

**Charakterisierung der molekularen Grundlagen
knochenphänotypischer Manifestationen von
Vti1a^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäusen und kompensatorischer
SNARE-Proteine**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Simone Schmücker

aus Meschede

angefertigt in der Arbeitsgruppe Biochemie III

der Universität Bielefeld

Bielefeld 2018

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

2. Gutachten: apl. Prof. Dr. Torben Lübke
Biochemie I, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 MAPK-Signalweg	2
1.2 TGF- β - und BMP-Signalweg	4
1.3 Vesikulärer Transport	7
1.4 SNARE-Proteine	8
1.4.1 Vti1a und Vti1b	11
1.4.2 Vti1p	12
1.4.3 Vti1a- und Vti1b-Doppeldefizienz	13
1.4.4 SNAP-23 und SNAP-25	14
1.4.5 SNAP-29 und SNAP-47	15
2. Zielsetzung.....	17
3. Material.....	18
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
3.2 Chemikalien	20
3.3 Enzyme, Nukleotide, Standards	21
3.4 Wachstumsfaktoren	21
3.5 Antikörper	22
3.5.1 Primäre Antikörper	22
3.5.2 Sekundäre Antikörper	23
3.6 Plasmide.....	23
3.7 Oligonukleotide.....	25
3.8 Kits	26
3.9 Bakterienstämme.....	26
3.10 Zelllinien.....	27
3.11 Mauslinien	27
3.12 Hefestämme	27
3.13 Software.....	28
3.14 Internetdienste	28
4. Methoden.....	29
4.1 Molekularbiologische Methoden	29
4.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	29
4.1.2 Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	29
4.1.3 Transformation von <i>E. coli</i>	29
4.1.3.1 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	30
4.1.3.2 Elektroporation von <i>E. coli</i>	30
4.1.4 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA.....	30
4.1.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	31
4.1.6 Sequenzierung.....	31
4.1.7 Agarosegelelektrophorese	31
4.1.8 PCR	32
4.1.9 Kolonie-PCR.....	33

4.1.10 A/T-Klonierung	34
4.1.11 Blau-/weiß-Selektion.....	34
4.1.12 Analytische und präparative Restriktion.....	35
4.1.13 Gelextraktion.....	35
4.1.14 Ligation.....	35
4.1.15 Genotypisierung.....	36
4.1.16 Reverse Transkription	37
4.1.17 CRISPR-Cas9(n)	38
4.1.17.1 Herstellung des Vektors.....	38
4.1.17.2 Surveyor-Assay.....	38
4.1.17.3 Isolierung genomischer DNA	39
4.1.17.4 Surveyor-PCR	39
4.1.17.5 Surveyor-Hybridisierung	39
4.1.17.6 T7-Endonuklease I Abbau	40
4.2 Zellkulturtechnische Methoden	40
4.2.1 Kultivieren von Säugerzellen.....	40
4.2.2 Passagieren von Säugerzellen	40
4.2.3 Kryokonservieren und Revitalisieren von Säugerzellen.....	41
4.2.4 Gewinnung von primären Zellen.....	42
4.2.5 Immortalisierung von MEF.....	42
4.2.6 Reinigung von Deckgläsern	42
4.2.7 Zellfixierung und Antikörperfärbung.....	43
4.2.8 Transfektion mit Polyethylenimin.....	44
4.2.9 Stimulation von Säugerzellen.....	44
4.2.10 Transport des Reporterproteins	45
4.2.11 Durchflusszytometrie	45
4.2.12 Alzianblaufärbung von Zellen.....	46
4.2.13 Zellmigration (Wundheilungstest)	46
4.2.14 Antikörperfärbung von Paraffinschnitten	46
4.2.15 Zellkernisolation.....	47
4.3 Proteinbiochemische Methoden	48
4.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe	48
4.3.2 Bradford Assay	48
4.3.3 SDS-Gelelektrophorese	49
4.3.4 Western Blot	50
4.3.4.1 Semi-Dry Blot	50
4.3.4.2 Wet Blot.....	50
4.3.5 Proteindetektion auf Nitrozellulose-Membranen	51
4.3.6 Sekretionsassay.....	52
4.3.7 LIMP2-Glucocerebrosidaseassay.....	53
4.4 Hefegenetische Methoden	54
4.4.1 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	54
4.4.2 Kryokonservierung von <i>S. cerevisiae</i>	55
4.4.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	56
4.4.3.1 Lithiumacetat (LiOAc)-Transformation	56
4.4.3.2 PLATE	57
4.4.4 Zellaufschluss nach Thorner.....	58
4.4.5 Wachstumstest	58
4.4.6 Differenzielle Zentrifugation	58
4.4.7 5-FOA Assay.....	60

5. Ergebnisse	61
5.1 Die Rolle von Vti1a und Vti1b beim lysosomalen Proteintransport.....	66
5.1.1 Untersuchung des Mannose-6-Phosphat-abhängigen Transports	67
5.1.2 Untersuchung des LIMP2-abhängigen Transports.....	69
5.1.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der lysosomalen Struktur	70
5.2 Einfluss von Vti1a und Vti1b auf die zelluläre Signaltransduktion	73
5.2.1 Untersuchung des TGF- β - und BMP-Signalwegs.....	75
5.2.2 Analyse des MAPK-Signalwegs in MEF.....	94
5.2.3 Studien zur Zellmigration in MEF	96
5.3 Der mögliche Ersatz von Vti1a und Vti1b durch Qbc-SNAREs.....	101
5.3.1 Untersuchung möglicher Ersatzkandidaten in <i>S. cerevisiae</i>	101
5.3.2 Analyse des <i>knockdowns/knockouts</i> von SNAP-29 oder SNAP-47.....	107
6. Diskussion	113
6.1 Der Verlust von Vti1a und Vti1b verursacht leichte lysosomale Defekte.....	113
6.2 Die Vti1a- und Vti1b-Doppeldefizienz führt zu einer reduzierten Aktivität der TGF- β /BMP-Signalwege	120
6.3 SNAP-29 und SNAP-47 sind mögliche Kandidaten für einen funktionellen Ersatz von Vti1a und Vti1b	128
7. Zusammenfassung	138
8. Literatur	142
9. Anhang	IV
9.1 Zusätzliche Daten.....	IV
9.2 Abkürzungsverzeichnis	VII
9.3 Akademischer Werdegang.....	XI
9.4 Danksagung.....	XII
9.5 Eigenständigkeitserklärung.....	XIII

1. Einleitung

Eukaryotische Zellen zeichnen sich durch eine Kompartimentierung aus. Diese Unterteilung des Intrazellularraums in verschiedene Organellen wie z.B. Nukleus, endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat und Endosomen ermöglicht die Ausbildung abgeschlossener Reaktionsräume. Sie können sich z.B. hinsichtlich ihres pH-Werts und ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden, so dass verschiedene Reaktionen innerhalb einer Zelle zur gleichen Zeit in den einzelnen Kompartimenten stattfinden können. Allerdings gibt es neben den genannten Vorteilen auch Nachteile für die Zelle. Diese muss aufgrund der Komplexität ein vesikuläres Transportsystem bereitstellen, welches den Stoffaustausch zwischen den Organellen ermöglicht. Hierbei überführen membranumschlossene Vesikel die Fracht von einem Donor- zu einem Akzeptorkompartiment. Gleichzeitig wird so auch der Transport von Membranbestandteilen bewerkstelligt. Mittlerweile wurden verschiedene intrazelluläre Transportrouten dokumentiert. Der sekretorische Weg führt Proteine vom ER zum Golgi-Apparat (Palade, 1975). Hier finden verschiedene posttranslationale Modifikationen statt. Im Vordergrund stehen dabei Sulfatierungen und Glykosylierungen. Ab diesem Punkt trennen sich die Transportwege. Zur Exozytose bestimmte Proteine werden in Richtung Plasmamembran befördert, um von dort aus in den Interzellularraum sekretiert zu werden. Ein anderer Weg führt Proteine vom Golgi-Apparat über die frühen und späten Endosomen zum Lysosom. Dieses Organell ist äußerst dynamisch und dient dem intrazellulären Abbau von Proteinen (Luzio *et al.*, 2007). Endozytose beschreibt einen Prozess, bei dem Proteine aus dem Extrazellularraum in die Zelle aufgenommen werden. Diese gelangen zunächst in die frühen Endosomen und können von dort aus über die späten Endosomen zum Lysosom transportiert werden (Mukherjee *et al.*, 1997). Zudem können sie zurück zur Plasmamembran *recycled* werden, wie es z.B. für Rezeptoren der Fall sein kann (Gruenberg *et al.*, 2001). Des Weiteren wird zwischen anterogradem und retrogradem Transport differenziert.

Bindestellen für Proteine dar, die eine *Src homology 2* (SH2) Domäne und/oder eine *phosphotyrosine binding domain* (PTB) aufweisen. Von hier aus wird das Signal über Adapterproteine wie z.B. *growth-factor-receptor bound-2* (Grb2) und Nukleotid-Austauschfaktoren wie z.B. *Son-of-sevenless* (Sos) an Ras (*Rat sarcoma*) weitergegeben (Rozakis-Adcock *et al.* 1993; Moran *et al.*, 1990). Hierdurch wird Ras-GDP (*Guanosindiphosphate*) in die aktive Form Ras-GTP (*Guanosintriphosphate*) überführt. Ras aktiviert die Proteinfamilie Raf (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*; Wood *et al.*, 1992), was wiederum die Aktivierung der Proteinkinasen MEK1/2 (*Mitogen-activated Proteinkinase*) ermöglicht (Dent *et al.*, 1992; Kyriakis *et al.*, 1992; Wellbrock *et al.*, 2004). MEK1/2 phosphorylieren Tyrosine und Threonine in Erk1/2, die ihre einzigen Substrate darstellen (Ray und Sturgill, 1988; **Abb. 1.2**).

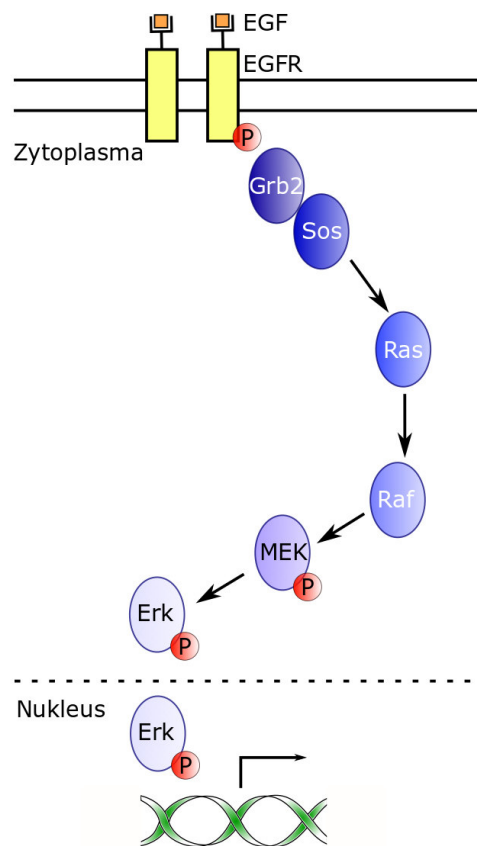


Abb. 1.2 MAPK-Signalweg

Die Bindung von EGF am EGFR sorgt für die Phosphorylierung intrinsischer Tyrosinreste. Die damit einhergehende Aktivierung führt zur Bindung von Adapterproteinen und Nukleotid-Austauschfaktoren wie z.B. Grb2-Sos, die das Signal an Ras weitergeben. Ras aktiviert Raf und dieses Protein wiederum überführt MEK1/2 in seine aktive Form. MEK1/2 phosphoryliert Erk1/2, welches verschiedene zelluläre Prozesse steuert.

Im Vergleich zu Raf und MEK1/2 besitzen Erk1/2 eine große Anzahl an zytoplasmatischen und nukleären Substraten (Roskoski, 2012). Die MAPK Erk1 und Erk2 sind zu 83 % identisch und werden ubiquitär exprimiert (Boulton *et al.*, 1991a und b). Durch Stimulanzen werden beide Proteine simultan aktiviert (Lefloch *et al.*, 2009). Yao *et al.* (2003) zeigten, dass das *Erk2* Gen bei Verlust embryonal letal ist, wohingegen der Verlust des *Erk1* Gens keine Auswirkungen hat. Erk1 defiziente Mäuse sind lebensfähig, fertil und normal groß (Nekrasova *et al.* 2005; Pagès *et al.*, 1999). Erk1 und Erk2 sind in der Lage in den Zellkern zu translozieren (Lenormand *et al.*, 1993). Dieser Signalweg ermöglicht durch die Regulation von Transkription, Stoffwechsel und Zytoskelett verschiedene biologische Funktionen wie z.B. Zelldifferenzierung und -wachstum (Wellbrock *et al.*, 2004). Durch die lysosomale Degradation des Ligand-Rezeptorkomplexes erfolgt die Signalabschaltung (Beguinot *et al.*, 1984). Eine Signalweiterleitung erfolgt nicht nur von der Plasmamembran und von den frühen Endosomen aus, sondern auch von Organellen, die aus der Reifung von frühen Endosomen entstehen, wie z.B. multivesikuläre Körperchen (Oksvold *et al.*, 2001; Futter *et al.*, 1996). Die Aktivierung von Erk1/2 kann nicht nur durch einen EGF Stimulus erfolgen. Lee *et al.* (2007) konnten eine TGF (*transforming growth factor*)- β 1 abhängige Phosphorylierung von ShcA (*Src Homology and Collagen A*) durch den TGF- β -Rezeptor nachweisen. Hierdurch kommt es zur Assoziation von ShcA mit Grb2 und Sos, was ebenfalls eine Initiation des MAPK-Wegs zur Folge hat.

1.2 TGF- β - und BMP-Signalweg

ShcA wird sowohl an Serinen als auch an Tyrosin-Resten phosphoryliert, denn die Rezeptoren der TGF- β - bzw. BMP (*bone morphogenic protein*)-Proteinfamilie weisen eine Serin/Threonin sowie eine Tyrosin Kinase Aktivität auf und werden daher als *dual-specificity* Kinasen klassifiziert (Lee *et al.*, 2007; Mathews und Vale, 1991). Die Bindung der homodimeren Proteine TGF- β bzw. BMP induziert die Assemblierung zweier Typ I und zweier Typ II Rezeptoren zu heterotetrameren Komplexen (Chen und Derynck, 1994; Laiho *et al.*, 1990; Laiho *et al.*, 1991). Dabei phosphoryliert der konstitutiv aktive Rezeptor Typ II den Rezeptor Typ I in seiner GS-Domäne, die reich an Glycin- und Serin-Resten ist. Es wurde gezeigt, dass die Bindung eines Liganden ohne Typ II Rezeptor und eine Signalaktivität ohne Typ I Rezeptor nicht möglich ist (Wrana *et al.*, 1994; Wrana *et al.*, 1992). Rezeptor Typ I

aktiviert daraufhin rezeptorregulierte Smad-Proteine (R-Smads). Während Smad2 und Smad3 Substrate der TGF- β -Rezeptoren sind, übermitteln Smad1, Smad5 und Smad9 das Signal von BMP-Rezeptoren (Hoodless *et al.*, 1996; Kretzschmar *et al.*, 1996; Eppert *et al.*, 1996; Nakao *et al.*, 1997a; Macías-Silva *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Aktivierte R-Smads bilden heterodimere bzw. -trimere Komplexe, bestehend aus ein oder zwei R-Smads und Smad4, aus. Dabei ist Smad4 ein gemeinsam genutztes *common mediator* Smad (Co-Smad), welches ursprünglich als Tumorsuppressorgen DPC4 (*deleted in pancreatic carcinoma*) identifiziert wurde (Hahn *et al.*, 1996; Lagna *et al.*, 1996). Diese Komplexe sind in der Lage in den Nukleus zu translozieren, um die Genexpression zu kontrollieren (Chen *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1999). Neben den bereits erwähnten Smad-Proteinen gibt es noch die inhibitorisch wirkenden I-Smads Smad6 und Smad7, deren Expression durch denselben Signalweg angeregt wird und so eine negative Rückkopplung erlauben. Hierfür blockieren sie die Bindungsstellen am Typ I Rezeptor oder rekrutieren die E3 Ubiquitin Ligasen Smurf1 (*Smad ubiquitination regulatory factor*) und Smurf2 (Hayashi *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997b). Des Weiteren können sie phosphorylierte R-Smads binden und konkurrieren so um die Wechselwirkung mit Smad4. Ebenso können I-Smads mit DNA und nukleären Smad-Komplexen interagieren, um eine Inhibition zu bewirken (Dijke und Hill, 2004; Derynck und Zhang *et al.*, 2003; Hata und Chen, 2016). Im Säuger gibt es fünf Typ II Rezeptoren und sieben Typ I Rezeptoren sowie 29 Liganden. TGF- β 1, TGF- β 3 und Aktivine binden den Typ II Rezeptor und benötigen dazu keinen Typ I Rezeptor, wohingegen TGF- β 2 nur mit einer Kombination aus beiden Rezeptoren interagiert (Derynck und Zhang *et al.*, 2003).

Die Smad-Protein Familie wurde zuerst in *Drosophila* entdeckt. Dabei stellt das Genprodukt *Mothers against decapentaplegic* (Mad) ein entsprechendes Smad-Protein dar, welches mit dem BMP-homologen Rezeptor *Decapentaplegic* (Dpp) interagiert (Sekelsky *et al.*, 1995; Raftery *et al.*, 1995). In *Caenorhabditis elegans* wurden entsprechende Mad-Homologe identifiziert, die als sma-2, sma-3 und sma-4 bezeichnet werden (Savage *et al.*, 1996). Die Bezeichnung Smad ist eine Kombination beider Begriffe. Die R- und Co-Smads weisen mit der N-terminalen MH1 (MAD-homology1) und der C-terminalen MH2 zwei konservierte Domänen auf, die durch eine nicht konservierte Linkerregion miteinander verbunden sind. Am C-Terminus (MH2-Domäne) besitzen die R-Smads ein charakteristisches SXS Motiv. Die in diesem Motiv enthaltenen Serinreste werden durch den TGF- β -Rezeptor Typ I

phosphoryliert und führen so zur Aktivierung. Die Assemblierung mit Smad4 wird über dessen MH2-Domäne ermöglicht. Im Zellkern erfolgt die DNA Bindung über die MH1-Domäne und die Interaktion mit diversen Faktoren über die MH2-Domäne (Shi und Massagué, 2003; Heldin *et al.*, 1997). Kontrovers diskutiert ist die subzelluläre Lokalisation der Smad-Proteine im unstimulierten Zustand. Die Mehrheit der Veröffentlichungen beschreibt ein ligandenunabhängiges Pendeln der R-Smads zwischen Zytosol und Nukleus (Xiao *et al.*, 2001). Erst die Assoziation mit Smad4, nach Aktivierung des Signalwegs, hält die Komplexe im Zellkern (**Abb. 1.3**).

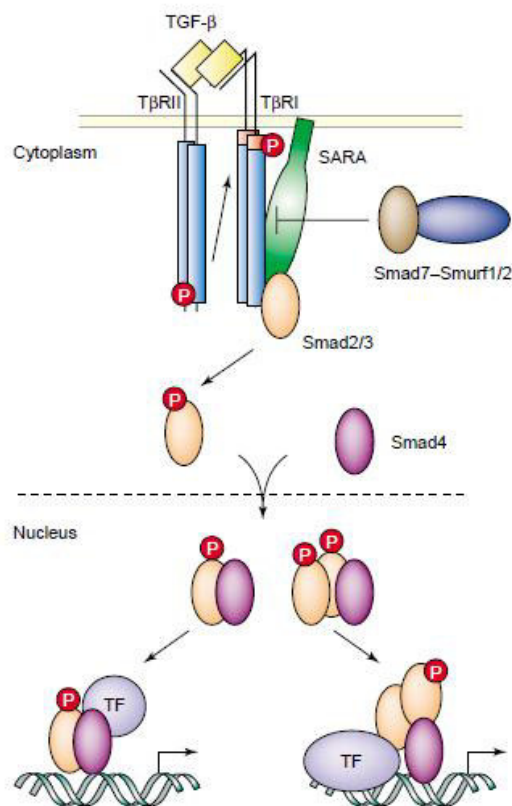


Abb. 1.3 TGF-β-Signalweg

Die Aktivierung des TGF-β Signalwegs wird über die Bindung eines Liganden an die entsprechenden TGF-β-Rezeptoren initiiert. Der damit einhergehenden Assemblierung der Rezeptortypen I und II folgt eine Phosphorylierung von meist zytosolisch lokalisierten R-Smads (Smad2, Smad3), die daraufhin mit Smad4 interagieren. Der daraus resultierende Komplex transloziert in den Zellkern, wo er die Expression von verschiedenen Genen reguliert. I-Smads wie z.B. Smad7 ermöglichen eine Inhibition der Signaltransduktion über verschiedene Wege. Dargestellt ist die Interaktion mit den E3 Ubiquitin Ligasen Smurf1/2 (Dijke und Hill, 2012)

Der plasmamembranständige Ligand-Rezeptorkomplex wird in SARA (*SMAD anchor for receptor activation*)-enthaltende frühe Endosomen Clathrin-abhängig internalisiert. Auch von diesen Endosomen ausgehend erfolgt die Signalweitergabe (Dijke und Hill, 2004). Es

wurde gezeigt, dass beide Rezeptortypen, I und II, schnell internalisiert werden und in EEA1-positiven Endosomen akkumulieren (Hayes *et al.*, 2002). Tzukazaki *et al.* (1998) identifizierten SARA als ein Protein, welches eine doppelte Zinkfingerdomäne, die als FYVE Domäne bezeichnet wird, aufweist und mit Smad2/3 sowie mit den TGF- β -Rezeptoren interagieren kann. Die Deletion der FYVE-Domäne führt zu einer Fehllokalisierung von Smad2 und inhibiert die TGF- β abhängige Modulation der Transkription. Hayes *et al.* (2002) sowie Penheiter *et al.* (2002) zeigten, dass eine Internalisierung für die Signalgebung essentiell ist. Hierzu gibt es zwei Hypothesen. Die erste Hypothese beschreibt die Internalisierung des Ligand/Rezeptorkomplexes in Endosomen, in denen die Interaktion mit SARA/Smad2 stattfindet. In einem zweiten möglichen Modell wird die Formation eines Komplexes aus Ligand/Rezeptor, SARA und Smad2 an der Plasmamembran diskutiert, welcher anschließend in Endosomen endozytiert wird (Hayes *et al.*, 2002).

1.3 Vesikulärer Transport

Der intrazelluläre Transport von Ligand-Rezeptorkomplexen scheint eine zentrale Bedeutung für eine Vielzahl von Signalwegen zu haben. Innerhalb der Zelle ermöglichen Membranfusionen die Weitergabe des Komplexes an unterschiedliche Organellen. Im Folgenden soll daher der Mechanismus des vesikulären Transports näher erläutert werden (**Abb. 1.4**).

