ruddock, L. (2007). A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *Journal of Cell Biology*, 179(6), 1193–1204.
- Rebecchi, Valeria (2018). Analysis of KDEL-receptor ER/Golgi retention in mammalian cells. *Master-Arbeit, Universität des Saarlandes*.
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., & Schmitt, M. J. (2005). Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, 168(3), 353–358.

- Roberg, K. J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., & Kaiser, C. A. (1999). LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 145(4), 659–672.
- Ruggiero, C., Fragassi, G., Grossi, M., Picciani, B., Di Martino, R., Capitani, M., Buccione, R., Luini, A., & Sallese, M. (2014). A Golgi-based KDELR-dependent signalling pathway controls extracellular matrix degradation. *Oncotarget*, 6(5), 3375-93.
- Ruggiero, C., Grossi, M., Fragassi, G., Di Campli, A., Di Ilio, C., Luini, A., & Sallese, M. (2018). The KDELR receptor signalling cascade targets focal adhesion kinase on focal adhesions and invadopodia. *Oncotarget*, 9(12), 10228–10246.
- Saleh-Gohari, N., & Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Research*, 32(12), 3683–8.
- Schmitt, M., Brendel, M., Schwarz, R., & Radler, F. (1989). Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT28. *Journal of General Microbiology*, 135(6), 1529–1535.
- Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., Wanner, B., van der Oost, J., Brouns, S. J., & Severinov, K. (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10098–103.
- Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean, N., & Pelham, H. R. B. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell*, 61(7), 1349–1357.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., & Rothman, J. E. (1991). ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: A novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, 67(2), 239–253.
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., & Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods*, 11(4), 399–402.
- Shih, W., Gallusser, A., & Kirchhausen, T. (1995). A clathrin-binding site in the hinge of the $\beta 2$ chain of mammalian AP-2 complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(52), 31083–31090.
- Siggs, O. M., Popkin, D. L., Krebs, P., Li, X., Tang, M., Zhan, X., Zeng, M., Lin, P., Xia, Y., Oldstone, M. B., Cornall, R. J., & Beutler, B. (2015). Mutation of the ER retention receptor KDELR1 leads to cell-intrinsic lymphopenia and a failure to control chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(42), 5706–5714.
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*,

- Singh, P., Tang, B. L., Wong, S. H., & Hong, W. (1993). Transmembrane topology of the mammalian KDEL receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), 6435–41.
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., & Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317(6034), 230–234.
- Solis, G. P., Bilousov, O., Koval, A., Lüchtenborg, A. M., Lin, C., & Katanaev, V. L. (2017). Golgi-resident Gao promotes protrusive membrane dynamics. *Cell*, 170(5), 939–955.
- Stagg, S. M., Gürkan, C., Fowler, D. M., LaPointe, P., Foss, T. R., Potter, C. S., Carragher, B., & Balch, W. E. (2006). Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*, 439(7073), 234–238.
- Sternweis, P. C., & Robishaw, J. D. (1984). Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *Journal of Biological Chemistry*, 259(22), 13806–13813.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7), e21800.
- Taipale, J., & Keski-Oja, J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(1), 51–9.
- Taketani, Y., Kitamoto, K., Sakisaka, T., Kimakura, M., Toyono, T., Yamagami, S., Amano, S., Kuroda, M., Moore, T., Usui, T., & Ouchi, Y. (2017). Repair of the TGFBI gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair. *Scientific Reports*, 7(1), 16713.
- Thuerauf, D. J., Arnold, N. D., Zechner, D., Hanford, D. S., DeMartin, K. M., McDonough, P. M., Prywes, R., & Glembotski, C. C. (1998). p38 mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum Response element: A potential role for the transcription factor ATF6. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20636–20643.
- Townsley, F. M., Wilson, D. W., & Pelham, H. R. (1993). Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO Journal*, 12(7), 2821–9.
- Tsai, Y.-L., Ha, D. P., Zhao, H., Carlos, A. J., Wei, S., Pun, T. K., Wu, K., Zandi, E., Kelly, K., & Lee, A. S. (2018). Endoplasmic reticulum stress activates SRC, relocating chaperones to the cell surface where GRP78/CD109 blocks TGF- β signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(18), 4245-4254.
- Urano, F., Wang, X. Z., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287(5453), 664–666.

- Verma, G., & Datta, M. (2010). IL-1 β induces ER stress in a JNK dependent manner that determines cell death in human pancreatic epithelial MIA PaCa-2 cells. *Apoptosis*, *15*(7), 864–876.
- Vigers, G. P., Crowther, R. A., & Pearse, B. M. (1986). Three-dimensional structure of clathrin cages in ice. *EMBO Journal*, *5*(3), 529–34.
- 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.
- Wang, X. Z., & Ron, D. (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, *272*(5266), 1347–1349.
- Waters, M. G., Serafini, T., & Rothman, J. E. (1991). “Coatomer”: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, *349*(6306), 248–251.
- Wieland, F. T., Gleason, M. L., Serafini, T. a, & Rothman, J. E. (1987). The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell*, *50*, 289–300.
- Wilson, D. W., Lewis, M. J., & Pelham, H. R. B. (1993). pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(10), 7465–7468.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(36), 34525–32.
- Yang, C., Slepnev, V. I., & Goud, B. (1994). Rab proteins form in vivo complexes with two isoforms of the GDP- dissociation inhibitor protein (GDI). *Journal of Biological Chemistry*, *269*(50), 31891–31899.
- Yu, X., Breitman, M., & Goldberg, J. (2012). A Structure-based mechanism for Arf1-dependent recruitment of coatomer to membranes. *Cell*, *148*(3), 530–542.
- Zhao, P., Xiao, X., Kim, A. S., Leite, M. F., Xu, J., Zhu, X., Ren, J., & Li, J. (2008). c-Jun inhibits thapsigargin-induced ER stress through up-regulation of DSCR1/Adapt78. *Experimental Biology and Medicine*, *233*(10), 1289–300.
- Zhou, J., Liu, C. Y., Back, S. H., Clark, R. L., Peisach, D., Xu, Z., & Kaufman, R. J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(39), 14343–14348.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X. Z., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., & Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes and Development*, *12*(7), 982–995.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred Schmitt danken, der mir die Promotion an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat. Vielen Dank für Ihr stetes Interesse am Fortschritt meiner Arbeit, die uneingeschränkte Unterstützung und das fortwährende Vertrauen in eine erfolgreiche Bewältigung der Projekte. Ein großes Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Martin Simon für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Hilfe bei den qPCR-Experimenten, der Transkriptomanalyse und die generelle Unterstützung im Laufe meiner Promotion.

