

# **Charakterisierung des murinen Doppelknockouts der endosomalen Qb-SNARES *Vti1a* und *Vti1b***

---

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**Fakultät für Chemie  
der Universität Bielefeld**

---

**Vorgelegt von  
Sascha Michael Browski  
aus Soest**

**Bielefeld 2010**



1. Gutachten: Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard  
Biochemie III, Fakultät für Chemie  
Universität Bielefeld

2. Gutachten: Prof. Dr. Thomas Dierks  
Biochemie I, Fakultät für Chemie  
Universität Bielefeld



# Inhaltsverzeichnis

<b>KAPITEL 1 - EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 INTRAZELLULÄRE TRANSPORTWEGE .....	1
1.1.1 Anterograder Transport, Endoplasmatisches Retikulum & Golgi-Apparat .....	2
1.1.1.1 Das endoplasmatische Retikulum .....	2
1.1.1.2 Der Golgi-Apparat .....	3
1.1.2 Retrograder Transport und das endosomale System .....	3
1.1.2.1 Das frühe Endosom .....	3
1.1.2.2 Das Recycling-Endosom .....	4
1.1.2.3 Das spätendosomal-lysosomale Kompartiment .....	4
1.1.2.4 Transportmodelle im endosomalen System .....	4
1.1.3 Verschiedene Mechanismen der Endozytose .....	5
1.1.3.1 Makropinozytose .....	5
1.1.3.2 Clathrin-abhängige Endozytose .....	6
1.1.3.3 Caveolae-spezifische Endozytose .....	6
1.1.4 Nicht-sekretorischer Weg und unkonventionelle Sekretion .....	7
1.2 SPEZIELLE FUNKTIONEN DES ENDOSOMALEN SYSTEMS .....	8
1.2.1 Signaltransduktion und endosomale Signalgebung .....	8
1.2.2 Neuronale Entwicklung und Signaltransport .....	9
1.3 VESIKULÄRER TRANSPORT .....	10
1.4 SNARE-PROTEINE .....	11
1.4.1 Struktur von SNARE-Proteinen .....	12
1.4.2 Die SNARE-vermittelte Membranfusion .....	13
1.4.3 Regulation der SNARE-vermittelten Membranfusion .....	14
1.4.3.1 Hüllproteine .....	14
1.4.3.2 SM-Proteine .....	15
1.4.3.3 Tethering-Faktoren .....	15
1.4.3.4 Rab-GTPasen .....	15
1.5 DIE ENDOSOMALEN QB-SNARES VTI1A UND VTI1B .....	16
1.5.1 Vti1a .....	16
1.5.2 Vti1b .....	18
1.5.3 Muriner Knockout von vti1a und vti1b .....	19
1.5.3.1 Einzeldefizienz von Vti1a oder Vti1b .....	19
1.5.3.2 Doppeldefizienz von Vti1a und Vti1b .....	19
1.6 ZIEL DER ARBEIT .....	20
<b>KAPITEL 2 – MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1 MATERIAL .....	21

2.1.1 Laborausstattung .....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	23
2.1.4 Proteinkonjugate und Wachstumsfaktoren .....	24
2.1.5 Antikörper .....	24
2.1.6 Antibiotika, Enzyme, Nukleotide und Standards.....	25
2.1.7 Kits zur Arbeit mit DNA und Proteinen .....	25
2.1.8 Plasmide .....	26
2.1.9 Primer zur Genotypisierung .....	26
2.1.10 Bakterienstämme .....	26
2.1.11 Mauslinien.....	26
2.1.12 Mausembryonale Fibroblastenlinien .....	27
2.1.13 Medien zur Kultivierung von E. coli.....	27
2.1.14 Medien und Lösungen für die Zellkultur .....	28
2.1.15 Häufig verwendete Puffer und Lösungen .....	29
2.1.16 Programme und Internetseiten .....	30
2.2 METHODEN .....	31
2.2.1 Methoden zur Behandlung prokaryotischer Zellen .....	31
2.2.1.1 Kultivierung prokaryotischer Zellen.....	31
2.2.1.1.1 Kryokonservierung prokaryotischer Zellen.....	31
2.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter E. coli.....	31
2.2.1.3 Transformation von E. coli mit plasmidischer DNA .....	31
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	32
2.2.2.1 Präparation plasmidischer DNA aus E. coli .....	32
2.2.2.2 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheitsgrad .....	32
2.2.2.3 Enzymatische Restriktion von DNA.....	32
2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	33
2.2.2.5 Isolation von DNA aus Mausgewebe zur Genotypisierung .....	33
2.2.2.6 Bestimmung des Vti1a/Vti1b Genotyps per PCR .....	33
2.2.3 Zellbiologische und Zellkulturtechnische Methoden .....	34
2.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	34
2.2.3.2 Trypsinieren und Passage adhärenter Zellen.....	34
2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl .....	34
2.2.3.4 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen .....	34
2.2.3.5 Revitalisierung kryokonservierter eukaryotischer Zellen.....	35
2.2.3.6 Transfektion von Plasmiden in eukaryotische Zellen.....	35
2.2.3.6.1 Nukleofektion mittels Amaxa .....	35
2.2.3.6.2 Transfektion mittels Lipofectamin LTX .....	35
2.2.3.7 Herstellung mausembryonaler Fibroblasten .....	35
2.2.3.8 Herstellung mausembryonaler hippocampaler Neuronen .....	36
2.2.3.9 Immortalisierung mausembryonaler Fibroblasten .....	36
2.2.3.9.1 Immortalisierung durch Passage .....	36
2.2.3.9.2 Immortalisierung durch das Large-T Antigen .....	36

2.2.3.10 PLL-Beschichtung von Deckgläsern .....	37
2.2.3.11 Fixierung adhärenter Zellen auf Deckgläsern .....	37
2.2.3.11.1 Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol .....	37
2.2.3.11.2 Fixierung und Permeabilisierung mit PFA .....	37
2.2.3.12 Indirekte Immunfärbung von fixierten Zellen .....	38
2.2.3.13 Färbung des Zellkerns mit HOECHST .....	38
2.2.3.14 Färbung der Lysosomen mit LysoTracker .....	38
2.2.3.15 Färbung von Lipidtropfen mit Nilrot .....	38
2.2.3.16 Endozytose von fluoreszenzmarkiertem Dextran .....	39
2.2.3.17 Endozytose von fluoreszenzmarkiertem Transferrin .....	39
2.2.3.18 Endozytose von fluoreszenzmarkiertem Choleratoxin, LDL oder EGF .....	39
2.2.3.19 Exozytose von biotinyliertem Transferrin .....	39
2.2.3.20 EGF-Stimulierter Abbau von EGFR und pErk Signalgebung .....	40
2.2.3.21 Bestimmung der EGF-Rezeptormenge auf der Zelloberfläche per FACS .....	40
2.2.3.22 Assay zur Sekretion lysosomaler Enzyme .....	41
2.2.3.23 Bestimmung der autophagozytotischen Aktivität .....	41
2.2.3.23.1 Bestimmung durch radioaktiven pulse-chase .....	41
2.2.3.23.2 Bestimmung durch Akkumulation von LC3-II .....	43
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden .....	43
2.2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten eukaryotischer Zellen .....	43
2.2.4.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe .....	43
2.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford .....	44
2.2.4.4 TCA-Fällung von Proteinen .....	44
2.2.4.5 Dialyse von FKS .....	44
2.2.4.6 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	44
2.2.4.7 Westernblot Analyse / Semi-Dry Transfer .....	45
2.2.4.8 Immundetektion spezifischer Proteinbanden .....	45
2.2.5 Methoden zur Histologie und Skelettfärbung .....	46
2.2.5.1 Alcianblau- und Alizarinrot-Färbung des embryonalen Skeletts .....	46
2.2.5.2 Herstellung von Paraffinschnitten .....	46
2.2.5.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten .....	46
<b>KAPITEL 3 - ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1 VTI1A/VTI1B DOPPELDEFIZIENTE EMBRYONEN .....	47
3.1.1 E18,5 Embryonen haben einen äußerlich erkennbaren Phänotyp .....	47
3.1.2 Defekte in der Knochenbildung .....	48
3.1.3 Pathologische Veränderungen der Lunge .....	51
3.2 VTI1A/VTI1B DOPPELDEFIZIENTE MAUSEMBRYONALE FIBROBLASTEN .....	54
3.2.1 Verwendete Zelllinien .....	54
3.2.2 MEF zeigen keinen offensichtlichen morphologischen Phänotyp .....	54
3.2.2.1 Morphologie von Lysosomen, Golgi-Apparat und frühen Endosomen .....	55
3.2.2.2 Co-Fluoreszenzfärbung von späten Endosomen und Recycling-Endosomen .....	56
3.2.3 DKO MEF zeigen keinen Defekt in der Autophagozytose .....	58
3.2.3.1 Abbau radioaktiv markierter Proteine .....	58

3.2.3.2 Abbau von LC3 .....	59
3.2.4 Vti1a/Vti1b DKO führt zu erhöhter Sekretion lysosomaler Enzyme .....	60
3.2.4.1 Bestimmung der Sekretion lysosomaler Enzyme in MEF .....	61
3.2.4.2 Proteinmenge der Mannosephosphatrezeptoren .....	62
3.2.4.3 Die Lokalisation von MPR46 und MPR300 ist unverändert .....	63
3.2.5 DKO MEF haben keine Defekte in der Endozytose .....	67
3.2.5.1 Unspezifische Aufnahme von niedermolekularem Dextran .....	67
3.2.5.2 Aufnahme von Cholera toxin über Caveolae .....	68
3.2.5.1 Clathrin-abhängige Endozytose von LDL.....	70
3.2.6 Das Recycling von Transferrin ist in DKO MEF nicht gestört .....	71
3.2.6.1 Aufnahme von Transferrin.....	72
3.2.6.2 Exozytose von internalisiertem Transferrin .....	73
3.2.7 EGF-Rezeptor Abbau, Signalgebung und Dysregulation .....	74
3.2.7.1 Aufnahme und Transport von EGF zum Lysosom .....	74
3.2.7.2 Degradation des EGF-Rezeptors .....	76
3.2.7.3 Signalgebung und endosomale Lokalisation des EGF-Rezeptors .....	77
3.2.7.4 EGFR-stimulierte Zellmigration.....	78
3.2.7.5 Bei Stimulation mit niedriger EGF-Konzentration ist der EGFR dysreguliert .....	79
3.2.7.6 Konzentration von EGFR auf der Plasmamembran.....	81
3.2.8 Lipidtropfen: Aufbau, Abbau und dynamisches Gleichgewicht .....	82
3.2.8.1 Aufbau und Degradation von Lipidtropfen .....	82
3.2.8.1 Erhöhte Anzahl von Lipidtropfen in DKO MEF der E-Linie .....	84
3.3 VTI1A/VTI1B DOPPELDEFIZIENTE HIPPOCAMPAL NEURONEN.....	85
3.3.1 Kultivierung, Neuritenausbildung und Neuritenwachstum .....	85
3.3.2 Unauffällige Morphologie der hippocampalen Neuronen .....	87
3.3.3 Stimulation hippocampaler Neuronen mit NT-3.....	90
<b>KAPITEL 4 - DISKUSSION .....</b>	<b>92</b>
4.1 ÄUßERLICHER PHÄNOTYP DER EMBRYONEN .....	92
4.2 SKELETT UND LUNGE.....	93
4.2.1 Veränderungen am Skelett .....	93
4.2.1.1 Mangelnde Innervierung und Auswirkung auf das Knochenwachstum.....	93
4.2.1.2 Fehlerhafte Signaltransduktion in Osteoblasten .....	94
4.2.1.3 Zwei Regulatoren von Runx2: Wnt und MAP-Kinasen.....	95
4.2.2 Veränderungen der Lunge .....	97
4.2.2.1 Defiziente Bildung von Lamellarkörperchen und Surfactant-Sekretion.....	97
4.2.2.2 Dysregulation der Proliferation/Differenzierung von Lungenepithel .....	99
4.3 MAUSEMBRYONALE FIBROBLASTEN .....	100
4.3.1 Erhöhte Sekretion lysosomaler Hydrolasen .....	100
4.3.2 Dysregulation des EGF-Rezeptors .....	102
4.3.2.1 Fehlsortierung des EGF-Rezeptors.....	103
4.3.2.2 Weitere Konsequenzen der Dysregulation .....	104
4.3.3 Aufbau, Abbau und Gleichgewicht von Lipidtropfen .....	105



---

4.3.4 Das endosomale System Vti1a/Vti1b defizienter MEF.....	106
4.3.4.1 Vti1a und Vti1b werden durch andere SNARE Proteine ersetzt .....	107
4.3.4.2 Veränderte Regulation der Membranfusion bei Knockout oder Knockdown.....	110
4.4 HIPPOCAMPAL NEURONEN.....	112
4.4.1 Anterograde Membrantransport und Zelladhäsionsmoleküle .....	113
4.4.2 Retrograde Transport und Signaling-Endosomen.....	114
4.4.3 Weitere Schlussfolgerungen .....	115
4.5 AUSBLICK .....	116
4.5.1 Zur weiteren Analyse von Skelett und Lunge.....	116
4.5.2 Zur weiteren Analyse der MEF .....	116
4.5.3 Zur weiteren Analyse hippocampaler Neuronen .....	117
<b>KAPITEL 5 – ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....</b>	<b>118</b>
<b>KAPITEL 6 - LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>122</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>X</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>XI</b>



# Kapitel 1

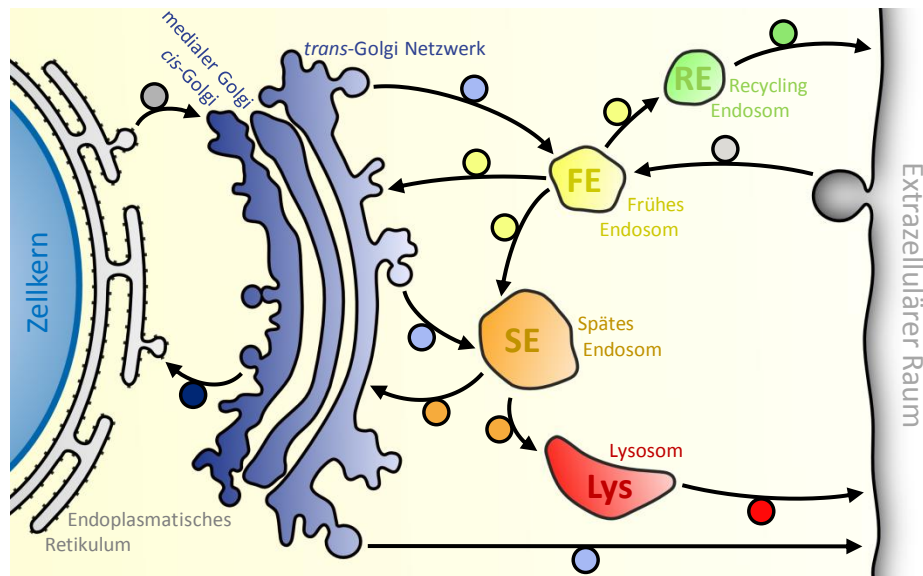
## Einleitung

Eukaryotische Zellen sind durch die Bildung von Kompartimenten hochgradig organisiert. Verschiedene Typen von Organellen und Vesikeln haben jeweils spezifische Aufgaben im Transport oder in der Prozessierung von Material. Die Fusion solcher Vesikel mit anderen Vesikeln oder Membranen wird über *Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Receptor* (SNARE) Proteine katalysiert. Zwei SNARE Proteine, *Vti1a* und *Vti1b*, werden in Säugern ubiquitär exprimiert und vermitteln Fusionen im endosomalen System. Während die Defizienz eines der beiden Proteine in der Maus toleriert wird, ist ein Fehlen beider Proteine perinatal letal. Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des murinen Doppelknockouts von *Vti1a* und *Vti1b*.

### 1.1 Intrazelluläre Transportwege

Der Austausch von Membranen und Material zwischen einzelnen Kompartimenten der Zelle ist essentiell. Er verläuft größtenteils über Vesikel, die sich von einem Ursprungsorganell abschnüren, zum Ziel befördert werden und dort mit dem Zielkompartiment verschmelzen. Vereinfacht gesehen gibt es für den intrazellulären Transport zwei Richtungen. Der anterograde Transport verläuft vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat hin zur Plasmamembran. Der retrograde Transport ist dem entgegen gerichtet und führt von der Plasmamembran zum Golgi-Apparat und ER (Abb. 1.1).

Das Prinzip des Transports durch Vesikel und tubulovesikuläre Strukturen entlang des sekretorischen Weges wurde erstmals von Georg Palade beschrieben (Palade 1975).



**Abb. 1.1 Vesikuläres Transportnetzwerk zwischen den Kompartimenten der Zelle**

Proteine werden vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) anterograd über *cis*- und medialen Golgi-Apparat zum *trans*-Golgi transportiert. Das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) fungiert als Sortierstation der Zelle, von wo aus Material und Membranen direkt zur Plasmamembran gebracht oder zum endosomalen System weitergeleitet werden. Andersherum kann Material aus dem Extrazellulärraum zusammen mit Regionen der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden. Aufgenommenes Material erreicht zumeist erst das frühe Endosom (FE), das neben dem TGN eine weitere zelluläre Sortierstelle ist. Von dort aus kann es unter anderem zum TGN, über das Recycling-Endosom zurück zur Plasmamembran oder über späte Endosomen (SE) zum degradativen Lysosom (Lys) transportiert werden. Die Organellen des endosomalen Systems sind über vielfältige Wege miteinander verbunden.

### 1.1.1 Anterograder Transport, Endoplasmatisches Retikulum & Golgi-Apparat

In anterograder Richtung beginnt der Transport am ER und führt über den Golgi-Apparat entweder direkt zur Plasmamembran oder zum endosomalen System (Abb. 1.1).

#### 1.1.1.1 Das endoplasmatische Retikulum

Etwa ein Drittel aller transkribierten Proteine sind für den sekretorischen Weg oder zur Integration in Membranen bestimmt. Diese werden aufgrund spezifischer Lokalisations-signale von den Ribosomen in das Lumen des ERs transloziert (Walter und Johnson 1994). Dort werden die naszierenden Proteine unter ständiger Qualitätskontrolle gefaltet und erste post-translationelle Modifikationen wie die *N*-Glykosylierung und die Hydroxylierung von Prolinresten durchgeführt. An speziellen ER-Austrittsregionen werden die so prozessierten Proteine in *Coat Protein Complex II* (COPII) Vesikel sortiert (Bannykh *et al.* 1996; Hughes und Stephens 2008). Im ER herrscht ein annähernd neutraler pH-Wert, der die Bindung löslicher Proteine an Transportadapter begünstigt (Wu *et al.* 2001). Die Sortierungssignale für die Interaktion mit COPII sind vielfältig und beinhalten di-azide und hydrophobe bzw. aromatische Motive (Barlowe 2003).

### 1.1.1.2 Der Golgi-Apparat

Die COPII-Vesikel werden zum *cis*-Golgi transportiert und entlassen dort ihre Fracht zur weiteren Prozessierung. ER-Transportadapter und andere Proteine, die eine durch die KDEL Sequenz codierte ER-Zugehörigkeit haben, werden an dieser Stelle in *Coat Protein Complex I* (COPI) Vesikeln konzentriert und retrograd zum ER zurückgeleitet (Munro und Pelham 1987; Hughes und Stephens 2008).

Im Golgi-Apparat werden Proteine des sekretorischen Weges sequenziell durch *cis*-Golgi und medialen Golgi zum *trans*-Golgi-Apparat transportiert. In jedem dieser Kompartimente laufen unterschiedliche *O*-Glykosylierungen und proteolytische Spaltungen ab. Der pH-Wert im Golgi wird von *cis*-Golgi bis *trans*-Golgi azider und beträgt dort etwa 6,2 (Wu *et al.* 2001).

Das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) ist eine Sortierstation des sekretorischen Weges. Von hier aus können Proteine entweder in konstitutiv sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran gebracht, in Granula der kontrollierten Sekretion zwischengespeichert oder aber über Clathrin-umhüllte Vesikel an das endosomale System übergeben werden (Traub und Kornfeld 1997).

## 1.1.2 Retrograder Transport und das endosomale System

In retrograder Richtung beginnt der Transport an der Plasmamembran und führt zum endosomalen System oder weiter zum TGN und ER (Abb. 1.1). Säugerzellen internalisieren (endozytieren) pro Stunde etwa einen Anteil ihrer Plasmamembran, welcher der kompletten Zelloberfläche entspricht (Steinman *et al.* 1976). Die meisten der endozytotischen Wege führen innerhalb weniger Minuten zunächst zum früh-endosomalen Kompartiment (Schmid *et al.* 1989).

### 1.1.2.1 Das frühe Endosom

Das frühe Endosom hat einen leicht aziden pH-Wert von 6,2 – 6,8, der die Dissoziation aufgenommener Ligand-Rezeptor-Komplexe bewirkt. Es dient, ähnlich dem TGN, als Sortierstation: Von hier aus können Proteine und Membranen zum Recycling-Endosom, zu späten Endosomen oder zum TGN weitergeleitet werden. Mehrere frühe Endosomen können auch homotypisch zu einem größeren Kompartiment verschmelzen (Gruenberg *et al.* 1989). Mikroskopisch stellt sich das frühe Endosom als Kompartiment dar, das aus Vesikeln mit ca. 400 nm Querschnitt und tubulären Strukturen mit einem Querschnitt von 60 nm besteht (Gruenberg *et al.* 2001).

### 1.1.2.2 Das Recycling-Endosom

Obwohl Material vom frühen Endosom aus in einem schnellen Schritt wieder an die Plasmamembran gelangen kann, werden z.B. internalisierte Rezeptoren auch in einem langsameren Transport über das Recycling-Endosom wieder aus der Zelle entlassen (Sheff *et al.* 1999). Das Recycling-Endosom besteht aus vesikulär-tubulären Strukturen mit einem Querschnitt von 50 nm, die in Kernnähe akkumulieren (Hopkins *et al.* 1983). Der pH-Wert des Recycling-Endosoms ist etwa um 0,4 Einheiten niedriger als der des frühen Endosoms und dient der vollständigen Dissoziation von Ligand-Rezeptor-Komplexen (Sipe *et al.* 1987).

### 1.1.2.3 Das spätendosomal-lysosomale Kompartiment

Nicht recyceltes Material gelangt vom frühen Endosom aus entweder zum TGN oder zum späten Endosom. Proteine und Lipide werden für letzteres in multivesikulären Körpern an der Membran früher Endosomen gesammelt und unter Ansäuerung zum späten Endosom transportiert (Gruenberg und Stenmark 2004).

Dieses sortiert wiederum die Fracht retrograd zum TGN oder weiter zu den Lysosomen (van der Goot und Gruenberg 2006). Der niedrige pH-Wert später Endosomen von ca. 5,0 – 5,5 ist unter anderem Voraussetzung für den Weitertransport zum Lysosom (van Weert *et al.* 1995). Das tubulär-vesikuläre, spätendosomale und das dichte, lysosomale Kompartiment haben viele Gemeinsamkeiten (van der Goot und Gruenberg 2006). Eines der Hauptmerkmale des Lysosoms ist jedoch die degradative Funktion durch saure Hydrolasen, die in diesem Milieu (ca. pH 4,5) maximal aktiv sind. Die Hydrolasen werden im TGN durch Mannosephosphat-Rezeptoren erkannt und über das endosomale System zum Lysosom transportiert (Figura *et al.* 1986). Zusätzlich können sekretorische Lysosomen reguliert mit der Plasmamembran verschmelzen. Sie dienen so z.B. als Reparatursystem der Membran oder zur Sekretion lytischer Enzyme in zytotoxischen T-Zellen (Andrews *et al.* 2000; Burkardt *et al.* 1990).

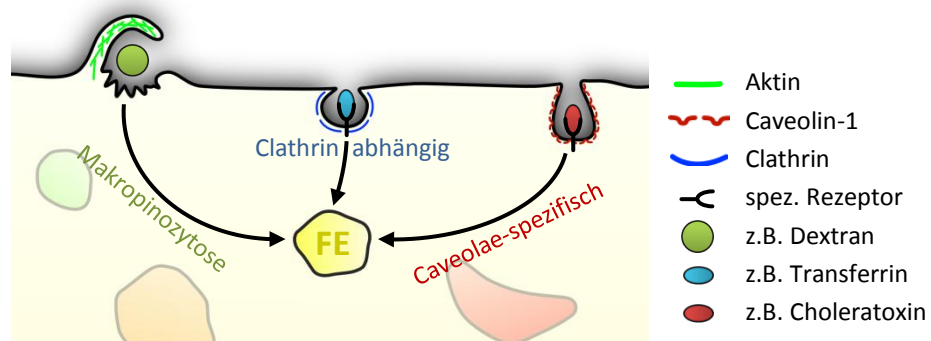
### 1.1.2.4 Transportmodelle im endosomalen System

Auf welche Art Makromoleküle innerhalb des endosomalen Systems und zum Lysosom transportiert werden, wird stark debattiert. Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, die entweder einen rein vesikulären Transport, Reifung der Organellen, kurzzeitige Verschmelzung von Organellen oder direkte Fusion der Kompartimente beinhalten (Mullins und Bonifacino 2001). Besonders durch *live-cell-imaging* Experimente gewinnen

momentan Modelle an Bedeutung, in denen die Organellen direkt miteinander interagieren (Gan *et al.* 2009; Bright *et al.* 2005). In einer anderen Studie wurde beobachtet, dass sich aus frühen Endosomen Vesikel von 400 nm bis 800 nm bilden, die dann von frühen zu späten Endosomen reifen (Rink *et al.* 2005).

### 1.1.3 Verschiedene Mechanismen der Endozytose

Extrazelluläres Material erreicht das endosomale System über verschiedene Mechanismen, die eine frühe Möglichkeit der Sortierung an der Plasmamembran darstellen (Doherty und McMahon 2009). Drei dieser Mechanismen spielen in dieser Arbeit eine Rolle und werden daher kurz vorgestellt: Die Clathrin-abhängige und die Caveolae-spezifische Endozytose sowie die Makropinozytose (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2 Verschiedene Aufnahmewege führen zum endosomalen System**

Makromoleküle können über die unspezifische Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit in die Zelle gelangen (Makropinozytose). Eine spezifische Aufnahme setzt die Interaktion mit einem Rezeptor voraus. Der Ligand-Rezeptor-Komplex wird über mehrere mögliche Mechanismen endozytiert. So wird z.B. Transferrin spezifisch über den Transferrin-Rezeptor erkannt und dieser wiederum spezifisch über Clathrin-abhängige Mechanismen internalisiert. Ein anderer Mechanismus ist die Endozytose in Caveolae. Dieser wird z.B. von Choleratoxin zur Aufnahme in die Zelle genutzt.

#### 1.1.3.1 Makropinozytose

Durch Makropinozytose gebildete Makropinosomen sind, abhängig vom Zelltyp, bis zu 5 µm große Strukturen. Sie bilden sich durch gewellte Einbuchtungen der Plasmamembran (Fawcett 1965). Durch die Größe der endozytierten Bereiche ist das Verhältnis zwischen Inhalt und umschließender Membran recht gering, so dass Makromoleküle aus der extrazellulären Umgebung sehr effizient internalisiert werden. Makropinosomen besitzen außer der Membran keine weitere Hülle. Die Zusammensetzung der Membran ist dabei zu derjenigen der Plasmamembran weitgehend identisch (Bretscher und Thomson 1983). Makropinozytose ist ein unspezifischer Vorgang, der sich über dynamische Reorganisation

des Zytoskeletts unter Beteiligung von Aktin vollzieht (Watts und Marsh 1992; Allison *et al.* 1971). Der Inhalt von Makropinosomen wird zu frühen Endosomen transportiert, von wo aus er zur Degradation ins Lysosom gelangt (Racoosin und Swanson 1993).

Ein Beispiel für makropinozytierte Moleküle ist niedermolekulares Dextran, das bei Fluoreszenzmarkierung zur Verfolgung des Makropinosoms genutzt werden kann (Berlin und Oliver 1980).

### 1.1.3.2 Clathrin-abhängige Endozytose

Clathrin ist ein Hüll-Strukturprotein, das bei vielen Prozessen an der Vesikelbildung von der Plasmamembran, aber auch von Kompartimenten des endosomalen Systems beteiligt ist (Schmid und McMahon 2007). Die Vielfalt und Spezifität der über Clathrin endozytierten Makromoleküle liegt in den multiplen Frachtadptoren, Rezeptoren und akzessorischen Proteinen begründet, die mit Clathrin in Wechselwirkung treten können (Ungewickell und Hinrichsen 2007). Diese koordinieren die Nukleation von Clathrin an der zu internalisierenden Membran, beginnend mit der Bindung der Hüll-Proteine an Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (Haucke 2005). Durch Zusammenwirken von Adapterproteinen und Clathrin wird die Membran gekrümmt und das entstehende Vesikel schließlich über die GTPase Dynamin von der Plasmamembran abgetrennt (Hinrichsen *et al.* 2006; Hinshaw *et al.* 1995). Der Prozess von der Akkumulation der Komponenten bis zur Abspaltung des Vesikels dauert in etwa 20 – 150 s (Merrifield *et al.* 2005). Solche Clathrin-coated pits bzw. Vesikel sind aufgrund der polymeren Struktur des Clathrins sehr gleichförmig und zwischen 10 nm und 500 nm groß (Heuser 1980). Nach der Abspaltung des Vesikels wird das Clathrin-Polymer durch Auxilin und Hsp70 disassembliert und das Vesikel zum Ziel transportiert (Ungewickell *et al.* 1995).

Clathrin-vermittelte Endozytose kann unter anderem über den fluoreszenzmarkierten Transferrin-Rezeptor verfolgt werden. Dessen YXRF Motiv wird vom Adapterprotein AP2 erkannt und die Nukleation von Clathrin gestartet (Collawn *et al.* 1990).

### 1.1.3.3 Caveolae-spezifische Endozytose

Caveolae sind flaschenförmige Invaginationen mit einem Durchmesser von 60 – 80 nm (Yamada *et al.* 1955). Sie befinden sich auf der Oberfläche der meisten Zelltypen mit Ausnahme von z.B. Neuronen und Leukozyten (Stan 2005). Nach der Clathrin-vermittelten Endozytose gehört die Aufnahme über Caveolae zu den am häufigsten beobachteten Mechanismen (Parton und Simons 2007). Caveolin-1, Caveolin-2 und Caveolin-3 sind in Caveolae lokalisierte Proteine, wobei Caveolin-1 und Caveolin-3 direkt an der Bildung und



Strukturgebung der Caveolae beteiligt sind (Razani *et al.* 2002; Drab *et al.* 2001; Galbiati *et al.* 2001). Caveolin-1 ist mit einer *Hairpin*-Domäne in die Membran eingebettet; N- und C-terminus befinden sich im Zytosol (Richter *et al.* 2007). Es bildet Oligomere, bindet Cholesterin und Fettsäuren und ist in *Lipid Rafts* akkumuliert (Monier *et al.* 1996; Dietzen *et al.* 1995). Wie genau Caveolae assemblieren, spezifische Rezeptoren akkumulieren und schließlich endozytiert werden, ist zurzeit noch nicht bekannt. Vieles wird aber über die Assoziation mit *Lipid Rafts* reguliert (Parton und Simons 2007).

Bei der Abtrennung des caveolaren Vesikels von der Membran ist unter anderem Dynamin essentiell (Oh *et al.* 1998). Nach Internalisierung bleibt die Hüllstruktur von Caveolae erhalten, während die Fracht durch transiente Interaktionen in das frühe Endosom abgegeben wird (Pelkman *et al.* 2004). Ein Beispiel für die Caveolae-spezifische Aufnahme ist Choleratoxin, das an das Gangliosid GM1 als Rezeptor bindet und so endozytiert wird (Orlandi und Fischman 1998).

#### 1.1.4 Nicht-sekretorischer Weg und unkonventionelle Sekretion

Neben dem sekretorischen (konventionellen) Weg des vesikulären Transports existieren weitere Mechanismen, die einen intrazellulären Transport von Proteinen vermitteln.

So werden mitochondriale und peroxisomale Proteine, die nicht in den Organellen selbst synthetisiert werden, über spezifische Translokationskomplexe direkt aus dem Zytosol importiert (Wickner und Schekman 2005). Zum Transport in den Zellkern vorgesehene Proteine werden über den *Nuclear Pore Complex* ebenfalls aus dem Zytosol aquiriert (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010).

Aber auch sekretorische Proteine werden über Mechanismen exozytiert, die bisher kaum untersucht sind und unter dem Oberbegriff der unkonventionellen Sekretion zusammengefasst werden (Nickel und Seedorf 2008). Die unkonventionelle Sekretion definiert sich über eine von ER und/oder Golgi unabhängige Prozessierung und Exozytose. In *Leishmania* besitzen z.B. nur 5 % der sekretierten Proteine ein Signal für den konventionellen Transportweg, während 57 % der Proteine über unkonventionelle Mechanismen exportiert werden (Cuervo *et al.* 2009). Für die unkonventionelle Sekretion sind vor allem vier Mechanismen in der Diskussion: Direkte Translokation vom Zytoplasma in den Extrazellulärraum, lysosomale Sekretion, Sekretion über Vesikel aus multivesikulären Strukturen sowie Exozytose über Vesikel, die sich aus der Plasmamembran bilden (Nickel und Seedorf 2008).

## 1.2 Spezielle Funktionen des endosomalen Systems

Der Transport durch das endosomale System ist Teil hochgradig dynamischer und regulierter Prozesse. Die Anforderungen an das Endosom sind dabei stark vom Zelltyp abhängig. Zwei dieser Funktionen sollen hier besonders hervorgehoben werden: Die regulatorische Rolle in der Signaltransduktion und bei der Entwicklung von Neuronen.

### 1.2.1 Signaltransduktion und endosomale Signalgebung

Als Signaltransduktion werden Prozesse bezeichnet, in denen Zellen ein extrazelluläres Signal über Rezeptoren in eine intrazelluläre Reaktion umwandeln. Viele dieser Rezeptoren vermitteln dabei nach Aktivierung durch ihren Liganden das Signal nicht nur von der Plasmamembran aus, sondern werden endozytiert und dadurch reguliert (Sorkin und von Zastrow 2009).

Eines der am besten untersuchten Beispiele dafür ist die Regulation des *Epidermal Growth Factor* (EGF)-Rezeptors (Sorkin und Goh 2009). Die Bindung verschiedener Liganden an den EGF-Rezeptor induziert dessen Dimerisierung, Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität und anschließende Endozytose (Yarden *et al.* 2001). Abhängig vom Zelltyp und der Konzentration des Liganden erfolgt die Endozytose über Clathrin-abhängige oder -unabhängige Wege (Kazazic *et al.* 2006; Sigismund *et al.* 2005). Es wird aber davon ausgegangen, dass der EGF-Rezeptor unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich über Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert wird (Sorkin und Goh 2009; Sigismund *et al.* 2008). Anschließend gelangt er über frühe Endosomen zu Recycling-Endosomen oder in multivesikuläre Kompartimente des späten Endosoms. Aus allen drei Kompartimenten kann der Ligand-Rezeptor-Komplex mit unterschiedlichen Kinetiken zurück zur Plasmamembran recycelt werden. Je nach Ligand dissoziiert der Rezeptorkomplex pH-abhängig, was wiederum über den weiteren Transportweg und die Aktivität des Rezeptors entscheidet (French *et al.* 1995). Der Ligand EGF bleibt pH-unabhängig gebunden und resultiert in einer anhaltenden, durch vesikulären Transport auch räumlich regulierten Signalgebung (Welch und Mullins 2002; Teis *et al.* 2002).

Weiterhin kann die endosomale Signalgebung in den multivesikulären Kompartimenten reguliert werden, indem der Rezeptor von der äußeren Membran des Kompartiments in ein inneres Vesikel internalisiert wird. Dies geschieht abhängig von der Ubiquitinierung des Rezeptors und nachfolgender Sortierung durch die ESCRT-Maschinerie (Huang *et al.* 2006). Schlussendlich wird der Rezeptor zur Signalattenuierung zum Lysosom transportiert und degradiert (Futter *et al.* 2006).

Über die beschriebenen Wege ist eine sehr genaue zeitliche und räumliche Regulation von Signaltransduktionsvorgängen durch das endosomale System möglich.

Dies beschränkt sich nicht nur auf Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie den EGF-Rezeptor. Ähnliche Mechanismen werden auch bei z.B. der Familie der Sieben-Transmembran-Rezeptoren oder Notch-Rezeptoren untersucht (Sorkin und von Zastrow 2009).

### 1.2.2 Neuronale Entwicklung und Signaltransport

Neuronen bestehen aus einem Zellkörper und spezialisierten, langen Fortsätzen, den Neuriten. Aufgrund dieses polaren Aufbaus und der Länge der Neuriten sind Neuronen besonders stark auf einen funktionellen endosomalen Transport angewiesen.

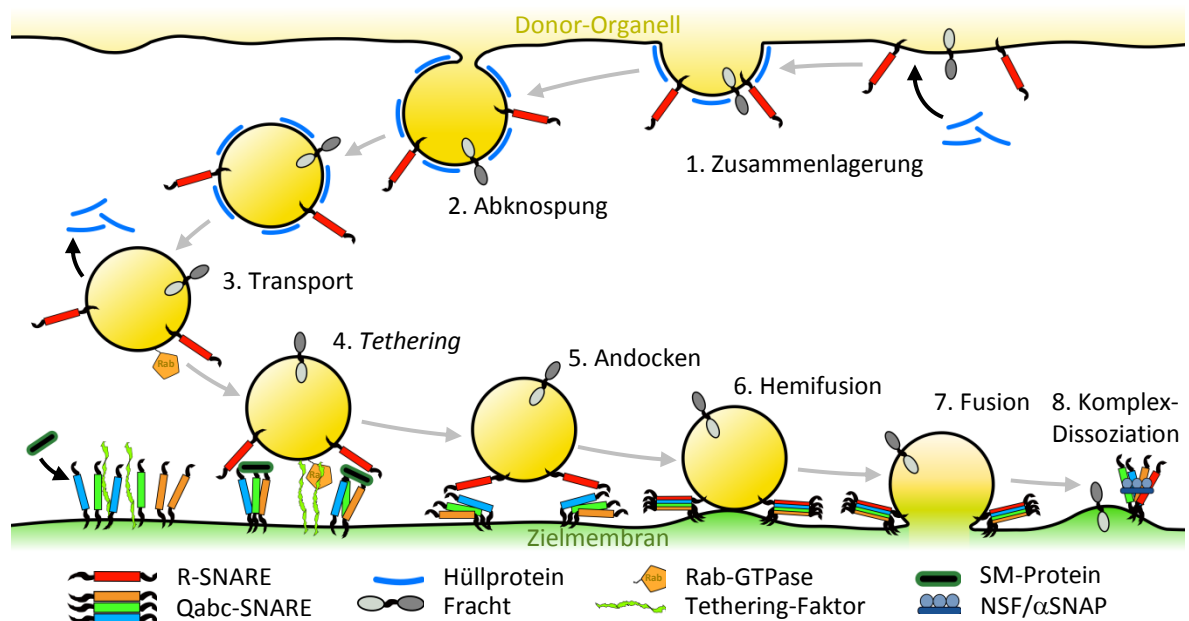
Das für die Reizweiterleitung verantwortliche Axon ist in der Regel der längste Neurit eines Neurons. Während eine typische, sphärische Zelle eine Plasmamembran-Oberfläche von ca. 1500  $\mu\text{m}^2$  hat, müssen Neuronen für das Wachstum ihres Axons eine Fläche dieser Größe pro Tag neu synthetisieren (Pfenninger 2009). Die Insertion neuer Membran beim wachsenden Axon geschieht hauptsächlich am distalen Ende, dem Wachstumskegel (Craig *et al.* 1995). Das Membranmaterial wird am Golgi-Apparat synthetisiert und vermutlich über sekretorische Lysosomen anterograd zum Wachstumskegel transportiert, wo es mit der Plasmamembran fusioniert (Arantes und Andrews 2006; Martinez-Arca *et al.* 2001).

Ein weiterer Mechanismus, bei dem endosomaler Transport essentiell ist, ist die Signalübertragung vom Wachstumskegel bzw. später der Synapse bis zum Zellkörper (Cosker *et al.* 2009). Am Axon erhaltenen Signale sind Bedingung für das Wachstum des Axons, Auffindung und Innervation des Ziels sowie das Überleben der Zelle (Sann *et al.* 2009). Die Mechanismen dieser Signalweiterleitung sind ähnlich zu denen, die in 1.2.1 besprochen wurden. Ein Beispiel ist die Signalgebung durch Neurotrophine wie den *Nerve Growth Factor* (NGF), die an *Tropomyosin receptor kinase* (Trk)-Rezeptoren am Wachstumskegel binden (Ghattacharyya *et al.* 1997). Die Rezeptoren induzieren ein lokales Signal am Wachstumskegel, werden aber auch endozytiert und retrograd in *Signaling*-Endosomen zum Zellkörper transportiert. Dort geben sie weiterhin Signale, die z.B. das Überleben der Zelle vermitteln (Ginty und Segal 2002; Watson *et al.* 2001).

Hat ein Neuron Synapsen ausgebildet, ist das endosomale System an deren Funktion über die Bildung, Exozytose, Wiederaufnahme und das Recycling von Neurotransmittern synaptischer Vesikel beteiligt (John *et al.* 2010).

### 1.3 Vesikulärer Transport

Der Transport zwischen den verschiedenen Kompartimenten des sekretorischen Weges beruht auf einem gemeinsamen Mechanismus. Von der Zusammenstellung eines Vesikels aus der Ursprungsmembran bis zur Fusion mit der Zielmembran ist eine ganze Reihe verschiedener Proteinfamilien beteiligt (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 Vesikulärer Transport: Von der Zusammenlagerung bis zur Fusion**

Fracht-Proteine, Adaptern und Hüllproteine assemblieren (1). Daraus resultiert eine Krümmung der Membran, von der sich schließlich ein fertiges Vesikel abschnürt (2). Während des Transportes zum Ziel werden die Hüllprotein-Polymere dissoziiert (3). An der Membran angekommen, erfolgt erst die lockere Anbindung des Vesikels an die Zielmembran (*Tethering* (4)), dann das stabilere Andocken (5). Beteiligte Proteine sind regulatorische *Tethering*-Faktoren, Rab-GTPasen und SM-Proteine. Durch Bildung eines RQ<sub>abc</sub>-SNARE-Komplexes von SNAREs gegenüberliegender Membranen erfolgt zunächst die Hemifusion (6), dann die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran (7). Der SNARE-Komplex wird für ein funktionelles Recycling durch NSF/αSNAP disassembliert (8).

Der vesikuläre Transport lässt sich in einzelne Schritte einteilen: Zusammenlagerung und Abknospung des Vesikels, Transport zur Zielmembran, spezifische Erkennung und *Tethering* am Ziel und abschließend die Fusion der Membranen.

An der Membran des Donor-Organells lagern sich zunächst über spezifische Adaptermoleküle die zu transportierenden Proteine und Hüll-Proteine an die Membran an (McMahon und Mills 2004). Dabei kommt in Transportwegen zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran hauptsächlich Clathrin als Hüllprotein vor, im Transport zwischen ER und Golgi je nach Richtung entweder COPI oder COPII (1.1.1 bzw. 1.1.3.2). Die dynamische Rekrutierung der Hüllkomplexe geschieht durch unterschiedliche Faktoren: Durch kleine GTPasen der Arf1/Sar1 Familie im Fall von COPI/COPII oder durch Phosphatidylinositolphosphate und verschiedenste Adaptern im Fall von Clathrin (Owen

*et al.* 2004; Springer *et al.* 1999). Die Anlagerung des Hüll-Komplexes bewirkt eine Krümmung der Membran und schließlich die meist durch Dynamin vermittelte Abknospung des Vesikels (1.1.3.2).

Nach der GTP-abhängigen Dissoziation des Hüll-Komplexes wird das Vesikel zur Zielmembran transportiert. Dieser Transport erfolgt über kurze Strecken, z.B. zwischen ER und Golgi in Hefe, durch Diffusion (Preuss *et al.* 1992). Ein Transport über längere Strecken wird durch das Zytoskelett unter Nutzung von Motorproteinen wie Kinesin, Dynein und Myosin erreicht (Hammer und Wu 2002).

Am Zielorganell angekommen, findet das *Tethering* statt. Hierunter versteht man die Interaktion multipler *Tethering*-Faktoren mit Rab-GTPasen (*Ras-like protein from brain*) und SNARE-Proteinen der Vesikel, durch die das Vesikel spezifisch mit der Zielmembran verbunden wird (Sztul und Lupashin 2006). Die vollständige Assemblierung dieser Faktoren führt zu einer festen Bindung des Vesikels an die Zielmembran, dem *Docking* (Bethani *et al.* 2009; Zerial and McBride 2001).

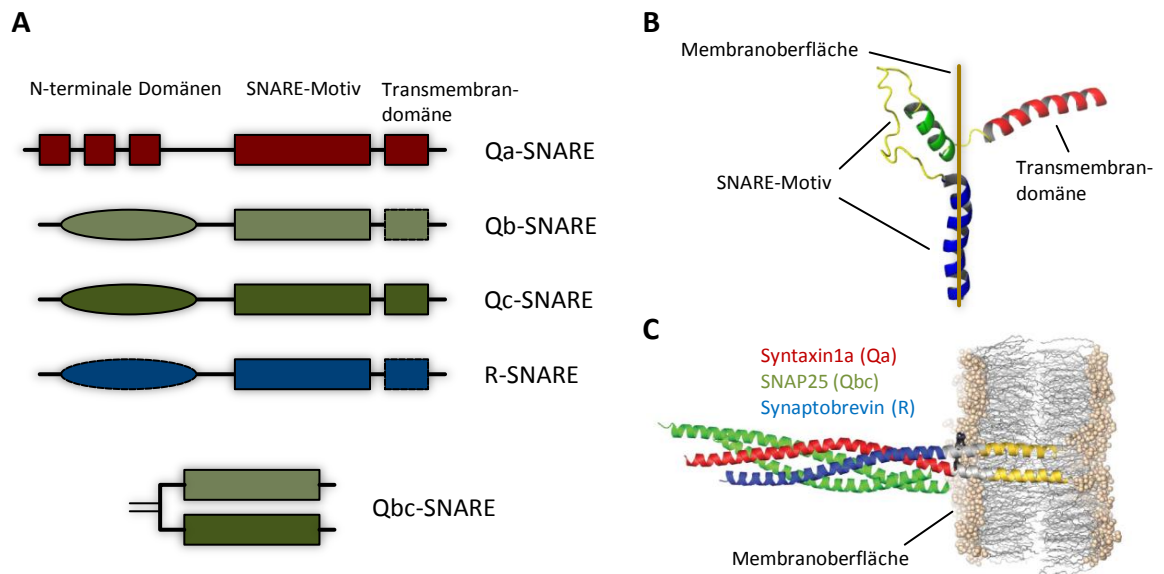
Die tatsächliche Fusion der Membran erfolgt durch die Bildung eines Komplexes aus SNARE-Proteinen, die in den gegenüberliegenden Membranen verankert sind. Der Vorgang der durch SNARE-Proteine vermittelten Fusion wird in Abschnitt 1.4.2 detailliert besprochen. Abschließend wird der gebildete SNARE-Komplex durch die ATPase NSF und deren Co-Faktor  $\alpha$ SNAP dissoziiert (Barnard *et al.* 1997).

## 1.4 SNARE-Proteine

Nach der Beschreibung des vesikulären Transports durch Palade ermöglichte die *in vitro* Rekonstitution von ER- und Golgi-Vesikeln erstmals Experimente zur Charakterisierung der beteiligten Proteinmaschinerie (Fries und Rothman 1980). Die ATPase NSF (*N-ethylmaleimid Sensitive Factor*) wurde als erstes für die Fusion essentielles Protein entdeckt, später dann dessen Co-Faktor  $\alpha$ SNAP (*Soluble NSF Attachment Protein*) (Clary *et al.* 1990; Block *et al.* 1988). Ein Komplex der eigentlich für die Fusion verantwortlichen SNARE-Proteine wurde durch Co-Immünpräzipitationsexperimente mit  $\alpha$ SNAP isoliert und die Proteine daher als  $\alpha$ SNAP Rezeptoren bezeichnet (Söllner *et al.* 1993). Mittlerweile sind in Säugern ca. 40 verschiedene SNARE-Proteine bekannt (Jahn und Scheller 2006).

### 1.4.1 Struktur von SNARE-Proteinen

Die Familie der SNAREs besteht aus kleinen, etwa 100 – 300 Aminosäure umfassenden Proteinen mit einem evolutionär konservierten, 60 – 70 Aminosäuren langen SNARE-Motiv (Weimbs *et al.* 1997). Aufgrund struktureller Aspekte werden sie in vier Sub-Klassen eingeteilt: Qa-, Qb-, Qc- und R-SNAREs (Fasshauer *et al.* 1998, Abb. 1.4 A).



**Abb. 1.4 Struktur der SNARE-Proteine und des SNARE-Motivs**

**A** Die meisten SNARE-Proteine haben eine C-terminale Transmembrandomäne, direkt gefolgt vom SNARE-Motiv und verschiedenen N-terminalen Domänen. Qbc-SNAREs besitzen zwei SNARE-Motive und keine Transmembrandomäne, dafür aber meist eine palmitoylierte Region zur Membraninsertion. Gestrichelte Linien symbolisieren Domänen, die in manchen SNAREs der Sub-Klasse fehlen. Abbildung nach Jahn und Scheller 2006. **B** Liegen SNARE-Proteine nicht in einem SNARE-Komplex vor, ist das SNARE-Motiv (grüne Helix, unstrukturierte Region und blaue Helix) weitgehend unstrukturiert (gezeigt ist Synaptobrevin / VAMP-1 aus Ellena *et al.* 2009). **C** Im SNARE-Komplex dagegen bilden die SNARE-Motive eine hochorganisierte *coiled-coil* Struktur aus, die sich bis in die Membranregion erstreckt (gezeigt sind die Strukturen der SNARE-Motive ohne N-terminale Domänen aus Stein *et al.* 2009).

Die meisten SNAREs besitzen eine C-terminale Transmembrandomäne, die direkt an das SNARE-Motiv anknüpft (Stein *et al.* 2009; Hong 2005). Strukturierte, N-terminale Domänen sind ebenfalls in den meisten SNAREs vorhanden. In Qa-SNAREs (auch „echte“ Syntaxine genannt), sowie manchen Qb- und Qc-SNAREs ist ein Bündel dreier antiparalleler Helices charakteristisch. Dieses kann in Syntaxin 1 und Syntaxin 7 mit dem SNARE-Motiv interagieren und so dessen Funktion beeinflussen (Fasshauer 2003). In einer in Säugern evolutionär konservierten Klasse von R-SNAREs (Longine) findet sich N-terminal die regulative Longin-Domäne, die einer evolutionär weniger gut konservierten Klasse (Brevine) fehlt (Rossi *et al.* 2004).

Einen anderen Aufbau haben Qbc-SNAREs. Sie besitzen je ein Qb- und ein Qc-SNARE-Motiv, aber keine Transmembrandomäne. Eine Membranassoziation findet meist über

Palmitoylierung der *Linker*-Region zwischen Qb- und Qc-Motiv statt (Hong 2005).

Ein funktionaler SNARE-Komplex besteht aus vier SNARE-Motiven, von denen jedes einer anderen Subklasse angehört. Während im einzelnen SNARE-Protein das SNARE-Motiv weitgehend unstrukturiert vorliegt (Ellena *et al.* 2009; Abb. 1.4 B), bildet sich bei Zusammenlagerung in der Form RQabc eine hoch organisierte *coiled-coil* Struktur (Abb. 1.4 C). Diese ist in den verschiedenen SNARE-Komplexen konserviert, wie sich durch die Auflösung mehrerer Kristallstrukturen gezeigt hat. Zu den Komplexen, deren Kristallstruktur bekannt ist, gehört der neuronal-sekretorische Komplex VAMP-2 / Syntaxin 1 / SNAP25, der spät-endosomale Komplex VAMP-8 / Syntaxin 7 / Vti1b / Syntaxin 8 und der früh-endosomale Komplex VAMP-4 / Syntaxin 13 / Vti1a / Syntaxin 6 (Zwilling *et al.* 2007; Antonin *et al.* 2002; Sutton *et al.* 1998).

Im SNARE-Komplex haben die Helices der einzelnen SNARE-Motive eine Gangweite von 7 Aminosäuren, so dass es entlang der *coiled-coil* Struktur 16 Ebenen interagierender Aminosäuren gibt. Diese Interaktionen sind, bis auf die der mittleren Ebene (0-Ebene), hydrophob. In der 0-Ebene dagegen finden sich hydrophile Wechselwirkungen zwischen drei Glutamin (Q)-Seitenketten und einer Arginin (R)-Seitenkette. Entsprechend der in der 0-Ebene des Komplexes beigesteuerten Seitenkette erfolgte die Klassifikation in R- und Q-SNAREs. Die weitere Differenzierung in Qa, Qb und Qc geschieht über Homologien zu den Q-SNARE-Motiven des zuerst kristallisierten, neuronalen SNARE Komplexes: Syntaxin 1 (Qa) und SNAP25 (Qb- bzw. Qc-Helix) (Sutton *et al.* 1998; Fasshauer *et al.* 1998).

#### 1.4.2 Die SNARE-vermittelte Membranfusion

Die Ausbildung eines SNARE-Komplexes ist im sekretorischen System der maßgebliche Schritt bei der Fusion zweier Membranen (Jahn und Scheller 2006, zur Veranschaulichung siehe Abb. 1.3 Schritte 5 – 8). Von den am Fusionskomplex beteiligten vier SNARE-Proteinen muss auf jeder Seite der gegenüberliegenden Membranen mindestens eines über eine Transmembrandomäne verankert sein (Jun *et al.* 2007). Die SNARE-Motive lagern sich dann, beginnend am membranfernen N-terminus, reißverschlußartig zu der beschriebenen *coiled-coil* Struktur zusammen.

Dieser Prozess setzt genügend Energie frei, um die elektrostatische Abstoßung der gegenüberliegenden Membranen zu überwinden (Fasshauer *et al.* 2003). Durch die mechanisch über die Transmembrandomänen übertragene Kraft erfolgt vermutlich zunächst eine Hemifusion der aneinanderliegenden Membranschichten, dann die vollständige Fusion (Langosch *et al.* 2007). Dabei ist die SNARE-Maschinerie so effizient,

dass ein einziger Komplex zur Fusion zweier Vesikel genügt (van den Bogaart *et al.* 2010). Die SNAREs gehen während der Membranfusion von einem *trans*-Komplex (meistens R-SNARE und Qabc-SNAREs auf gegenüberliegenden Membranen) zu einem *cis*-Komplex (alle SNAREs auf der Zielfmembran) über. Dieser *cis*-Komplex wird von NSF ATP-abhängig disassembliert, so dass die einzelnen SNAREs für eine neue Fusionsreaktion zur Verfügung stehen. Dafür assoziiert zunächst  $\alpha$ SNAP mit der Oberfläche der *coiled-coil* Struktur des SNARE-Komplexes (Marz *et al.* 2003). Dadurch wird NSF rekrutiert und löst, vermutlich beginnend an der strukturell schwachen 0-Ebene, den SNARE-Komplex auf (Marz *et al.* 2003; Barnard *et al.* 1997).

### 1.4.3 Regulation der SNARE-vermittelten Membranfusion

Die Integrität der Organellen, die Balance der Verteilung von Membranmaterial und viele weitere Prozesse sind auf eine strikte Regulation der Transportprozesse angewiesen. Durch funktionelle Inhibition oder Knockout einzelner SNARE-Proteine wurde gezeigt, dass jeweils spezifische RQabc-Kombinationen die Fusion bei spezifischen Transportschritten vermitteln (Jahn und Scheller 2006). Einzelne SNARE-Proteine können Teil unterschiedlich kombinierter SNARE-Komplexe sein.

SNARE-Proteine selbst sind in der Komplexbildung wenig selektiv, so lange die RQabc-Regel eingehalten wird (Brandhorst *et al.* 2006; Yang *et al.* 1999). Zum Beispiel beim Recycling von SNAREs sind allerdings zwangsweise SNARE-Proteine auf Vesikeln vorhanden, die nur als Fracht transportiert werden, aber keinen aktiven Fusionskomplex bilden dürfen. Die Spezifität des Transports wird daher über eine ganze Reihe von Faktoren gewährleistet. Die wichtigsten Gruppen dieser Faktoren wurden teilweise bereits kurz angesprochen und sollen hier kurz vorgestellt werden.

#### 1.4.3.1 Hüllproteine

Ein erster Schritt der Spezifität besteht in der Sortierung von SNARE-Proteinen zu demjenigen Kompartiment, in dem sie Fusionen vermitteln sollen. Diese Sortierung kann über Teile des Hüllkomplexes von Vesikeln geschehen. Beispiele sind die ER-Golgi SNAREs Bet1, Sed5 und Sec22, die an Untereinheiten des COPII-Komplexes binden oder Vti1b, das mit dem Clathrin-Adapterprotein EpsinR interagiert (Miller *et al.* 2007; Mossessova *et al.* 2003).



### 1.4.3.2 SM-Proteine

Die Familie der SM-Proteine (*Sec1/Munc18-related proteins*) ist an der Regulation von SNAREs beteiligt, hat aber vermutlich auch direkten Einfluss auf die Fusionskatalyse (Carr und Rizo 2010). Durch Bindung von SM-Proteinen an das N-terminale Drei-Helix-Bündel von Qa-SNAREs wird beispielsweise bei Syntaxin 1 eine geschlossene, inaktive Konformation stabilisiert (Yang *et al.* 2000; Dulubova *et al.* 1999). Dadurch wird nach einer erfolgten Fusion eine sofortige Reassemblierung des SNARE-Komplexes verhindert. Gleichzeitig ist aber z.B. Munc18-1 in der Lage, unabhängig von einer N-terminalen Interaktion die SNARE-vermittelte Fusion zu stimulieren (Diao *et al.* 2010). Es wird daher ein sequentieller Mechanismus vorgeschlagen, in dem SM-Proteine zunächst die Assemblierung des SNARE-Komplexes regulieren und anschließend kooperativ zur Fusion beitragen (Carr und Rizo 2010).