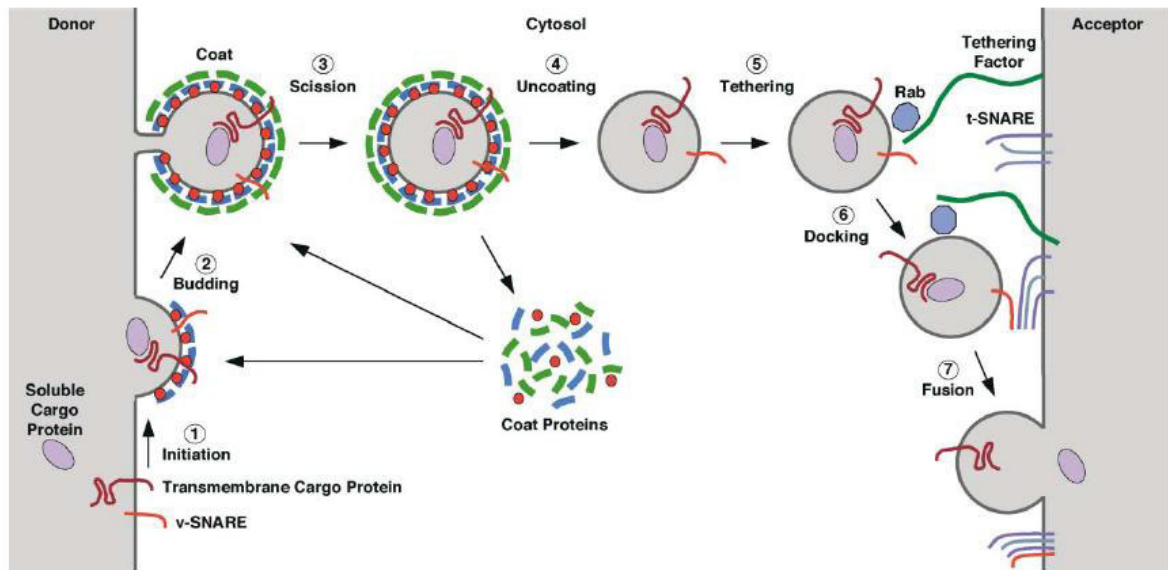


Abb. 1.4 Mechanismus des vesikulären Transports

Der vesikuläre Transport erfolgt in mehreren Schritten. Zu Beginn kommt es zur Vesikelbildung, welche mit der Rekrutierung von Hüllproteinen und der Beladung mit Frachtproteinen einhergeht. Die erste Kontaktaufnahme mit dem Akzeptorkompartiment wird durch *Tether*- und *Rab*-Proteine vermittelt. Der Vorgang wird mit der SNARE-vermittelten Membranfusion zwischen Transportvesikel und Zielorganell abgeschlossen, so dass die Frachtproteine an ihren Bestimmungsort gelangen (Bonifacino und Glick, 2004).

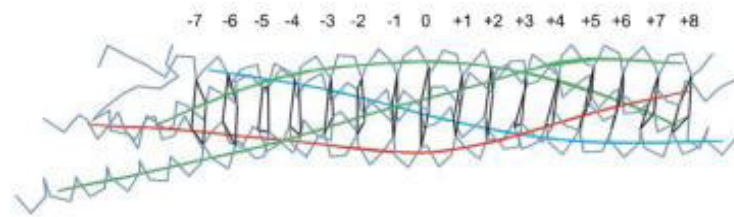
Dieser wird durch die Assemblierung von zytosolischen Hüllproteinen an der entsprechenden Membran initiiert, wodurch es zu einer Membrandeformation kommt. Gleichzeitig werden die zu transportierenden Frachtproteine rekrutiert. Ist dieser Prozess abgeschlossen, so schnürt das Vesikel vom Donorkompartiment ab und wird zum Akzeptorkompartiment transportiert. Bevor es mit diesem in Interaktion treten kann, kommt es zur Dissoziation der Hüllproteine. Die erste Kontaktaufnahme des Vesikels mit dem Organell geschieht über *Tether*- und *Rab* (*Ras related in the brain*)-Proteine. Die Fusion beider Membranen wird durch SNARE-Proteine katalysiert und ermöglicht so die Freisetzung der Fracht in das Akzeptorkompartiment (Bonifacino und Glick, 2004).

1.4 SNARE-Proteine

SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*)-Proteine weisen einen charakteristischen Aufbau auf. Namensgebend ist das SNARE-Motiv, welches aus 60 bis 70 Aminosäuren besteht. Am C-terminalen Ende besitzt ein Großteil der Proteinfamilie eine einzelne Transmembrandomäne. Diese ist durch eine Linkerregion mit

dem SNARE-Motiv verbunden. Eine weitere Möglichkeit der Membranassoziation ergibt sich durch Prenylierungen, Palmitoylierungen oder durch die Interaktion mit einem SNARE-Protein, welches selbst membrangebunden ist (Hong, 2005). Der N-Terminus von SNARE-Proteinen zeichnet sich durch eine große Variabilität aus und ermöglicht die Unterteilung der SNARE-Proteine in Untergruppen. Die Klassifizierung der SNARE-Proteine erfolgte zunächst auf Grundlage der Lokalisation. So wurden Vesikel-assoziierte SNAREs als v (*vesicle*)-SNAREs bezeichnet, während sich t (*target*)-SNAREs auf dem Akzeptor- bzw. Zielorganell befanden (Söllner *et al.*, 1993). Problematisch wurde diese Nomenklatur bei homotypischen Fusionen, da diese Unterteilung hier nicht möglich ist. Eine andere Art der Klassifizierung gliedert SNAREs anhand ihrer Aminosäure in der hydrophilen Nullschicht innerhalb des SNARE-Komplexes in Q- und R-SNAREs. Der SNARE-Komplex setzt sich aus vier SNARE-Motiven zusammen und zeichnet sich durch 16 Ebenen interagierender Aminosäureseitenketten aus, welche, bis auf die Nullschicht, hydrophob sind. R-SNAREs weisen in der Nullschicht ein Arginin (R) und Q-SNAREs ein Glutamin (Q) auf, woraus die entsprechende Nomenklatur resultiert (Fasshauer *et al.*, 1998). Die ersten strukturellen Aufklärungen von SNARE-Komplexen wurden von Sutton *et al.* (1998) und Antonin *et al.* (2002) durchgeführt, die die Kristallstruktur des synaptischen (Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25) und des endosomalen (Syntaxin 7, Syntaxin 8, Vti1b und Endobrevin/VAMP8) SNARE-Komplexes untersuchten. Eine weitere Unterteilung der Q-SNAREs erfolgt anhand von Sequenzähnlichkeiten in Qa-, Qb-, und Qc-SNAREs (Bock *et al.*, 2001; Kloepper *et al.*, 2007; Fasshauer *et al.*, 1998; **Abb. 1.5**).

A



B

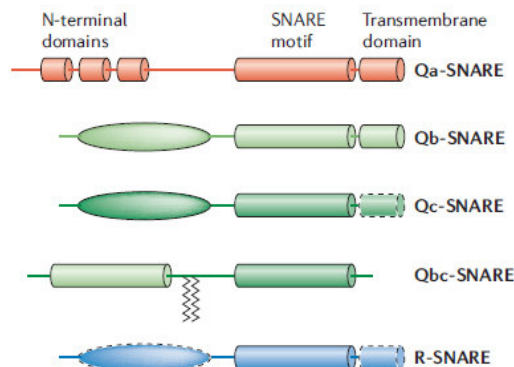


Abb. 1.5 Aufbau von SNARE-Proteinen

SNARE-Komplexe bestehen aus 16 interagierenden Schichten (-7 bis +8) von Aminosäureseitenketten (A). Die Aminosäure in der Nullschicht (0) ermöglicht die Klassifizierung in Q (Glutamin)- und R (Arginin)-SNAREs. Eine weitere Unterteilung der SNARE-Proteine in Qa-, Qb-, und Qc-SNAREs erfolgt anhand von Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz (B). Generell weisen SNARE-Proteine unterschiedliche Domänen auf. Charakteristisch ist das SNARE-Motiv, welches für die Ausbildung von Komplexen zur Membranfusion essentiell ist. Am C-terminalen Ende befindet sich mit Ausnahme z.B. der Qbc-SNAREs eine Transmembrandomäne. Qbc-SNAREs können stattdessen Fettsäurederivate zur Membranassoziation aufweisen. Der N-terminale Bereich der SNARE-Proteine ist sehr variabel und besitzt in den meisten Fällen eine regulatorische Funktion (Fasshauer *et al.*, 1998; Jahn und Scheller, 2006).

Exozytose vermittelnde Q-SNAREs, die auf der Plasmamembran lokalisiert sind, assemblieren zu einem QaQbQc-Akzeptorkomplex (**Abb. 1.6**). Dieser Komplex interagiert mit dem vesikulär lokalisierten R-SNARE. Die Zusammenlagerung beginnt am N-terminalen Teil des SNARE-Motivs und setzt sich reißverschlussartig in Richtung der Transmembrandomäne fort. Dies erzeugt einen *trans*-Komplex, der durch den Zusammenlagerungsprozess von einem lockeren in einen festen Zustand übergeht. Hierdurch wird eine mechanische Kraft auf die Membranen ausgeübt, wodurch sich eine Fusionspore bildet. Der *trans*-SNARE-Komplex geht in einen *cis*-SNARE-Komplex über (Jahn und Scheller, 2006). Dieser wird durch das AAA+ (ATPases associated with various cellular activities) Protein NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) und SNAPs (*soluble NSF attachment proteins*), welche als Kofaktoren agieren, disassembliert (Söllner *et al.*, 1993; Malhotra *et al.*, 1988).

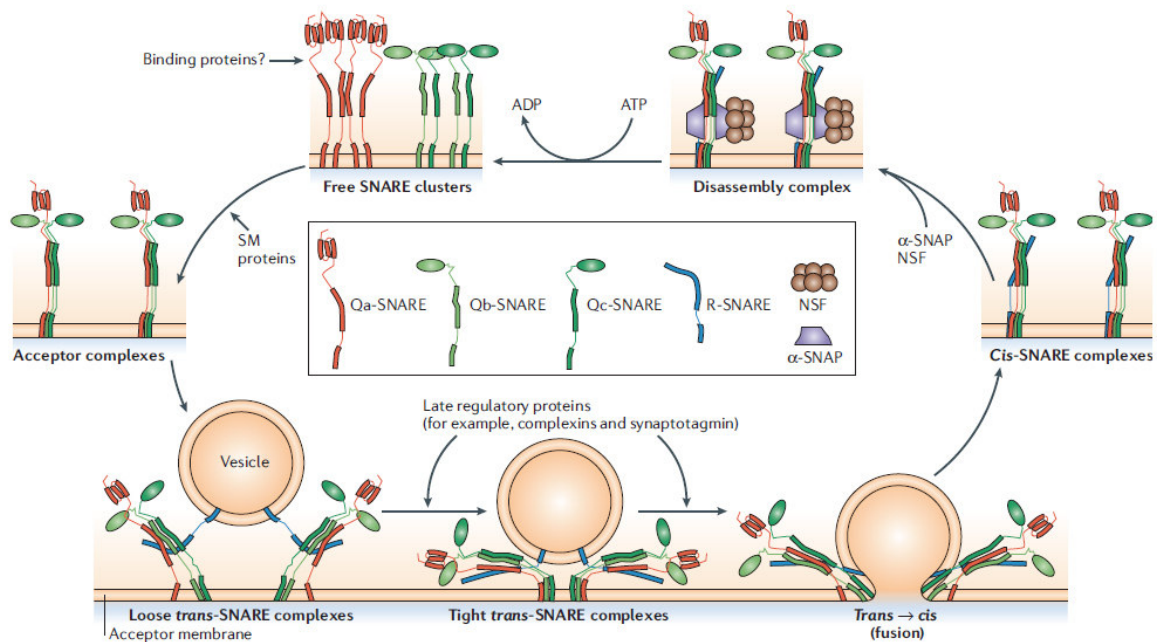


Abb. 1.6 Zyklus der SNARE vermittelten Membranfusion

Drei Q-SNAREs befinden sich in der Membran des Zielorganells und bilden einen Akzeptorkomplex aus. Dieser interagiert mit einem vesikulär lokalisierten R-SNARE. Es kommt zur Ausbildung eines SNARE-Komplexes in Form eines α -helikalen Vierhelixbündels. Dieser sogenannte *trans*-SNARE-Komplex geht von einem lockeren in einen festen Zustand über, wodurch sich die Fusionspore öffnet und ein Stoffaustausch ermöglicht wird. Dabei geht der *trans*-SNARE-Komplex in einen *cis*-SNARE-Komplex über. Die AAA+ ATPase NSF disassembliert zusammen mit SNAPs die entstandenen *cis*-SNARE-Komplexe (Jahn und Scheller, 2006).

Entsprechend ihrer Funktion beim vesikulären Transport sind SNARE-Proteine an unterschiedlichen Organellen lokalisiert, so dass jeweils ein spezifisches Set an SNARE-Proteinen für eine bestimmte Membranfusion verantwortlich ist. Es gibt SNARE-Proteine, die nur an einem Fusionsschritt beteiligt sind und andere, die verschiedene Membranverschmelzungen ermöglichen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den SNARE-Proteinen Vti1a und Vti1b im Säugetier. Diese Qb-SNAREs findet man vor allem im Golgi-Apparat, an Lysosomen und an frühen sowie späten Endosomen (Kreykenbohm *et al.*, 2002).

1.4.1 Vti1a und Vti1b

Vti1a wurde im Golgi und TGN detektiert (Kreykenbohm *et al.*, 2002). Es katalysiert die Fusion von frühen bzw. *recycling* Endosomen mit dem TGN, ein retrograder Transportschritt. Vti1a bildet dafür einen SNARE-Komplex mit Syntaxin 6, Syntaxin 16 und VAMP3 oder

VAMP4 (Mallard *et al.*, 2002). Die homotypische Fusion von frühen Endosomen wird durch einen SNARE-Komplex bestehend aus Vti1a, Syntaxin 13, Syntaxin 6 und VAMP4 vermittelt (Brandhorst *et al.*, 2006). Die Spleißvariante Vti1a- β wird ausschließlich im Gehirn exprimiert und ist in synaptischen sowie in Clathrin-beschichteten Vesikeln, die an Nervenendigungen entstehen, angereichert. Im Vergleich zu Vti1a weist sie eine Insertion von sieben Aminosäuren in der Nähe des SNARE-Motivs auf. Diese hat eventuell einen Einfluss auf die Bindung von SNARE-Komplexpартnern sowie auf die Sortierung des Proteins in synaptische Vesikel (Antonin *et al.*, 2000a). Vti1a- β interagiert zusammen mit Syntaxin 6, Syntaxin 16 und VAMP4 in einem SNARE-Komplex (Kreykenbohm *et al.*, 2002). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass Vti1a die Exozytose in adrenergen chromaffinen Zellen unterstützt, indem es die Anzahl sowie die Größe der Vesikel und die Menge an Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran aufrechterhält. Vti1b hingegen scheint keine Rolle in diesen Prozessen zu spielen (Walter *et al.*, 2014).

Vti1b besitzt 30 % Sequenzähnlichkeit zu Vti1a (Atlashkin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 1998). Die intrazelluläre Lokalisation von Vti1b ist breit und überlappt teilweise mit der des Vti1a. Vti1b wurde vor allem im TGN und in späten Endosomen detektiert und ist für die homotypische Fusion später Endosomen verantwortlich (Kreykenbohm *et al.*, 2002). Hierfür interagiert es mit Syntaxin 7, Syntaxin 8 und VAMP8 (Endobrevin) (Antonin *et al.*, 2000b). Bei der heterotypischen Fusion später Endosomen mit Lysosomen ist Vti1b in einem Komplex mit Syntaxin 7, Syntaxin 8 und VAMP7 assoziiert (Pryor *et al.*, 2004). Vti1b spielt auch bei immunologischen Prozessen eine Rolle. In aktivierten Makrophagen weisen Vti1b und Syntaxin 6 eine erhöhte Expression auf. Beide Proteine können im perinukleären Golgi nachgewiesen werden, wo sie mit $\text{TNF}\alpha$ kolokalisieren. Zudem sind sie mit Vesikeln assoziiert, die vom Golgi stammen und $\text{TNF}\alpha$ enthalten. Daher wird ihnen in aktivierten Makrophagen eine Rolle im post-Golgi Transport von $\text{TNF}\alpha$ zugeschrieben (Murray *et al.*, 2005a und b). Des Weiteren haben Vti1b und VAMP8 eine Rolle bei der Degranulation von zytotoxischen T-Lymphozyten (Dressel *et al.*, 2010).

1.4.2 Vti1p

In *S. cerevisiae* ist das Qb-SNARE Vti1p das homologe Protein von Vti1a und Vti1b. Vti1p ist für den Organismus essentiell (Fischer von Mollard *et al.*, 1997). An unterschiedlichen

Zellorganellen katalysiert es verschiedene Membranfusionen. Die Fusion später Endosomen wird durch einen SNARE-Komplex bestehend aus Pep12p, Vti1p, Syn8p und Ykt6p katalysiert (Dilcher *et al.*, 2001; Kweon *et al.*, 2003; Lewis und Pelham, 2002). Membranfusionen mit der Vakuole benötigen die Assoziation von Vam3p, Vti1p, Vam7p und Nyv1p bzw. Ykt6p (Ungermann *et al.*, 1999). Tlg2p, Vti1p, Tlg1p und Snc1p bzw. Snc2p ermöglichen homotypische Fusionen des TGNs und den retrograden Transport von frühen Endosomen zum TGN (Brickner *et al.*, 2001; Holthuis *et al.*, 1998). Retrograde Fusionsvorgänge am Golgi werden durch die Komplexbildung von Sed5p, Vti1p bzw. Gos1p, Sft1p und Ykt6p bewerkstelligt (Banfield *et al.*, 1995; Lupashin *et al.*, 1997; McNew *et al.*, 1997).

1.4.3 Vti1a- und Vti1b-Doppeldefizienz

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass der *knockout* (KO) von Vti1a oder Vti1b keinen generellen Phänotyp zeigt. Mäuse dieser Genotypen sind lebensfähig und fertil. Der *double-knockout* (DKO) von Vti1a und Vti1b (*Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-}) ist vor der Geburt letal. Zellen embryonaler *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse lassen sich jedoch isolieren, kultivieren und analysieren. Erste Untersuchungen an Vti1a- und Vti1b-doppeldefizienten immortalen Fibroblasten zeigten keine auffällig veränderte Organellmorphologie. Zelluläre Stoffwechselwege, wie z.B. der Transport von Transferrin, wiesen keine Defekte auf. Allerdings wurde eine erhöhte Sekretion lysosomaler Enzyme detektiert, die eventuell auf Defekte im Transport des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (M6PR) zurückzuführen ist (Kunwar *et al.*, 2011; Browski, Dissertation, 2010). *In vitro* wurde nachgewiesen, dass der retrograde Transport des M6PR von Endosomen zum TGN Vti1a benötigt (Ganley *et al.*, 2008; Medigeshi *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen wurden am neuronalen System dieser Mäuse durchgeführt. *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Gehirne waren kleiner als die von Wurfgeschwistern. Die Ventrikel waren vergrößert. Starke Defekte waren in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems nachweisbar (Kunwar *et al.*, 2011). Auch in Cortexkulturen wurde eine erhöhte Sekretion lysosomaler Hydrolasen detektiert. Vti1a- und Vti1b-doppeldefiziente, neuronale Zellen wiesen zudem eine verringerte Reaktion auf neurotrophe Faktoren auf (Schöning, Dissertation, 2014).

Interessanterweise können *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen kultiviert werden. Auch in diesen Zellen müssen Vti1a- und Vti1b-abhängige Vesikeltransporte bzw. Membranfusionen aufrecht

erhalten bleiben, weshalb die Vermutung nahelegt, dass ein anderes SNARE-Protein diese Funktionen übernimmt. Dafür kommen vor allem andere Qb-SNAREs in Frage. Darunter fallen Sec20, Gosr2 (Membrin, GS27) und Gosr1 (Gos28, GS28). Intrazellulär überschneidet sich die Lokalisation von Vti1a bzw. Vti1b und die der genannten Qb-SNAREs kaum, da sie an grundsätzlich unterschiedlichen Transportprozessen beteiligt sind (Atlashkin *et al.*, 2003; Jahn und Scheller, 2006; Kloepper *et al.*, 2008; Kunwar *et al.*, 2011). Die orthologen Proteine sind in *S. cerevisiae* nicht in der Lage den Verlust von Vti1p zu kompensieren, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Qb-SNAREs im Säuger als Ersatz für Vti1a und Vti1b dienen könnten, gering. Ein Vergleich der Proteinsequenzen der SNARE-Motive zeigte eine geringe Sequenzidentität der genannten Qb-SNAREs mit Vti1a und Vti1b. Interessanterweise zeigte SNAP (*synaptosomal-associated protein*)-29, ein Mitglied der SNAP-25-Familie, die höchste Ähnlichkeit mit Vti1b (Schöning, Dissertation, 2014). Zu den SNARE-Proteinen der SNAP-25-Familie zählen SNAP-23, SNAP-25, SNAP-29 und SNAP-47. Sie gehören zur Gruppe der Qbc-SNAREs und zeichnen sich durch ein Qb- und ein Qc-SNARE-Motiv aus (Holt *et al.*, 2006).

1.4.4 SNAP-23 und SNAP-25

Auf der Ebene der Aminosäuren ist SNAP-23 zu 59 % identisch mit SNAP-25. Vier Cysteinreste ermöglichen eine Palmitoylierung. In SNAP-25 ist mindestens einer dieser vier Reste palmitoyliert, was die Assoziation mit der Membran erlaubt (Hess *et al.*, 1992). Ravichandran *et al.* (1996) konnten die Expression von SNAP-23 in allen getesteten Geweben (Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Muskel, Niere und Pankreas) nachweisen. SNAP-23 ist in der Lage Syntaxine und VAMPs zu binden. Es ist wahrscheinlich, dass SNAP-23 und SNAP-25 funktionell äquivalent zueinander sind. SNAP-23 ist vermutlich in Transportprozessen zwischen Endosomen und Plasmamembran sowie zwischen Endosomen involviert (Chen und Whiteheart, 1999). Außerdem spielt es im konstitutiv sekretorischen Transportweg eine Rolle (Ravichandran *et al.*, 1996).

SNAP-25 wird fast nur im Gehirn exprimiert und deutlich weniger im Pankreas (Oyler *et al.*, 1989). Es gibt zwei Isoformen, SNAP-25a und SNAP-25b, welche sich im Expressionsmuster während der Gehirnentwicklung unterscheiden (Bark *et al.*, 1995). SNAP-25 kommt in axonalen Wachstumskegeln vor. Eine Inhibition der SNAP-25 Expression verhindert das Neuritenwachstum *in vitro* und *in vivo* (Osen-Sand *et al.*, 1993). Die Proteinlevel im

embryonalen Gehirn sind zunächst niedrig, steigen aber im Laufe der Entwicklung an. Dabei verlagert sich die Lokalisation von den Axonen zu den präsynaptischen Nervenendigungen (Oyler *et al.*, 1991). SNAP-25 ist u.a. für die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran verantwortlich (Söllner *et al.*, 1993; Oyler *et al.*, 1989; Horikawa *et al.*, 1993). Die Transmitterfreisetzung wird durch Botulinum Neurotoxin A gehemmt und geht mit einer selektiven Proteolyse von SNAP-25 einher (Blasi *et al.*, 1993). Im Pankreas wurde es in endokrinen aber nicht in exokrinen Zellen detektiert. SNAP-25 wurde zusammen mit weiteren SNARE-Proteinen in den Inselzellen des Pankreas nachgewiesen. Es fungiert dort in der regulierten Sekretion und der Fusion von *dense core* Vesikeln mit der Plasmamembran. Botulinum Neurotoxin A/E führt auch in diesem Zelltyp zur Proteolyse von SNAP-25 und reduziert die Ca^{2+} -abhängige Freisetzung von Insulin (Oho *et al.*, 1995; Sadoul *et al.*, 1995; Wheeler *et al.*, 1996).