Außerdem gilt mein Dank allen Kooperationspartnern, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben: Prof. Dr. Fulvio Reggiori für die Durchführung der Elektronenmikroskopie in Hefen, Dr. Marcus Koch, der die elektronenmikroskopische Analyse der Säugerzellen ermöglicht hat, sowie Dr. Stephan Philip für seine Unterstützung bei der CRISPR/Cas9-Technologie und das damit verbundene Sorten der Zellen.

Ein weiteres Dankeschön richte ich an die Mitglieder des IRTG 1830 für die sowohl lehrreiche als auch freundschaftliche Atmosphäre auf den entsprechenden Seminaren und Konferenzen. Hier geht ein großer Dank an Dr. Gabriele Amoroso für die tolle Organisation und die große Hilfe bei organisatorischen Fragen. Dr. Joe Casey möchte ich an dieser Stelle für die Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes in Kanada danken sowie für das interessante Projekt, das ich in dieser Zeit in seinem Labor bearbeiten durfte. Dabei gilt mein Dank auch allen Personen, die diesen Auslandsaufenthalt zu einer tollen Erfahrung gemacht haben.

Natürlich gilt mein Dank auch allen Mitgliedern der AG Schmitt für das freundschaftliche Arbeitsklima. Dr. Frank Breinig danke ich für den steten Rückhalt, die hilfreichen Ratschläge und natürlich auch für die Kaffeebestellungen. Ruth Kiefer und Stefanie Gier danke ich für die wunderschönen Mittagspausen und ihre Unterstützung, die weit über den Laboralltag hinaus geht. An dieser Stelle danke ich Steffi für ihre unermüdliche Hilfe beim CRISPR/Cas9-Screening, das ohne sie in diesem Ausmaß nicht möglich gewesen wäre. Außerdem danke ich Dr. Björn Becker für die Zusammenarbeit und seine Hilfsbereitschaft in der KDELR-Thematik. Einen weiteren Dank richte ich an meine Studenten Ségolène Bompierre, Anna Lauer, Luca Vella und Valeria Rebecchi, die mit ihren Bachelor- und Master-Arbeiten zum Gelingen meiner Projekte beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön geht an all meine Freunde für die schönen gemeinsamen Momente, ihr Verständnis und die bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen. Hier geht mein Dank besonders an Stefanie Gier und Nathalie Jung, die mich bereits durch das ganze Studium begleitet haben und immer ermutigend an meiner Seite stehen.

Auch meiner Familie möchte ich an dieser Stelle für die stete Unterstützung danken. Besonders meiner Schwester Stephanie danke ich für den Rückhalt und ihre Hilfe in jeder Situation.

Anhang

Tabelle A1: Read-Counts der einzelnen Replikate bei der Transkriptomanalyse.

	Replikat	Counts
Data	AB_KO1_743	128.288.626
	AB_KO2_744	104.027.386
	AB_KO3_745	142.791.842
	AB_WT1_737	147.378.976
	AB_WT1pos_740	96.796.740
	AB_WT2_738	140.326.618
	AB_WT2pos_741	81.700.816
	AB_WT3_739	75.056.066
	AB_WT3pos_742	91.036.042
Trimmed	AB_KO1_743	123.370.800
	AB_KO2_744	100.899.370
	AB_KO3_745	135.769.974
	AB_WT1_737	140.265.218
	AB_WT1pos_740	92.865.446
	AB_WT2_738	136.618.318
	AB_WT2pos_741	77.176.986
	AB_WT3_739	73.104.608
	AB_WT3pos_742	90.005.994

Tabelle A2: Differentiell exprimierte Gene (adjusted p-value < 0,05) der Transkriptomanalyse (Vergleich KDELR1-KO mit wildtypischen HAP1-Zellen), deren Gen-ID, adjusted p-values und Fold-Change.

Gen-ID	Gen Name	adjusted p-values	Fold-Change
ENSG00000180353.10	HCLS1	2,32E-70	-8,20919219
ENSG0000026025.15	VIM	2,24E-59	-5,0347944
ENSG00000186340.14	THBS2	9,49E-56	-6,444271646
ENSG00000145242.13	EPHA5	2,33E-51	7,158160571
ENSG00000185222.8	TCEAL9	1,11E-43	-9,157984695
ENSG00000178522.14	AMBN	9,50E-41	-4,125701454
ENSG00000197565.15	COL4A6	1,31E-40	-4,692394641
ENSG00000130303.12	BST2	5,90E-37	-8,238463683
ENSG0000052850.5	ALX4	1,49E-32	-5,301034698
ENSG00000152217.16	SETBP1	5,04E-29	-4,986919273
ENSG00000132718.8	SYT11	7,23E-29	-2,856189592
ENSG00000156299.13	TIAM1	3,09E-27	3,314667192
ENSG00000134802.17	SLC43A3	2,79E-26	-3,255057521
ENSG00000169594.13	BNC1	8,57E-26	3,337302104
ENSG00000092345.13	DAZL	9,43E-26	-4,048958829
ENSG00000136960.12	ENPP2	1,72E-23	-4,265987206
ENSG00000157064.10	NMNAT2	4,62E-23	4,099707417
ENSG00000224039.1	CDYLP1	7,25E-23	-4,443883553
ENSG00000284109.1	CDYLP1	7,25E-23	-4,443883553
ENSG00000221818.8	EBF2	1,13E-22	4,379950994