### 1.4.3.3 Tethering-Faktoren

Für fast alle SNARE-Fusionskomplexe wurden spezifische *Tethering*-Faktoren identifiziert (Sztul und Lupasin 2006; Whyte und Munro, 2002). Sie stellen zusammen mit Rab-Proteinen einen ersten, spezifischen Kontakt zwischen Vesikel und Zielmembran her und können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Proteine mit langen *coiled-coil* Domänen oder Komplexe mit mehreren Untereinheiten (Cai *et al.* 2007).

### 1.4.3.4 Rab-GTPasen

Im menschlichen Genom werden fast 70 unterschiedliche Rab-Proteine codiert (Colicelli 2004). Rab-Proteine sind kleine GTPasen, die inaktiv im Zytoplasma vorliegen, durch Austausch von GDP zu GTP aktiviert werden und sich dann kompartimentspezifisch an Membranen anlagern. Aktive Rab-Proteine vernetzen durch ihre multiplen Bindestellen verschiedene Effektoren auf der Membranoberfläche (Aivazian *et al.* 2006; Zerial und McBride 2001). Auf diese Weise spielen sie eine Rolle in Sortierungsprozessen bei der Vesikelbildung, der Rekrutierung von Hüllkomplexen und Motorproteinen sowie schließlich bei der spezifischen Erkennung von *Tethering*- und SNARE Molekülen. (Markgraf *et al.* 2007; Jordens *et al.* 2005; Carroll *et al.* 2001).

## 1.5 Die endosomalen Qb-SNAREs Vti1a und Vti1b

Vti1a und Vti1b sind in Säugern ubiquitäre Qb-SNAREs des endosomalen Systems. Sie sind spezialisierte Homologe eines einzelnen Vorläufer-SNAREs in Hefe, Vti1p (*Vps10 tail interacting*, Fischer von Mollard und Stevens 1998).

Vti1p ist Teil mehrerer SNARE-Komplexe im retrograden Transport zum *cis*-Golgi, im Transport vom TGN zum prävakuolären Kompartiment (vergleichbar mit dem späten Endosom) und bei der Fusion des prä-vakuolären Kompartiments mit der Vakuole (vergleichbar mit dem Lysosom) (Brickner *et al.* 2001; Fischer von Mollard und Stevens 1999; Fischer von Mollard *et al.* 1997).

Ein Knockout von *VTI1* ist letal und wird auf den Verlust des *cis*-Golgi-Transports zurückgeführt (Fischer von Mollard *et al.* 1997). Vti1p ist demnach essentiell und kann im entsprechenden SNARE-Komplex nicht ersetzt werden. Dies bestätigt eine spätere phylogenetisch-funktionelle Einteilung der SNARE-Proteine, in der Vti1p in Hefen das einzige endosomal-lysosomale Qb-SNARE repräsentiert (Qb.III Subgruppe, Kloepper *et al.* 2007). In Säugern besteht die Qb.III Subgruppe aus zwei Proteinen: Vti1a und Vti1b.

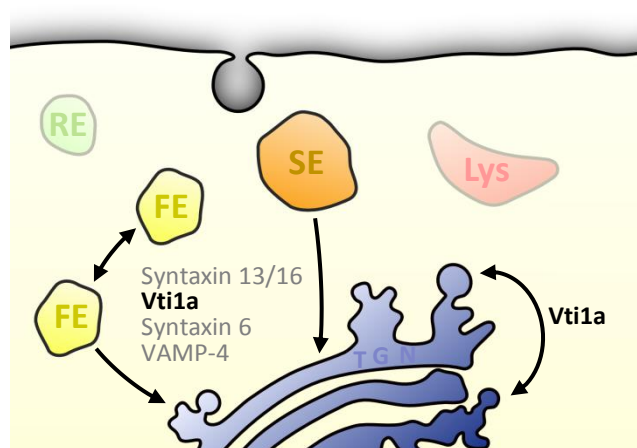
### 1.5.1 Vti1a

Vti1a hat ein Molekulargewicht von 27 kDa und ist zu Vti1p 33 % homolog (Fischer von Mollard und Stevens 1998; Lupashin *et al.* 1997). Anstelle des ansonsten hoch konservierten Glutamins enthält es in der 0-Ebene einen Aspartatrest (Antonin *et al.* 2000a). Dieser besetzt im SNARE-Komplex die gleiche Position wie das Glutamin und ist an einem ähnlichen Netzwerk von Wasserstoffbindungen beteiligt (Zwilling *et al.* 2007).

Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie zeigten, dass Vti1a hauptsächlich in TGN und Golgi, aber auch in kleinen, endosomalen Strukturen lokalisiert ist. Entsprechend konnte beobachtet werden, dass nach Brefeldin A induziertem Zerfall des Golgi-Apparats auch Vti1a dispers in der Zelle verteilt vorliegt (Kreykenbohm *et al.* 2002). Die Funktion von Vti1a spiegelt sich in dessen Lokalisation wieder (Abb. 1.5).

Antikörper gegen Vti1a blockieren den Transport innerhalb des Golgi-Apparats (Xu *et al.* 1998), die Fusion früher Endosomen (Antonin *et al.* 2000b) und den retrograden Transport von frühen Endosomen / Recycling-Endosomen zum TGN (Mallard *et al.* 2002).

In Co-Immunpräzipitationsexperimenten wurde Vti1a in einem spezifischen SNARE-Komplex mit Syntaxin 13 (Qa), Syntaxin 6 (Qc) und VAMP-4 (R) nachgewiesen, der die homotypische Fusion früher Endosomen vermittelt (Brandhorst *et al.* 2006).



**Abb. 1.5 Vti1a ist ein SNARE mit hauptsächlichster Funktion im frühen Endosom und TGN**

Vti1a spielt bei Transportprozessen innerhalb des Golgi-Apparates eine Rolle. Weiterhin vermittelt es die homotypische Fusion früher Endosomen (FE) und den retrograden Transport von frühen Endosomen und späten Endosomen (SE) zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN). Vti1a ist an weiteren, nicht abgebildeten Routen des unkonventionellen Transports beteiligt.

Vti1a wurde auch mit Syntaxin 5 (Qa), einem *cis*-Golgi SNARE co-immunpräzipitiert (Xu *et al.* 1998). Über colokalisations- und funktionelle siRNA-Studien wurde nachgewiesen, dass Vti1a in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen an einer unkonventionellen Transportroute vom ER zur Plasmamembran beteiligt ist (Flowerdew *et al.* 2009). Dabei fungiert VAMP-7 als R-SNARE.

Vti1a, Syntaxin 5 und VAMP-7 sind weiterhin in einem vollständigen SNARE-Komplex mit Rbet1 (Qc) isoliert worden (Siddiqi *et al.* 2006). Der von diesem Komplex vermittelte Transportschritt ist jedoch sehr speziell. In Enterozyten werden Triacylglyceride über ein einzigartiges Lipoprotein von 250 nm Durchmesser gebunden. Die Fusion von spezifischen Vesikeln, die dieses Lipoprotein vom ER zum Golgi transportieren, wird über den genannten Komplex katalysiert (Siddiqi *et al.* 2006).

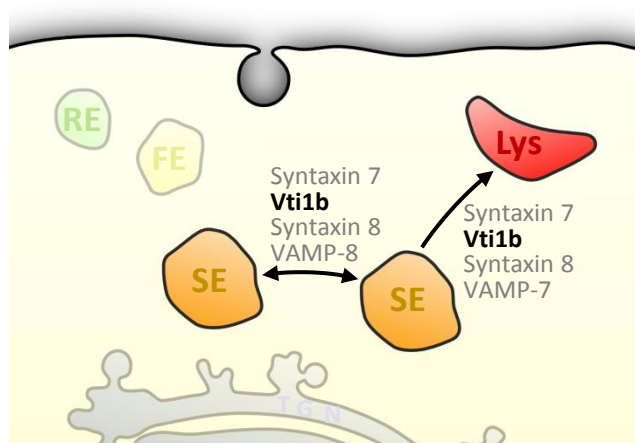
Weiterhin existiert von Vti1a eine hirnspezifische Spleißvariante, das Vti1a- $\beta$  (Antonin *et al.* 2000a). Die Variante unterscheidet sich über die zusätzliche Heptapeptidsequenz LIKLREE, die direkt N-terminal des SNARE-Motivs liegt. Im SNARE-Komplex liegt es mit Syntaxin 16 (Qa), Syntaxin 6 (Qc) und VAMP-4 (R) vor. Vti1a- $\beta$  lokalisiert in immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen auf Clathrin-beschichteten Vesikeln früher Endosomen. Es ist in Nervenendigungen zu finden und konnte in synaptischen Vesikeln angereichert werden. Co-Präzipitationsexperimente zeigten jedoch, dass Vti1a- $\beta$  nicht Teil des neuronalen, exozytotischen SNARE-Komplexes ist. Zusammengenommen spricht dies für die Möglichkeit, dass Vti1a- $\beta$  eine Funktion in der Recycling-Maschinerie in Synapsen hat (Antonin *et al.* 2000a).

### 1.5.2 Vti1b

Vti1b hat ein Molekulargewicht von 29 kDa und ist zu Vti1p 27 % homolog. Die Homologie zwischen Vti1a und Vti1b beträgt untereinander ebenfalls nur 30 % (Fischer von Mollard und Stevens 1998; Lupashin *et al.* 1997).

In immunfluoreszenzmikroskopischen und immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen war Vti1b, wie Vti1a, im TGN und auf endosomalen Strukturen zu finden. Diese erstreckten sich jedoch weiter in die Zellperipherie. Ein induzierter Zerfall des Golgi-Apparates durch Brefeldin A veränderte die Lokalisation von Vti1b nicht wesentlich. Dies ließ darauf schließen, dass Vti1a und Vti1b in unterschiedlichen Organellen lokalisiert sind (Kreykenbohm *et al.* 2002).

Funktionelle Daten bestätigten diese Vermutung. Antikörper gegen Vti1b hemmten die homotypische Fusion später Endosomen (Antonin *et al.* 2000b). Dabei vermittelt Vti1b diesen Fusionschritt im Komplex mit Syntaxin 7 (Qa), Syntaxin 8 (Qc) und VAMP-8 (R). Die Fusion später Endosomen mit Lysosomen wird vom gleichen Qabc-SNARE-Komplex geleistet, allerdings mit VAMP-7 als R-SNARE (Pryor *et al.* 2004).



**Abb. 1.6 Vti1b hat Funktionen im spätendosomal-lysosomalen Kompartiment**

Vti1b ist im gleichen Qabc-Komplex mit zwei unterschiedlichen R-SNAREs aktiv. Es vermittelt die homotypische Fusion später Endosomen, wie auch die Fusion später Endosomen mit dem lysosomalen Kompartiment.

In aktivierten Makrophagen wurde Vti1b über Co-Immunpräzipitation in einem weiteren Q-SNARE-Komplex nachgewiesen (Murray *et al.* 2005). Es vermittelt in diesen Zellen zusammen mit Syntaxin 7 (Qa), Syntaxin 6 (Qc) und VAMP-3 (R) die Fusion von Golgi-Vesikeln mit dem Recycling-Endosom (Murray *et al.* 2005a). In einem anschließenden, VAMP-3 abhängigen Schritt fusioniert das Recycling-Endosom mit der Plasmamembran und exozytiert auf diese Weise das Zytokin TNF $\alpha$ .

### 1.5.3 Muriner Knockout von *Vti1a* und *Vti1b*

Um die *in vivo* Funktionen von *Vti1a* und *Vti1b* näher zu untersuchen, wurden murine Knockout-Modelle erstellt. Dafür wurden Mauslinien hergestellt, in denen gezielt das für das SNARE-Motiv codierende Exon von entweder *Vti1a* oder *Vti1b* zerstört wurde (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung, Atlashkin *et al.* 2003).

#### 1.5.3.1 Einzeldefizienz von *Vti1a* oder *Vti1b*

*Vti1a* defiziente Mäuse erwiesen sich als lebensfähig, fertil und zeigten keinen auffälligen Phänotyp (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Ebenso sind *Vti1b* defiziente Mäuse fertil und lebensfähig (Athlaskin *et al.* 2003). Allerdings waren 20 % der defizienten Tiere kleiner und leichter als ihre Wurfgeschwister. *Vti1b* defiziente Hepatozyten zeigten eine verlangsamte lysosomale Degradation von Asialofetuin und teilweise Akkumulationen von multivesikulären Körpern und Autophagosomen. Dies ließ auf einen Defekt in der Reifung später Autophagosomen schließen. In allen Gewebekomponenten der *Vti1b* negativen Tiere war der Proteingehalt des *Vti1b*-Komplexparters Syntaxin 8 signifikant reduziert. Syntaxin 8 wird in *Vti1b* defizienten Zellen verstärkt lysosomal degradiert und somit im Umkehrschluss durch *Vti1b* stabilisiert (Athlaskin *et al.* 2003).

#### 1.5.3.2 Doppeldefizienz von *Vti1a* und *Vti1b*

Während der Verlust von *Vti1a* vom Organismus scheinbar vollständig kompensiert werden kann, ist die Kompensation der *Vti1b* Defizienz offensichtlich etwas weniger effektiv. Da die Deletion des funktionell einzigen Hefe-Homologen *VTII* als letal bekannt war, wurde angenommen dass *Vti1a* und *Vti1b* sich bei einer Einzeldefizienz möglicherweise gegenseitig ersetzen können (Fischer von Mollard *et al.* 1997; Fischer von Mollard, unveröffentlicht).

Um dies zu überprüfen, wurden Mäuse beider Linien gekreuzt. *Vti1a/Vti1b* doppeldefiziente Embryonen entwickelten sich entgegen der Erwartung bis zur Geburt weitgehend normal, starben aber perinatal. Dieser Befund bestätigte, dass *Vti1a* und *Vti1b* sich bei einzelner Defizienz gegenseitig ersetzen können. Er zeigt aber auch, dass in den meisten Geweben ein weiterer Mechanismus zur Kompensation beider SNAREs vorhanden sein muss (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

Eine nähere Untersuchung der Embryonen kurz vor der Geburt zeigte bei *Vt1a/Vt1b* doppeldefizienten Tieren einen interessanten Phänotyp. Im Gegensatz zu normal entwickelten doppelt heterozygoten *Vt1a<sup>+/-</sup>Vt1b<sup>+/-</sup>* und triallelen *Vt1a<sup>-/-</sup>Vt1b<sup>+/-</sup>* bzw. *Vt1a<sup>+/-</sup>Vt1b<sup>-/-</sup>* Embryonen wiesen sie zu diesem Zeitpunkt schwere Defekte in der neuronalen Entwicklung auf.

Das Gehirn war kleiner, zeigte vergrößerte Ventrikel und fehlende sowie verkürzte und fehlgeleitete axonale Bahnen. Im peripheren Nervensystem wurde ab dem 12. Tag der embryonalen Entwicklung eine schwere, progressive Neurodegeneration offensichtlich. Besonders solche Ganglien, die im Verlaufe ihrer Entwicklung längere Axone ausbilden, waren betroffen. Die Dorsalwurzelganglien waren an Tag 18,5 der embryonalen Entwicklung zu 98,4 % reduziert, Ganglion nodosum und Ganglion petrosus zu 96,2 % sowie Ganglion geniculi zu 96 % (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

Aufgrund der Tatsache, dass in den neuronalen Systemen besonders diejenigen vom Knockout betroffen sind, die längere Axone ausbilden, wurden mehrere Mechanismen für den Phänotyp diskutiert. Bei den Neuronen könnte der Transport entlang der anterograden Route zum Axon gestört sein, wodurch an der axonalen Wachstumszone benötigtes Material nur langsam transportiert würde. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein retrograder Defekt bei der Aquirierung neurotropher Wachstumsfaktoren vorliegt. Welcher Mechanismus der Wahrscheinlichste ist, bleibt offen (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Für den *Vt1a/Vt1b* Doppelknockout (DKO) war zu Beginn dieser Arbeit lediglich der neuronale Phänotyp beschrieben (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, wie sich die *Vt1a/Vt1b* Defizienz auf zellulärer Ebene auswirkt. Erste morphologische Studien an DKO mausembryonalen Fibroblasten (MEF) hatten keine wesentlichen Unterschiede zu Kontrollzellen aufgezeigt (Browski 2006). Daher galt es, weitere Marker zur Untersuchung der endosomalen Morphologie einzusetzen und das endosomale System der DKO MEF eingehend auf seine Funktion zu untersuchen.

Um ein weiteres Modellsystem der *Vt1a/Vt1b* Defizienz zu entwickeln, das eher dem neuronalen Phänotyp der Embryonen entspricht, sollten Kulturen DKO hippocampaler Neuronen präpariert und charakterisiert werden.

Auch sollte geklärt werden, ob DKO Embryonen neben der beschriebenen neuronalen Degeneration weitere phänotypische Besonderheiten zeigen.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborausstattung

Gerät	Hersteller
<u>Autoklaven</u>	
Webeco CS-Lab/IDK	WEBECO
Webeco Automat V	WEBECO
Biophotometer	Eppendorf AG
Durchflusszytometer FACScan	Becton-Dickinson
Eismaschine Ziegra B-100	Ziegra-Eismaschinen
Elektrophoresekammern	Mechanische Werkstatt Universität Bielefeld
<u>Elektrophorese-Netzgeräte</u>	
Biometra P25	Biometra
Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Netzteil 250 V / 0-0.1 A	Elektronische Werkstatt Universität Bielefeld
<u>Elektroporationsmaschinen</u>	
Electroporator 2510	Eppendorf AG
Amaya Nucleofector II	Lonza
Exfo X-Cite <sup>(R)</sup> 120 PC	Exfo
<u>Fluoreszenzmikroskope</u>	
Leica DM IRB	Leica Microsystems
Kamera: Leica DC 300 F	
Leica DM 5000B	Leica Microsystems
Kamera: Leica DFC 350 Fx	
Zeiss LSM 710	Zeiss
Fujifilm LAS 3000 ECL-Kamera	Fuji
Gasbrenner Gasprofi 2	WLD-Tec GmbH
Geldokumentationssystem	Peqlab
Heiztisch	Medax
HeraCell Inkubator	Heraeus Instruments
<u>Kühltruhen</u>	
Herafreeze HFC 7150 TOP	Heraeus Instruments
Herafreeze HFC 586 TOP	Heraeus Instruments
Laboport Vakuumpumpe	KNF Neuberger
LabStyle 3002 Laborwaage	Mettler Toledo

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Leica DMIL Lichtmikroskop	Leica Microsystems
Magnetrührer MR80	Heidolph
Millipore Destillationsanlage	Millipore Synergy UV
Mikroplattenleser Infinite M200	Tecan
<u>Pipetten</u>	
PIPETMAN 2/10/20/200/1000 µL	Gildon S.A.S.
Glaspipetten 5/10/20 mL	Hirschmann EM
Pasteur-Pipetten	Brand GmbH & Co KG
Präparationsbesteck	F.S.T.
Präzisionswaage	Sartorius
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik GmbH
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific
SevenMulti pH-Meter	Mettler Toledo
Stereolupe Discovery.V8	Zeiss
Kamera AxioCam MRc5	
<u>Sterilwerkbänke</u>	
Holten LaminAir HVR2448	Heto-Holten AIS
Heraeus Herasafe HS12	Kendro Laboratory Products
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab
Thermomixer 5436 Heizblock	Eppendorf AG
TriCarb 2800TR Szintillationszähler	Perkin Elmer
Ultraschallgerät 450	Branson
Vortex-Genie2, G-560	Scientific Industries Ind.
<u>Wasserbäder</u>	
Paratherm U4 electronic	Juchheim Labortechnik, Seelbach
Thermostat 2761	Eppendorf-AG
Memmert WB	Memmert
Westernblot-Kammern	Mechanische Werkstatt
<u>Zentrifugen</u>	
Biofuge 13 Tischzentrifuge	Heraeus Instruments
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf-AG
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf-AG
Rotor A-4-62	
Eppendorf Centrifuge 5804	Eppendorf-AG
Rotor A-4-44	
Sorvall RC-5B	DuPont Instruments
Rotor SS-34, Rotor SLA1500	

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	Menzel GmbH
Dialyseschläuche	Roth
Elektroporationsküvetten	Eppendorf AG
Eppendorfgefäße 1,5/2 mL	Eppendorf AG
Flüssigszintillationsgefäße	Zinsser Analytic
Gewebekulturflaschen und -platten	Greiner bio-one GmbH
Glasflaschen und -schalen, Bechergläser	Schott



<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Kryoröhrchen	Nunc
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one GmbH
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH
Omnifix Injektionsspritzen	Braun
Parafilm <sup>(R)</sup> M	Pechiney
PCR-Gefäße 200 µL	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co
Plastikröhrchen 10/15/50 mL	Greiner bio-one GmbH
Protran <sup>(R)</sup> Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schüll
Sterican Injektions-Kanülen	Carl Roth GmbH & Co
Sterilfilter	Sarstedt
Whatman Paper GB002	Schleicher und Schüll
Zellschaber	Sarstedt

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Verwendete Standard-Chemikalien, die hier nicht aufgelistet sind, wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich und Merck im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Alcianblau	Sigma Aldrich
Alizarinrot	Sigma Aldrich
B27 Medienzusatz 50x	Gibco
Bacto-Agar	DIFCO, U.S.A.
Bacto-Pepton	DIFCO, U.S.A.
Bacto-Trypton	DIFCO, U.S.A.
BD Matrigel <sup>TM</sup> Basement Membrane Matrix	BD Bioscience
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva, PAA
<sup>14</sup> C-L-Valin	Hartmann
DAKO <sup>(R)</sup> Mounting Medium	Carpinteria
Deferoxamin Mesylat	Sigma-Aldrich
Dextran, MW15000, FITC Konjugat	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Pulver	Gibco BRL
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fischer Scientific
E64D	Sigma
Ethidiumbromid	Serva
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA
Glutamax 100x	Gibco
Hefe-Extrakt	DIFCO, U.S.A.
Hoechst 33342, MW 615,99	Invitrogen
Immersionsöl für Mikroskopie	Leica
Krebs-Henseleit Puffer, 2g/L Glukose, Pulver	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Biomol
L-Glutamin 200 mM	Gibco BRL
Lumasafe Plus Szintillationscocktail	Lumac LSC
LysoTracker Red DND-99	Cambrex
3-Methyladenin	Sigma-Aldrich

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Substrate	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Lasana
Neurobasal-A	Gibco
Ölsäure	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	Biomol
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Serva
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Roth
Roti-Histokitt II	Roth
Rotiphorese Acryl/Bisacrylgemisch	Roth
SaeKem LE Agarose	Lonza
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nilrot	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
N2 Medienzusatz 100x	Gibco
Triton X-100	Roth
Trypsin, Pulver	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA)	Gibco BRL
Tween-20	Fluka

#### 2.1.4 Proteinkonjugate und Wachstumsfaktoren

<b>Protein/Faktor</b>	<b>Hersteller</b>
BSA, Alexa Fluor 488 Konjugat	Invitrogen
Epidermal Growth Factor (EGF)	Santa Cruz Biotechnology
EGF, Alexa Fluor 488 Konjugat	Molecular Probes
Holo-Transferrin, human	Sigma-Aldrich
Low Density Lipoprotein (LDL), BODIPY <sup>(R)</sup> Konjugat	Invitrogen
Neurotrophin-3 (NT-3)	Sigma-Aldrich
Streptavidin-Polymer, Peroxidasekonjugat	Roth
Transferrin, human, Biotinkonjugat	Sigma-Aldrich

#### 2.1.5 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Nr.</b>	<b>Spezies</b>	<b>WB</b>	<b>IF</b>	<b>Quelle</b>
$\alpha$ -Kaninchen 488/546		Ziege		1:400	Invitrogen
$\alpha$ -Kaninchen Cy2/3		Ziege		1:400	Dianova
$\alpha$ -Kaninchen HRP		Ziege	1:10000		Sigma
$\alpha$ -Maus 488/546		Ziege		1:400	Invitrogen
$\alpha$ -Maus Cy2/3		Ziege		1:400	Dianova
$\alpha$ -Maus HRP		Ziege	1:10000		Sigma
$\alpha$ -Ratte 488/546		Ziege		1:400	Invitrogen
$\alpha$ -Ratte Cy2/3		Ziege		1:400	Dianova
$\alpha$ -Ratte HRP		Ziege	1:10000		Sigma
Aktin		Kaninchen	1:10000	1:1000	Gonsior <i>et al.</i> , 1999

Antikörper	Nr.	Spezies	WB	IF	Quelle
β3-Tubulin		Kaninchen		1:1000	Promega
Caveolin-1		Kaninchen	1:5000	1:200	Transduction Lab
EEA1		Maus		1:400	Transduction Lab
EGF-Rezeptor		Kaninchen	1:300	1:250	Santa Cruz
GM130		Maus	1:800	1:400	Transduction Lab
L1	ASCS4	Maus		1:400	Hybridoma Bank
LAMP1	1D4B	Ratte	1:800	1:400	Hybridoma Bank
LAMP2	ABL93	Ratte	1:800	1:400	Hybridoma Bank
LC3	PD014	Kaninchen	1:1000		MBL
MAP2		Kaninchen	1:3000	1:1000	Abcam
MPR300	I-5	Kaninchen	1:500	1:300	Höning, Köln
MPR46	kII-5	Kaninchen		1:300	Höning, Köln
MPR46	MSCI	Kaninchen	1:500		Höning, Köln
p42/44 (Erk)		Kaninchen	1:1000		Cell Signaling
Phospho p42/44		Kaninchen	1:1000		Cell Signaling
Syntaxin 8	60	Kaninchen	1:1000	1:200	G. F. v. Mollard
Synaptobrevin		Maus	1:1000	1:400	Jahn, Göttingen
TGN38		Maus	1:800	1:400	Transduction Lab
Vti1a		Kaninchen	1:1000	1:400	G. F. v. Mollard
Vti1b		Kaninchen	1:3000	1:400	G. F. v. Mollard

### 2.1.6 Antibiotika, Enzyme, Nukleotide und Standards

Antibiotikum/Enzym/Nukleotid/Standard	Hersteller
1 kb DNA Ladder	Gibco
Ampicillin	Roth
Deoxynucleosid Triphosphate (dNTPs)	Roche
Kanamycin	Roth
Penicillin/Streptomycin 100x (10000 U/mL)	Lonza
Precision Plus Protein Standards All Blue	Sigma-Aldrich
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Roche, Bioline, Fermentas

### 2.1.7 Kits zur Arbeit mit DNA und Proteinen

Kit	Hersteller
Amaya Nukleofektion Kit K	Lonza
Coomassie Plus Bradford Protein Assay Reagent	Pierce
Lipofectamin LTX und PLUS Reagenz	Invitrogen
QIAEX <sup>(R)</sup> II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Plasmid Midiprep Kit	Qiagen
Supersignal West Pico Enhanced Chemilum. Reagenz	Pierce

### 2.1.8 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pMSSVLT	pMSE, Amp/Kana-Resistenz. Enthält SV40-Fragment mit <i>Large-T</i> und <i>Small-T</i> cDNA via <i>StuI</i> und <i>BamHI</i> .	Müller, IMT Marburg
pXT-1-GFP	pcDNA3.1, Amp-Resistenz. Enthält Xylosyltransferase I mit C-term. GFP via <i>BstXI</i> und <i>XbaI</i> .	S. Schön, K. Kleesiek
Rab4-EGFP	pEGFP-C3, Kana-Resistenz. Enthält humanes Rab4a via <i>XhoI</i> und <i>HindIII</i>	M. Zerial
Rab7-CFP	pEGFP-C3, Kana-Resistenz. Enthält Rab7 via <i>XhoI</i> und <i>KpnI</i> .	S. Pfeffer
Rab9-CFP	pEGFP-C1, Kana-Resistenz. Enthält Rab9 via <i>SalI</i> und <i>BamHI</i> .	D. Chowdry
Rab11-YFP	pEYFP-C1, Kana-Resistenz. Enthält Rab9 via <i>SalI</i> und <i>BamHI</i> .	D. Chowdry

### 2.1.9 Primer zur Genotypisierung

Primer	Ziel	Sequenz
Ak32	Neo-Kassette	CCTGCGTGCAATCCATCTTG
Xho	<i>Vt1a</i> -KO	GCAAATAAGCTCCCAATTGTCTC
ASalC	<i>Vt1a</i> -WT	ATGAACTGTCTGCTAAAATTTAAC
Seq6	<i>Vt1b</i> -KO	TACCAATTTGATCAGTTTCTGTGG
Seq7	<i>Vt1b</i> -WT	ATACCTTCTCCTGGCATCCATG

### 2.1.10 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Quelle
DH5- $\alpha$	<i>E. coli</i> supE44 thi-1 recA1 hsdR17(rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ) thi-1 $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) endA1 gyrA (NaI <sup>r</sup> ).	Gibco BRL

### 2.1.11 Mauslinien

Bezeichnung	Genotyp	Hintergrund	Referenz
Vt1a/Vt1b	<i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1a</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup>	Gemischt C57BL/6 und 129/SvJ	G.F.v. Mollard
Vt1a/b BL6	<i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1a</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup>	C57BL/6 durch Rückkreuzung	G.F.v. Mollard

### 2.1.12 Mausembryonale Fibroblastenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Mauslinie	Immortalisierung	Referenz
DHET E3	<i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup>	Vt1a/Vt1b	Passage	N. Kanwar
DKO E1	<i>Vt1a</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>-/-</sup>	Vt1a/Vt1b	Passage	N. Kanwar
a <sup>+/-</sup> b <sup>-/-</sup> E2	<i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>-/-</sup>	Vt1a/Vt1b	Passage	N. Kanwar
a <sup>-/-</sup> b <sup>+/-</sup> E5	<i>Vt1a</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup>	Vt1a/Vt1b	Passage	N. Kanwar
DHET T3	<i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup>	Vt1a/Vt1b	pMSSVLT	S. Browski
DKO T1	<i>Vt1a</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>-/-</sup>	Vt1a/Vt1b	pMSSVLT	S. Browski
a <sup>+/-</sup> b <sup>-/-</sup> T2	<i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>-/-</sup>	Vt1a/Vt1b	pMSSVLT	S. Browski
a <sup>-/-</sup> b <sup>+/-</sup> T5	<i>Vt1a</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup>	Vt1a/Vt1b	pMSSVLT	S. Browski
DHET TBL6-2	<i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup>	Vt1a/b BL6	pMSSVLT	Diese Arbeit
DKO TBL6-4	<i>Vt1a</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>-/-</sup>	Vt1a/b BL6	pMSSVLT	Diese Arbeit
a <sup>+/-</sup> b <sup>-/-</sup> TBL6-1	<i>Vt1a</i> <sup>+/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>-/-</sup>	Vt1a/b BL6	pMSSVLT	Diese Arbeit
a <sup>-/-</sup> b <sup>+/-</sup> TBL6-5	<i>Vt1a</i> <sup>-/-</sup> <i>Vt1b</i> <sup>+/-</sup>	Vt1a/b BL6	pMSSVLT	Diese Arbeit

### 2.1.13 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB) Medium Autoklavieren Lagerung bei 4 °C	1 g/L Glukose 5 g/L Bacto-Hefeextrakt 5 g/L NaCl 10 g/L Bacto-Trypton mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH 7,0 einstellen. Ggf. nach Autoklavieren Selektionsantibiotika zugeben (100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin).
LB Agar Autoklavieren Lagerung bei 4 °C	Zusammensetzung wie LB Medium, jedoch mit 1,5 % Agar. Nach Erhitzen des LB-Agars bis zur Verflüssigung und Abkühlen auf ca. 60 °C wurde der LB-Agar steril in 10 cm Petrischalen gegossen erstarren gelassen.
SOC Medium Autoklavieren Lagerung bei 4 °C	2 g Bacto-Trypton 0,5 g Bacto-Hefe-Extrakt 60 mg NaCl 10 mg KCl 200 mg MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O mit ddH <sub>2</sub> O auf 200 mL auffüllen.

### 2.1.14 Medien und Lösungen für die Zellkultur

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DMEM Steril filtrieren Lagerung bei 4 °C	13,38 g/L DMEM Pulver 3,4 g/L NaHCO <sub>3</sub> 8 mL/L 1 M HCl 0,1 g/L Phenolrot pH auf 7,4 einstellen.
DMEM BSA Lagerung bei 4 °C	5 % (v/v) L-Glutamin (200 mM) 5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100x 10 g/L BSA in DMEM.
DMEM Kryokonservierung Lagerung bei -20 °C	10 % (v/v) FKS 10 % (v/v) DMSO in DMEM Vollmedium.
DMEM Vollmedium Lagerung bei 4 °C	5 % (v/v) L-Glutamin (200 mM) 5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100x 10 % (v/v) FKS in DMEM.
Neurobasal-A Vollmedium Lagerung dunkel bei 4 °C	2 mL B27 50x 1 mL Glutamax 100x 2 mL FKS 200 U/mL Penicillin/Streptomycin mit Neurobasal-A auf 100 mL auffüllen, innerhalb einer Woche verbrauchen.
Neurobasal-A-N2 Lagerung dunkel bei 4 °C	1 mL N2 100x 1 mL Glutamax 100x 200 U/mL Penicillin/Streptomycin mit Neurobasal-A auf 100 mL auffüllen, innerhalb einer Woche verbrauchen.
Krebs-Henseleit Puffer Sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C	9,55 g/L Krebs-Henseleit Puffer, Pulver 373 mg/L CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O 2,1 g/L NaHCO <sub>3</sub> mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH auf 7,4 einstellen.
PBS für Zellkultur Autoklavieren Lagerung bei 4 °C	136 mM NaCl 2,5 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,002 % Phenolrot pH auf 7,4 einstellen.
Präparations-Puffer Sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C	818,2 mg NaCl 37,2 mg KCl 20 µL 1 M CaCl <sub>2</sub> 119,2 mg HEPES 198 mg Glukose 25 U Penicillin/Streptomycin in ddH <sub>2</sub> O lösen, pH auf 7,3 einstellen und auf 100 mL auffüllen.

### 2.1.15 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Bouin-Fixans	35,7 mL gesättigte Pikrinsäure 12 mL Formalin (40 %ig) 2,4 mL Eisessig jeweils frisch ansetzen.
DNA-Ladepuffer 6x	0,15 % (w/v) Bromphenolblau 0,15 % (w/v) Xylencyanol FF 40 % (w/v) Saccharose in TAE lösen.
0,5 M EDTA	14,61 g Ethylendiamintetraacetat (Titrplex III) in ddH <sub>2</sub> O lösen, pH 8,0 mit NaOH einstellen, auf 1 L auffüllen.
EDTA-NaOH	20 g Ethylendiamintetraacetat (Titrplex III) in 80 mL ddH <sub>2</sub> O unter rühren erhitzen NaOH zugeben, bis EDTA gelöst ist pH auf 7,4 einstellen.
Färbelösung	5 mL 0,3 % filtriertes Alcianblau 8GS in 75 % Ethanol 5 mL 0,1 % filtriertes Alizarinrot S in 95 % Ethanol 5 mL Eisessig 85 mL 70 % Ethanol
Hoechst 1000x	100 mg/mL Hoechst 33342 in ddH <sub>2</sub> O.
10x PBS Autoklavieren	87,7 g NaCl 28,28 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,52 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in ddH <sub>2</sub> O lösen, pH 7,4 einstellen, auf 1 L auffüllen.
PBS-T	0,1 % (v/v) Tween-20 <sup>(R)</sup> in PBS lösen.
Proteinaseinhibitor-Mix 100x	50 µL 100 mM PMSF (17,4 mg/mL in Ethanol) 10 µL Pepstatin 39 µL Methanol 1 µL Leupeptin jeweils frisch ansetzen, innerhalb 1 h verwenden.
Proteinase K Lösung Sterilfiltrieren	200 mM NaCl 20 mM Tris pH 8,0 5 mM EDTA 0,02 % Tween-20 <sup>(R)</sup> 2 mg/mL Proteinase K jeweils frisch zugeben.
10 % SDS	10 g Natriumdodecylsulfat in 100 mL ddH <sub>2</sub> O lösen.
10x SDS Laufpuffer	10 g/L SDS 30,2 g/L Tris 144 g/L Glycin in ddH <sub>2</sub> O.
10x <i>Semi-Dry</i> Puffer	5,8 g/L Tris 2,92 g/L Glycin 3,7 mL/L 10 % SDS mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH 9,2 mit NaOH.

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>Semi-Dry</i> Puffer	20 mL 10x <i>Semi-Dry</i> Puffer 50 mL Methanol mit ddH <sub>2</sub> O auf 200 mL auffüllen.
3x Stop Puffer	1 Spatelspitze Bromphenolblau 15 g Saccharose 4,5 g SDS 18,8 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8 26,2 mL ddH <sub>2</sub> O vor Verwendung 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol hinzufügen.
50x TAE	242 g Tris 37 g Na <sub>2</sub> EDTA (Titriplex III) 57 mL Essigsäure mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen.
TE	10 mM Tris-HCl pH 7,5 50 mM EDTA aus 0,5 M EDTA
1 M Tris-HCl	12,11 g Tris in ddH <sub>2</sub> O lösen, pH mit HCl einstellen, auf 100 mL auffüllen.

### 2.1.16 Programme und Internetseiten

<b>Programm/Internetseite</b>	<b>Zweck</b>
Adobe Photoshop (Adobe Systems)	Bildbearbeitung
Aida 4.06.117 (Fuji)	LAS-Steuerung
AxioVision 4.6 (Zeiss)	Stereomikroskop
CellQuest Pro 4.0.2 (Becton Dickinson)	FACS-Steuerung und Auswertung
Citavi 2.5 (Swiss Academic Software)	Literaturverwaltung
E-capture (Vilber Lourmat)	Geldokumentationssystem
<a href="http://scholar.google.de/">http://scholar.google.de/</a>	Literatursuche
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/">http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/</a>	Pubmed Literatursuche
i-Control 1.4 (Tecan)	Mikroplattenleser
Inkscape 0.46 ( <a href="http://www.inkscape.org">www.inkscape.org</a> )	Grafikerstellung
ImageJ 1.42q (NIH, <a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/">http://rsb.info.nih.gov/ij/</a> )	Bildbearbeitung/Auswertung
Leica Application Suite 1.8.0 (Leica)	Fluoreszenzmikroskop
MS Office 2007	Textbearbeitung/Tabellenkalkulation und Grafikerstellung
Quantasart 2.0 (PerkinElmer)	Szintillationszähler



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden zur Behandlung prokaryotischer Zellen

#### 2.2.1.1 Kultivierung prokaryotischer Zellen

Prokaryontische Zellen wurden in LB-Medium als Flüssigkulturen oder auf LB-Agar-Platten kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Inkubator (LB-Agar Platten) bis zur gewünschten Koloniengröße oder im Schüttler (Flüssigkulturen) bis zur gewünschten OD<sub>600</sub>.

##### 2.2.1.1.1 Kryokonservierung prokaryontischer Zellen

Zur Kryokonservierung wurde der jeweilige Stamm zunächst auf einer LB-Agar Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und ü.N. kultiviert. Von den frisch gewachsenen Bakterien wurde eine stecknadelkopfgroße Menge mit einem Zahnstocher in 1 mL 7 % (v/v) DMSO-Lösung transferiert und umgehend bei -80 °C gelagert.

##### 2.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Eine kleine Menge *E. coli* wurde in 10 mL LB-Medium gelöst und ü.N. kultiviert. Diese Vorkultur wurde vollständig in 1 L LB-Medium überführt und 2 h bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 - 0,35 kultiviert. Die Kultur wurde 20 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 5000 rpm und 4 °C im Rotor SLA 1500 abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 L kaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und wie zuvor abzentrifugiert. Das Pellet wurde nacheinander in 0,5 L kaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst, wiederum abzentrifugiert und in 20 mL kaltem, sterilem 10 %igen Glycerol resuspendiert. Die Lösung wurde in 40 µL Aliquots aufgeteilt und umgehend auf Trockeneis gelagert. Die endgültige Lagerung erfolgte bei -80 °C.

##### 2.2.1.3 Transformation von *E. coli* mit plasmidischer DNA

Elektroporationsküvetten wurden mit 70 %igem Ethanol gereinigt, mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und 30 min unter UV-Licht entkeimt. 40 µL elektrokompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, schnell mit 0,1 µg Plasmid versetzt und gemischt. Die Mischung wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben, bei 1800 V elektroporiert und mit 500 µL SOC-Medium versetzt. Nach 30 – 60 min Inkubation im Wasserbad bei 37 °C wurden 50 µL und 450 µL der Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und ü.N. kultiviert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Präparation plasmidischer DNA aus *E. coli*

Zur Präparation analytischer Mengen plasmidischer DNA wurden entsprechende kryokonservierte oder bei 4 °C auf LB-Agar gelagerte *E. coli* Stämme in 3 mL LB-Medium angeimpft und ü.N. kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde 1 min bei 15000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die plasmidische DNA mit dem QIAprep Spin MiniPrep Kit extrahiert (Qiagen, Handbuch 2006).

Die Präparation präparativer Mengen plasmidischer DNA oder plasmidischer DNA zur Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte analog mit dem QIAfilter Plasmid Midiprep Kit (Qiagen, Handbuch 2005). Die *E. coli* Stämme wurden dafür in entsprechend größeren Mengen von 25 – 50 mL LB-Medium angeimpft.

Die Lagerung der Plasmide erfolgte für bis zu 4 Wochen bei 4 °C, für längere Zeiträume bei -20 °C.

### 2.2.2.2 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheitsgrad

1 µL der DNA-Lösung wurden mit dem NanoDrop ND-1000 analysiert. Die DNA-Konzentration wird automatisch über die Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Eine Absorption von 1 entspricht im linearen Bereich empirisch etwa 50 µg/mL dsDNA. Die Bestimmung des Reinheitsgrades erfolgte über die zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm Wellenlänge. Der Quotient aus  $Abs_{260}/Abs_{280}$  gibt den Reinheitsgrad der DNA wieder und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.2.2.3 Enzymatische Restriktion von DNA

Analytische Restriktionen erfolgten jeweils von 1 µL isolierter, plasmidischer DNA. Diese wurden in 200 µL PCR-Gefäßen zu folgendem Restriktionsmix gegeben:

Volumen	Komponente
1 µL	10x Enzypuffer
1 µL	10x BSA (sofern benötigt)
0,1 µL	Restriktionsenzym A
0,1 µL	Restriktionsenzym B
7,8 µL	ddH <sub>2</sub> O

Der Ansatz wurde für 1 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 2 µL 6x DNA Ladepuffer vermischt per Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

#### 2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA wurde eine entsprechende Menge Agarose (1 % (w/v) für 1 kb bis 10 kb große Fragmente, 2,5 % für Fragmente von 50 bp bis 500 bp) durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde das Gel 1:10000 mit Ethidiumbromid versetzt, in eine Elektrophoresekammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt, der Kamm aus dem Gel entfernt und die vorbereiteten DNA-Proben und ein entsprechender Marker aufgetragen. Nach Anlegen einer je nach Gelgröße variierenden Spannung von 60 V bis 100 V wurde die Elektrophorese durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers (bei 400 bp) ca.  $\frac{3}{4}$  der Laufstrecke des Gels erreicht hatte. Die DNA-Banden wurden auf dem UV-Transilluminator des Geldokumentationssystems sichtbar gemacht und dokumentiert.

#### 2.2.2.5 Isolation von DNA aus Mausgewebe zur Genotypisierung

Wenige mg Gewebe (z.B. 2 – 3 mm Schwanzspitze) wurden ü.N. bei 55 °C und 700 rpm in 200 µL Proteinase K Lösung geschüttelt. Die Proben wurden 10 min bei 18000 x g zentrifugiert, 45 µL des Überstands mit 5 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C.

#### 2.2.2.6 Bestimmung des Vti1a/Vti1b Genotyps per PCR

Die Bestimmung des Vti1a/Vti1b Genotyps erfolgte über die Polymerasekettenreaktion (PCR) Technik. Dafür wurde 1 µL nach 2.2.2.5 vorbereiteter Probe zum PCR-Reaktionsmix gegeben. Es wurden jeweils für Vti1a und Vti1b die DNA für Wildtyp und Knockout in einem Ansatz gleichzeitig amplifiziert. Beispiel für PCR mit peQGOLD PCR-Master-Mix Y System (Peqlab):

Vti1a	Vti1b	Komponente
7,5 µL	7,5 µL	Mastermix Y
6,4 µL	6,4 µL	H <sub>2</sub> O
0,3 µL	0,3 µL	Primer Ak32
--	0,3 µL	Primer Xho
--	0,3 µL	Primer ASalC
0,3 µL	--	Primer Seq6
0,3 µL	--	Primer Seq7

Die Primer wurden in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt. Die PCR erfolgte mit 35 Zyklen bei einer Elongationszeit von 30 s und einer *Annealing*-Temperatur von 51,5 °C. Von den Proben wurden 8 µL mit 2 µL 6x DNA Probenpuffer versetzt und zur Analyse auf ein 2 %iges Agarosegel geladen. Die erwarteten Fragmentgrößen sind für *Vti1a* Wildtyp

370 bp, *Vt1a* Knockout 530 bp, *Vt1b* Wildtyp 510 bp und *Vt1b* Knockout 410 bp.

## 2.2.3 Zellbiologische und Zellkulturtechnische Methoden

### 2.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, vor Benutzung auf 37 °C aufgewärmt. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 2.2.3.2 Trypsinieren und Passage adhärenter Zellen

Zur Ablösung des adhärenen Zellrasens wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und anschließend so viel vorgewärmtes Trypsin-EDTA zugegeben, dass die Zellen damit bedeckt waren. Sobald ein Ablösen des Zellrasens nach Schwenken des Kulturgefäßes sichtbar war, wurde zum Abstoppen des Trypsins DMEM Vollmedium im Überschuss zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt.

Für eine einfache Passage wurden die Zellen in der Regel 1:4 – 1:10 geteilt und in neuem Vollmedium ausgesät. Empfindlichere Zellen oder Zellen, die sofort im Anschluss für weitere Experimente verwendet werden sollten, wurden nach Vereinzlung 5 min bei 200 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und neues Medium zugegeben.

### 2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl von Zellsuspensionen z.B. nach dem Trypsinieren wurden 10 µL der vereinzelt Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Es wurden 4 Großquadrate ausgezählt und das Ergebnis gemittelt. Die Zellzahl pro mL ergab sich durch Multiplikation mit dem Faktor 10<sup>4</sup>.

### 2.2.3.4 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Adhärenente Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, anschließend trypsiniert, in eiskaltem PBS aufgenommen und bei 200 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in eiskaltem Kryokonservierungsmedium vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1 mL Aliquots in vorgekühlte Kryoröhrchen gegeben, für 30 min bei -20 °C belassen, dann ü.N. auf -80 °C gekühlt und schließlich bei -150 °C konserviert. Die Zellzahl wurde zuvor durch Zählen in der Neubauerkammer auf 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL eingestellt oder alternativ die Zellen einer konfluenten 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche auf 4 mL Kryokonservierungsmedium aufgeteilt.

### **2.2.3.5 Revitalisierung kryokonservierter eukaryotischer Zellen**

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut bis nur noch ein kleiner Rest gefroren vorlag. 0,5 mL warmes Vollmedium wurden zugegeben, die Suspension in einer 5 mL Glaspipette vorsichtig gemischt und in ein Falcon-Röhrchen mit 10 mL vorgelegtem, warmem Vollmedium überführt. Die Zellen wurden bei 200 x g für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 mL Vollmedium resuspendiert. Nach Kultivierung für 4 h oder ü.N. wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um Reste von DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen.

### **2.2.3.6 Transfektion von Plasmiden in eukaryotische Zellen**

#### **2.2.3.6.1 Nukleofektion mittels Amaxa**

Die Nukleofektion wurde nach Herstellerprotokoll (Amaxa Handbuch, Lonza 2009) durchgeführt. In Kürze: Adhärente Zellen wurden trypsiniert und in Portionen zu  $1 - 1,5 \times 10^6$  Zellen pelletiert. Die Pellets wurden in 100 µL Transfektionsreagenz L aufgenommen und mit Programm L1 im Nucleofector II transfiziert. Transfizierte Zellen wurden in Vollmedium aufgenommen und je nach Verwendung portioniert kultiviert.

#### **2.2.3.6.2 Transfektion mittels Lipofectamin LTX**

Zur Lipofektion mit Lipofectamin wurde nach Herstellerangaben verfahren (Lipofectamin Handbuch, Invitrogen 2008). In Kürze: Für die Transfektion eines *Wells* einer 24-Well-Schale wurden die Zellen am Tag zuvor so ausgesät, dass sie ca. 50 % - 70 % konfluent waren. 750 ng aufgereinigte DNA wurden in 100 µL serumfreies DMEM gegeben, gevortext, 0,75 µL PLUS Reagenz zugefügt und vorsichtig gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 1,5 µL Lipofectamin hinzugegeben, nochmals gevortext und 30 min bei RT inkubiert. Bei den zu transfizierenden Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, dann der Lipofectamin-DNA-Mix hinzugegeben. Nach 4 h – 6 h Inkubation erfolgte ein erneuter Mediumwechsel.

### **2.2.3.7 Herstellung mausembryonaler Fibroblasten**

Eine trächtige Maus wurde am Tag 12,5 der embryonalen Entwicklung durch cervicale Dislokation getötet, bäuchlings geöffnet und die Uterushörner entnommen. Die Embryonen wurden nach Isolation aus Uterus- und Amnionhülle mit sterilem PBS gewaschen, Kopf und innere Organe entfernt und jeweils in eine Schale mit 5 mL vorgewärmtem Trypsin-EDTA überführt. Nach Zerkleinerung der Embryonen mit einer Schere wurde die Suspension in je einen Schikanekolben überführt. Nach 15 min Schütteln bei 37 °C im Wasserbad wurden 5 mL DMEM Vollmedium zugegeben, die Suspension in ein Falconröhrchen überführt und durch Auf- und Abpipettieren mit einer Glaspipette

vereinzelt. Die Zellen wurden bei 200 x g für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 5 mL DMEM Vollmedium aufgenommen und in einer 6 cm Schale kultiviert.

### **2.2.3.8 Herstellung mausembryonaler hippocampaler Neuronen**

Eine trächtige Maus wurde am Tag 18,5 der embryonalen Entwicklung durch cervicale Dislokation getötet und die Uterushörner entnommen. Die Embryonen wurden daraus isoliert und bis zur zeitnahen Präparation in eine feuchte, warme Schale gelegt. Zur Präparation wurde je einem Embryo der Kopf abgeschnitten, die Schädeldecke geöffnet und mit einem kleinen Löffelspatel vorsichtig das Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde in eine 3 cm Schale mit eiskalter Präparationslösung gelegt und unter dem Stereomikroskop die rechte und linke Hemisphäre isoliert. Aus den Hemisphären wurde jeweils der Hippocampus herausgeschnitten und von umliegendem Gewebe und Hirnhaut befreit. Die Hippocampi wurden bis zur Präparation des letzten Embryos in 0,5 mL eiskalter Präparationslösung gelagert. Nach Zugabe von 0,5 mL Präparationslösung mit 1 mg/mL Trypsin wurden die Hippocampi 5 – 7 min bei RT inkubiert und anschließend 3 x mit je 0,5 mL Neurobasal-A Vollmedium gewaschen. Zur Vereinzelung der Zellen wurden sie in 1 mL Neurobasal-A Vollmedium aufgenommen und mit silikonbeschichteten Glaspipetten, deren Öffnung über einer Flamme abgerundet und verkleinert wurde, auf- und abpipettiert. Die Zellsuspension wurde auf 16 *Wells* einer 24-*Well*-Schale mit PLL-beschichteten Deckgläsern aufgeteilt. Nach Sedimentation für 30 – 60 min wurden je *Well* 0,5 mL Neurobasal-A Vollmedium zugegeben und ü.N. kultiviert. Am Folgetag wurden je 0,5 mL Neurobasal-A Medium ohne FKS zugegeben (FKS-Endkonzentration 1 %). Eine Transfektion erfolgte maximal 4 d bis 6 d nach der Präparation.

### **2.2.3.9 Immortalisierung mausembryonaler Fibroblasten**

#### **2.2.3.9.1 Immortalisierung durch Passage**

Isolierte mausembryonale Fibroblasten (MEF) wurden in 15 cm Schalen wiederholt passagiert, bis sie in eine Wachstumskrise eintraten (ca. Passage 12 – 14). In weiteren ca. 5 – 10 Passagen, in denen die Zellen nur sehr langsam die Konfluenz erreichten, wurde auf Zellen selektioniert, die durch zufällige Veränderungen ihres Genoms immortal waren. Nach Eintreten der Zellen in eine Phase gleichmäßigen, starken Wachstums wurden sie in Kulturschalen vermehrt und kryokonserviert.

#### **2.2.3.9.2 Immortalisierung durch das Large-T Antigen**

Eine weniger zeitaufwändige Methode zur Immortalisierung von MEF ist die Transfektion der Zellen mit Onkogenen wie dem *Large-T* Antigen des Simianvirus 40. Die cDNA des *large-T* Antigens ist im Vektor pMSSVLT enthalten und codiert für ein Protein, das durch

Beeinflussung des Retinoblastoma- und p53 Tumor-Suppressor-Proteins die natürliche Zellteilungsrestriktion ausschaltet (Schuermann 1990; Sáenz-Robles et al. 2001).

Zur Immortalisierung durch das *Large-T* Antigen wurde der Vektor pMSSVLT beim Erreichen der Wachstumskrise per Amaxa-System in die entsprechenden Zelllinien transfiziert. Nach 2 – 3 Passagen wurde ein gegenüber untransfizierten Kontrollzellen starkes Wachstum als Zeichen für eine erfolgreiche Immortalisierung gewertet, die Zellen vermehrt und kryokonserviert.

#### **2.2.3.10 PLL-Beschichtung von Deckgläsern**

500 – 1000 Deckgläser wurden in einem Becherglas 24 h in 1 N HCl geschüttelt, mehrmals mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend ü.N. in Aceton geschüttelt. Die Deckgläser wurden nochmals tagsüber in frischem Aceton geschüttelt, dann ü.N. in 70 % Ethanol. Nach 4 – 6 x 5 min schwenken in ddH<sub>2</sub>O wurden die Deckgläser ü.N. in 1 mg/mL Poly-L-Lysin (PLL) in PBS geschwenkt. Abschließend wurden die Deckgläser auf Alufolie unter der Sterilbank vereinzelt und 2 – 4 h mit UV-Licht sterilisiert. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung in einem sterilen Falcon-Röhrchen.

#### **2.2.3.11 Fixierung adhärenter Zellen auf Deckgläsern**

##### **2.2.3.11.1 Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol**

Adhärenent wachsende Zellen wurden bis zur gewünschten Konfluenz auf Deckgläsern kultiviert, 1 x kurz mit PBS gespült und dann auf Eis für 30 s mit -20 °C kaltem Methanol bedeckt. Das Methanol wurde abgesaugt und die Zellen sofort mit PBS überschichtet. Sofern die Zellen nicht für eine Immunfärbung bestimmt waren, wurden die Deckgläser weitere 2 x mit PBS gewaschen, 1 x kurz in ddH<sub>2</sub>O getaucht, abgetropft und mit Dakofluor *Mounting* Medium mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt. Die Aushärtung des *Mounting* Mediums erfolgte ü.N. im Dunkeln bei RT.

##### **2.2.3.11.2 Fixierung und Permeabilisierung mit PFA**

Adhärenent wachsende Zellen wurden bis zur gewünschten Konfluenz auf Deckgläsern kultiviert, 1 x kurz mit PBS gespült und dann mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 15 min inkubiert. Anschließend wurden sie 2 x kurz mit PBS gespült und zur Deaktivierung des PFAs für 5 min mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS überschichtet. Sofern die Zellen für eine Immunfärbung bestimmt waren, wurden die Deckgläser zur Permeabilisierung 10 min mit 0,02 % Triton X-100 behandelt. Wenn nicht, wurden sie 2 x mit PBS gespült, 1 x in ddH<sub>2</sub>O getaucht, abgetropft und mit Dakofluor *Mounting* Medium mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt. Die Aushärtung des *Mounting* Mediums erfolgte ü.N. im Dunkeln bei RT.

### 2.2.3.12 Indirekte Immunfärbung von fixierten Zellen

Fixierte und permeabilisierte Zellen wurden zur Immunfärbung zunächst 45 min mit 1 % BSA in PBS geblockt. Der erste Antikörper wurde in 1 % BSA in PBS verdünnt und vorsichtig so auf das Deckglas getropft, dass die Lösung alle Zellen bedeckte. Die Inkubation erfolgte für 1 – 2 h in einer feuchten, dunklen Kammer. Nicht gebundener 1. Antikörper wurde durch 3 x 5 min waschen mit PBS entfernt und wiederum unspezifische Bindestellen durch Inkubation mit 5 % Ziegen Serum für 20 min blockiert. Der 2. Antikörper wurde analog zum 1. Antikörper verdünnt, aufgetragen und für 1 h in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Die Deckgläser wurden im Anschluss 4 x 5 min mit PBS gewaschen, 1 x in ddH<sub>2</sub>O getaucht, abgetropft und mit Dakofluor *Mounting* Medium mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger gelegt. Die Aushärtung des *Mounting* Mediums erfolgte ü.N. im Dunkeln bei RT.

### 2.2.3.13 Färbung des Zellkerns mit HOECHST

Zur Anfärbung des Zellkerns für Fluoreszenzmikroskopie wurden auf Deckgläsern fixierte Zellen vor dem finalen Waschschrift mit einer 1:1000 in PBS verdünnten HOECHST-Stammlösung für 5 min inkubiert.