1.4.5 SNAP-29 und SNAP-47

SNAP-29 wurde zunächst als Golgi-SNARE mit 32 kDa identifiziert (GS32). Es wurde gezeigt, dass dieses Protein mit dem Golgi-Apparat assoziiert ist. Es ist kein Syntaxin und gehört in eine Gruppe zusammen mit SNAP-23, SNAP-25 und Sec9p (Wong, 1999). Das 29 kDa große SNAP-29 wurde in Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Skelettmuskel, Milz und Hoden nachgewiesen. SNAP-29 besitzt keine konservierten Cysteinreste für eine Palmitoylierung und keine hydrophoben Aminosäuren, die eine Membranverankerung erlauben. Vermutlich wird eine Membranassoziation über Syntaxine ermöglicht. Eine breite intrazelluläre Verteilung weist darauf hin, dass SNAP-29 an multiplen Transportschritten beteiligt ist (Steggmaier *et al.*, 1998). SNAP-29 bindet Plasmamembran-lokalisierete und intrazelluläre Syntaxine (Hohenstein und Roche, 2001). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass SNAP-29 an der synaptischen Transmission und zwar möglicherweise als ein Regulator der Disassemblierung von neuronalen SNARE-Komplexen, beteiligt ist. Es kompetitiert mit α -SNAP um die Bindung an SNARE-Komplexen und inhibiert damit deren Zerfall, wodurch es nicht zur Auflösung der Komplexe kommen kann und zu einem Abfall der Menge an freien SNARE-Proteinen führt (Su *et al.*, 2001). SNAP-29 ist daher ein negativer Modulator für die Neurotransmitterfreisetzung. Es bewirkt vermutlich eine Verlangsamung des *Recyclings* von SNARE-Komplexen und des Umsatzes synaptischer Vesikel (Pan *et al.*, 2005). Auch bei

immunologischen Vorgängen spielt SNAP-29 eine Rolle. Es ist z.B. für die Phagozytose von *Escherichia coli* wichtig. In den Mastzellen ist SNAP-29 sowohl in zytosolischen als auch in Membranfraktionen nachweisbar. Es spielt beim Abtötungsprozess der Bakterien eine Rolle. Wahrscheinlich reguliert SNAP-29 die Fusion von Phagosomen mit den endozytotischen Kompartimenten und letztlich die Bildung von degradativen Phagolysosomen (Wesolowski *et al.*, 2012). Itakura *et al.* (2012) konnten nachweisen, dass SNAP-29 mit Syntaxin 17 sowie VAMP8 bei der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen interagiert und so die Degradation des eingeschlossenen Materials ermöglicht. Patienten mit einer 1 bp Deletion im SNAP-29 (Chromosom 22q11.2) Gen zeigen das CEDNIK Syndrom mit zerebraler Dysgenese, Neuropathie, Ichthyose und Keratoderma. Diese Deletion führt zu einer verringerten Expression und resultiert in einer anormalen Vesikelreifung und -sekretion (Sprecher *et al.*, 2005).

SNAP-47 ist ein weiteres Protein der SNAP-25 Familie. Es zeichnet sich durch einen besonders langen N-terminalen *stretch* und einen verlängerten *loop* zwischen den beiden SNARE-Motiven aus. Verglichen mit SNAP-23 und SNAP-25 besitzt SNAP-47, analog zu SNAP-29, keine Cysteinreste in der Linkerregion, die die beiden SNARE-Motive verbindet und ist daher nicht palmitoyliert. SNAP-47 wurde in Gehirn, Leber, Niere, Herz, Hoden, Lunge, Skelettmuskel und Milz nachgewiesen. Es hat eine breite, intrazelluläre Verteilung, die synaptische Vesikel und andere intrazelluläre Membranpools einschließt (Holt *et al.*, 2006). Im Gegensatz zur gut erforschten Neurotransmitterfreisetzung, ist die Aufklärung der aktivitätsabhängigen AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) Rezeptor Exozytose während der Langzeit-Potenzierung noch nicht weit fortgeschritten. Jurado *et al.* (2013) wiesen SNAP-47 in einem Komplex mit Syntaxin 3 und Synaptobrevin 2 nach, der für diesen Prozess eine Rolle spielt. Als Interaktionspartner von SNAP-47 wurden VAMP4, VAMP7 und VAMP8 identifiziert. Eine Funktion im frühen, sekretorischen Weg wird vermutet. Es kolokalisiert mit ER/ERGIC Markern sowie mit Markern für späte und *Recycling* Endosomen. SNAP-47 kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor, seine Funktion im Zellkern ist allerdings noch unklar. Eine Interaktion mit dem Zytoskelett wurde ebenso nachgewiesen (Kuster *et al.*, 2015).

2. Zielsetzung

In der eukaryotischen Zelle sind Membranfusionen für den intrazellulären Transport essentiell und werden durch organellspezifische SNARE-Proteine katalysiert (Jahn und Scheller, 2006). So werden endosomale Fusionsvorgänge durch SNARE-Komplexe vermittelt, die u.a. aus Vti1a oder Vti1b bestehen (Brandhorst *et al.*, 2006; Antonin *et al.*, 2000b). Ein KO von Vti1a oder Vti1b ist phänotypisch nahezu unauffällig. Diese Mäuse sind vital und fertil. Dagegen sind Mausembryonen, denen gleichzeitig Vti1a und Vti1b fehlen (DKO), nicht lebensfähig. Sie zeigen deutliche Unterschiede zu ihren Wurfgeschwistern (Kunwar *et al.*, 2011; Schöning, Dissertation, 2014).

Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen den phänotypischen Manifestationen der Vti1a- und Vti1b-doppeldefizienten Mäuse und der molekularen Grundlage näher zu charakterisieren.

Dabei wurde zunächst besonderes Augenmerk auf die Struktur der Organellen gelegt. Vti1b vermittelt die Fusion später Endosomen mit Lysosomen (Pryor *et al.*, 2004), daher sollte untersucht werden, inwieweit ein Verlust von Vti1a und Vti1b einen Einfluss auf lysosomale Transportwege und Strukturen hat.

Weiterhin sollten durch Literaturrecherche *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Mausembryonen mit Tieren verglichen werden, denen bestimmte Signalwegsproteine fehlen. Dabei wurde der Fokus auf die TGF- β -, BMP- und EGF-Signalwege gelegt, da diese für die Knochenentwicklung essentiell sind. Zeigt der Vergleich Übereinstimmungen, so sollten die betroffenen Signalwege näher analysiert werden.

Der KO des homologen SNARE-Proteins Vti1p ist in *S. cerevisiae* letal (Fischer von Mollard *et al.*, 1997), aber *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Säugerzellen können kultiviert und untersucht werden. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass es hier einen funktionellen Ersatz für Vti1a und Vti1b gibt. Aufgrund ihrer Eigenschaften kommen die Qbc-SNAREs SNAP-29 und SNAP-47 in Frage (Kunwar *et al.*, 2011) und sollten daraufhin untersucht werden.

3. Material

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Material	Hersteller
Analysenwaage XA 205	Mettler-Toledo, Giessen
<i>Autoklaven</i>	
Laboklav 160-MSLV-FA	SHP Steriltechnik AG, Detzel
Webeco Automat V	WEBECO, Bremen
Vapour-Line 80-M	VWR, Leuven
Bechergläser 50/100/250 mL	Schott, Mainz
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blot-Papier	Whatman, Dassel
Deckgläser 13 mm Durchmesser	VWR, Leuven
Durchflusszytometer FACScalibur	BD Biosciences, USA
Durchflusszytometer S3e™ Cell Sorter	Bio-Rad, USA
Eismaschine Ziegla B-100	Ziegla Eismaschinen, Isernhagen
<i>Elektrophoresenetzgeräte</i>	
Biometra P25	Biometra, Göttingen
Netzteil 250 V, 0-0,1 A	Elektronische Werkstatt, Bielefeld (Universität)
Power Supply EPS 200	PharmaciaBiotech, Freiburg
SDS-Gelelektrophoresekammern	Bio-Rad, München
Agarosegelelektrophoresekammern	Mechanische Werkstatt, Bielefeld (Universität)
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Falcon® 5 mL Round Bottom	Corning GmbH HQ, USA
Polysterene Tube	
Fujifilm LAS 3000 ECL-Kamera	Fuji, Düsseldorf
Gasbrenner gasprofi 2 SCS	WLD-TEC, Göttingen
<i>Gefriertruhen</i>	
Gefrierschrank Liebherr Premium (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Hera Freeze HFC 586 TOP (-80 °C)	Kendro Laboratory Products, Hanau
MDF C2156 VAN (-150 °C)	Sanyo, Japan
<i>Geldokumentationssystem</i>	
Kamera	PeQLab, Erlangen
Monitor RMB92	Rainbow CCTV Traverse City, USA
Bildaufnahmegerät	Mitsubishi, Ratingen
Transilluminator	PeQLab, Erlangen
Glasflaschen 500/1000 mL	Schott, Mainz
Gaspipetten 5/10/20 mL	Hirschmann EM, Eberstadt
Glaspotter	Wheaton, USA
Heizplatte	Medax, Kiel
Inkubator Hera Cell	Kendro Laboratory products, Hanau
Inkubator	BINDER, Tuttlingen
Kammerdeckgläser	Lab-Tek™ Thermo Fisher Scientific, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
<i>Kühlschränke (4 °C)</i>	
Privileg Oko	Privileg, Fürth

Gerät / Material	Hersteller
Liebherr Premium BioFresh Magnetrührer MR80	Liebherr, Ochsenhausen Heidolph, Nürnberg
<i>Mikroskope</i>	
DM 5000 B	Leica, Solms
DMIL	Leica, Solms
DM IRB	Leica, Solms
LSM 700	Zeiss, Jena
Mikrowelle Intellowave	LG, Korea
Mikrowelle	Siemens, München
Mikrotom	Jung Ag, Heidelberg
Millipore Destillationsanlage	Millipore Synergy UV, USA
Nanodrop ND-1000	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Objektträger 76x26x1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Omnifix Injektionsspritzen	B. Braun, Melsungen
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, USA
Pasteur-Pipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Meter Seven Multi	Mettler Toledo, Gießen
Pipetboyacu-Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences AG, Schweiz
Pipetten Pipetman	Gilson, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plastikröhrchen 15/50 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Plastik-Pipetten 5/10/25 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg Ideal Tek Switzerland, Schweiz
Präzisionswaage Pioneer	Ohaus, Schweiz
Precellys® 24	PeQlab, Erlangen
Protran Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel
Reagenzgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße 0,5/1,5/2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Rotilabo®-Spritzensterilfilter (Porengröße: 0,22 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Schikanekolben (diverse Größen)	VWR, Darmstadt
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, USA
Stereolupe	Deitenbach, Iserlohn
sterile Werkbank Hera Safe HS12	Kendro Laboratory products, Hanau
Tecan Infinite M200	Tecan, Schweiz
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Osterode
Ultrazentrifuge Optima™	Beckman Coulter, USA
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, USA
Vakuumpumpe Laboport KNF	Neuberger, Freiburg
Vortex Genie II	Scientific Industries, USA
Wägeschälchen	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Wasserbäder</i>	
Paratherm U4 electronic	Julabo, Seelbach
Thermostat 2761	Eppendorf, Hamburg
WB	Memmert, Schwabach
Wasserstrahlpumpe	Mechanische Werkstatt, Universität Bielefeld
Western Blot-Kammern (Semidry)	Mechanische Werkstatt, Universität Bielefeld

Gerät / Material	Hersteller
Western Blot-Kammern (Wet)	Bio-Rad, USA
Zellkulturflasche 25/75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 4/6/24/48/96 well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 100/150 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Zentrifugen</i>	
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC 3B	Sorvall, Bad Homburg
RC 5B Plus	Sorvall, Bad Homburg
<i>Zentrifugenrotoren</i>	
A-4-44	Eppendorf, Hamburg
A-4-62	Eppendorf, Hamburg
F-34-6-38	Eppendorf, Hamburg
F45-6-38	Eppendorf, Hamburg
GS-3	Sorvall, Bad Homburg

3.2 Chemikalien

Chemikalien werden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Meckenheim) und VWR (Darmstadt) in dem Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen. Tabellierte Chemikalien sind von den dort genannten Anbietern.

Name	Hersteller
Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
5-Fluororotsäure (5-FOA)	Thermo Fisher Scientific, USA
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, USA
Polyethylenimin MW 40000	Polysciences, Inc., USA
Rapamycin	Biomol, Hamburg
Ziegenserum	PAA, Cölbe

3.3 Enzyme, Nukleotide und Standards

Name	Hersteller
BIOTAQ™ DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	PeQLab, Erlangen
Dispase II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oligo (dT) 15 Primer	Promega, Mannheim
Precision Plus Protein™ All Blue Standard	Bio-Rad, USA
Precision Plus Protein™ Unstained	Bio-Rad, USA
Q5®High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Quick-Load® Purple 1 kb DNA ladder	New England Biolabs, Frankfurt
Quick-Load® Purple 100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen (und entsprechende Puffer)	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNA Ligase (T4 Ligase) (inklusive entsprechende Puffer 10x T4 DNA Ligase mit 10 mM ATP)	New England Biolabs, Frankfurt
T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK)	New England Biolabs, Frankfurt
T7 Endonuklease I	New England Biolabs, Frankfurt
Zymolyase 20T	Seikagaku Biobusiness, Japan

3.4 Wachstumsfaktoren

Name	Hersteller
BMP-2	Peprotech, Hamburg
BMP-4	Peprotech, Hamburg
BMP-7	Peprotech, Hamburg
EGF	Peprotech, Hamburg
TGF-β1	Peprotech, Hamburg
TGF-β2	Peprotech, Hamburg

3.5 Antikörper

3.5.1 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung		Hersteller
		Western Blot	Immunfluoreszenz	
Aktin	Maus	1:1000	----	C. Wiegand
Cleaved Caspase III (9661)	Kaninchen	----	1:100	Cell signaling
Collagen II (CIIC1)	Maus	----	1:50	DSHB
EEA1 (3288)	Kaninchen	----	1:100	Cell signaling
EGFR (sc-03)	Kaninchen	1:500	----	Santa Cruz Biotechnology
Erk1/2 (9101)	Kaninchen	1:1000		Cell signaling
GAPDH (sc-25778)	Kaninchen	1:1000	----	Santa Cruz Biotechnology
GM130 (610822)	Maus	----	1:400	BD Transduction Laboratories
Hsp70	Maus	1:1000	----	C. Wiegand
Lamin B2 (ab151735)	Kaninchen	1:1000	----	Abcam
LAMP-1 (sc-19992)	Ratte	----	1:200	Santa Cruz Biotechnology
LIMP-2	Kaninchen	----	1:400	Pineda
Osteocalcin (orb77248)	Kaninchen	----	1:100	Biorbyt
pErk1/2 (4695)	Kaninchen	1:1000	----	Cell signaling
Smad1 (6944)	Kaninchen	1:1000	1:400	Cell signaling
Smad2 (5339)	Kaninchen	1:1000	1:400	Cell signaling
Smad3 (9523)	Kaninchen	1:1000	1:100 (Histologie)	Cell signaling
Smad1/5/9P (13820)	Kaninchen	1:1000	----	Cell signaling
Smad2P (3108)	Kaninchen	1:1000	----	Cell signaling
SNAP-23	Kaninchen	1:1000	----	R. Jahn
SNAP-25 (111002)	Kaninchen	1:500	----	Synaptic Systems
SNAP-29	Kaninchen	1:1000	----	R. Jahn
SNAP-47	Kaninchen	1:1000	----	R. Jahn
TGF-βRII-Phycoerythrin (FAB532P)	Ziege	gebrauchsfertig für die Durchflusszytometrie		R&D Systems
V-ATPase 60 kDa Untereinheit (60 K, A-6427)	Maus	1:1000	----	Invitrogen
Vti1a (165005)	Meerschweinchen		1:400	Synaptic Systems
Vti1b	Kaninchen		1:400	R. Jahn
Vti1p	Kaninchen	1:3000	----	G. Fischer von Mollard

3.5.2 Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung		Hersteller
		Western Blot	Immunfluoreszenz	
Kaninchen Cy2	Ziege	----	1:400	Dianova
Kaninchen Cy3	Ziege	----	1:400	Dianova
Kaninchen 649	Ziege	----	1:400	Dianova
Kaninchen HRP	Ziege	1:1000	----	Dianova
Maus Cy2	Ziege	----	1:400	Dianova
Maus Cy3	Ziege	----	1:400	Dianova
Maus HRP	Ziege	1:1000	----	Dianova
Meerschweinchen Cy3	Ziege	----	1:400	Dianova
Ratte Cy2	Ziege	----	1:400	Dianova

3.6 Plasmide

Name	Beschreibung	Selektion	Referenz
pC4-pQCXIP	Reporterkonstrukt	Ampicillin Puromycin	Gordon <i>et al.</i> , 2010
pEGFP-C1	Säugerexpressionsvektor für Fusionsproteine mit N-terminalem EGFP	Kanamycin Neomycin	Clontech
pFvM28	Vti1p in pRS314 (<i>XhoI/SacI</i>)	Ampicillin TRP1	Gabriele Fischer von Mollard
pFvM29	Hefeexpressionsvektor, CEN-Plasmid Vti1p in pRS316 (<i>XhoI/SacI</i>)	Ampicillin URA3	Gabriele Fischer von Mollard
pGEM [®] -T Easy	Klonierungsvektor	Ampicillin LacZ	Promega
pLIH2	SNAP-23 in pYX242 (<i>NcoI/HindIII</i>)	Ampicillin LEU2	Lisa Hüttemann
pLIH5	SNAP-47 in pYX242 (<i>NcoI/HindIII</i>)	Ampicillin LEU2	Lisa Hüttemann
pLK4	SNAP-47 <i>knockout</i> , Exon 2, Oligos: 5'CACCGAGCTGAACCAGTGCTTGGTC3' 5'AAACGACCAAGCACTGGTTCAGCTC3' (RF3) kloniert in pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) mit <i>BbsI</i>	Ampicillin Puromycin	Lennard Karsten
pMSSVLT	SV40 Fragment mit großen T- und kleinen T-Genen	Ampicillin Kanamycin G418	Sascha Browski (IMT Marburg, R. Müller)
pMW2	SNAP-29 in pET28b (<i>NdeI/EcoRI</i>)	Kanamycin	Michael Weiland

Name	Beschreibung	Selektion	Referenz
pRNAT-U6.3/Hygro	shRNA-Expressionsvektor	Ampicillin Hygromycin	Genscript
pRS314	Hefeexpressionsvektor, CEN-Plasmid	Ampicillin TRP1	Sikorski und Hieter, 1989
pSIS2	SNAP-29 in pYX242 (<i>NcoI/HindIII</i>)	Ampicillin LEU2	diese Arbeit
pSIS4	PCR amplifiziertes SNAP-25 (<i>Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}</i> Mausehirn cDNA) kloniert in pGEM [®] -T Easy	Ampicillin	diese Arbeit
pSIS5	SNAP-25 in pYX242 (<i>NcoI/SalI</i>)	Ampicillin LEU2	diese Arbeit
pSIS6	PCR amplifiziertes Sec9 (genomische DNA von Hefestamm SEY6210) kloniert in pGEM [®] -T Easy	Ampicillin	diese Arbeit
pSIS7	Sec9 in pYX242 (<i>NcoI/HindIII</i>)	Ampicillin LEU2	diese Arbeit
pSIS8	SNAP-29 <i>knockout</i> (CRISPR-Cas9), Exon 1, Oligos: 5'CACCGGCCCCGACGCGCCATTGAC3' 5'AAACGTCAATGGGCGCGTCGGGGCC3' (RF2) kloniert in pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) mit <i>BbsI</i>	Ampicillin Puromycin	diese Arbeit
pSIS11	SNAP-47 <i>knockout</i> , Exon 1, Oligos: 5'CACCGACTGCAGCCTAGTCGAAATG3' 5'AAACCATTTCGACTAGGCTGCAGTC3' (RF1.2) kloniert in pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) mit <i>BbsI</i>	Ampicillin Puromycin	diese Arbeit
pSIS12	SNAP-47 <i>knockdown</i> (Sequenz aus Jurado <i>et al.</i> , 2013), kloniert in pRNAT-U6.3/Hygro (<i>BamHI</i> and <i>HindIII</i>)	Ampicillin Hygromycin	diese Arbeit
pSIS15	SNAP-29 <i>knockout</i> , Exon 1, Oligos: 5'CACCGGCGGACGTCCTTCCACGGCG3' 5'AAACCGCCGTGGAAGGACGTCCGCC3' (RF3) kloniert in pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462, Nickase) mit <i>BbsI</i>	Ampicillin Puromycin	diese Arbeit
pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462)	Cas9n (D10A-Mutation, Nickase) von <i>S. pyogenes</i> zur Generierung von CRISPR- <i>Guides</i>	Ampicillin Puromycin	Addgene
pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459)	Cas9 (Nuklease) von <i>S. pyogenes</i> zur Generierung von CRISPR- <i>Guides</i>	Ampicillin Puromycin	Addgene
pYX242	Hefeexpressionsvektor, 2 μ -Plasmid	Ampicillin LEU2	R&D

3.7 Oligonukleotide

Genotypisierung

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung	Projekt
AK32	CCTGCGTGCAATCCATCTTG	Genotypisierung
ASalC	ATGAACTGTCTGCTAAAATTTAAC	Genotypisierung
5n	CAACTCTTCTGTGATTTCTGTACC	Genotypisierung
50n	TGAGGGATCCAATACCTTCTCC	Genotypisierung
Xho	GCAAATAAGCTCCCAATTGTCTC	Genotypisierung

knockdown/knockout

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung	Projekt
S47KDJarudoF	GATCCCATAGCAATAGAATCAGCAGAGC TTGATATCCGGCTCTGCTGATTCTATTGCT ATTTTTTCCAAA	SNAP-47 <i>knockdown</i>
S47KDJarudoR	AGTTTTTGAAAAAATAGCAATAGAATC AGCAGAGCCGGATATCAAGCTCTGCTGAT TCTATTGCTATGG	SNAP-47 <i>knockdown</i>
pRNA-U6 Forward	TACGATACAAGGCTGTTAGAGAG	SNAP-47 <i>knockdown</i>
pRNA Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	SNAP-47 <i>knockdown</i>
pSpCas9n 2A Puro PX462 Seq F	GAGGGCCTATTTCCCATGAT	CRISPR Cas9
SN29 KO Exon1 F2	CACCGGCCCGACGCGCCCATGAC	CRISPR Cas9
SN29 KO Exon1 R2	AAACGTCAATGGGCGCGTCGGGGCC	CRISPR Cas9
SN47 KO Exon1 F1.2	CACCGACTGCAGCCTAGTCGAAATG	CRISPR Cas9
SN47 KO Exon1 R1.2	AAACCATTTGACTAGGCTGCAGTC	CRISPR Cas9
Surveyor SN47 KO Ex2 F1.2 u 3	CATTGCAGGCTCATCTGCC	CRISPR Cas9
Surveyor SN47 KO Ex2 R1.2 u 3	GGGCGCTCTGAATCAGTCAC	CRISPR Cas9
SN47 KO Exon2 F3	CACCGAGCTGAACCAGTGCTTGGTC	CRISPR Cas9
SN47 KO Exon2 R3	AAACGACCAAGCACTGGTTCAGCTC	CRISPR Cas9
SN29 KO Exon1 F3	CACCGCGGACGTCCTTCCACGGCG	CRISPR Cas9
SN29 KO Exon1 R3	AAACCGCCGTGGAAGGACGTCCGCC	CRISPR Cas9
Surveyor SN29 KO Ex1 F2 u 3.1	GCAGTGCTGGCGGAAGTAGTG	CRISPR Cas9
Surveyor SN29 KO Ex1 R2 u 3	TTTCTGAGCAGGAGCCCAG	CRISPR Cas9

Hefe-Wachstumstests

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung	Projekt
Sec9 pYX NcoI	ACCATGGGATTAAGAAATTTTTAAGATTAAG	Sec9 in pYX242
Sec9 pYX HindIII	AAAGCTTCTATCTGATACCTGCCAACCTGTTG	Sec9 in pYX242
SNAP47 pYX NcoI F	ACCATGGGAATGAGTTCTGATATGCGTGTCCA CTC	SN47 in pYX242
SNAP47 pYX HindIII R	TAAGTCTTACATCAGCTTTCTCATACGCCGG	SN47 in pYX242
SNAP47 YXSeq F	CTTGTGAGCCCTTTGGAA	SN47 in pYX242
SNAP47 YX Seq R	TCTCAGAAATAATAGCAG	SN47 in pYX242
SNAP23 pYX NcoI F	ACCATGGATAATCTGTCCCCAGAGGA	SN23 in pYX242
SNAP23 pYX HindIII R	TAAGCTTAATCAATGAGTTTCTTTGCTC	SN23 in pYX242
SNAP25 pYX NcoI F	ACCATGGCCGAAGACGCAGACATGCG	SN25 in pYX242
SNAP25 pYX Sall R	TGTCGACTTAACCACTTCCAGCATCTTTGTTG	SN25 in pYX242