ENSG00000154645.13	CHODL	3,87E-21	3,524182313
ENSG00000172461.10	FUT9	2,71E-20	-6,161620907
ENSG00000050030.13	NEXMIF	1,16E-19	-4,429603346
ENSG00000134531.9	EMP1	1,58E-18	-3,796898784
ENSG00000147027.3	TMEM47	1,93E-17	3,54139651
ENSG00000136542.8	GALNT5	2,32E-17	3,15562015
ENSG00000150051.13	MKX	2,96E-17	3,666343008
ENSG00000104313.17	EYA1	8,07E-17	2,641365369
ENSG00000136859.9	ANGPTL2	6,34E-16	-4,755047396
ENSG00000101144.12	BMP7	8,79E-16	-9,184378464
ENSG00000137558.7	PI15	8,79E-16	-4,493403278
ENSG00000204262.11	COL5A2	8,79E-16	2,777971672
ENSG00000118246.13	FASTKD2	1,05E-15	2,638411958
ENSG00000117477.12	CCDC181	1,12E-15	3,593367315
ENSG00000133687.15	TMTC1	1,13E-15	3,09982207
ENSG00000180964.16	TCEAL8	8,95E-15	-9,655678938
ENSG00000153714.5	LURAP1L	1,25E-14	3,409262296
ENSG00000140563.14	MCTP2	8,16E-14	2,926461579
ENSG00000128918.14	ALDH1A2	1,53E-13	2,954190991
ENSG00000113805.8	CNTN3	3,78E-13	5,455882107
ENSG00000178403.3	NEUROG2	4,98E-13	2,193681171
ENSG00000165025.14	SYK	5,05E-13	2,306040027
ENSG00000124019.9	FAM124B	1,52E-12	-2,987057179
ENSG00000165323.15	FAT3	1,52E-12	-4,453288811
ENSG00000188730.4	VWC2	1,52E-12	3,816708215
ENSG00000282908.1	FAT3	1,52E-12	-4,453288811
ENSG00000186103.3	ARGFX	2,57E-11	-5,974439501
ENSG00000170775.2	GPR37	3,24E-11	1,708551779
ENSG00000213694.3	S1PR3	9,01E-11	2,622634285
ENSG00000080986.12	NDC80	1,81E-10	-2,054586556
ENSG00000155961.4	RAB39B	2,22E-10	-5,370799311
ENSG00000007062.11	PROM1	2,76E-10	2,44985619
ENSG00000173157.16	ADAMTS20	3,20E-10	3,529672966
ENSG00000155093.17	PTPRN2	3,71E-10	-9,343494164
ENSG00000060718.20	COL11A1	3,85E-10	-5,856246494
ENSG00000156475.18	PPP2R2B	6,62E-10	-1,846021285
ENSG00000135373.12	EHF	7,10E-10	-2,819513437
ENSG00000182968.4	SOX1	1,23E-09	2,934854404
ENSG00000138771.14	SHROOM3	1,28E-09	-2,046658826
ENSG00000038427.15	VCAN	1,33E-09	-2,771822208
ENSG00000004468.12	CD38	1,84E-09	2,958988024
ENSG00000117600.12	PLPPR4	1,87E-09	2,801732618
ENSG00000164651.16	SP8	1,93E-09	2,11792535
ENSG00000026508.17	CD44	2,13E-09	-3,635882504
ENSG00000183421.11	RIPK4	2,56E-09	3,379697219

ENSG00000156689.6	GLYATL2	4,16E-09	-2,941401181
ENSG00000234444.9	ZNF736	4,49E-09	-2,522187761
ENSG00000188227.12	ZNF793	6,41E-09	-1,879122299
ENSG00000163536.12	SERPINI1	7,65E-09	2,510119009
ENSG00000183117.18	CSMD1	7,75E-09	-1,861917181
ENSG00000212747.4	RTL8B	8,12E-09	-2,335614413
ENSG00000164120.13	HPGD	9,24E-09	1,869581141
ENSG00000198398.2	TMEM207	1,39E-08	3,297616809
ENSG00000144410.4	CPO	1,53E-08	2,77396218
ENSG00000067445.20	TRO	2,75E-08	-3,386895505
ENSG00000151789.10	ZNF385D	2,79E-08	-5,162765145
ENSG00000183807.7	FAM162B	2,79E-08	2,128875282
ENSG00000038295.7	TLL1	3,16E-08	2,782313082
ENSG00000138944.7	KIAA1644	3,16E-08	-2,246579395
ENSG00000120675.5	DNAJC15	3,56E-08	-3,360531258
ENSG00000154040.20	CABYR	3,82E-08	1,890197566
ENSG00000114315.3	HES1	3,83E-08	-1,632061252
ENSG00000170370.11	EMX2	5,70E-08	2,999212322
ENSG00000198354.6	DCAF12L2	6,80E-08	-7,114818738
ENSG00000105438.8	KDELRL1	7,49E-08	-2,307905645
ENSG00000164112.12	TMEM155	9,90E-08	-8,372205904
ENSG00000135917.13	SLC19A3	1,22E-07	1,828919506
ENSG00000196781.14	TLE1	1,43E-07	1,737540117
ENSG00000127507.17	ADGRE2	2,09E-07	-2,313982897
ENSG00000189056.13	RELN	2,20E-07	-2,260017977
ENSG00000101605.12	MYOM1	2,78E-07	1,834984623
ENSG00000131018.22	SYNE1	3,50E-07	1,629489533
ENSG00000105894.11	PTN	4,34E-07	7,993379508
ENSG00000166265.11	CYYR1	4,34E-07	-1,487847657
ENSG00000146215.13	CRIP3	4,57E-07	2,721786442
ENSG00000138119.16	MYOF	4,79E-07	-2,689944938
ENSG00000282230.1	ADAM9	4,84E-07	-9,771329227
ENSG00000175538.10	KCNE3	4,96E-07	-2,517244009
ENSG00000114200.9	BCHE	6,39E-07	2,142711186
ENSG00000180806.4	HOXC9	7,00E-07	-2,546087755
ENSG00000172554.11	SNTG2	7,83E-07	1,364715751
ENSG00000171617.13	ENC1	8,86E-07	-2,363231662
ENSG00000261787.1	TCF24	9,56E-07	2,079687529
ENSG00000164107.8	HAND2	1,04E-06	1,791465735
ENSG00000187957.7	DNER	1,04E-06	2,463684386
ENSG00000180660.7	MAB21L1	1,08E-06	1,685520694
ENSG00000047648.21	ARHGAP6	1,35E-06	1,980810894
ENSG00000164695.4	CHMP4C	1,36E-06	-3,203613096
ENSG00000134343.12	ANO3	1,47E-06	2,933573051
ENSG00000134330.18	IAH1	2,34E-06	1,654124812

ENSG00000146938.14	NLGN4X	2,34E-06	-7,720372999
ENSG00000107562.16	CXCL12	2,58E-06	7,627208709
ENSG00000197608.11	ZNF841	3,02E-06	-2,198238479
ENSG00000154589.6	LY96	3,08E-06	2,825159757
ENSG00000016402.13	IL20RA	3,13E-06	1,638919206
ENSG00000174473.15	GALNTL6	3,16E-06	1,962486634
ENSG00000125266.6	EFNB2	3,64E-06	-2,163770325
ENSG00000165973.18	NELL1	3,71E-06	-2,032162183
ENSG00000133106.14	EPSTI1	3,72E-06	-4,69593448
ENSG00000120658.13	ENOX1	3,78E-06	-1,828624177
ENSG00000138792.9	ENPEP	3,89E-06	-2,793741186
ENSG00000070915.9	SLC12A3	4,17E-06	-4,606574847
ENSG00000123612.15	ACVR1C	4,54E-06	3,150502464
ENSG00000173930.8	SLCO4C1	5,28E-06	2,172181735
ENSG00000112562.18	SMOC2	6,12E-06	-3,755424553
ENSG00000177570.13	SAMD12	7,56E-06	2,130404127
ENSG00000269190.5	FBXO17	8,04E-06	2,483010586
ENSG00000282954.1	FBXO17	8,04E-06	2,483010586
ENSG00000164796.17	CSMD3	8,29E-06	1,8192867
ENSG00000196109.6	ZNF676	9,24E-06	-7,405771704
ENSG00000142871.16	CYR61	9,31E-06	-1,51961135
ENSG00000155530.2	LRGUK	9,37E-06	1,774508801
ENSG00000135547.8	HEY2	9,60E-06	5,476322571
ENSG00000178573.6	MAF	1,02E-05	1,290124143
ENSG00000135218.17	CD36	1,06E-05	1,907951223
ENSG00000113209.8	PCDHB5	1,15E-05	1,480839899
ENSG00000154330.12	PGM5	1,19E-05	1,720891193
ENSG00000178053.17	MLF1	1,43E-05	-3,824184867
ENSG00000134954.14	ETS1	1,47E-05	1,434203949
ENSG00000241166.6	HLA-L	1,76E-05	-21,12903774
ENSG00000156076.9	WIF1	1,87E-05	-7,250531303
ENSG00000197584.11	KCNMB2	2,29E-05	-1,790632628
ENSG00000128714.5	HOXD13	2,35E-05	1,559741577
ENSG00000170162.13	VGLL2	2,57E-05	6,053639772
ENSG00000260027.4	HOXB7	3,01E-05	-6,757189325
ENSG00000105143.12	SLC1A6	3,05E-05	-2,202066817
ENSG00000114455.13	HHLA2	3,93E-05	-2,08237609
ENSG00000163347.5	CLDN1	4,20E-05	1,30705518
ENSG00000111335.12	OAS2	4,22E-05	-2,038032145
ENSG00000120833.13	SOCS2	4,42E-05	-1,840720452
ENSG00000133019.11	CHRM3	5,15E-05	2,11184731
ENSG00000100234.11	TIMP3	5,25E-05	-1,482401651
ENSG00000144229.11	THSD7B	5,63E-05	-2,063834695
ENSG00000046889.18	PREX2	5,76E-05	-2,058898634
ENSG00000197705.9	KLHL14	6,30E-05	1,837302613