### 2.2.3.14 Färbung der Lysosomen mit LysoTracker

Zur Anfärbung azider Zellkompartimente wurden die Zellen bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert, das Medium abgenommen und durch DMEM-Vollmedium mit 50 nM LysoTracker ersetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min im Inkubator unter Standardbedingungen; die Zellen wurden dann mit PFA fixiert und auf Objektträger aufgebracht.

### 2.2.3.15 Färbung von Lipidtropfen mit Nilrot

Nilrot ist ein lipophiles, fluoreszierendes Reagenz, das zur Färbung intrazellulärer Lipidakkumulationen genutzt werden kann. Zur Induktion einer vermehrten Bildung von Lipidtropfen wurden Zellen bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert und dann für die angegebenen Zeiträume unter Standardbedingungen mit DMEM Vollmedium mit 600 µM Ölsäure inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen PFA-fixiert, aber nicht permeabilisiert und mit einer 1:1000 Verdünnung der Nilrot-Lösung (0.5 mg/mL in Aceton, Lagerung bei -20 °C) in PBS für 5 min bei RT inkubiert. Die Deckgläser wurden im Anschluss 5 x 5 min mit PBS gewaschen, 1 x in ddH<sub>2</sub>O getaucht, abgetropft und mit Dakofluor *Mounting* Medium auf Objektträgern fixiert. Die Aushärtung des *Mounting* Mediums erfolgte ü.N. im Dunkeln bei RT.



### 2.2.3.16 Endozytose von fluoreszenzmarkiertem Dextran

Zellen wurden in einer 4-Well-Schale auf Deckgläsern bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % inkubiert, 2 x mit PBS gewaschen und je Well 200 µL vorgewärmtes DMEM BSA mit 2 mg/mL Dextran-FITC (Molekulargewicht von 15000 kDa) zugeben. Es folgte für 30 min eine Inkubation bei 37 °C unter Standardbedingungen, dann ein Wechsel auf DMEM Vollmedium. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Standardbedingungen für die angegebenen Zeiten inkubiert, danach 1 x schnell mit PBS gespült und umgehend mit PFA fixiert. Dann wurden die Deckgläser 3 x mit PBS, 1 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Dakofluor *Mounting* Medium auf Objektträger gebracht. Die Aushärtung des *Mounting* Mediums erfolgte ü.N. im Dunkeln bei RT.

### 2.2.3.17 Endozytose von fluoreszenzmarkiertem Transferrin

Zellen wurden auf in einer 4-Well-Schale auf Deckgläsern bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % inkubiert, 2 x mit PBS gewaschen und 1 h in DMEM BSA ausgehungert. Die Zellkulturschale wurde auf Eis gesetzt, das Medium entfernt und je Well 150 µL eiskaltes DMEM BSA mit 50 µg/mL Transferrin-Alexa546 zugegeben. Es folgte für 30 min eine Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, warmes DMEM Vollmedium zugegeben und für die angegebenen Zeiten bei 37 °C im Inkubator unter Standardbedingungen auf vorgewärmten Metallblöcken inkubiert. Danach wurde 1 x schnell mit PBS gespült, die Zellen umgehend mit PFA fixiert, 3 x mit PBS, 1 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Dakofluor *Mounting* Medium auf Objektträger gebracht.

### 2.2.3.18 Endozytose von fluoreszenzmarkiertem Cholera toxin, LDL oder EGF

Zellen wurden auf Deckgläsern bis zu 80 %iger Konfluenz inkubiert, 2 x mit PBS gewaschen und 2 h mit DMEM BSA ausgehungert. Im Anschluss wurden die Zellen auf Eis gesetzt und mit eiskaltem DMEM BSA mit entweder 2 µg/mL Cholera toxin-FITC, 10 µg/mL *Low-Density-Lipoprotein* (LDL)-Bodipy oder 1 µg/mL EGF-Alexa488 für 1 h auf Eis inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt, vorgewärmtes DMEM Vollmedium zugegeben und die Schalen bei 37 °C auf vorgewärmten Metallblöcken im Inkubator unter Standardbedingungen für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PFA oder Methanol fixiert, 3 x mit PBS, 1 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, abgetropft und mit Dakofluor *Mounting* Medium auf Objektträger gebracht. Die Aushärtung des *Mounting* Mediums erfolgte ü.N. im Dunkeln bei RT.

### 2.2.3.19 Exozytose von biotinyliertem Transferrin

Zellen wurden in einer 4-Well-Schale bis zur Bildung eines konfluenten Zellrasens kultiviert, 2 x mit PBS gewaschen und für 1 h in DMEM BSA unter Standardbedingungen

ausgehungert. Das Medium wurde abgenommen und durch 200  $\mu$ L DMEM BSA mit 50  $\mu$ g/mL biotinyliertem Transferrin ersetzt. Die Zellen wurden für 30 min unter Standardbedingungen kultiviert, dann die Schalen auf Eis gesetzt und 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Auf der Membran verbliebenes biotinyliertes Transferrin wurde durch 1 min Inkubation mit eiskalter 10 mM Essigsäure in 150 mM NaCl und nochmaliges waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss wurden 200  $\mu$ L vorgewärmtes DMEM BSA mit 0,5 mg/mL unmarkiertem Holo-Transferrin und 0,1 mM Deferoxamin-Mesylat zugegeben. Die Schalen wurden für die angegebenen Zeiten bei 37 °C unter Standardbedingungen auf Metallblöcken im Inkubator inkubiert. Für jeden Zeitpunkt wurde anschließend erst das Medium abgenommen und mit Proteinaseinhibitoren vermischt auf Eis gestellt, dann die Zellen in 200  $\mu$ L PBS mit 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS und Proteinaseinhibitormix abgeschabt, homogenisiert und auf Eis gestellt. Die Proben wurden mit je 100  $\mu$ L 3x Stop Puffer versetzt, per SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, per Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit Streptavidin-HRP unter der ECL Kamera detektiert. Die Auswertung erfolgte über densitometrische Bestimmung mit ImageJ.

#### **2.2.3.20 EGF-Stimulierter Abbau von EGFR und pErk Signalgebung**

Zellen wurden in 12-Well-Schalen bis zur Konfluenz inkubiert, 2 x mit PBS gewaschen und 2 h in DMEM BSA ausgehungert. Das Medium wurde abgenommen und 500  $\mu$ L vorgewärmtes DMEM BSA mit 500 ng/mL oder 1,5 ng/mL EGF zugegeben. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten bei 37 °C auf vorgewärmten Metallblöcken im Inkubator unter Standardbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden sie schnell 2 x mit PBS gewaschen, umgehend in 200  $\mu$ L 3x Stop Puffer aufgenommen, 5 min auf 95 °C erhitzt und kurz anzentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die Proben wurden im Anschluss per SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert.

#### **2.2.3.21 Bestimmung der EGF-Rezeptormenge auf der Zelloberfläche per FACS**

Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bis 80 % Konfluenz kultiviert. Sie wurden 3 x mit PBS gewaschen und 2 h in DMEM BSA unter Standardbedingungen kultiviert. Die Schalen wurden auf Eis 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und für 10 min eiskaltes PBS mit 1 % EGTA zugegeben. Die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren von der Zellkulturschale gelöst, bei 200 x g für 4 min bei 4 °C abzentrifugiert und jeweils ein Drittel der Zellen in je 1 mL eiskaltem DMEM BSA, DMEM BSA mit 500 ng unmarkiertem EGF und DMEM BSA mit 500 ng EGF-Alexa488 resuspendiert. Die Zellen wurden für 1,5 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die mit unmarkiertem EGF inkubierten Zellen wurden anschließend bei 200 x g für 4 min bei 4 °C abzentrifugiert und

nochmals für 1,5 h mit 1 mL DMEM BSA und 500 ng EGF-Alexa488 auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert (Kontrolle auf unspezifische Bindung). Alle Proben wurden nach der jeweiligen Inkubation 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen, in 500 µL PBS aufgenommen und die Fluoreszenzintensität von je 20000 Zellen pro Probe im L1-Filter am FACS (*Fluorescence Activated Cell Scanning*) bestimmt.

### 2.2.3.22 Assay zur Sekretion lysosomaler Enzyme

Die zelluläre Sekretion der lysosomalen Enzyme  $\beta$ -Hexosaminidase,  $\beta$ -Mannosidase,  $\beta$ -Glucuronidase und  $\beta$ -Galaktosidase wurde durch die Enzymaktivitäten im Überstand und in den Zellen gemessen. Dafür wurde von jedem Enzym der Umsatz eines spezifischen 4-Methylumbelliferyl (4-MU) Substrates zum fluoreszentelem 4-Methylumbelliferon bestimmt. Zellen wurden in 12-Well-Schalen bis zur Konfluenz kultiviert, 2 x mit PBS gewaschen und dann 20 h mit 400 µL DMEM BSA inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, mit Proteinaseinhibitormix versetzt und auf Eis gelagert. Die Zellen wurden in PBS mit 0,1 % Triton X-100 mit Proteinaseinhibitormix abgeschabt, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und ebenfalls auf Eis gelagert. Jeweils die angegebene Menge der Proben (siehe Tabelle) wurde in 2 mL Eppendorfgefäßen auf Eis vorgelegt, mit 50 µL eiskaltem Probenpuffer (0,1 M Na-Citrat, pH 4,6; 0,08 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ ; 0,4 % (w/v) BSA) mit je 1 mM Substrat versetzt und für die angegebene Zeit (siehe Tabelle) bei 37 °C geschüttelt. Zur Kontrolle wurde jeweils Substrat ohne Probe mit inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 2 mL Stop-Puffer (0,2 M Glycin, mit NaOH auf pH 10,8) abgestoppt, die Proben durch invertieren gut gemischt und je eine Doppelbestimmung des umgesetzten 4-MU Substrates im Mikroplattenleser durchgeführt (Absorption: 360 nm; Emission: 440 nm).

Substrat	Probe/Verdünnung	Inkubationszeit
4-MU-2-acetamido-deoxy- $\beta$ -D-Glucopyranosid	10 µL (1:10)	30 min
4-MU- $\beta$ -D-Mannopyranosid	20 µL	60 min
4-MU- $\beta$ -D-Galaktopyranosid	10 µL	120 min
4-MU- $\beta$ -D-Glucopyranosid	10 µL	120 min

### 2.2.3.23 Bestimmung der autophagozytotischen Aktivität

#### 2.2.3.23.1 Bestimmung durch radioaktiven pulse-chase

Zur Bestimmung der autophagozytotischen Aktivität wurden Proteine in MEF zunächst mit radioaktivem Valin markiert und anschließend deren Abbau untersucht. Dazu wurden je Genotyp vier 3 cm Zellkulturschalen bis zum Erreichen einer ca. 90 %igen Konfluenz inkubiert, dann 2 x mit PBS gewaschen und je mit 1 mL Valin-freiem DMEM (siehe

unten), dem 0,63  $\mu\text{Ci/mL}$   $^{14}\text{C}$ -L-Valin zugesetzt wurden, für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 2 x mit PBS gewaschen und dann mit je 1 mL folgender Medien aufgefüllt:

2 Schalen: DMEM Vollmedium mit 15 mM L-Valin

1 Schale: Krebs-Henseleit Puffer mit 15 mM L-Valin

1 Schale: Krebs-Henseleit Puffer mit 15 mM L-Valin und 10 mM 3-Methyladenin.

Die Schalen wurden für 3 h unter Standardbedingungen kultiviert, dann die Überstände abgenommen, auf Eis gestellt und die Schalen wie zuvor wieder befüllt und inkubiert. Von den Überständen wurde eine TCA-Fällung durchgeführt und Niederschlag und Überstand bei 4 °C aufbewahrt. Nach weiteren 5 h wurde nur eine der Schalen mit DMEM Vollmedium für insgesamt 24 h im Inkubator belassen. Bei den anderen Schalen wurde mit den Überständen wie zuvor verfahren, die Zellen wurden in 1 mL PBS mit 0,1 % Triton-X 100 aufgenommen und nachfolgend wie die Überstände TCA-präzipitiert und aufbewahrt. Die letzte Schale wurde nach insgesamt 24 h ebenso behandelt. Überstände und Präzipitate wurden mit jeweils 3 mL Szintillationscocktail vermischt und im Szintillationszähler vermessen. Als Negativkontrolle wurde Szintillationscocktail ohne Probe sowie Szintillationscocktail mit PBS genutzt. Die autophagozytotische Aktivität wurde als Quotient von löslicher zu unlöslicher Radioaktivität berechnet.

Ansatz für 1 L Valin-freies DMEM:

<b>Aminosäuren</b>	<b>Vitamine</b>	<b>Salze &amp; andere Komp.</b>
84 mg L-Arginin HCl	4 mg D-Calciumpantothenat	200 mg $\text{CaCl}_2$
63 mg L-Cystin 2HCl	4 mg Cholinchlorid	0,1 mg $\text{Fe}(\text{NO}_3)\cdot 9\text{H}_2\text{O}$
584 mg L-Glutamin	4 mg Folsäure	400 mg KCl
30 mg Glycin	7,2 mg i-Inositol	97,67 mg $\text{MgSO}_4$
42 mg L-Histidin $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	4 mg Niacinamid	6400 mg NaCl
105 mg L-Isoleucin	0,4 mg Riboflavin	125 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$
105 mg L-Leucin	4 mg Thiamin HCl	
146 mg L-Lysin		4500 mg D-Glukose
30 mg L-Methionin		110 mg Natriumpyruvat
66 mg L-Phenylalanin		15 mg Phenolrot
42 mg L-Serin		
95 mg L-Threonin		5 % (v/v) dialysiertes FKS
16 mg L-Tryptophan		5 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin 100x
104 mg L-Tyrosin $\cdot 2\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$		

### **2.2.3.23.2 Bestimmung durch Akkumulation von LC3-II**

Zur Bestimmung der Akkumulation von LC3-II nach Initiation der Autophagozytose wurden je Genotyp Zellen in acht 3 cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zellen wurden dann 3 x mit PBS gewaschen und die Schalen wie folgt befüllt: 2 Schalen mit Vollmedium, 3 Schalen mit Krebs-Henseleit Puffer und 3 Schalen mit Krebs-Henseleit Puffer, dem Proteinaseinhibitoren (10 ng/mL E63D und 30 ng/mL Pepstatin) zugesetzt wurden. Die Schalen mit Vollmedium wurden umgehend 2 x mit PBS gewaschen und die Zellen in 200 µL 3x Stop Puffer aufgenommen. Die übrigen Schalen wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 1 h, 2 h und 4 h wurde je eine Schale mit Krebs-Henseleit Puffer und eine Schale mit Krebs-Henseleit Puffer und Proteinaseinhibitoren 1 x mit PBS gewaschen und die Zellen in 200 µL 3x Stop Puffer aufgenommen. Die Proben wurden je Genotyp auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und Westernblots angefertigt. Die Blots wurden zur Immundetektion abweichend vom Standardprotokoll für 24 h bei 4 °C mit 4 % Blotto + 1 % BSA blockiert. Der Antikörper zur LC3-Detektion wurde für weitere 24 h in 2 % Blotto bei 4 °C zugegeben.

## **2.2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten eukaryotischer Zellen**

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 15 cm Zellkulturschalen kultiviert, 2 x mit eiskaltem PBS gespült und mit dem Zellschaber in 1 mL eiskaltem PBS mit Proteinaseinhibitormix abgeschabt. Die Zellen wurden über Scherkräfte durch zehnmaliges Pressen durch eine kleine Kanüle aufgeschlossen. Sofern die Zellen nicht für Experimente genutzt wurden, in denen Detergenzien stören, erfolgte der Aufschluss durch Zugabe von 1 % Triton-X 100 und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Sofern die Zellen ausschließlich für Westernblot-Analysen eingesetzt werden sollten, wurden sie nach dem Waschen mit PBS direkt in 3x Stop Puffer homogenisiert.

### **2.2.4.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe**

Mausgewebe wurde entnommen und zur späteren Verwendung bei -20 °C oder -80 °C gelagert. Zur Herstellung von Proteinextrakten für Westernblot-Analysen wurde das Gewebe 1:9 (w/v) mit 3x Stop Puffer vermischt, zerkleinert und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Größere Gewebestücke, die nicht homogenisiert werden konnten, wurden durch kurzes Abzentrifugieren entfernt.

#### 2.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zunächst wurden Proteinstandards mit 0/1,0/1,5/5,0/10,0/15,0 und 25,0 µg/mL BSA in PBS angesetzt. Gleichzeitig wurden verschiedene Mengen der Proben (1 µL bis 10 µL) auf je 1 mL mit PBS aufgefüllt. Alle Proben und Standards wurden gevortext, 200 µL Bradford *Protein Assay* Reagenz zugesetzt und nochmals gevortext. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die OD<sub>595</sub> aller Proben bestimmt. Aus den OD<sub>595</sub> Werten der Standardlösungen wurde eine Eichgerade erstellt und über die Steigung der linearen Regressionsgeraden die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

#### 2.2.4.4 TCA-Fällung von Proteinen

Zur Fällung von Proteinbestandteilen in Lösung wurde der Lösung 1/5 Volumen eiskalter 50 %iger Trichloressigsäure (TCA) zugesetzt und gevortext. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Präzipitate 10 min bei 18000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in einer entsprechenden Menge 500 mM NaOH solubilisiert.

#### 2.2.4.5 Dialyse von FKS

Zur Entfernung niedermolekularer Bestandteile wie Aminosäuren aus FKS wurden 50 mL FKS in einen Dialyseschlauch mit einem molekularen *cut-off* von 4500 kDa gefüllt und dicht verschlossen. Die Dialyse erfolgte unter ständigem Rühren 5 x für 8 – 14 h bei 4 °C in 1 L PBS. Das FKS wurde anschließend steril abgefüllt und portioniert bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.4.6 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen wurde durch Sodiumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht. Um eine höhere Bandenschärfe zu erlangen, wurde ein diskontinuierliches Gel verwendet, in dem zunächst die Proben in einem Sammelgel aufkonzentriert und anschließend im Trenngel aufgetrennt werden. Dafür wurden zunächst zwei Glasplatten (10 cm x 1 cm) mit Ethanol gesäubert, mit 1 mm *Spacern* zusammengesetzt und die Kanten über einen Gummischlauch abgedichtet. Das Trenngel wurde bis 0,5 cm unterhalb des Kammes aufgefüllt, mit Isopropanol überschichtet und ca. 30 min auspolymerisiert. Nach Entfernung des Isopropanols durch Spülen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Sammelgel eingefüllt, der Kamm eingesteckt und das Gel für ca. 10 min auspolymerisiert. Dichtungsschlauch und Kamm wurden entfernt, das Gel in die Laufkammer eingespannt, SDS-Laufpuffer aufgefüllt und Luftblasen unter dem Gel entfernt. Nach Beladen des Gels mit den vorbereiteten Proben wurde die Elektrophorese mit 20 mA pro Gel laufen gelassen bis die Bromphenolblaufront das Ende des Gels fast erreicht hatte. Die Gele wurden umgehend zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

Zusammensetzung für je 1 Gel (Trenngel 5 mL, Sammelgel 1,5 mL):

<b>Komponente</b>	<b>8 % Gel</b>	<b>10 % Gel</b>	<b>12,5 % Gel</b>	<b>Sammelgel</b>
10 % SDS	50 µL	50 µL	50 µL	15 µL
10 % APS	50 µL	50 µL	50 µL	15 µL
ddH <sub>2</sub> O	2,3 mL	2 mL	1,6 mL	1 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL	--
1 M Tris-HCl pH 6,8	--	--	--	190 µL
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	1,35 mL	1,7 mL	2,1 mL	280 µL
TEMED	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2 µL

#### 2.2.4.7 Westernblot Analyse / *Semi-Dry* Transfer

Zum Transfer von im SDS-Gel aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran wurden zunächst 6 Stücke Whatman-Papier und eine Nitrozellulosemembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wurde 5 min in *Semi-Dry* Puffer getränkt, auch das Whatman-Papier und das Polyacrylamidgel wurden kurz in *Semi-Dry* Puffer gelegt. Dann wurden drei Lagen Whatman-Papier, Nitrozellulose, Polyacrylamidgel und nochmals drei Lagen Whatman-Papier in dieser Reihenfolge luftblasenfrei übereinander auf die untere Elektrode der Blot-Apparatur geschichtet. Die obere Elektrode der Blot-Apparatur wurde aufgesetzt, mit einem zusätzlichen Gewicht beschwert, die Spannungsquelle angeschlossen (positiver Pol unten, negativer Pol oben) und der Transfer für 1 – 2 h (abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins) mit ca. 1 mA/cm<sup>2</sup> gestartet. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran kurz in Ponceau-S Lösung (0,2 % Ponceau-S in 3 % TCA) geschwenkt, mit ddH<sub>2</sub>O gespült bis der Hintergrund entfärbt war und das Ergebnis dokumentiert. Die Membran wurde entweder sofort weiter verwendet oder getrocknet und dunkel gelagert.

#### 2.2.4.8 Immundetektion spezifischer Proteinbanden

Nach dem Westernblot wurden zur Detektion spezifischer Proteinbanden zunächst alle unspezifischen Bindestellen auf der Nitrozellulose durch Blocken mit 2 % Milchpulver in PBST für 30 min bei RT besetzt. Anschließend wurde der 1. Antikörper entsprechend in 2 % Milchpulver in PBST verdünnt und die Membran 2 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C darin geschwenkt. Die Membran wurde dann 3 x 5 min mit PBST gewaschen und der in PBST verdünnte 2. Antikörper zugegeben und für 1 h bei RT geschwenkt. Abschließend wurde 4 x 5 min mit PBST und 2 x 5 min mit PBS gewaschen, Supersignal ECL-Reagenz auf die Membran gegeben und das Signal mit dem LAS 3000 System detektiert.

## **2.2.5 Methoden zur Histologie und Skelettfärbung**

### **2.2.5.1 Alcianblau- und Alizarinrot-Färbung des embryonalen Skeletts**

Embryonen oder neugeborene Tiere wurden durch Dekapitation getötet, Haut sowie innere Organe entfernt und mindestens 4 d in 100 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Skelette 24 h in Aceton entfettet und für 2 – 3 d bei 37 °C in frischer Färbelösung (2.1.15) belassen. Nach 15 min vorsichtigem Spülen in Leitungswasser wurden sie für 1 – 2 d in 1 % KOH belassen, bis die Knochen durch das verbliebene Gewebe klar sichtbar wurden. Die Skelette wurden 1 – 5 d in 20 % Glycerin mit 1 % KOH, 1 – 3 d in 50 % Glycerin und nochmals 1 – 3 d in 80 % Glycerin in dieser Reihenfolge entwässert. Die Lagerung erfolgte in 100 % Glycerin im Dunkeln.

### **2.2.5.2 Herstellung von Paraffinschnitten**

E18,5 Embryonen wurden durch Dekapitation getötet und die Haut zum besseren Eindringen des Fixans entfernt. Die Fixation erfolgte über 24 h bei 4 °C in Bouin-Lösung. Anschließend wurde zum Entkalken das Bouin-Fixans entfernt und das Präparat für 24 h in EDTA-NaOH leicht geschüttelt. Das Präparat wurde 24 h in (mehrfach ausgetauschtem) Leitungswasser gewässert und anschließend für je 24 h in 50 %, 70 %, 90 % und 100 % Ethanol sowie 100 % Isopropanol, und 2 x Xylol in dieser Reihenfolge entwässert. Zum Einbetten wurden die Präparate für mindestens 24 h bei 60 °C in Paraffin gegeben und nochmals 24 h in frischem Paraffin inkubiert. Das Präparat wurde in Gussformen platziert, diese mit frischem Paraffin bei 60 °C aufgefüllt, die Mikrotom-Halterung aufgelegt und das Paraffin bei RT erstarren gelassen. Zum weiteren Aushärten wurde der Paraffinblock ü.N. bei -20 °C gekühlt. Paraffinschnitte wurden am Mikrotom mit einer Schichtdicke von 7 µm angefertigt.

### **2.2.5.3 Hämatoxilin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten**

Paraffinschnitte wurden auf Objektträgern ü.N. bei 37 °C getrocknet. Sie wurden im Anschluss je 10 min in folgender Reihenfolge entparaffiniert und gewässert: 2 x Xylol, Isopropanol 100 %, Ethanol 100 %, Ethanol 90 %, Ethanol 70 %, Ethanol 50 %, ddH<sub>2</sub>O. Die Objektträger wurden 10 min in Hämatoxilin-Lösung belassen, 20 min mit langsam fließendem Leitungswasser gewässert und für 10 min in Eosin belassen. Im Anschluss folgte die Entwässerung für je 2 – 3 min in folgender Reihenfolge: 50 %, 70 %, 90 % und 100 % Ethanol sowie 100 % Isopropanol, 2 x Xylol. Die gefärbten Paraffinschnitte wurden luftblasenfrei mit Roti-Histokitt I eingedeckt und dunkel und trocken aufbewahrt.



# Kapitel 3

## Ergebnisse

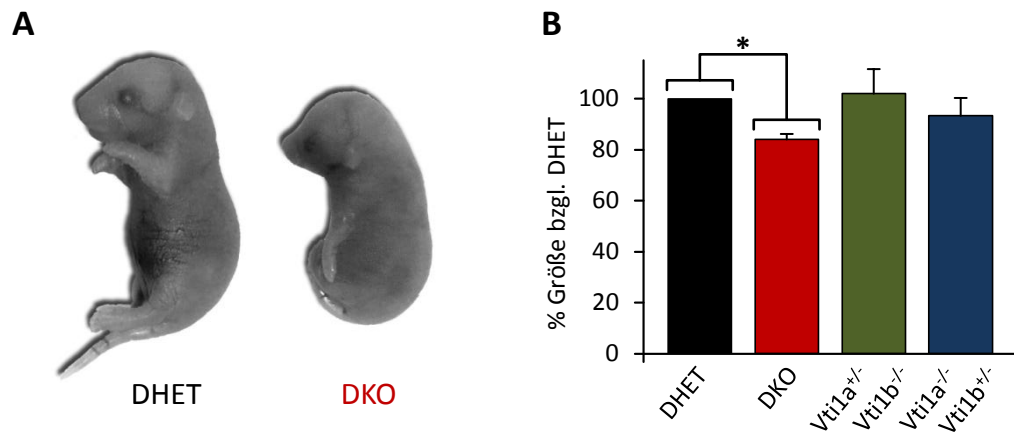
### 3.1 Vti1a/Vti1b doppeldefiziente Embryonen

Für Vti1a/Vti1b negative Embryonen wurde bisher ein ausgeprägter neuronaler Phänotyp beschrieben. Bis zum perinatalen Tod zeichnet sich dieser vor allem durch progressive Neurodegeneration der meisten peripheren Ganglien sowie gravierende Veränderungen in axonalen Bahnen aus (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit fielen bei der Präparation von E18,5 Tieren weitere phänotypische Besonderheiten des Doppelknockouts auf.

#### 3.1.1 E18,5 Embryonen haben einen äußerlich erkennbaren Phänotyp

Zur Präparation von  $Vti1a^{-/-}Vti1b^{-/-}$  Embryonen wurden  $Vti1a^{-/-}Vti1b^{+/-}$  Mäuse mit entsprechenden  $Vti1a^{+/-}Vti1b^{-/-}$  Tieren verpaart. Aus trächtigen Weibchen wurden am Tag 18,5 der embryonalen Entwicklung (E18,5) die Embryonen entnommen und vor der Weiterverwendung fotografiert.

Bei einem Vergleich der jeweiligen Wurfgeschwister fiel auf, dass die  $Vti1a^{-/-}Vti1b^{-/-}$  (DKO) Tiere oft weniger weit entwickelt wirkten als  $Vti1a^{+/-}Vti1b^{+/-}$  (DHET),  $Vti1a^{-/-}Vti1b^{+/-}$  oder  $Vti1a^{+/-}Vti1b^{-/-}$  (trialele) Tiere (Abb. 3.1 A). Sie zeigten eine abgerundete, weniger ausgeprägte Kopfform. Die vorderen Gliedmaßen lagen parallel zur Körperachse, während sie bei den Wurfgeschwistern angewinkelt waren. Auch die hinteren Gliedmaßen lagen jeweils sehr eng am Körper an. Eine Bestimmung der Kopf-Rumpflänge bei 9 Würfen ergab, dass DKO Embryonen gegenüber DHET eine im Schnitt um  $16 \pm 2\%$  signifikant verringerte Größe aufwiesen (Abb. 3.1 B).



**Abb. 3.1 DKO Embryonen weisen äußerlich erkennbare phänotypische Veränderungen auf**

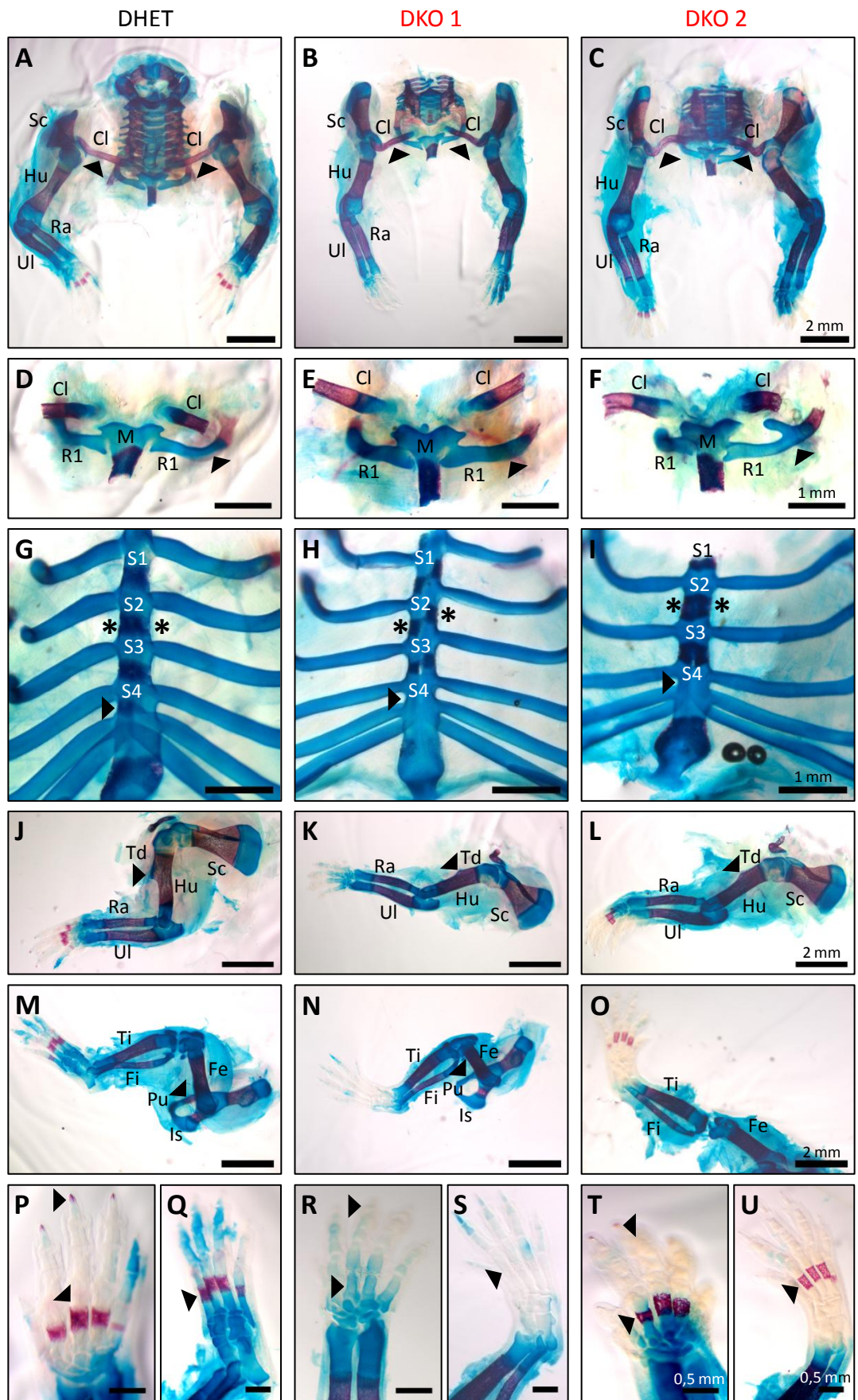
E18,5 Embryonen wurden nach Präparation aus dem Muttertier vor der Weiterverwendung fotografiert. **A** DKO Embryonen wirken weniger weit entwickelt als ihre Wurfgeschwister. Sie haben einen abgerundeteren Kopf sowie eine auffällige Stellung der Gliedmaßen. Triallele Tiere lassen sich von DHET nicht unterscheiden. **B** Gegenüber DHET Embryonen sind DKO Tiere um  $16 \pm 2\%$  signifikant kleiner. Es wurde von 9 Würfen die Kopf-Rumpf-Länge der Embryonen bestimmt und auf DHET normalisiert. \* bezeichnet eine Signifikanz von  $p=0,0009$  im t-Test nach Student (ungepaart, zweiflächig). Die statistische Auswertung wurde vor der Normalisierung durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

### 3.1.2 Defekte in der Knochenbildung

Um zu überprüfen, ob die äußerlichen Merkmale Vti1a/Vti1b defizienter Embryonen auf Veränderungen im Skelett zurückzuführen sind, wurden diese mit Alcianblau und Alizarinrot gefärbt. Dabei erscheint Knorpel in blau, während calcifizierte, also knöcherne Bereiche, rot angefärbt werden. Dies erlaubt es, neben der allgemeinen Anatomie des Skeletts auch Unterschiede in der Struktur festzustellen, die Rückschlüsse auf Knochenbildung und -entwicklung zulassen.

Die Färbung wurde an 5 Würfen durchgeführt, darunter waren 7 DKO und 13 DHET Embryonen. Die Schädel wurden jeweils zuvor zur Präparation von Neuronen genutzt und wegen der daraus resultierenden Schäden nicht zum Vergleich herangezogen. Gezeigt sind Bereiche, die in DKO Tieren im Vergleich zu DHET verändert sind (Abb. 3.2). Ebenfalls untersuchte E18,5 Vti1a<sup>-/-</sup> und Vti1b<sup>-/-</sup> Embryonen zeigten keinerlei Auffälligkeiten.

Auch im skelettierten Zustand blieb die veränderte Stellung der vorderen Extremitäten erhalten (A-C). Humerus und Radius waren im DKO (B,C) wesentlich weniger angewinkelt als in DHET Tieren (A). Am auffälligsten waren die Claviculae (Pfeilspitze A-C). Das Claviculum ist ein bogenförmiger Knochen, der das Schultergelenk mit dem Sternum verbindet. Die medialen Enden sind mit dem Manubrium verbunden und laufen zunächst gerade, dann in einem Bogen zu Humerus und acromialem Fortsatz der Scapulae. Während dies bei DHET Embryonen der Fall war, beschrieben die Claviculae bei DKO





### Abb. 3.2 DKO Embryonen zeigen Deformationen im Skelett und teils fehlende Calcifizierung

Skelette von E18,5 Tieren wurden mit Alcianblau (Knorpel) und Alizarinrot (Knochen) gefärbt. **A,B,C** Anteriorale Ansicht von Halswirbelsäule, Claviculae und vorderen Extremitäten. Der Winkel zwischen Humerus und Radius ist im DKO wesentlich größer. DKO Claviculae sind verformt (Pfeilspitzen). **D,E,F** Anteriorale Ansicht von Manubrium, Claviculae und erster Rippe. DKO 2 zeigt einen zusätzlichen, knorpeligen Auswuchs an der ersten Rippe (Pfeilspitze). **G,H,I** Anteriorale Ansicht von Sternum und Rippen. Es sind im DKO Defekte in der Calcifizierung zu erkennen (Pfeilspitze) sowie in DKO 1 eine longitudinale Verschiebung von Rippen und Sternebrae (Asterisk). **J,K,L** Laterale Ansicht der vorderen Extremitäten. Die Tuberositas deltoidea ist beim DKO weniger ausgeprägt (Pfeilspitze). **M,N,O** Laterale Ansicht der hinteren Extremitäten und Pelvis. Bei DKO1 ist das Os Pubis nicht calcifiziert (Pfeilspitze). **P,R,T** Manus und **Q,R,T** Pes: Die Calcifizierung in den distalen Extremitäten fehlt bei DKO Tieren teilweise. Maßstabsangaben bei DKO 2 gelten für die jeweilige Bildzeile. Cl=Claviculum, Fe=Femur, Fi=Fibia, Hu=Humerus, Is=Ischium, M=Manubrium, Pu=Pubis, R1=erste Rippe, S1-S4=Sternebra 1-4, Td=Tuberositas deltoidea, Ti=Tibia, Ul=Ulna.

Tieren einen sehr viel ausgeprägteren, teils doppelt S-förmigen Bogen. Sie verliefen im Gegensatz zu den unauffälligen DHET Tieren von ihren medialen Enden ausgehend nicht dorsal, sondern ventral. Bei einem DKO Embryo war ein Claviculum nicht calcifiziert, das andere fehlte vollständig.

An der ersten Rippe zeigte sich bei einem der DKO Skelette (DKO 2) eine überzählige, knorpelige Verzweigung (Pfeilspitze D-F).

In allen untersuchten DKO Embryonen war das vierte Sternebra nicht calcifiziert (Pfeilspitze G-I). Ebenso waren die Zentren der Ossifizierung in den übrigen Sternebrae nicht zusammengewachsen. In einem der untersuchten DKO Embryonen (DKO 1, Asterisk G-I) waren Rippen und Sternebrae des Sternums beiderseits longitudinal versetzt. In zwei anderen DKO (nicht gezeigt) waren S1-S4 vollständig nicht calcifiziert.

Die Tuberositas deltoidea (Td) war bei DKO Tieren weniger ausgeprägt (Pfeilspitze J-L). Insgesamt wirkten Humerus, Radius und Ulna etwas dicker und weniger gerade geformt.

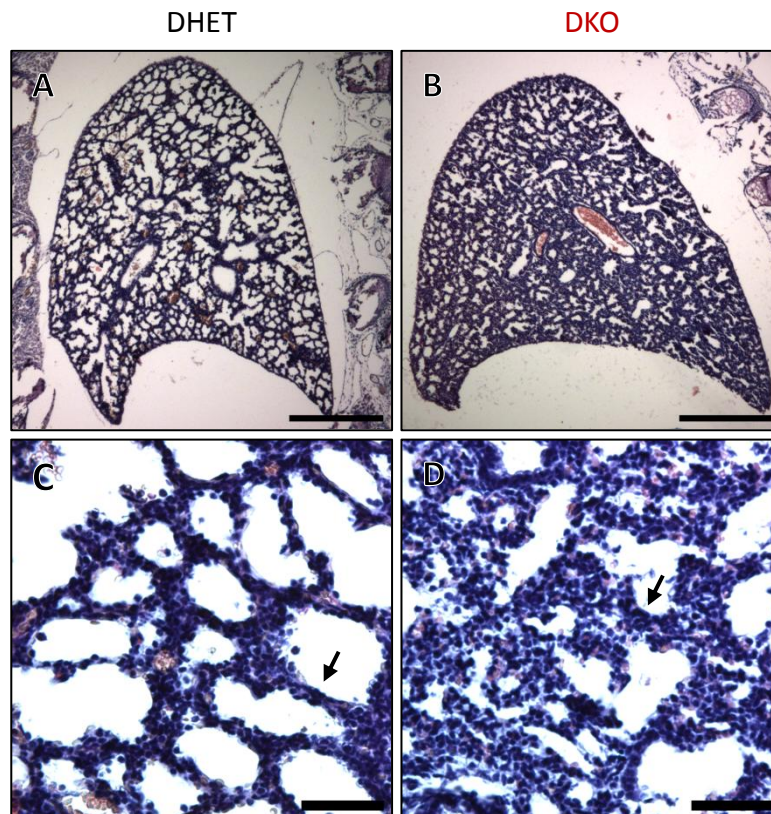
Eine nicht vollständige Calcifizierung lässt sich in einigen, aber nicht allen DKO Tieren feststellen. In zwei Fällen war das Pubis nicht calcifiziert (DKO 1, Pfeilspitze M-O), in mehreren Fällen Pes und Manus (Pfeilspitze P,R,T: Pes; Pfeilspitze Q,S,U: Manus).

Zusammengenommen weisen diese Befunde auf eine Beteiligung von Vti1a/Vti1b in der Entwicklung der Knochen hin. Besonders interessant sind dabei die Auffälligkeiten an Clavicula und Sternum der DKO Embryonen. Diese werden aus Anlagen gebildet, die etwa zur selben Zeit entstehen, an der sich der neuronale Phänotyp manifestiert (siehe 4.2.1).

### 3.1.3 Pathologische Veränderungen der Lunge

Zusätzlich zu den Skelettfärbungen wurde ein Teil der verfügbaren E18,5 Tiere nach Dekapitation umgehend fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden Schnitte mit 7  $\mu\text{m}$  Schichtdicke angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (Christiane Wiegand). Hämatoxylin färbt saure Strukturen blau und macht so vor allem den Zellkern sichtbar. Eosin lässt basische Strukturen wie Zellplasmaproteine in rot erscheinen und färbt dadurch das Zellplasma. HE-Paraffinschnitte geben auf zellulärer Ebene einen guten Überblick über die Struktur des Gewebes.

Für Magen, Leber, Niere und Milz konnten an den vorhandenen Proben keine einheitlichen Veränderungen festgemacht werden. Um über eventuelle Veränderungen eindeutige Aussagen treffen zu können, werden in nächster Zeit Gewebsschnitte weiterer Embryonen angefertigt.

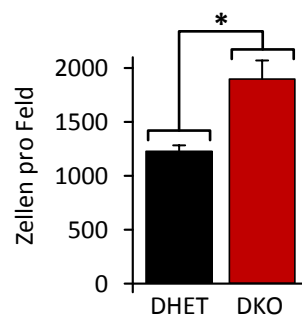


**Abb. 3.3 DKO Lungen zeigen pathologische Veränderungen**

E18,5 Embryonen wurden nach Dekapitation umgehend fixiert und HE-gefärbte Paraffinschnitte angefertigt. **A,B** DKO Lungen wirken bereits bei geringer Vergrößerung wesentlich dichter als beim DHET. Lateraler Schnitt, Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ . **C,D** Die Septen haben im DKO mehr Zellschichten (Pfeil) und die Alveolen sind weniger expandiert. Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ .

Die Lungenstruktur von DKO Embryonen wies jedoch in allen Fällen offensichtliche Abweichungen auf. Schon bei geringen Vergrößerungen wirkte die Lunge im DKO gegenüber DHET Tieren wesentlich dichter (Abb. 3.3 A,B). Die Alveolen waren weniger expandiert und die alveolaren Septen wiesen eine höhere Schichtdicke auf (Pfeile Abb. 3.3 C,D). Im Idealfall besteht ein Septum aus zwei Zellschichten, jeweils einer Schicht pro angrenzender Alveole. Dies war bei DHET Tieren in guter Annäherung der Fall, während DKO Embryonen häufig drei oder mehr Schichten ausbildeten.

Zur quantitativen Erfassung des Phänotyps wurde die Zelldichte in DKO und DHET Lungen ermittelt. Dazu wurden für jeden Embryo die Zellkerne in 4 Aufnahmen der Lunge mit 400x Vergrößerung (Leica DM IRB) ausgezählt und das Ergebnis gemittelt. Dies wurde für Lungen von 3 DHET und 3 DKO Tieren aus 3 Würfeln durchgeführt. Während der ermittelte Wert bei den DHET Tieren bei  $1227 \pm 57$  Zellen/Feld lag, waren es im DKO  $1900 \pm 172$  Zellen/Feld (Abb. 3.4).



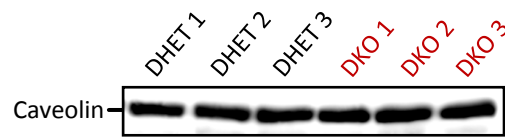
**Abb. 3.4 Die Zelldichte ist in DKO Lungen wesentlich erhöht**

Von HE gefärbten Paraffinschnitten der Lunge wurden jeweils 4 Aufnahmen (40x Objektiv, Leica DM IRB) angefertigt, die Zellkerne gezählt und gemittelt. Es wurden aus 3 Würfeln 3 DHET und 3 DKO Tiere ausgezählt. Die Zelldichte in der Lunge ist mit  $1900 \pm 172$  Zellen/Feld beim DKO signifikant höher als bei DHET Tieren mit  $1227 \pm 57$  Zellen/Feld. Der Fehler ist in SEM angegeben, \* entspricht  $p=0,05$  im t-Test (zweiflächig, ungepaart).

Ähnliche Veränderungen der Lunge wurden teils auch in *Vti1a*<sup>-/-</sup> Tieren sowohl an E18,5 als auch an adulten Tieren beobachtet. Die Veränderungen waren jedoch nur in einigen Tieren zu sehen und nicht einheitlich. Um zu untersuchen, inwieweit die Penetranz dieses Phänotyps eventuell vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängt, werden zur Zeit E18,5 Embryonen verschiedener *Vti1a/Vti1b* Genotypen mit C57BL/6 und 129/SvJ Hintergrund zur Anfertigung von Gewebsschnitten präpariert (Christiane Wiegand).

Die beobachteten Veränderungen im DKO könnten unter anderem auf eine fehlerhafte Zelldifferenzierung und daraus folgender Fibrose oder aber auf einen Sekretionsdefekt hindeuten, durch den die Alveolen destabilisiert werden (siehe 4.2.2).

Ein zur Vti1a/Vti1b defizienten Lunge phänotypisch ähnliches Bild zeigen *Caveolin-1* Knockout-Mäuse (Drab *et al.* 2001). Caveolin-1 und Caveolae sind in vielfacher Weise mit dem endosomalen System verbunden (Hansen und Nichols, 2010). Daher wurde geprüft, ob der Lungenphänotyp Vti1a/Vti1b defizienter Mäuse auf einem veränderten Proteinlevel von Caveolin-1 beruht. Dafür wurde Lungengewebe von E18,5 Embryonen zerkleinert, in 3x Stop Puffer aufgenommen und per SDS-PAGE und Westernblot auf den Caveolin-1-Gehalt hin analysiert. Es zeigte sich jedoch keine Veränderung des Proteinlevels (Abb. 3.5). Ein Effekt der Vti1a/Vti1b Defizienz auf den zellulären Gehalt von Caveolin-1 kann damit ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.5 Das Proteinlevel von Caveolin-1 ist in DKO Lungengewebe nicht verändert**

Lungengewebe von E18,5 DHET und DKO Embryonen wurde per SDS-PAGE und Westernblot auf den Gehalt an Caveolin-1 hin untersucht. Der Vergleich von Gewebe jeweils dreier Tiere aus zwei Würfen zeigt, dass Caveolin-1 in ähnlichen Konzentrationen vorhanden ist.

## 3.2 Vti1a/Vti1b doppeldefiziente mausembryonale Fibroblasten

Vti1a und Vti1b sind SNAREs mit Funktionen im endosomalen System. Da die Phänotypen Vti1a/Vti1b doppeldefizienter Embryonen auf Defekte dieses Systems zurückzuführen sein müssen, wurde die Morphologie und Funktion der Endosomen in Zelllinien entsprechenden Genotyps untersucht. Dafür wurden mausembryonale Fibroblasten (MEF) aus E12,5 Tieren isoliert und immortalisiert (Browski 2006 und diese Arbeit). Die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit der hergestellten Zelllinien bietet die Möglichkeit, Untersuchungen unter gut reproduzierbaren Bedingungen durchzuführen.

### 3.2.1 Verwendete Zelllinien

Die für die nachfolgenden Versuche verwendeten MEF verschiedener *Vti1a/Vti1b* Genotypen haben teils einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund und unterscheiden sich in der Methode der Immortalisierung. E-Linie und T-Linie sind aus den gleichen Vorläuferzellen entstanden und haben einen gemischten C57BL/6 - 129/SvJ Hintergrund. Um eventuelle Einflüsse des genetischen Hintergrunds zu berücksichtigen, wurde eine weitere Zelllinie (TBL6) aus Embryonen mit reinem C57BL/6-Hintergrund erzeugt. Die E-Linien sind durch Passage immortalisiert worden, die T-Linien und TBL6-Linien durch Transfektion mit dem *Large-T*-Antigen. Experimente wurden zur Absicherung der Ergebnisse meist mit mehreren Zelllinien durchgeführt. In Versuchen, in denen dies relevant ist, sind die jeweils verwendeten Zelllinien angegeben.

### 3.2.2 MEF zeigen keinen offensichtlichen morphologischen Phänotyp

Die Morphologie des endosomalen Systems und damit verbundener Organellen zeigte sich bereits im Hinblick auf mehrere Marker als unauffällig (Browski 2006). Der *cis*-Golgi Marker GM130, der Vti1b-Komplexpartner Syntaxin 7 sowie LAMP1 und LAMP2 als Marker für das spätendosomal-lysosomale Kompartiment waren in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gegenüber DHET Zellen nicht verändert. Syntaxin 8, ein Komplexpartner von Vti1b, war in DKO MEF und *Vti1a<sup>+/-</sup>Vti1b<sup>-/-</sup>* MEF diffuser verteilt. Hier wird vermutet, dass Syntaxin 8 durch Vti1b stabilisiert wird und bei Vti1b Defizienz Syntaxin 8 in entsprechend geringeren Mengen vorliegt (Atlashkin *et al.* 2003).

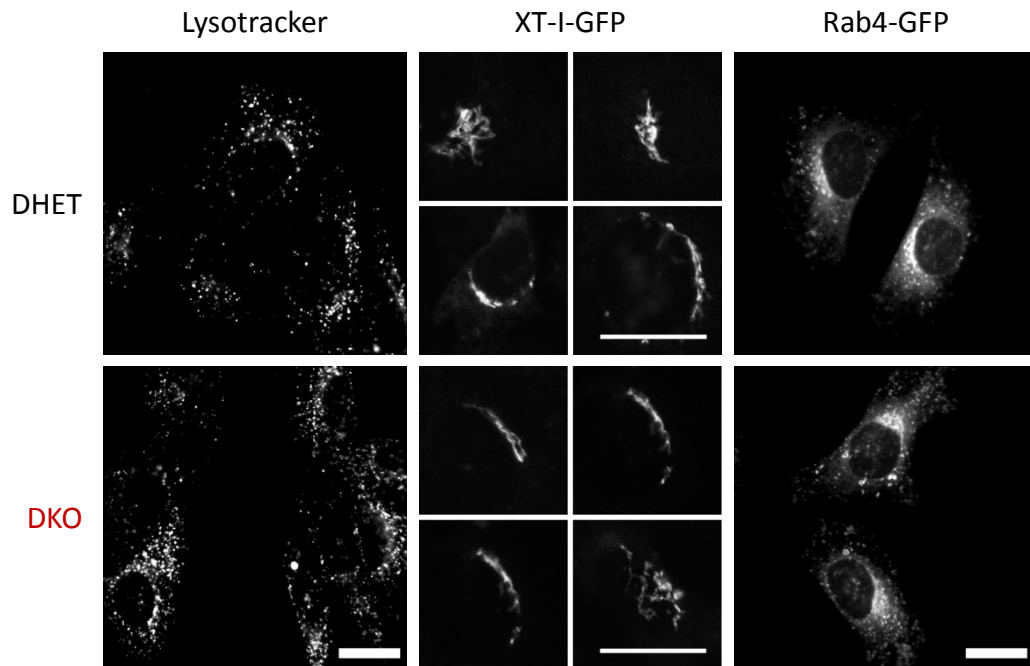
In dieser Arbeit wurden weitere Marker für eine eingehendere morphologische Untersuchung per Fluoreszenzmikroskopie verwendet.



### 3.2.2.1 Morphologie von Lysosomen, Golgi-Apparat und frühen Endosomen

Zusätzlich zu Antikörpern gegen LAMP1 und LAMP2 wurde LysoTracker zur Färbung des Lysosoms eingesetzt. LysoTracker ist eine azidotrope Base und fluoresziert bei Protonierung in saurer Umgebung. Nach Zugabe zum Medium diffundiert der membrangängige LysoTracker in die Zellen und akkumuliert im sauren spätendosomal-lysosomalen Kompartiment. Zur Färbung wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert, für 30 min mit 50 nM LysoTracker in Vollmedium inkubiert, mit PBS gewaschen, PFA-fixiert und auf Objektträger aufgebracht.

Sowohl in DHET als auch DKO MEF zeigte der Marker azide Kompartimente mit einer heterogenen Verteilung. Gemittelt war sowohl die ungefähre Anzahl als auch die Lokalisation der LysoTracker-positiven Kompartimente (zytoplasmatisch verteilt mit einer perinukleär höheren Dichte) im DKO nicht verändert (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6 Lysosomen, medialer Golgi-Apparat und frühe Endosomen sind morphologisch unauffällig**

In DHET und DKO MEF sind LysoTracker-markierte Lysosomen über eine größere Anzahl von Zellen gemittelt in gleicher Quantität und Verteilung zu sehen. Sowohl der *cis*- und mediale Golgi-Apparat (XT-I-GFP) als auch frühe Endosomen (Rab4-GFP) sind über fluoreszenzmikroskopische Bilder nicht unterscheidbar. LysoTracker wurde 50 nM in Vollmedium eingesetzt, die Zellen für 30 min damit inkubiert und im Anschluss PFA-fixiert. Die XT-I-GFP und Rab4-GFP-Plasmide wurden jeweils transfiziert und die Zellen vor PFA-Fixation für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Gezeigte Zelllinie: TBL6. Auch durchgeführt mit: T- und E-Linie (LysoTracker), T-Linie (XT-I-GFP, Rab4-GFP). Maßstab: 20 µm.

Für eine weitergehende Färbung des *cis*- und medialen Golgi-Apparates wurde ein GFP-Xylosyltransferase I (XT-I)-Konstrukt genutzt, das in diesem Bereich lokalisiert (Schön *et al.* 2006). Dafür wurden Zellen auf Deckgläsern kultiviert, mit dem XT-I-GFP-Plasmid transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach kurzem Waschen mit PBS wurden die Zellen

PFA-fixiert und auf Objektträger aufgebracht.

Die Verteilung von XT-I ähnelte derjenigen von GM130 (vgl. Abb. 3.13 und Abb. 3.14). XT-I ist sowohl im DKO als auch in DHET Zellen erwartungsgemäß in tubulären Strukturen sichelförmig um den Zellkern lokalisiert (Abb. 3.6).

Das *trans*-Golgi-Netzwerk zeigt sich über den Marker TGN38 (Luzio *et al.* 1990) in DHET und DKO Zellen gleichermaßen als vom Nukleus in die Peripherie ausgehendes Netzwerk tubulärer Strukturen. Die Färbung wurde in einem anderen Zusammenhang angefertigt und ist daher in Abb. 3.13 und Abb. 3.14 zu finden.

Zur Visualisierung des früh-endosomalen Kompartiments wurde ein GFP-Konstrukt der GTPase Rab4 genutzt, die hauptsächlich dort lokalisiert ist (van der Sluijs *et al.* 1991). Das Plasmid wurde in DKO und DHET MEF transfiziert (methodisch analog zu XT-I) und zeigte vesikuläre Strukturen gleicher Verteilung mit höherer Dichte am Zellkern (Abb. 3.6).

Frühe Endosomen, Lysosomen und der *cis*-mediale Golgi Apparat sind somit in DHET und DKO MEF über die verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Techniken nicht unterscheidbar.

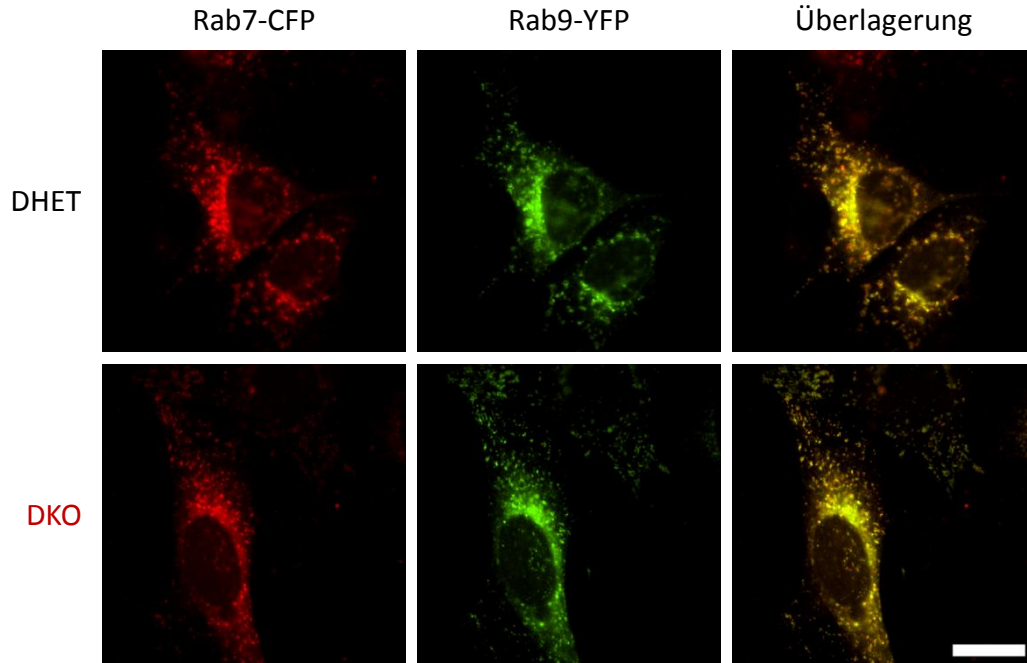
### 3.2.2.2 Co-Fluoreszenzfärbung von späten Endosomen und Recycling-Endosomen

Zur Visualisierung von späten Endosomen und Recycling-Endosomen standen Fluoreszenz-Konstrukte der GTPasen Rab7, Rab9 und Rab11 zur Verfügung. Rab7 und Rab9 sind beide im späten Endosom lokalisiert, gelangen jedoch durch unterschiedliche Rekrutierungsmechanismen dorthin (Soldati *et al.* 1995). Eine Co-Färbung durch Rab7-CFP und Rab9-YFP sollte zeigen, ob in DHET und DKO MEF beide spezifisch spätendosomalen Rab-GTPasen gleich lokalisiert sind und die Morphologie des Kompartiments Unterschiede aufweist. Dazu wurden MEF auf Deckgläsern kultiviert, mit beiden Konstrukten gleichzeitig transfiziert, für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert, PFA-fixiert und auf Objektträger aufgebracht.