Signalwege

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung	Projekt
TGFBR2 PCR 2F	CTGCAATGCTGTGGGAGAAGTG	Signalwege
TGFBR2 PCR 2R	CTCGGTCAAAGTCTCACACACG	Signalwege
TGFBR1 R	CGTTCATGGTTCCGAGAGGCA	Signalwege
TGFBR1FSeqF	GCGTCGAGCAATTTCCAGAAC	Signalwege
Smad2 PCR F	GGAGAGACCTTCCATGCGTCAC	Signalwege
Smad2 PCR R	CGGGTTAGCTGATAAACGGCTTC	Signalwege
Smad3 PCR 2 F	GAGAACACTAACTTCCCTGCTGGC	Signalwege
Smad3 PCR 2 R	CATCGGATTCGGGGAGAGGTTTG	Signalwege
Smad4 SeqF3 PCR F	CTACCTGGACAGAGAAGCTGGC	Signalwege
Smad4 SeqR3 PCR R	GGTGTGCAGGACTTCATCCAAG	Signalwege
GAPDH RTf	AATGGGGTGAGGCCGGTGCT	Signalwege
GAPDH RTr	CACCCTCAAGTGGGCCCCCG	Signalwege
BmpR1a PCR F	GGAAGTTGCTGTATTGCTGACCTG	Signalwege
BmpR1a PCR R	CAACCTCACGCATGTCCTCATAG	Signalwege
BmpR2 PCR F	GAGGCTAACTGGAAATCGGCTG	Signalwege
BmpR2 PCR R	GGGATGGTTTCCAACTTCTGTCTG	Signalwege
Smad1 PCR F	GATCCGTCCAACAATAAGAACCGC	Signalwege
Smad1 PCR R	GCTGAGCAAACCTCTTGTTGTTG	Signalwege
Smad5 PCR F	GATTCCTCAGACCATGCCAGC	Signalwege

3.8 Kits

Name	Hersteller
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena, Jena
innuPREP Plasmid MIDI Direct Kit	Analytik Jena, Jena
innuPREP Plasmid Mini Kit Plus	Analytik Jena, Jena
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
pGEM [®] -T Easy Vector Systems	Promega, Mannheim
Roti [®] -Quant Bradford Protein Assay	Roth, Kalsruhe
SuperSignal [®] West Femto Trial Kit	Thermo Scientific, USA
SuperSignal [®] West Pico Chemilumineszenz Reagenz	Thermo Scientific, USA
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Zyppy [™] Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, USA

3.9 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -	Gibco, Erlangen

3.10 Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
E3T	Mausembryonale Fibroblasten, T-immortal, BL6 Vti1b/Vti1a, <i>Vti1a</i> ^{+/-} <i>Vti1b</i> ^{+/-}	Christiane Wiegand Simone Schmücker
E4T	Mausembryonale Fibroblasten, T-immortal, BL6 Vti1b/Vti1a, <i>Vti1a</i> ^{-/-} <i>Vti1b</i> ^{-/-}	Christiane Wiegand Simone Schmücker
E3P	Mausembryonale Fibroblasten, P-immortal, BL6 Vti1b/Vti1a, <i>Vti1a</i> ^{+/-} <i>Vti1b</i> ^{+/-}	Christiane Wiegand Simone Schmücker
E5P	Mausembryonale Fibroblasten, P-immortal, BL6 Vti1b/Vti1a, <i>Vti1a</i> ^{-/-} <i>Vti1b</i> ^{-/-}	Christiane Wiegand Simone Schmücker
E1P	Mausembryonale Fibroblasten, P-immortal, BL6 Vti1b/Vti1a, <i>Vti1a</i> ^{+/-} <i>Vti1b</i> ^{+/-}	Christiane Wiegand Simone Schmücker
E7P	Mausembryonale Fibroblasten, P-immortal, BL6 Vti1b/Vti1a, <i>Vti1a</i> ^{-/-} <i>Vti1b</i> ^{-/-}	Christiane Wiegand Simone Schmücker
Neuro-2a (N2a)	Murine Neuroblastoma-Zelllinie	DSMZ Roland Seibt

3.11 Mauslinien

Bezeichnung	Genotyp	Hintergrund	Referenz
BL6 Vti1b/Vti1a	<i>Vti1a</i> ^{+/-} <i>Vti1b</i> ^{+/-} <i>Vti1a</i> ^{+/-} <i>Vti1b</i> ^{-/-} <i>Vti1a</i> ^{-/-} <i>Vti1b</i> ^{+/-} <i>Vti1a</i> ^{-/-} <i>Vti1b</i> ^{+/+} <i>Vti1a</i> ^{-/-} <i>Vti1b</i> ^{-/-} <i>Vti1a</i> ^{+/+} <i>Vti1b</i> ^{+/+}	C57BL/6J (durch Rückkreuzung)	Gabriele Fischer von Mollard

3.12 Hefestämme

Name	Paarungstyp	Genotyp	Referenz
FvMY6	MAT α	Δ vti1::HIS3 ura3-52 trp1- Δ 901 ade2-101 lys2-801 suc2- Δ 9 mel-	Gabriele Fischer von Mollard
FvMY21	MAT α	leu2-3,112 ura3-52 his3- Δ 200 ade2-101 trp1- Δ 901 vti1-11	Gabriele Fischer von Mollard
FvMY24	MAT α	leu2-3,112 ura3-52 his3- Δ 200 ade2-101 trp1- Δ 901 vti1-2	Gabriele Fischer von Mollard
SEY6211	MAT α	leu2-3,112 ura3-52 his3- Δ 200 ade2-101 trp1- Δ 901 suc2- Δ 9 mel-	Scott Emr

3.13 Software

Name	Anwendung
Adobe Photoshop CS3	Bildbearbeitung
Adobe Acrobat X Pro	PDF-Dateien öffnen/bearbeiten
Aida 4.06.117	Western Blot, Bildbearbeitung
BD CellQuest™ Pro	Durchflusszytometrie Software
Bio-Rad ProSort™	Durchflusszytometrie Software
Citavi 5.7.0.0	Literaturverwaltung
Ecapt 15.01	Geldokumentationssystem Software
Graph Pad Prism 8	statistische Auswertung
Image J/Fiji	Bildbearbeitung
Image Reader LAS-3000 Version 2.1	ECL-Kamera Software
LAS AF 1.8.0 build 1346	Fluoreszenzmikroskop Software
Leica IM1000	Fluoreszenzmikroskop Software
ND-1000 V3.8.1	NanoDrop® Software
Office 2007	diverses (u.a. Textverarbeitung)
SnapGene® Viewer	Bearbeitung von DNA Sequenzen
Tecan i-control 1.11	Tecan Software
ZEISS ZEN (blue/black edition)	LSM700 Software

3.14 Internetdienste

Adresse	Anwendung
http://crispr.mit.edu/	CRISPR Design
https://scf.cebitec.uni-bielefeld.de/	DNA-Sequenzierung durch SCF Cebitec
https://www.gatc-biotech.com/de/index.html	DNA-Sequenzierung durch GATC Biotech
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/	Literaturrecherche
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Sequenzvergleich
https://www.ensembl.org/index.html	Datenbank
http://www.uniprot.org/	Datenbank

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wird in flüssigem LB-Medium bzw. auf LB-Agar für 12 bis 16 h bei 37 °C kultiviert.

LB-Medium (1 L)

NaCl	5 g
Glukose	1 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g

Das LB-Medium wird autoklaviert, bevor entsprechende Antibiotika, wie z.B. Ampicillin (100 µg/mL) oder Kanamycin (50 µg/mL) hinzugegeben werden. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C. Durch Zugabe von 7 g Agar-Agar können entsprechende Agar-Platten hergestellt werden.

4.1.2 Kryokonservierung von *E. coli*

Bakterienmaterial wird von einer frisch bewachsenen Agar-Platte entnommen und in 1 mL kaltem Dimethylsulfoxid (DMSO, 7%) resuspendiert. Die Zellen werden bei -80 °C eingelagert.

4.1.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation beschreibt einen Vorgang, bei dem Bakterien gezielt DNA aufnehmen. Dieser Prozess kann z.B. durch einen Stromstoß (Elektroporation) induziert werden. Hierdurch kommt es in der bakteriellen Membran zu einer Bildung von Poren, wodurch die DNA in die Zelle gelangt. Nicht vorbehandelte *E. coli* würden bei diesem Prozess keine DNA aufnehmen, daher müssen zunächst kompetente Zellen hergestellt werden, welche diese Fähigkeit besitzen.

4.1.3.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

Aus einer *E. coli* Übernachtskultur werden 4 L Hauptkultur hergestellt und bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Die Kultur wird anschließend auf 4 °C abgekühlt und für 20 bis 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Pellets werden in je 1,5 L kaltem Millipore-H₂O aufgenommen und anschließend erneut bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert (4 °C). Die Zellen werden in 750 mL kaltem Millipore-H₂O resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wird wiederholt. Das Bakterienpellet wird in 80 mL kaltem sterilen 10 %igen Glycerol (in Wasser) aufgenommen und mit 6000 rpm 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die entstandenen Pellets werden in insgesamt 8 mL kaltem sterilen 10 %igen Glycerol resuspendiert und in je 40 µL aliquotiert. Die kompetenten Zellen werden mittels Trockeneis oder flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.1.3.2 Elektroporation von *E. coli*

Elektrokompente *E. coli* werden in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt. 1 bis 2 µL des zu transformierenden Ligationsansatzes werden zu den Zellen pipettiert. Die Elektroporation wird durch einen 1800 V starken Stromstoß ausgeführt. Anschließend werden die *E. coli* zur Regeneration in 37 °C warmes SOC-Medium aufgenommen und in diesem für 20 bis 40 min inkubiert, bis sie auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert werden können.

SOC-Medium (100 mL)

NaCl	60,0 mg
Trypton	2,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
KCl	19,0 mg
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,2 g

4.1.4 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung plasmidischer DNA aus Bakterienkulturen werden verschiedene Kits verwendet. Das Prinzip dieser Kits beruht darauf, dass die Zellen zunächst lysiert werden, so dass sowohl genomische, als auch plasmidische DNA, freigesetzt werden. Die Neutralisierung des Ansatzes renaturiert die plasmidische DNA während die genomische DNA ausfällt und durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA abgetrennt werden kann. Der Überstand wird auf

eine Silica-Säule gegeben. In Anwesenheit von chaotropen Salzen bindet Plasmid-DNA am Säulenmaterial. Nach unterschiedlichen Waschschrinen kann diese unter Niedrigsalzbedingungen eluiert werden. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben der Kits.

4.1.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wird mittels NanoDrop® ND-1000 Photometer spektralphotometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine OD_{260} von 1 ungefähr 50 µg/mL doppelsträngiger (ds) DNA bzw. 40 µg/mL dsRNA. Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure und berücksichtigt die Verunreinigung durch Proteine, die ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen und sollte im Idealfall für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen.

4.1.6 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidabfolge plasmidischer DNA wird diese entweder im *Center for Biotechnology* der Universität Bielefeld durch die *Sequencing Core Facility* oder extern durch die GATC Biotech sequenziert.

4.1.7 Agarosegelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese können DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Als Trennmaterial dient das Polysaccharid Agarose, welches je nach gewünschter Trennschärfe, in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden kann. Das negativ-geladene Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren ermöglicht die Trennung innerhalb eines elektrischen Feldes bei ca. 80 bis 100 mA. Zur Detektion wird Ethidiumbromid eingesetzt, welches in die DNA interkalieren kann. Die zu trennenden Proben werden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Dieser beschwert die Probe durch Saccharose und ermöglicht die Beurteilung des Elektrophorese-Fortschritts durch Bromphenolblau und/oder Xylencyanol. Zur Größenbestimmung werden DNA-Standards (siehe 3.3) verwendet. Das Ergebnis der Elektrophorese wird an einem entsprechenden Geldokumentationssystem aufgenommen.

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA, 1L)

TRIS	242 g
Na ₂ EDTA (Titriplex III)	37 g
Eisessig	57 mL

mit Millipore-H₂O auf 1 L auffüllen. Der 50x TAE-Puffer wird vor Verwendung auf 1x TAE verdünnt.

6x DNA-Ladepuffer (10 mL)

Bromphenolblau	15 mg
Xylencyanol	15 mg
Saccharose	4 g

in 10 mL 1x TAE-Puffer lösen und bei Raumtemperatur lagern.

4.1.8 PCR

Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wird durch ein wiederholt ablaufendes Temperaturschema ermöglicht. Dieses besteht im Wesentlichen aus drei Teilschritten. Im ersten Schritt (Denaturierung) werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen aufgelöst, so dass linearisierte DNA-Einzelstränge vorliegen. Das *Annealing* ermöglicht im zweiten Schritt die Hybridisierung spezifischer Primerpaare an sequenzkomplementäre Bereiche der Einzelstränge. Während der Elongation, dem letzten Schritt der PCR, verlängern hitzestabile DNA-Polymerasen die angelagerten Primer zu doppelsträngigen Bereichen. Über Formel (1) kann die ungefähre Schmelztemperatur T_m eines Primers bestimmt und gleichzeitig die Hybridisierungstemperatur abgeschätzt werden. Die Variablen G, C, A und T stehen für die im Primer enthaltenen Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin.

$$T_m = (4 \text{ °C} \times [G+C]) + (2 \text{ °C} \times [A+T]) \quad (1)$$

PCR-Produkte werden mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 4.1.7) aufgetrennt.

Ansatz mit *Taq*-Polymerase (20 µL)

10x NH ₄ -Puffer	2,0 µL
MgCl ₂	1,5 µL
dNTPs	0,4 µL
<i>forward</i> Primer	0,5 µL
<i>reverse</i> Primer	0,5 µL
<i>Taq</i>	0,1 µL
DNA	1,0 µL
Millipore-H ₂ O	14,0 µL

Ansatz mit Q5-Polymerase (25 µL)

5x Q5-Puffer	5,00 µL
dNTPs	0,50 µL
<i>forward</i> Primer	1,25 µL
<i>reverse</i> Primer	1,25 µL
Q5	0,25 µL
DNA	1,00 µL
Millipore-H ₂ O	15,75 µL

Allgemeines Temperaturprofil

95 °C / 98 °C 3 min initiale Denaturierung (*Taq* / Q5)

95 °C / 98 °C 30 s Denaturierung

T °C 30 s Annealing (Temperatur abhängig von der Primerlänge)

72 °C 30 s/500 bp Elongation (Zeit abhängig vom *template*)

72 °C 5 min finale Elongation

} 30 – 35 Zyklen

4.1.9 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Identifikation von Bakterienkolonien, die die gewünschte Plasmid-DNA enthalten. Dazu werden die zu testenden Kolonien mit einem Zahnstocher abgenommen und in den PCR-Ansatz (Ansatz mit *Taq*-Polymerase), an Stelle von DNA, überführt. Gleichzeitig werden die so analysierten Klone auf LB-Agar mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen („Sicherheitsplatte“). Die PCR wird durchgeführt und die Produkte werden im Agarosegel elektrophoretisch getrennt und ausgewertet.

4.1.10 A/T-Klonierung

Mit Hilfe der A/T-Klonierung können PCR-Produkte in den Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy eingefügt werden. Dieses Plasmid liegt in linearisierter Form vor und weist einen 3' Thymin (T)-Überhang an beiden Enden auf. Mit Hilfe der *Taq*-Polymerase werden 3'Adenin (A)-Überhänge an das entsprechende PCR-Produkt angefügt und ermöglichen so dessen Ligation mit dem pGEM[®]-T Easy -Vektor.

A-Tailing

10x NH ₄ -Puffer	1,2 µL
MgCl ₂	0,9 µL
dNTPs	0,3 µL
<i>Taq</i>	0,1 µL
PCR-Produkt	10,0 µL

Der Ansatz wird im Thermocycler für 20 min bei 72 °C inkubiert.

pGEM[®]-T Easy Ligation

2x Ligasepuffer	5,0 µL
PCR-Produkt	3,5 µL
pGEM [®] -T Easy	0,5 µL
T4 Ligase	1,0 µL

Die Inkubation erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C im Wasserbad.

4.1.11 Blau-/weiß-Selektion

Einige Vektoren, wie z.B. pGEM[®]-T Easy, haben zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung die Sequenz für die β -Galaktosidase (*lacZ*). Dieses Enzym spaltet das dem Nähragar zugesetzte, zunächst farblose X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galaktose und einem Indoxyl-Derivat, welches unter Luftsauerstoff zu einem Indigofarbstoff oxidiert. Durch diese Reaktion färbt sich die entsprechende Bakterienkolonie blau. War die Klonierung erfolgreich, so wird die kodierende Sequenz des *lacZ*-Gens unterbrochen und die Expression der β -Galactosidase ist nicht mehr möglich. Die betroffene Bakterienkolonie verbleibt weiß. Für diesen Nachweis muss dem Nähragar, neben dem X-Gal, IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) als Induktor des *lac*-Operons zugesetzt werden.

4.1.12 Analytische und präparative Restriktion

Restriktionsendonukleasen Typ II schneiden die Phosphodiesterbindung der DNA in ihrer palindromischen Erkennungssequenz. Dabei können sowohl klebrige Enden (*sticky ends*) mit 3' oder 5' Überhang als auch glatte Enden (*blunt ends*) entstehen.

Analytische Restriktion

10x Enzympuffer	1,0 µL
Restriktionsenzym A	0,1 µL
Restriktionsenzym B	0,1 µL
DNA	0,5 µg

mit Millipore-H₂O auf 10 µL auffüllen. Der Restriktionsansatz wird 1 h bei der enzymespezifischen Temperatur inkubiert.

Präparative Restriktion

10x Enzympuffer	6,0 µL
Restriktionsenzym A	1,0 µL
Restriktionsenzym B	1,0 µL
DNA	10,0 µg

mit Millipore-H₂O auf 60 µL auffüllen und für 2 bis 3 h bei der enzymespezifischen Temperatur inkubieren.

4.1.13 Gelextraktion

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird das innuPREP DOUBLEpure Kit von Analytik Jena (siehe 3.8) verwendet, welches die DNA von ausgeschnittenen Agarosegelresten befreit und gleichzeitig reinigt.

4.1.14 Ligation

Ligasen verknüpfen DNA-Fragmente durch Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'OH- und 5'Phosphat-Ende einer DNA.

Ansatz

10x Ligasepuffer	1,5 µL
Vektor-DNA	0,5 µL
Insert-DNA	12,0 µL
T4 Ligase	1,0 µL

mit Millipore-H₂O auf 15 µL auffüllen. Ligationsansätze inkubieren über Nacht bei 16 °C im Wasserbad.

4.1.15 Genotypisierung

Der Nachweis des Vti1a und Vti1b Genotyps von Mäusen bzw. Mausembryonen ist PCR-basiert. Hierfür werden den Tieren Gewebeproben (Ohrlochstanzen oder Schwanzspitzen) entnommen und über Nacht bei 55 °C im Lysepuffer bei 500 rpm inkubiert. Die im Puffer enthaltene Proteinase K wird durch anschließendes Erhitzen der Proben auf 95 °C für 5 bis 10 min inaktiviert. Die Proben werden für 10 min bei 13000 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert, der Überstand enthält die DNA und kann für die Diagnostik-PCR verwendet werden.

Lysepuffer (200 mL)

4 M NaCl	10,0 mL (200 mM)
1 M Tris pH 8	4,0 mL (20 mM)
0,5 M EDTA pH 8	2,0 mL (5 mM)
25 % Tween-20	0,2 mL (0,02 %)

in 200 mL Millipore-H₂O lösen. Proteinase K wird vor Gebrauch in einer Konzentration von 0,5 mg/mL hinzugefügt. Die Lagerung des Puffers erfolgt bei -20 °C.

Ansatz

Millipore-H ₂ O	11,00 µL
MgCl ₂	1,10 µL
10x NH ₄ Reaktionspuffer	1,50 µL
dNTPs	0,30 µL
je Primer	0,38 µL
Vti1a Primer	Ak32, Asalc, Xho
Vti1b Primer	Ak32, Seq5n, Seq50n
Taq-Polymerase	0,08 µL

vom Mastermix werden 14 µL in ein PCR-Gefäß vorgelegt und 1 µL des Probenüberstands werden hinzugefügt. Nach erfolgter PCR (Temperaturprofil siehe 4.1.8) werden die Produkte in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt.

4.1.16 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben, um diese z.B. als *template* in einer PCR einsetzen zu können. cDNA bietet den Vorteil, dass sie deutlich stabiler ist als mRNA. Für die Synthese von cDNA aus Zellkulturzellen werden diese zunächst ausgesät und beim Erreichen der gewünschten Konfluenz vom Schalenboden abgeschabt. Mittels innuPREP RNA Mini Kit (siehe 3.8) wird die RNA aus den Zellen, ähnlich der DNA-Isolation, gewonnen. Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgt durch das Omniscript RT Kit (3.8).

Ansatz

RNA	2,0 µg
10x Puffer RT	2,0 µL
dNTP Mix	2,0 µL
Oligo-dT-Primer	2,0 µL
RNasin®	1,0 µL
Omniscript Reverse Transkriptase	1,0 µL

mit RNase-freiem H₂O auf 20 µL auffüllen und für 1 h bei 37 °C inkubieren. Die cDNA kann bei -20 °C gelagert werden.

4.1.17 CRISPR-Cas9(n)

Mittels CRISPR-Cas9(n) können gezielt genomische Modifikationen eingefügt werden. Für dieses System muss zunächst ein entsprechender Vektor hergestellt werden, der neben der Cas9(n)-Sequenz, auch die Nukleotidabfolge für entsprechende *guides* trägt. Dieser wird in die Zellen transfiziert, die genomisch modifiziert werden sollen.

4.1.17.1 Herstellung des Vektors

Die Herstellung eines CRISPR-Cas9(n) Vektors beginnt mit der Hybridisierung und Phosphorylierung der entsprechenden Oligonukleotide (Oligo), die im späteren Verlauf als *guide* dienen sollen.

Oligo-Hybridisierung

Oligo 1	1,0 µL
Oligo 2	1,0 µL
Ligasepuffer	1,0 µL
T4 PNK	0,5 µL
Millipore-H ₂ O	6,5 µL

Temperaturprofil

37 °C	30 min
95 °C	5 min
auf 25 °C (-5 °C/min) 0 min (Temperaturabsenkung/s)	

Die zusammengelagerten Oligonukleotide können mit dem entsprechend restringierten CRISPR-Cas9(n) Vektor nach 4.1.14 ligiert werden. Nach der Ligation können Säugerzellen mit dem Konstrukt nach 4.2.8 transfiziert werden.

4.1.17.2 Surveyor-Assay

Genomische Modifikationen, die durch Cas9(n) eingefügt wurden, können mit dem Surveyor-Assay nachgewiesen werden. Allerdings kann mit diesem Assay keine Aussage über die Art der Modifikation getroffen werden. Die entsprechenden Abschnitte auf der genomischen DNA (gDNA) werden mittels PCR amplifiziert. Dies geschieht sowohl in den CRISPR-Cas9(n) Zellen, als auch in Wildtyp Zellen. Die resultierenden Produkte werden

miteinander hybridisiert und mit der T7-Endonuklease I inkubiert. Dieses Enzym schneidet nur dann, wenn im entstandenen DNA-Hybrid eine genomische Modifikation vorliegt.

4.1.17.3 Isolierung genomischer DNA

Nach Kultivierung (siehe 4.2.1) in 6 *well* Schalen und Transfektion (siehe 4.2.8) der Säugerzellen werden diese einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie in 200 μ L PBS abgeschabt und für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Es werden 250 μ L Lysepuffer hinzugegeben und nach 4.1.15 fortgefahren.

4.1.17.4 Surveyor-PCR

Für die sich anschließende Surveyor-PCR wird die Q5-Polymerase verwendet (2x 25 μ L) und nach Protokoll 4.1.8 durchgeführt. Als Positivkontrolle wird ein entsprechender Abschnitt des Leervektors bzw. des Oligonukleotid-enthaltenen Vektors amplifiziert. Anschließend werden die PCR-Produkte aus dem Gel gereinigt oder, wenn keine Nebenprodukte entstanden sind, erfolgt die Reinigung direkt über das innuPREP DOUBLEpure Kit (siehe 3.8).