ENSG00000118971.7	CCND2	6,49E-05	-1,542459098
ENSG00000180730.4	SHISA2	6,78E-05	1,361627769
ENSG00000188385.11	JAKMIP3	6,98E-05	-2,667364021
ENSG00000163631.16	ALB	7,31E-05	2,393744492
ENSG00000146197.8	SCUBE3	7,36E-05	-1,197722706
ENSG00000179344.16	HLA-DQB1	7,52E-05	4,352078733
ENSG00000219438.8	FAM19A5	7,55E-05	-7,123259612
ENSG00000082497.11	SERTAD4	7,91E-05	1,607344647
ENSG00000134769.21	DTNA	7,91E-05	-2,486491283
ENSG00000281230.2	SERTAD4	7,91E-05	1,607344647
ENSG00000059804.15	SLC2A3	8,00E-05	1,370062986
ENSG00000134853.11	PDGFRA	8,72E-05	-1,962848852
ENSG00000144681.10	STAC	9,25E-05	1,377070936
ENSG00000078018.19	MAP2	9,41E-05	2,092569786
ENSG00000186854.10	TRABD2A	0,000101958	-1,30290113
ENSG00000198131.13	ZNF544	0,000101958	2,413000548
ENSG00000118946.11	PCDH17	0,000105366	1,376030134
ENSG00000075388.3	FGF4	0,000117648	-2,27627795
ENSG00000104237.7	RP1	0,000122604	2,17962717
ENSG00000144339.11	TMEFF2	0,000122604	2,085213107
ENSG00000147145.12	LPAR4	0,000122604	2,007748999
ENSG00000107242.17	PIP5K1B	0,000125572	2,081098838
ENSG00000134202.10	GSTM3	0,000131295	1,588939623
ENSG00000121742.16	GJB6	0,000133662	1,320666818
ENSG00000112164.5	GLP1R	0,000153857	-3,016657311
ENSG00000272398.5	CD24	0,000162101	1,635424251
ENSG00000135046.13	ANXA1	0,000180439	1,656850355
ENSG00000152583.12	SPARCL1	0,000189992	-2,059114019
ENSG00000225972.1	MTND1P23	0,000195058	-2,155266015
ENSG00000152779.13	SLC16A12	0,000198382	2,85745643
ENSG00000146374.13	RSPO3	0,000204707	-3,848348902
ENSG00000146072.6	TNFRSF21	0,000206807	-1,117483425
ENSG00000104611.11	SH2D4A	0,000209733	1,616945446
ENSG00000164344.15	KLKB1	0,000209733	2,40903816
ENSG00000164093.15	PITX2	0,000212382	1,950326266
ENSG00000110848.8	CD69	0,00024532	2,307304856
ENSG00000235268.2	KDM4E	0,000246036	-6,767690837
ENSG00000113532.12	ST8SIA4	0,000250891	1,923426951
ENSG00000073756.11	PTGS2	0,000252896	1,86846534
ENSG00000000005.5	TNMD	0,000302621	-1,609197925
ENSG00000204959.4	ARHGEF34P	0,000307839	2,746715861
ENSG00000179083.6	FAM133A	0,00030965	2,11810259
ENSG00000145824.12	CXCL14	0,000310692	-1,634414033
ENSG00000007372.21	PAX6	0,000326011	-1,53273734
ENSG00000179008.8	C14orf39	0,000333856	1,714494084

ENSG00000163064.6	EN1	0,000373191	-2,296233999
ENSG00000138135.6	CH25H	0,000385308	3,536989146
ENSG00000159388.5	BTG2	0,000397127	-1,149873187
ENSG00000167165.18	UGT1A6	0,000404859	-1,691359228
ENSG00000081818.3	PCDHB4	0,000457398	2,794929347
ENSG00000113319.12	RASGRF2	0,000533816	1,710009173
ENSG00000165633.12	VSTM4	0,000596581	1,339410459
ENSG00000189190.9	ZNF600	0,000604131	-3,216992944
ENSG00000168004.9	HRASLS5	0,000622107	1,20455123
ENSG00000211448.11	DIO2	0,000622107	-3,323463031
ENSG00000089127.12	OAS1	0,000688351	-2,99949137
ENSG00000186297.11	GABRA5	0,000747108	1,400506461
ENSG00000163032.11	VSNL1	0,000758425	1,284131796
ENSG00000172318.5	B3GALT1	0,000770446	-1,610042792
ENSG00000229544.8	NKX1-2	0,000770446	1,959060458
ENSG00000282278.1	AC058822.1	0,000770446	-2,233200866
ENSG00000205835.8	GMNC	0,000788024	4,856768281
ENSG00000276219.4	ZNF676	0,000788024	-6,06732207
ENSG00000151136.14	BTBD11	0,000912008	-1,572916627
ENSG00000243955.5	GSTA1	0,000935475	-3,654593704
ENSG00000205413.7	SAMD9	0,001042652	2,07450292
ENSG00000137968.16	SLC44A5	0,001131598	-1,958373361
ENSG00000113749.7	HRH2	0,001276119	-3,526231058
ENSG00000205111.8	CDKL4	0,001359424	1,967688492
ENSG00000053747.15	LAMA3	0,001405376	1,521509372
ENSG00000113140.10	SPARC	0,001484351	-2,86464053
ENSG00000102271.13	KLHL4	0,001643973	2,010452644
ENSG00000183850.13	ZNF730	0,001765995	-2,377258953
ENSG00000119938.8	PPP1R3C	0,001853839	1,575247811
ENSG00000112769.18	LAMA4	0,001959756	1,465163464
ENSG00000138061.11	CYP1B1	0,002004429	-2,361041651
ENSG00000111801.15	BTN3A3	0,002042605	1,031999121
ENSG00000149050.9	ZNF214	0,002103324	-2,132499113
ENSG00000133124.11	IRS4	0,002337825	2,078179378
ENSG00000136098.16	NEK3	0,002337825	2,289976578
ENSG00000182985.17	CADM1	0,002351014	1,552910925
ENSG00000065675.14	PRKCQ	0,002390236	1,404662558
ENSG00000185008.17	ROBO2	0,002675836	0,997378516
ENSG00000244509.3	APOBEC3C	0,002806163	-1,13570718
ENSG00000120251.18	GRIA2	0,002963324	-2,382231603
ENSG00000119888.10	EPCAM	0,003005482	1,428593856
ENSG00000180828.2	BHLHE22	0,003005482	1,290302922
ENSG00000204131.9	NHSL2	0,003043956	-1,291865598
ENSG00000184613.10	NELL2	0,003341412	1,387416355
ENSG00000188153.12	COL4A5	0,003439174	-0,984517662