Rab7 und Rab9 zeigten in DHET und DKO eine nahezu vollständige Colokalisation (Überlagerung Abb. 3.7). In MEF beiden Genotyps waren Rab7 und Rab9 in für das endosomale System typischer Verteilung zu sehen: Perinukleär gehäuft und dann zur Peripherie hin in einzelnen, vesikulären Strukturen.

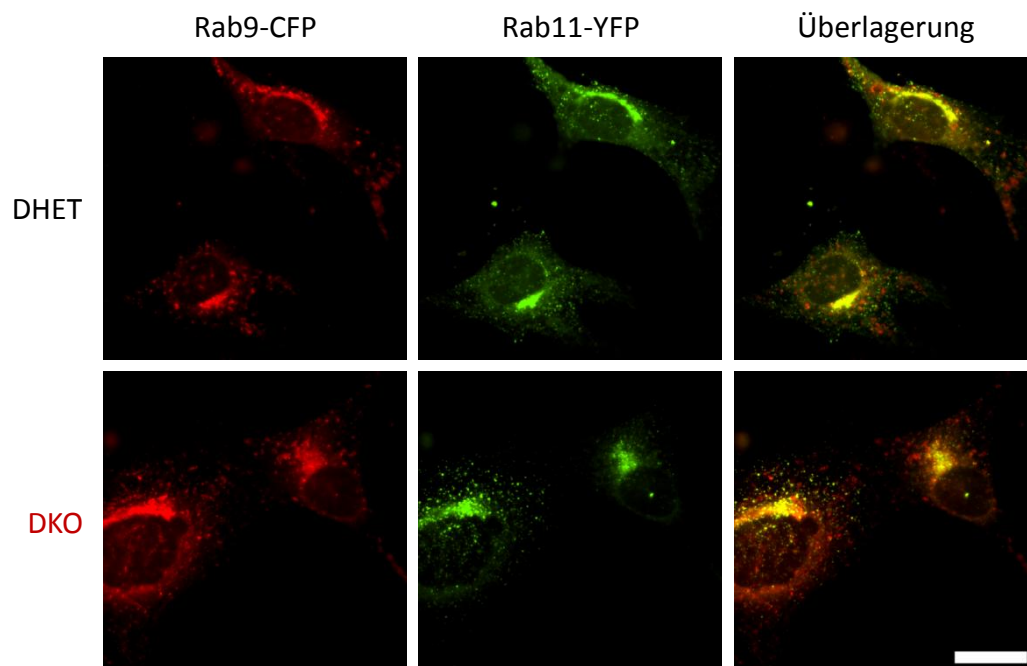
Rab11 ist vorwiegend im Recycling-Endosom zu finden (Ullrich *et al.* 1996). Die Co-Färbung von Rab9 und Rab11 zeigte, dass in DHET und DKO MEF späte Endosomen und Recycling-Endosomen in ihrer Kompartimentierung und Lokalisation vergleichbar waren (Überlagerung Abb. 3.8; methodisch analog zur Färbung mit Rab7/9).

Die Recycling-Endosomen waren in feineren vesikulären Strukturen zu finden als späte Endosomen. Die beiden Kompartimente überlagerten vor allem am Ort ihrer höchsten Dichte am Zellkern. Zur Zellperipherie hin bildeten sie unterscheidbare Strukturen.



**Abb. 3.7** Die spätendosomalen Marker Rab7 und Rab9 colokalisieren in DHET und DKO

Rab7 und Rab9 sind sowohl in DHET als auch DKO MEF in typisch endosomalen Strukturen verteilt. Sie colokalisieren in beiden Fällen fast vollständig. Rab7-CFP und Rab9-YFP wurden zur Fluoreszenzfärbung gleichzeitig in MEF transfiziert, diese 24 h kultiviert und anschließend PFA-fixiert. Gezeigt: TBL6-Linie. Auch durchgeführt mit: T-Linie. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.8** Rab9 und Rab11 sind in DHET und DKO gleich verteilt und colokalisieren perinukleär

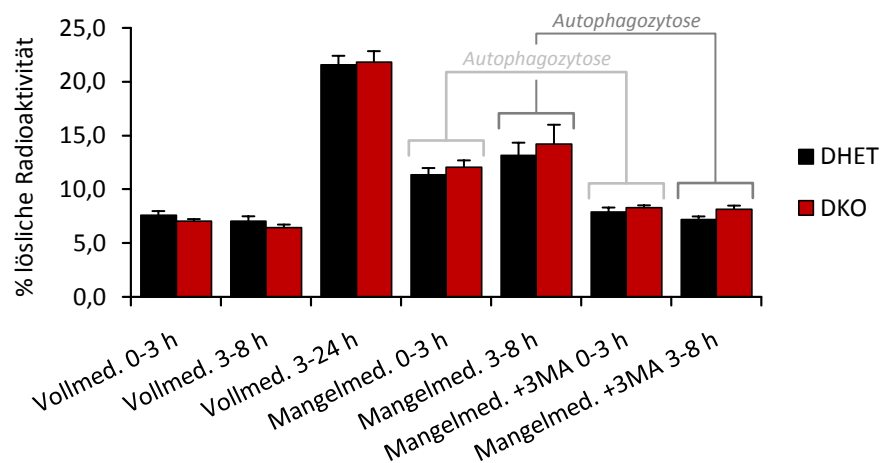
Spätendosomale Strukturen (Rab9) sind in DHET und DKO in größeren Vesikeln verteilt als das Recycling-Endosom (Rab11). Spätes Endosom und Recycling-Endosom colokalisieren vor allem in Golgi-Nähe (Überlagerung). Zur Zellperipherie hin sind die Kompartimente vereinzelter und in ihrer Lokalisation unterscheidbar. DHET und DKO MEF sind bezüglich Verteilung und Lokalisation identisch. Zur Fluoreszenzfärbung wurde ein Ansatz von Rab9-CFP und Rab11-YFP in MEF transfiziert, diese 24 h kultiviert, PFA-fixiert und auf Objektträger aufgebracht. Gezeigt: TBL6-Linie. Auch durchgeführt mit: T-Linie. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3 DKO MEF zeigen keinen Defekt in der Autophagozytose

Der Abbau zytoplasmatischen Materials geschieht hauptsächlich durch Autophagozytose (Henell *et al.* 1987; Mortimore *et al.* 1987). Dabei wird zunächst eine Doppelmembran-Struktur gebildet, die Teile des Zytoplasmas umschließt: Das Autophagosom. Dieses reift in mehreren Schritten über Fusion mit dem endosomal-lysosomalen System zum Phagolysosom, wo die Degradation des Materials stattfindet. In Hefen ist das Vti1a/Vti1b homologe Vti1p essentiell für die Autophagozytose (Ishihara *et al.* 2001). In einer Subklasse von *Vti1b*<sup>-/-</sup> Mäusen akkumulieren späte autophagozytotische Vakuolen, was auf einen Defekt der Autophagosomenreifung hindeutet (Atlashkin *et al.* 2003).

#### 3.2.3.1 Abbau radioaktiv markierter Proteine

Um zu überprüfen, ob in *Vti1a/Vti1b* negativen MEF die Autophagozytose beeinträchtigt ist, wurde der Abbau radioaktiv markierter Proteine verfolgt. Dafür wurden die Zellen zunächst 24 h in Medium mit 0,63  $\mu\text{Ci/mL}$  <sup>14</sup>C-Valin kultiviert. Im Anschluss wurden sie kurz mit PBS gewaschen und dann für verschiedene Zeitpunkte zur Induktion der Autophagozytose mit Mangelmedium inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe mit dem Autophagozytoseinhibitor 3-Methyladenin (3MA) versetzt. Zur Erfassung der konstitutiven Proteindegradation wurden parallel Zellen in Vollmedium inkubiert.



**Abb. 3.9 Die Proteindegradation durch Autophagozytose ist in DKO und DHET MEF vergleichbar**

Die Proteindegradation ist in DHET und DKO unter Standardbedingungen in Vollmedium sowie bei Induktion der Autophagozytose vergleichbar. Nach 3 h beträgt die Autophagozytoserate beim DHET  $3,4 \pm 0,5$  % und beim DKO  $3,8 \pm 0,4$  %. Innerhalb der nächsten 5 h werden beim DHET weitere  $6,0 \pm 0,7$  %, beim DKO ebenso  $6,0 \pm 1,0$  % durch Autophagozytose degradiert.

Proteine in DHET und DKO MEF wurden mit <sup>14</sup>C-Valin markiert, Autophagozytose durch Mangelmedium induziert und anschließend lösliche sowie unlösliche Radioaktivität bestimmt. Die Proteindegradation wurde als Quotient lösliche/unlösliche Radioaktivität ausgedrückt. Der Autophagozytoseinhibitor 3MA reduzierte die Proteindegradation auf das entsprechend im Vollmedium ermittelte Level. Die Degradation durch Autophagozytose berechnet sich aus [Degradation in Mangelmedium]-[Degradation in Mangelmedium + 3MA] (zusammengehörige Wertepaare siehe Grafik). Werte sind gemittelt aus 3 Versuchen. Jeder Versuch wurde mit Zellen anderen genetischen Hintergrunds (T-Linie, TBL6-Linie, E-Linie) durchgeführt. Fehler sind SEM.

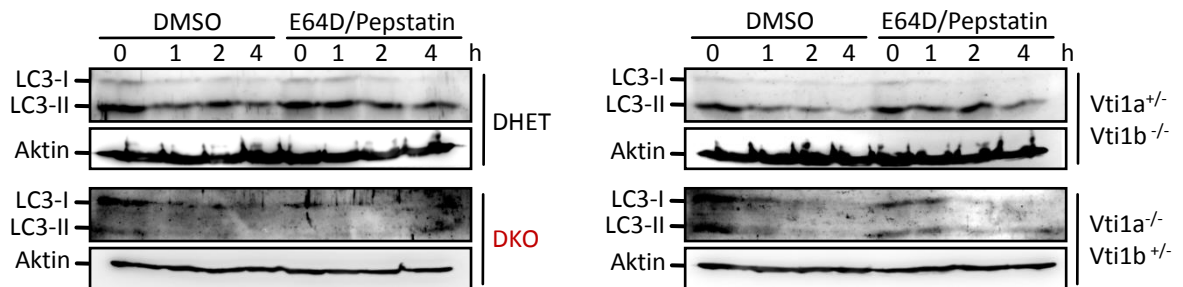
Medium und lysierte Zellen wurden jeweils gesammelt und das radioaktive Gesamtmaterial durch Proteinfällung in lösliche und unlösliche Radioaktivität getrennt. Von den Zellen degradiertes Material wurde als % der löslichen Radioaktivität von der Gesamtradioaktivität ausgedrückt (Abb. 3.9).

Die konstitutive Proteindegradation war in DHET und DKO MEF nach 3 h und weiteren 5 h bzw. 21 h vergleichbar. Die in Mangelmedium induzierte Autophagozytose wurde durch Zugabe von 3MA auf das Level der Proteindegradation in Vollmedium reduziert. Entsprechend konnte der Anteil der Degradation durch induzierte Autophagozytose als [Degradation in Mangelmedium] – [Degradation in Mangelmedium + 3MA] berechnet werden. Nach 3 h wurden durch Autophagozytose im DHET  $3,4 \pm 0,5$  % und beim DKO  $3,8 \pm 0,4$  % der Gesamtproteinmenge degradiert (zusammengehörige Wertepaare siehe Verbindungslinien, Abb. 3.9). Es wird also in DHET und DKO ein vergleichbarer Anteil von Proteinen mit einem relativ kurzen Lebenszyklus abgebaut. Um den Abbau langlebigerer Proteine ebenfalls zu erfassen, wurde bei einem Teil der Zellen nach 3 h das Medium durch jeweils frisches ersetzt und sie wurden für weitere 5 h inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurden in DHET MEF  $6,0 \pm 0,7$  % autophagozytiert, beim DKO ebenso  $6,0 \pm 1,0$  %. Dies lässt darauf schließen, dass Reifung und Funktion des Phagolysosoms im getesteten System nicht in kritischem Maße von Vti1a oder Vti1b abhängen.

### 3.2.3.2 Abbau von LC3

Furuta *et al.* konnten kürzlich einen Autophagozytosedefekt in *Vti1b* Knockdown Zellen beobachten. Nach siRNA-vermitteltem Knockdown von *Vti1b* oder *VAMP-8* akkumulierten die Zellen nach Induktion der Autophagozytose das Protein LC3 (Furuta *et al.* 2010). Daher wurde die Autophagozytosekapazität Vti1a/Vti1b defizienter MEF nochmals über eine alternative Methode getestet. *Rat microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3) ist ein Protein, das nach Synthese und posttranslationaler Modifikation zytosolisch als LC3-I (Molekulargewicht: 18 kDa) vorliegt. Bei Initiation von Autophagozytose wird es zu membranständigem LC3-II mit einem apparenten Molekulargewicht von 16 kDa konvertiert. Es lokalisiert in Autophagosomen und wird dort schnell abgebaut (Kabeya *et al.* 2000). Durch Vergleich der Proteinmenge von LC3-II nach induzierter Autophagozytose mit oder ohne Proteinaseinhibitoren lässt sich eine Aussage über die Funktion des Autophagosoms treffen (Furuta *et al.* 2010). Bei normal ablaufender Autophagozytose sollte LC3-II abgebaut werden, während es bei Zusatz von Proteinaseinhibitoren oder einem Defekt in der Autophagosomenreifung akkumuliert.

Daher wurden MEF entsprechenden Genotyps bis zur Konfluenz kultiviert, 3 x mit PBS gewaschen und anschließend für die angegebenen Zeiten in Mangelmedium die Autophagozytose initiiert. Den Kontrollzellen wurden die Proteinaseinhibitoren E64D (10 ng/mL) und Pepstatin (30 ng/mL) zugesetzt. Zu allen anderen Schalen wurde 1  $\mu$ L/mL DMSO gegeben, um Effekte des Lösungsmittels von E64D/Pepstatin zu berücksichtigen. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, in 3x Stop Puffer aufgenommen und per SDS-PAGE und Westernblot analysiert.



**Abb. 3.10 LC3-II akkumuliert bei induzierter Autophagozytose nicht in DHET, DKO oder triallelen MEF**

Bei MEF der verschiedenen *Vti1a/Vti1b* Genotypen wurde für die angegebenen Zeiten Autophagozytose induziert. Kontrollzellen wurden die Proteinaseinhibitoren E64D und Pepstatin zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in 3 x Stop Puffer aufgenommen und per SDS-PAGE und Westernblot auf LC3-Gehalt hin analysiert. In allen getesteten Zelllinien wurde im Verlaufe der Inkubation LC3-I (18 kDa) zu LC3-II (16 kDa) konvertiert und dieses degradiert. Der Versuch wurde mit der TBL6-Linie durchgeführt.

In allen getesteten Zelllinien nahm die LC3-I-Konzentration innerhalb von 1 h Inkubation ab. Dies ließ auf eine Autophagozytose-abhängige Konvertierung zu LC3-II schließen. Unabhängig vom *Vti1a/Vti1b*-Genotyp war wiederum nach 4 h die LC3-II-Konzentration in Proben ohne Proteinaseinhibitoren erheblich geringer als in Proben mit E64D/Pepstatin. Im Rückschluss ist die Autophagozytose also weder in DKO noch in triallelen MEF gegenüber DHET verringert. Dies bestätigt die in 3.2.3.1 erhaltenen Ergebnisse. Der von Furuta *et al.* nachgewiesene Einfluss von Vti1b auf die Autophagosomenreifung ist demnach im *Vti1b*-Knockdown, nicht aber im -Knockout zu beobachten (4.3.4.2).

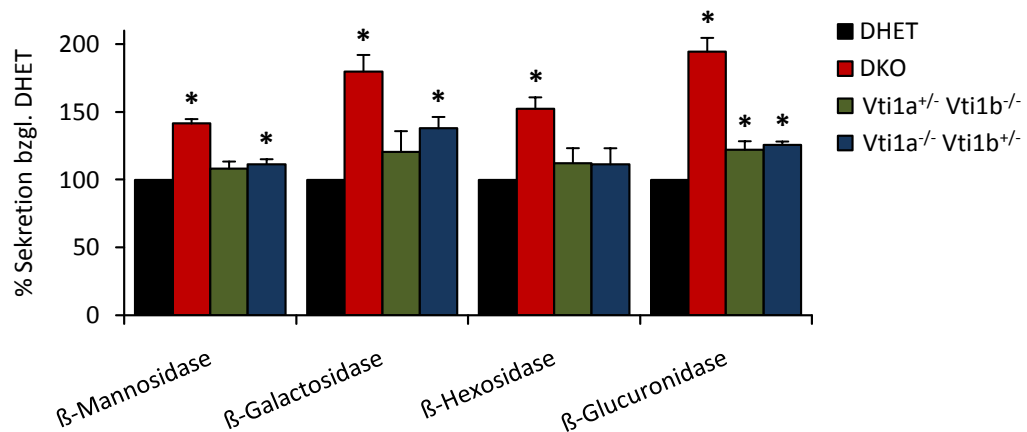
### 3.2.4 *Vti1a/Vti1b* DKO führt zu erhöhter Sekretion lysosomaler Enzyme

Neu synthetisierte lysosomale Hydrolasen werden über Mannosephosphatrezeptoren (MPR) vom TGN zum Lysosom transportiert (Figura *et al.* 1986). In einem sauren, prä-lysosomalen Kompartiment trennen sich Rezeptoren und Enzyme: Die löslichen Enzyme erreichen das Lysosom, während die MPR zurück zum TGN transportiert werden. Es gibt zwei Formen des MPR mit unterschiedlichem Molekulargewicht und etwas unterschiedlicher Funktion, den MPR46 und MPR300. Fehlt eine der Varianten oder wird MPR46 überexprimiert, werden lysosomale Enzyme verstärkt sekretiert (Chao *et al.* 1990;

Kasper *et al.* 1996). Vti1a ist am retrograden Transport von MPR46 vom Endosom zum TGN beteiligt (Medigeshi und Schu 2003). Inhibition von Vti1a führte zu erhöhter Sekretion der lysosomalen  $\beta$ -Hexosaminidase (Ganley *et al.* 2008).

### 3.2.4.1 Bestimmung der Sekretion lysosomaler Enzyme in MEF

Zur Bestimmung der Sekretionsrate lysosomaler Enzyme wurden MEF kultiviert, 2x mit PBS gewaschen und für 20 h in serumfreiem Medium mit 1 % BSA inkubiert. Die Aktivität lysosomaler Enzyme wurde in Medium und Zellextrakten durch fluorimetrische Messung des Umsatzes spezifischer 4-Methylumbelliferylsubstrate bestimmt. Die Sekretion wurde als prozentualer Anteil der Aktivität im Überstand zur Aktivität in den Zellen berechnet.



**Abb. 3.11 Signifikant erhöhte Sekretion lysosomaler Enzyme bei Vti1a/Vti1b negativen MEF**

Im DKO ist die Sekretion lysosomaler Enzyme gegenüber DHET MEF signifikant erhöht: Bei  $\beta$ -Mannosidase auf  $141 \pm 3$  %,  $\beta$ -Galactosidase  $180 \pm 12$  %,  $\beta$ -Hexosidase  $152 \pm 9$  % und  $\beta$ -Glucuronidase  $195 \pm 10$  %. Triallele MEF zeigen ebenfalls leicht erhöhte Sekretion, die teils statistisch signifikant ist. Für den Versuch wurden Zellen 20 h in serumfreiem Medium inkubiert und die Aktivität lysosomaler Enzyme in Überstand und Medium bestimmt. Die Sekretion wurde als Anteil [Aktivität Überstand] / [Aktivität Zellen] angegeben und auf DHET normiert. Fehlerbalken sind SEM aus 3–5 Versuchen an den Zelllinien T und TBL6; die Ergebnisse wurden auch für die Zelllinie E bestätigt. \* bezeichnet statistische Signifikanz im t-Test nach Student (zweiflächig, gepaart,  $p < 0,05$ ); die statistische Auswertung erfolgte vor Normierung der Werte.

Auf diese Weise wurde die Sekretion für MEF der E-, T- und TBL6-Linie bestimmt. Da diese Zelllinien jeweils ein unterschiedliches Hintergrundniveau an Sekretion zeigten, wurden die Ergebnisse zum besseren Vergleich auf DHET normalisiert (Abb. 3.11).

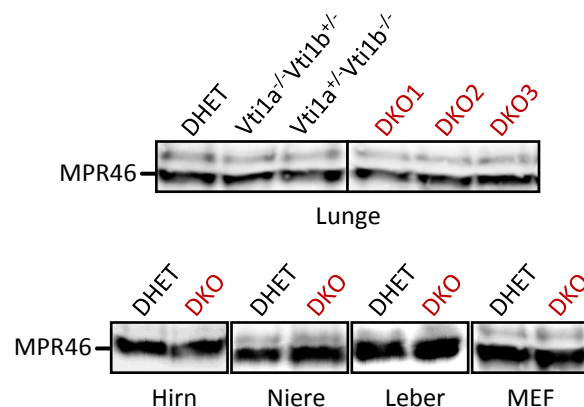
Es zeigte sich, dass in DKO MEF gegenüber DHET alle vier getesteten lysosomalen Enzyme in signifikant höherem Maße sekretiert wurden. Die Sekretion von  $\beta$ -Mannosidase war auf  $141 \pm 3$  % erhöht, die von  $\beta$ -Galactosidase auf  $180 \pm 12$  %,  $\beta$ -Hexosidase auf  $152 \pm 9$  % und  $\beta$ -Glucuronidase auf  $195 \pm 10$  %. Auch in den triallelen MEF war die

Sekretion leicht erhöht; die Erhöhung war hier vor allem bei *Vti1a*<sup>-/-</sup>*Vti1b*<sup>+/-</sup> Zellen gegenüber DHET signifikant. Die Ursache dieser erhöhten Sekretion ist vermutlich auf eine Beeinträchtigung des MPR-vermittelten Transports zurückzuführen. Dabei könnte das Expressionsniveau eines oder beider MPR verändert sein oder aber ein Defekt im Recycling der Rezeptoren vorliegen.

### 3.2.4.2 Proteinmenge der Mannosephosphatrezeptoren

Das Proteinniveau von MPR46 wurde in den hergestellten Zelllinien sowie in embryonalem Mausemewebe überprüft, um Rückschlüsse auf den Mechanismus der erhöhten Sekretion lysosomaler Enzyme zu erhalten (3.2.4.1). Dafür wurden Zellextrakte und Gewebshomogenate von E18,5 Embryonen per SDS-PAGE und anschließendem Westernblot analysiert. Eine ebenfalls angestrebte Analyse des MPR300-Proteinniveaus ließ sich aufgrund der mangelhaften Qualität des MPR300-Antikörpers im Westernblot nicht realisieren.

Das MPR46 Proteinlevel unterschied sich in den getesteten MEF nicht wesentlich (Abb. 3.12). Innerhalb mehrerer unabhängiger Versuche zeigten sich zwischen DHET und DKO Schwankungen des MPR-Niveaus, die jedoch keine eindeutigen Tendenzen aufwiesen. Ebenso verhielt es sich mit den getesteten Gewebshomogenaten: Teils unterschieden sich die MPR-Konzentrationen, allerdings auch innerhalb gleicher Genotypen eines Wurfs, teils waren sie vergleichbar. Hier sind die Schwankungen eventuell dadurch zu erklären, dass die präparierten Embryonen unterschiedlich vital waren. In einigen Geweben könnte daher bereits Proteolyse eingesetzt haben. Da die Unterschiede im Gehalt an MPR46 in MEF und Geweben insgesamt nicht signifikant waren, ist dies als Ursache für die erhöhte Sekretion lysosomaler Enzyme auszuschließen.



**Abb. 3.12 MPR46 Proteinlevel unterscheiden sich in MEF und Gewebe nicht signifikant**

MEF und Gewebeproben gleicher Konzentration von E18,5 Embryonen wurden per SDS-PAGE und anschließendem Westernblot auf ihren MPR46-Gehalt analysiert. Das MPR-Niveau schwankt teilweise zwischen DHET und DKO oder auch unterschiedlichen Proben eines Gewebes gleichen Genotyps. Insgesamt lässt sich keine eindeutige Tendenz für eine erhöhte oder verringerte Expression von MPR46 in DKO gegenüber DHET feststellen.

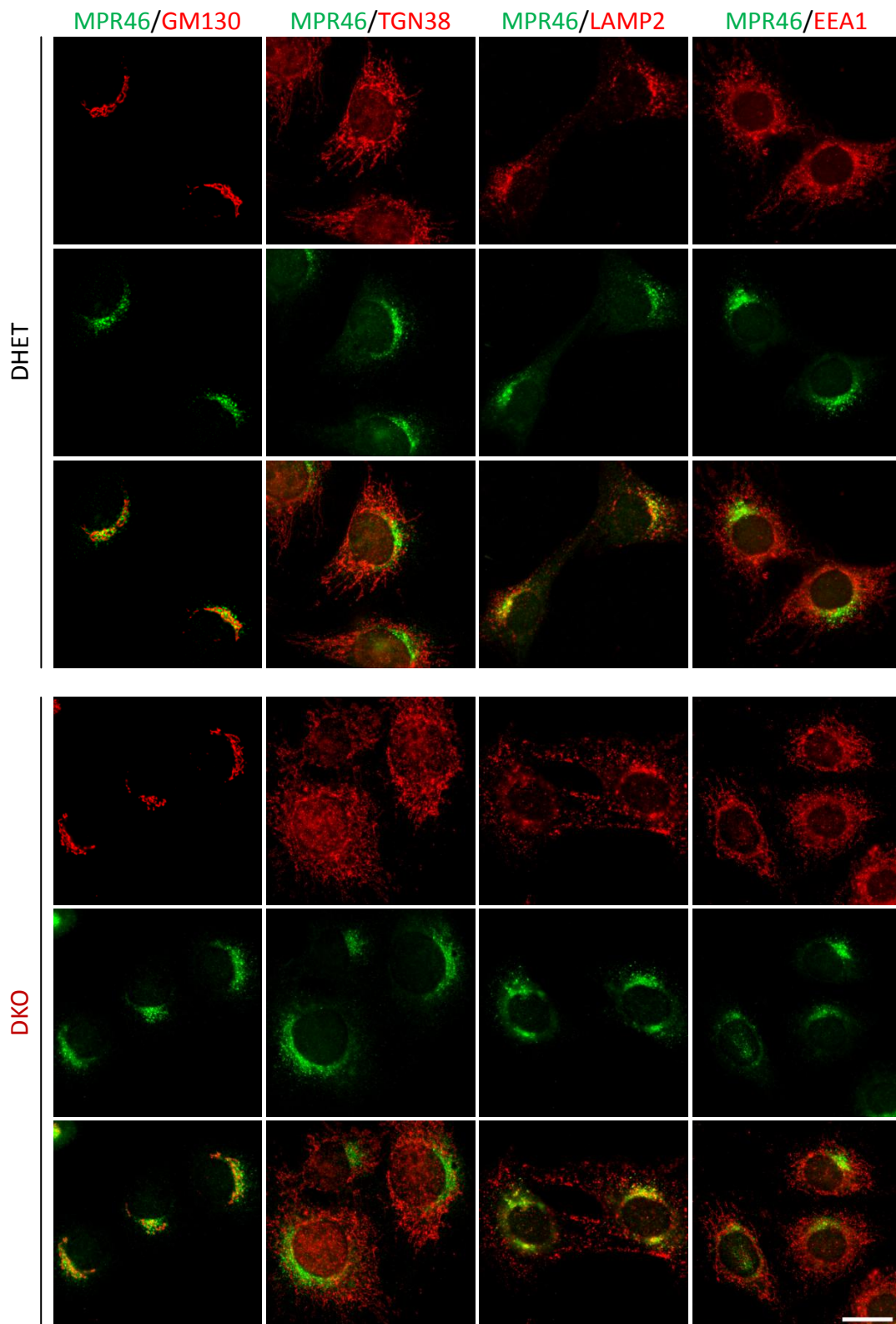


### 3.2.4.3 Die Lokalisation von MPR46 und MPR300 ist unverändert

Ein Defekt im MPR-vermittelten Transport könnte auch durch eine Fehllokalisierung von MPR46 oder MPR300 entstehen. Eine Anreicherung der MPR in einem bestimmten Kompartiment könnte auf einen nicht funktionalen oder mit verminderter Kinetik ablaufenden Transportschritt schließen lassen. Die Transportroute von MPR46 und MPR300 umfasst das TGN sowie früh- und spätendosomale Kompartimente (Figura *et al.* 1986). Zur Lokalisation der MPR wurden sie in DHET und DKO MEF mit Markern dieser Kompartimente co-immunofärbt.

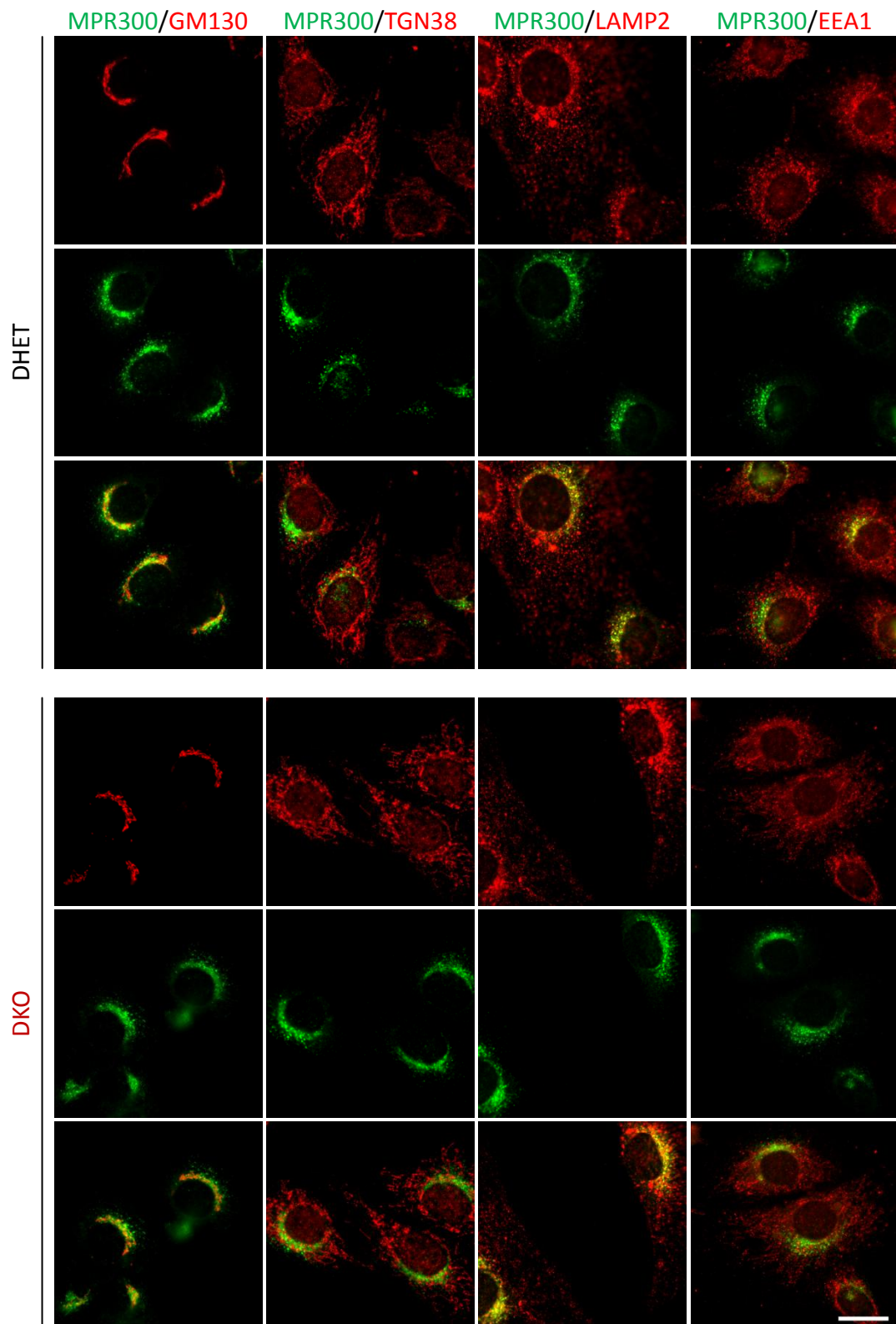
Sowohl MPR46 als auch MPR300 waren in DHET und DKO MEF sichelförmig in vesikulären Strukturen um den Zellkern verteilt (Abb. 3.13 und Abb. 3.14). Die Vesikel schienen, über eine Vielzahl von Zellen betrachtet, in DKO MEF geringfügig disperser zu sein als in DHET. Die Colokalisationen waren jedoch in Zelllinien beider Genotyps gleich: Die MPR waren jeweils nahe an den Strukturen des Golgi-Apparats (GM130) zu finden und colokalisierten nicht mit TGN (TGN38) oder frühen Endosomen (EEA1). MPR-positive Vesikel colokalisierten jeweils teilweise mit dem spätendosomal-lysosomalen Marker LAMP2. Die Colokalisation war in Bereichen mit geringer Vesikeldichte gut erkennbar (Pfeilspitzen, Abb. 3.15 A). Auch im kernnahen Bereich, in dem sich endosomale Kompartimente häufen, war die sichtbare Colokalisation kein durch die Vesikeldichte hervorgerufenen Artefakt. Der angefertigte *Linescan* zeigte, dass die Intensität der Fluoreszenz von MPR und LAMP2 entlang einer Linie im Bild teils voneinander abwich, teils aber exakt parallel verlief (Abb. 3.15 B). Diese parallelen Bereiche im Intensitätsverlauf deuteten darauf hin, dass sich dort MPR und LAMP2 im gleichen Kompartiment befanden.

Insgesamt sind die Mannosephosphatrezeptoren demnach in DKO MEF geringfügig disperser verteilt als in DHET, die Colokalisation mit verschiedenen Organellenmarkern aber ist unverändert und entspricht den Erwartungen. Eine Akkumulation in einem der getesteten Kompartimente ist nicht zu beobachten.



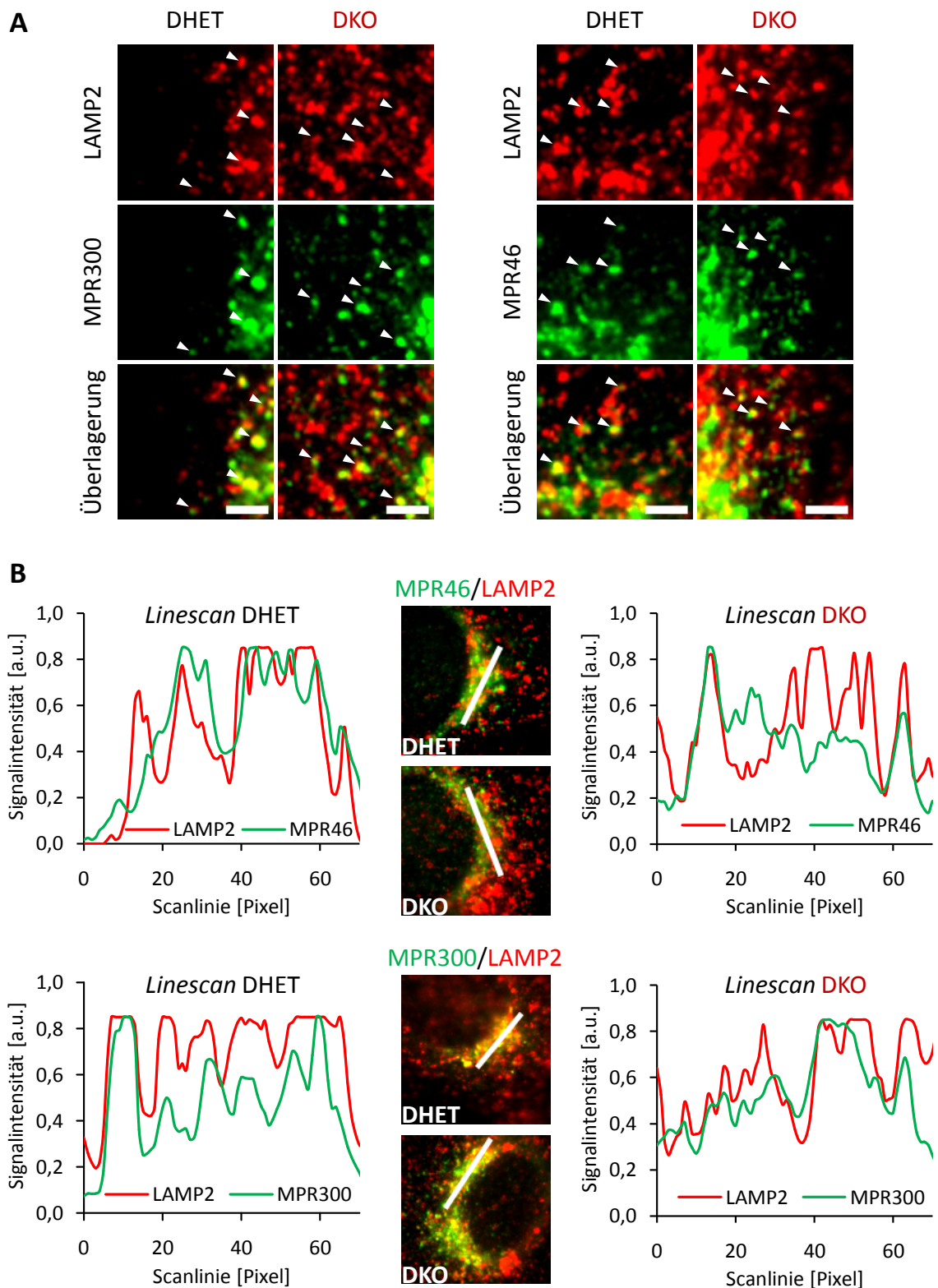
**Abb. 3.13 Die Lokalisation von MPR46 ist in DKO gegenüber DHET MEF nicht verändert**

MPR46 (jeweils grün) ist in vesikulären Strukturen sichelförmig um den Zellkern verteilt. Die Colokalisation mit dem Golgi-Marker GM130 zeigt, dass MPR46 jeweils dicht am, nicht aber im *cis*-Golgi-Apparat zu finden ist. MPR46 colokalisiert nicht mit dem TGN-Marker TGN38 oder dem Marker für frühe Endosomen EEA1, wohl aber teilweise mit LAMP2 als spätendosomal-lysosomalem Marker (siehe Abb. 3.15). Es besteht kein Unterschied zwischen DHET und DKO Zellen. Zur Immunfärbung wurden die Zellen jeweils auf Deckgläsern kultiviert, PFA-fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern co-inkubiert. Gezeigt: TBL6-Linie; durchgeführt auch mit T- und E-Linie. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.14 Die Lokalisation von MPR300 ist in DKO MEF gegenüber DHET nicht verändert**

Wie MPR46 auch ist MPR300 (jeweils grün) in vesikulären Strukturen halbmondförmig um den Zellkern verteilt. Die Co-Färbung mit den Markern für Golgi-Apparat (GM130), TGN (TGN38), frühen Endosomen (EEA1) und späten Endosomen / Lysosomen (LAMP2) zeigt keine Unterschiede zwischen DHET und DKO MEF auf. MPR300 lokalisiert am, aber nicht im Golgi, colokalisiert nicht mit TGN oder frühen Endosomen, jedoch teilweise mit späten Endosomen / Lysosomen (siehe Abb. 3.15). Zur Immunfärbung wurden die Zellen jeweils auf Deckgläsern kultiviert, PFA-fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern co-inkubiert. Gezeigt: TBL6-Linie; durchgeführt auch mit T- und E-Linie. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.15 MPR46 und MPR300 colokalisieren in DHET und DKO mit LAMP2**

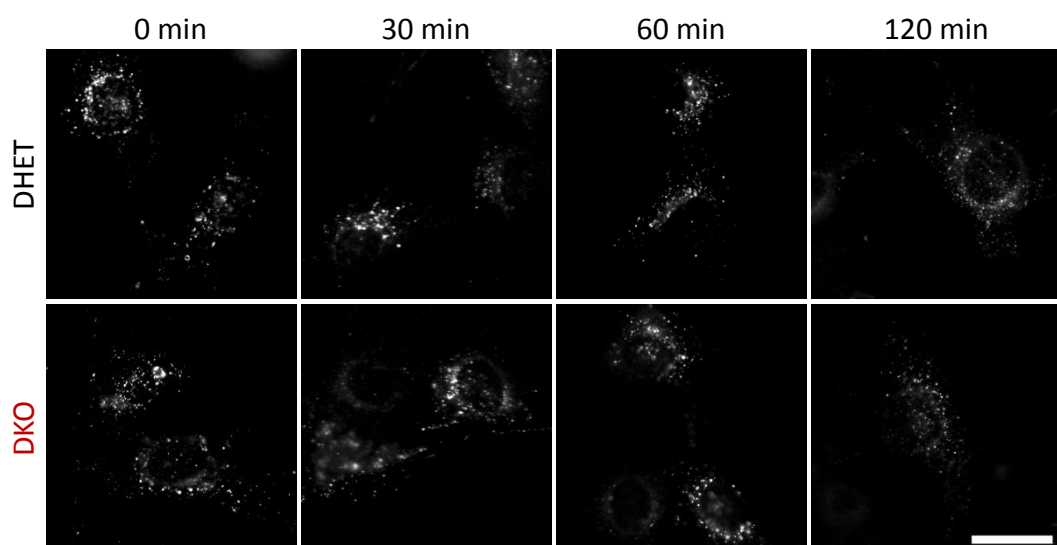
Die teilweise Colokalisation der MPR (grün) mit dem spätendosomal-lysosomalen Kompartiment (LAMP2, rot) ist in DHET und DKO MEF etwa gleich ausgeprägt. **A** In Bereichen mit geringerer Vesikelkonzentration sind einzelne Colokalisationen von MPR und LAMP2 gut zu erkennen (Pfeilspitzen). Maßstab: 2,5  $\mu\text{m}$ . **B** Auch in Kernnähe ist die gezeigte Colokalisation kein Artefakt erhöhter Vesikeldichte. Die Fluoreszenzintensität wurde für die getrennten Kanäle (MPR: GFP-Kanal, LAMP2: Cy3-Kanal) im Mikroskopiebild entlang einer 1 Pixel breiten Linie in Kernnähe per ImageJ bestimmt (weiße Linie). Die Intensitätsverläufe der Kanäle wurden überlagert. Bereiche, in denen die Intensität der Kanäle parallel verläuft, deuten auf eine Lokalisation von MPR und LAMP2 im gleichen Vesikel hin.

### 3.2.5 DKO MEF haben keine Defekte in der Endozytose

Da Vti1a und Vti1b an früh- und spätesomalen Transportschritten beteiligt sind, wurde untersucht, ob ein Fehlen der beiden Proteine eine Beeinträchtigung der Endozytose extrazellulären Materials zur Folge hat. Extrazelluläre Materialien können auf unterschiedlichen Wegen endozytiert werden. Daher wurde die Aufnahme von drei Markern analysiert, die jeweils einen anderen Mechanismus zur Endozytose benötigen. FITC-gekoppeltes Dextran wurde als Marker für unspezifische Pinozytose und FITC-gekoppeltes Cholera-toxin als Marker für caveolaespezifische Endozytose eingesetzt. Zum Test der clathrinvermittelten Endozytose wurde Bodipy-markiertes *Low Density Lipoprotein* (LDL) benutzt.

#### 3.2.5.1 Unspezifische Aufnahme von niedermolekularem Dextran

Niedermolekulares, FITC-gekoppeltes Dextran wird rezeptorunabhängig in Zellen endozytiert und dann über frühe und späte Endosomen zum Lysosom transportiert (Berlin und Oliver 1980; Chastellier *et al.* 1983). Dort akkumuliert es aufgrund seiner Resistenz gegen saure Hydrolasen (Ohkuma und Poole 1978). Zur Untersuchung der unspezifischen Endozytose wurden MEF auf Deckgläsern kultiviert, kurz gewaschen und mit 2 mg/mL Dextran-FITC in DMEM BSA für 30 min unter Standardbedingungen kultiviert. Nach so erfolgter Aufnahme des Dextrans wurde das Medium abgenommen und durch DMEM Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten inkubiert, dann PFA-fixiert und auf Objektträger aufgebracht.



**Abb. 3.16 Die Pinozytose von Dextran verläuft in DHET und DKO MEF gleich**

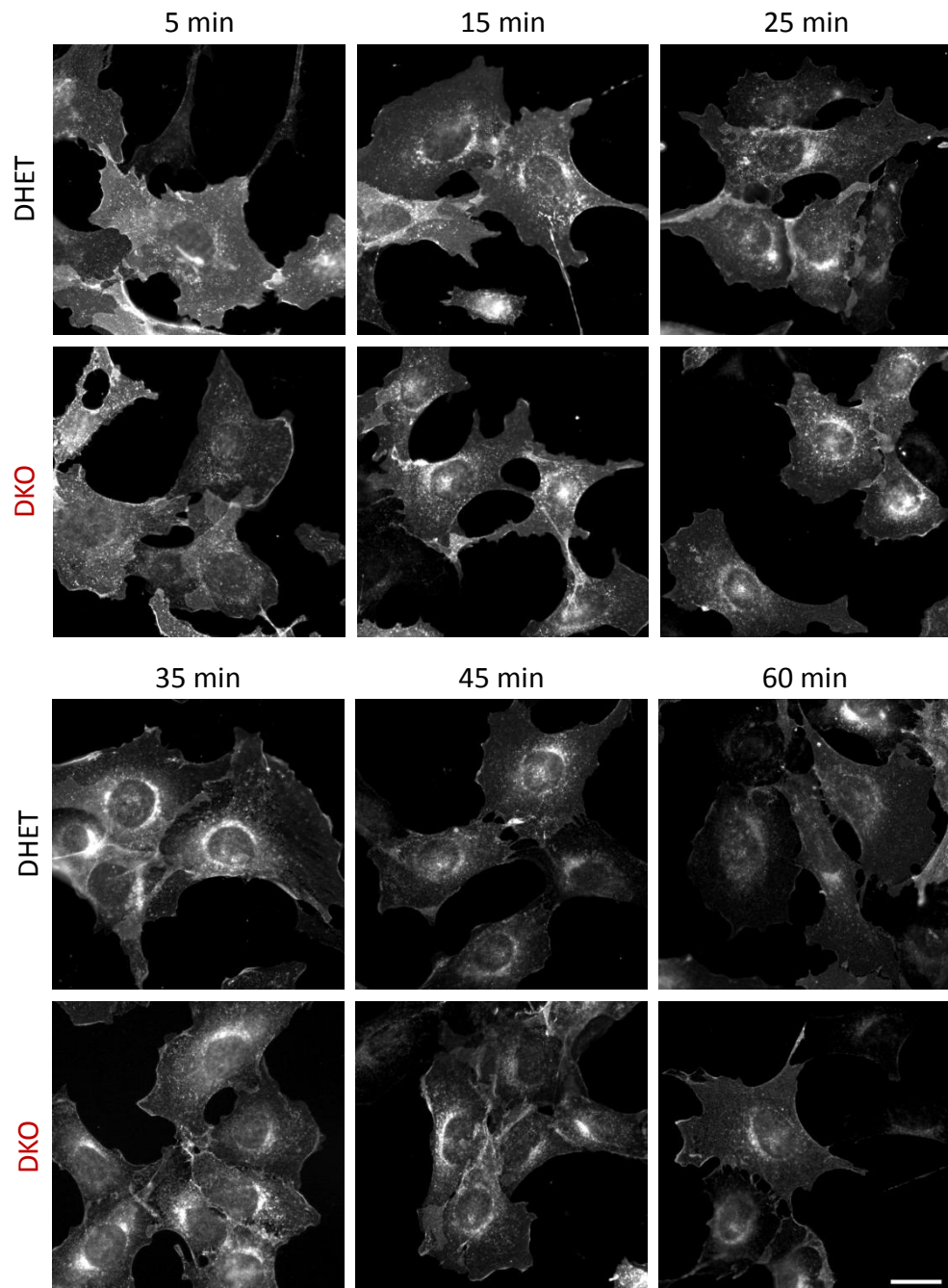
In beiden Zelllinien ist bereits am Zeitpunkt direkt nach der Dextran-Aufnahme (0 min) eine Lokalisation in endosomalen Strukturen zu erkennen. Diese Verteilung bleibt über den beobachteten Zeitraum fast unverändert. Die Zellen wurden für 30 min mit Dextran-FITC (MW = 15000 kDa) beladen, für die angegebenen Zeiten mit Vollmedium inkubiert und anschließend PFA-fixiert. Der Versuch wurde mehrmals mit der T-Linie durchgeführt. Maßstab: 20  $\mu$ m.

Bereits direkt nach der Aufnahme des Dextrans befand sich ein Großteil des Materials in größeren vesikulären Strukturen (Abb. 3.16). Nur ein Bruchteil war in kleineren Strukturen zu sehen, die frühe Zeitpunkte der Aufnahme an der Membran darstellen. Nach 30 min befand sich sämtliches Dextran in Vesikeln mit perinukleärer Häufung. Diese Verteilung änderte sich für den beobachteten Zeitraum nicht und entsprach der erwarteten Akkumulation im lysosomalen Kompartiment. Die Aufnahme von niedermolekularem Material über unspezifische Pinozytose und der anschließende Transport ins Lysosom sind also in DKO MEF nicht in kritischem Maße beeinträchtigt.

### 3.2.5.2 Aufnahme von Cholera toxin über Caveolae

Cholera toxin bzw. die hier genutzte Untereinheit B, bindet an der Zellmembran an das in Caveolae lokalisierte Gangliosid GM1 und wird internalisiert (Orlandi und Fischman 1998). Es erreicht Golgi-Apparat und TGN über frühe Endosomen und kann zwischen TGN und ER transportiert werden (Nichols *et al.* 2001; Fujinaga *et al.* 2003). Zum Test der Caveolin-abhängigen Endozytose wurden MEF auf Deckgläsern kultiviert, 2 h in DMEM BSA ausgehungert, 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und im Anschluss 1 h mit 2 µg/mL Cholera toxin-FITC auf Eis inkubiert. Nach Wechsel auf vorgewärmtes Vollmedium wurden die Zellen für die jeweils angegebene Zeit bei 37 °C inkubiert, PFA-fixiert und auf Objektträger aufgebracht.

5 min nach Beginn der Inkubation bei 37 °C war eine Färbung überwiegend auf der Plasmamembran und in wenigen, vesikulären Strukturen zu erkennen (Abb. 3.17). Bereits 10–20 min später war Cholera toxin vorwiegend in Golgi-Strukturen um den Kern lokalisiert. Nach 35 min trat eine starke Hintergrundfärbung weitläufig um den Kern herum auf, die darauf hindeutete, dass Cholera toxin das ER erreicht hatte. Die Intensität der Färbungen ließ mit dem Abbau von Cholera toxin im weiteren Verlauf nach. Zwischen DHET und DKO konnte auch hier kein Unterschied im retrograden Transport von der Plasmamembran zu Endosomen, Golgi und ER festgestellt werden.



**Abb. 3.17 Aufnahme und Transport von Cholera toxin zu Golgi und ER sind nicht beeinträchtigt**

Kurz nach der Aufnahme der Cholera toxin-Untereinheit B ist der Marker noch größtenteils auf der Plasmamembran verteilt und zeigt nur wenige verteilte vesikuläre Strukturen. Nach 15 – 25 min befindet sich Cholera toxin in Golgi-Strukturen in Kernnähe. Nach 35 min ist eine ER-Färbung zu beobachten, nach 60 min der Abbau des Materials. DHET und DKO unterscheiden sich nicht.

Die Zellen wurden 2 h ausgehungert, 1 h auf Eis mit Cholera toxin-FITC in DMEM vorinkubiert, für die angegebenen Zeiten bei 37 °C inkubiert und PFA-fixiert. Gezeigt: TBL6-Zellen; ebenso mit Zellen der T-Linie durchgeführt. Maßstab: 20 µm.

### 3.2.5.1 Clathrin-abhängige Endozytose von LDL

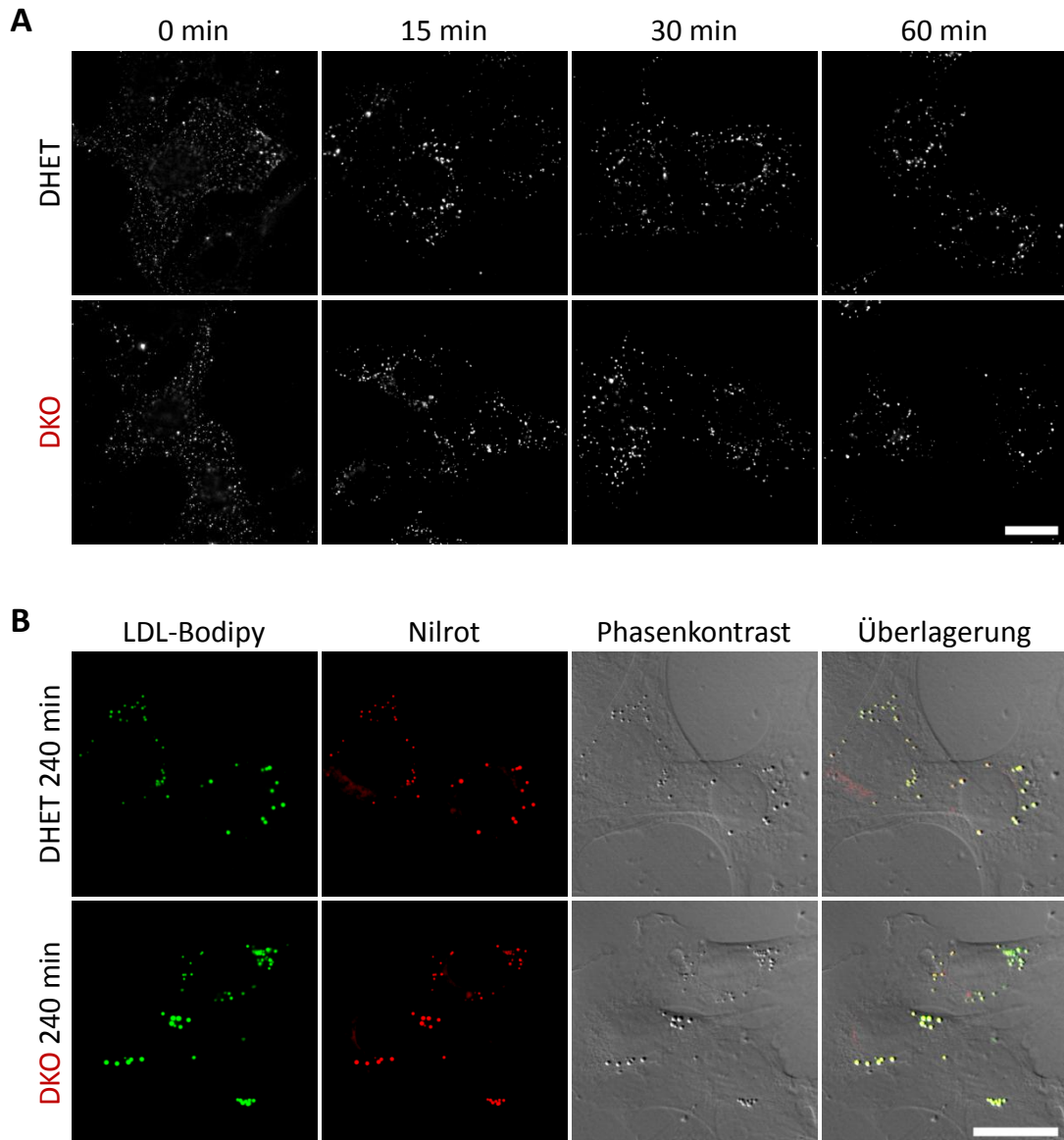
LDL wird über den LDL-Rezeptor in spezialisierten Membranbereichen, den Clathrin *coated pits*, gebunden und Clathrin-abhängig internalisiert. Durch die Ansäuerung im endosomalen Kompartiment diffundiert LDL von seinem Rezeptor. Der LDL-Rezeptor wird zurück an die Zelloberfläche transportiert, während LDL im Lysosom degradiert wird (Anderson *et al.* 1982; Goldstein *et al.* 1985).

Um die Aufnahme und Degradation von LDL zu verfolgen, wurden MEF auf Deckgläsern kultiviert, 2 h in DMEM BSA ausgehungert und 1 h zur Anlagerung mit 10 µg/mL LDL-Bodipy in DMEM BSA auf Eis vorinkubiert. Das Medium wurde gegen Vollmedium ausgetauscht, die Zellen für die angegebenen Zeiten bei 37 °C inkubiert und PFA-fixiert.

Nach Anlagerung von LDL an die Zellen war zunächst eine gleichmäßig feine, punktuelle Verteilung auf der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 3.18 A). Nach 15 min war das LDL in größeren vesikulären Strukturen zu erkennen. Die Anzahl kleinerer Vesikel wurde nach 30 min geringer. Zwischen 30 min und 60 min begann die Bildung einiger auffallend großer LDL-Strukturen, die auch im Phasenkontrast sichtbar waren (nicht gezeigt). Nach 4 h waren keine kleineren Vesikel zu sehen; sämtliches fluoreszentes Material befand sich in wenigen großen Strukturen, die eine für Lysosomen untypische Verteilung hatten und im Phasenkontrast deutlich sichtbar waren (Abb. 3.18). Eine Anfärbung mit Nilrot zeigte, dass es sich um Lipidtropfen innerhalb der Zellen handelte (Überlagerung, Abb. 3.18). Nach Aufnahme von LDL im Überschuss wird daraus hydrolysiertes Cholesterin in veresterter Form in diesen Strukturen gespeichert (Brown *et al.* 1980). Bodipy ist, wie Nilrot auch, ein Marker für solche Lipidakkumulationen (Ohsaki *et al.* 2010).