4.1.17.5 Surveyor-Hybridisierung

Die bei der Surveyor-PCR entstandenen Produkte werden im Folgenden miteinander hybridisiert. Bei diesem Vorgang können statistisch gesehen drei mögliche Hybridisierungsprodukte entstehen. Gewünscht ist die Hybridisierung des Wildtyp-Produkts mit dem eventuell modifizierten Produkt, denn dabei entstandene nicht komplementäre Bereiche werden von der T7-Endonuklease I erkannt und geschnitten. Neben diesem können noch zwei weitere Hybridisierungsprodukte entstehen und zwar wenn das Wildtyp-Produkt bzw. das modifizierte Produkt mit sich selber hybridisiert. Als Positivkontrolle dient die Hybridisierung des Leervektors mit einem Oligonukleotid-enthaltenen Vektor.

gereinigtes PCR-Produkt	100-150 ng
NEB-Puffer 2	2 μ L

mit Millipore-H₂O auf 19,5 μ L auffüllen.

Temperaturprofil

95 °C	5 min
85 °C (-2 °C/s)	0 min (Temperaturabsenkung/s)
25 °C (-0,1 °C/s)	0 min (Temperaturabsenkung/s)
4 °C	unendlich

4.1.17.6 T7-Endonuklease I Abbau

Die T7-Endonuklease I schneidet DNA-Hybride nur dann, wenn nicht komplementäre Bereiche vorliegen. Um Hybride zu spalten, werden dem Ansatz 0,5 µL T7-Endonuklease I zugesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wird 0,75 µL 0,5 M EDTA hinzugegeben. Die Proben werden mittels Agarosegelelektrophorese ausgewertet.

4.2 Zellkulturtechnische Methoden

4.2.1 Kultivieren von Säugerzellen

Adhärent wachsende Zellen werden bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre in Vollmedium kultiviert. In regelmäßigen Zeitabständen müssen die Zellen mit neuem Medium versorgt oder passagiert werden.

Vollmedium

L-Glutamin (200mM)	5 mL
Penicillin/Streptomycin	5 mL
Fötale Kälberserum (FKS)	50 mL

in 500 mL DMEM (GIBCO® /Invitrogen, Darmstadt) lösen und bei 4 °C lagern. Dem Medium können zur Selektion Antibiotika, wie z.B. Hygromycin B oder Puromycin, zugesetzt werden.

4.2.2 Passagieren von Säugerzellen

Das regelmäßige Passagieren ermöglicht ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen, während sie für Experimente verwendet werden können. Dazu werden die adhärennten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (Lonza, Köln) behandelt. Die Proteinase löst die Zellen aus dem Zellverband und vom Zellkulturflaschenboden. Die

Reaktion wird durch Zugabe von Vollmedium unterbunden. Die Zellen werden in Vollmedium resuspendiert, ausgesät und bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

PBS (phosphate buffered saline, 1L)

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g

in 1 L Millipore-H₂O lösen, den pH-Wert auf 7,4 einstellen und bei 4 °C lagern.

4.2.3 Kryokonservieren und Revitalisieren von Säugerzellen

Das Einfrieren bzw. Konservieren erfolgt bei -150 °C in einem speziellen DMSO-enhaltenen Einfriermedium. Hierfür werden die Säugerzellen bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Nach Waschen und Trypsinbehandlung werden sie in ca. 5 mL PBS aufgenommen und bei 250 rpm für 5 min zentrifugiert. Das dabei erhaltene Zellpellet wird in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert (je 1 mL). Die Zellen werden zunächst für 20 min bei -20 °C eingefroren, über Nacht bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag zu -150 °C überführt.

Einfriermedium (50 mL)

Vollmedium	25 mL
DMSO	5 mL
FKS	20 mL

vor Gebrauch frisch ansetzen oder bis zu zwei Wochen bei 4 °C lagern.

Kryokonservierte Säugerzellen werden schnell bei Raumtemperatur aufgetaut und in 5 mL Vollmedium überführt. Anschließend werden sie bei 250 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 5 mL Vollmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Nach 24 h wird das Medium gewechselt bzw. je nach Konfluenz werden die Zellen passagiert.

4.2.4 Gewinnung von primären Zellen

Murine Chondrozyten werden aus dem Brustkorb von E18.5 Embryonen gewonnen. Dieser wird weitestgehend von Muskulatur befreit und für 4 h in DMEM ohne FKS mit Kollagenase (250 µg/mL) bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert und das Pellet in Vollmedium aufgenommen. Die Aussaat erfolgt in geeigneten Zellkulturschalen.

Osteoblasten können aus der Schädeldecke von Mausembryonen (E18.5) isoliert werden. Dabei wird zunächst überschüssiges Gewebe von der Schädeldecke entfernt und anschließend wird sie für 2 h in DMEM ohne FKS mit Kollagenase (1 mg/mL) und Dispase II (2 mg/mL) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden analog zur Chondrozytengewinnung weiter behandelt.

Mausembryonale Fibroblasten (MEF) werden aus der Embryonenhaut (E18.5) isoliert, indem diese entlang des Embryorückens abgetrennt und mechanisch zerkleinert wird. Das isolierte Gewebe wird für 4 h in DMEM ohne FKS mit Kollagenase (250 µg/mL) und Dispase II (250 µg/mL) bei 37 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgen entsprechend der Chondrozyten- und Osteoblastengewinnung.

4.2.5 Immortalisierung von MEF

Die Immortalisierung von Zellen beschreibt einen Prozess, der die begrenzte Teilungsfähigkeit von Zellen aufhebt und damit eine theoretisch zeitlich nicht begrenzte Kultivierbarkeit ermöglicht. MEF werden aus Haut E18.5 Mausembryonen nach 4.2.4 isoliert und in Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Immortalisierung werden die Zellen mit dem Plasmid pMSSVLT (siehe 3.6), welches die DNA für das große T-Antigen des SV40-Virus trägt, transfiziert. Zur Immortalisierung mittels Passage werden die Zellen über mehrere Wochen fortlaufend kultiviert, bis sich einzelne Zellklone zeigen, die tumorähnlich entartet sind.

4.2.6 Reinigung von Deckgläsern

Für die Mikroskopie werden Säugerzellen meist auf Deckgläsern kultiviert. Die Deckgläser müssen dafür zunächst 24 h in konzentrierter Salpetersäure geschüttelt werden. Nach mehrmaligem Waschen mit Millipore-H₂O werden sie weitere 24 h in Aceton geschwenkt. Dieser Schritt wird wiederholt, bevor die Deckgläser über Nacht mit 70 %igen Ethanol behandelt werden. Abschließend werden sie mit Millipore-H₂O gewaschen, im

Hitzesterilisator getrocknet und sterilisiert. Nach dieser Vorbehandlung werden sie für die Kultivierung von Säugerzellen verwendet.

4.2.7 Zellfixierung und Antikörperfärbung

Für die Färbung von intrazellulären Strukturen und Proteinen werden Zellen zunächst auf Deckgläsern durch 4 %iges PFA (Paraformaldehyd) fixiert und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dazu werden die Zellen mit PBS (3x 5 min) gewaschen und mit 4 %igen PFA 15 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift werden die Zellmembranen durch Zugabe von PBS 0,02 % Triton für 20 min permeabilisiert. Anschließend wird nach dem Waschen 1 %iges Ziegen Serum in PBS für 30 min auf die Zellen gegeben. Der primäre, in 1 %igem Ziegen Serum verdünnte Antikörper wird für 2 h bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Die Detektion erfolgt mittels sekundärem, fluorophorgekoppelten Antikörper, der für 1 h bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubieren muss. Die Zellkerne werden durch Hoechst 33342 (100 mg/mL, 1:5000 in PBS verdünnt) angefärbt. Im Anschluss wird mit PBS und Millipore-H₂O gewaschen. Die Deckgläser werden mit der Zellseite nach unten in einem Tropfen Mowiol auf einen Objektträger geklebt und müssen über Nacht trocknen.

PFA-Fixierlösung (4 %)

Paraformaldehyd	24 g
Millipore-H ₂ O (60 °C)	540 mL

rühren, 6 bis 9 Tropfen NaOH hinzugeben bis die Lösung klar wird.

10x PBS	60 mL
---------	-------

abkühlen lassen und den pH-Wert mit NaOH auf 7,3 einstellen. Anschließend kann die Fixierlösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden.

Mowiol 4-88-Lösung

Mowiol	10 g
PBS	40 mL
24 h rühren.	
Glycerin	20 mL

24 h rühren, 1 h bei 27000 *g* zentrifugieren und aliquotieren. Die Lagerung erfolgt gut verschlossen bei 4 °C.

4.2.8 Transfektion mit Polyethylenimin

Die Transfektion beschreibt die Aufnahme von plasmidischer DNA in Säugerzellen. Das kationische Polyethylenimin (PEI) bildet für diesen Vorgang so genannte Polyplexe mit der zu transfizierenden DNA und ermöglicht die zelluläre Endozytose. Der Transfektionsmix besteht aus der entsprechenden Menge Plasmid-DNA (abhängig von der Zellzahl), der drei- bis sechsfachen Menge an PEI (1 mg/mL) und einer angepassten Menge an FKS-freiem Medium. Das Volumen des Ansatzes ist abhängig von der Kultivierungsschale. Der Mix wird nach einem Mediumwechsel auf die ca. 80 % konfluente Zellkultur gegeben und verbleibt ca. 24 h dort. Anschließend können die Zellen analysiert werden.

4.2.9 Stimulation von Säugerzellen

Für die Stimulation von Säugerzellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren werden diese in 6 *well* Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Die Zellen werden in DMEM ohne FKS für 2 (EGF) bis 4 h (TGF- β und BMP) gehungert. Anschließend erfolgt die Stimulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von TGF- β 1 (2 ng/mL), TGF- β 2 (2 ng/mL), BMP-2 (40 ng/mL), BMP-4 (40 ng/mL), BMP-7 (40 ng/mL) oder EGF (1,5 ng/mL). Nach der Stimulation werden die Zellen mit PBS gewaschen und in PBS 1 % Triton X-100 (inklusive Protease- und Phosphataseinhibitoren) geerntet. Die Proben werden zum vollständigen Zellaufschluss für 1 h auf Eis gelagert und zwischendurch auf dem Vortexer gemischt. Anschließend werden sie kurz zentrifugiert, um Zelltrümmer und genomische DNA zu entfernen. Ein entsprechendes Volumen an Überstand wird mit 3x Stopppuffer versehen und für 5 min bei 95 °C aufgekocht, so dass eine SDS-Gelelektrophorese (siehe 4.3.3) durchgeführt werden kann. Die Lagerung der Proben kann bei -20 °C erfolgen.

Lysepuffer

25 % Triton X-100	100,00 μL (1 %)
500 mM NaF	50,00 μL (0,01 M)
50 mM Na_3VO_4	50,00 μL (0,001 M)
PMSF (100 mM in Methanol)	12,50 μL (0,5 mM)
Pepstatin A (1 mg/mL in Methanol)	2,50 μL (1,5 μM)
Leupeptin (10 mg/mL in Millipore- H_2O)	0,24 μL (2 μM)
Methanol	9,75 μL
PBS	2,40 mL

4.2.10 Transport des Reporterproteins

Zur Untersuchung von intrazellulären Transportwegen wurde ein pC4-Reporterprotein verwendet (Gordon *et al.*, 2010). Nach Expression gelangt es ins ER und kann dieses aufgrund von aggregierenden Domänen nicht wieder verlassen. Erst durch Zugabe eines Liganden werden der Transport zum Golgi und die abschließende Sekretion ermöglicht.

MEF werden in speziell für *live cell imaging* ausgelegte Kammerdeckgläser ausgesät, so dass nach 24 h eine Konfluenz von ca. 60-70 % erreicht wird. Die Zellen werden mit dem Reporterkonstrukt (Plasmid pC4-pQCXIP, siehe 3.6) transfiziert (siehe 4.2.8) und nach 24 h mit *live cell imaging* untersucht. Durch Zugabe von 2 bis 4 μM Rapamycin wird der intrazelluläre Transport des Reporterproteins induziert. In den ersten 30 min wird jede Minute und anschließend alle 5 min der Transportfortschritt fotografisch dokumentiert.

4.2.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Charakterisierung einzelner Zellen. Dazu werden diese im Durchflusszytometer hydrodynamisch fokussiert, um einen Laserstrahl zu passieren. Das von den Zellen gestreute Licht wird detektiert. Dabei wird zwischen Vorwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung differenziert. Das Vorwärtsstreulicht gibt Aufschluss über die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht ihre Granularität widerspiegelt. Des Weiteren kann die Fluoreszenz der Zellen bestimmt werden. Mittels FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) können Zellen anhand ausgewählter Eigenschaften sortiert werden.

MEF werden in 12 *well* Schalen ausgesät und bis zu einer 70-80 %igen Konfluenz kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgt für einen definierten Zeitraum mit TGF- β 1 (2 ng/mL, siehe 4.2.9). Die Zellen werden gewaschen und anschließend mit 150 μL PBS + Antikörper (Verdünnung nach Herstellerangaben)/*well* versetzt und für 3 min bei 4 °C im Dunkeln leicht

geschüttelt. Die Zellen werden abgeschabt und für weitere 10 min inkubiert (s.o.). Für die Messung werden sie in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 500 μ L PBS verdünnt.

4.2.12 Alzianblaufärbung von Zellen

Alzianblau färbt saure Polysaccharide und Proteoglykane blau an. Zellen werden für 20 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % Glutaraldehyd oder 4 %iger PFA-Lösung fixiert. Anschließend werden sie mit PBS 3x 5 min gewaschen. Durch Zugabe von Alzianblau (1 % Alzianblau in 3 % Essigsäure) werden die Zellen für 2 h bei Raumtemperatur gefärbt. Es folgen Waschschriffe (2x 5 min PBS). Danach werden die Deckgläser mit Mowiol auf einen Objektträger eingedeckt.

4.2.13 Zellmigration (Wundheilungstest)

MEF werden in 6 *well* Schalen bis zum Erreichen einer 90 %igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wird entlang einer Linie auf dem Schalenboden der Zellrasen mit einer Pipettenspitze abgeschabt („Wunde“) und das Nährmedium gewechselt. Die entstandene Wunde wird zu definierten Zeitpunkten dokumentiert. Soll die Wachstumsfaktor-abhängige Migration untersucht werden, so müssen die Zellen entsprechend vorher ohne Serumzugabe inkubiert werden, bevor die Wunde erzeugt und der Wachstumsfaktor hinzugegeben wird (siehe 4.2.9).

4.2.14 Antikörperfärbung von Paraffinschnitten

Im ersten Schritt erfolgt die Entparaffinierung. Dabei wird der Objektträger nacheinander jeweils für 5 min in Xylol (2x), Isopropanol, 100 %igem Ethanol, 90 %igem Ethanol, 70 %igem Ethanol, 50 %igem Ethanol und abschließend in Millipore-H₂O inkubiert. Die Renaturierung erfolgt in einem 10 mM Citratpuffer (pH 6), in dem die Paraffinschnitte kurz aufgeköcht werden. Für eine korrekte Wiederherstellung der Proteinfaltung ist es wichtig, dass der Ansatz langsam bei Raumtemperatur abkühlt. Anschließend werden für 30 min bis 1 h unspezifische Reaktionen in 1 %igem Ziegen Serum geblockt. Der erste Antikörper wird über Nacht hinzugegeben (4 °C). Nach einem Waschschriffe (3x 5 min PBS) inkubieren die Schnitte mit dem zweiten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Es wird zweimal mit PBS gewaschen und anschließend eine Hoechst-Zellkernfärbung durchgeführt (siehe 4.2.7). Die Schnitte werden einmal mit PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckt.

4.2.15 Zellkernisolation

Die Zellkernisolation ermöglicht die Trennung einer zytoplasmatischen von einer nukleären Fraktion, die dann abschließend mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Western Blot auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht werden können.

Säugerzellen werden auf 10 cm Schalen ausgesät und bis zu einer gewünschten Dichte kultiviert. Die Zellen werden in 3 mL kaltem PBS aufgenommen, geerntet und bei 1000 g für 5 min (Raumtemperatur) pelletiert. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt. Das Pellet wird in 500 µL hypertonischem Puffer resuspendiert. Anschließend werden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Es werden 25 µL 10 % NP40 hinzugegeben und für 10 s auf höchster Stufe auf dem Vortexer geschüttelt. Die Zellsuspension wird für 10 min bei 3000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand entspricht der zytoplasmatischen Fraktion und wird in ein neues Reagiergefäß überführt. Das Pellet wird zweimal mit 500 µL kaltem PBS gewaschen und jedes Mal bei 20000 g für 5 min (4 °C) zentrifugiert. Daraufhin wird es in 50 µL Zellextraktionspuffer aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und dabei in 10 min Abständen auf dem Vortexer gemischt. Die Zellsuspension wird 30 min bei 14000 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand entspricht der Zellkernfraktion. Die Proben werden für eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot vorbereitet, indem ein entsprechendes Volumen 3x Stopppuffer hinzugegeben und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht wird (siehe 4.3.3). Die Lagerung kann bei -20 °C erfolgen.

Hypertonischer Puffer (100 mL)

Tris	242 mg (20 mM)
NaCl	58 mg (10 mM)
MgCl ₂	61 mg (3 mM)

in Millipore-H₂O lösen, den pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen und auf 100 mL auffüllen. Der Puffer ist bei Raumtemperatur lagerbar.

Zellextraktionspuffer (100 mL)

NaCl	584 mg (100 mM)
Na ₄ P ₂ O ₇ *10H ₂ O	932 mg (20 mM)
Tris	121 mg (10 mM)
N ₃ VO ₄	38 mg (2 mM)
EDTA	37 mg (1 mM)
EGTA	38 mg (1 mM)
NaF	4 mg (1 mM)
Glycerol	10 mL (10 %)
Triton X-100	1 mL (1,0 %)
NaDesoxycholat	0,5 g (0,5 %)
SDS	0,1 g (0,1 %)

in Millipore-H₂O lösen und den pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen. Anschließend den Puffer auf 100 mL auffüllen. Vor Verwendung wird der Puffer mit 1 mM PMSF und *complete* (Protease Inhibitor Cocktail, Roche) versehen. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

Die zu untersuchenden Gewebe werden Mausembryonen (E18.5) entnommen und direkt verarbeitet oder zur Lagerung bei -20 °C eingefroren. Für die Herstellung von Proteinextrakten werden diese zunächst gewogen und adäquate Volumina an PBS 1 % TritonX-100 (auf 100 mg Gewebe kommen 1 mL PBS 1 % TritonX-100) hinzugegeben. Der Aufschluss des Gewebes wird mit Hilfe des Precellys®24 (Programm: 1x 15 s, 5000 rpm) durchgeführt. Die Proben werden danach für 1 h auf Eis inkubiert und mehrmals auf dem Vortexer geschüttelt. Die Proteinkonzentrationen im Probenüberstand werden mit dem Bradford Assay (siehe 4.3.2) bestimmt. Zum Probenüberstand wird 3x Stopppuffer gegeben und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend können die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese getrennt und untersucht werden (siehe 4.3.3).

4.3.2 Bradford Assay

Um Proteinkonzentrationen in Zelllysaten oder Gewebeextrakten zu bestimmen, wird ein Bradford Assay durchgeführt. Dafür wird der Proteinextrakt 1:400 verdünnt. Aus einer

0,1 mg/mL BSA-Stammlösung wird eine Eichreihe (von 1 µg/mL bis 25 µg/mL) angesetzt. Zu jeder Probe bzw. Eichreihe wird eine entsprechende Menge Bradford Reagenz (1:5) gegeben und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Die Proben und die Eichreihe werden bei 595 nm in einer 96 well Schale im Tecan Reader vermessen.

4.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese trennt Proteine in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe auf. Dafür müssen die Proteine mit 3x Stopppuffer vorbehandelt werden. Dieser enthält β-Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken aufbricht, und SDS. Dieses anionische Tensid verleiht Proteinen eine negative Ladung, da es sich an entsprechende Strukturen anlagert. Das SDS-Gel besteht aus einem Sammelgel, in dem die Proteine konzentriert werden und einem Trenngel, in dem die Trennung nach Größe erfolgt. Die Trennschärfe des Trenngels wird anhand der Größe der zu trennenden Proteine festgelegt.

10 %iges Trenngel	
Millipore-H ₂ O	3 mL
1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8	1,9 mL
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	2,6 mL
10 % SDS	75 µL
10 % APS	75 µL
TEMED	3,8 µL
Sammelgel	
Millipore-H ₂ O	2 mL
1,0 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8	380 µL
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	560 µL
10 % SDS	30 µL
10 % APS	30 µL
TEMED	4 µL

3x Stopppuffer (45 mL)

Bromphenolblau	eine Spatelspitze
Saccharose	15,0 g
SDS	4,5 g
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	18,8 mL
Millipore-H ₂ O	26,2 mL

auf 45 mL mit Millipore-H₂O auffüllen. 900 µL 3x Stopppuffer werden vor der Verwendung mit 100 µL β-Mercaptoethanol versetzt.

10x SDS-Laufpuffer (1 L)

SDS	10,0 g
Tris	30,2 g
Glycin	144,0 g

in 1 L Millipore-H₂O lösen. Vor der Verwendung wird der Laufpuffer 1:10 in Millipore-H₂O verdünnt.

4.3.4 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine durch ein gerichtetes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

4.3.4.1 Semi-Dry Blot

Beim Semi-Dry Blot erfolgt die Übertragung der negativ geladenen Proteine durch ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld (1 mA/cm^2 , 1 h) auf eine Nitrozellulose-Membran. Dazu werden sowohl das SDS-Gel und die Nitrozellulose-Membran, sowie die Whatman-Papiere im Semi-Dry Puffer getränkt. Zwischen je drei Whatman-Papieren befinden sich die Nitrozellulose-Membran und das SDS-Gel.

Durch Ponceau S-Lösung (1:50 in Millipore-H₂O) kann die Qualität des Transfers beurteilt werden. Ponceau S färbt Proteine reversibel an, dazu wird die Nitrozellulose-Membran für wenige Minuten bei Raumtemperatur in der Lösung geschwenkt.

10x Semi-Dry Puffer (1 L)

Tris	5,8 g
Glycin	2,2 g
10% SDS	3,7 mL

mit Millipore-H₂O auf 1 L auffüllen. Vor Gebrauch werden 20 mL 10x Semi-Dry-Puffer mit 50 mL Methanol versetzt und mit Millipore-H₂O auf 200 mL aufgefüllt.

4.3.4.2 Wet Blot

Im Gegensatz zum Semi-Dry Blot erfolgt die Reaktion beim Wet-Transfer in einer mit Puffer gefüllten und Eis gekühlten Blotkammer bei 400 mA für 2 h. Der Aufbau ist identisch zum

Semi Dry Blot. Ein Nachteil dieser Technik ist die deutlich längere Übertragungszeit. Ein Vorteil ist allerdings, dass auch große Proteine, wie z.B. Transmembranproteine, deutlich besser und schärfer auf die Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Auch hier kann durch eine Ponceau S-Färbung die Qualität des Transfers beurteilt werden (siehe 4.3.4.1).

10x Wet Blot-Puffer (1 L)

Glycin	144,0 g
Tris	30,3 g

in 1 L Millipore-H₂O lösen und den pH-Wert mit HCl auf 8,3 einstellen. Dem 1x Wet Blot-Puffer wird vor Gebrauch 20 % (v/v) Methanol zugesetzt.