ENSG0000078053.16	AMPH	0,003461591	2,942075355
ENSG00000196335.12	STK31	0,003491305	1,389314512
ENSG00000154065.16	ANKRD29	0,003757987	2,243705688
ENSG00000140285.9	FGF7	0,003791218	1,550436913
ENSG00000127329.15	PTPRB	0,003849477	-1,978158485
ENSG00000176222.8	ZNF404	0,004178641	1,583127749
ENSG00000086205.16	FOLH1	0,00469019	1,374693554
ENSG00000122584.12	NXPH1	0,00469019	-2,334785354
ENSG00000213809.8	KLRK1	0,00469019	1,249593937
ENSG00000134709.10	HOOK1	0,004777414	2,047441004
ENSG00000168016.13	TRANK1	0,00479633	2,458034466
ENSG00000147255.18	IGSF1	0,004978066	-1,090399346
ENSG00000162630.5	B3GALT2	0,004978066	1,623865308
ENSG00000067715.13	SYT1	0,00499675	1,757855655
ENSG00000077092.18	RARB	0,004999942	1,576625887
ENSG00000112837.16	TBX18	0,004999942	-5,288557906
ENSG00000138759.18	FRAS1	0,005381912	1,226231689
ENSG00000197410.12	DCHS2	0,005712886	1,543210134
ENSG00000284227.1	DCHS2	0,005712886	1,543210134
ENSG00000261263.2	AC138907.5	0,006104556	3,660686114
ENSG00000179431.6	FJX1	0,006454915	-1,139359241
ENSG00000117148.7	ACTL8	0,00663589	-2,058487045
ENSG00000068781.21	STON1-GTF2A1L	0,007091077	-1,530340732
ENSG00000166349.9	RAG1	0,007091077	-2,38980673
ENSG00000091490.10	SEL1L3	0,007276661	1,323786096
ENSG00000079257.7	LXN	0,007430446	-1,455886706
ENSG00000213424.8	KRT222	0,007430446	3,92980483
ENSG00000163565.18	IFI16	0,007672389	-1,621112495
ENSG00000074527.11	NTN4	0,007723238	1,102125221
ENSG00000123388.4	HOXC11	0,007843727	2,185322134
ENSG00000165092.12	ALDH1A1	0,007845648	2,631035728
ENSG00000169439.11	SDC2	0,007965431	-1,28550149
ENSG00000244119.1	PDCL3P4	0,008066443	1,389285572
ENSG00000164266.10	SPINK1	0,008167808	-3,989197129
ENSG00000198719.8	DLL1	0,008228801	2,136544537
ENSG00000275555.2	DLL1	0,008228801	2,136544537
ENSG00000105928.13	GSDME	0,008387249	1,06851094
ENSG00000006377.10	DLX6	0,008437771	-1,049533065
ENSG00000179750.15	APOBEC3B	0,008596224	-3,868439489
ENSG00000125820.5	NKX2-2	0,008653705	-1,380674532
ENSG00000169908.11	TM4SF1	0,00866468	1,148711305
ENSG00000143341.11	HMCN1	0,008726876	-3,604061358
ENSG00000186265.9	BTLA	0,009176583	-2,299666805
ENSG00000120451.10	SNX19	0,009775793	0,927451978
ENSG00000112414.14	ADGRG6	0,010450881	2,075211762

ENSG00000203995.9	ZYG11A	0,010591727	1,283051851
ENSG00000176406.22	RIMS2	0,010685455	1,107488186
ENSG00000171956.6	FOXB1	0,010874957	-3,476797352
ENSG00000120907.17	ADRA1A	0,011202236	1,125846664
ENSG00000188112.8	C6orf132	0,012274813	-1,608771646
ENSG00000111432.4	FZD10	0,012640992	-1,070572935
ENSG00000166801.15	FAM111A	0,012660725	1,418852278
ENSG00000196968.10	FUT11	0,013456905	-0,982191362
ENSG00000090530.9	P3H2	0,013542039	1,720769037
ENSG00000163673.7	DCLK3	0,014176021	3,68226767
ENSG00000060140.8	STYK1	0,014330222	1,380507417
ENSG00000155754.14	C2CD6	0,014611145	-4,618905427
ENSG00000133401.15	PDZD2	0,014685056	1,003886711
ENSG00000260062.3	GOLGA2P11	0,014766051	1,325292208
ENSG00000157502.13	MUM1L1	0,015653392	-3,822970846
ENSG00000153246.12	PLA2R1	0,016058359	2,138555486
ENSG00000138670.17	RASGEF1B	0,016157999	-1,210011793
ENSG00000153253.16	SCN3A	0,016157999	2,797488216
ENSG00000145730.20	PAM	0,016165705	1,229168484
ENSG00000204442.3	FAM155A	0,016220404	-1,834370461
ENSG00000225968.7	ELFN1	0,016473905	-5,829227834
ENSG00000135324.5	MRAP2	0,01765477	1,199267338
ENSG00000112276.13	BVES	0,017767415	-1,604779155
ENSG00000176928.5	GCNT4	0,018002208	-1,84712385
ENSG00000231672.6	DIRC3	0,018002208	1,676155751
ENSG00000172020.12	GAP43	0,019231447	-2,290709041
ENSG00000176399.3	DMRTA1	0,019429429	-1,354291702
ENSG00000178568.14	ERBB4	0,019760239	-4,212246387
ENSG00000111846.16	GCNT2	0,019990889	-1,211043557
ENSG00000137462.6	TLR2	0,019990889	1,119006796
ENSG00000227986.1	TRIM60P18	0,021158262	-3,564254497
ENSG00000186462.8	NAP1L2	0,021379115	1,051827322
ENSG00000197013.9	ZNF429	0,021508416	-0,935778361
ENSG00000103241.6	FOXF1	0,02300446	1,798695663
ENSG00000254979.5	AP000781.2	0,02300446	-3,299121634
ENSG00000090376.10	IRAK3	0,023169253	-1,797692153
ENSG00000136158.11	SPRY2	0,023962238	0,818120061
ENSG00000101004.14	NINL	0,024008657	1,097157931
ENSG00000178538.9	CA8	0,024434089	-1,326435603
ENSG00000043355.11	ZIC2	0,024790284	0,996326326
ENSG00000253813.1	COX6B1P4	0,025015792	5,169725673
ENSG00000133134.11	BEX2	0,025306285	-2,931102301
ENSG00000134533.6	RERG	0,026052855	1,759979623
ENSG00000163618.17	CADPS	0,026649045	-1,665255553
ENSG00000134042.12	MRO	0,026809228	1,802202008