Zusammengefasst zeigt der Versuch, dass die clathrinabhängige Endozytose von LDL in DHET und DKO MEF gleich verläuft. LDL wird aufgenommen, hydrolysiert und daraus entstandenes Cholesterin in Lipidtropfen gespeichert. Die Speicherung und Hydrolyse von Fettsäuren in Lipidtropfen wurde in 3.2.8 nochmals gesondert untersucht.





**Abb. 3.18** In DHET und DKO MEF wird LDL-Bodipy gleichermaßen aufgenommen und degradiert

DKO und DHET MEF wurden ausgehungert, 1 h mit LDL-Bodipy auf Eis vorinkubiert, für die angegebenen Zeiten in Vollmedium bei 37 °C inkubiert und PFA-fixiert. **A** LDL ist zunächst in feinen Strukturen an der Plasmamembran verteilt (0 min), dann in größeren vesikulären Strukturen sichtbar (15 min). Maßstab: 20 µm. **B** Im Verlauf des Experiments bilden sich im Phasenkontrast sichtbare, große Strukturen, in denen sich nach 4 h sämtliches fluoreszentes Material befindet. Nilrotfärbung der Zellen zeigt, dass es sich um Lipidtropfen handelt. Gezeigt: TBL6-Linie. Ebenfalls mit T- und E-Linie durchgeführt. Maßstab: 20 µm.

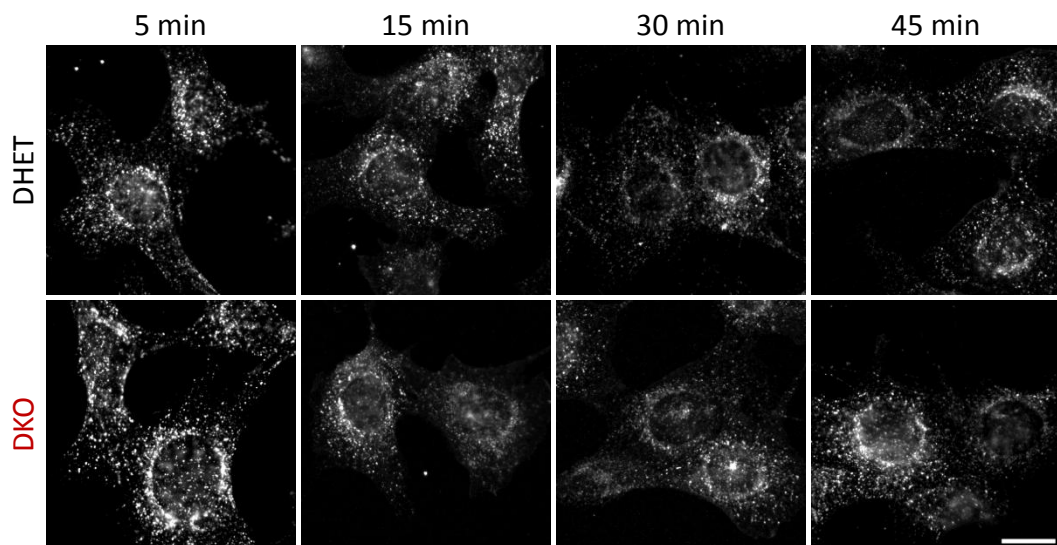
### 3.2.6 Das Recycling von Transferrin ist in DKO MEF nicht gestört

Da in den getesteten Endozytosewegen (3.2.5) kein Defekt vorlag, wurde überprüft, ob Vti1a/Vti1b negative Zellen in anschließenden Transportschritten Beeinträchtigungen zeigen. Mit Eisen gesättigtes Transferrin wird über den Transferrin-Rezeptor zunächst Clathrin-abhängig endozytiert. Nach Ansäuerung im endosomalen System wird das gebundene Eisen abgegeben. Das Transferrin selbst wird über das Recycling-Endosom

wieder zur Plasmamembran transportiert und zur Bindung von neuem Eisen freigesetzt (Daniels *et al.* 2006).

### 3.2.6.1 Aufnahme von Transferrin

Zunächst wurde geprüft, ob die Endozytose von Transferrin im DKO ähnlich zu DHET MEF abläuft. Zwar wird Transferrin über ähnliche Mechanismen internalisiert wie das bereits als unauffällig getestete LDL, bereits kurz nach der Internalisierung befinden sich Transferrin und LDL aber in frühen Endosomen leicht unterschiedlichen Charakters (Lakadamyali *et al.* 2006). Für das Experiment wurden Zellen auf Deckgläsern kultiviert, zur maximalen Oberflächenpräsenz des Transferrin-Rezeptors 1 h mit DMEM BSA ausgehungert und zur Bindung 30 min mit 50 µg/mL Transferrin-Alexa546 in DMEM BSA auf Eis inkubiert. Nach Inkubation bei 37 °C für die angegebenen Zeiten wurden die Zellen PFA-fixiert und auf Objektträger aufgebracht.



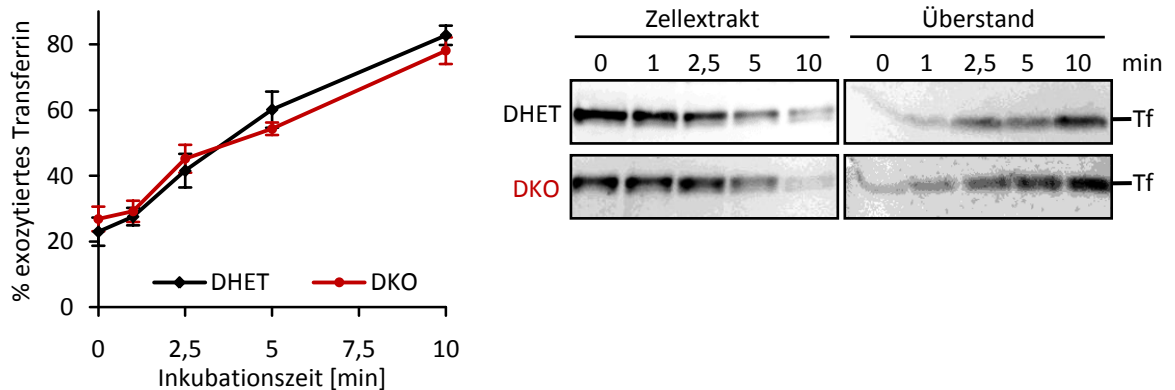
**Abb. 3.19 Die Clathrin-abhängige Aufnahme von Transferrin zeigt keine Unterschiede**

5 min nach Rezeptorbindung des Transferrins ist es über das Zytoplasma verteilt in vesikulären Strukturen mit perinukleärer Häufung lokalisiert. Dieses Bild ändert sich in DHET und DKO MEF über den beobachteten Zeitraum kaum. Die Zellen wurden 1 h ausgehungert, 30 min mit Transferrin-Alexa546 auf Eis vorinkubiert, für die angegebenen Zeiten bei 37 °C in Vollmedium belassen und PFA-fixiert. Gezeigt: T-Linie; ebenfalls mit E-Linie durchgeführt. Maßstab: 20 µm.

Schon 5 min nach Rezeptorbindung war Transferrin internalisiert und befand sich in vesikulären Strukturen vor allem in der Nähe des Zellkerns. Während im Verlauf des Beobachtungszeitraumes die Fluoreszenzintensität nachließ, wies die Verteilung keine größeren Veränderungen mehr auf. Dies entsprach den Erwartungen und war in DHET und DKO MEF gleichermaßen der Fall.

### 3.2.6.2 Exozytose von internalisiertem Transferrin

Um nach der Aufnahme auch die Abgabe des Transferrins verfolgen zu können, wurden Zellen nach dem Aushungern in DMEM BSA für 30 min bei 37 °C mit 50 µg/mL biotinyliertem Transferrin in DMEM BSA inkubiert. Nach so erfolgter Sättigung der Zellen mit Transferrin-Biotin wurde auf der Oberfläche verbleibendes Transferrin mit eiskalter Essigsäure und anschließendem Waschen entfernt. Die Zellen wurden dann für die angegebene Zeit mit einem Überschuss unmarkierten Holo-Transferrins in Vollmedium inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, ebenso wie die Zellen mit Stop-Puffer versetzt und per SDS-PAGE und anschließendem Westernblot auf den Gehalt an biotinyliertem Transferrin untersucht. Exozytiertes Transferrin wurde als Anteil des Transferrins im Medium gegenüber dem Anteil in den Zellen berechnet.



**Abb. 3.20 Die Exozytose internalisierten Transferrins verläuft in DKO und DHET mit gleicher Kinetik**

Sowohl in DHET als auch in DKO MEF wird innerhalb von 10 min ein Großteil des endozytierten Transferrins (Tf) abgegeben: Bei DHET  $83 \pm 3 \%$ , bei DKO  $78 \pm 4 \%$ . Im Westernblot, wie auch im Verlauf des Graphen, wird deutlich, dass die Kinetik der Transferrin-Exozytose vergleichbar ist.

MEF wurden mit biotinyliertem Transferrin gesättigt, auf der Oberfläche befindliches Transferrin entfernt und die Zellen dann für die angegebenen Zeiten in Vollmedium mit Überschuss an unmarkiertem Transferrin inkubiert. Überstände und Zellextrakte wurden per SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot auf den Gehalt an biotinyliertem Transferrin untersucht. Beispiele für erhaltene Westernblots mit Detektion von Transferrin durch Streptavidin-HRP sind gezeigt. Der Graph zeigt den per Densitometrie über ImageJ ermittelten Verlauf aus 4 unabhängigen Versuchen; Fehler sind SEM. Exozytiertes Transferrin wurde als Quotient [Transferrin Überstand] / [Transferrin Zellextrakt] errechnet. Der Versuch wurde mit T- und E-Linie durchgeführt.

Die Kinetik der Transferrin-Exozytose war in DHET und DKO MEF identisch (Abb. 3.20). Innerhalb der ersten 10 min hatten die Fibroblasten  $83 \pm 3 \%$  (DHET) bzw.  $78 \pm 4 \%$  (DKO) des Materials in den Überstand abgegeben. Im weiteren Verlauf näherten sich beide Zelllinien asymptotisch der vollständige Exozytose (nicht gezeigt).

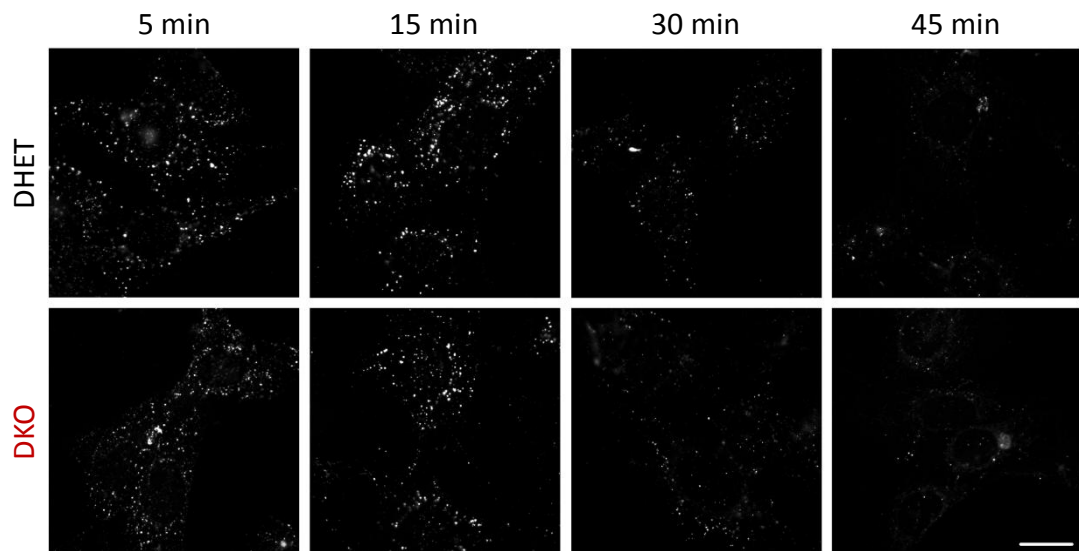
Aufnahme (3.2.6.1) und Abgabe von Transferrin sind demnach im DKO nicht beeinträchtigt. Das Recycling nach Clathrin-vermittelter Aufnahme über frühes Endosom, Recycling-Endosom und die anschließende Exozytose des Transferrins an der Plasmamembran laufen mit unveränderter Kinetik ab.

### 3.2.7 EGF-Rezeptor Abbau, Signalgebung und Dysregulation

Die Signalgebung des *Epidermal Growth Factor Receptors* (EGFR) wird durch Endozytose und anschließende Degradation reguliert (Carpenter *et al.* 1976). Nach EGF-Stimulation dimerisiert der membranständige EGF-Rezeptor und wird internalisiert. Der EGF-EGFR-Komplex wird anschließend über den *Multivesicular Body* (MVB) zur Degradation ins Lysosom transportiert (Futter *et al.* 1996). In HeLa-Zellen injizierte Antikörper gegen Vti1b resultieren in einem verzögerten EGFR-Transport (Antonin *et al.* 2000). Es wurde daher geprüft, wie sich die Vti1a/Vti1b Doppeldefizienz auf Abbau und Signalgebung des EGF-Rezeptors auswirken.

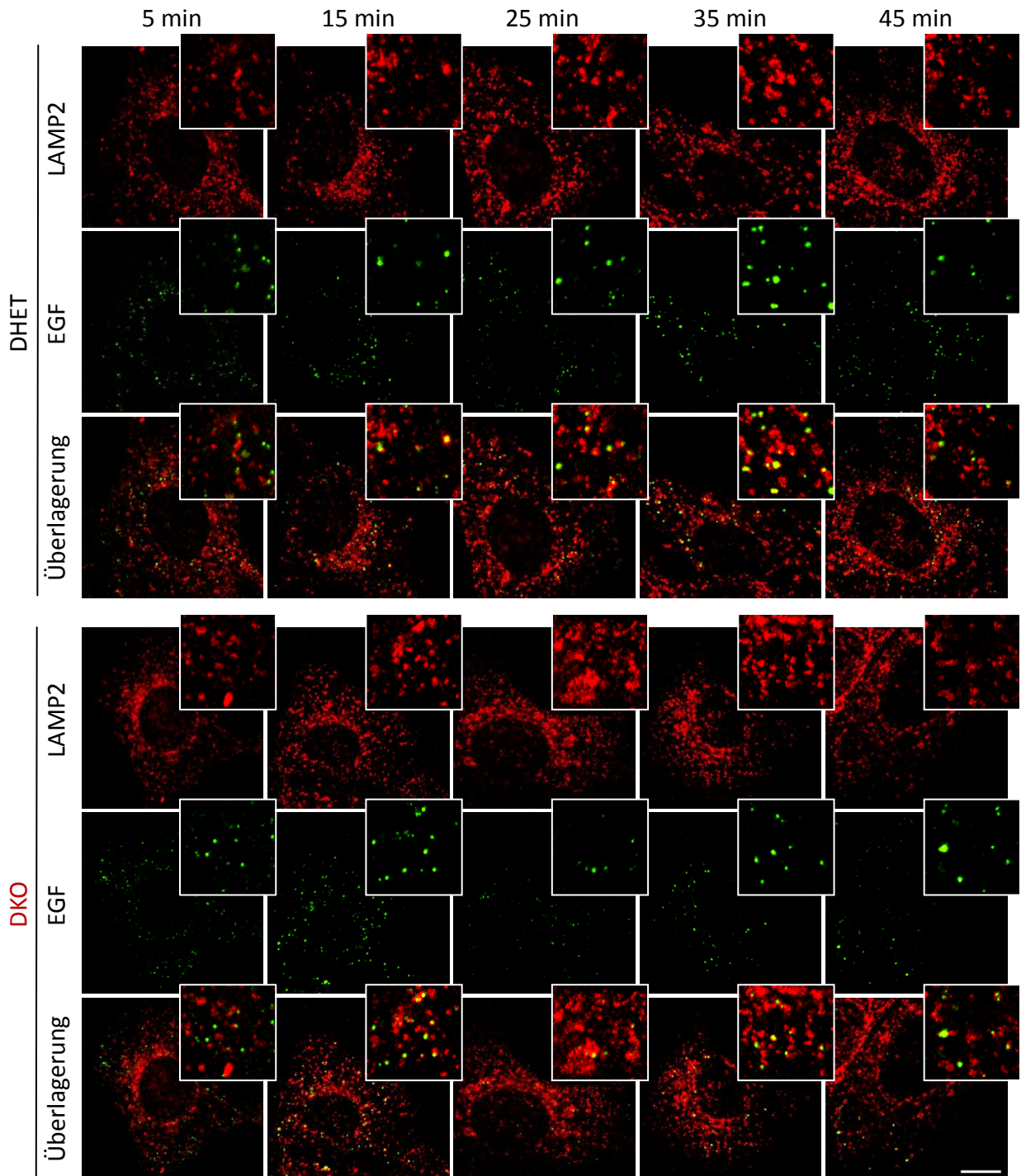
#### 3.2.7.1 Aufnahme und Transport von EGF zum Lysosom

Da EGF und EGF-Rezeptor nach der Aufnahme in die Zelle bis zur Degradation komplexiert bleiben, kann der Transport und Abbau von EGFR über fluoreszenzgekoppeltes EGF mikroskopisch verfolgt werden. Dazu wurden MEF für 2 h in DMEM BSA ausgehungert und zur Anlagerung 1 h auf Eis mit 1 µg/mL EGF-Alexa488 in DMEM BSA inkubiert. Nach Wechsel auf Vollmedium wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten bei 37 °C inkubiert und dann PFA- oder Methanolfixiert. Teils folgte eine Immunfärbung des spätendosomal-lysosomalen Markers LAMP2.



**Abb. 3.21 Aufnahme und Abbau von EGF-Alexa488 ist in DKO MEF nicht beeinträchtigt**

EGF ist nach 5 min Inkubation bei 37 °C in endosomalen Strukturen zu beobachten. Die Präsenz der Färbung ist nach 15 min am stärksten, bei 30 min bereits deutlich schwächer und bei 45 min fast verschwunden. Die Zellen wurden 2 h ausgehungert, 1 h auf Eis mit EGF-Alexa488 in DMEM BSA vorinkubiert und dann für die angegebenen Zeiten in Vollmedium bei 37 °C inkubiert. Gezeigt: TBL6-Linie. Ebenfalls mit T- und E-Linie durchgeführt. Maßstab: 20 µm.



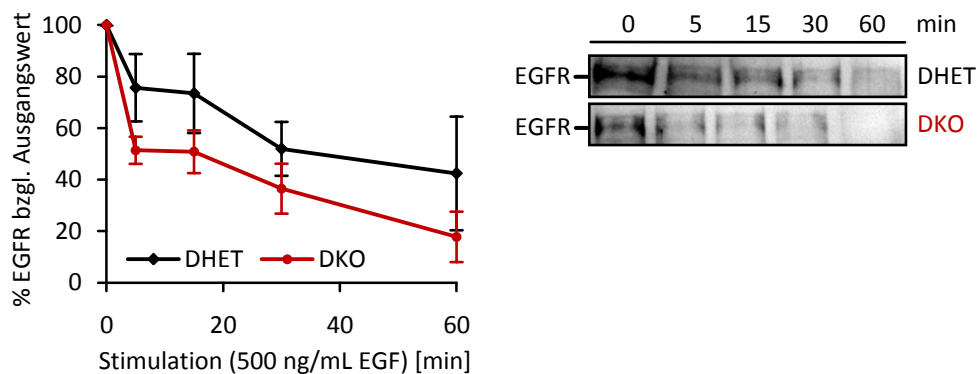
**Abb. 3.22 Der EGF-Transport zum Lysosom verläuft in DKO und DHET mit ähnlicher Geschwindigkeit**

EGF und der spätendosomal-lysosomale Marker LAMP2 sind 5 min nach beginnender Endozytose in deutlich getrennten Strukturen sichtbar (Vergrößerung). 10 min später colokalisieren EGF und LAMP2 teilweise. Nach 35 min befindet sich sämtliches EGF im spätendosomal-lysosomalen Kompartiment. MEF wurden 2 h ausgehungert, 1 h mit EGF-Alexa488 in DMEM BSA vorinkubiert und dann für die angegebenen Zeiten mit Vollmedium inkubiert. Nach Methanolfixierung wurden die Zellen gegen LAMP2 immungefärbt und konfokale Schnitte der Zellen aufgenommen. Gezeigt: TBL6-Linie; ebenfalls mit T- und E-Linie durchgeführt. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ . Vergrößerung jeweils 2,7x.

Die Aufnahme von EGF erfolgte in DKO und DHET in gleichen Schritten (Abb. 3.21). Kurz nach Beginn der Endozytose befand sich EGF in über die Zelle verteilten, endosomalen Strukturen. Diese endosomale Färbung erreichte nach 15 min ihre höchste Intensität und wurde dann langsam geringer, was mit einem Abbau des EGF-EGFR-Komplexes konform geht. Um zu sehen, zu welchem Zeitpunkt EGF in den Bereich des spätendosomal-lysosomalen Kompartiments eintritt, wurde eine Co-Immunfärbung von LAMP2 angefertigt (Abb. 3.22). Auf den konfokalen Aufnahmen zeigten sich EGF und LAMP2 nach 5 min als deutlich getrennte Strukturen, die nach 15 min teilweise colokalisierten. Spätestens nach 35 min befand sich sämtliches EGF im späten Endosom / Lysosom. Zwischen DHET und DKO konnte dabei nicht unterschieden werden. Der Transport, das Erreichen des Lysosoms und der darauf folgende Abbau des EGF-Rezeptors sind demnach in Vti1a/Vti1b doppeldefizienten MEF nicht beeinträchtigt.

### 3.2.7.2 Degradation des EGF-Rezeptors

In einem alternativen Ansatz wurde direkt die Degradation des EGF-Rezeptors verfolgt. Hierfür wurden die MEF 2 h in DMEM BSA ausgehungert und dann direkt 500 ng/mL EGF in DMEM BSA zugegeben. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten bei 37 °C inkubiert, 2 x mit PBS gewaschen und in Stop-Puffer aufgenommen. Der EGFR-Gehalt der Zellextrakte wurde per SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot analysiert.



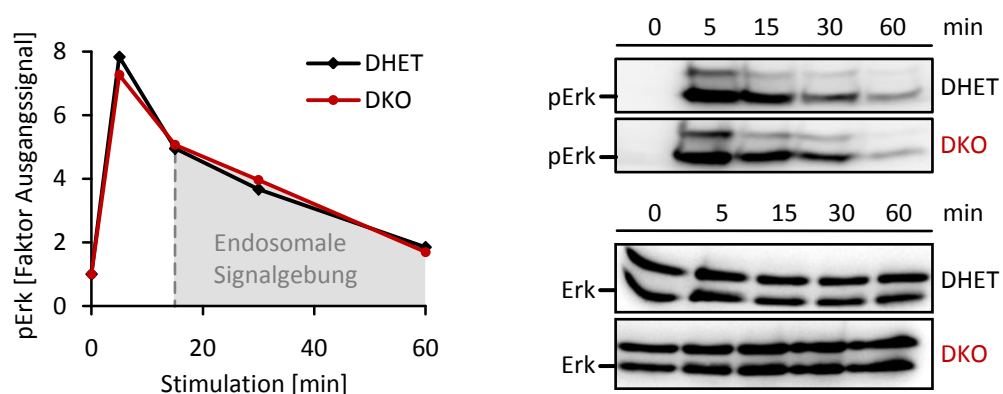
**Abb. 3.23 Die Degradation des EGF-Rezeptors verläuft mit gleicher Kinetik**

In DHET und DKO MEF wurde nach EGF-Stimulation der EGF-Rezeptor schnell abgebaut. Nach 30 min waren im DHET noch  $51 \pm 10\%$ , im DKO  $36 \pm 10\%$  der Ausgangsmenge des Rezeptors vorhanden. Auch im beispielhaft angeführten Westernblot ist in DHET und DKO eine etwa gleich schnelle Degradation erkennbar. Für den Versuch wurden MEF ausgehungert und anschließend mit 500 ng/mL EGF in DMEM BSA stimuliert. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeiten gewaschen, in Probenpuffer aufgenommen und per SDS-PAGE und Westernblot auf ihren EGFR-Gehalt analysiert. Die Westernblots wurden densitometrisch per ImageJ ausgewertet und die Bandenintensitäten auf den EGFR-Gehalt bei 0 min normalisiert. Fehler sind SEM aus 4 unabhängigen Versuchen (TBL6-Linie; ebenfalls mit T-Linie und E-Linie durchgeführt).

Es zeigte sich, dass der EGF-Rezeptor in DHET und DKO MEF mit gleicher bzw. im DKO etwas beschleunigter Kinetik abgebaut wird (Abb. 3.23). 30 min nach Beginn der Rezeptorinternalisierung waren in DHET MEF noch  $51 \pm 10 \%$ , im DKO  $36 \pm 10 \%$  der Ausgangsmenge des Rezeptors vorhanden. Auch wenn im DHET nach 60 min der EGF-Rezeptor im Mittel weniger vollständig degradiert wurde als in DKO MEF, ist der Verlauf des Rezeptorabbaus ähnlich. Dies zeigt, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen des EGF-Transports aus 3.2.7.1, dass Transport und Degradation des EGF-Rezeptors im DKO nicht beeinträchtigt sind.

### 3.2.7.3 Signalgebung und endosomale Lokalisation des EGF-Rezeptors

Nach Internalisierung des aktiven EGF-Rezeptors erfolgt nicht nur dessen Degradation, vielmehr ist die endosomale Lokalisation des Rezeptors maßgeblich an seiner Signalgebung beteiligt (Sorkin und von Zastrow, 2009). Nach EGF-Stimulation wird durch den Rezeptor unter anderem die *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) Signalkaskade aktiviert, was sich durch den Phosphorylierungszustand von *Extracellular Regulated Kinase* 1/2 (Erk1/2 bzw. Erk) verfolgen lässt. Nur bei korrekter spätendosomaler Lokalisation des Rezeptors durch entsprechende Gerüstproteine lässt sich eine starke, über einen längeren Zeitraum anhaltende Phosphorylierung von Erk (pErk) beobachten (Teis *et al.* 2006; Teis *et al.* 2002). Um eine mögliche Fehllokalisierung des EGF-Rezeptorkomplexes im DKO zu überprüfen, wurde das Erk-Signal analysiert. Dafür wurden MEF ausgehungert, mit 500 ng/mL EGF stimuliert und die Zellextrakte per SDS-PAGE und Westernblot analysiert (s.o.). Die Westernblots wurden nach Inkubation mit Antikörpern gegen Erk und pErk ausgewertet.



**Abb. 3.24 Die endosomale Signalgebung des EGF-Rezeptors ist intakt**

Die Phosphorylierung von Erk erreicht bei 5 min ein Maximum, sinkt dann erst stark und nach 15 min im weiteren Verlauf langsam ab. Für den Versuch wurden MEF 2 h ausgehungert und dann mit 500 ng/mL EGF in DMEM BSA stimuliert. Die Zellen wurden in Stop-Puffer gelöst und die Extrakte per SDS-PAGE und anschließendem Westernblot auf Erk und pErk-Gehalt untersucht (Erk1: 42 kDa, Erk2: 44 kDa). Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot. Dieser wurde per ImageJ densitometrisch ausgewertet und graphisch dargestellt: Der pErk1-Gehalt wurde auf den Erk-Gehalt normalisiert und als Faktor des Signals bei 0 min berechnet. Durchgeführt mit TBL6-Zellen.

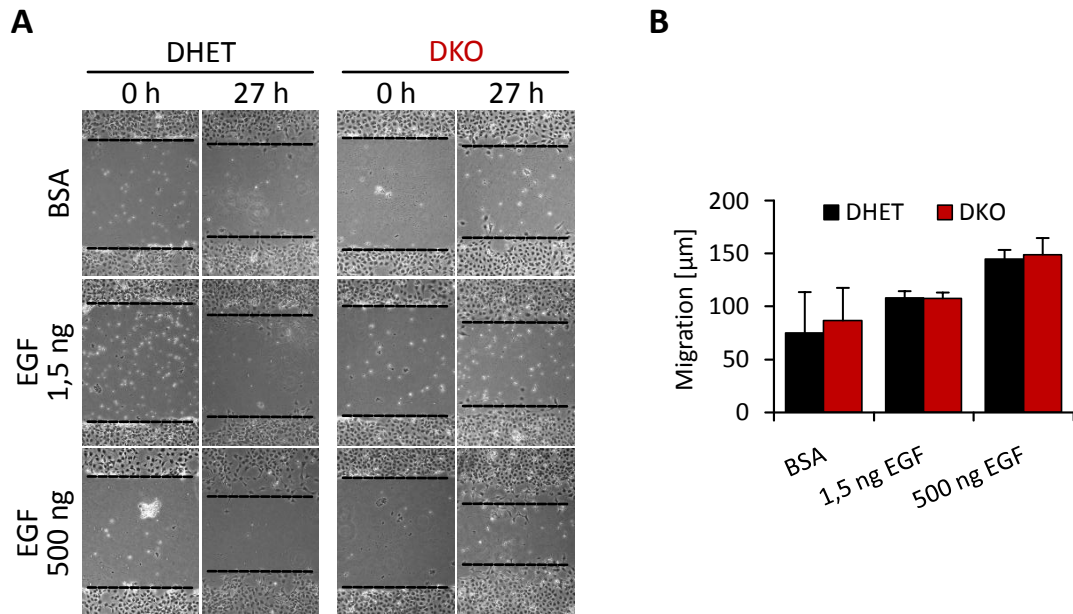
Die endosomale Signalgebung in DKO Zellen war intakt (Abb. 3.24). Das Maximum der Erk-Phosphorylierung nach 5 min war auf die Signalgebung des EGF-Rezeptors von der Plasmamembran zurückzuführen. Der Schulterbereich des Verlaufs, d.h. das langsame Absinken der Phosphorylierung nach 15 min, deutete nach Teis *et al.* auf eine längerfristige Signalgebung des internalisierten Rezeptors im späten Endosom hin. Die Vti1a/Vti1b Doppeldefizienz führte demnach nicht zu einer Fehllokalisierung oder beeinträchtigten Signalgebung des EGF-Rezeptors. Dies lässt den Schluss zu, dass auch die entsprechenden EGFR-Gerüstproteine wie z.B. p14 im endosomalen System korrekt transportiert und lokalisiert werden.

#### 3.2.7.4 EGFR-stimulierte Zellmigration

Die EGFR-Signalgebung ist unter anderem für die Zellmigration essentiell. Fokale Adhäsionspunkte werden durch Transport des aktiven, endosomalen EGF-Rezeptorkomplexes dorthin dynamisch reguliert; dies führt zur Migration der Zellen (Welch und Mullins 2002). Ein Verlust von entsprechenden EGFR-Gerüstproteinen hat eine verminderte Migration zur Folge (Zhang *et al.* 2010). Um auszuschließen, dass das EGFR-Signal im DKO zwar endosomal lokalisiert (3.2.7.3), der anschließende Transport zu fokalen Adhäsionspunkten jedoch beeinträchtigt ist, wurde ein Migrationstest durchgeführt. Dabei wurden MEF zunächst bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 1 d in DMEM BSA ausgehungert. Die Zellschicht wurde durch Abschaben mit einer Pipette auf einer schmalen Linie unterbrochen und die entstandene „Wunde“ in der Zellschicht dokumentiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in DMEM BSA mit 500 ng/mL EGF, 1,5 ng/mL EGF sowie ohne EGF für 27 h inkubiert und abermals die Wunde dokumentiert. Die Differenz der Wundbreite vor- und nach der Inkubation wurde berechnet und die Migration der Zellen als Hälfte dieses Wertes angegeben (Abb. 3.25).

Es stellte sich heraus, dass DHET und DKO MEF gleichermaßen zur Migration stimulierbar waren. Eine EGF-Konzentration von 1,5 ng/mL reichte aus, um eine gegenüber der Kontrolle höhere Migration zu erreichen. Bei Stimulation mit 500 ng/mL legten DHET MEF eine Wegstrecke von  $145 \pm 9 \mu\text{m}$  (Kontrolle:  $75 \pm 39 \mu\text{m}$ ) und DKO MEF  $149 \pm 16 \mu\text{m}$  (Kontrolle:  $87 \pm 31 \mu\text{m}$ ) zurück. Dies lässt den Rückschluss zu, dass nach der korrekten Lokalisation des aktiven EGFR-Komplexes im späten Endosom auch der Transport zu fokalen Adhäsionspunkten ungestört abläuft.





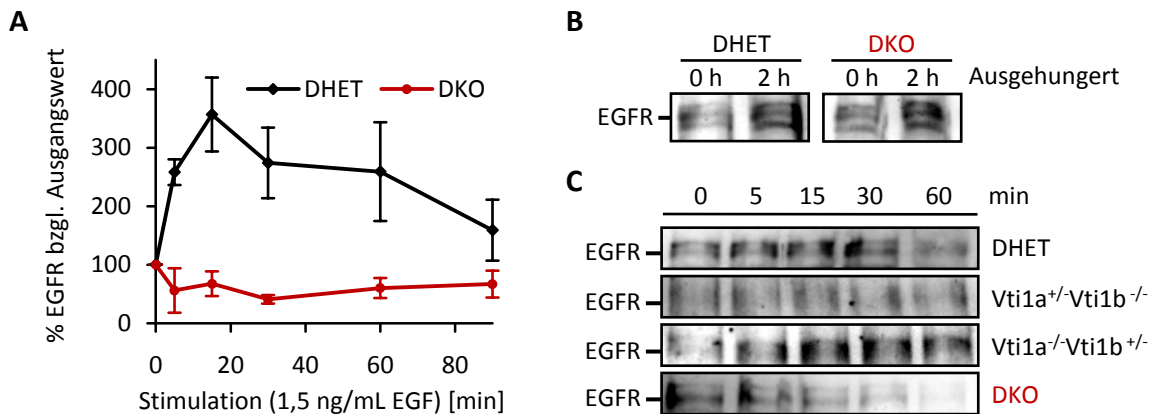
**Abb. 3.25 Die EGF-stimulierte Zellmigration erfolgt in DHET und DKO gleichermaßen**

**A** DHET und DKO Zellen migrieren über eine Lücke in der Zellschicht mit steigender EGF-Konzentration im Medium mehr aufeinander zu. **B** Bereits bei 1,5 ng/mL EGF ist die Migration höher als bei der Kontrolle ohne EGF. Bei Stimulation mit 500 ng/mL EGF beträgt sie schließlich in DHET  $145 \pm 9 \mu\text{m}$  und  $149 \pm 16 \mu\text{m}$  in DKO MEF (ohne EGF: DHET  $75 \pm 39 \mu\text{m}$ , DKO  $87 \pm 31 \mu\text{m}$ ). Die EGF-induzierte Migration von DHET und DKO ist also auf gleichem Niveau.

MEF wurden bis zur Konfluenz kultiviert, 1 d in DMEM BSA ausgehungert, entlang einer schmalen Linie die Zellen abgeschabt und die entstandene Wunde dokumentiert. Die Zellen wurden 27 h mit DMEM BSA ohne EGF, mit 1,5 ng/mL und 500 ng/mL EGF inkubiert und die Wunde nochmals dokumentiert. Die Differenz aus [Wundbreite vor Inkubation] - [Wundbreite nach Inkubation] wurde an 9 unterschiedlichen Stellen ermittelt, der Durchschnitt berechnet und für die Migration der Zellen die Hälfte des erhaltenen Wertes angegeben. Fehler sind als Standardabweichung zweier unabhängiger Versuche (T-Linie und TBL6-Linie; E-Linie zeigt gleiche Tendenz) angegeben.

### 3.2.7.5 Bei Stimulation mit niedriger EGF-Konzentration ist der EGFR dysreguliert

Internalisierung und endosomaler Transport des EGF-Rezeptors sind abhängig von der eingesetzten Konzentration des Liganden. Bei Stimulation mit hohen EGF-Konzentrationen erfolgt die Endozytose des EGFR-Komplexes hauptsächlich Clathrin-unabhängig und der Rezeptor wird degradiert. Ist die EGF-Konzentration dagegen niedrig, wird der Rezeptor überwiegend über Clathrin *coated pits* internalisiert und anschließend zur Plasmamembran recycelt (Sigismund *et al.* 2008). Physiologische Konzentrationen von EGF entsprechen im Serum von Mäusen 1-3 ng/mL (Perheentupa *et al.* 1985). Es wird angenommen, dass Zellen *in vivo* durch EGF-Konzentration von 1-20 ng/mL reguliert werden (Sigismund *et al.*, 2005). Zusätzlich zu den in 3.2.7.2 mit 500 ng/mL EGF durchgeführten Versuchen zur EGFR-Degradation wurde daher untersucht, wie der EGFR-Abbau bei Konzentrationen von 1,5 ng/mL abläuft. Hierfür wurde, von der EGF-Konzentration abgesehen, analog zu 3.2.7.2 verfahren.



**Abb. 3.26 Dysregulation des EGF-Rezeptors bei Stimulation mit niedriger EGF-Konzentration**

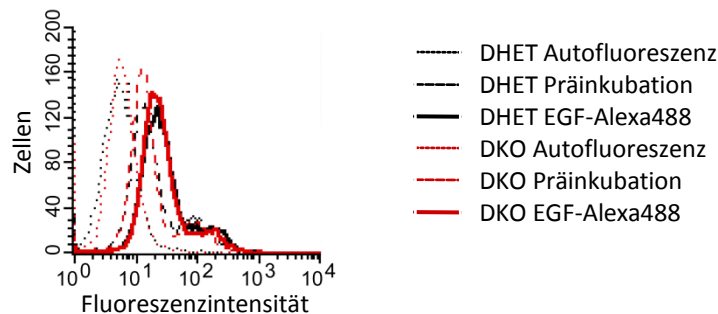
MEF wurden 2 h ausgehungert, anschließend mit 1,5 ng/mL EGF in DMEM BSA für die angegebenen Zeiten stimuliert und die Zellextrakte per SDS-PAGE und Westernblot auf ihren EGFR-Gehalt untersucht. **A** Während bei DHET MEF der EGFR-Gehalt zunächst stark ansteigt, fällt er bei DKO ab. Im DHET ist das EGFR-Level nach 30 min auf  $274 \pm 60$  % gestiegen, im DKO wurde EGFR bis auf  $41 \pm 7$  % abgebaut. Fehler sind SEM aus 6 unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlichen Hintergrunds (T-Linie, TBL6-Linie, E-Linie). EGFR-Banden im Westernblot wurde densitometrisch per ImageJ ausgewertet und auf den EGFR-Gehalt bei 0 min normalisiert. **B** Durch das Aushungern der MEF vor der Stimulation wird EGFR vermehrt exprimiert. **C** In den repräsentativen Westernblots ist zu erkennen, dass der EGF-Rezeptor nicht nur in DHET MEF, sondern auch in triallelen Zellen hochreguliert wird, während er im DKO abgebaut wird.

Interessanter Weise wurde der EGF-Rezeptor bei niedrigen EGF-Konzentrationen im DHET nicht abgebaut, sondern im Gegenteil zunächst vermehrt exprimiert (Abb. 3.26 A, C). So stieg der EGFR-Gehalt im DHET nach 30 min Stimulation auf  $274 \pm 60$  % an, während der EGF-Rezeptor im DKO auf  $41 \pm 7$  % abgebaut wurde. Der Abbau im DKO entsprach dabei in etwa der Degradationsrate bei Stimulation mit 500 ng/mL ( $36 \pm 10$  %, 3.2.7.2). In triallelen MEF wurde, wie im DHET auch, der EGF-Rezeptor heraufreguliert (Abb. 3.26 C). Dies war bei *Vti1a*<sup>-/-</sup>*Vti1b*<sup>+/-</sup> MEF deutlich zu erkennen. In *Vti1a*<sup>+/-</sup>*Vti1b*<sup>-/-</sup> Zellen war das EGFR-Level in zwei Versuchen insgesamt niedrig und daher im Westernblot schlechter erkennbar, eine Erhöhung des EGFR-Gehalts im Vergleich zum 0 min Wert war jedoch offensichtlich.

Der Anstieg des EGFR-Gehalts in den DHET und triallelen Zellen war auf eine vermehrte Expression des EGF-Rezeptors durch die zweistündige Inkubation in serumfreiem Medium zurückzuführen (Abb. 3.26 B). Der EGFR-Gehalt stieg bei Zellen aller Genotypen in mehreren Versuchen jeweils 2 - 3 h nach Serumentzug an. Dieser Anstieg wurde im DKO scheinbar schon durch geringe EGF-Stimulation herunterreguliert, im DHET dagegen erst bei höheren EGF-Konzentrationen (3.2.7.2). Dies könnte im DKO auf eine Fehlsortierung des EGF-Rezeptors hindeuten, die statt zum Recycling zur Degradation führt. Eine solche Dysregulation könnte *in vivo* erhebliche Auswirkungen auf die Entwicklung des Organismus haben (siehe 4.3.2).

### 3.2.7.6 Konzentration von EGFR auf der Plasmamembran

Ebenfalls eine mögliche Erklärung für die in DHET und DKO unterschiedliche EGFR-Regulation bei Stimulation mit niedriger EGF-Konzentration könnte in einer veränderten Verteilung des Rezeptors zwischen Plasmamembran und Zytoplasma zu finden sein. Die Aktivierungskinetik des EGF-Rezeptors ist stark von dessen Dimerisierung abhängig (Canals 1992). Eine höhere Konzentration des Rezeptors an der Oberfläche hätte dementsprechend eine größere Sensitivität für EGF zur Folge. Dies wiederum könnte erklären, weshalb der EGFR im DKO bei geringer Stimulation internalisiert und abgebaut wird, im DHET dagegen nicht. Die Oberflächenkonzentration des EGF-Rezeptors wurde daher über Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Die Zellen wurden dafür zunächst wie in den vorherigen Experimenten 2 h in DMEM BSA ausgehungert. Nach Waschen mit eiskaltem PBS wurden sie mit 1 % EGTA in PBS vom Schalenboden abgelöst und nochmals gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen 1 h bei 4 °C in DMEM BSA mit 500 ng EGF-Alexa488 zur Markierung des Oberflächen-EGFR inkubiert. Danach wurden sie 3 x mit PBS gewaschen und im FACS die Fluoreszenzintensität untersucht. Als Kontrolle wurden die Zellen zuerst mit DMEM BSA mit 500 ng/mL unmarkiertem EGF zur Absättigung der Bindestellen und anschließend nochmals mit der gleichen Konzentration EGF-Alexa488 inkubiert. Zur Berücksichtigung der Autofluoreszenz wurden ebenfalls MEF in DMEM BSA ohne Zusätze behandelt.



**Abb. 3.27** Auf der Plasmamembran befinden sich bei DHET und DKO gleiche Mengen EGFR

Oberflächen-EGFR wurde nach 2 h Aushungern in DMEM BSA bei DHET und DKO mit EGF-Alexa488 markiert und je  $2 \times 10^4$  Zellen im FACS vermessen. Es zeigt sich, dass bei beiden Zelllinien gleiche Mengen des Rezeptors auf der Oberfläche vorhanden sind (durchgezogene Linie). Zur Kontrolle der Signalspezifität wurden Zellen zunächst mit unmarkiertem EGF, dann mit EGF-Alexa488 inkubiert (gestrichelte Linie). Die Autofluoreszenz wurde durch Inkubation der Zellen in DMEM BSA ohne Zusätze berücksichtigt (gepunktete Linie). Gezeigt ist einer von zwei gleich verlaufenden Versuchen an der T-Linie.

Der EGF-Rezeptor befand sich bei DHET und DKO in gleicher Menge auf der Zelloberfläche (Abb. 3.27, durchgezogene Linie). Die Verschiebung des Signals zu geringeren Intensitäten bei Präinkubation mit unmarkiertem EGF zeigte die Spezifität der EGFR-Markierung (gestrichelte Linie). Der Versuch wurde an Zellen der T-Linie und

TBL6-Linie (nicht gezeigt) durchgeführt. Bei der TBL6-Linie wies der DKO, entgegen der T-Linie, in zwei unabhängigen Versuchen eine leicht erhöhte EGFR-Konzentration an der Oberfläche auf. Die zwischen DHET und DKO unterschiedliche Regulation des EGFR trat jedoch bei allen verwendeten Zelllinien (T, TBL6, E; 3.2.7.5) auf. Daher ist anzunehmen, dass die EGFR-Oberflächenkonzentration eher Zelllinien- als Genotypabhängig differiert. Ein Zusammenhang mit der beobachteten EGFR-Dysregulation scheint nicht zu bestehen.

### 3.2.8 Lipidtropfen: Aufbau, Abbau und dynamisches Gleichgewicht

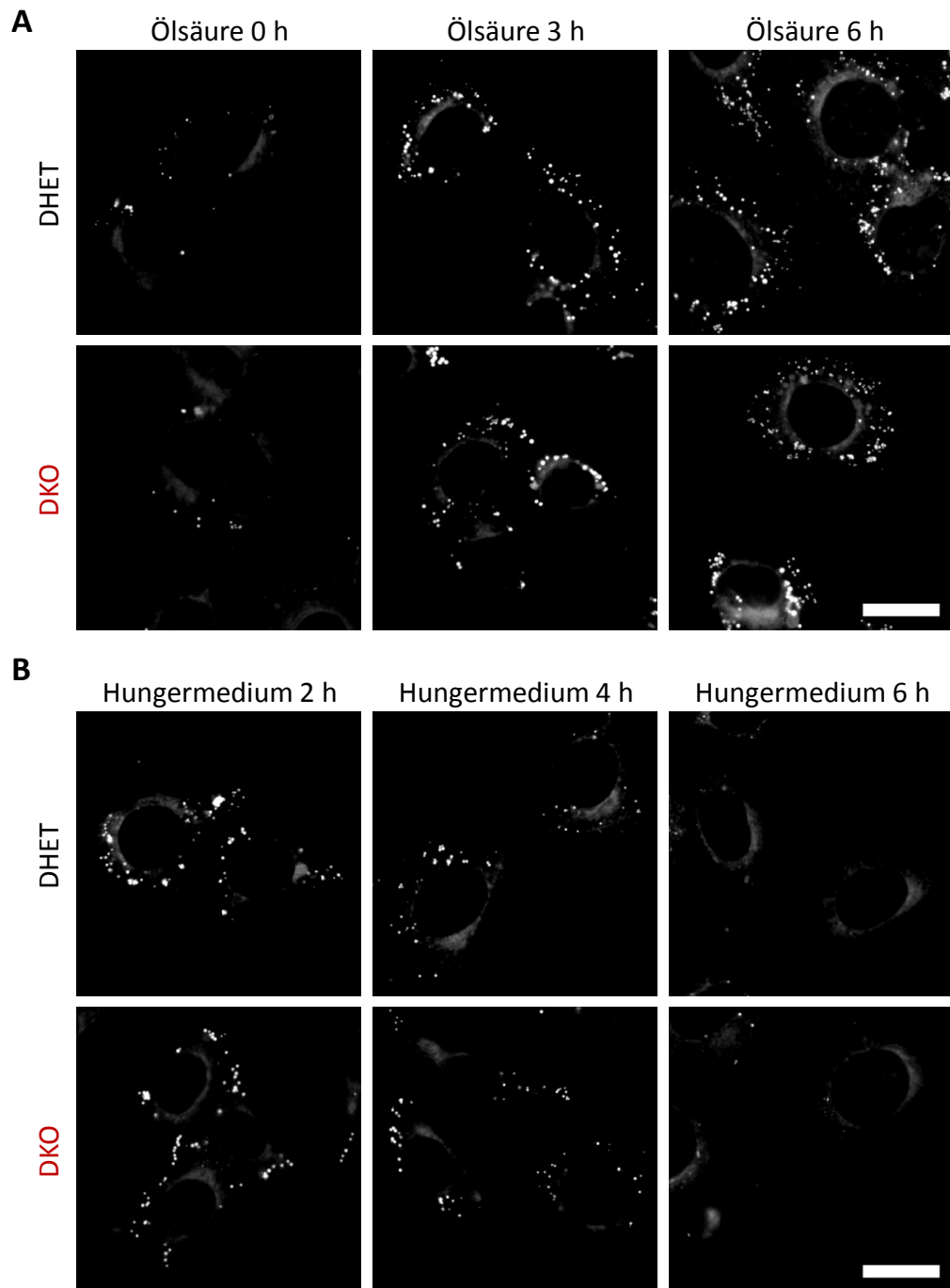
Intrazelluläre Lipidtropfen bestehen aus einem Kern neutraler Lipide, der von einer einzelnen Schicht Phospholipide umschlossen ist. Sie dienen nicht nur als Energiespeicher, sondern sind dynamische Organellen und beeinflussen z.B. die Signaltransduktion der Zelle (Walther *et al.* 2009). Zu den Proteinen, die sich auf der Tropfenoberfläche befinden, gehören auch SNARE-Proteine. So wird die Fusion von Lipidtropfen unter anderem durch den Vti1a-Kompletpartner VAMP-4 vermittelt. Ein Knockdown von *VAMP-4* führte zu einer verlangsamten Fusion und geringeren Größe von Lipidtropfen (Boström *et al.* 2007).

#### 3.2.8.1 Aufbau und Degradation von Lipidtropfen

Es wurde getestet, ob der *Vti1a/Vti1b* Doppelknockout ebenfalls Konsequenzen bei Auf-, Abbau und Fusion der Lipidtropfen hat. Die Synthese von Lipidtropfen wurde durch Inkubation entsprechender Zellen in Vollmedium mit 600  $\mu$ M Ölsäure induziert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die MEF PFA-fixiert und Lipidakkumulationen mit Nilrot angefärbt (Abb. 3.28 A).

Es zeigte sich, dass sowohl in DHET als auch DKO MEF von vornherein vereinzelte, kleine Lipidtropfen vorlagen. Durch die Inkubation mit Ölsäure stieg die Anzahl und Größe der Tropfen nach 2-3 h deutlich an und erreichte nach 6 h ein Maximum. Auch nach weiteren 6 h Inkubation wurde keine wesentliche Vergrößerung oder Vermehrung der Tropfen beobachtet (nicht gezeigt). Größe, Anzahl und Lokalisation der Lipidtropfen waren in DHET und DKO zu den untersuchten Zeitpunkten im Wesentlichen gleich.

Auch der Abbau der Lipidtropfen durch anschließende Inkubation in DMEM BSA (Abb. 3.28 B) verlief in beiden Genotypen vergleichbar: Zweistündiges Aushungern der MEF verringerte die Anzahl und Größe der Lipidtropfen leicht; nach 4 h waren die Tropfen deutlich reduziert. Nach 6 h waren fast keine Lipidakkumulationen mehr sichtbar.



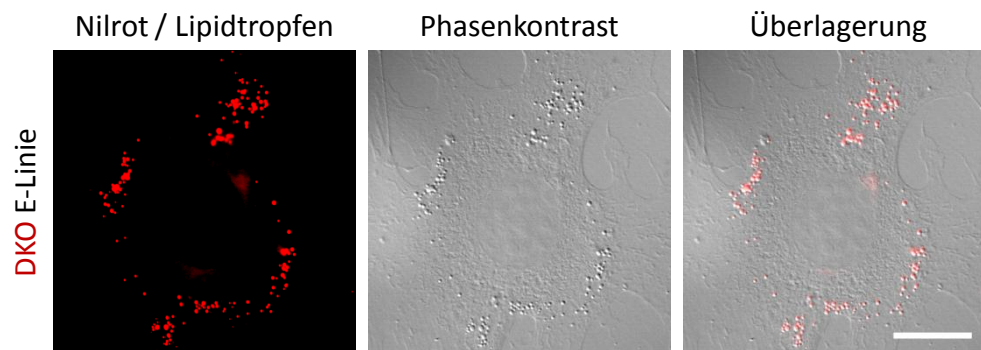
**Abb. 3.28** Synthese und Degradation von Lipidtröpfchen sind in DKO MEF unauffällig

**A** In DHET und DKO MEF wurde die Bildung von Lipidtröpfchen durch Inkubation in Vollmedium mit 600  $\mu\text{M}$  Ölsäure induziert. Im *Steady-State* Zustand der Zellen bei 0 h sind bereits vereinzelte Lipidakkumulationen vorhanden. Nach 2-3 h ist ein deutlich sichtbarer Anstieg in Anzahl und Größe der Lipidtröpfchen zu erkennen; nach etwa 6 h ist dabei ein Maximum erreicht. DHET und DKO sind nicht unterscheidbar. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ . **B** Im Anschluss wurden die Zellen in DMEM BSA ausgehungert. Nach 2 h nimmt die Anzahl und Größe der Lipidtröpfchen leicht, nach 4 h stark ab. Nach ca. 6 h ist der Grundzustand sowohl in DHET als auch DKO Zellen wieder erreicht. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

Zur Anfärbung der Lipidtröpfchen wurden die Zellen nach den angegebenen Zeiten PFA-fixiert und mit Nilrot inkubiert. Durchgeführt wurde der Versuch mit TBL6-, T- und E-Linie.

### 3.2.8.1 Erhöhte Anzahl von Lipidtropfen in DKO MEF der E-Linie

Der Versuch 3.2.8.1 wurde mehrmals unter Verwendung unterschiedlicher Zelllinien entsprechenden *Vti1a/Vti1b* Genotyps durchgeführt (T-Linie, TBL6-Linie, E-Linie). In DKO MEF der E-Linie (immortalisiert durch Passage) fiel auf, dass die Zellen im Grundzustand, also bei Inkubation unter Standardbedingungen in Vollmedium, gegenüber DHET eine deutlich erhöhte Anzahl von Lipidakkumulationen aufwiesen (Abb. 3.29, vgl. Abb. 3.28 A, Wert bei 0 h).



**Abb. 3.29 DKO MEF der E-Linie zeigen eine erhöhte Anzahl Lipidtropfen**

DKO MEF der E-Linie (Immortalisierung durch Passage) wurden unter Standardbedingungen in Vollmedium inkubiert, PFA fixiert und mit Nilrot gefärbt. Gegenüber DHET derselben Zelllinie weist ein deutlich höherer Anteil von Zellen eine teils drastisch erhöhte Lipidakkumulation auf. Diese ist auch im Phasenkontrast sichtbar. DHET verhält sich wie Zellen aus der TBL6-Linie und T-Linie, bei denen dieser Unterschied nicht auftrat (vgl. Abb. 3.28). Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

Während beim DHET in vereinzelten Zellen einige Lipidtropfen vorhanden waren, zeigte beim DKO eine deutlich höhere Anzahl von Zellen eine teilweise vergleichbare, teilweise drastisch erhöhte Lipidakkumulation. Dies wurde in der T- und TBL6-Linie nicht beobachtet. Auch in einer weiteren, nachträglich durch Passage immortalisierten MEF-Linie mit BL6-Hintergrund wiesen DKO Zellen keine erhöhte Lipidakkumulation auf (siehe 4.3.3).

### 3.3 Vti1a/Vti1b doppeldefiziente hippocampale Neuronen

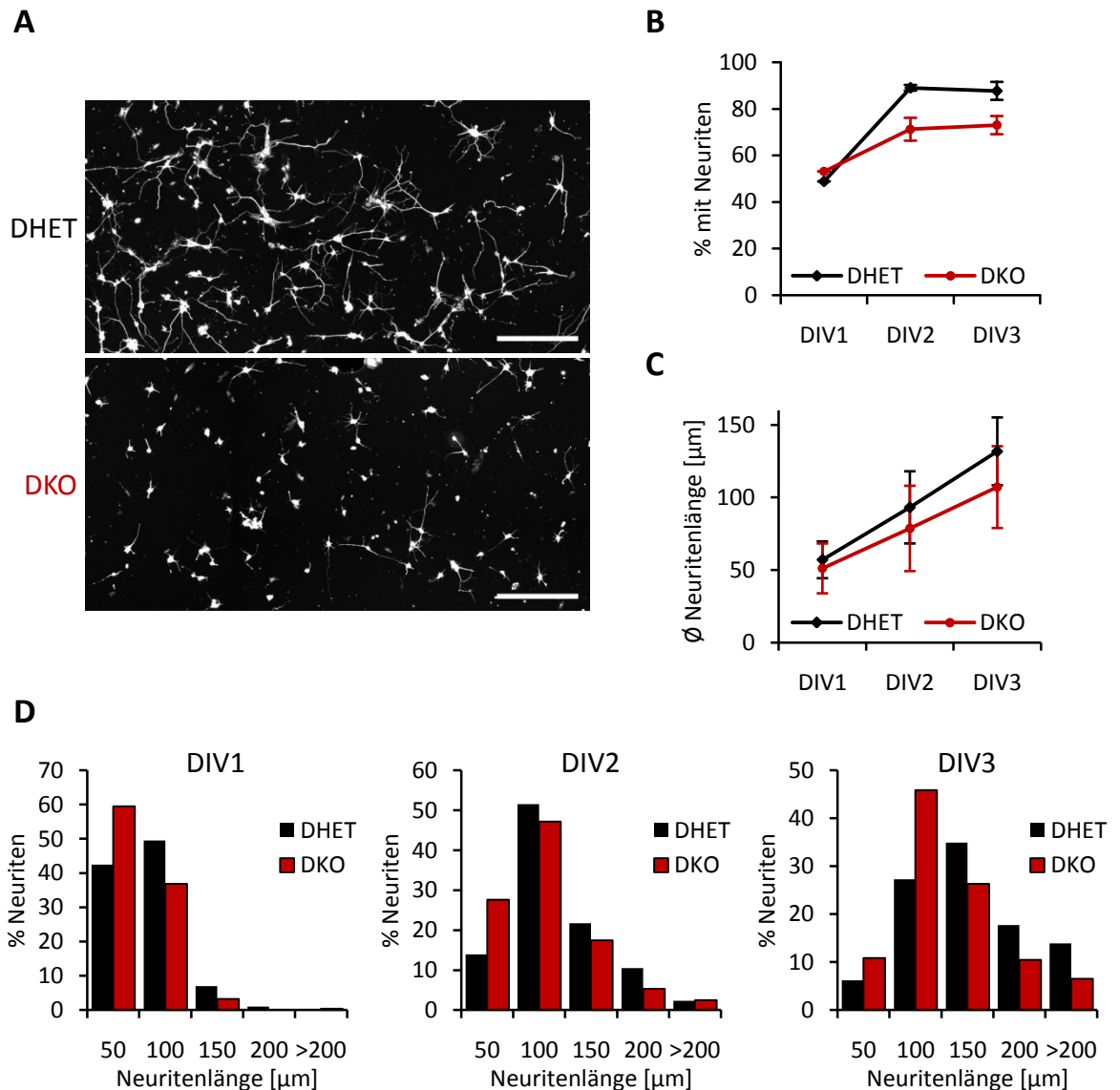
Neuronale Zellen sind in ihrer Entwicklung, Funktion und für ihr Überleben besonders stark auf endo- und exozytotische Prozesse angewiesen. Entsprechend schwerwiegend sind die neuronalen Phänotypen der Vti1a/Vti1b defizienten Embryonen (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Überraschender Weise zeigten die Experimente an Vti1a/Vti1b defizienten mausembryonalen Fibroblasten bisher kaum Beeinträchtigungen des endosomalen Systems (4.2). Um ein Modellsystem des Vti1a/Vti1b Knockouts zu testen, das eher dem neuronalen Charakter des Phänotyps entspricht, wurden hippocampale Neuronen aus E18.5 Embryonen präpariert. Der Hippocampus gehört zu den Hirnregionen, die im DKO an E18.5 nicht einer starken Degeneration unterliegen (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Die Präparation hippocampaler Neuronen sollte daher genügend Zellmaterial liefern, um *in vitro* Experimente durchführen zu können.