4.3.5 Proteindetektion auf Nitrozellulose-Membranen

Der Nachweis spezifischer Proteine auf Nitrozellulose-Membranen erfolgt durch Antikörper. Dabei detektiert ein spezifischer primärer Antikörper das zu untersuchende Protein und wird von einem sekundären, *Horse Radish Peroxidase* (HRP)-gekoppelten Antikörper gebunden. Die Visualisierung erfolgt über die Meerrettichperoxidase. Diese ermöglicht durch die Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Luminol, eine *enhanced* Chemolumineszenz (ECL)-basierte Reaktion. Die resultierende Emission wird mit einer Kamera gemessen.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran werden freie Bindungsstellen der Membran durch BSA (in PBS-T oder TBS-T) gesättigt. Der in BSA verdünnte erste Antikörper verbleibt über Nacht bei 4 °C auf der Nitrozellulose-Membran. Die Membran wird mit PBS-T oder TBS-T gewaschen (3x 5 min). Der sekundäre Antikörper wird in PBS-T bzw. TBS-T verdünnt und inkubiert für 1 h bei Raumtemperatur auf der Nitrozellulose-Membran. Anschließend wird 3x 5 min in PBS-T bzw. TBS-T und 1x 5 min in PBS bzw. TBS gewaschen. Die Immundetektion wird an der Kamera nach Zugabe entsprechender Reagenzien (siehe 3.8) dokumentiert.

10x PBS

NaCl	87,70 g
Na ₂ HPO ₄	28,48 g
NaH ₂ PO ₄	5,52 g

in 1 L Millipore-H₂O lösen und den pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen.

1x PBS-T

PBS (10x)	100 µL
Millipore-H ₂ O	900 µL
Tween-20	1 mL

10x TBS

Tris	30,3 g
NaCl	87,7 g

in 1 L Millipore-H₂O lösen und den pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen.

1x TBS-T

TBS (10x)	100 µL
Millipore-H ₂ O	900 µL
Tween-20	1 mL

4.3.6 Sekretionsassay

Der Sekretionsassay dient dem enzymatischen Nachweis der Exozytose lysosomaler Hydrolasen. Zu analysierende Zellen werden in 6 *well* Schalen bis zu einer 80 %igen Konfluenz kultiviert. Die Zellen werden 24 h in DMEM ohne FKS mit 1 % BSA (bzw. ohne BSA) gehungert. Die Überstände werden abgenommen, mit einem Proteinaseinhibitormix versetzt und für 30 min bei 30000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Gleichzeitig werden die Zellen in PBS mit 1 % TritonX-100 und Proteinaseinhibitormix abgeschabt. Dabei ist es wichtig, dass das Probevolumen der Überstände dem PBS 1 % Triton X-100 Volumen entspricht.

Für den Enzymassay werden 50 µL Probenpuffer vorgelegt und 40 bis 60 µL der Proben hinzugegeben. Durch Zugabe des Substrats (0,1 mM) wird die enzymatische Umsetzung

gestartet. Die Inkubation erfolgt für 30 min bzw. 1 h (β -Hexosaminidase bzw. β -Galaktosidase) bei 37 °C. Zum Stoppen der Reaktion wird Stopppuffer (ca. 1-1,5 mL) hinzugegeben. Pro Ansatz werden 200 μ L (Doppelbestimmung) in einer 96 well Schale vermessen. Die Anregungswellenlänge liegt bei 360 nm und die Emission wird bei 440 nm detektiert.

Substrate

Hexosaminidase: 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamide

Galaktosidase: 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactoside

100x Inhibitor mix

PMSF (17,4 mg/mL in Methanol)	50 μ L (50 mM)
Pepstatin (1 mg/mL in Methanol)	10 μ L (0,15 mM)
Leupeptin (10 mg/mL in H ₂ O)	1 μ L (0,2 mM)
Methanol	39 μ L

Probenpuffer (50 mL)

tri-Na-Citrat*2H ₂ O	1,5 g (0,1 M)
BSA	0,2 g (0,4 %)

in 50 mL Millipore-H₂O lösen, den pH-Wert mit Zitronensäure auf 4,6 einstellen und bei -20 °C lagern.

Stopppuffer (0,5 L)

Glycin	7,5 g (0,2 M)
--------	---------------

in 0,5 L Millipore-H₂O lösen, den pH-Wert mit NaOH auf 10,8 einstellen und bei 4 °C lagern.

4.3.7 LIMP-2-Glucoerebrosidaseassay

Mit dem LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein type-2*)-Glucoerebrosidaseassay soll die Aktivität der lysosomalen Glucoerebrosidase nachgewiesen werden. Zellen werden in 6 well Schalen kultiviert und nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % für 24 h in DMEM ohne FKS gehungert. Der Zellaufschluss erfolgt in PBS 1% Triton X-100 inklusive

Proteaseinhibitormix (siehe 4.3.6). Die Proteinkonzentrationen werden mittels Bradford Assay (siehe 4.3.2) bestimmt.

Ansatz

Probenpuffer	150 μ L
Probe	25 μ g (Gesamtprotein)
PBS 1 % TritonX-100	100 – x μ L
100x 4-MU β -D-Glucopyranoside	2,5 μ L (1 mM)
100x Conduritol B Epoxide	2,5 μ L (1 mM)

Für jede Probe wird ein doppelter Ansatz pipettiert, d.h. einmal wird der Ansatz mit Inhibitor versehen, der zweite Ansatz bleibt ohne Inhibitor. Die Proben inkubieren für 30 min bei 37 °C. 150 μ L Stopppuffer (siehe 4.3.6) werden in die 96 *well* Schale vorgelegt und die Probe hinzugefügt. Für die Eichreihe werden 150 μ L Probenpuffer, 150 μ L Stopppuffer und 10 μ L einer 4-MU-Lösung (Stammlösung 10 mM in Methanol, Konzentrationen von 0,01 mM bis 0,75 mM) in die 96 *well* Schale gegeben. Die Anregungswellenlänge beträgt 360 nm und die Emission wird bei 440 nm gemessen.

Substrat

4-Methylumbelliferyl β -D-Glucopyranoside

Inhibitor

Conduritol B Epoxide

4.4 Hefegenetische Methoden

4.4.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wird in SD-Minimalmedium oder YEPD-Vollmedium bzw. auf dem entsprechenden Agar bei 30 °C angezogen.

SD-Medium (1 L)

Hefe Stickstoff Base 6,7 g

mit Millipore-H₂O auf 860 mL auffüllen, autoklavieren und bei 4 °C lagern. Vor Gebrauch 40 mL 50 %ige Glukose und 100 mL 10x Aminosäuremix hinzufügen. Durch Zugabe von 16 g Agar-Agar können entsprechende Platten hergestellt werden.

10x Aminosäuremix (1 L)

Adenin	0,2 g
L-Arginin	0,2 g
L-Histidin	0,2 g
L-Leucin	1,2 g
L-Lysin	0,6 g
L-Phenylalanin	0,5 g
L-Threonin	2,0 g
L-Tryptophan	0,2 g
L-Tyrosin	0,3 g
Uracil	0,2 g

in 1 L Millipore-H₂O lösen, autoklavieren und bei 4 °C lagern. Zur Herstellung eines Selektionsmediums wird die entsprechende Aminosäure bzw. Base nicht hinzugefügt.

YEPD (1 L)

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g

in 960 mL Millipore-H₂O lösen, autoklavieren und bei 4 °C lagern. Vor Verwendung müssen 40 mL 50 %ige Glukose hinzugefügt werden. Durch Zugabe von 15 g Agar-Agar können entsprechende Platten hergestellt werden.

4.4.2 Kryokonservierung von *S. cerevisiae*

Die Kryokonservierung von Hefen wird analog zu der von Bakterienzellen (siehe 4.1.2) durchgeführt.

4.4.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefen beschreibt einen Prozess, bei der die Zellen dazu angeregt werden, Plasmid-DNA aufzunehmen. Zellwände von Hefen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, werden durch Zugabe eines alkalischen, einwertigen Kations für Plasmid-DNA durchgängig. Durch Zugabe von einzelsträngiger Träger-DNA, Polyethylenglykol und Verwendung eines Hitzeschocks kann die Effizienz erhöht werden.

4.4.3.1 Lithiumacetat (LiOAc)-Transformation

Die LiOAc-Transformation ist eine effiziente Methode, um Hefen mit Plasmiden zu transformieren. Vorteil dieser Methode ist, dass gleichzeitig mehrere Plasmide in die Zellen eingebracht werden können.

Eine Übernachtskultur wird auf eine OD_{600} von 0,3 verdünnt (50 mL) und bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Die Zellen werden bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 25 mL sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend werden die Zellen erneut zentrifugiert, in 10 mL LiSorb aufgenommen und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach werden sie pelletiert und in 100 μ L LiSorb/Transformation resuspendiert. Es wird ein DNA-Mix angesetzt, der aus 10 μ L hitzedenaturierter Lachssperma-DNA, 100 μ L LiSorb und ca. 2 μ L der Plasmid-DNA besteht. Zu diesem Mix werden 900 μ L 40 %iges PEG/LiAc/TE und 100 μ L kompetente Hefen zugesetzt. Anschließend wird bei 30 °C für 30 min inkubiert. Es erfolgt der Hitzeschock bei 42 °C für 15 min. Die Zellen werden für 30 s bei 6500 rpm zentrifugiert und zur Regeneration in 300 μ L SOS-Medium aufgenommen. Sie verbleiben bei 30 °C für 30 min. Im letzten Schritt werden die Zellen auf entsprechendem Selektionsagar ausgestrichen und 2 bis 3 d bei 30 °C kultiviert.

Lisorb (100 mL)

0,5 M EDTA	100,0 μ L (1 mM)
1 M Lithiumacetat	10,0 mL (100 mM)
Sorbitol	18,2 g (1 M)
1 M TRIS-HCL pH 8	1,0 mL (10 mM)

mit Millipore-H₂O auf 100 mL auffüllen, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

Lachssperma-DNA (10 mg/mL)

Die Lachssperma-DNA wird in Millipore-H₂O gelöst, 5x 30 s mit Ultraschall behandelt und bei -20 °C gelagert. Vor Verwendung wird die DNA für 5 min bei 95 °C erhitzt.

40 % PEG4000 in LiAc/TE (50 mL)

0,5 M EDTA	100,0 µL (1 mM)
1 M Lithiumacetat	5,0 mL (100 mM)
Polyethylenglykol MW 4000	20,0 g (40 %)
1 mM TRIS-HCl pH8	0,5 mL (10 mM)

mit Millipore-H₂O auf 50 mL auffüllen, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

SOS-Medium

1 M CaCl ₂	6,5 µL
2 M Sorbitol	500,0 µL
YEPD-Medium	500,0 µL

4.4.3.2 PLATE

Mit Hilfe der PLATE (Polyethylenglykol 4000, Lithiumacetat, Tris, EDTA)-Transformation können Hefezellen deutlich schneller mit dem gewünschten Plasmid transformiert werden. Ein Nachteil dieser Methode ist die im Vergleich zur LiOAc-Transformation geringere Effizienz. Hefezellen einer frisch bewachsenen Platte werden in 500 µL PLATE-Lösung resuspendiert. 2 µL der zu transformierenden Plasmid-DNA werden hinzugefügt. Es wird ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 min durchgeführt. Die Zellen werden bei 6500 rpm für 30 s pelletiert, in 200 µL SOS-Medium (siehe 4.4.3.1) resuspendiert und zur Regeneration für 30 min bei 30 °C inkubiert. Analog zur LiOAc-Transformation werden sie auf Selektionsagar ausgestrichen und für 2 bis 3 d bei 30 °C kultiviert.

PLATE (100 mL)

Polyethylenglykol 4000	40,0 g (40 %)
1 M Lithiumacetat	10,0 mL (100 mM)
1 M Tris-HCl pH 7,5	1,0 mL (10 mM)
0,5 M EDTA	0,2 mL (1 mM)

in Millipore-H₂O auf 100 mL auffüllen und bei 4 °C lagern.

4.4.4 Zellaufschluss nach Thorner

Eine Hefe-Übernachtskultur wird auf eine OD_{600} von 0,3 bis 0,4 verdünnt und mindestens bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Anschließend werden 5 OD_{600} Zellen 3 min bei 4000 rpm (4 °C) pelletiert. Das Pellet wird in 1 mL Millipore- H_2O aufgenommen und 30 s bei 6500 rpm zentrifugiert. Die Zellen werden in 200 μ L Thornerpuffer, der zuvor auf 70 °C erhitzt wurde, mit Proteinaseinhibitoren (siehe 4.3.6) resuspendiert, mit einer Spatelspitze Glaskügelchen versetzt, für 10 bis 20 s auf dem Vortexer gemischt und 10 min bei 70 °C geschüttelt. Anschließend wird ein weiteres Mal für 2 min auf dem Vortexer geschüttelt, um den Zellaufschluss zu vervollständigen. Die Proben werden 5 min bei Raumtemperatur mit 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

Thorner Puffer (100 mL)

Harnstoff	48,6 g (8 M)
SDS	5,0 g (5 %)
Tris	0,6 g (50 mM)

in Millipore- H_2O lösen, den pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen und auf 100 mL mit Millipore- H_2O ergänzen. Vor Gebrauch mit 5 % β -Mercaptoethanol und 1 % 100x Proteinaseinhibitor-Mix (siehe 4.3.6) versetzen.

4.4.5 Wachstumstest

Zur Durchführung eines Wachstumstests wird zunächst aus einer Übernachtskultur eine Hauptkultur mit einer OD_{600} von 0,4 angesetzt. Erreicht die Kultur eine OD_{600} von 0,8 werden Verdünnungsreihen (OD_{600} von 0,1 bis 0,005) hergestellt und 10 μ L der Zellsuspensionen auf entsprechende Platten getropft. Die Platten werden entweder bei 30 °C oder bei 37 °C für 1 bis 3 d inkubiert.

4.4.6 Differentielle Zentrifugation

Um die subzelluläre Verteilung von Proteinen zu bestimmen, wird eine differentielle Zentrifugation durchgeführt. Diese ermöglicht die Auftrennung der Zellaufschlüsse in ihre einzelnen Bestandteile bzw. Organellen anhand ihres Sedimentationskoeffizienten. Dazu werden Zellen einer Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,35 verdünnt und bis zu einer

OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 wachsen gelassen. 20 OD₆₀₀ Zellen werden bei 4500 rpm zentrifugiert und das Pellet in 2 mL TEβ resuspendiert. Die Zellen werden für 10 min bei 30 °C geschüttelt und bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 mL Spheroblastpuffer aufgenommen, der 60 µL Zymolyase (10 mg/mL in Spheroblastpuffer) zum Abbau der Zellwand enthält. Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 30 °C. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert, in 2 mL Spheroblastpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird zwei weitere Male durchgeführt. Anschließend werden die Zellen in 1 mL Lysepuffer mit 10 µL PMSF (100 mM) resuspendiert. Das Lysat wird in einen Glaspotter überführt und auf Eis durch fünf maliges Bewegen des Stempels homogenisiert. Die Zelltrümmer werden für 5 min bei 4 °C und 2000 rpm (500 g) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. 400 µL dieses Überstands werden als Probe H aufbewahrt. Weitere 500 µL Überstand werden für 10 min bei 4 °C mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (S13) wird abgenommen. Das Pellet (P13) wird in 500 µL Lysepuffer (mit 5 µL 100 mM PMSF) resuspendiert. S13 wird 20 min bei 50000 rpm in der Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet P200 wird in Lysepuffer resuspendiert. Der Überstand S200 wird aufbewahrt. Die Proben werden bei -20 °C gelagert.

TEβ (10 mL)

1 M Tris-HCl pH 8	2,0 mL (200 mM)
0,5 mM EDTA	0,4 mL (20 mM)
β-Mercaptoethanol	0,1 mL (1 %)

mit Millipore-H₂O auf 10 mL auffüllen.

Spheroblastpuffer (10 mL)

2 M Sorbitol	6,00 mL (1,2 M)
1 M K ₃ PO ₄ pH 7,3	0,50 mL (50 mM)
1 M MgCl ₂	0,01 mL (1 mM)

mit Millipore-H₂O auf 10 mL auffüllen.

Lysepuffer (10 mL)

1 M Tris-HCl pH7,5	0,50 mL (50 mM)
2 M Sorbitol	1,00 mL (0,2 M)
0,5 M EDTA	0,02 mL (1 mM)

mit 10 µL 100 mM PMSF versetzen und auf 10 mL mit Millipore-H₂O auffüllen.

4.4.7 5-FOA Assay

Mit dem 5-FOA Assay können Gene daraufhin getestet werden, ob sie für die Zelle essentiell sind bzw. ob andere Gene sie ersetzen können. Dazu werden Wildtyp-Hefestämme mit einem Plasmid transformiert, welches das essentielle Zielgen und eine *URA3*-Sequenz aufweist. Die anschließende genomische Deletion dieses Gens hat dadurch keine Auswirkungen auf die Zelle. Der Hefestamm wird mit einem Plasmid transformiert, welches u.a. für das potentielle Ersatzgen kodiert. Die Zugabe von 5-FOA ins Medium führt dazu, dass nur die Zellen überleben, die das Plasmid mit der *URA3*-Sequenz und damit auch das Zielgen, verloren haben. Ura3p ist eine Orotidine 5'-Phosphat Decarboxylase, welche 5-FOA zum zytotoxischen 5-Fluorouracil umsetzt. Kann das potentielle Ersatzgen die Funktion des essentiellen Zielgens nicht übernehmen, so ist dieser Vorgang für die Zelle letal. Für diesen Assay wird dem SD-Nähragar 5-FOA in einer Konzentration von 0,5 mg/mL hinzugefügt. Die zu testenden Hefestämme inklusive Kontrollen werden auf dem Agar ausgestrichen und bei 30 °C für 1 bis 3 d inkubiert.

5. Ergebnisse

SNARE-Proteine katalysieren mit der Membranfusion einen essentiellen Schritt im subzellulären Transport eukaryotischer Zellen. Die Säugerzelle weist ein großes Set an unterschiedlichen SNARE-Proteinen auf, die an definierten Organellen bzw. Organellmembranen lokalisiert sind. Dies ermöglicht einen zielgerichteten, spezifischen Transport innerhalb der Zelle. So sind die für diese Arbeit relevanten Qb-SNAREs Vti1a und Vti1b für verschiedene Transportwege im Säuger essentiell. Darunter fallen z.B. Fusionen der frühen und späten Endosomen, aber auch Golgi- und lysosomale Transportwege (Mallard *et al.*, 2002; Brandhorst *et al.*, 2006; Antonin *et al.*, 2000b; Pryor *et al.*, 2004). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der DKO von Vti1a und Vti1b perinatal letal ist, während der KO von nur einem der beiden SNAREs phänotypisch nahezu unauffällig ist (Atlashkin *et al.*, 2003; Kunwar *et al.*, 2011). Interessanterweise sind bei *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäusen bereits während der Embryonalentwicklung zunehmende Unterschiede zu *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Wurfgeschwistern zu beobachten. Bis E15.5 unterscheiden sich Wildtyp (WT) bzw. DHET und DKO kaum. Ab E18.5 sind signifikante Unterschiede detektierbar (**Abb. 5.1A**; Kunwar *et al.*, 2011; Browski, Dissertation, 2010; Schöning, Dissertation, 2014). So sind DKO Embryonen signifikant kleiner und zeigen diverse Auffälligkeiten am Skelett (Schöning, Dissertation, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden die phänotypischen Analysen weitergeführt. Des Weiteren sollten die molekularen Grundlagen aufgeklärt werden. Hierzu wurde zunächst untersucht, ob sich die signifikant reduzierte Größe der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Embryonen (Schöning, Dissertation, 2014) auch im Gewicht der Mäuse widerspiegelt. Es wurde gezeigt, dass DKO Embryonen (E18.5) signifikant leichter sind als ihre DHET Wurfgeschwister (**Abb. 5.1B**).

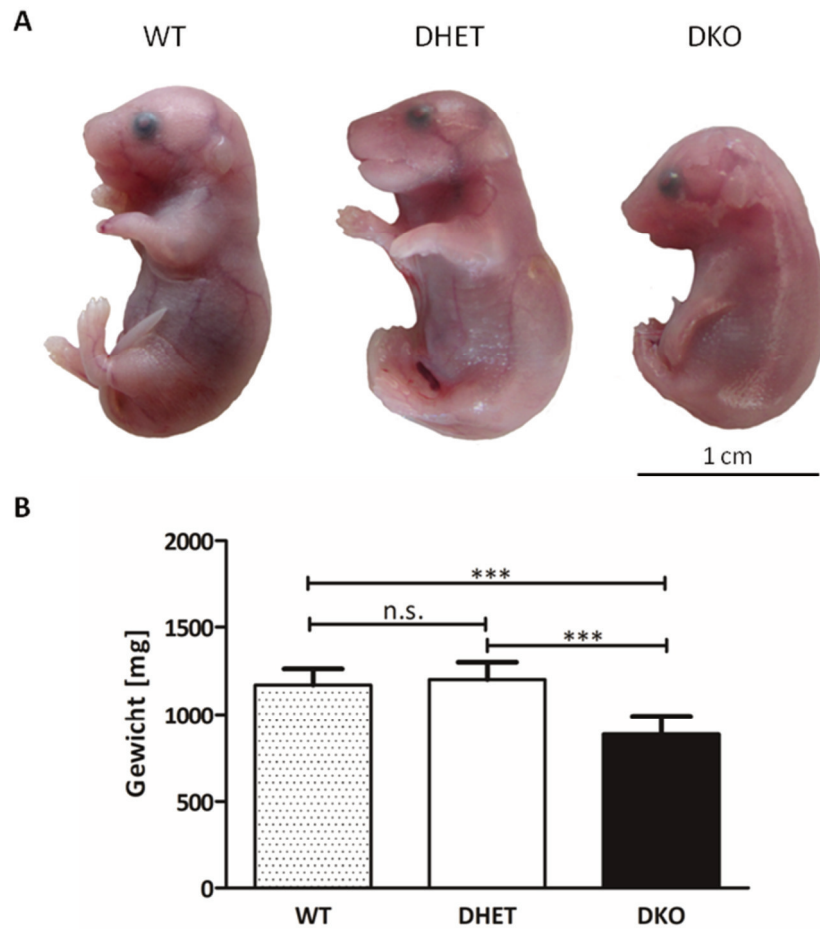


Abb. 5.1 Vergleich von WT, DHET und DKO Embryonen

In A sind E18.5 WT, DHET und DKO Mausembryonen dargestellt. Der Maßstab entspricht 1 cm. DHET bzw. WT unterscheiden sich hinsichtlich ihres Phänotyps deutlich von gleichaltrigen DKO Tieren. Ein Unterschied zeigte sich in der Haltung der vorderen Gliedmaßen der Embryonen. WT bzw. DHET Mäuse weisen eine 90° Armbeugung auf, wohingegen DKO Embryonen eine gestreckte Armhaltung zeigen. Auffällig ist zudem die stärkere Krümmung der DKO Mäuse und die damit einhergehende Rundung des Embryorückens. DHET bzw. WT Embryonen sind signifikant schwerer (B) als ihre DKO Wurfgeschwister (ungepaarter t-Test, $n_{\text{DHET,DKO,WT}}=17$, zweiflächig, $***=p<0,001$, n.s.= nicht signifikant). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

In vorangegangenen Studien wurden Veränderungen am Skelett der DKO Mäuse detektiert. Phänotypisch auffällig war eine abweichende Haltung der vorderen Extremitäten des DKOs. WT und DHET Mäuse wiesen eine 90° Armbeugung auf, während DKO Mäuse eine fast gestreckte Armhaltung zeigten (**Abb. 5.1A**). Weitere markante Veränderungen waren verformte Schlüsselbeine, eine Gaumenspalte (ca. 50 % der DKO Embryonen), ein deformiertes Sternum, veränderte Rippen und ein fehlender Lendenwirbel (Schöning, Dissertation, 2014).

Bisher lag der Organismus im Fokus der Forschung. In dieser Arbeit sollten weitere Untersuchungen auf zellulärer Ebene erfolgen. Dabei sollte überprüft werden, ob es

subzellulär Unterschiede hinsichtlich Vti1a, Vti1b und entsprechender Zellorganellen zwischen WT, DHET und DKO Fibroblasten gibt. Hierzu wurden Zellen aus mausemryonaler Haut (E18.5) isoliert und mit verschiedenen Organellmarkern angefärbt. Die Aufnahmen der Immunfärbungen erfolgten an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop.