ENSG00000111700.12	SLCO1B3	0,028629516	-6,066077898
ENSG00000232196.3	MTRNR2L4	0,028629516	-1,05410956
ENSG00000170989.8	S1PR1	0,029303058	1,043897162
ENSG00000260548.1	AL035425.2	0,029303058	2,531990461
ENSG00000278728.2	CNTNAP2	0,029303058	-1,125227303
ENSG00000159899.14	NPR2	0,02953039	-0,98212061
ENSG00000281020.2	SNTG2	0,031042594	1,822615613
ENSG00000137463.4	MGARP	0,031661036	-1,54912517
ENSG00000166689.15	PLEKHA7	0,033552025	0,885309058
ENSG00000165084.15	C8orf34	0,033929592	-1,494960488
ENSG00000176658.16	MYO1D	0,03394154	0,933863448
ENSG00000115339.13	GALNT3	0,034371352	1,852468666
ENSG00000123119.11	NECAB1	0,034755775	1,519402396
ENSG00000134595.8	SOX3	0,034755775	3,300365161
ENSG00000085563.14	ABCB1	0,034863264	1,306293237
ENSG00000018236.14	CNTN1	0,035831515	1,409626424
ENSG00000142677.3	IL22RA1	0,036272473	2,729362435
ENSG00000270672.1	MTRNR2L6	0,041227426	-1,300472508
ENSG00000186439.12	TRDN	0,041482819	3,382813362
ENSG00000160191.17	PDE9A	0,041799653	1,338753937
ENSG00000006468.13	ETV1	0,042678167	1,22875416
ENSG00000138400.12	MDH1B	0,042710852	1,73060692
ENSG00000185483.11	ROR1	0,042759482	1,916242643
ENSG00000009694.13	TENM1	0,043080922	2,650562943
ENSG00000013619.13	MAMLD1	0,043439517	-1,081258583
ENSG00000109424.3	UCP1	0,044384336	0,847163089
ENSG00000262560.1	AC018512.1	0,045030957	5,606112451
ENSG00000147256.11	ARHGAP36	0,04512278	-2,023253035
ENSG00000169306.9	IL1RAPL1	0,04512278	1,112562134
ENSG00000158089.14	GALNT14	0,046395156	-2,346225578
ENSG00000221887.5	HMSD	0,046395156	1,140797822
ENSG00000197635.9	DPP4	0,048408542	1,273893706
ENSG00000173705.8	SUSD5	0,048415162	-0,795493213
ENSG00000050327.14	ARHGEF5	0,049195089	1,761509183
ENSG00000163492.14	CCDC141	0,049211479	1,124933876

Tabelle A3: Auflistung der Gene, die in den signifikant veränderten GO-Termen der Transkriptomanalyse (KDELRL1-KO verglichen mit wildtypischen HAP1-Zellen) eine Deregulation aufwiesen, sowie deren Fold-change. Der Fold-change von hochregulierten Genen ist jeweils rot hervorgehoben, während der Fold-change von runterregulierten Genen blau markiert ist.

Gen Name	Fold-change	Gen Name	Fold-change
GO-Term: Developmental process			
ACTL8	-2,06	KLKB1	2,41
ACVR1C	3,15	KLRK1	1,25
ADAM9	-9,77	LAMA3	1,52
ADAMTS20	3,53	LAMA4	1,47

ALDH1A2	2,95	LRGUK	1,77
ALX4	-5,30	MAB21L1	1,69
AMBN	-4,13	MAF	1,29
ANGPTL2	-4,76	MAP2	2,09
ANXA1	1,66	MCTP2	2,93
BCHE	2,14	MKX	3,67
BHLHE22	1,29	MLF1	-3,82
BMP7	-9,18	NEK3	2,29
BNC1	3,34	NELL1	-2,03
BST2	-8,24	NEUROG2	2,19
BTG2	-1,15	NKX1-2	1,96
CABYR	1,89	NKX2-2	-1,38
CADM1	1,50	NLGN4X	-7,72
CD24	1,64	NTN4	1,10
CD36	1,91	PAX6	-1,53
CD44	-3,64	PCDH17	1,38
CHMP4C	-3,20	PCDHB4	2,79
CHODL	3,52	PCDHB5	1,48
CHRM3	2,11	PDGFRA	-1,96
CLDN1	1,31	PITX2	1,95
CNTN3	5,46	PLPPR4	2,80
COL11A1	-5,86	PREX2	-2,06
COL5A2	2,78	PRKCQ	1,40
CXCL12	7,63	PROM1	2,45
CXCL14	-1,63	PTGS2	1,87
CYP1B1	-2,36	PTN	7,99
CYR61	-1,52	PTBRB	-1,98
DAZL	-4,05	RAG1	-2,39
DLL1	2,14	RARB	1,58
DLX6	-1,05	RELN	-2,26
DNER	2,46	RIPK4	3,38
EBF2	4,38	ROBO2	1,00
EFNB2	-2,16	RP1	2,18
EHF	-2,82	RSPO3	-3,85
EMP1	-3,80	S1PR3	2,62
EMX2	3,0	SDC2	-1,29
EN1	-2,30	SERPINI1	2,51
ENC1	-2,36	SHISA2	1,36
ENPEP	-2,79	SHROOM3	-2,17
ENPP2	-4,27	SLCO4C1	2,17
EPCAM	1,43	SNTG2	1,82
EPHA5	7,16	SNX19	0,93
ETS1	1,43	SOX1	2,93
EYA1	2,64	SP8	2,12
FAT3	-4,45	SPARC	-2,86
FGF4	-2,28	ST8SIA4	1,92
FGF7	1,55	SYK	2,31
FJX1	-1,14	SYNE1	1,63
FRAS1	1,23	SYT1	1,76
FUT9	-6,16	TBX18	-5,29
GABRA5	1,40	THBS2	-6,44
GJB6	1,32	TIAM1	3,31
GSTA1	-3,65	TIMP3	1,48