#### 3.3.1 Kultivierung, Neuritenausbildung und Neuritenwachstum

Die Präparation hippocampaler Neuronen wurde wie in 2.2.3.8 beschrieben ausgeführt. In Kürze: Embryonen wurden an E18.5 beide Hippocampi entnommen, 5 min bei RT in Präparationslösung mit 0,5 mg/mL Trypsin belassen und anschließend 3 x mit Neurobasal-A Vollmedium gewaschen. Die Hippocampi wurden mit silikonisierten Glaspipetten in Vollmedium vereinzelt und die Suspension auf 16 – 24 PLL-beschichtete Deckgläser getropft. Nach 30-60 min hatten sich die Zellen abgesetzt und Neurobasal-A Vollmedium wurde zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei Standardbedingungen. Am nächsten Tag wurde Neurobasal-A Medium ohne FKS zugegeben, so dass sich eine FKS-Endkonzentration von 1 % ergab.

Die *in vitro* Kulturen Vti1a/Vti1b defizienter Neuronen unterschieden sich nach ein- oder zwei Tagen (*days in vitro*, DIV) von DHET oder triallelen Kulturen (Abb. 3.30 A). Bereits bei der Durchlichtmikroskopie der *in vitro* Kulturen, besonders aber nach PFA-Fixation und Immunfluoreszenzfärbung des neuronenspezifischen  $\beta$ III-Tubulins wurde deutlich, dass DKO Kulturen eine wesentlich geringere Neuronendichte aufwiesen. Auch bei längerer Kultivierungsdauer setzte sich dieser Trend fort. Nur bei wenigen Präparationen erreichten DKO-Kulturen annähernd die Dichte von DHET oder triallelen Kulturen.

Es wurde daher getestet, wie sich die Neuronen in Kultur entwickeln. Dafür wurden Neuronen nach den angegebenen DIV PFA-fixiert,  $\beta$ III-Tubulin immungefärbt und ausgezählt, welcher Anteil der neuronalen Zellen Neuriten ausbildet (Abb. 3.30 B). Am ersten Tag nach In-Kulturnahme der hippocampalen Neuronen waren dies bei DHET und



**Abb. 3.30 DKO hippocampale Neuronen zeigen *in vitro* einen deutlichen Phänotyp**

Hippocampale Neuronen wurden aus E18.5 Embryonen präpariert und auf PLL-Deckgläsern kultiviert. **A** Nach zwei Tagen in Kultur (DIV2) sind DHET und triallele Neuronen gut angewachsen, während die Zelldichte der DKO Kulturen deutlich geringer ist. Die Zellen wurden PFA-fixiert und  $\beta$ III-Tubulin immungefärbt, Maßstab ist 250  $\mu\text{m}$ . **B** Die kultivierten Neuronen entwickeln sich unterschiedlich gut: Nach DIV1 bilden in DHET und DKO etwa die Hälfte der Zellen Neuriten aus. Nach DIV2 und DIV3 sind es beim DHET  $89 \pm 1\%$  bzw.  $88 \pm 4\%$ , beim DKO dagegen nur  $71 \pm 5\%$  bzw.  $73 \pm 4\%$ . Hierfür wurden Neuronen nach den entsprechenden DIV PFA-fixiert und neuronale Zellen über  $\beta$ III-Tubulin Färbung identifiziert. Zellen, die neuritenähnliche Fortsätze (Fortsätze  $> 10 \mu\text{m}$ ) zeigten, wurden als % aller gefärbten Zellen angegeben. Angegebene Fehler sind Standardabweichungen aus Messungen zweier unabhängiger Präparationen. Für jeden Wert wurden 200 - 400 Zellen ausgezählt. **C** Die Länge der ausgebildeten Neuriten ist im DKO mit zunehmender Kultivierungsdauer geringer als beim DHET. Nach DIV1 sind die Neuriten noch in etwa gleich lang (DHET:  $57 \pm 13 \mu\text{m}$ ; DKO:  $51 \pm 17 \mu\text{m}$ ). An DIV3 werden die Unterschiede deutlicher (DHET:  $132 \pm 23 \mu\text{m}$ ; DKO:  $107 \pm 28 \mu\text{m}$ ). Die Zellen wurden jeweils PFA-fixiert,  $\beta$ III-Tubulin immungefärbt und der jeweils längste Fortsatz von  $> 100$  Zellen vermessen. Neuriten mit weniger als 15  $\mu\text{m}$  wurden nicht berücksichtigt. Fehler sind Standardabweichungen von zwei Versuchen unabhängiger Präparationen. **D** Darstellung der Daten aus (C) in Histogrammen. Die Häufigkeitsverteilung ist beim DKO an allen DIV zu geringeren Neuritenlängen hin verschoben.



DKO Zellen gleichermaßen etwa 50 %. Während dieser Wert für DHET Neuronen an DIV2 auf  $89 \pm 1$  % anstieg, erhöhte sich der Anteil beim DKO nur auf  $71 \pm 5$  %. An DIV3 blieben die Werte für DHET und DKO in etwa auf dem jeweiligen Niveau.

Da die DKO Neuronen offensichtlich in ihrer Entwicklung beeinträchtigt waren, wurde im Weiteren untersucht, ob die ausgebildeten Neuriten Auffälligkeiten im Wachstum zeigten. Dafür wurde jeweils der längste Fortsatz der neuronalen Zellen nach verschiedenen DIV gemessen (Abb. 3.30 C). Auch hier wiesen die DKO Neuronen Defizienzen gegenüber DHET auf. Nach einem Tag in Kultur lag die durchschnittliche Neuritenlänge bei DHET und DKO noch ungefähr bei gleichen Werten ( $57 \pm 13$   $\mu\text{m}$  bzw.  $51 \pm 17$   $\mu\text{m}$ ). An DIV3 allerdings waren die DHET Neuriten durchschnittlich auf  $132 \pm 23$   $\mu\text{m}$  gewachsen, im DKO nur auf  $107 \pm 28$   $\mu\text{m}$ . Im Histogramm zeigt sich, dass die Häufigkeitsverteilung der Neuritenlängen beim DKO an allen DIV zu geringeren Werten hin verschoben ist (Abb. 3.30 D).

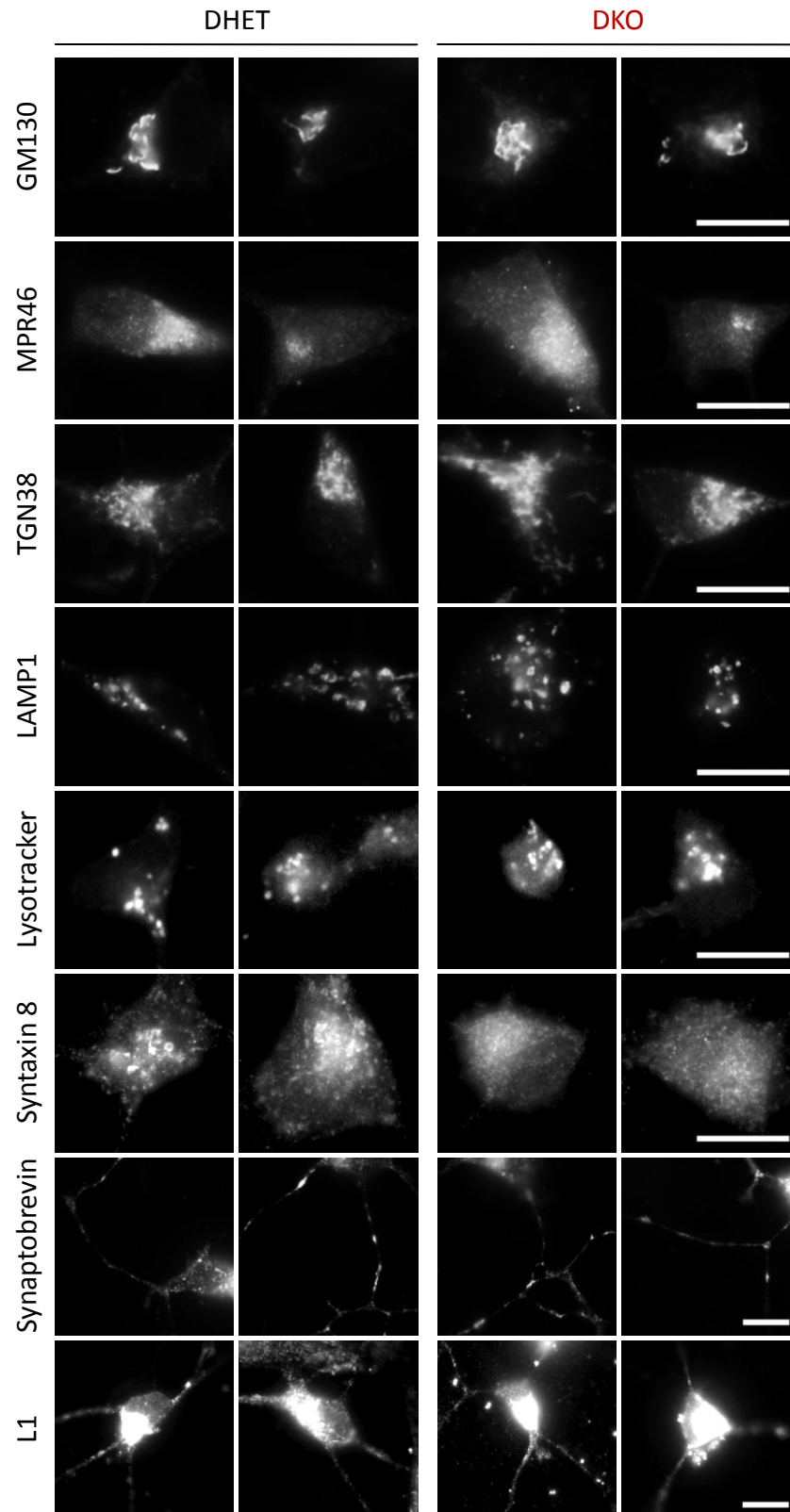
Zusammengefasst zeigte sich, dass hippocampale Neuronen Vti1a/Vti1b defizienter Embryonen gegenüber DHET *in vitro* deutlich weniger vital sind, zu einem geringeren Anteil Neuriten ausbilden und die Neuriten im Durchschnitt kürzer sind. Ein Phänotyp dieser Neuronen ist außerhalb ihrer *in vivo* Umgebung demnach offensichtlich (siehe 4.4).

### 3.3.2 Unauffällige Morphologie der hippocampalen Neuronen

Da die Vti1a/Vti1b defizienten Hippocampusneuronen in Kultur deutliche Unterschiede zum DHET zeigten, wurde die Morphologie genauer untersucht. Wie schon bei den hergestellten Fibroblasten geschehen (3.2.2), wurden von den Neuronen Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Marker des endosomalen Systems angefertigt. Dafür wurden Neuronen an DIV2 oder DIV3 PFA-fixiert, mit den entsprechenden Erst- und Zweitantikörpern inkubiert und mikroskopisch analysiert (Abb. 3.31).

In DHET und DKO bildete der Golgi-Apparat (GM130) tubuläre Strukturen, die an einer Seite des Zellkerns zu finden waren. Das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN38) war in tubulär-vesikulären Strukturen im Zytoplasma lokalisiert. MPR46 ist ein Marker für TGN, frühe und späte Endosomen (Figura *et al.* 1986) und war sowohl in DHET als auch DKO punktuell im Zellkörper verteilt. Die Lysosomen der Neuronen fanden sich als größere Kompartimente im Zellkörper (LAMP1). Die Lysotracker-Fluoreszenz deutete auf die erwartete Azidität dieses Kompartiments hin. Der Vti1b-Komplexbpartner Syntaxin 8 war, wie in Fibroblasten auch, im DKO deutlich disperser.

Synaptobrevin ist ein R-SNARE synaptischer sekretorischer Vesikel (Baumert *et al.*



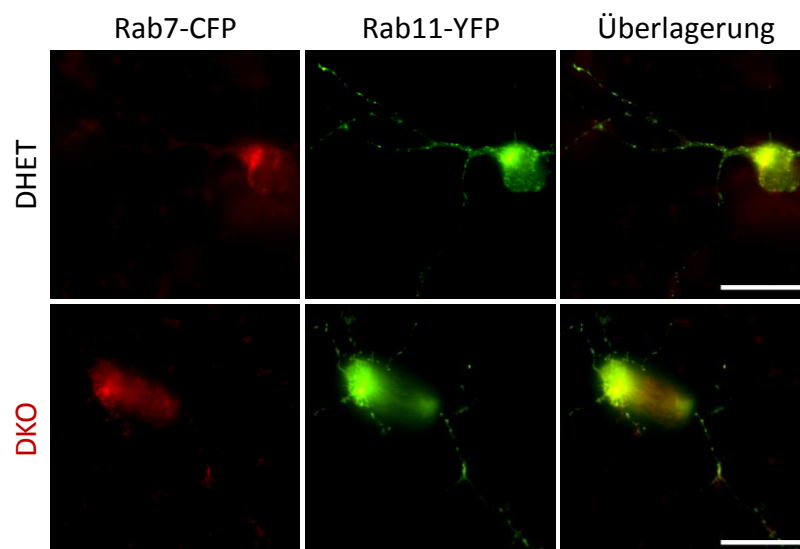
**Abb. 3.31 DKO hippocampale Neuronen sind in Immunfärbungen weitgehend unauffällig**

Hippocampale Neuronen wurden an DIV2 oder DIV3 PFA-fixiert, mit entsprechenden Erst- und Zweitantikörpern inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Der Vti1b-Komplexpertner Syntaxin 8 ist, wie in Fibroblasten, im DKO diffus verteilt. Die übrigen getesteten Marker weisen keinen Unterschied zwischen DHET und DKO auf. Verwendete Marker: *cis*-Golgi (GM130), TGN/frühe- und späte Endosomen (MPR46), *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN38), Lysosom (LAMP1, Lysotracker), Vti1b-Komplexpertner Syntaxin 8, Synapsen (Synaptobrevin), Transzytoseaktivität (L1). Maßstab: 10  $\mu$ m.

1989), das dementsprechend als synaptischer Marker dienen kann. Es war in DHET und DKO punktuell im Zellkörper, vor allem aber in größeren synaptischen Strukturen der Neuriten zu finden.

L1 bzw. NgCAM ist ein neuronales Adhäsionsmolekül, das vom Zellkörper zu den Axonen transportiert wird (Wisco *et al.* 2003). L1 war in DHET und DKO in größeren Konzentrationen im Zellkörper, sowie punktuell in Neuriten vorhanden. Dies deutete auf einen funktionierenden anterograden axonalen Transport in DKO Neuronen hin. Da jedoch die L1-Färbungen keine einwandfreie Qualität hatten, müssen diese für eine eindeutige Aussage optimiert und wiederholt werden.

Zusätzlich wurde die Lokalisation der Marker Rab7 (spätes Endosom) und Rab11 (Recycling-Endosom) durch Co-Immunfluoreszenz getestet. Dafür wurden Neuronen an DIV1 mit Rab7-CFP und Rab11-YFP transfiziert, für zwei Tage unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend PFA fixiert.



**Abb. 3.32 Rab7 und Rab11 sind in DHET und DKO gleich lokalisiert**

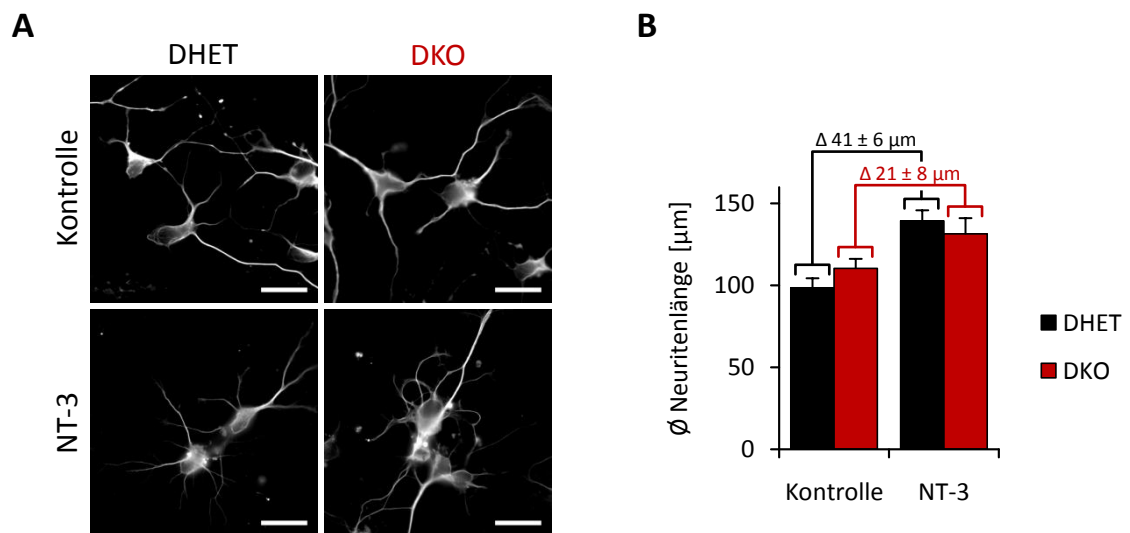
Späte Endosomen (Rab7-CFP) sind in DHET und DKO als größere, vesikuläre Strukturen im Zellkörper zu sehen. Sie colokalisieren dort teils mit dem Marker der Recycling-Endosomen, Rab11-YFP. Recycling-Endosomen finden sich in DHET und DKO jedoch auch an Orten synaptischer Aktivität in Neuriten. Zur Co-Färbung wurden hippocampale Neuronen an DIV1 mit Rab7-CFP und Rab11-YFP transfiziert, 2 d kultiviert und anschließend PFA-fixiert. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

Sowohl für Rab11 als auch Rab7 zeigte sich in DHET und DKO das gleiche Bild. Die späten Endosomen (Rab7) waren als größere vesikuläre Strukturen im Zellkörper sichtbar. Rab11-YFP colokalisierte dort teilweise, erstreckte sich aber weiter in die Peripherie. Zudem war das Recycling-Endosom auch in Neuriten zu finden. Dort wurde es unter anderem an Orten synaptischer Aktivität erwartet, was sich durch die zu Synaptobrevin ähnliche Lokalisation bestätigte (siehe Abb. 3.31).

### 3.3.3 Stimulation hippocampaler Neuronen mit NT-3

Die schwerwiegende Neuronale Phänotyp der DKO Embryonen sowie die Defizienzen hippocampaler Neuronen *in vitro* könnten ihre Ursache in einem gestörten Transport neurotropher Faktoren haben. Bei Abwesenheit des *hippocampus derived neurotrophic factor* bzw. Neurotrophin-3 (NT-3) ist zum Beispiel ein ähnlich verlaufender Verlust peripherer Ganglien zu beobachten wie in *Vti1a/Vti1b* DKO Mäusen (Farinas *et al.* 1996). In hippocampalen Zellkulturen hat NT-3 positive Auswirkungen auf Neuritenlänge und -anzahl. Es wird über den Rezeptor TrkA internalisiert, für dessen Transport wiederum ein funktionales endosomales System Voraussetzung ist (Belliveau *et al.* 1997; Ascano *et al.* 2009).

Um herauszufinden, ob die NT-3 Signalgebung in *Vti1a/Vti1b* defizienten hippocampalen Neuronen gestört ist, wurden die Neuronen direkt nach der Präparation und der erfolgten Adhäsion auf den Deckgläsern mit PBS gewaschen. Das so entfernte Medium wurde durch serumfreies Neurobasal-A-N2 Medium mit oder ohne 30 ng/mL NT-3 ersetzt. An DIV2 wurden die Zellen PFA-fixiert und das neuronenspezifische  $\beta$ III-Tubulin immungefärbt. Zur Ermittlung der durchschnittlichen Neuritenlänge wurde jeweils der längste Fortsatz eines Neurons vermessen.



**Abb. 3.33 DKO Neuronen zeigen bei NT-3-Stimulation gegenüber DHET geringeres Neuritenwachstum**

Hippocampale Neuronen wurden präpariert, für 2 d in serumfreiem Medium mit oder ohne 30 ng/mL NT-3 inkubiert, PFA-fixiert und  $\beta$ III-Tubulin immungefärbt. **A** Inkubation mit NT-3 bewirkt bei DHET und DKO eine vermehrte Neuritenbildung. **B** Bei DHET und DKO zeigt NT-3 einen positiven Effekt auf die Neuritenlänge. DHET Neuriten erreichen  $139 \pm 6 \mu\text{m}$  (Kontrolle:  $99 \pm 6 \mu\text{m}$ ), DKO Neuriten  $131 \pm 9 \mu\text{m}$  (Kontrolle:  $110 \pm 6 \mu\text{m}$ ). Das Wachstum NT-3 stimulierter Neuriten gegenüber der Kontrolle fällt also bei DKO Neuronen wesentlich geringer aus (DHET:  $41 \pm 6 \mu\text{m}$ , DKO:  $21 \pm 8 \mu\text{m}$ ). Gemessen wurde jeweils der längste Fortsatz eines Neurons; Fortsätze  $< 15 \mu\text{m}$  wurden nicht berücksichtigt. Fehler sind Standardabweichungen von  $\sim 100$  Messwerten aus 3 DHET und 3 DKO Präparationen zweier Würfe.

Der Zusatz von NT-3 wirkte sich in DHET und DKO positiv auf die Anzahl der Neuriten aus (Abb. 3.33 A). Während Kontrollzellen zumeist vergleichsweise einfach strukturiert waren, wies ein Großteil der NT-3 stimulierten Neuronen zahlreichere Fortsätze auf.

Auch auf die durchschnittliche Neuritenlänge hatte NT-3 bei DHET und DKO Zellen einen positiven Effekt (Abb. 3.33 B). Dieser Effekt war allerdings bei DHET Neuronen wesentlich stärker als bei DKO Neuronen. Die Differenz zwischen unstimulierten und stimulierten Neuriten betrug beim DHET  $41 \pm 6 \mu\text{m}$ , beim DKO nur  $21 \pm 8 \mu\text{m}$ .

Während DKO Neuronen also eindeutig auf die Stimulation mit NT-3 reagieren, zeigen sie gleichzeitig Beeinträchtigungen in der Auswirkung der Stimulation. Dies macht zumindest den vollständigen Verlust der NT-3 Signalgebung unwahrscheinlich (siehe 4.4.2).

# Kapitel 4

## Diskussion

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen des murinen Knockouts von *Vt1a* und *Vt1b* näher charakterisiert werden. Neben dem bekannten neuronalen Phänotyp von *Vt1a/Vt1b* defizienten Mausembryonen fielen an E18,5 Tieren weitere Veränderungen von Skelett und Lunge auf (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Aus DKO Tieren hergestellte mausembryonale Fibroblasten waren durch die Defizienz nur wenig beeinträchtigt. Sie wiesen aber eine erhöhte Sekretion lysosomaler Enzyme und eine veränderte Regulation des EGF-Rezeptors auf. In kultivierten hippocampalen Neuronen dagegen zeigten sich deutlichere Defekte.

### 4.1 Äußerlicher Phänotyp der Embryonen

Bereits äußerlich waren an E18,5 DKO Embryonen Unterschiede zu ihren triallelen oder DHET Wurfgeschwistern erkennbar (3.1.1). Die kleinsten Embryonen einer Präparation waren meist DKO-Tiere; sie hatten im Durchschnitt eine um  $16 \pm 2$  % signifikant verringerte Kopf-Rumpf-Länge. Vor allem war auch die Position der vorderen Gliedmaßen auffällig, die beim DKO in allen Fällen parallel zur Körperachse lagen. In DHET und triallelen Tieren waren sie angewinkelt.

Über diese Merkmale ist es bereits bei der Präparation möglich, DKO Embryonen von ihren Wurfgeschwistern zu unterscheiden. Entsprechend können die DKO Tiere z.B. bei der Herstellung von Kulturen hippocampaler Neuronen bevorzugt behandelt werden. Dies ist insofern relevant, als dass DKO Tiere zumeist bereits direkt nach der Präparation wenig und nach einigen Minuten gar keine Reflexe mehr zeigen. DHET und triallele Tiere sind deutlich länger vital, so dass davon ausgegangen werden kann, dass daraus präpariertes Gewebe erst später Zerfallserscheinungen aufweist.

Für diese Arbeit wurden ausschließlich E18,5 Tiere präpariert. Um zu untersuchen, ob z.B. die Fehlstellung der vorderen Extremitäten sich erst später entwickelt oder von vornherein

gegeben ist, wäre eine Präparation von Embryonen auch in früheren Entwicklungsstadien interessant.

## 4.2 Skelett und Lunge

Da die Embryonen bereits äußerliche Veränderungen aufwiesen, wurden sie eingehender untersucht. Dazu wurden von E18,5 Embryonen Skelette präpariert und mit Alcianblau (Knorpel) und Alizarinrot (Knochen) gefärbt (3.1.2). Weitere Embryonen wurden in Paraffin eingebettet und HE-gefärbte Schnitte zur histologischen Analyse angefertigt (3.1.3).

### 4.2.1 Veränderungen am Skelett

DKO Embryonen zeigten teilweise eine distal (Pes, Manus, Os pubis) verringerte Calcifizierung. Am Auffälligsten waren jeweils die verformten Claviculae und das Sternum, welches teils gar nicht, immer aber am 4. Sternebra nicht calcifiziert war. In allen Fällen war der deltoide Vorsprung am Humerus weniger ausgeprägt (3.1.2). Einzeln aufgetretene Befunde, wie der longitudinale Versatz der beiden Leisten des Sternums oder der überzählige knorpelige Auswuchs an der ersten Rippe eines DKO Embryonen könnten zufällige Mutationen sein. Hier muss durch Präparation weiterer Skelette geklärt werden, ob diese oder ähnliche Fehlbildungen in statistisch relevanter Häufigkeit auftreten und auf den Genotyp zurückzuführen sind. Die übrigen, häufiger aufgetretenen Befunde könnten über verschiedene Mechanismen mit der Defizienz von *Vt1a/Vt1b* verknüpft sein.

#### 4.2.1.1 Mangelnde Innervierung und Auswirkung auf das Knochenwachstum

Die Entwicklung von Muskulatur und das Wachstum der Knochen ist eng miteinander verbunden. Dies basiert, zumindest zu einem großen Teil, auf der mechanischen Kraft, die ein Muskel durch Kontraktion auf den sich bildenden Knochen auswirkt (Hall und Herring 1990; Herring und Lakars 1982).

Durch die *Vt1a/Vt1b* Defizienz sind an E18,5 Ganglien und auch Motoneuronen der Lendenwirbelsäule stark reduziert (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Es ist demnach wahrscheinlich, dass die Innervierung der Muskeln in den Embryonen unvollständig abläuft. Solange die DKO Embryonen vital waren, zeigten sie erkennbare Reaktionen auf eine Berührung hin und atmeten auch teilweise. Demnach ist zwar eine unvollständige Innervierung der Muskeln wahrscheinlich, ein vollständiges Fehlen der

Innervierung kann aber ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass frühe Muskelkontraktionen ausbleiben oder schwächer sind und deshalb weniger Kraft auf die wachsenden Knochen ausgeübt wird.

In einer Untersuchung amyogener Embryonen, bei denen keine gestreifte Muskulatur gebildet wird, wurde der reziproke Einfluss der Muskelbildung auf das Knochenwachstum analysiert (Rot-Nikcevic *et al.* 2006). Bei den amyogenen Embryonen sind die vorderen Extremitäten genau so angewinkelt wie die der WT Embryonen. Die gestreckte Form bei *Vti1a/Vti1b* negativen Tieren kann also über eine fehlende Muskelaktivität nicht erklärt werden. Auffällig war an den amyogenen E18,5 Embryonen besonders das Fehlen aller Rippen und die Fusion cervicaler Wirbel. Dies ist bei *Vti1a/Vti1b* defizienten Embryonen nicht zu beobachten; allerdings kann hier auch nicht von einem vollständigen Fehlen der Muskelaktivität ausgegangen werden (s.o.).

Besonders hervorzuheben ist, dass die Claviculae amyogener E18,5 Embryonen als kleiner, deformiert und stark gebogen beschrieben werden. Auch ist der deltoide Vorsprung am Humerus nicht ausgebildet. Beides wird vermutlich erst durch die Krafteinwirkung entstehender Muskeln geformt (Rot-Nikcevic *et al.* 2006). Diese phänotypische Ähnlichkeit zum DKO Skelett (siehe Abb. 3.2) legt nahe, dass mangelnde Muskelinnervierung hier eine Rolle spielt. Dies könnte z.B. in histologischen Schnitten durch Anfärben von Nervenbahnen in den entsprechenden Muskelgeweben überprüft werden.

Da sich beispielsweise die Calcifizierung amyogener Embryonen im Gegensatz zu *Vti1a/Vti1b* defizienten Embryonen als normal erwies, erklärt eine möglicherweise mangelnde Muskelinnervierung nur Teile des *Vti1a/Vti1b* Phänotyps.

#### 4.2.1.2 Fehlerhafte Signaltransduktion in Osteoblasten

Knochen werden über zwei verschiedene Mechanismen aufgebaut (Kersenty *et al.* 2009; Kronenberg 2003; de Crombrughe *et al.* 2001). Zunächst formen Mesenchymzellen durch Expression von Adhäsionsmolekülen dichte Zellgruppen. In einigen Elementen des Skeletts differenzieren solche Zellen direkt zu Osteoblasten und bilden Mineralablagerungen (desmale Ossifikation). Die meisten Knochen werden allerdings durch endochondrale Ossifikation gebildet. Hierbei differenzieren die Mesenchymzellen zu Chondrozyten (Knorpelzellen), die zunächst proliferieren und eine knorpelige, extrazelluläre Matrix aus Collagen und Aggrecan aufbauen. Im nächsten Schritt differenzieren sie zu hypertrophen (vergrößerten) Chondrozyten, die die Calcifizierung der Matrix regulieren und schließlich in die Apoptose eintreten.



Der Eintritt von Chondrozyten in das hypertrophe Stadium sowie die Differenzierung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten ist ein Prozess, der maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor Runx2 (*runt domain related transcription*) reguliert wird (Ducy *et al.* 1997). Interessanterweise sind bei Dysregulationen von Runx2 besonders die Entwicklung von Claviculae und Sternum betroffen (Kimura *et al.* 2010; Huang *et al.* 1997). Claviculae bilden sich sowohl durch desmale wie auch durch endochondrale Ossifikation, so dass zu ihrer korrekten Ausbildung eine präzise Kontrolle von Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung nötig ist (Huang *et al.* 1997). Eine Haplodefizienz von Runx2 führt an E18,5 zu verkleinerten Claviculae, eine Defizienz von Runx2 zu fehlender Calcifizierung im Sternum (Kimura *et al.* 2010; Ge *et al.* 2007). In DKO Embryonen sind die Claviculae an E18,5 verformt und das Sternum nicht oder mindestens am 4. Sternebra nicht calcifiziert (Abb. 3.2).

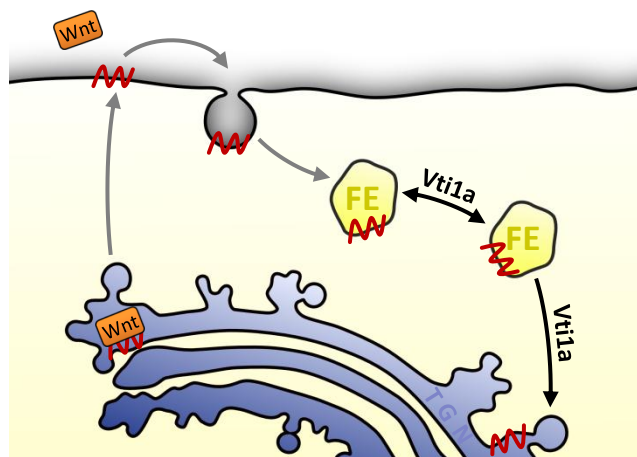
In einer normal verlaufenden Entwicklung ist das 4. Sternebra der letzte Teil des Sternums, der calcifiziert (Chen 1953). Das Sternum bildet sich ab E12 in zwei voneinander unabhängigen, knorpeligen Leisten, die im Laufe der Entwicklung aufeinander zu migrieren und schließlich das Sternum bilden. Die Sternebrae calcifizieren ab E16 bis E18 vom caudalen S1 ausgehend zu S4 (Storm *et al.* 1996; Chen 1952/1953).

Zusammengenommen könnte der im *Vt1a/Vt1b* DKO beobachtete Phänotyp, besonders von Claviculae und Sternum, auf eine Beteiligung von Runx2 hindeuten. Sehr interessant ist, dass Runx2 bei normaler Entwicklung an E12 in Claviculum und Sternum bereits stark exprimiert wird (Kimura *et al.* 2010; Otto *et al.* 1997). Dies entspricht etwa dem Zeitraum, in dem die neuronale Degeneration in *Vt1a/Vt1b* DKO Embryonen beginnt (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Ob Runx2 tatsächlich dysreguliert ist, ließe sich zum Beispiel über *in situ*-Hybridisierung zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung überprüfen.

#### 4.2.1.3 Zwei Regulatoren von Runx2: Wnt und MAP-Kinasen

Die Verbindung zwischen einer möglichen Runx2-Dysregulation (4.2.1.2) und einer *Vt1a/Vt1b* Defizienz kann über verschiedene Faktoren erfolgen, die Runx2 regulieren. Dazu gehört der vom Faktor Wnt induzierte Signalweg, der sowohl bei der Knochenentwicklung über Runx2 als auch in der neuronalen Entwicklung eine essentielle Rolle spielt (Grigoryan *et al.* 2008; Dong *et al.* 2006). Unter anderem ist Wnt im Zeitraum von E10-E12 maßgeblich an der Entwicklung von Ganglien beteiligt (Hari *et al.* 2002). Auch das axonale Wachstum von Neuronen des Corpus Callosum, welches im *Vt1a/Vt1b* DKO deutlich reduziert ist, hängt von einem Wnt-Signalgradienten ab (Keeble *et al.* 2006).

Die Sekretion des Wnt-Faktors aus Wnt-exprimierenden Zellen ist von dem Wnt-bindenden Protein *Wntless* (Wls) abhängig (Banziger *et al.* 2006; Bartscherer *et al.* 2006; Goodman *et al.* 2006). Wnt bindet Wls am *trans*-Golgi-Netzwerk und wird zur Plasmamembran transportiert. Nach der Dissoziation von Wnt wird Wls Clathrin-abhängig endozytiert und über das frühe Endosom zum TGN recycelt (Lorenowicz und Korswagen 2009; Yang *et al.* 2007). Sowohl bei der homotypischen Fusion früher Endosomen sowie beim retrograden Transport von frühen Endosomen zum TGN ist *Vti1a* beteiligt (Mallard *et al.* 2002; Antonin *et al.* 2000b). Es ist demnach denkbar, dass in *Vti1a/Vti1b* defizienten Zellen das Recycling von Wls und damit die Wnt-Sekretion beeinträchtigt ist. Eine daraus folgende, defiziente Wnt-Signalgebung über *Runx2* könnte eine verspätete Differenzierung von Chondrozyten und Fehlentwicklungen im Skelett nach sich ziehen (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1** Mögliche Beteiligung von *Vit1a/Vti1b* am Wls-recycling

Die Sekretion des Wnt-Proteins ist von dessen Transporter Wls (rotes Symbol) abhängig. Dieser wird nach der Sekretion wieder endozytiert und in frühen Endosomen für das Recycling zum TGN sortiert. *Vit1a/Vti1b* Defizienz könnte zu einer Fehlsortierung oder einer verlangsamten Kinetik des Wls-Recyclings führen.

Ein weiterer Mechanismus zur *Runx2*-Regulation verläuft über MAP-Kinasen. Durch Aktivierung des MAP-Kinase/Erk-Signalwegs wird die *Runx2*-Transkriptionsaktivität gesteigert, durch Blockieren des Signalwegs wird sie gehemmt (Ge *et al.* 2007). MAP-Kinasen werden über Rezeptortyrosinkinasen wie FGF-Rezeptoren oder den EGF-Rezeptor aktiviert. Ein Knockout des EGF-Rezeptors führt in Mausembryonen zu einer verspäteten Rekrutierung von Osteoblasten und nachfolgenden Defizienzen in der Ossifikation (Wang *et al.* 2004). In *Vti1a/Vti1b* defizienten MEF liegt eine Dysregulation des EGF-Rezeptors bei Stimulation mit physiologischen Konzentrationen von EGF vor (3.2.7.5, siehe auch 4.3.2). Der beobachtete, rapide Abbau des EGF-Rezeptors könnte zu einer verminderten *Runx2*-Aktivität und damit zu mangelnder Calcifizierung und Fehlbildungen der Knochen in DKO Embryonen führen.

## 4.2.2 Veränderungen der Lunge

In HE gefärbten Paraffinschnitten zeigte sich eine eindeutige Veränderung der Lunge in DKO Embryonen (3.1.3). Die Alveolen waren gegenüber DHET Embryonen weniger expandiert und die Interstitialräume der Septen wiesen häufig mehr als zwei Zellschichten auf. Aufnahmen der Lungen wurden mit 400x Vergrößerung angefertigt und die Zellen pro aufgenommenem Feld gezählt. Dies zeigte eine im DKO mit  $1900 \pm 172$  Zellen/Feld gegenüber DHET mit  $1227 \pm 57$  Zellen/Feld deutlich höhere Zellzahl.

Ein dazu ähnliches phänotypisches Bild der Lunge zeigen Caveolin-1 Knockout-Mäuse (Drab *et al.* 2001). In diesen Mäusen sind in 30 % der Flächen eines Lungenschnitts die Septen deutlich verdickt. Durch Färbung mit Flk1, einem Marker für nicht-differenzierte Endothelzellen, wurde deutlich, dass es sich um eine durch Hyperproliferation ausgelöste Fibrose handelte (Drab *et al.* 2001). Diese Hyperproliferation beruht auf einer Veränderung der Aktivität von *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) und MAP-Kinase-Kaskaden, die normalerweise durch Caveolin-1 reguliert werden (Wang *et al.* 2006).

Aufgrund des engen Zusammenhangs von Caveolin-1 und dem endosomalen System (siehe 1.1.3.3) wurde überprüft, ob der Phänotyp in *Vt1a/Vt1b* defizienten Lungen möglicherweise mit einer veränderten Expression von Caveolin-1 verbunden ist. Die Analyse von Lungengewebe mehrerer Embryonen ergab jedoch, dass Caveolin-1 in DKO und DHET in vergleichbaren Mengen vorlag (3.1.3). Auch der Caveolae-abhängige Transport ist in DKO MEF nicht beeinträchtigt (3.2.5.2, siehe auch 4.3.4). Eine *Vt1a/Vt1b* abhängige Beteiligung von Caveolin am Phänotyp der DKO Lungen ist damit unwahrscheinlich.

Es könnten zwei weitere Mechanismen zur Erklärung des Phänotyps in Frage kommen. Zum einen könnte, ähnlich wie für den Phänotyp der Knochen vorgeschlagen, die Signaltransduktion im Lungenepithel gestört sein. Weiterhin ist eine Beeinträchtigung in der Bildung der Lamellarkörper, die den alveolaren *Surfactant* sekretieren, denkbar.

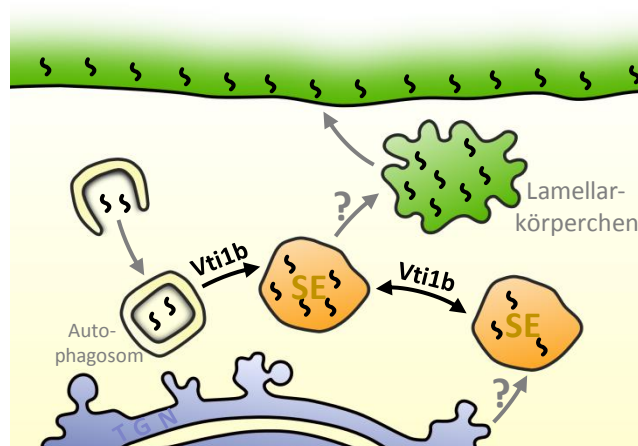
### 4.2.2.1 Defiziente Bildung von Lamellarkörperchen und *Surfactant*-Sekretion

Unter *Surfactant* versteht man ein Gemisch aus Lipiden und Proteinen, welches das alveolare Endothel auskleidet (Goerke 1998). Der *Surfactant*-Film vermindert unter anderem die Oberflächenspannung der Alveolen und verhindert auf diese Weise, dass die ansonsten instabilen alveolaren Strukturen kollabieren (Whitsett *et al.* 2010). Der *Surfactant*-Film wird durch physikalischen Stress beim ersten Atemzug von alveolaren Zellen des Typs II sekretiert (Andreeva *et al.* 2007).

*Vt1a/Vt1b* heterozygote und defiziente Embryonen reagierten bei der Präparation an

E18,5 auf äußere Reize und zeigten teils deutlich sichtbare Schnappatmung. Unter diesen Gesichtspunkten könnten die Alveolen im DKO aufgrund einer gegenüber DHET ungenügenden Sekretion von *Surfactant* weniger expandiert sein und so das beobachtete Bild erzeugen.

*Surfactant* wird in Lamellarkörperchen der Alveolaren Typ II Zellen gespeichert (Andreeva *et al.* 2007; Schmitz und Müller 1991). Unter anderem über eine Bestimmung des Proteoms der Lamellarkörperchen zeigte sich, dass sie lysosomalen Charakter haben (Wang *et al.* 2008). Sie entstehen aus multivesikulären Strukturen später Endosomen und vermutlich auch unter Mitwirkung des Autophagosoms (Lajoie *et al.* 2005; Weaver *et al.* 2002; Hariri *et al.* 2000). Während bekannt ist, dass zur Sekretion der Lamellarkörperchen die SNAREs Syntaxin 2 und SNAP-23 an der Plasmamembran essentiell sind, sind an der Biosynthese des Organells beteiligte SNAREs noch unbekannt (Wang *et al.* 2008; Abonyo *et al.* 2004).



**Abb. 4.2 Mögliche Beteiligung von Vit1a/Vti1b an der Bildung von Lamellarkörperchen**

Alveolare Lamellarkörperchen werden vermutlich über zwei Wege gebildet. Zum einen enthalten sie spätendosomal-lysosomale Komponenten, zum anderen sind autophagosomale Prozesse beteiligt. An beiden Synthesewegen könnte Vti1b beteiligt sein. Eine Vit1a/Vti1b Defizienz könnte zur verminderten Bildung von Lamellarkörperchen führen, was wiederum eine verringerte Sekretion von *Surfactant* zur Folge hätte.

Da Vti1b an der homotypischen Fusion später Endosomen und der Fusion später Endosomen mit dem Lysosom beteiligt ist (Pryor *et al.* 2004; Antonin *et al.* 2000b) sowie eine Rolle bei der Autophagosomenreifung spielt (Furuta *et al.* 2010; Atlashkin *et al.* 2003), ist eine Funktion bei der Bildung von Lamellarkörperchen wahrscheinlich. Eine Defizienz von Vti1a/Vti1b könnte in diesem Fall zu einer Störung in der Bildung von Lamellarkörperchen führen. Die daraus resultierende Verminderung in der Sekretion von *Surfactant* könnte zum Phänotyp der DKO Lunge führen (Abb. 4.2).

Zur Überprüfung des vorgeschlagenen Mechanismus könnten elektronenmikroskopische Aufnahmen der DKO Lunge angefertigt werden, um Struktur und Quantität der Lamellar-

körperchen zu analysieren. In einem alternativen Ansatz wäre es möglich, an Zellkulturen des Lungengewebes die Beteiligung von *Vt1b* an der Bildung von Lamellarkörpern nachzuweisen.

#### 4.2.2.2 Dysregulation der Proliferation/Differenzierung von Lungenepithel

Wie bereits in 4.2.1.3 dargelegt, könnte eine *Vt1a/Vt1b* Defizienz Einfluss auf die Wnt-Signalgebung haben. Auch die Entwicklung der Lunge ist hochgradig von einer streng regulierten Wnt-Signalgebung abhängig (Pongracz und Stockley 2006; Okubo *et al.* 2004). Sowohl eine Hyperaktivierung als auch eine Blockade des kanonischen Wnt-Signals führt zu einer fehlerhaften Entwicklung der Lunge, in der besonders die peripheren, alveolaren Bereiche nicht ausgebildet wurden (Okubo *et al.* 2004; Mucenski *et al.* 2003). Ein Knockout von *Wnt5a*, das über einen nicht-kanonischen Weg Signale transduziert, führte in E18 Lungen unter anderem zu einer wesentlich erhöhten Proliferation von Epithelzellen (Li *et al.* 2002).

Insgesamt sind an der Morphogenese und Entwicklung der Lunge zahlreiche Wnt-Isoformen beteiligt (Pongracz und Stockley 2006). Welche Auswirkungen ein eventueller Einfluss der *Vt1a/Vt1b* Defizienz auf Wnt-Faktoren und Signalgebung haben könnte, ist daher ohne umfangreiche Untersuchungen nicht vorherzusagen. Auch andere Signalwege, beispielsweise über den EGF-Rezeptor, haben erheblichen Einfluss auf die Lungenentwicklung. In EGFR defizienten E18 Embryonen sind die Alveolen unregelmäßig ausgebildet und teilweise kollabiert, zeigen entgegen den *Vt1a/Vt1b* defizienten Tieren aber Septen von verminderter Zellstärke (Cardoso und Lü 2006; Miettinen *et al.* 1997).

Zur Klärung einer möglicherweise gestörten Signalgebung muss zuerst festgestellt werden, ob die in *Vt1a/Vt1b* defizienten Embryonen vorliegenden Veränderungen tatsächlich auf eine übermäßige Proliferation oder veränderte Differenzierung von Epithelzellen zurückzuführen ist. Dies könnte über Färbungen von histologischen Schnitten unterschiedlicher Embryonalstadien mit verschiedenen Markern erfolgen. Je nach Ergebnis wäre dann zu klären, welche Signalwege bei der Entwicklung im DKO verändert sind.

### 4.3 Mausembryonale Fibroblasten

Um auf zellulärer Ebene die Mechanismen zu analysieren, die zu den phänotypischen Veränderungen an DKO Embryonen führen, wurden mausembryonale Fibroblasten immortalisiert. An diesem Modell der *Vt1a/Vt1b* Defizienz zeigte sich, dass das endosomale System in Morphologie und Funktion erstaunlich wenig beeinträchtigt war.

Im Folgenden wird zunächst die Bedeutung der im DKO beobachteten erhöhten Sekretion lysosomaler Hydrolasen, der veränderten EGFR-Regulation und der möglichen Störung im Lipidhaushalt diskutiert. Anschließend wird auf die übrigen Experimente, den daraus gefolgerten, milden Phänotyp und mögliche Ursachen dafür eingegangen.

#### 4.3.1 Erhöhte Sekretion lysosomaler Hydrolasen

In DKO MEF war gegenüber DHET die Sekretion der getesteten lysosomalen Hydrolasen  $\beta$ -Mannosidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Hexosidase und  $\beta$ -Glucuronidase um teilweise fast das Doppelte der normalen Sekretion signifikant erhöht (3.2.4.1). Auch *Vt1a*<sup>-/-</sup>*Vt1b*<sup>+/-</sup> MEF zeigten eine leichte, aber bei drei der getesteten Enzyme signifikante Erhöhung. Bei *Vt1a*<sup>+/-</sup>*Vt1b*<sup>-/-</sup> MEF war eine leichte Sekretionssteigerung nur für die  $\beta$ -Glucuronidase signifikant.

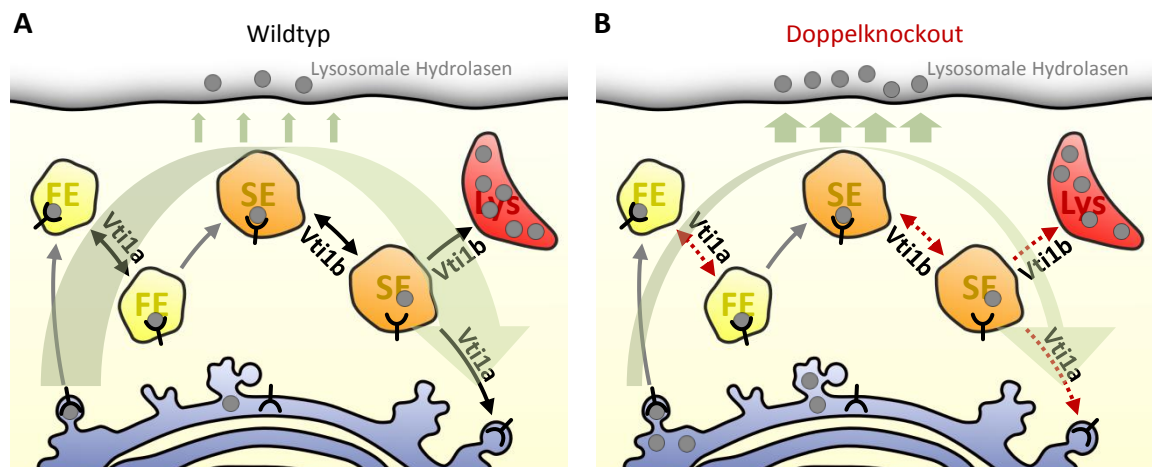
Die Sekretion lysosomaler Hydrolasen entsteht demnach durch einen additiven Effekt der Defizienz von *Vt1a* und *Vt1b*. Dabei spielt der Verlust von *Vt1a* offensichtlich eine größere Rolle als der Verlust von *Vt1b*. Es wäre allerdings auch denkbar, dass der Sekretionseffekt in den *Vt1a*<sup>+/-</sup>*Vt1b*<sup>-/-</sup> MEF allein auf der Halbierung des *Vt1a*-Proteingehalts beruht: Die Proteinmengen von *Vt1a* und *Vt1b* hängen direkt von der Anzahl der codierenden Allele ab. Da keine vergleichbaren MEF des Genotyps *Vt1a*<sup>+/+</sup>*Vt1b*<sup>-/-</sup> zur Verfügung standen, konnte diese Möglichkeit jedoch nicht überprüft werden.

Neu synthetisierte lysosomale Hydrolasen werden über MPR vom TGN zum Lysosom transportiert (Figura *et al.* 1986). Die Route führt über frühe Endosomen zu späten Endosomen, wo MPR und Hydrolasen aufgrund des niedrigen pH-Wertes dissoziieren (Pfeffer 2009; Tong und Kornfeld 1989). Die Hydrolasen werden über Fusion an das Lysosom abgegeben, während die MPR zum TGN recyceln (Gosh *et al.* 2003). Fehlt eine der beiden MPR-Varianten oder wird die 46 kDa-Form überexprimiert, resultiert dies in einer vermehrten Sekretion der transportierten Proteine aus einem prä-lysosomalen Kompartiment (Kasper *et al.* 1996; Chao *et al.* 1990).

Unter Berücksichtigung der für MPR beschriebenen Transportroute müssten *Vt1a* und

Vti1b beide an Fusionen während des MPR-Recyclings beteiligt sein. Tatsächlich wurde dies für Vti1a direkt nachgewiesen (Medigeschi und Schu 2003). Ebenfalls wurde gezeigt, dass Zugabe von Antikörpern gegen Vti1a in HeLa-Zellkulturen eine erhöhte Sekretion lysosomaler  $\beta$ -Hexosaminidase zur Folge hat (Ganley *et al.* 2008).

Die in Vti1a/Vti1b defizienten MEF beobachtete Sekretionserhöhung basiert demnach höchstwahrscheinlich auf einem Fehler im Recycling der MPR. Die Lokalisation von MPR46 und MPR300 erwies sich jedoch in DHET und DKO MEF auch gegenüber Markern des endosomalen Kompartiments als unverändert (3.2.4.3). Ebenfalls konnte für MPR46 keine genotypabhängige Veränderung der Proteinkonzentration festgestellt werden, die beispielsweise auf eine Degradation aufgrund einer Fehlsortierung hinweisen würde (3.2.4.2). Die Proteinkonzentration von MPR300 konnte allerdings wegen des für den Westernblot ungeeigneten Antikörpers nicht quantifiziert werden. Dies sollte mit einem anderen Antikörper nachgeholt werden. Wenn für die 300 kDa-Variante des MPR eine verminderte Konzentration nachgewiesen werden könnte, wäre die Sekretion der Hydrolasen auf einen verhältnismäßigen Überschuss von MPR46 zurückzuführen (Chao *et al.* 1990).



**Abb. 4.3 Erhöhte Sekretion lysosomaler Hydrolasen durch beeinträchtigtetes Endosom/TGN-Recycling**

**A** MPR transportieren lysosomale Hydrolasen zum späten Endosom, wo der MPR-Hydrolase-Komplex dissoziiert. Die Hydrolasen werden ins Lysosom abgegeben, während die MPR zum TGN recycelt werden. Eine geringe Menge der Hydrolasen wird sekretiert. **B** Durch Defizienz von Vti1a und Vti1b könnten mehrere Schritte im Recycling der MPR beeinträchtigt sein. Dies führt zu einer insgesamt verringerten Kinetik des MPR-Transports. Dadurch sind die Rezeptoren übersättigt und Hydrolasen werden vermehrt sekretiert.

Die beobachtete, geringfügig dispersere Verteilung der MPR in DKO gegenüber DHET MEF könnte auf veränderte Strukturen MPR-positiver Kompartimente hinweisen, die mit einer Defizienz in Vti1a/Vti1b vermittelten Fusionsschritten zu erklären ist. Denkbar wäre, dass wegen solcher struktureller Veränderungen das Recycling der MPR beeinträchtigt ist und so die vermehrte Sekretion der Hydrolasen zustande kommt. Da diese Veränderungen

sehr geringfügig sind und auch andere endosomale Marker in der konventionellen Fluoreszenz-mikroskopie keine Unterschiede zeigen (3.2.2), müssten zur Bestätigung genauere Analysen mit hochauflösenden Methoden wie der PALM-Mikroskopie durchgeführt werden. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme der MEF wird zurzeit angefertigt und könnte zeigen, ob Golgi-Apparat und Vesikel der DKO Zellen generell morphologische Unterschiede aufweisen.

Bis solche Daten vorliegen, ist ein insgesamt verlangsamtes Recycling der MPR der wahrscheinlichste Mechanismus für die verstärkte Sekretion (Abb. 4.3). Unter der Annahme, dass anterograder und retrograder Transport zwischen Endosom und TGN gleichermaßen durch Vti1a/Vti1b Defizienz beeinträchtigt sind, wäre weder eine Fehlsortierung der MPR noch eine kompartimentspezifische Akkumulation oder Degradation zu beobachten. Dies entspräche den erhaltenen Ergebnissen. Durch Absättigung der verlangsamt recycelten MPR könnte dann am TGN eine Fehlsortierung in sekretorische Vesikel erfolgen. Ein verlangsamtes TGN/Endosom-Recycling könnte eventuell über *live-cell-imaging* aufgeklärt werden. Dazu würde die Aufnahme exogener, fluoreszenzmarkierter MPR in die Zelle verfolgt werden. Ein schnelles Erreichen des endosomalen Systems und nachfolgende Akkumulation oder Verlangsamung des Transports im DKO würde auf entsprechende Defekte hindeuten.