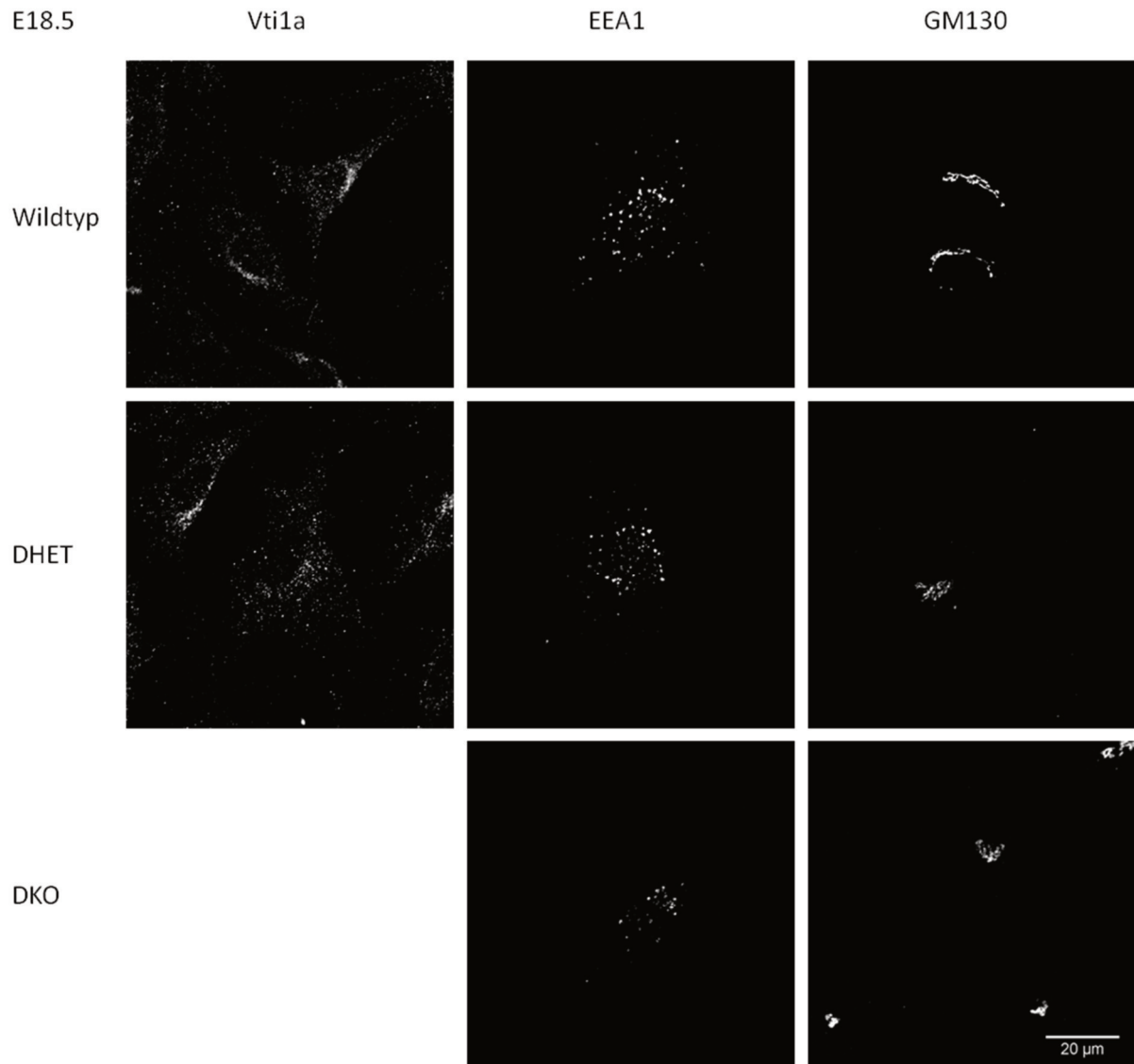


Abb. 5.2 Immunfluoreszenz der WT, DHET, DKO MEF zum Nachweis von Vti1a, EEA1 und GM130

Immunfärbung gegen Vti1a (links), EEA1 (mittig) und GM130 (rechts) in WT, DHET und DKO MEF, die aus der Haut von E18.5 Embryonen gewonnen und in 24 *well* Schalen kultiviert wurden. Die Färbung erfolgte an Tag 3. Vti1a war hauptsächlich perinukleär in punktuellen Strukturen detektierbar. Auch EEA1 zeigte punktuelle Strukturen. GM130 war perinukleär lokalisiert. Dabei unterschieden sich DHET und DKO nicht. Es handelt sich um konfokale Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Vti1a war hauptsächlich perinukleär lokalisiert, was dem bei Kreykenbohm *et al.* (2002) beschriebenen Vorkommen im Golgi ähnelte (**Abb. 5.2**). Der *cis*-Golgi wurde mittels GM130 detektiert. Hier war ein deutliches perinukleäres Signal zu beobachten, das der Beschreibung

in der Literatur entspricht (Nakamura *et al.*, 1995). Weitere punktuelle Signale wurden in Nähe der Plasmamembran detektiert, die mit einer früh endosomalen Lokalisation einhergehen könnten. Aufgrund der in der Literatur (Brandhorst *et al.*, 2006) beschriebenen früh endosomalen Lokalisation von Vti1a wurde zudem das Markerprotein EEA1 (*early endosome antigen 1*) detektiert, welches ein Membranprotein der frühen Endosomen ist (Mu *et al.*, 1995). EEA1 war wie erwartet in punktuellen Strukturen im zytoplasmatischen, membrannahen Bereich der Zellen lokalisiert. Unterschiede zwischen WT, DHET und DKO MEF hinsichtlich der Größe und Lokalisation der untersuchten Zellkompartimente zeigten sich nicht.

Das zweite Protein im Fokus dieser Arbeit war Vti1b. Daher wurden Immunfärbungen durchgeführt, um auch hier WT, DHET und DKO Zellen hinsichtlich ihrer subzellulären Organellmorphologie miteinander zu vergleichen.

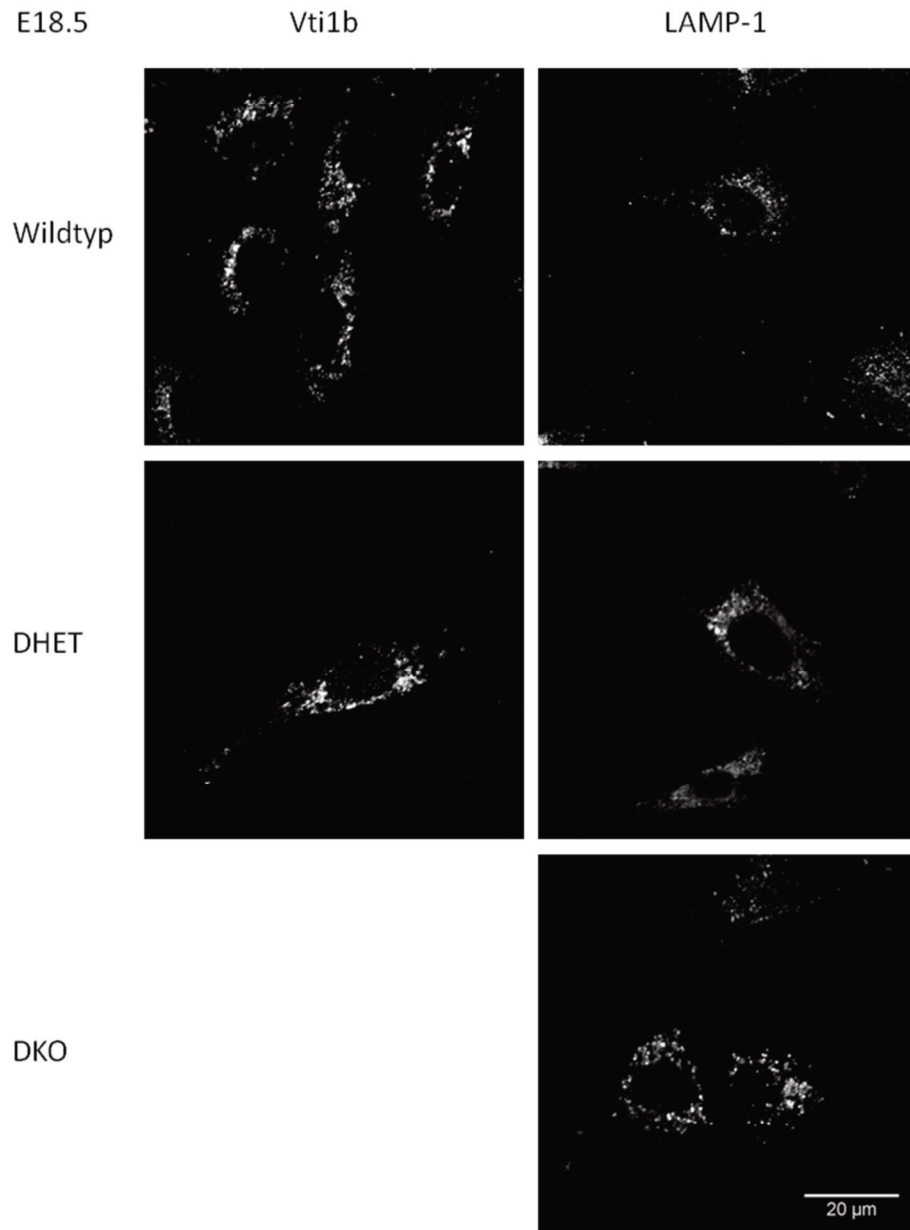


Abb. 5.3 Nachweis von Vti1b und LAMP-1 in WT, DHET und DKO MEF

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT, DHET und DKO MEF, die aus mausembyronaler (E18.5) Haut isoliert und für die Färbung verschiedener Proteine in 24 *well* Schalen ausgesät wurden. In den Zellen wurde Vti1b (links) und LAMP-1 (rechts) angefärbt. Beide Proteine zeigten eine breite, subzelluläre Verteilung innerhalb der Zellen. Differenzen zwischen den getesteten Genotypen waren nicht nachweisbar. Diese konfokalen Aufnahmen zeigen eine 400fache Vergrößerung der Zellen. Der Maßstab entspricht 20 μm .

Abb. 5.3 zeigt eine breite Verteilung von Vti1b. Im Vergleich mit Vti1a reichte diese deutlich weiter in die Peripherie der Zelle. Die Färbung von WT, DHET und DKO Lysosomen mit LAMP-1 (*lysosome associated membrane protein-1*), einem lysosomalen Membranprotein (Chen *et al.*, 1985), ähnelte der Vti1b-Färbung hinsichtlich ihrer angefärbten Strukturen. Zusammenfassend waren sowohl für Vti1a, EEA1 und GM130 als auch für Vti1b und LAMP-1

keine Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen zu detektieren. Diese rein qualitativ durchgeführten Experimente sollten zunächst einen Überblick über die Lokalisation von Vti1a, Vti1b und entsprechender Organellmarker geben. Im Fokus stand dabei der Vergleich zwischen WT, DHET, und DKO Zellen. Im nächsten Schritt wurde ein definiertes Zellorganell im Detail untersucht. Neben der Struktur sollten funktionelle Assays Aufschluss über die Auswirkungen des Verlusts von Vti1a und Vti1b auf das Lysosom geben. Für alle nachfolgenden Experimente wurden DHET Zelllinien als Kontrolle verwendet, da sich in bisherigen Analysen keine signifikanten Unterschiede zu WT Zellen gezeigt haben. Weiterhin konnten durch die Zuchtstrategie DHET und DKO Embryonen als Wurfgeschwister für die Analysen gewonnen werden. Dies bietet den experimentellen Vorteil, dass die Embryonen unter gleichen Voraussetzungen isoliert werden konnten.

5.1 Die Rolle von Vti1a und Vti1b beim lysosomalen Proteintransport

Lysosomen sind wichtige Organellen in der Zelle, da sie den Abbau unterschiedlicher Biopolymere und Proteine leisten. Hierunter fallen z.B. Transmembranrezeptoren wie der EGFR. Dabei ermöglicht die lysosomale Degradation die Abschaltung des Signalwegs (Beguinot *et al.*, 1984). Der Ligand-Rezeptorkomplex wird dafür in frühe Endosomen internalisiert und über späte Endosomen bzw. multivesikuläre Körperchen wird der Transport in die Lysosomen ermöglicht (Huang *et al.*, 2006). Hier erfolgt die Degradation durch lysosomale Hydrolasen (Alroy und Lyons, 2014). Die Fusion später Endosomen mit dem Lysosom wird u.a. durch Vti1b katalysiert (Pryor *et al.*, 2004). Auch die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen ist ein Prozess, an dem Vti1b beteiligt ist (Moreau *et al.*, 2013). Die Autophagozytose dient dem Abbau von Organellen und zytoplasmatischen Komponenten (Nakatogawa *et al.*, 2009). Die für den Abbau benötigten lysosomalen Hydrolasen werden in den meisten Fällen vom ER zum Golgi und anschließend über die Endosomen ins Lysosom transportiert (Alroy und Lyons, 2014). Transportschritte innerhalb der Golgi-Zisterne sind u.a. von Vti1a abhängig, sodass beide Vti1-Proteine eine Rolle beim lysosomalen Transport spielen (Kreykenbohm *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1998). Die Mehrheit an lysosomalen Hydrolasen erhält durch posttranslationale Modifikationen im Golgi einen M6P-Rest. Dieser wird durch M6P-Rezeptoren erkannt, gebunden und dient als Signal für den Transport ins Lysosom. Defekte in der Regulation dieses Transports können zu einer

intrazellulären Fehllokalisierung oder Sekretion dieser Enzyme führen. Letzteres wurde in MEF sowie in Neuronen des Genotyps *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* nachgewiesen. In verschiedenen *Vti1a*- und *Vti1b*-doppeldefizienten MEF Zelllinien wurden signifikant erhöhte Mengen an sekretierter β -Galaktosidase, β -Mannosidase, β -Hexosaminidase und β -Glucuronidase detektiert (Browski, Dissertation, 2010; Kunwar *et al.*, 2011). Des Weiteren zeigte Schöning, dass es in *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Cortexkulturen (E15.5) zu einer vermehrten Sekretion der β -Galaktosidase kam (Schöning, Dissertation, 2014). Eine erhöhte Freisetzung von Hydrolasen könnte eventuell in den entsprechenden Organen zu einem vermehrten Abbau von Gewebe führen. So wird die Resorption von Knorpel in der Wachstumszone durch die gezielte Freisetzung von lysosomalen Hydrolasen ermöglicht (Bastow *et al.*, 2012). Eine Fehlregulation der Freisetzung von lysosomalen Hydrolasen in der Wachstumszone könnte eine Ursache für das fehlende Rippenpaar in *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Mäusen sein (Schöning, Dissertation, 2014). Daher war es von Interesse, das Ausmaß der Sekretion lysosomaler Enzyme in einem geeigneten Zelltyp zu untersuchen. Hierzu wurde als Modellsystem Chondrozyten gewählt, die der Hauptbestandteil der zunächst knorpelig angelegten Rippen sind.

5.1.1 Untersuchung des Mannose-6-Phosphat-abhängigen Transports

Die meisten sauren Hydrolasen werden M6P-abhängig ins Lysosom transportiert. Im Golgi bindet ein M6P-Rezeptor an die Enzyme und reguliert so den Transport ins Lysosom. Dabei handelt es sich um einen Transportweg, der frühe und späte Endosomen involviert (Gosh *et al.*, 2003). Zur Untersuchung dieser Prozesse wurden Sekretionsassays durchgeführt; dazu wurden Chondrozyten in entsprechenden Schalen ausgesät und die enzymatischen Aktivitäten der lysosomalen Hydrolasen in den Zellen und Zellüberständen bestimmt. Der Quotient aus der enzymatischen Aktivität im Überstand und der Gesamtaktivität wurde für den Vergleich herangezogen. Für den Nachweis wurden spezifische 4-Methylumbelliferylsubstrate verwendet, die durch die Enzyme β -Hexosaminidase und β -Galaktosidase umgesetzt wurden und zu einem detektierbaren, fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon führten.

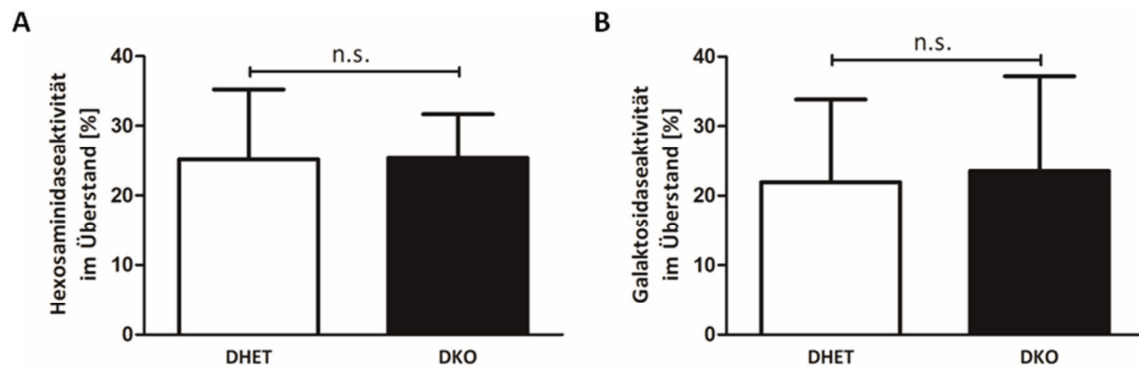


Abb. 5.4 Nachweis der Aktivität lysosomaler Hydrolasen in Chondrozyten

Dargestellt sind die Ergebnisse für die beiden lysosomalen Hydrolasen β -Hexosaminidase (A) und β -Galaktosidase (B). Für die Untersuchung wurden $Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}$ und $Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}$ Chondrozyten in 6 well Schalen ausgesät und die enzymatischen Aktivitäten in Zellextrakten und Überständen bestimmt. Es wurde der Quotient aus der Aktivität im Zellüberstand und der Gesamtaktivität gebildet, was dem sekretierten Protein entsprach. Genotyp-abhängige Unterschiede in der enzymatischen Aktivität wurden nicht detektiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder (ungepaarter t-Test, β -Hexosaminidase: n=9 DHET, n=6 DKO, β -Galaktosidase: n=9 DHET, n=6 DKO, zweiflächig, n.s.=nicht signifikant).

Sowohl für die β -Hexosaminidase (**Abb. 5.4A**) als auch für die β -Galaktosidase (**Abb. 5.4B**) konnten enzymatische Aktivitäten in den Zellextrakten und -überständen gemessen werden. Im Zellüberstand wurde für DHET und DKO jeweils eine β -Hexosaminidasaktivität von 25 % detektiert. Die β -Galaktosidaseaktivität betrug im Überstand 22 % für $Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}$ und 24 % für $Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}$ Zellen. Eine erhöhte Sekretion der beiden getesteten Hydrolasen in $Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}$ Chondrozyten wurde nicht nachgewiesen. Das fehlende Rippenpaar der $Vti1a$ - und $Vti1b$ -doppeldefizienten Embryonen konnte daher nicht auf eine vermehrte Exozytose lysosomaler Enzyme zurückgeführt werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass nur spezifische Enzyme von einer vermehrten Sekretion betroffen sind.

Neben dem Mannose-6-Phosphat-abhängigen Transport von Enzymen vom Golgi zum Lysosom, gibt es noch weitere Möglichkeiten, Hydrolasen ins Lysosom zu transportieren. Die β -Glucocerebrosidase wird beispielsweise LIMP-2-abhängig vom Golgi über die Endosomen ins Lysosom transportiert (Reczek *et al.*, 2007). Die beiden SNARE-Proteine vermitteln Fusionsvorgänge, die für den LIMP-2-abhängigen Transport essentiell sind. Ein Verlust von $Vti1a$ und $Vti1b$ könnte daher zu einer erhöhten Sekretion oder intrazellulären Fehllokalisation der β -Glucocerebrosidase führen.

5.1.2 Untersuchung des LIMP-2-abhängigen Transports

Zur Untersuchung möglicher Auswirkungen des Verlusts von Vti1a und Vti1b auf den LIMP-2-abhängigen Transport der β -Glucocerebrosidase ins Lysosom wurde ein enzymatischer Assay etabliert. Immortalisierte MEF Zelllinien dienten dabei als Modellsystem. Auch für diesen Assay wurde zur Detektion ein 4-Methylumbelliferylsubstrat verwendet. Zunächst wurde das Protokoll des Sekretionsassays angewandt. Es musste beachtet werden, dass für den Aktivitätsnachweis der lysosomalen β -Glucocerebrosidase ein Inhibitor verwendet werden muss, da es im Zytoplasma ein funktionell ähnliches Enzym gibt, welches das Substrat ebenso umsetzen kann und dadurch zu fehlerbehafteten Ergebnissen führen würde. Conduritol B Epoxid hemmt spezifisch die lysosomale β -Glucocerebrosidase, sodass die Differenz zwischen der Gesamtaktivität des Zellextrakts und der Aktivität nach Zugabe des Inhibitors die eigentliche Aktivität der lysosomalen β -Glucocerebrosidase wiedergibt. Des Weiteren benötigt die β -Glucocerebrosidase zur Aktivierung ein Detergenz im Reaktionspuffer.

Nach diesem Protokoll durchgeführte Experimente wiesen hohe Standardabweichungen auf, die vermutlich auf eine sehr geringe β -Glucocerebrosidaseaktivität in den Zellüberständen zurückzuführen waren (nicht gezeigt). Daher musste der Assay dahingehend angepasst werden, dass ausschließlich die enzymatische Aktivität in den Zellextrakten bestimmt und zwischen DHET und DKO MEF verglichen wurde. Zur Etablierung wurde zunächst die spezifische Aktivität in Bezug auf unterschiedliche Gesamtproteinmengen bestimmt und dann eine Proteinmenge (25 μ g, nicht gezeigt) gewählt, bei der keine Substratlimitierung auftrat. Zusätzlich wurde eine Kinetik über vier Stunden aufgenommen. Hierbei wurde der Umsatz pro Zeiteinheit ermittelt, um eine optimale Inkubationszeit zu bestimmen (30 min, nicht gezeigt).

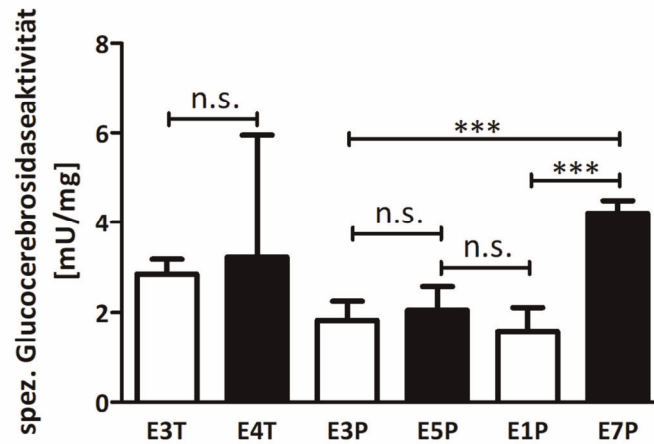


Abb. 5.5 Nachweis der β -Glucocerebrosidaseaktivität in MEF

Gezeigt ist die spezifische β -Glucocerebrosidaseaktivität in Zellextrakten der Linien E3T (DHET, T-immortal), E4T (DKO, T-immortal), E3P (DHET, P-immortal), E5P (DKO, P-immortal), E1P (DHET, P-immortal) und E7P (DKO, P-immortal). Die Zelllinien unterscheiden sich im Genotyp und in der Art der Immortalisierung. Zellen wurden in 6 *well* Schalen ausgesät, 24 h gehungert und für den Assay abgeschabt. Es wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und eine Gesamtproteinmenge von 25 μ g für den Assay eingesetzt. Nach Zugabe des Substrats wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend Stopppuffer zugegeben und die Proben vermessen. Für den Vergleich wurden die spezifischen β -Glucocerebrosidaseaktivitäten ermittelt. Signifikante Unterschiede ergaben sich ausschließlich zwischen E1P und E7P bzw. E3P und E7P. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (ungepaarter t-Test, n=4, zweiflächig, n.s.=nicht signifikant, ***=p<0,001).