GSTM3	1,59	TLE1	1,74
HAND2	1,79	TLL1	2,78
HCLS1	-8,21	TMEFF2	2,09
HES1	-1,63	TNFRSF21	-1,12
HEY1	5,48	TNMD	-1,61
HOOK1	2,05	TRABD2A	-1,30
HOXB7	-6,76	TRO	-3,39
HOXC11	2,16	VCAN	-2,77
HOXC9	-2,55	VGLL2	6,05
HOXD13	1,56	VIM	-5,03
HPGD	1,87	VWC2	3,82
HRH2	-3,53	WIF1	-7,25
IFI16	-1,62		
GO-Term: Cellular developmental process			
ACTL8	-2,06	IFI16	-1,62
ACVR1C	3,15	KLRK1	1,25
ADAMTS20	3,53	LAMA3	1,52
ADAM9	-9,77	LAMA4	1,47
ALDH1A2	2,95	LRGUK	1,77
ANXA1	1,66	MAF	1,29
BCHE	2,14	MAP2	2,09
BHLHE22	1,29	MLF1	-3,82
BMP7	-9,18	NEK3	2,29
BTG2	-1,15	NELL1	-2,03
CADM1	1,50	NEUROG2	2,19
CABYR	1,89	NKX2-2	-1,38
CD24	1,64	NLGN4X	-7,72
CD36	1,91	NTN4	1,10
CHODL	3,52	PAX6	-1,53
COL11A1	-5,86	PDGFRA	-1,96
COL5A2	2,78	PITX2	1,95
CXCL12	7,63	PLPPR4	2,80
CXCL14	-1,63	PREX2	-2,06
CYR61	-1,52	PRKCQ	1,40
DAZL	-4,05	PROM1	2,45
DLL1	2,14	PTGS2	1,87
DLX6	-1,05	PTN	7,99
DNER	2,46	RAG1	-2,39
EBF2	4,38	RARB	1,58
EFNB2	-2,16	RELN	-2,26
EHF	-2,82	ROBO2	1,00
EMX2	3,0	RP1	2,18
EN1	-2,30	S1PR3	2,26
ENC1	-2,36	SDC2	-1,29
ENPP2	-4,27	SHROOM3	-2,17
EPCAM	1,43	SLCO4C1	2,17
EPHA5	7,16	SNX19	0,93
ETS1	1,43	SOX1	2,93
EYA1	2,64	SPARC	-2,86
FGF4	-2,28	SYK	2,31
GABRA5	1,40	SYNE1	1,63
GSTA1	-3,65	SYT1	1,76

GSTM3	1,59	TIAM1	3,31
HAND2	1,79	TLL1	2,78
HCLS1	-8,21	TNFRSF21	-1,12
HES1	-1,63	TNMD	-1,61
HEY2	5,48	VCAN	-2,77
HOOK1	2,05	VIM	-5,03
HOXB7	-6,76	VWC2	3,82
HRH2	-3,53	WIF1	-7,25
GO-Term: Biological adhesion			
ADAM9	-9,77	HLA-DQB1	4,35
ADGRE2	-2,31	KLRK1	1,25
AMBN	-4,13	LAMA3	1,52
ANXA1	1,66	LAMA4	1,47
ARHGAP6	1,98	NLGN4X	-7,72
BMP7	-9,18	PCDH17	1,38
BTLA	-2,30	PCDHB4	2,79
CADM1	1,50	PCDHB5	1,48
CD24	1,64	PDGFRA	-1,96
CD36	1,91	PGM5	1,72
CD44	-3,64	PRKCQ	1,40
CLDN1	1,31	PTN	7,99
CNTN3	5,46	RAG1	-2,39
COL4A6	-4,69	RELN	-2,26
CXCL12	7,63	ROBO2	1,00
CYP1B1	-2,36	SERPINI1	2,51
CYR61	-1,52	SMOC2	-3,56
DCHS2	1,54	SYK	2,31
DLL1	2,14	THBS2	-6,44
EFNB2	-2,16	TIAM1	3,31
EPCAM	1,43	TMEM47	3,54
ETS1	1,43	TNFRSF21	-1,12
FAT3	-4,45	TRO	-3,39
HES1	-1,63	VCAN	-2,77
HHLA2	-2,08	VWC2	3,82
GO-Term: Regulation of cell adhesion			
ADAM9	-9,77	HES1	-1,63
ANXA1	1,66	HHLA2	-2,08
ARHGAP6	1,98	HLA-DQB1	4,35
BMP7	-9,18	KLRK1	1,25
BTLA	-2,30	LAMA3	1,52
CD24	1,64	LAMA4	1,47
CD36	1,91	PRKCQ	1,40
CD44	-3,64	PTN	7,99
CXCL12	7,63	RAG1	-2,39
CYP1B1	-2,36	SERPINI1	2,51
CYR61	-1,52	SMOC2	-3,56
DLL1	2,14	SYK	2,31
EFNB2	-2,16	TNFRSF21	-1,12
EPCAM	1,43	VWC2	3,82
ETS1	1,43		

GO-Term: Multicellular organismal process			
ACVR1C	3,15	IL20RA	1,64
ADAM9	-9,77	KCNMB2	-1,79
ALB	2,39	KLKB1	2,41
ALDH1A2	2,95	KLRK1	1,25
ALX4	-5,30	LAMA3	1,52
AMBN	-4,13	LAMA4	1,47
ANGPTL2	-4,76	LRGUK	1,77
ANXA1	1,66	LXN	-1,46
BCHE	2,14	LY96	2,83
BHLHE22	1,29	MAB21L1	1,69
BMP7	-9,18	MAF	1,29
BST2	-8,24	MAP2	2,09
BTG2	-1,15	MCTP2	2,93
CABYR	1,89	MKX	3,69
CADM1	1,50	MLF1	-3,82
CD24	1,64	MYOF	-2,69
CD36	1,91	MYOM1	1,83
CD38	2,96	NEK3	2,29
CD44	-3,64	NELL1	-2,03
CHMP4C	-3,20	NEUROG2	2,19
CHODL	3,52	NKX1-2	1,96
CHRM3	2,11	NKX2-2	-1,38
CLDN1	1,31	NLGN4X	-7,72
CNTN3	5,46	NTN4	1,10
COL11A1	-5,86	PAX6	-1,53
COL5A2	2,78	PCDH17	1,38
CSMD1	-1,86	PCDHB4	2,79
CXCL12	7,63	PCDHB5	1,48
CXCL14	-1,63	PDGFRA	-1,96
CYP1B1	-2,36	PITX2	1,95
CYR61	-1,52	PLPPR4	2,80
DAZL	-4,05	PREX2	-2,06
DLL1	2,14	PRKCQ	1,40
DLX6	-1,05	PROM1	2,45
DNER	2,46	PTGS2	1,87
DTNA	-2,49	PTN	7,99
EBF2	4,38	PTPRB	-1,98
EFNB2	-2,16	RAG1	-2,39
EHF	-2,82	RARB	1,58
EMP1	-3,80	RELN	-2,26
EMX2	3,0	ROBO2	1,00
EN1	-2,30	RP1	2,18
ENC1	-2,36	RSPO3	-3,85
ENPEP	-2,79	S1PR3	2,62
ENPP2	-4,27	SDC2	-1,29
EPCAM	1,43	SERPINI1	2,51
EPHA5	7,16	SHISA2	1,36
ETS1	1,43	SHROOM3	-2,05
EYA1	2,64	SLCO4C1	2,17
FAT3	-4,45	SNTG2	1,82
FGF4	-2,28	SNX19	0,93
FGF7	1,55	SOX1	2,93