### 4.3.2 Dysregulation des EGF-Rezeptors

Der EGF-Rezeptor wird, bei Stimulation mit physiologisch niedrigen EGF-Konzentrationen, über Clathrin *coated pits* aufgenommen und ein Großteil der Rezeptoren wieder zur Plasmamembran recycelt (Sigismund *et al.* 2008). Bei Stimulation mit 1,5 ng/mL EGF zeigten DHET MEF einen Anstieg im EGFR-Gehalt, der nach 30 min bei  $274 \pm 60$  % des Ursprungswertes lag, während der EGFR im DKO rapide abgebaut wurde und nach 30 min  $41 \pm 7$  % des Ausgangswertes aufwies (3.2.7.5). Der Anstieg des EGFR-Gehalts im DHET ist nicht auf die EGF-Stimulation zurückzuführen, sondern geschieht durch den experimentell bedingten, vorherigen Serumentzug. Sowohl in DHET als auch DKO war EGFR nach 2 – 3 h in DMEM BSA vermehrt exprimiert. Die Induktion der EGFR-Expression durch Serumentzug wurde auch in anderen Zelllinien beobachtet (Halatsch *et al.* 2004). Ebenso wird beispielsweise der verwandte Rezeptor für *Vascular Endothelial Growth Factor* VEGF unter Serumentzug hochreguliert (Akagi *et al.* 1998). Der Anstieg der zellulären EGFR-Konzentration 2 – 3 h nach Beginn der Induktion, Expression und posttranslationalen Modifikationen liegt bei DHET und DKO im erwarteten Zeitrahmen (Olson *et al.* 1989).

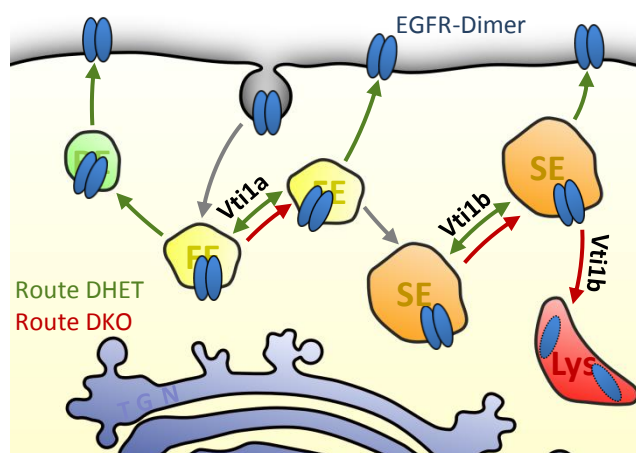


### 4.3.2.1 Fehlsortierung des EGF-Rezeptors

Während der EGFR-Anstieg im DKO bei physiologischer EGF-Stimulation durch rapiden Abbau verhindert wird, ist ein EGF-Einfluss beim DHET nicht zu erkennen. Dies spricht dafür, dass der EGF-Rezeptor im DHET recycelt wird, während er im DKO einer degradativen Route zugeführt wird (Sigismund *et al.* 2008).

Da die Aktivierungskinetik des EGF-Rezeptors und damit die Empfindlichkeit für EGF stark von dessen Dimerisierung abhängt, wurde spekuliert, dass die Verteilung des Rezeptors zwischen Plasmamembran und endosomalem System im DKO verändert sein könnte (Canals 1992). Bei erhöhter Oberflächenkonzentration wäre zu erwarten, dass der Rezeptor schon bei geringeren EGF-Konzentrationen stärkere Signale generiert und daher degradiert wird. Es zeigte sich jedoch über FACS-Analysen, dass die Oberflächenkonzentrationen in DHET und DKO MEF vergleichbar waren (3.2.7.6).

Daher ist anzunehmen, dass die Ursache der veränderten EGFR-Regulation zu späteren Zeitpunkten nach der Internalisierung zu suchen ist. Im Normalfall tritt der EGF-Rezeptor teils schon nach 2 min in das früh-endosomale Kompartiment ein, von wo aus er schnell recycelt oder durch homotypische Fusion früher Endosomen zum weiteren retrograden Transport sortiert wird (Sorkin und Goh 2009; Hopkins *et al.* 1985; Dunn *et al.* 1984). Im späten Endosom erfolgt wiederum eine Sortierung entweder zum langsamen Recyclen oder zur Internalisierung in multivesikuläre Strukturen, was zur Degradation im Lysosom führt (Sorkin und Goh 2009). An allen Stellen des endosomalen Transportes hängt die Sortierung von der Interaktion mit mehreren Adapterproteinen und vielfachen Signalen wie der genauen Phosphorylierung und Ubiquitylierung ab (Sorkin und Goh 2009; Huang *et al.* 2006; Futter *et al.* 2006).



**Abb. 4.4** Der EGF-Rezeptor könnte im DKO fehlreguliert und daher degradiert werden

Nach Endozytose des aktiven EGFR-Komplexes wird er im früh- und spätendosomalem System verschieden sortiert. Nach Stimulation mit physiologischen EGF-Konzentrationen wird der EGF-Rezeptor im DHET zum Recycling an die Plasmamembran sortiert. Im DKO führt vermutlich eine Fehlsortierung in den endosomalen Kompartimenten zu einer Degradation im Lysosom.

Vt1a und Vt1b sind demnach an Fusionen der Kompartimente beteiligt, durch die der EGF-Rezeptor transportiert wird (Abb. 4.4). An welcher Stelle genau der EGFR-Transport im DKO jedoch vom DHET abweicht, kann nur durch genaue Verfolgung der Route mit multiplen Markern erschlossen werden. Hierzu könnte die gleichzeitige Aufnahme von EGF und anderen Markern der Clathrin-abhängigen Endozytose, wie Transferrin oder LDL (deren Transport nicht gestört ist, siehe 4.3.4, 3.2.5 und 3.2.6), mikroskopisch verfolgt werden. Auch sollten die Kompartimente, durch die der EGF-Rezeptor transportiert wird, während der EGF-Aufnahme mit Rab4 (Recycling-Vesikel des frühen Endosoms), Rab5 (frühes Endosom), Rab7 (spätes Endosom) oder Rab11 (Recycling-Endosom) spezifisch co-gefärbt werden (Stenmark 2009). Alternativ sollte zur Degradation des EGF-Rezeptors über *Pulse-Chase*-Experimente mit radioaktiv markiertem EGF überprüft werden, wie viel des Rezeptorkomplexes in DHET und DKO jeweils recycelt wird.

Ist der Schritt bekannt, an dem die Fehlsortierung eintritt, könnten daran beteiligte Faktoren bestimmt werden. Denkbar wäre beispielsweise, dass die Sortierung durch das veränderte Recycling eines EGFR-Adapters beeinträchtigt wird.

#### 4.3.2.2 Weitere Konsequenzen der Dysregulation

Auch wenn der genaue Mechanismus der EGFR-Fehlsortierung noch nicht bekannt ist, ist die Tatsache dieser Dysregulation hochgradig interessant. Eine korrekt regulierte Signalgebung des EGF-Rezeptors ist während der Embryogenese für eine normal verlaufende Entwicklung essentiell (Sibilia *et al.* 2007). Im Hinblick auf die regulative Funktion der Rezeptordegredation (siehe 1.2.1) ist eine Beeinträchtigung der Signalgebung des Rezeptors im DKO zu erwarten.

Erste Versuche zur Bestimmung des bei physiologischen EGF-Konzentrationen induzierten Erk-Signals zeigten in MEF zwar noch keine eindeutigen Ergebnisse, weitere Untersuchungen sollten dies jedoch klären. Auch die EGF-induzierte Zellmigration erwies sich bei DHET und DKO bei physiologischen Konzentrationen als vergleichbar (3.2.7.4). Es ist jedoch anzumerken, dass sich die EGFR-Konzentrationen in DHET und DKO nach einer längeren Inkubationszeit mit EGF wieder ihren Ausgangswerten nähern (siehe Abb. 3.26). Sofern die Dysregulation also nur innerhalb eines Zeitraums von ca. 60 – 120 min Auswirkungen zeigt, ist ein Unterschied in der MEF-Migration über 27 h nicht zu erwarten. Es sollten also vor allem kurzfristige Reaktionen der Zelle, wie die vom EGFR ausgelösten Signalkaskaden, untersucht werden. Dies entspricht vermutlich auch eher den *in vivo*-Bedingungen, unter denen EGF von mehreren Zellen kompetitiv aufgenommen werden muss und nicht wie im getesteten *in vitro*-System im Überschuss vorhanden ist.

Im Weiteren ist der EGF-Rezeptor Teil der übergeordneten Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, zu denen auch der *Fibroblast Growth Factor Receptor* FGFR oder der für die neuronale Entwicklung essentielle Rezeptor TrkA gehören (Hubbard und Miller 2007; Wiley und Burke 2001). Da auch diese Rezeptoren einer endosomalen Regulation unterliegen ist zu klären, ob sie im DKO ähnliche Effekte aufweisen. Selbst wenn nur die bisherigen Ergebnisse berücksichtigt werden, ist eine Beteiligung der EGFR-Dysregulation am Phänotyp der Vt1a/Vt1b defizienten Embryonen sehr wahrscheinlich. Im Hinblick auf die mögliche Beteiligung der Wnt-Signalgebung an der Fehlentwicklung von DKO Embryonen ist besonders hervorzuheben, dass EGFR- und Wnt-Signalgebung miteinander mechanistisch verbunden sind. Eine Aktivierung des EGFR hat beispielsweise eine Transaktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges zur Folge (Ji *et al.* 2009).

### 4.3.3 Aufbau, Abbau und Gleichgewicht von Lipidtropfen

Lipidtropfen sind dynamische Organellen, an deren Bildung vermutlich Caveoline beteiligt sind (Walther *et al.* 2009; Pohl *et al.* 2002). Caveolin-1 defiziente Mäuse haben Defekte in der Lipolyse und daraus isolierte MEF zeigen eine beeinträchtigte Synthese von Lipidtropfen (Cohen *et al.* 2004). Umgekehrt wäre auch eine Beeinflussung der zellulären Caveolin-Verteilung durch eine veränderte Homöostase von Lipidtropfen denkbar. Dies ist bei einigen SNARE-Proteinen der Fall, die auf überzählige Lipidtropfen rekrutiert werden und daher an anderer Stelle fehlen (Söllner 2007; Boström *et al.* 2007). So wäre über diesen Umweg beispielsweise ein Effekt der Lipidtropfen auf die Entwicklung des Lungenendothels möglich (siehe 4.2.2). Da der Vt1a-Komplexbpartner VAMP-4 an der Fusion von intrazellulären Lipidtropfen beteiligt ist (Boström *et al.* 2007), wurde untersucht, ob die Vt1a/Vt1b Defizienz einen Einfluss auf den Auf- und Abbau von Lipidtropfen haben könnte. Auch ein indirekter Effekt der Vt1a/Vt1b Defizienz durch veränderte Recycling-Kinetiken des endosomalen Systems wäre denkbar, da bereits nachgewiesen wurde, dass frühe Endosomen, vermutlich zum Lipid-Austausch, mit Lipidtropfen interagieren (Liu *et al.* 2007).

Dies bestätigte sich jedoch nicht; die Lipidtropfen in DHET und DKO MEF wurden mit gleicher Geschwindigkeit synthetisiert und wieder degradiert (3.2.8.1). Es zeigte sich allerdings, dass in einer von drei getesteten Zelllinien (E-Linie) im DKO bereits bei Inkubation unter Standardbedingungen eine erhöhte Anzahl der Lipidakkumulationen vorlag (3.2.8.1).

Der so erhaltene Hinweis, dass Vt1a oder Vt1b funktional am zellulären Lipidgleichgewicht beteiligt sind, bestätigte sich jedoch in Zellen der T-Linie und TBL6-Linie nicht.

Diese durch das *Large-T*-Antigen immortalisierten Zelllinien proliferieren allerdings fast doppelt so schnell wie die durch Passagieren immortalisierte E-Linie. Da Lipidtropfen bei einer Zellteilung gleichmäßig zwischen den Tochterzellen aufgeteilt werden (Nagayama *et al.* 2007), bestand die Möglichkeit, dass eine im DKO veränderte Lipidhomöostase durch die hohe Proliferationsrate der T- und TBL6-Linien überdeckt wurde.

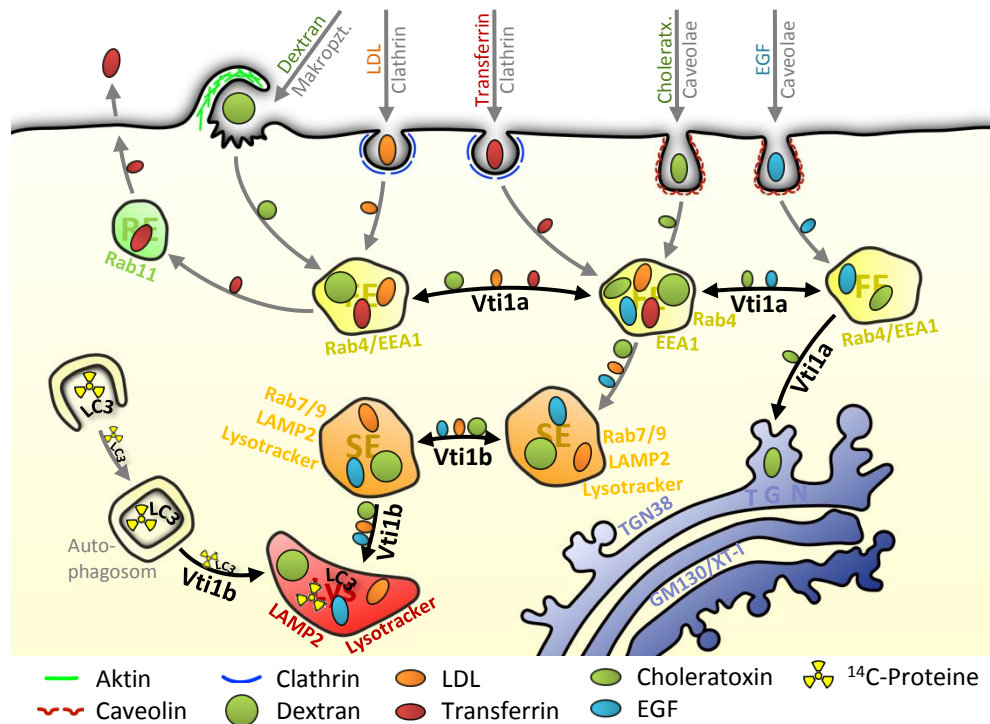
Nilrotfärbungen einer nachträglich durch Passage immortalisierten MEF-Linie mit BL6-Hintergrund zeigten jedoch ebenfalls keine erhöhte Lipidakkumulation im DKO. Die Proliferationsrate dieser Zelllinie entspricht ungefähr derjenigen der E-Linie. Die höhere Anzahl von Lipidtropfen im DKO der E-Linie ist demnach eine zufällige, vom Genotyp unabhängige Eigenschaft.

#### 4.3.4 Das endosomale System Vti1a/Vti1b defizienter MEF

Da Vti1a und Vti1b an essentiellen Fusionsschritten des endosomalen Systems beteiligt sind, wurden offensichtliche Defizite in der Morphologie und Funktion des Systems in DKO MEF erwartet. Mit der erhöhten Sekretion lysosomaler Enzyme und der Dysregulation des EGF-Rezeptors (siehe 4.3.1 und 4.3.2) wurden wichtige Hinweise auf die *in vivo* Funktion von Vti1a/Vti1b gefunden. Eine Vielzahl endosomaler Eigenschaften ist jedoch in DKO und DHET MEF unverändert (Übersicht in Abb. 4.5).

Morphologie und Lokalisation des *cis*- und medialen Golgi-Apparats (XT-I), früher Endosomen (Rab4, EEA1) und der aziden spät-endosomalen und lysosomalen Kompartimente (Lysotracker) waren in DHET und DKO vergleichbar (3.2.2.1). Ebenso wie die Colokalisation von spätem Endosom und Recycling-Endosom ein gleiches Muster auf (3.2.2.2). Die Autophagozytose wurde über zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze bestimmt und erwies sich als funktionell (Akkumulation von LC3-II und Abbau radioaktiv markierter Proteine, 3.2.3). Die Endozytose über Makropinozytose (Dextran), Clathrin *coated pits* (LDL) und Caveolae (Choleratoxin) sowie der anschließende endosomale Transport erfolgte im DKO mit unveränderter Kinetik. Nach vergleichbar verlaufender Aufnahme von Transferrin wurde dieses in DHET und DKO gleichermaßen zur Abgabe recycelt (3.2.6). Nach Stimulation durch hohe Konzentrationen an EGF wird der EGF-Rezeptor hauptsächlich Caveolae-spezifisch endozytiert (Sigismund *et al.* 2008). Der nachfolgende Weg und die Degradation wurden im Detail verfolgt, es zeigten sich aber unter diesen Bedingungen, entgegen den Beobachtungen nach vorwiegend clathrinabhängiger Aufnahme (4.3.2), keine Unterschiede zwischen DHET und DKO. Ebenso war die Signalgebung des Rezeptors, die über Erk-Phosphorylierung und Zellmigration bestimmt wurde, im DKO nicht beeinträchtigt (3.2.7.3 und 3.2.7.4).

Unter Berücksichtigung dieser Fakten stellen sich zwei Fragen. Erstens: Wie können in DKO MEF Transportwege funktional sein, die essentiell von der Funktion von Vti1a/Vti1b abhängen? Und zweitens: Wenn der siRNA-vermittelte Knockdown von Vti1b zu Defizienzen in der Autophagozytose führt (Furuta *et al.* 2010), weshalb zeigt dann der Knockout von Vti1b nicht den gleichen Effekt? Beide Fragen werden im Folgenden diskutiert und jeweils ein möglicher Mechanismus zur Beantwortung aufgezeigt.



**Abb. 4.5** Untersuchte Morphologie und Transportwege in MEF

DKO MEF sind in vielerlei Hinsicht gegenüber DHET MEF unverändert. Getestet wurde die Aufnahme und der anschließende Transport von Dextran, LDL und Choleratoxin über Makropinozytose, Clathrin-vermittelte und Caveolae-abhängige Endozytose. Für Transferrin wurde sowohl die Aufnahme als auch das Recycling verfolgt. Stimulation der Zellen mit hohen Konzentrationen an EGF führt zur vorwiegend Caveolae-abhängigen Endozytose, wonach der EGFR-Komplex zum lysosomalen Kompartiment transportiert und degradiert wurde. Die autophagozytotische Kapazität der Zellen wurde über den Abbau radioaktiv markierter Proteine sowie die Umwandlung und die anschließende Degradation von LC3 überprüft. Die Morphologie der Zellen wurde über die Marker Rab4/7/9/11, EEA1, LAMP2, Lysotracker, TGN38, GM130 und XT-1 analysiert.

#### 4.3.4.1 Vti1a und Vti1b werden durch andere SNARE Proteine ersetzt

Die Eigenschaft der SNARE-Proteine, auch mit nicht-spezifischen Komplexpartnern SNARE-Komplexe ausbilden zu können, solange die RQabc-Regel eingehalten wird, wurde bereits erwähnt (siehe 1.4.3). Ein Beispiel dafür ist der murine Knockout von *VAMP-3*, der vermutlich vollständig durch *VAMP-2* kompensiert wird und keinen Phänotyp aufweist (Yang *et al.* 2001). Auch die Defizienz des neuronalen SNAREs Syntaxin 1A verursacht fast keinerlei Defekte, da es im Komplex wahrscheinlich durch Syntaxin 1B ersetzt wird (Fujiwara *et al.* 2006). In anderen Fällen kommt es zu

gewebespezifischen Unterschieden, wie beim letalen Knockout von *VAMP-2* (Schoch *et al.* 2001). In chromaffinen Zellen wird die *VAMP-2* Defizienz vollständig durch *VAMP-3* kompensiert, während in Synapsen, wo *VAMP-3* nicht vorliegt, die Vesikelfusion wesentlich beeinträchtigt ist (Borisovska *et al.* 2005; Schoch *et al.* 2001).

Der Phänotyp *Vti1a/Vti1b* defizienter Mäuse legt ebenfalls einen kompensatorischen Mechanismus nahe, der abhängig vom Gewebetyp ist. Während neuronales System, Lunge und Skelett Fehlbildungen aufweisen, sind *Vti1a/Vti1b* abhängige Transportrouten in MEF fast vollständig funktional (3.1 und 3.2; Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

Das *Vti1a/Vti1b* abhängige Fusionen in DKO MEF von anderen SNARE-Komplexen übernommen werden, ist unwahrscheinlich. In einem Experiment an frühen Endosomen zeigte sich, dass trotz Anwesenheit mehrerer potentieller Komplexe die Störung des früh-endosomalen SNARE-Komplexes spezifisch alle Fusionsvorgänge unterband (Brandhorst *et al.* 2006). Es sind daher höchstwahrscheinlich andere SNAREs der Qb-Klasse, die den Verlust von *Vti1a* und *Vti1b* in den jeweiligen Komplexen kompensieren.

In der Maus werden noch drei weitere Qb-SNAREs exprimiert: *Sec20*, *Membrin* und *Gos28* (Klopper *et al.* 2008; Jahn und Scheller 2006). Diese SNAREs sind jedoch Teil anderer Qb-Subklassen und Transportvorgänge als *Vti1a/Vti1b* (*Sec20*: Qb.I-SNARE im ER-Transport; *Membrin/Gos28*: Qb.II-SNAREs im Golgi-Transport; Klopper *et al.* 2007/2008). Sie besitzen zudem jeweils ein homologes SNARE-Protein in Hefe. Da *Vti1p* in Hefen essentiell ist, ist eine kompensatorische Funktion dieser Qb-SNAREs bei der *VIII* Deletion ausgeschlossen (Fischer von Mollard *et al.* 1997). Dass *Sec20*, *Membrin* und *Gos28* den murinen Knockout von *Vti1a* und *Vti1b* in einem evolutionär höheren und komplexeren System kompensieren können, ist daher sehr unwahrscheinlich.

Neben den genannten Qb-SNAREs kommen auch Qbc-SNAREs als Ersatz für *Vti1a/Vti1b* in Frage. Folglich würde nicht nur das Qb-SNARE, sondern auch das Qc-SNARE in einem *Vti1a/Vti1b* abhängigen SNARE-Komplex ersetzt. Ein Hinweis, dass dies tatsächlich der Fall sein könnte, ist die disperse Verteilung und Destabilisierung des Qc-SNAREs Syntaxin 8 im *Vti1b* Knockout sowie *Vti1a/Vti1b* Doppelknockout (Atlashkin *et al.* 2003). Dieses Verhalten von Syntaxin 8 in *Vti1b* defizienten Zellen lässt auf einen Funktionsverlust schließen, der durch eine Verdrängung im physiologischen Komplex durch ein Qbc-SNARE erklärbar ist. Syntaxin 6, der Qc-Komplexpartner von *Vti1a*, ist bei *Vti1a* Defizienz allerdings weder in Lokalisation noch Proteinmenge beeinträchtigt.

Bisher sind vier Qbc-SNAREs in der Maus bekannt: *SNAP-23*, *SNAP-25*, *SNAP-29* und *SNAP-47* (Jahn und Scheller 2006; Holt *et al.* 2006; Steegmaier *et al.* 1998). *SNAP-25* ist ein ausschließlich neuronales SNARE und kommt daher zur Kompensation in MEF nicht in Frage (Jahn und Scheller 2006). *SNAP-23* ist ubiquitär auf der Plasmamembran und in

intrazellulären Vesikeln verteilt und vermittelt in Komplexen mit VAMP-3, VAMP-7 und VAMP-8 sekretorische Vorgänge (Jahn und Scheller 2006).

SNAP-29 besitzt, im Gegensatz zu SNAP-23 und SNAP-25, keine Lipidmodifikationen zur Membranverankerung (Steggmaier *et al.* 1998). Es befindet sich auf der Plasmamembran und in vesikulären Strukturen und ist nicht nur an sekretorischen Vorgängen, sondern auch am endosomalen Recycling beteiligt (Rapaport *et al.* 2010; Gordon *et al.* 2010). Ein Knockdown von *SNAP-29* beeinträchtigt die Fusion früher Endosomen und das Recycling von Transferrin (Rapaport *et al.* 2010). Zudem ist SNAP-29 ein negativer Regulator für synaptisches Recycling und steht mit cutaner und neuronaler Entwicklung direkt in Verbindung (Pan *et al.* 2005; Sprecher *et al.* 2005). In humanen Patienten mit einer 1-bp Deletion im *SNAP-29* Gen wird beispielsweise das Corpus Callosum im Hirn nicht ausgebildet (Sprecher *et al.* 2005).

Unter den Qbc-SNAREs zeigt SNAP-29 die meisten Homologien zu dem erst kürzlich entdeckten SNAP-47. Auch dieses ist nicht palmitoyliert und intrazellulär ähnlich verteilt wie SNAP-29. SNAP-47 wird im Mausembryo ubiquitär bereits ab E10 exprimiert und ist später verstärkt in Hirngewebe zu finden (Holt *et al.* 2006).

Berücksichtigt man die Lokalisation und Funktion der genannten Qbc-SNAREs, sind SNAP-29 und SNAP-47 die wahrscheinlichsten Kandidaten für einen funktionellen Ersatz von Vti1a und Vti1b. SNAP-29 zeigte in ersten Studien jedoch keine Lokalisationsänderung in Vti1a/Vti1b defizienten Zellen und ließ sich auch nicht mit dem Vti1a-Komplexpartner Syntaxin 16 co-präzipitieren (Browski 2006). Da SNAP-29 allerdings ein in der Zelle sehr dispers verteiltes SNARE ist, ist eine veränderte Verteilung schwer nachzuweisen. Ebenso muss bedacht werden, dass in Zellen nur ca. 5 % eines SNARE-Proteins zu einer gegebenen Zeit in einem SNARE-Komplex vorliegen (Jahn und Scheller 2006). Die Co-Immunpräzipitation eines kompensatorischen SNAREs in einem eventuell noch geringeren Prozentsatz von SNARE-Komplexen könnte demnach ebenfalls schwer nachzuweisen sein.

Da die vorhandenen Daten klar auf einen kompensatorischen Mechanismus hinweisen, wird eine Beteiligung von SNAP-23, SNAP-29 und SNAP-47 zurzeit im Rahmen einer Masterarbeit weiter untersucht (Susanne Schöning).

#### 4.3.4.2 Veränderte Regulation der Membranfusion bei Knockout oder Knockdown

Über kompensatorische SNARE-Proteine ist es plausibel erklärbar, dass viele *Vt1a/Vt1b* abhängige Transportvorgänge in DKO MEF unvermindert stattfinden. Für die Tatsache, dass sich Knockdown und Knockout von *Vt1b* anders auf die autophagozytotische Kapazität der Zellen auswirken, muss es jedoch weitere mechanistische Gründe geben (3.2.3; Furuta *et al.* 2010).

Weder DKO noch triallele MEF zeigten gegenüber DHET Defizienzen in der Autophagozytose. Auch in früheren Untersuchungen *Vt1b* defizienter Mäuse wiesen deren Hepatozyten zwar teilweise Akkumulationen von multivesikulären Körpern und Autophagosomen auf, ein Defekt in der Autophagozytose konnte *in vitro* aber nicht nachgewiesen werden (Atlashkin *et al.* 2003; Atlachkine 2002). Der siRNA-vermittelte Knockdown von *Vt1b* führt dagegen zur Akkumulation autophagosomalen Materials (Furuta *et al.* 2010). Dieser Widerspruch ließe sich in einem Modell erklären, dass von einer strikten Regulation der zellulären Fusionsereignisse ausgeht.

In einer umfangreichen Studie wurde festgestellt, dass bei dem siRNA-vermittelten Knockout früh-endosomaler SNAREs typischerweise eine Restkonzentration der Proteine von ca. 10 % verbleibt (Bethani *et al.* 2009). Diese Proteinmenge erwies sich für die Ausführung von Fusionsvorgängen als ausreichend. Rab5 und EEA1 sind hauptsächlich an den frühen *Tethering*- und Andocksritten der Fusion früher Endosomen beteiligt (Zerial und McBride 2001; McBride *et al.* 1999). Beim Knockdown früh-endosomaler SNAREs wurde eine erhöhte Membranassoziation von EEA1 an den endosomalen Vesikeln beobachtet, die zu einem vermehrten Andocken der Vesikel führte (Bethani *et al.* 2009). Zudem wurde postuliert, dass das Andocken früher Endosomen unabhängig von einer anschließenden SNARE-Funktion ist (Geumann *et al.* 2008). In Studien mit rekonstituierten Vesikeln zeigte sich, dass bereits ein einziger funktioneller SNARE-Komplex zur Membranfusion genügt (van den Bogaart *et al.* 2010). Jedoch steigt das Zeitintervall vom Docking bis zur Fusion bei sinkender Anzahl von SNARE-Molekülen drastisch an (Karatekin *et al.* 2010).

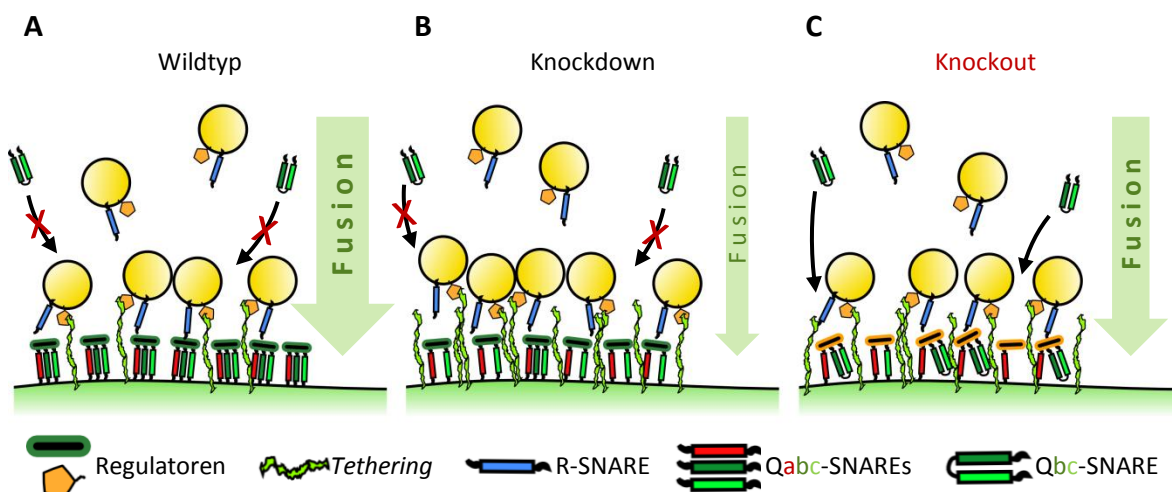
Bei einem Knockdown von *Vt1b* wäre demnach denkbar, dass die betroffenen Fusions Schritte aufgrund der Restaktivität vorhandener SNARE-Komplexe ablaufen. Durch die Induktion von Autophagozytose ist jedoch eine erhöhte Belastung *Vt1b* abhängiger Transportrouten zu erwarten. Dies könnte dazu führen, dass die Restaktivität der vorhandenen SNARE-Komplexe nicht mehr zur vollständigen Ausführung aller Fusionsvorgänge ausreicht und so zu der von Furuta *et al.* beobachteten Akkumulation autophagosomalen Materials führt.

Das Bestehen solcher Restaktivitäten könnte die Ursache der unterschiedlichen Auto-



phagozytosekapazität von *Vti1b* Knockdown und Knockout sein. Sowohl im Knockout als auch im Knockdown wäre unter der Berücksichtigung der dargestellten Fakten zu erwarten, dass eine erhöhte Anzahl angedockter Vesikel im autophagosomalen Weg vorliegt. Es wurde beobachtet, dass an Kontaktstellen angedockter Vesikel SNAREs ausgegrenzt werden, die nicht komplexspezifisch sind (Bethani *et al.* 2007). Innerhalb der Kontaktstellen wiederum erhöht eine Kooperation der spezifischen *Tethering*-/Andock- und SNARE-Maschinerie die Fusionsrate rekonstituierter Vesikel drastisch (Ohya *et al.* 2009). Wie genau solche regulatorischen Mechanismen funktionieren, welche exakten Auswirkungen sie haben und was für Proteine beteiligt sind, ist momentan Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und kontroverser Diskussionen (Ohya *et al.* 2009; Cai *et al.* 2007; Jahn und Scheller 2006).

Es wäre denkbar, dass die Anwesenheit weniger *Vti1b*-SNAREs ausreicht, um über regulatorische Mechanismen in Kooperation mit der übrigen Fusionsmaschinerie kompensatorische SNARE-Proteine auszuschließen. Beim Knockdown früh-endosomaler SNAREs beispielsweise wurde untersucht, ob kompensatorische SNARE-Proteine rekrutiert wurden; dies war nicht der Fall (Bethani *et al.* 2009). Bei vollständiger Abwesenheit von *Vti1b* könnten die gleichen oder ähnliche Faktoren jedoch dazu führen, dass sich die Spezifität des Fusionskomplexes ändert und eine Kompensation durch andere SNAREs zugelassen wird (zur Veranschaulichung siehe Abb. 4.6). Eine Rekrutierung kompensatorischer SNARE-Proteine würde dann eine, auch gegenüber dem *Vti1b* Knockdown, erhöhte Anzahl funktioneller SNARE-Komplexe bedeuten.



**Abb. 4.6 Die SNARE-Komplexbildung könnte bei Knockdown und Knockout verschieden reguliert werden**

**A** Die SNARE-Komplexbildung ist ein streng regulierter Prozess mit hoher Selektivität für die jeweiligen Komplexpartner. **B** Beim Knockdown eines SNAREs bleibt typischerweise eine Restproteinmenge von 10 %. Diese könnte ausreichen, um in der Fusionsmaschinerie kompensatorische SNAREs auszuschließen. Bei hohen Anforderungen an den Fusionsmechanismus könnte eine geringere Anzahl funktioneller SNARE-Komplexe jedoch zu einer stark verlangsamten Kinetik führen. **C** Das vollständige Fehlen eines SNARE-Proteins im Knockout könnte bewirken, dass regulatorische Faktoren die Akquisition kompensatorischer SNAREs zulassen. Der kompensatorische SNARE-Komplex arbeitet möglicherweise mit geringerer Effizienz, ist aber zur quantitativen Wiederherstellung der Fusionsvorgänge in der Lage.

Die Wechselwirkung solcher regulatorischer Faktoren könnte bei Vti1b durch die N-terminale Habc-Domäne vermittelt werden (Antonin *et al.* 2002). Auch für Vti1a wurde eine ähnliche Drei-Helix-Struktur ermittelt (*protein data bank*, 1VCS, von Abe *et al.* unveröffentlicht).

Über diesen spekulativen Mechanismus ist erklärbar, dass die Autophagozytosekapazität *Vti1a/Vti1b* einzel- und doppeldefizienter MEF derjenigen von heterozygoten MEF entspricht, während ein Knockdown von *Vti1b* zur Akkumulation autophagozytotischen Materials führt (Furuta *et al.* 2010). Um zu überprüfen, ob sich dieser oder ein ähnlicher Mechanismus tatsächlich abspielt, müssten die an der Bildung von Autophagosomen beteiligten Vorgänge in Knockout- und Knockdown-MEF genauestens untersucht werden. Wenn bekannt ist, welches SNARE für Vti1b im Knockout kompensiert (4.3.4.1), könnte in einem ersten Ansatz über hochauflösende Mikroskopie geklärt werden, ob kompensatorische SNAREs in Knockout Zellen zur Autophagosomenbildung rekrutiert werden, im Knockdown aber nicht. Die beschriebenen Differenzen in der autophagozytotischen Kapazität könnten ein sehr gutes Modell für die weitere Erforschung der regulatorischen Mechanismen des Fusionsapparates sein.

#### 4.4 Hippocampale Neuronen

Da der *Vti1a/Vti1b* Knockout in mausembryonalen Fibroblasten offensichtlich weitgehend kompensiert werden kann (4.3.4), wurden hippocampale Neuronen als weiteres Modellsystem der *Vti1a/Vti1b* Defizienz eingeführt (3.3). Neuronen sind im Wachstum wie auch in ihrer späteren Homöostase aufgrund ihrer stark ausgeprägten Zellpolarität von einem funktionalen endosomalen System abhängig (siehe 1.2.2). Dies wird durch den vorwiegend neuronalen Phänotyp der DKO Embryonen unterstrichen (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

Es zeigte sich, dass DKO hippocampale Neuronen gegenüber DHET *in vitro*-Kulturen mit deutlich geringerer Zelldichte bildeten (3.3.1). An DIV3 hatten beim DKO nur  $73 \pm 4$  % der neuronalen Zellen Neuriten ausgebildet (DHET  $88 \pm 4$  %), die im Durchschnitt eine Länge von  $107 \pm 28$   $\mu\text{m}$  erreichten (DHET  $132 \pm 23$   $\mu\text{m}$ ). DKO Neuronen waren über das Neurotrophin NT-3 stimulierbar, der Effekt auf das Neuritenwachstum jedoch geringer als im DHET (Wachstumssteigerung um  $21 \pm 8$   $\mu\text{m}$  im DKO gegenüber  $41 \pm 6$   $\mu\text{m}$  im DHET; 3.3.3). Die per Immunfärbung zahlreicher Marker mikroskopisch analysierte Morphologie der Neuronen war, wie auch in MEF, zwischen DHET und DKO vergleichbar (3.3.2).

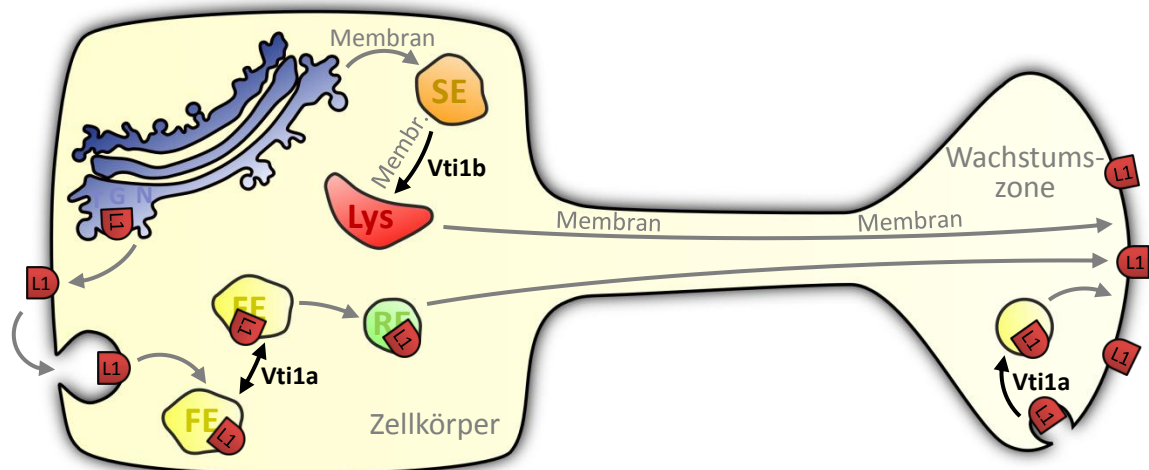
Diese Beobachtungen können mit einer *Vti1a/Vti1b* Defizienz über mehrere Mechanismen in Verbindung gebracht werden.

#### 4.4.1 Anterograder Membrantransport und Zelladhäsionsmoleküle

Zur Ausbildung der neuronalen Polarität müssen neu synthetisierte Plasmamembran sowie Signalmoleküle und Rezeptoren in ausreichender Menge und Geschwindigkeit zur Wachstumszone der Neuriten transportiert werden (Arimura und Kaibuchi 2007).

Dieser Transport vom TGN zu den Neuriten wird zum einen über spätendosomal-lysosomale Kompartimente in Abhängigkeit von VAMP-7 geleistet (Arantes und Andrews 2006; Martinez-Arca *et al.* 2001). Bei Expression einer dominant negativen Mutante des Vti1b-Komplexpartners VAMP-7 in hippocampalen Neuronen wurden weder Dendriten noch Axone gebildet (Martinez-Arca *et al.* 2000). Zum anderen sind sekretorische Recycling-Endosomen in Abhängigkeit des Vti1a-Komplexpartners Syntaxin 13 beteiligt (Hirling *et al.* 2000). Auch für Syntaxin 6, einen weiteren Komplexpartner von Vti1a, ist eine Beteiligung am Neuritenwachstum nachgewiesen (Kabayama *et al.* 2008).

Da sowohl Vti1a als auch Vti1b in die Mechanismen des anterograden Transports eingreifen könnten, wäre ein verlangsamtes Neuritenwachstum durch reduzierten Materialtransport denkbar (Abb. 4.7). Über eine Erweiterung dieser Hypothese ließe sich auch erklären, weshalb DKO hippocampale Neuronen *in vitro* weniger dichte Kulturen und zu einem geringeren Anteil Neuriten bilden.



**Abb. 4.7** Mögliche Vti1a/Vti1b-Abhängigkeit des Material- und Membrantransports in Neuronen

Die Ausbildung neuer Neuriten bzw. Axone hängt von einem funktionellen endosomalen Transportsystem ab. Das Zelladhäsionsmolekül L1 wird beispielsweise zunächst am Zellkörper sekretiert, wieder aufgenommen und zum Transport an den Wachstumskegel sortiert. An der Wachstumszone werden dynamische Remodulationen der Membran unter anderem durch Endozytose und Recycling von L1 erreicht. Das zur Ausbildung neuronaler Fortsätze benötigte Membranmaterial wird über sekretorische Lysosomen transportiert. Sowohl L1- als auch Membrantransport werden über Vti1a/Vti1b-abhängige Routen geleistet.

Eine Voraussetzung für die Ausbildung neuronaler Fortsätze ist die Adhäsion an der umgebenden Matrix *in vivo* bzw. der Zellkulturschale *in vitro*. Die Adhäsion wird unter anderem von *Cellular Adhesion Molecules* (CAM) vermittelt, die andere CAM, Integrine

oder Komponenten der umgebenden Matrix binden und neurotrophe Signale generieren (Schmid und Maness 2008). Der Transport von L1 bzw. NgCAM (*neuronal/glial CAM*) ist gut untersucht (Winckler und Mellman 2010). L1 wird vom TGN zur somatodendritischen Domäne transportiert und dort in die Membran inseriert. Nach anschließender Endozytose gelangt es über frühe Endosomen zu Recycling-Endosomen, die den anterograden Transport zum Wachstumskegel vermitteln (Wisco *et al.* 2003). Am Wachstumskegel wiederum ist L1 an der dynamischen Remodulation der migrierenden Membran beteiligt und wird durch Endo- und Exozytose reguliert (Dequidt *et al.* 2007; Abb. 4.7).

Ein Defekt im anterograden Transport sowie beim Recycling von Adhäsionsproteinen wie L1 und dadurch ausbleibende, neurotrophe Signale könnte in DKO hippocampalen Neuronen zu einer verringerten Adhärenz führen. Dies würde die geringe Dichte von DKO-Neuronen durch mangelnde Bindung an die Beschichtung der Kulturschale ebenso erklären wie die verringerte Ausbildung neuronaler Fortsätze. Eine angefertigte Immunfärbung von L1 sollte klären, ob das Protein fehllokalisiert ist (3.3.2). Die Aufnahmen waren jedoch von mangelnder Qualität und zeigten lediglich die diffuse Anwesenheit über die gesamten Neuronen verteilt mit Schwerpunkt im Zellkörper. Um eine fundierte Aussage über die L1-Lokalisation treffen zu können, muss die Färbung optimiert und wiederholt werden.

#### 4.4.2 Retrograder Transport und *Signaling*-Endosomen

Das neuronale Überleben, das Neuritenwachstum und die Zielinnervierung sind vom retrograden Transport am Wachstumskegel endozytierter Signalkomplexe abhängig (Sann *et al.* 2009; Zweifel *et al.* 2005; siehe auch 1.2). Ein gut untersuchtes Beispiel ist der Rezeptor TrkA, der nach Bindung neurotropher Faktoren über zwei unterschiedliche Wege endozytiert werden kann: Entweder Clathrin-vermittelt oder über *Pincher*-vermittelte Makropinozytose (Valdez *et al.* 2007; Shao *et al.* 2002). Im Anschluss wird TrkA zur Signalübermittlung in *Signaling*-Endosomen retrograd zum Zellkörper transportiert und aktiviert dort den MAP-Kinase Signalweg (Bronfman *et al.* 2007). Der Charakter der *Signaling*-Endosomen ist nicht endgültig geklärt und wird teils als früh-endosomal, spätendosomal oder auch multivesikulär beschrieben (Ibáñez 2007).

Aus zwei Gründen lag die Vermutung nahe, dass Vt1a/Vt1b an der retrograden Signalgebung neurotropher Faktoren beteiligt sind (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Erstens ist die neuronale Spleißform von Vt1a, Vt1a- $\beta$ , vorwiegend in synaptischen vesikulären Strukturen lokalisiert (Antonin *et al.* 2000a). Zweitens entspricht der neuronale Phänotyp der DKO Embryonen Mausmodellen, die für neurotrophe Faktoren

wie BDNF und NT-3 defizient sind (Kunwar *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

*In vitro*-Kulturen DKO hippocampaler Neuronen zeigten jedoch neurotrophe Reaktionen (vermehrte Bildung neuronaler Fortsätze und verstärktes Neuritenwachstum; Morfini *et al.* 1994) auf die Stimulation mit NT-3 (3.3.3). Der Effekt auf das Neuritenwachstum war im DKO allerdings gegenüber DHET geringer. Dies könnte einerseits darauf schließen lassen, dass die retrograde Signalgebung intakt ist, aber mögliche Defizienzen im anterograden Transport eine Einschränkung des Neuritenwachstums verursachen (siehe 4.4.1). Der beobachtete Effekt könnte aber auch auf einem nur teilweise intakten retrograden Trk-Transport beruhen. Für den EGF-Rezeptor, der durch ähnliche Mechanismen reguliert wird wie Trk, wurde eine mögliche Fehlsortierung bereits ausführlich diskutiert (Bronfman *et al.* 2007; 4.3.2.1). Es ist vorstellbar, dass eine Fehlsortierung des Trk-NT-3-Komplexes an einem Punkt des retrograden Transports zur Degradation führt und damit nur ein teilweiser neurotropher Effekt eintritt.

Um diese Vorgänge näher zu untersuchen, sollten idealerweise kompartimentierte Versuchsaufbauten verwendet werden, in denen Zellkörper und Axone getrennt voneinander stimuliert werden können (Campenot und MacInnis 2004). Auf diese Weise kann mit Bestimmtheit festgestellt werden, ob ein Faktor, der am Axon aufgenommen wurde, retrograd zum Zellkörper transportiert oder aber degradiert wird. Auch wäre eine Stimulation der Neuronen mit anderen Neurotrophinen interessant, da jedes Neurotrophin bestimmte Trk-Rezeptoren bevorzugt bindet und diese sich in ihrer Signalgebung unterscheiden (Bronfman *et al.* 2007).

#### 4.4.3 Weitere Schlussfolgerungen

Wurden die hippocampalen Neuronen für Kontrollversuche zur NT-3-Stimulation in Medium ohne jegliche Wachstumsfaktoren kultiviert, war die Länge von DKO Neuriten nach DIV2 mit der von DHET vergleichbar. DKO Neuriten waren in diesem Fall sogar etwas länger als DHET Neuriten (DHET  $99 \pm 6 \mu\text{m}$ ; DKO  $110 \pm 6 \mu\text{m}$ ). Bei Zugabe von NT-3 oder Inkubation in Medium, das geringe Mengen Serum enthielt, waren dagegen DHET-Neuriten im Durchschnitt länger (3.3.1 und 3.3.3). Dies könnte über beide vorgeschlagenen Mechanismen, also entweder mangelnden Materialtransport bei höherer Belastung oder fehlerhafte Signalgebung, erklärt werden.

Trotz der beobachteten Defizienzen war über die Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Marker des endosomalen Systems keine Veränderung in der endosomalen Morphologie der Neuronen sichtbar (3.3.2). Zur Morphologie der DKO hippocampalen Neuronen wurden allerdings bisher nur statische Aufnahmen angefertigt. Beispielsweise bei Untersuchungen

zur Charakterisierung von *Signaling*-Endosomen wurde beobachtet, dass verschiedene Rab5 oder Rab7 enthaltende, endosomale Strukturen im Axon entweder hochgradig dynamisch oder aber stationär sind (Deinhardt *et al.* 2007). Bei einer Fehlsortierung von z.B. Signalkomplexen in stationäre anstelle von dynamischen Strukturen wäre ein Defizit im axonalen Transport die Folge, das jedoch in statischen Bildern eventuell nicht sichtbar ist. Es wäre daher sinnvoll, in DHET und DKO hippocampalen Neuronen die Transportvorgänge verschiedener neuronaler Signalkomplexe über *live-cell-imaging*-Verfahren direkt zu verfolgen.

## 4.5 Ausblick

### 4.5.1 Zur weiteren Analyse von Skelett und Lunge

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde für *Vt1a* und *Vt1b* eine Rolle in der Entwicklung von Skelett und Lunge aufgezeigt (4.2.1 und 4.2.2). Um zu untersuchen, ob in beiden Fällen neben den makroskopischen Strukturen auch die extrazelluläre Matrix phänotypische Veränderungen aufweist, sollten Gewebsschnitte der Embryonen mit entsprechenden Markern analysiert werden. Besonders interessant wäre die Erstellung von *in vitro*-Kulturen des Lungenepithels und der Osteoblasten. Die Morphologie dieser Zellen und ihre Reaktion auf Wachstumsfaktoren würden Hinweise auf einen genauen Mechanismus der *Vt1a/Vt1b*-Abhängigkeit in der Skelett- und Lungenentwicklung geben. Ähnlich wie es bei den hippocampalen Neuronen beobachtet wurde, wäre es denkbar, dass solche phänotypisch betroffenen Zellsysteme stärkere Defizienzen auf zellulärer Ebene aufweisen als die ebenfalls untersuchten MEF-Linien (4.3.4).

### 4.5.2 Zur weiteren Analyse der MEF

Die Experimente an DKO MEF lieferten deutliche Hinweise auf eine Kompensation der *Vt1a/Vt1b* Defizienz durch andere SNARE-Proteine (4.3.4.1). Ob dies der Fall ist und welche SNARE-Proteine involviert sind, wird zurzeit im Rahmen einer Masterarbeit untersucht (Susanne Schöning). Zusätzlich sollte geklärt werden, in welchem Mechanismus der Unterschied in der autophagozytotischen Kapazität von *Vt1b* Knockout und *Vt1b* Knockdown begründet liegt (4.3.4.2). Beides zusammen macht die MEF-Linien zu einem sehr guten Werkzeug, um auch generelle regulatorische Mechanismen der SNARE-vermittelten Membranfusion besser zu verstehen.

Mit der Dysregulation des EGF-Rezeptors und dem vermutlich verlangsamten Recycling

zwischen Endosomen und TGN in DKO MEF wurden erste Hinweise auf die zellulären Grundlagen des DKO Phänotyps entdeckt (4.3.1 und 4.3.2). Es sollte im Weiteren untersucht werden, wo die Ursache der Dysregulation liegt, ob auch weitere Rezeptor-Tyrosinkinasen dysreguliert sind und wie sich eine Dysregulation auf die intrazellulären Signalkaskaden auswirkt. Daraus würden sich genaue Erkenntnisse zur Beteiligung von Vti1a und Vti1b an der endosomalen Signalregulation ergeben. Dies wiederum würde zu einem vollständigeren Bild der Funktionsweise des endosomalen Systems beitragen.

Das Recycling von Endosomen zum TGN sollte in DKO MEF idealerweise durch *live-cell-imaging*-Verfahren überprüft werden. Wie auch am Modell der hippocampalen Neuronen diskutiert wurde ist es möglich, dass über diese Verfahren dynamische Unterschiede aufgeklärt werden, die in den angefertigten statischen Bildern nicht offensichtlich sind (4.4.3).

#### 4.5.3 Zur weiteren Analyse hippocampaler Neuronen

Bei der Untersuchung an DKO hippocampalen Neuronen sollte der Fokus auf Experimente zum axonalen Transport in kompartimentierten Zellkammersystemen gelegt werden. Diese Methode bietet die beste Möglichkeit, um beispielsweise eine Fehlsortierung von über lange Strecken transportierten Signalkomplexen nachzuweisen (Campenot *et al.* 2003). Da Vti1a- $\beta$  als vorwiegend in Synapsen lokalisiert beschrieben wurde (Antonin *et al.* 2000a), sollten besonders auch Vorgänge beim endosomalen Recycling in Wachstumszonen und an Synapsen hippocampaler Neuronen beobachtet werden.

Für diese weiteren Untersuchungen wird viel Zellmaterial und daher eine entsprechend hohe Anzahl an DKO Embryonen benötigt. Im Verlaufe der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Zuchtfrequenz *Vti1a/Vti1b* trialleler Mäuse sehr niedrig ist. Bei terminiert angesetzten Verpaarungen waren es innerhalb des letzten Jahres ca. 95 % der Muttertiere, die entweder nicht aufnahmen oder ihre Embryonen vor E18,5 verloren (Christiane Wiegand). Es wird daher für weitere Experimente an DKO hippocampalen Neuronen nötig sein, die Mauszucht entsprechend auszuweiten.

Eine statistische Analyse zeigte interessanterweise, dass besonders Muttertiere mit *Vti1a*<sup>-/-</sup>-Hintergrund einen geringen Zuchterfolg aufwiesen (Christiane Wiegand). Auch wurde in einem kürzlich veröffentlichten Artikel für den Vti1a-Komplexparker VAMP-4 eine essentielle Rolle bei der Spermatogenese beschrieben (Guo *et al.* 2010). Dies impliziert eine weitere Rolle für Vti1a, aus der sich ein spannendes Forschungsprojekt ergeben könnte.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

In eukaryotischen Zellen wird die Fusion membranumschlossener Organellen durch SNARE-Proteine katalysiert. Vti1a und Vti1b sind in Säugern ubiquitär exprimierte Qb-SNAREs, welche die Membranfusion bei jeweils spezifischen Transportschritten im endosomalen System vermitteln. Um die *in vivo*-Funktionen von Vti1a und Vti1b näher zu charakterisieren, wurden murine Knockout-Modelle erstellt. Während die einzelne Defizienz von Vti1a oder Vti1b zu keinem schwerwiegenden Phänotyp führte, erwies sich der Doppelknockout (DKO) als perinatal letal. Dies ließ darauf schließen, dass sich die zu 30 % homologen SNAREs Vti1a und Vti1b in ihren jeweiligen SNARE-Komplexen funktionell ersetzen können. An den DKO Embryonen fiel vor allem ein neuronaler Phänotyp auf, der sich durch progressive Degeneration peripherer Ganglien und Fehlbildungen axonaler Bahnen auszeichnete.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass DKO Embryonen am Tag 18,5 ihrer Entwicklung (E18,5) bereits durch äußerliche Merkmale von ihren Wurfgeschwistern unterscheidbar sind. Präparierte Skelette dieser Embryonen waren besonders durch Verformung der Claviculae und mangelnde Calcifizierung des Sternums gekennzeichnet. In Paraffinschnitten der Lunge waren die Alveolen weniger expandiert und die Septen verdickt. Diese Veränderungen an Skelett und Lunge könnten über mehrere Mechanismen, wie z.B. eine fehlregulierte Signaltransduktion, mit der Vti1a/Vti1b Defizienz in Verbindung stehen.

Zur Untersuchung der Defizienz von Vti1a und Vti1b auf zellulärer Ebene wurden mausembryonale Fibroblasten (MEF) entsprechender Genotypen immortalisiert. DKO MEF sekretierten vermehrt lysosomale Hydrolasen, was auf einen Defekt im Recycling von Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPR) zwischen Endosomen und *trans*-Golgi-Netzwerk schließen ließ. Konzentration und Lokalisation der MPR waren jedoch in DKO und Kontrollen vergleichbar. In DKO MEF wurde der EGF-Rezeptor bei Stimulation mit physiologischen Mengen EGF rapide abgebaut, was in Kontrollzellen nicht beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, dass der EGF-Rezeptor im DKO nach der Endozytose



fehlsortiert und daher degradiert statt recycelt wird. Da die Signalgebung des EGF-Rezeptors und verwandter Rezeptor-Tyrosinkinasen essentiell für die embryonale Entwicklung ist, könnte diese Dysregulation eine Ursache für die Fehlentwicklungen im DKO sein.

Bei Stimulation des Rezeptors mit hohen EGF-Konzentrationen fanden dagegen Transport und Degradation des Rezeptorkomplexes in DKO- und Kontrollzellen mit ähnlicher Kinetik statt. Auch die EGF-abhängige Phosphorylierung von Erk sowie die Zellmigration verliefen in DKO und Kontrollen vergleichbar, so dass unter diesen Bedingungen Sortierung und Transport des Rezeptors vermutlich nicht gestört sind.

Es wurde untersucht, ob Vti1a und Vti1b eine Rolle beim Auf- und Abbau intrazellulärer Lipidtropfen spielen; diese Hypothese bestätigte sich jedoch nicht.

Die Analyse der DKO Morphologie über mehrere Marker des endosomalen Systems zeigte keine offenkundigen phänotypischen Veränderungen. Aufnahme und Recycling von Transferrin sowie Aufnahme und Transport von Dextran, LDL und Cholera toxin waren im DKO gegenüber Kontrollzellen nicht verändert. Demnach ist die Endozytose über Makropinozytose und Clathrin- bzw. Caveolin-abhängige Mechanismen, wie auch der nachfolgende endosomale Transportweg, im DKO nicht beeinträchtigt. Auch die autophagozytotische Kapazität, die durch radioaktiven *pulse-chase* und über die Akkumulation von LC3-II bestimmt wurde, war zwischen DKO MEF und Kontrollzellen vergleichbar. Vti1a und Vti1b sind nach *in vitro* Daten für Fusionen in allen genannten Transportwegen und Prozessen essentiell. In Hefen ist die Deletion von *VTI1*, des dort einzigen Homologen von *Vti1a* und *Vti1b*, letal. Zusammengenommen lässt dies darauf schließen, dass im murinen Doppelknockout die Defizienz von Vti1a und Vti1b durch andere Qb- oder Qbc-SNAREs kompensiert wird.