FJX1	-1,14	SP8	2,12
FRAS1	1,23	SPARC	-2,86
FUT9	-6,16	ST8SIA4	1,92
GABRA5	1,40	SYK	2,31
GJB6	1,32	SYT1	1,76
GLP1R	-3,02	TBX18	-5,29
GSTM3	1,59	THBS2	-6,44
HAND2	1,79	TIAM1	3,31
HCLS1	-8,21	TIMP3	1,48
HES1	-1,63	TLE1	1,74
HEY2	5,48	TLL1	2,78
HHLA2	-2,08	TNFRSF21	-1,12
HMCN1	-3,60	TNMD	-1,61
HOOK1	2,05	TRO	-3,39
HOXB7	-6,76	VCAN	-2,77
HOXC11	2,16	VGLL2	6,05
HOXC9	-2,55	VIM	-5,03
HOXD13	1,56	VWC2	3,82
HPGD	1,87	WIF1	-7,25
HRH2	-3,53		
IFI16	-1,62		
GO-Term: Multicellular organism development			
ACVR1C	3,15	KLKB1	2,41
ADAM9	-9,77	LAMA3	1,52
ALDH1A2	2,95	LAMA4	1,47
ALX4	-5,30	MAB21L1	1,69
AMBN	-4,13	MAF	1,29
ANGPTL2	-4,76	MAP2	2,09
ANXA1	1,66	MCTP2	2,93
BCHE	2,14	MKX	3,67
BHLHE22	1,29	MLF1	-3,82
BMP7	-9,18	NEK3	2,29
BST2	-8,24	NELL1	-2,03
BTG2	-1,15	NEUROG2	2,19
CADM1	1,50	NKX1-2	1,96
CD24	1,64	NKX2-2	-1,38
CD44	-3,64	NLGN4X	-7,72
CHMP4C	-3,20	NTN4	1,10
CHODL	3,52	PAX6	-1,53
CHRM3	2,11	PCDH17	1,38
CLDN1	1,31	PCDHB4	2,79
CNTN3	5,46	PCDHB5	1,48
COL11A1	-5,86	PDGFRA	-1,96
COL5A2	2,78	PITX2	1,95
CXCL12	7,63	PLPPR4	2,80
CXCL14	-1,63	PREX2	-2,06
CYP1B1	-2,36	PRKCQ	1,40
CYR61	-1,52	PROM1	2,45
DAZL	-4,05	PTGS2	1,87
DLL1	2,14	PTN	7,99
DLX6	-1,05	PTPRB	-1,98
DNER	2,46	RAG1	-2,39

EBF2	4,38	RARB	1,58
EFNB2	-2,16	RELN	-2,26
EHF	-2,82	ROBO2	1,00
EMP1	-3,80	RP1	2,18
EMX2	3,0	RSPO3	-3,85
EN1	-2,30	S1PR3	2,62
ENC1	-2,36	SDC2	-1,29
ENPEP	-2,79	SERPINI1	2,51
ENPP2	-4,27	SHISA2	1,36
EPCAM	1,43	SHROOM3	-2,17
EPHA5	7,16	SLCO4C1	2,17
ETS1	1,43	SNTG2	1,82
EYA1	2,64	SNX19	0,93
FAT3	-4,45	SOX1	2,93
FGF4	-2,28	SP8	2,12
FGF7	1,55	SPARC	-2,86
FJX1	-1,14	ST8SIA4	1,92
FRAS1	1,23	SYK	2,31
FUT9	-6,16	SYT1	1,76
GABRA5	1,40	TBX18	-5,29
GJB6	1,32	THBS2	-6,44
GSTM3	1,59	TIAM1	3,31
HAND2	1,79	TIMP3	1,48
HCLS1	-8,21	TLE1	1,74
HES1	-1,63	TLL1	2,78
HEY2	5,48	TNFRSF21	-1,12
HOOK1	2,05	TNMD	-1,61
HOXB7	-6,76	TRO	-3,39
HOXC11	2,16	VCAN	-2,77
HOXC9	-2,55	VGLL2	6,05
HOXD13	1,56	VIM	-5,03
HPGD	1,87	VWC2	3,82
HRH2	-3,53	WIF1	-7,25
IFI16	-1,62		
GO-Term: Extracellular matrix			
ADAMTS20	3,53	LAMA4	1,47
ALB	2,39	NTN4	1,10
AMBN	-4,13	PTN	7,99
BMP7	-9,18	RELN	-2,26
COL11A1	-5,86	SMOC2	-3,76
COL4A5	-0,98	SPARC	-2,86
COL4A6	-4,69	SPARCL1	-2,19
COL5A2	2,78	THBS2	-6,44
CYR61	-1,52	TIMP3	1,48
FRAS1	1,23	VCAN	-2,77
HMCN1	-3,60	VWC2	3,82
LAMA3	1,52		
GO-Term: Extracellular matrix component			
ALB	2,39	LAMA4	1,47
COL11A1	-5,86	NTN4	1,10
COL4A5	-0,98	PTN	7,99

COL4A6	-4,69	SMOC2	-3,76
COL5A2	2,78	SPARC	-2,86
FRAS1	1,23	THBS2	-6,44
HMCN1	-3,60	TIMP3	1,48
LAMA3	1,52	VWC2	3,82
GO-Term: Glycosaminoglycan binding			
ADGRE2	-2,31	LXN	-1,46
BMP7	-9,18	NELL2	1,39
CD44	-3,64	PTN	7,99
CYR61	-1,52	RSPO3	-3,85
FGF4	-2,28	SMOC2	-3,,76
FGF7	1,55	THBS2	-6,44
VCAN	-2,77		

Erklärung

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

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

Saarbrücken, 2018

(Andrea Blum)