Als weiteres Modellsystem der Vti1a/Vti1b Defizienz wurden hippocampale Neuronen an E18,5 präpariert. *In vitro*-Kulturen DKO hippocampaler Neuronen waren gegenüber Kontrollen wesentlich weniger dicht. Zudem bildeten DKO Neuronen zu einem geringeren Anteil neuronale Fortsätze aus, die im Vergleich zu denen der Kontrollzellen verkürzt waren. Zwar zeigte sich, dass DKO Neuronen durch das Neurotrophin NT-3 stimuliert werden konnten, das durch NT-3 induzierte Neuritenwachstum war jedoch im DKO deutlich geringer als in Kontrollzellen. Diese Beobachtungen könnten einerseits auf eine Rolle von Vti1a/Vti1b im anterograden Transport vom Zellkörper zur Wachstumszone der Neuriten hindeuten. Andererseits wäre eine Beteiligung von Vti1a/Vti1b am retrograden Transport u.a. von *Signaling*-Endosomen denkbar. Beide Prozesse sind für die neuronale Entwicklung, das Neuritenwachstum und das Überleben der Neuronen essentiell.

## Summary

In eukaryotic cells, the fusion of two membrane enclosed organelles is catalyzed by SNARE proteins. *vt1a* and *vt1b* are ubiquitously expressed mammalian Qb-SNARES, performing the membrane fusion in specific transport steps of the endosomal system. For a further characterization of the *in vivo* function of *vt1a* and *vt1b*, a murine knockout was generated. While a single deficiency for either *vt1a* or *vt1b* did not show any overt phenotype, the *Vt1a/Vt1b* double knockout (DKO) was perinatally lethal. This led to the conclusion that *vt1a* and *vt1b*, which share 30 % of their amino acid sequence, are able to functionally replace each other in a given SNARE complex. The DKO embryos were first described to show a neuronal phenotype with progressive degeneration of peripheral ganglia and impairment of axonal growth.

In this thesis DKO embryos at day 18,5 of their development (E18,5) turned out to have distinct external features distinguishing them from their littermates. Dissected skeletons of these embryos were marked by misformed clavicae and a deficiently calcified sternum. In paraffin sections of lung tissue alveolae were less expanded and septa were thickened. These alterations of skeleton and lung could be linked to the *vt1a/vt1b* deficiency in several ways, for example by a misregulation of signal transduction processes.

To analyze the *Vt1a/Vt1b* knockout on a cellular scale, mouse embryonic fibroblasts (MEF) of corresponding genotypes were generated and immortalized. DKO MEF secreted higher amounts of lysosomal hydrolases, implying a defect in recycling of mannose-6-phosphate receptors (MPR) between the endosomal system and the *trans*-Golgi-network. However, concentrations and localization of MPR were similar in DKO and control. In DKO MEF, the EGF-receptor was rapidly degraded upon stimulation with physiological amounts of EGF. This was not observed in control cells and indicates a missorting of endocytosed EGF-receptor in DKO MEF, leading to degradation rather than recycling. Considering the essential importance of the EGF-receptor and related receptor tyrosine kinases for embryonic development, this dysregulation might represent a causal link for the

DKO phenotype. In contrast, when stimulated with high EGF-concentration, transport and degradation of the receptor-ligand complex proceeded with similar kinetics in DKO and control. Also, EGF-dependent phosphorylation of Erk and cell migration were comparable between genotypes, indicating functional sorting and transport under these conditions.

A possible role for *vt1a* and *vt1b* in synthesis and degradation of intracellular lipid droplets was investigated; this hypothesis, however, did not prove to be valid.

Analysis of morphology by comparison of several endosomal markers did not show phenotypic differences between DKO and control cells. Uptake and release of transferrin as well as uptake and transport of dextran, LDL and cholera toxin were comparable in DKO and control. Considering this, endocytosis and subsequent transport by means of macropinocytosis and clathrin- or caveolae-mediated mechanisms are not impaired. Additionally, the autophagocytic capacity of DKO cells was found to be fully functional by radioactive pulse-chase experiments and determination of LC3-II accumulation. According to *in vitro* experiments, *vt1a* and *vt1b* are essential for fusion events in all of these pathways and processes. In yeast, deletion of the only *vt1a/vt1b* homologue, *vt1p*, is lethal. Taken together, these data suggest a compensation of the *vt1a/vt1b* deficiency by other Qb- or Qbc-SNAREs.

E18.5 hippocampal neurons were prepared as a further model system for the *Vt1a/Vt1b* double knockout. *In vitro*-cultures of DKO hippocampal neurons were notably less dense compared to control cells. Also, less DKO neurons developed neurites, which in addition were shorter when compared to those of control cells. While DKO hippocampal neurons could be stimulated by the neurotrophin NT-3, the neurite outgrowth induced was considerably less pronounced. On the one hand, these observations could imply a role for *vt1a/vt1b* in anterograde transport from the neuronal cell body to the growth cone. On the other hand, *vt1a/vt1b* might be involved in retrograde transport of e.g. signaling endosomes. Both processes are essential for neuronal development, survival and neurite outgrowth.

# Kapitel 6

## Literaturverzeichnis

- Abonyo, B.O., Gou, D., Wang, P., Narasaraaju, T., Wang, Z. and Liu, L. (2004). Syntaxin 2 and SNAP-23 are required for regulated surfactant secretion. *Biochemistry* 43, 3499–3506.
- Aivazian, D., Serrano, R.L. and Pfeffer, S. (2006). TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J. Cell Biol.* 173, 917–926.
- Akagi, Y., Liu, W., Zebrowski, B., Xie, K. and Ellis, L.M. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res.* 58, 4008–4014.
- Allison, A.C., Davies, P. and Petris, S. de (1971). Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. *Nature New Biol.* 232, 153–155.
- Anderson, R.G., Brown, M.S., Beisiegel, U. and Goldstein, J.L. (1982). Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor as visualized with antireceptor antibodies. *J. Cell Biol.* 93, 523–531.
- Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A. and Voyno-Yasenetskaya, T.A. (2007). Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293, L259-71.
- Andrews, N.W. (2000). Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol.* 10, 316–321.
- Antonin, W., Holroyd, C., Fasshauer, D., Pabst, S., Mollard, G.F. von and Jahn, R. (2000a). A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *EMBO J.* 19, 6453–6464.
- Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Höning, S. and Jahn, R. (2000b). The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol. Biol. Cell* 11, 3289–3298.
- Antonin, W., Riedel, D. and Mollard, G.F. von (2000). The SNARE Vti1a-beta is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex. *J. Neurosci.* 20, 5724–5732.
- Antonin, W., Dulubova, I., Arac, D., Pabst, S., Plitzner, J., Rizo, J. and Jahn, R. (2002). The N-terminal domains of syntaxin 7 and vti1b form three-helix bundles that differ in their ability to regulate SNARE complex assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 36449–36456.
- Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. and Schneider, T.R. (2002). Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat. Struct. Biol.* 9, 107–111.
- Arantes, R.M.E. and Andrews, N.W. (2006). A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 26, 4630–4637.
- Arimura, N. and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 194–205.
- Ascaño, M., Richmond, A., Borden, P. and Kuruvilla, R. (2009). Axonal targeting of Trk receptors via transcytosis regulates sensitivity to neurotrophin responses. *J. Neurosci.* 29, 11674–11685.

- Atlachkine, V. (2002). Characterisation of Vti1b and Vti1a proteins and generation of knock-out mice. Dissertation (Göttingen).
- Atlashkin, V., Kreykenbohm, V., Eskelinen, E.-L., Wenzel, D., Fayyazi, A. and Fischer Mollard, G. von (2003). Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5198–5207.
- Bannykh, S.I., Rowe, T. and Balch, W.E. (1996). The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J. Cell Biol.* 135, 19–35.
- Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G. and Basler, K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125, 509–522.
- Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* 13, 295–300.
- Barnard, R.J., Morgan, A. and Burgoyne, R.D. (1997). Stimulation of NSF ATPase activity by alpha-SNAP is required for SNARE complex disassembly and exocytosis. *J. Cell Biol.* 139, 875–883.
- Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D. and Boutros, M. (2006). Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125, 523–533.
- Baumert, M., Maycox, P.R., Navone, F., Camilli, P. de and Jahn, R. (1989). Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J.* 8, 379–384.
- Belliveau, D.J., Krivko, I., Kohn, J., Lachance, C., Pozniak, C., Rusakov, D., Kaplan, D. and Miller, F.D. (1997). NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J. Cell Biol.* 136, 375–388.
- Berlin, R.D. and Oliver, J.M. (1980). Surface functions during mitosis. II. Quantitation of pinocytosis and kinetic characterization of the mitotic cycle with a new fluorescence technique. *J. Cell Biol.* 85, 660–671.
- Bethani, I., Lang, T., Geumann, U., Sieber, J.J., Jahn, R. and Rizzoli, S.O. (2007). The specificity of SNARE pairing in biological membranes is mediated by both proof-reading and spatial segregation. *EMBO J.* 26, 3981–3992.
- Bethani, I., Werner, A., Kadian, C., Geumann, U., Jahn, R. and Rizzoli, S.O. (2009). Endosomal fusion upon SNARE knockdown is maintained by residual SNARE activity and enhanced docking. *Traffic* 10, 1543–1559.
- Bhattacharyya, A., Watson, F.L., Bradlee, T.A., Pomeroy, S.L., Stiles, C.D. and Segal, R.A. (1997). Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system. *J. Neurosci.* 17, 7007–7016.
- Block, M.R., Glick, B.S., Wilcox, C.A., Wieland, F.T. and Rothman, J.E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7852–7856.
- Borisovska, M., Zhao, Y., Tsytsyura, Y., Glyvuk, N., Takamori, S., Matti, U., Rettig, J., Südhof, T. and Bruns, D. (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J.* 24, 2114–2126.
- Brandhorst, D., Rizzoli, S.O., Bethani, I., Zwilling, D., Wenzel, D., Siddiqui, T.J. and Jahn, R. (2006). Evidence for early endosome-like fusion of recently endocytosed synaptic vesicles. *Traffic* 7, 1163–1176.
- Bretscher, M.S. and Thomson, J.N. (1983). Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa cells. *EMBO J.* 2, 599–603.
- Brickner, J.H., Blanchette, J.M., Sipos, G. and Fuller, R.S. (2001). The Tlg SNARE complex is required for TGN homotypic fusion. *J. Cell Biol.* 155, 969–978.
- Bright, N.A., Gratian, M.J. and Luzio, J.P. (2005). Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr. Biol.* 15, 360–365.

- Bronfman, F.C., Escudero, C.A., Weis, J. and Kruttgen, A. (2007). Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. *Dev Neurobiol* 67, 1183–1203.
- Brown, M.S., Ho, Y.K. and Goldstein, J.L. (1980). The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.* 255, 9344–9352.
- Browski, S.M. (2006). Funktion und Interaktion der SNARE-Proteine Vti1a, Vti1b und SNAP-29 in Säugerzellen (Bielefeld).
- Burkhardt, J.K., Hester, S., Lapham, C.K. and Argon, Y. (1990). The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* 111, 2327–2340.
- Cai, H., Reinisch, K. and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev. Cell* 12, 671–682.
- Campenot, R.B. and MacInnis, B.L. (2004). Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J. Neurobiol.* 58, 217–229.
- Canals, F. (1992). Signal transmission by epidermal growth factor receptor: coincidence of activation and dimerization. *Biochemistry* 31, 4493–4501.
- Cardoso, W.V. and Lü, J. (2006). Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development* 133, 1611–1624.
- Carpenter, G. and Cohen, S. (1976). <sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 71, 159–171.
- Carr, C.M. and Rizo, J. (2010). At the junction of SNARE and SM protein function. *Current opinion in cell biology*.
- Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. and Pfeffer, S.R. (2001). Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* 292, 1373–1376.
- Chao, H.H., Waheed, A., Pohlmann, R., Hille, A. and Figura, K. von (1990). Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J.* 9, 3507–3513.
- Chastellier, C. de, Ryter, A. and Thilo, L. (1983). Membrane shuttle between plasma membrane, phagosomes, and pinosomes in *Dictyostelium discoideum* amoeboid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 30, 233–243.
- CHEN, J.M. (1952). Studies on the morphogenesis of the mouse sternum. I. Normal embryonic development. *J. Anat.* 86, 373–386.
- CHEN, J.M. (1952). Studies on the morphogenesis of the mouse sternum. II. Experiments on the origin of the sternum and its capacity for self-differentiation in vitro. *J. Anat.* 86, 387–401.
- CHEN, J.M. (1953). Studies on the morphogenesis of the mouse sternum. III. Experiments on the closure and segmentation of the sternal bands. *J. Anat.* 87, 130–149.
- Chua, J.J.E., Kindler, S., Boyken, J. and Jahn, R. (2010). The architecture of an excitatory synapse. *J. Cell. Sci.* 123, 819–823.
- Clary, D.O., Griff, I.C. and Rothman, J.E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709–721.
- Cohen, A.W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T.M., Wang, X.B., Iyengar, P., Brasaemle, D.L., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53, 1261–1270.
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE* 2004, RE13.
- Collawn, J.F., Stangel, M., Kuhn, L.A., Esekogwu, V., Jing, S.Q., Trowbridge, I.S. and Tainer, J.A. (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* 63, 1061–1072.
- Cosker, K.E., Courchesne, S.L. and Segal, R.A. (2008). Action in the axon: generation and transport of signaling endosomes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 270–275.

- Cowles, C.R., Odorizzi, G., Payne, G.S. and Emr, S.D. (1997). The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* 91, 109–118.
- Craig, A.M., Wyborski, R.J. and Banker, G. (1995). Preferential addition of newly synthesized membrane protein at axonal growth cones. *Nature* 375, 592–594.
- Crombrugge, B. de, Lefebvre, V. and Nakashima, K. (2001). Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 721–727.
- Cuervo, P., Jesus, J.B. de, Saboia-Vahia, L., Mendonça-Lima, L., Domont, G.B. and Cupolillo, E. (2009). Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Journal of proteomics* 73, 79–92.
- Daniels, T.R., Delgado, T., Rodriguez, J.A., Helguera, G. and Penichet, M.L. (2006). The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* 121, 144–158.
- Darsow, T., Burd, C.G. and Emr, S.D. (1998). Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *J. Cell Biol.* 142, 913–922.
- Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C. and Schiavo, G. (2006). Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52, 293–305.
- Dell'Angelica, E.C. (2009). AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 552–559.
- Dequidt, C., Danglot, L., Alberts, P., Galli, T., Choquet, D. and Thoumine, O. (2007). Fast turnover of L1 adhesions in neuronal growth cones involving both surface diffusion and exo/endocytosis of L1 molecules. *Mol. Biol. Cell* 18, 3131–3143.
- Diao, J., Su, Z., Lu, X., Yoon, T.-Y., Shin, Y.-K. and Ha, T. (2010). Single-Vesicle Fusion Assay Reveals Munc18-1 Binding to the SNARE Core Is Sufficient for Stimulating Membrane Fusion. *ACS chemical neuroscience* 1, 168–174.
- Dietzen, D.J., Hastings, W.R. and Lublin, D.M. (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* 270, 6838–6842.
- Doherty, G.J. and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Dong, Y.-F., Soung, D.Y., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J. and Drissi, H. (2006). Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J. Cell. Physiol.* 208, 77–86.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F. and Luft, F.C., et al. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449–2452.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F. and Luft, F.C., et al. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449–2452.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747–754.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T.C. and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J.* 18, 4372–4382.
- Dunn, W.A. and Hubbard, A.L. (1984). Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. *J. Cell Biol.* 98, 2148–2159.
- Ellena, J.F., Liang, B., Wiktor, M., Stein, A., Cafiso, D.S., Jahn, R. and Tamm, L.K. (2009). Dynamic structure of lipid-bound synaptobrevin suggests a nucleation-propagation mechanism for trans-SNARE complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 20306–20311.
- Fariñas, I., Yoshida, C.K., Backus, C. and Reichardt, L.F. (1996). Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* 17, 1065–1078.

- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15781–15786.
- Fasshauer, D. (2003). Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 87–97.
- FAWCETT, D.W. (1965). SURFACE SPECIALIZATIONS OF ABSORBING CELLS. *J. Histochem. Cytochem.* 13, 75–91.
- Figura, K. von and Hasilik, A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 167–193.
- Fischer Mollard, G. von and Stevens, T.H. (1998). A human homolog can functionally replace the yeast vesicle-associated SNARE Vti1p in two vesicle transport pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 2624–2630.
- Fischer Mollard, G. von and Stevens, T.H. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Mol. Biol. Cell* 10, 1719–1732.
- Flowerdew, S.E. and Burgoyne, R.D. (2009). A VAMP7/Vti1a SNARE complex distinguishes a non-conventional traffic route to the cell surface used by KChIP1 and Kv4 potassium channels. *Biochem. J.* 418, 529–540.
- French, A.R., Tadaki, D.K., Niyogi, S.K. and Lauffenburger, D.A. (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J. Biol. Chem.* 270, 4334–4340.
- Fujinaga, Y., Wolf, A.A., Rodighiero, C., Wheeler, H., Tsai, B., Allen, L., Jobling, M.G., Rapoport, T., Holmes, R.K. and Lencer, W.I. (2003). Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 14, 4783–4793.
- Fujiwara, T., Mishima, T., Kofuji, T., Chiba, T., Tanaka, K., Yamamoto, A. and Akagawa, K. (2006). Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 26, 5767–5776.
- Furuta, N., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T. and Amano, A. (2010). Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol. Biol. Cell* 21, 1001–1010.
- Futter, C.E., Pearse, A., Hewlett, L.J. and Hopkins, C.R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J. Cell Biol.* 132, 1011–1023.
- Galbiati, F., Engelman, J.A., Volonte, D., Zhang, X.L., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Kneitz, B., Edelmann, W. and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276, 21425–21433.
- Gan, Z., Ram, S., Vaccaro, C., Ober, R.J. and Ward, E.S. (2009). Analyses of the recycling receptor, FcRn, in live cells reveal novel pathways for lysosomal delivery. *Traffic* 10, 600–614.
- Ganley, I.G., Espinosa, E. and Pfeffer, S.R. (2008). A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J. Cell Biol.* 180, 159–172.
- Geumann, U., Barysch, S.V., Hoopmann, P., Jahn, R. and Rizzoli, S.O. (2008). SNARE function is not involved in early endosome docking. *Mol. Biol. Cell* 19, 5327–5337.
- Ghosh, P., Dahms, N.M. and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 202–212.
- Ginty, D.D. and Segal, R.A. (2002). Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 268–274.
- Glebova, N.O. and Ginty, D.D. (2005). Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 191–222.



- Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1408, 79–89.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. and Schneider, W.J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 1–39.
- Gonsior, S.M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B.M. and Hinssen, H. (1999). Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J. Cell. Sci.* 112 ( Pt 6), 797–809.
- Goodman, R.M., Thombre, S., Firtina, Z., Gray, D., Betts, D., Roebuck, J., Spana, E.P. and Selva, E.M. (2006). Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling. *Development* 133, 4901–4911.
- Gordon, D.E., Bond, L.M., Sahlender, D.A. and Peden, A.A. (2010). A Targeted siRNA Screen to Identify SNAREs Required for Constitutive Secretion in Mammalian Cells. *Traffic* (Copenhagen, Denmark).
- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. and Birchmeier, W. (2008). Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev.* 22, 2308–2341.
- Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 721–730.
- Gruenberg, J., Griffiths, G. and Howell, K.E. (1989). Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.* 108, 1301–1316.
- Gruenberg, J. and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 317–323.
- Guo, X., Shen, J., Xia, Z., Zhang, R., Zhang, P., Zhao, C., Xing, J., Chen, L., Chen, W. and Lin, M., et al. (2010). Proteomic analysis of proteins involved in spermiogenesis in mouse. *J. Proteome Res.* 9, 1246–1256.
- Halatsch, M.-E., Gehrke, E.E., Vougioukas, V.I., Bötöfür, I.C., A-Borhani, F., Efferth, T., Gebhart, E., Domhof, S., Schmidt, U. and Buchfelder, M. (2004). Inverse correlation of epidermal growth factor receptor messenger RNA induction and suppression of anchorage-independent growth by OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in glioblastoma multiforme cell lines. *J. Neurosurg.* 100, 523–533.
- Hall, B.K. and Herring, S.W. (1990). Paralysis and growth of the musculoskeletal system in the embryonic chick. *J. Morphol.* 206, 45–56.
- Hansen, C.G. and Nichols, B.J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* 20, 177–186.
- Hari, L., Brault, V., Kléber, M., Lee, H.-Y., Ille, F., Leimeroth, R., Paratore, C., Suter, U., Kemler, R. and Sommer, L. (2002). Lineage-specific requirements of beta-catenin in neural crest development. *J. Cell Biol.* 159, 867–880.
- Hariri, M., Millane, G., Guimond, M.P., Guay, G., Dennis, J.W. and Nabi, I.R. (2000). Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Mol. Biol. Cell* 11, 255–268.
- Haucke, V. (2005). Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1285–1289.
- Henell, F., Berkenstam, A., Ahlberg, J. and Glaumann, H. (1987). Degradation of short- and long-lived proteins in perfused liver and in isolated autophagic vacuoles--lysosomes. *Exp. Mol. Pathol.* 46, 1–14.
- Herring, S.W. and Lakars, T.C. (1982). Craniofacial development in the absence of muscle contraction. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 1, 341–357.
- Heuser, J. (1980). Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 84, 560–583.

- Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S. and Ungewickell, E.J. (2006). Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8715–8720.
- Hinshaw, J.E. and Schmid, S.L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374, 190–192.
- Hirling, H., Steiner, P., Chaperon, C., Marsault, R., Regazzi, R. and Catsicas, S. (2000). Syntaxin 13 is a developmentally regulated SNARE involved in neurite outgrowth and endosomal trafficking. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1913–1923.
- Holt, M., Varoqueaux, F., Wiederhold, K., Takamori, S., Urlaub, H., Fasshauer, D. and Jahn, R. (2006). Identification of SNAP-47, a novel Qbc-SNARE with ubiquitous expression. *J. Biol. Chem.* 281, 17076–17083.
- Hong, W. (2005). SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 493–517.
- Hopkins, C.R. (1983). Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. *Cell* 35, 321–330.
- Hopkins, C.R., Miller, K. and Beardmore, J.M. (1985). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake. *J. Cell Sci. Suppl.* 3, 173–186.
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S. and Sorkin, A. (2006). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol. Cell* 21, 737–748.
- Huang, L.F., Fukai, N., Selby, P.B., Olsen, B.R. and Mundlos, S. (1997). Mouse clavicular development: analysis of wild-type and cleidocranial dysplasia mutant mice. *Dev. Dyn.* 210, 33–40.
- Hubbard, S.R. and Miller, W.T. (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 117–123.
- Hughes, H. and Stephens, D.J. (2008). Assembly, organization, and function of the COPII coat. *Histochem. Cell Biol.* 129, 129–151.
- Ibáñez, C.F. (2007). Message in a bottle: long-range retrograde signaling in the nervous system. *Trends Cell Biol.* 17, 519–528.
- Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2001). Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol. Biol. Cell* 12, 3690–3702.
- Jahn, R. and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631–643.
- Ji, H., Wang, J., Nika, H., Hawke, D., Keezer, S., Ge, Q., Fang, B., Fang, X., Fang, D. and Litchfield, D.W., et al. (2009). EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin. *Mol. Cell* 36, 547–559.
- Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C. and Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6, 1070–1077.
- Jun, Y., Xu, H., Thorngren, N. and Wickner, W. (2007). Sec18p and Vam7p remodel trans-SNARE complexes to permit a lipid-anchored R-SNARE to support yeast vacuole fusion. *EMBO J.* 26, 4935–4945.
- Kabayama, H., Tokushige, N., Takeuchi, M. and Mikoshiba, K. (2008). Syntaxin 6 regulates nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *Neurosci. Lett.* 436, 340–344.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.
- Karatekin, E., Di Giovanni, J., Iborra, C., Coleman, J., O'Shaughnessy, B., Seagar, M. and Rothman, J.E. (2010). A fast, single-vesicle fusion assay mimics physiological SNARE requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 3517–3521.

- Karsenty, G., Kronenberg, H.M. and Settembre, C. (2009). Genetic control of bone formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 629–648.
- Kasper, D., Dittmer, F., Figura, K. von and Pohlmann, R. (1996). Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J. Cell Biol.* 134, 615–623.
- Kazazic, M., Roepstorff, K., Johannessen, L.E., Pedersen, N.M., van Deurs, B., Stang, E. and Madhus, I.H. (2006). EGF-induced activation of the EGF receptor does not trigger mobilization of caveolae. *Traffic* 7, 1518–1527.
- Keeble, T.R., Halford, M.M., Seaman, C., Kee, N., Macheda, M., Anderson, R.B., Stacker, S.A. and Cooper, H.M. (2006). The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J. Neurosci.* 26, 5840–5848.
- Kimura, A., Inose, H., Yano, F., Fujita, K., Ikeda, T., Sato, S., Iwasaki, M., Jinno, T., Ae, K. and Fukumoto, S., et al. (2010). Runx1 and Runx2 cooperate during sternal morphogenesis. *Development* 137, 1159–1167.
- Klopper, T.H., Kienle, C.N. and Fasshauer, D. (2007). An elaborate classification of SNARE proteins sheds light on the conservation of the eukaryotic endomembrane system. *Mol. Biol. Cell* 18, 3463–3471.
- Klopper, T.H., Kienle, C.N. and Fasshauer, D. (2008). SNAREing the basis of multicellularity: consequences of protein family expansion during evolution. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2055–2068.
- Kreykenbohm, V., Wenzel, D., Antonin, W., Atlachkine, V. and Mollard, G.F. von (2002). The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 273–280.
- Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336.
- Labelle, C. and Leclerc, N. (2000). Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 123, 1–11.
- Lajoie, P., Guay, G., Dennis, J.W. and Nabi, I.R. (2005). The lipid composition of autophagic vacuoles regulates expression of multilamellar bodies. *J. Cell. Sci.* 118, 1991–2003.
- Lakadamyali, M., Rust, M.J. and Zhuang, X. (2006). Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* 124, 997–1009.
- Langosch, D., Hofmann, M. and Ungermann, C. (2007). The role of transmembrane domains in membrane fusion. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 850–864.
- Li, C., Xiao, J., Hormi, K., Borok, Z. and Minoo, P. (2002). Wnt5a participates in distal lung morphogenesis. *Dev. Biol.* 248, 68–81.
- Liu, P., Bartz, R., Zehmer, J.K., Ying, Y.-s., Zhu, M., Serrero, G. and Anderson, R.G.W. (2007). Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 784–793.
- Lorenowicz, M.J. and Korswagen, H.C. (2009). Sailing with the Wnt: charting the Wnt processing and secretion route. *Exp. Cell Res.* 315, 2683–2689.
- Lupashin, V.V., Pokrovskaya, I.D., McNew, J.A. and Waters, M.G. (1997). Characterization of a novel yeast SNARE protein implicated in Golgi retrograde traffic. *Mol. Biol. Cell* 8, 2659–2676.
- Luzio, J.P., Brake, B., Banting, G., Howell, K.E., Braghetta, P. and Stanley, K.K. (1990). Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). *Biochem. J.* 270, 97–102.
- Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. and Johannes, L. (2002). Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell Biol.* 156, 653–664.
- Markgraf, D.F., Peplowska, K. and Ungermann, C. (2007). Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. *FEBS Lett.* 581, 2125–2130.

- Martinez-Arca, S., Alberts, P., Zahraoui, A., Louvard, D. and Galli, T. (2000). Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 149, 889–900.
- Martinez-Arca, S., Coco, S., Mainguy, G., Schenk, U., Alberts, P., Bouillé, P., Mezzina, M., Prochiantz, A., Matteoli, M. and Louvard, D., et al. (2001). A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J. Neurosci.* 21, 3830–3838.
- Marz, K.E., Lauer, J.M. and Hanson, P.I. (2003). Defining the SNARE complex binding surface of alpha-SNAP: implications for SNARE complex disassembly. *J. Biol. Chem.* 278, 27000–27008.
- McBride, H.M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. and Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98, 377–386.
- McMahon, H.T. and Mills, I.G. (2004). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 379–391.
- Medigeshi, G.R. and Schu, P. (2003). Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46. *Traffic* 4, 802–811.
- Merrifield, C.J., Perrais, D. and Zenisek, D. (2005). Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* 121, 593–606.
- Miettinen, P.J., Warburton, D., Bu, D., Zhao, J.S., Berger, J.E., Minoo, P., Koivisto, T., Allen, L., Dobbs, L. and Werb, Z., et al. (1997). Impaired lung branching morphogenesis in the absence of functional EGF receptor. *Dev. Biol.* 186, 224–236.
- Miller, S.E., Collins, B.M., McCoy, A.J., Robinson, M.S. and Owen, D.J. (2007). A SNARE-adaptor interaction is a new mode of cargo recognition in clathrin-coated vesicles. *Nature* 450, 570–574.
- Mollard, G.F. von, Nothwehr, S.F. and Stevens, T.H. (1997). The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *J. Cell Biol.* 137, 1511–1524.
- Monier, S., Dietzen, D.J., Hastings, W.R., Lublin, D.M. and Kurzchalia, T.V. (1996). Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett.* 388, 143–149.
- Morfini, G., DiTella, M.C., Feiguin, F., Carri, N. and Cáceres, A. (1994). Neurotrophin-3 enhances neurite outgrowth in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci. Res.* 39, 219–232.
- Mortimore, G.E. and Pösö, A.R. (1987). Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu. Rev. Nutr.* 7, 539–564.
- Mossessova, E., Bickford, L.C. and Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* 114, 483–495.
- Mucenski, M.L., Wert, S.E., Nation, J.M., Loudy, D.E., Huelsken, J., Birchmeier, W., Morrisey, E.E. and Whitsett, J.A. (2003). beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 40231–40238.
- Mullins, C. and Bonifacino, J.S. (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23, 333–343.
- Munro, S. and Pelham, H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899–907.
- Murray, R.Z., Kay, J.G., Sangermani, D.G. and Stow, J.L. (2005a). A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* 310, 1492–1495.
- Murray, R.Z., Wylie, F.G., Khromykh, T., Hume, D.A. and Stow, J.L. (2005). Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis Factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 280, 10478–10483.
- Nagayama, M., Uchida, T. and Gohara, K. (2007). Temporal and spatial variations of lipid droplets during adipocyte division and differentiation. *J. Lipid Res.* 48, 9–18.

- Nichols, B.J., Kenworthy, A.K., Polishchuk, R.S., Lodge, R., Roberts, T.H., Hirschberg, K., Phair, R.D. and Lippincott-Schwartz, J. (2001). Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* 153, 529–541.
- Oh, P., McIntosh, D.P. and Schnitzer, J.E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* 141, 101–114.
- Ohkuma, S. and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3327–3331.
- Ohsaki, Y., Shinohara, Y., Suzuki, M. and Fujimoto, T. (2010). A pitfall in using BODIPY dyes to label lipid droplets for fluorescence microscopy. *Histochem. Cell Biol.* 133, 477–480.
- Ohya, T., Miaczynska, M., Coskun, U., Lommer, B., Runge, A., Drechsel, D., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2009). Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature* 459, 1091–1097.
- Okubo, T. and Hogan, B.L.M. (2004). Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *J. Biol.* 3, 11.
- Olson, T.S. and Lane, M.D. (1989). A common mechanism for posttranslational activation of plasma membrane receptors? *FASEB J.* 3, 1618–1624.
- Orlandi, P.A. and Fishman, P.H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.* 141, 905–915.
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S. and Olsen, B.R., et al. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89, 765–771.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347–358.
- Pan, P.-Y., Cai, Q., Lin, L., Lu, P.-H., Duan, S. and Sheng, Z.-H. (2005). SNAP-29-mediated modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 25769–25779.
- Parton, R.G. and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185–194.
- Pelkmans, L., Bürli, T., Zerial, M. and Helenius, A. (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118, 767–780.
- Perheentupa, J., Lakshmanan, J., Hoath, S.B., Beri, U., Kim, H., Macaso, T. and Fisher, D.A. (1985). Epidermal growth factor measurements in mouse plasma: method, ontogeny, and sex difference. *Am. J. Physiol.* 248, E391-6.
- Pfeffer, S.R. (2009). Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS Lett.* 583, 3811–3816.
- Pfenninger, K.H. (2009). Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 251–261.
- Pohl, J., Ring, A. and Stremmel, W. (2002). Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J. Lipid Res.* 43, 1390–1399.
- Pongracz, J.E. and Stockley, R.A. (2006). Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir. Res.* 7, 15.
- Preuss, D., Mulholland, J., Franzusoff, A., Segev, N. and Botstein, D. (1992). Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy. *Mol. Biol. Cell* 3, 789–803.
- Pryor, P.R., Mullock, B.M., Bright, N.A., Lindsay, M.R., Gray, S.R., Richardson, S.C.W., Stewart, A., James, D.E., Piper, R.C. and Luzio, J.P. (2004). Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep.* 5, 590–595.

- Racoosin, E.L. and Swanson, J.A. (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell Biol.* 121, 1011–1020.
- Rapaport, D., Lugassy, Y., Sprecher, E. and Horowitz, M. (2010). Loss of SNAP29 impairs endocytic recycling and cell motility. *PLoS ONE* 5, e9759.
- Razani, B., Wang, X.B., Engelman, J.A., Battista, M., Lagaud, G., Zhang, X.L., Kneitz, B., Hou, H., Christ, G.J. and Edelmann, W., et al. (2002). Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2329–2344.
- Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M.R., Morgan, G.P., Marsh, B.J. and Parton, R.G. (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic* 9, 893–909.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122, 735–749.
- Rizo, J., Chen, X. and Araç, D. (2006). Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell Biol.* 16, 339–350.
- Rossi, V., Banfield, D.K., Vacca, M., Dietrich, L.E.P., Ungermann, C., D'Esposito, M., Galli, T. and Filippini, F. (2004). Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators. *Trends Biochem. Sci.* 29, 682–688.
- Rot-Nikcevic, I., Reddy, T., Downing, K.J., Belliveau, A.C., Hallgrímsson, B., Hall, B.K. and Kablar, B. (2006). *Myf5*<sup>-/-</sup> :*MyoD*<sup>-/-</sup> amyogenic fetuses reveal the importance of early contraction and static loading by striated muscle in mouse skeletogenesis. *Dev. Genes Evol.* 216, 1–9.
- Sáenz-Robles, M.T., Sullivan, C.S. and Pipas, J.M. (2001). Transforming functions of Simian Virus 40. *Oncogene* 20, 7899–7907.
- Schmid, E.M. and McMahon, H.T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* 448, 883–888.
- Schmid, R.S. and Maness, P.F. (2008). L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 245–250.
- Schmid, S., Fuchs, R., Kielian, M., Helenius, A. and Mellman, I. (1989). Acidification of endosome subpopulations in wild-type Chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants. *J. Cell Biol.* 108, 1291–1300.
- Schmitz, G. and Müller, G. (1991). Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J. Lipid Res.* 32, 1539–1570.
- Schoch, S., Deák, F., Königstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Südhof, T.C. and Kavalali, E.T. (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 294, 1117–1122.
- Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. and Götting, C. (2006). Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II. *J. Biol. Chem.* 281, 14224–14231.
- Schuermann, M. (1990). An expression vector system for stable expression of oncogenes. *Nucleic Acids Res.* 18, 4945–4946.
- Shao, Y., Akmentin, W., Toledo-Aral, J.J., Rosenbaum, J., Valdez, G., Cabot, J.B., Hilbush, B.S. and Halegoua, S. (2002). Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *J. Cell Biol.* 157, 679–691.
- Sheff, D.R., Daro, E.A., Hull, M. and Mellman, I. (1999). The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J. Cell Biol.* 145, 123–139.
- Sibilia, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B.M., Natarajan, A., Hecking, M. and Holcman, M. (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 75, 770–787.
- Siddiqi, S.A., Siddiqi, S., Mahan, J., Peggs, K., Gorelick, F.S. and Mansbach, C.M. (2006). The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle. *J. Biol. Chem.* 281, 20974–20982.

- Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S. and Di Fiore, P.P. (2008). Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev. Cell* 15, 209–219.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P. and Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2760–2765.
- Sipe, D.M. and Murphy, R.F. (1987). High-resolution kinetics of transferrin acidification in BALB/c 3T3 cells: exposure to pH 6 followed by temperature-sensitive alkalization during recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7119–7123.
- Soldati, T., Rancaño, C., Geissler, H. and Pfeffer, S.R. (1995). Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes. *J. Biol. Chem.* 270, 25541–25548.
- Söllner, T.H. (2007). Lipid droplets highjack SNAREs. *Nat. Cell Biol.* 9, 1219–1220.
- Sorkin, A. and Goh, L.K. (2009). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* 315, 683–696.
- Sorkin, A. and Zastrow, M. von (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 609–622.
- Sprecher, E., Ishida-Yamamoto, A., Mizrahi-Koren, M., Rapaport, D., Goldsher, D., Indelman, M., Topaz, O., Chefetz, I., Keren, H. and O'Brien, T.J., et al. (2005). A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous syndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 242–251.
- Springer, S., Spang, A. and Schekman, R. (1999). A primer on vesicle budding. *Cell* 97, 145–148.
- Stan, R.V. (2005). Structure of caveolae. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 334–348.
- Steggmaier, M., Yang, B., Yoo, J.S., Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y. and Scheller, R.H. (1998). Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *J. Biol. Chem.* 273, 34171–34179.
- Stein, A., Weber, G., Wahl, M.C. and Jahn, R. (2009). Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* 460, 525–528.
- Steinman, R.M., Brodie, S.E. and Cohn, Z.A. (1976). Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *J. Cell Biol.* 68, 665–687.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525.
- Storm, E.E. and Kingsley, D.M. (1996). Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122, 3969–3979.
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M. and Rout, M.P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 490–501.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347–353.
- Sztul, E. and Lupashin, V. (2006). Role of tethering factors in secretory membrane traffic. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 290, C11–26.
- Tang, J., Maximov, A., Shin, O.-H., Dai, H., Rizo, J. and Südhof, T.C. (2006). A complexin/syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* 126, 1175–1187.
- Teis, D., Taub, N., Kurzbauer, R., Hilber, D., Araujo, M.E. de, Erlacher, M., Offterdinger, M., Villunger, A., Geley, S. and Bohn, G., et al. (2006). p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J. Cell Biol.* 175, 861–868.
- Teis, D., Wunderlich, W. and Huber, L.A. (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev. Cell* 3, 803–814.

- Tishgarten, T., Yin, F.F., Faucher, K.M., Dluhy, R.A., Grant, T.R., Fischer Mollard, G. von, Stevens, T.H. and Lipscomb, L.A. (1999). Structures of yeast vesicle trafficking proteins. *Protein Sci.* 8, 2465–2473.
- Tong, P.Y. and Kornfeld, S. (1989). Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 7970–7975.
- Traub, L.M. and Kornfeld, S. (1997). The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 527–533.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M. and Parton, R.G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* 135, 913–924.
- Ungermann, C., Mollard, G.F. von, Jensen, O.N., Margolis, N., Stevens, T.H. and Wickner, W. (1999). Three v-SNAREs and two t-SNAREs, present in a pentameric cis-SNARE complex on isolated vacuoles, are essential for homotypic fusion. *J. Cell Biol.* 145, 1435–1442.
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S.E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L.E. and Eisenberg, E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378, 632–635.
- Valdez, G., Philippidou, P., Rosenbaum, J., Akmentin, W., Shao, Y. and Halegoua, S. (2007). Trk-signaling endosomes are generated by Rac-dependent macroendocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 12270–12275.
- van den Bogaart, G., Holt, M.G., Bunt, G., Riedel, D., Wouters, F.S. and Jahn, R. (2010). One SNARE complex is sufficient for membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 358–364.
- van der Goot, F.G. and Gruenberg, J. (2006). Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol.* 16, 514–521.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Zahraoui, A., Tavitian, A., Goud, B. and Mellman, I. (1991). The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 6313–6317.
- van Weert, A.W., Dunn, K.W., Gueze, H.J., Maxfield, F.R. and Stoorvogel, W. (1995). Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J. Cell Biol.* 130, 821–834.
- Walter, P. and Johnson, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 87–119.
- Walther, T.C. and Farese, R.V. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 459–466.
- Wang, P., Chintagari, N.R., Narayanaperumal, J., Ayalew, S., Hartson, S. and Liu, L. (2008). Proteomic analysis of lamellar bodies isolated from rat lungs. *BMC Cell Biol.* 9, 34.
- Watson, F.L., Heerssen, H.M., Bhattacharyya, A., Klesse, L., Lin, M.Z. and Segal, R.A. (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat. Neurosci.* 4, 981–988.
- Watts, C. and Marsh, M. (1992). Endocytosis: what goes in and how? *J. Cell. Sci.* 103 ( Pt 1), 1–8.
- Weaver, T.E., Na, C.-L. and Stahlman, M. (2002). Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 263–270.
- Weimbs, T., Low, S.H., Chapin, S.J., Mostov, K.E., Bucher, P. and Hofmann, K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3046–3051.
- Welch, M.D. and Mullins, R.D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 247–288.
- Whitsett, J.A. (2010). Review: The intersection of surfactant homeostasis and innate host defense of the lung: lessons from newborn infants. *Innate Immun* 16, 138–142.



- Whyte, J.R.C. and Munro, S. (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell. Sci.* 115, 2627–2637.
- Wickner, W. and Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* 310, 1452–1456.
- Wiley, H.S. and Burke, P.M. (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* 2, 12–18.
- Winckler, B. and Mellman, I. (2010). Trafficking guidance receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001826.
- Wisco, D., Anderson, E.D., Chang, M.C., Norden, C., Boiko, T., Fölsch, H. and Winckler, B. (2003). Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 162, 1317–1328.
- Wisco, D., Anderson, E.D., Chang, M.C., Norden, C., Boiko, T., Fölsch, H. and Winckler, B. (2003). Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 162, 1317–1328.
- Wu, M.M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R.Y., Moore, H.P. and Machen, T.E. (2001). Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 33027–33035.
- YAMADA, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 445–458.
- Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez, L.C. and Scheller, R.H. (2000). nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *J. Cell Biol.* 148, 247–252.
- Yang, B., Gonzalez, L., JR., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R.J. and Scheller, R.H. (1999). SNARE Interactions Are Not Selective. Implications For Membrane Fusion Specificity. *J. Biol. Chem.* 274, 5649–5653.
- Yang, C., Mora, S., Ryder, J.W., Coker, K.J., Hansen, P., Allen, L.A. and Pessin, J.E. (2001). VAMP3 null mice display normal constitutive, insulin- and exercise-regulated vesicle trafficking. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1573–1580.
- Yang, P.-T., Lorenowicz, M.J., Silhankova, M., Coudreuse, D.Y.M., Betist, M.C. and Korswagen, H.C. (2008). Wnt signaling requires retromer-dependent recycling of MIG-14/Wntless in Wnt-producing cells. *Dev. Cell* 14, 140–147.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.
- Zerial, M. and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107–117.
- Zhang, N., Cai, W., Yin, G., Nagel, D.J. and Berk, B.C. (2010). GIT1 is a novel MEK1-ERK1/2 scaffold that localizes to focal adhesions. *Cell Biol. Int.* 34, 41–47.
- Zweifel, L.S., Kuruvilla, R. and Ginty, D.D. (2005). Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 615–625.
- Zwilling, D., Cypionka, A., Pohl, W.H., Fasshauer, D., Walla, P.J., Wahl, M.C. and Jahn, R. (2007). Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies. *EMBO J.* 26, 9–18.

# Abbildungsverzeichnis

ABB. 1.1 VESIKULÄRES TRANSPORTNETZWERK ZWISCHEN DEN KOMPARTIMENTEN DER ZELLE .....	2
ABB. 1.2 VERSCHIEDENE AUFNAHMEWEGE FÜHREN ZUM ENDOSOMALEN SYSTEM .....	5
ABB. 1.3 VESIKULÄRER TRANSPORT: VON DER ZUSAMMENLAGERUNG BIS ZUR FUSION .....	10
ABB. 1.4 STRUKTUR DER SNARE-PROTEINE UND DES SNARE-MOTIVS.....	12
ABB. 1.5 VTI1A IST EIN SNARE MIT HAUPTSÄCHLICHER FUNKTION IM FRÜHEN ENDOSOM UND TGN .....	17
ABB. 1.6 VTI1B HAT FUNKTIONEN IM SPÄTENDOSOMAL-LYSOSOMALEN KOMPARTIMENT.....	18
ABB. 3.1 DKO EMBRYONEN WEISEN ÄUßERLICH ERKENNBARE PHÄNOTYPISCHE VERÄNDERUNGEN AUF.....	48
ABB. 3.2 DKO EMBRYONEN ZEIGEN DEFORMATIONEN IM SKELETT UND TEILS FEHLENDE CALCIFIZIERUNG .....	50
ABB. 3.3 DKO LUNGEN ZEIGEN PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN .....	51
ABB. 3.4 DIE ZELLDICHTE IST IN DKO LUNGEN WESENTLICH ERHÖHT .....	52
ABB. 3.5 DAS PROTEINLEVEL VON CAVEOLIN-1 IST IN DKO LUNGENGeweBE NICHT VERÄNDERT .....	53
ABB. 3.6 LYSOSOMEN, MEDIALER GOLGI-APPARAT UND FRÜHE ENDOSOMEN SIND MORPHOLOGISCH UNAUFFÄLLIG.....	55
ABB. 3.7 DIE SPÄTENDOSOMALEN MARKER RAB7 UND RAB9 COLOKALISIEREN IN DHET UND DKO.....	57
ABB. 3.8 RAB9 UND RAB11 SIND IN DHET UND DKO GLEICH VERTEILT UND COLOKALISIEREN PERINUKLEÄR.....	57
ABB. 3.9 DIE PROTEINDEGRADATION DURCH AUTOPHAGOZYTOSE IST IN DKO UND DHET MEF VERGLEICHBAR.....	58
ABB. 3.10 LC3-II AKKUMULIERT BEI INDUZIERTER AUTOPHAGOZYTOSE NICHT IN DHET, DKO ODER TRIALLELEN MEF .....	60
ABB. 3.11 SIGNIFIKANT ERHÖHTE SEKRETION LYSOSOMALER ENZYME BEI VTI1A/VTI1B NEGATIVEN MEF .....	61
ABB. 3.12 MPR46 PROTEINLEVEL UNTERSCHIEDEN SICH IN MEF UND Gewebe NICHT SIGNIFIKANT .....	62
ABB. 3.13 DIE LOKALISATION VON MPR46 IST IN DKO GEGENÜBER DHET MEF NICHT VERÄNDERT .....	64
ABB. 3.14 DIE LOKALISATION VON MPR300 IST IN DKO MEF GEGENÜBER DHET NICHT VERÄNDERT.....	65
ABB. 3.15 MPR46 UND MPR300 COLOKALISIEREN IN DHET UND DKO MIT LAMP2 .....	66
ABB. 3.16 DIE PINOZYTOSE VON DEXTRAN VERLÄUFT IN DHET UND DKO MEF GLEICH .....	67
ABB. 3.17 AUFNAHME UND TRANSPORT VON CHOLERATOXIN ZU GOLGI UND ER SIND NICHT BEEINTRÄCHTIGT .....	69
ABB. 3.18 IN DHET UND DKO MEF WIRD LDL-BODIPY GLEICHERMAßEN AUFGENOMMEN UND DEGRADIERT .....	71
ABB. 3.19 DIE CLATHRIN-ABHÄNGIGE AUFNAHME VON TRANSFERRIN ZEIGT KEINE UNTERSCHIEDE .....	72
ABB. 3.20 DIE EXOZYTOSE INTERNALISIERTEN TRANSFERRINS VERLÄUFT IN DKO UND DHET MIT GLEICHER KINETIK .....	73
ABB. 3.21 AUFNAHME UND ABBAU VON EGF-ALEXA488 IST IN DKO MEF NICHT BEEINTRÄCHTIGT.....	74
ABB. 3.22 DER EGF-TRANSPORT ZUM LYSOSOM VERLÄUFT IN DKO UND DHET MIT ÄHNLICHER GESCHWINDIGKEIT .....	75
ABB. 3.23 DIE DEGRADATION DES EGF-REZEPTORS VERLÄUFT MIT GLEICHER KINETIK .....	76
ABB. 3.24 DIE ENDOSOMALE SIGNALGEBUNG DES EGF-REZEPTORS IST INTAKT .....	77
ABB. 3.25 DIE EGF-STIMULIERTE ZELLMIGRATION ERFOLGT IN DHET UND DKO GLEICHERMAßEN .....	79
ABB. 3.26 DYSREGULATION DES EGF-REZEPTORS BEI STIMULATION MIT NIEDRIGER EGF-KONZENTRATION.....	80
ABB. 3.27 AUF DER PLASMAMEMBRAN BEFINDEN SICH BEI DHET UND DKO GLEICHE MENGEN EGFR .....	81

---

ABB. 3.28 SYNTHESE UND DEGRADATION VON LIPIDTROPFEN SIND IN DKO MEF UNAUFFÄLLIG.....	83
ABB. 3.29 DKO MEF DER E-LINIE ZEIGEN EINE ERHÖHTE ANZAHL LIPIDTROPFEN.....	84
ABB. 3.30 DKO HIPPOCAMPALE NEURONEN ZEIGEN <i>IN VITRO</i> EINEN DEUTLICHEN PHÄNOTYP .....	86
ABB. 3.31 DKO HIPPOCAMPALE NEURONEN SIND IN IMMUNFÄRBUNGEN WEITGEHEND UNAUFFÄLLIG .....	88
ABB. 3.32 RAB7 UND RAB11 SIND IN DHET UND DKO GLEICH LOKALISIERT .....	89
ABB. 3.33 DKO NEURONEN ZEIGEN BEI NT-3-STIMULATION GEGENÜBER DHET GERINGERES NEURITENWACHSTUM .....	90
ABB. 4.1 MÖGLICHE BETEILIGUNG VON VTI1A/VTI1B AM WLS-RECYCLING .....	96
ABB. 4.2 MÖGLICHE BETEILIGUNG VON VTI1A/VTI1B AN DER BILDUNG VON LAMELLARKÖRPERCHEN .....	98
ABB. 4.3 ERHÖHTE SEKRETION LYSOSOMALER HYDROLASEN DURCH BEEINTRÄCHTIGTES ENDOSOM/TGN-RECYCLING .....	101
ABB. 4.4 DER EGF-REZEPTOR KÖNNTE IM DKO FEHLREGULIERT UND DAHER DEGRADIERT WERDEN .....	103
ABB. 4.5 UNTERSUCHTE MORPHOLOGIE UND TRANSPORTWEGE IN MEF .....	107
ABB. 4.6 DIE SNARE-KOMPLEXBILDUNG KÖNNTE BEI KNOCKDOWN UND KNOCKOUT VERSCHIEDEN REGULIERT WERDEN .....	111
ABB. 4.7 MÖGLICHE VTI1A/VTI1B-ABHÄNGIGKEIT DES MATERIAL- UND MEMBRANTRANSPORTS IN NEURONEN.....	113

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	EGF(R)	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Rezeptor)
ADP	Adenosindiphosphat		
Amp	Ampicillin	ENTH	Epsin N-terminal homologe Domäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat		
ARF	<i>ADP Ribosylation Factor</i>	ER	Endoplasmatisches Retikulum
ATP	Adenosintriphosphat	ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
a.u.	<i>arbitrary units</i>		
BSA	Rinderserumalbumin	<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
bzw.	beziehungsweise	F	Phenylalanin
bzgl.	bezüglich	FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i>
ca.	circa		
CAM	<i>Cellular Adhesion Molecule</i>	FE	Frühes Endosom
°C	Grad Celsius	Fe	Femur
cDNA	komplementäre DNA	Fi	Fibia
Cl	Claviculum	FKS	Fötales Kälberserum
COPI/II	<i>Coat Protein Complex I/II</i>	g	Gramm, Erdbeschleunigung
D	Asparaginsäure	GDP	Guanosindiphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser	ggf.	gegebenenfalls
dest.	destilliert	GM130	<i>Golgi-Matrix protein of 130 kDa</i>
d.h.	das heißt	GTP	Guanosintriphosphat
DHET	( <i>Vti1a/b</i> ) doppelt Heterozygot	HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure
DIV	<i>Day In Vitro</i>		
DKO	( <i>Vti1a/b</i> ) Doppelknockout	HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
DMEM	Dubbecco's Modified Eagle Medium	Hu	Humerus
DMSO	Dimethylsulfoxid	I	Isoleucin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IF	Immunfluoreszenz
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'- triphosphate	Is	Ischias
E	Glutaminsäure	k	Kilo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	kb	Kilobasen
EEA1	<i>Early Endosomal Antigen 1</i>	kDa	Kilodalton
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	L	Liter, Leucin
		LAMP	<i>Lysosome Associated Membrane Protein</i>

LC-3	<i>microtubule-associated protein1</i> <i>Light Chain 3</i>	SE	Spätes Endosom
		SEM	Standardfehler d. Mittelwertes
LB-Medium	Luria-Bertani Medium	SG	Sekretorisches Granulum
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Lys	Lysosom	SM-Proteine	Sec1/Munc18-ähnliche Proteine
m	milli-, Meter	SNAP	Synaptosomen-assoziiertes Protein
M	Manubrium, molar		
MEF	Mausembryonale Fibroblasten	SNAREs	<i>Soluble NSF Attachment Protein Receptors</i>
min	Minute(n)		
μ	mikro	Syx	Syntaxin
MPR	Mannosephosphat-Rezeptor	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
MVB	<i>Multivesicular Body</i>	TCA	Trichloressigsäure
MW	Molekulargewicht	Td	Tuberositas deltaidea
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>	TEMED	N,N,N',N'-
NSF	<i>N-ethylmaleimide-Sensitive Factor</i>		Tetramethylethylendiamin
		TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
NT-3	Neurotrophin-3	Ti	Tibia
OD	optische Dichte	Tf	Transferrin
p	Plasmid	TNF	Tumornekrosefaktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	Trk	<i>Tropomyosin related kinase</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion	Üs	Überstand
PFA	Paraformaldehyd	ü.N.	über Nacht
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration	rpm	Umdrehungen pro Minute
		UI	Ulna
		UV	Ultraviolett
PLL	Poly-L-Lysin	V	Volt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
Pu	Pubis		
Q	Glutamin	Vti1	<i>Vps10-tail-interacting 1</i>
R	Arginin	v/v	Volumen pro Volumen
R1	erste Rippe	WB	Westernblot
Rab	<i>Ras-like protein from brain</i>	WT	Wildtyp
RNA	Ribonukleinsäure	w/v	Gewicht pro Volumen
RT	Raumtemperatur	Y	Tyrosin
s	Sekunde(n)	z.B.	zum Beispiel
S	Sternebra		
Sar	<i>Secretion-associated and RAS-related</i>		
SDS	Natriumdodecylsulfat		

# Curriculum Vitae

## Sascha Michael Browski

- Geburtsdatum: 09.09.1980
- Geburtsort: Soest
- **08/1991 – 06/2000**      Conrad-von-Soest Gymnasium, Soest:  
Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
- **10/2001 – 09/2006**      Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie:  
Studium der Biochemie. Abschlussarbeit in der Arbeitsgruppe Biochemie III bei Prof. Dr. Fischer von Mollard. Thema der Arbeit: „Funktion und Interaktion der SNARE-Proteine Vti1a, Vti1b und SNAP-29 in Säugerzellen“. Abschluss als Diplom-Biochemiker.
- **02/2007 – 07/2010**      Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie:  
Promotion in der Arbeitsgruppe Biochemie III bei Prof. Dr. Fischer von Mollard. Thema der Arbeit: „Charakterisierung des murinen Doppelknockouts der endosomalen Qb-SNAREs Vti1a und Vti1b“.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard für die Möglichkeit, in Ihrer Arbeitsgruppe an einem sehr spannenden Thema forschen zu dürfen. Sie hatte nicht nur ein offenes Ohr für Probleme, sondern auch stets hilfreiche – und prompte – Anregungen, Tipps und Vorschläge, die mich weiter vorangebracht haben.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens trotz der anderen Stapel an Arbeit, die auf dem Schreibtisch warten.

Dr. Christiane Wiegand habe ich, in aller Bescheidenheit, fast alle praktischen Tricks im Labor zu verdanken, die ich kenne. Für ihre tatkräftige Unterstützung vor allem in stressigen Zeiten kann ich mich nicht genug bedanken. Ohne Arme, keine Kekse; ohne Christiane, keine Schnitte.

Schuld daran, dass ich hier eine sehr gute Zeit hatte, waren aber auch und vor allem die Kollegen der BCIII, die mir immer das Gefühl gegeben haben, dass Arbeit Spaß machen kann. Und die dafür gesorgt haben, dass das auch nach Feierabend weitergeht. Als da wären: Michael Gossing, Alexander Moreth, Anne Muschinski, Claudia Prange, Susanne Schöning, Roland Seibt, Ulrike Strunk und Jana Zimmermann. Vielen Dank für alles! Und auch den vielen Ehemaligen des Labors, an die ich mich gerne erinnere: Danke!

Nicht zu vergessen natürlich die beiden „grauen Eminenzen“ der BCIII, Rainer Beckmann und Herbert Wenzel, denen ich viel nette Hilfe verdanke.

Für die gute Zusammenarbeit und den ein- oder anderen schönen Abend danke ich auch den Kollegen der BCI sowie allen anderen helfenden Händen an der Universität Bielefeld.

Bei Sabrina Höfling bedanke ich mich ganz besonders für die viele Geduld, alles andere und jeden Tag, an dem ich mich dafür revanchieren kann.

Und schließlich ein riesiges „Danke schön!“ an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben und auf die ich auch in Zukunft immer zählen kann.

**Erklärung gemäß § 8 Abs. 2 der Promotionsordnung der Fakultät für Chemie  
der Universität Bielefeld vom 15. Dezember 2003**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2007 bis Juli 2010 in der Arbeitsgruppe Biochemie III an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Ich habe bisher an keiner anderen Fakultät oder Hochschule einen Antrag auf Zulassung zur Promotion eingereicht und die vorliegende Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung vorgelegt.

Bielefeld, den 28. Juli 2010

---

Sascha Michael Browski