Die Messung der spezifischen β -Glucocerebrosidaseaktivität wurde für die DHET Zelllinien E3T (T-immortal, *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-}) E3P und E1P (P-immortal, *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-}) sowie für die DKO Zelllinien E4T (T-immortal, *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-}) E5P und E7P (P-immortal, *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-}) vorgenommen (**Abb. 5.5**). Die T-immortalen Zelllinien E3T und E4T unterschieden sich mit 2,9 mU/mg und 3,2 mU/mg nicht signifikant in ihrer spezifischen β -Glucocerebrosidaseaktivität. Es fiel auf, dass in der Zelllinie E7P mit 4,2 mU/mg eine vergleichsweise mehr als doppelt so hohe Aktivität wie in den beiden DKO Zelllinien E1P (1,6 mU/mg) und E3P (1,8 mU/mg) detektiert wurde. Da dieser starke Effekt nur in einer der drei getesteten DKO Zelllinien auftrat, war dies eventuell auf diese Zelllinie an sich zurückzuführen. Eine Aussage über den Effekt der *Vti1a*- und *Vti1b*-Doppeldefizienz konnte in diesem Fall nicht getroffen werden.

5.1.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der lysosomalen Struktur

Defekte *Vti1a*- und *Vti1b*-abhängige, lysosomale Transportwege könnten dazu führen, dass sich die Struktur des Lysosoms verändert. Um intrazelluläre Auswirkungen des DKO von

Vti1a und Vti1b auf die lysosomale Morphologie zu untersuchen, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Färbungen durchgeführt (**Abb. 5.6**).

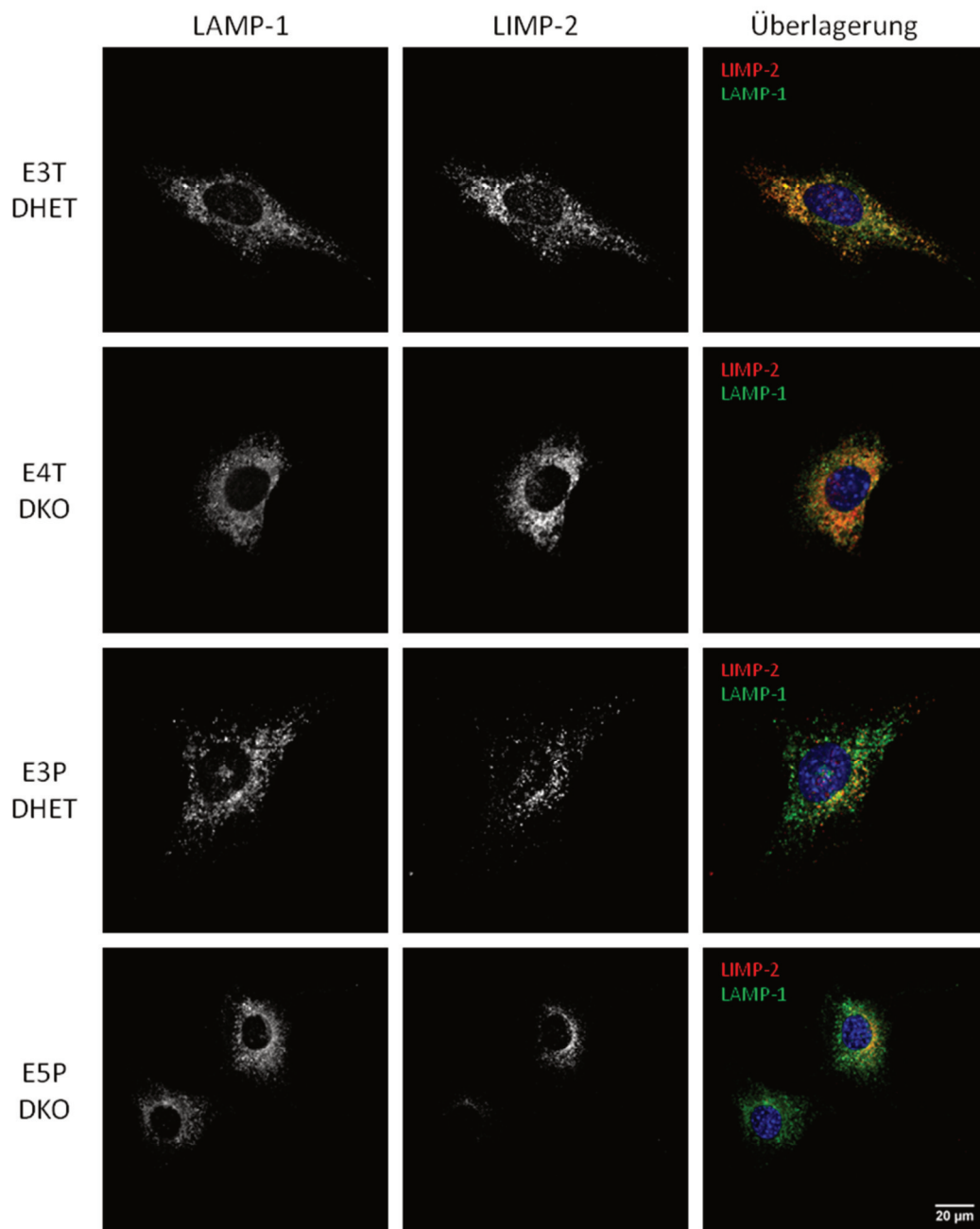


Abb. 5.6 Immunzytochemie von LAMP-1 und LIMP-2 in MEF

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der LAMP-1 (Cy2/grün) und LIMP-2 (Cy3/rot) Färbung von MEF der Linien E3T (DHET), E4T (DKO), E3P (DHET) und E5P (DKO). Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt und sind in blau dargestellt. Gelbe Strukturen zeigen kolokalisierende Bereiche von LIMP-2 und LAMP-1. Konfokale Aufnahmen, 400fache Vergrößerung, Maßstab entspricht 20 µm.

Die Darstellung von LAMP-1, einem lysosomalen Membranprotein (Chen *et al.*, 1985), ermöglichte die Detektion der Lysosomen in der Zelle, sodass Form und Anzahl zwischen den

Genotypen verglichen werden konnten. Es wurden die DHET und DKO Zelllinien E3T und E4T sowie E3P und E5P gegenübergestellt. LAMP-1 war für alle Zelllinien gleichermaßen als punktuelle Strukturen detektierbar. Zudem wurde eine LIMP-2 Färbung durchgeführt. Dieses Protein wurde spätendosomal und lysosomal nachgewiesen (Reczek *et al.*, 2007). Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen den entsprechenden DHET und DKO MEF Zelllinien detektiert. Analog zu LAMP-1 war auch LIMP-2 in punktuellen Strukturen nachweisbar. Eine Kollokalisationsstudie sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit LAMP-1 und LIMP-2 kollokalisiert sind und dabei mögliche Unterschiede zwischen beiden Genotypen darlegen.

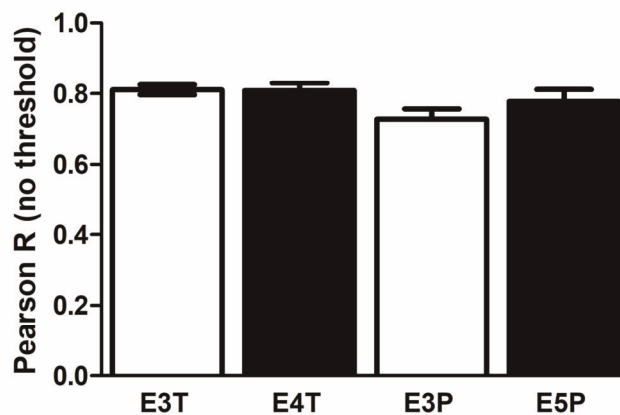


Abb. 5.7 Nachweis einer Kollokalisierung von LAMP-1 und LIMP-2

Quantifizierung der Kollokalisierung von LAMP-1 und LIMP-2 in den MEF Zelllinien E3T (DHET, T-immortal), E4T (DKO, T-immortal), E3P (DHET, P-immortal) und E5P (DKO, P-immortal). Unterschiede zwischen DHET und DKO Zelllinien waren nicht nachweisbar (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Mit ImageJ wurde der Pearsonkoeffizient R ermittelt (**Abb. 5.7**), der Aufschluss über das Ausmaß der LAMP-1 und LIMP-2 Kollokalisierung gibt. Dieser Parameter kann einen maximalen Wert von 1 annehmen, was einer 100 %igen Kollokalisierung der beiden Proteine entspricht. Für die Kollokalisierung von LIMP-2 und LAMP-1 lag dieser Wert für E3T bei 0,81, für E4T bei 0,81, für E3P bei 0,73 und für E5P bei 0,78. $Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}$ Zellen unterschieden sich damit nicht von $Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}$ Zellen in Bezug auf die Kollokalisierung von LAMP-1 und LIMP-2.

Es konnten keine Veränderungen bezüglich der lysosomalen Transportwege und Morphologie durch den Verlust von Vti1a und Vti1b nachgewiesen werden. Bei diesen Untersuchungen wurde weder das Cargo noch die Kinetik betroffener Transportprozesse

berücksichtigt. Hierzu wurden im Folgenden mögliche *downstream*-Effekte auf Signalkaskaden untersucht.

5.2 Einfluss von Vti1a und Vti1b auf die zelluläre Signaltransduktion

Die Doppeldefizienz von Vti1a und Vti1b zeigte im Vergleich zum Wildtyp bzw. DHET auf zellulärer Ebene keine Unterschiede in der Organellmorphologie. Auch die Analyse lysosomaler Transportwege war in den hier untersuchten Zellen unauffällig. *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse weisen jedoch deutliche phänotypische Unterschiede zu ihren Wurfgeschwistern auf. Diese betreffen vor allem das Skelett der Mäuse. Verschiedene Signalwege sind in der Entwicklung von Strukturen, wie Knorpel und Knochen, involviert. Signaltransduktion ist für den Organismus lebensnotwendig. Auf zellulärer Basis reguliert sie verschiedene Funktionen wie z.B. Teilung, Differenzierung, Apoptose und Migration von Zellen. Sie ermöglicht die Weiterleitung eines extrazellulären Stimulus durch z.B. Wachstumsfaktoren ins Zellinnere und löst dort eine entsprechende Reaktion aus. Die TGF/BMP-abhängige Signaltransduktion ist ein Beispiel für einen Signalweg, der für die Knochenentwicklung von Bedeutung ist (Chen *et al.*, 2012). Nach Ligandbindung am entsprechenden Rezeptor kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade, die auf der Familie der Smad-Proteine beruht (Dijke und Hill, 2012). Ein anderer Signalweg ist der MAPK-Weg, der z.B. durch die Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor stimuliert wird und intrazellulär eine Kaskade initiiert, die in der Phosphorylierung von Erk resultiert (Roskoski, 2012). Auswirkungen des Vti1a und Vti1b DKO auf den MAPK-Weg wurden erstmals durch Browski in MEF analysiert (Browski, Dissertation, 2010). Die intrazelluläre Signalaktivität, die mit der Phosphorylierung von Erk einhergeht, war in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF nicht beeinflusst. Auch die EGF-stimulierte Zellmigration war im Vergleich zu *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Zellen unauffällig. Die Untersuchung der Anzahl von EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche wies keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen auf. Auffällig war allerdings, dass nach Stimulation mit niedrigen EGF-Konzentrationen im DKO eine gegenüber der Kontrolle verringerte Menge des EGFR nachgewiesen wurde. In weitergehenden Untersuchungen wurden diese Ergebnisse verifiziert (Schmücker, Masterarbeit, 2013). Die bisherigen Ergebnisse beruhten auf der Analyse von immortalisierten Zelllinien, die den Nachteil haben, dass z.B. das immortalisierende SV40 T-Antigen, als Nebeneffekt, auch den Differenzierungszustand sowie den Phänotyp der

Zellen beeinflussen könnte (May *et al.*, 2005). Es sollten im Weiteren Experimente auf der Basis von primären Zelllinien, die dem Organismus näher sind, durchgeführt werden. Des Weiteren sollte ein Vergleich der Phänotypen von *Vti1a*- und *Vti1b*-doppeldefizienten Mäusen mit TGF- β 2 KO, TGF- β 2 und TGF- β 3 DKO, TGF- β 3 KO, BMP-7 KO und EGFR KO Mäusen vorgenommen werden. Liegen Gemeinsamkeiten vor, sollten die betroffenen Signalwege in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen analysiert werden (**Tab. 1**).

Tab. 1: Phänotypischer Vergleich der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO Mäuse mit *Tgf- β 2*^{-/-}, *Tgf- β 2*^{-/-} *Tgf- β 3*^{-/-}, *Tgf- β 2*^{+/-} *Tgf- β 3*^{-/-}, *Bmp-7*^{-/-} und *Egfr*^{-/-} Mäusen

++: beobachtet in mehr als 50 % der Fälle, +: beobachtet ohne Angabe der Häufigkeit, (+): beobachtet in 10-50 % der Fälle, --: beobachtet in weniger als 10 % der Fälle, n. u.: nicht untersucht (Schöning, Dissertation, 2014; Sanford *et al.*, 1997; Heupel *et al.*, 2008; Dünker und Kriegelstein, 2002; Jena *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1995; Miettinen *et al.*, 1999).

	<i>Vti1a</i> ^{-/-} <i>Vti1b</i> ^{-/-}	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-} <i>Tgf-β3</i> ^{-/-}	<i>Tgf-β2</i> ^{+/-} <i>Tgf-β3</i> ^{-/-}	<i>Bmp-7</i> ^{-/-}	<i>Egfr</i> ^{-/-}
Sterblichkeit	perinatal	perinatal	pränatal	perinatal	perinatal	postnatal
verringertes Gewicht	++ (E18.5)	++ (E18.5)	n. u.	+ (E18.5)	+ (P0)	n. u.
Fehlposition der Vorderpfoten	++	++	n. u.	--	--	--
<i>Spina bifida</i>	(+)	++	n. u.	--	--	n. u.
Fehlen eines Lendenwirbels	++	n. u.	n. u.	--	+	n. u.
Fehlbildung der Rippen	++	++	+	--	++	n. u.
reduziertes 13. Rippenpaar	++	--	--	--	+	n. u.
Sternum Fehlbildungen	++	(+)	+	--	+	n. u.
verzögerte Calcifizierung des Sternums	++	n. u.	n. u.	--	n. u.	n. u.
Deformation der Schlüsselbeine	++	++	n. u.	--	--	n. u.
Gaumenspalte	(+)	(+)	+	+	--	(+)

Die hier aufgeführten KO bzw. DKO Mauslinien sterben alle kurz vor bzw. kurz nach ihrer Geburt. Analysierte *Tgf- β 2*^{-/-} KO Mäuse (E18.5) zeigen eine Vielzahl an Auffälligkeiten. Da sie nicht in der Lage sind TGF- β 2 zu produzieren, fehlt ihnen ein wichtiger Ligand, der den

TGF- β -Signalweg aktivieren kann. Sie haben mit den *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO Mäusen (E18.5) eine verringerte Größe, eine Deformation der Gliedmaßen, eine *Spina bifida*, Veränderungen der Rippen, Sternum- und Schlüsselbeindeformationen sowie einen fehlenden Palatinenschluss gemeinsam (Sanford *et al.*, 1997; Heupel *et al.*, 2008). *Tgf- β 2*^{-/-} *Tgf- β 3*^{-/-} Mäuse sterben bereits im Embryonalstadium E15.5, so dass ein Vergleich nur bedingt möglich war. Diesen Mäusen fehlt zusätzlich TGF- β 3, welches auch den TGF- β -Signalweg aktivieren kann. Trotzdem ergaben sich phänotypische Übereinstimmungen wie z.B. Veränderungen der Rippen und Deformationen des Sternums (Dünker und Krieglstein, 2002). Des Weiteren konnten Dünker und Krieglstein (2002) ein vermehrtes Auftreten von Ödemen und Blutergüssen detektieren, die auch in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäusen auftreten (Schöning, Dissertation, 2014). Luo *et al.* (1997) konnten zeigen, dass BMP-7 für die Nephrogenese benötigt wird. Außerdem weisen *Bmp-7*^{-/-} Mäuse einen Augenphänotyp auf, der variabel in der Stärke der Ausprägung sein kann. BMP-7 ist ein Ligand des BMP-Signalwegs. *Bmp-7*^{-/-} KO Mäuse (P0) zeigen, ähnlich zu den *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäusen (E18.5), eine verringerte Größe, fehlende Lendenwirbel und veränderte Rippen. Zusätzlich weisen *Bmp-7*^{-/-} Mäuse Veränderungen an ihren Gliedmaßen auf (Jena *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1995). *Tgf- β 2*^{-/-} *Tgf- β 3*^{-/-} (E18.5) und *Egfr*^{-/-} Mäuse (E18.5) weisen einen fehlenden Palatinenschluss auf (Dünker und Krieglstein, 2002; Miettinen *et al.*, 1999). Dieser wurde auch für *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO Mäuse dokumentiert. Zudem konnten Miettinen *et al.* (1999) Veränderungen des Kiefers in *Egfr*^{-/-} Mäusen nachweisen. *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse zeigen ebenfalls Kieferdeformationen (Schöning, Dissertation, 2014). Aufgrund der aufgezeigten phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen Mäusen, denen Komponenten verschiedener Signalwege fehlen, und den *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Tieren, war es interessant, die Aktivität der zugehörigen Signalwege in Zellen dieses Genotyps zu untersuchen. Veränderungen der betroffenen Signalwege könnten einen Einfluss auf die beobachteten Auffälligkeiten der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse haben.

5.2.1 Untersuchung des TGF- β - und BMP-Signalwegs

Zunächst wurde getestet, ob die verwendeten Zelllinien E3T (DHET, T-immortalisierte *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} MEF), E4T (DKO, T-immortalisierte *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF), E3P (DHET, P-immortalisierte *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} MEF) und E5P (DKO, P-immortalisierte *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF) die benötigten Komponenten der zu untersuchenden Signalwege, wie Signalproteine

(Smad1/2/3/4/5/9) und zugehörige Rezeptoren (TGF- β RI, TGF- β RII, BMPRIa, BMPRII), exprimieren. Eine qualitative Analyse wurde mittels PCR durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial diente mRNA, die aus MEF isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Für den Nachweis wurden entsprechend generierte Primerpaare (siehe 3.7) eingesetzt.

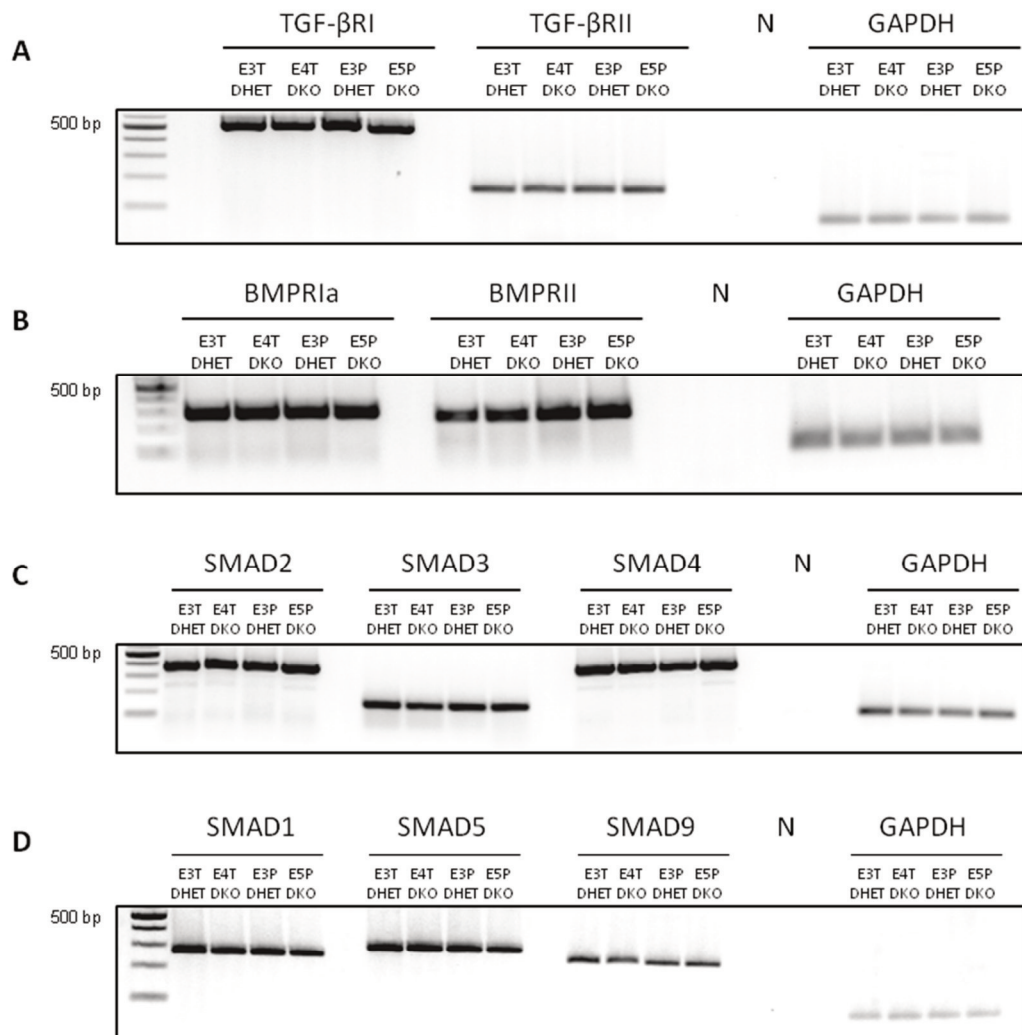


Abb. 5.8 Nachweis von TGF- β RI/II, BMPRIa/II und entsprechender Smad-Proteine in MEF Zelllinien mittels PCR

Dargestellt sind die nach PCR erhaltenen, in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennten Produkte. In A wurde auf das Vorliegen der TGF- β Rezeptoren TGF- β RI und TGF- β RII getestet und in B auf das der BMP-Rezeptoren. In C und D wurde die Expression der unterschiedlichen Smad-Proteine nachgewiesen. Der Nachweis von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) diente als Positivkontrolle. N ist die Abkürzung für Negativkontrolle. Diese enthielt Millipore-H₂O anstatt cDNA. Für alle getesteten Signalwegskomponenten wurden PCR-Produkte nachgewiesen.

Anhand der in **Abb. 5.8** gezeigten PCR-Produkte wurde eine Expression der Signalproteine sowohl in DHET als auch in DKO MEF verifiziert. Für den TGF- β -Signalweg sind das die

Rezeptoren TGF- β RI und TGF- β RII mit einer erwarteten Produktgröße von 525 bp und 178 bp (**Abb. 5.8A**). Die entsprechenden Signalproteine sind Smad2, Smad3 und Smad4, dessen PCR-Produkte eine Größe von 371 bp, 153 bp und 391 bp haben sollten (**Abb. 5.8C**). BMPRIa und BMPRII sind zwei Rezeptoren des BMP-Signalwegs. Die PCR-Produkte sollten 301 bp und 265 bp groß sein (**Abb. 5.8B**). Smad1, Smad5 und Smad9 sind die entsprechenden, durch die Rezeptoren phosphorylierten Signalproteine, deren Transkripte bzw. PCR-Produkte eine Größe von 271 bp, 312 bp und 256 bp (**Abb. 5.8D**) aufweisen sollten. So konnten sowohl für den TGF- β - als auch für den BMP-Signalweg alle getesteten Transkripte, d.h. alle Rezeptortypen und Smads, nachgewiesen werden. Die Zelllinien E3T und E4T sind T-immortalisiert, während E3P und E5P P-immortalisiert sind. Die Immortalisierungsstrategie hatte keine Auswirkungen auf die Expression.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Phänotypen der KO bzw. DKO Mäuse wurden die meisten Übereinstimmungen der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO Mäuse mit den *Tgf- β 2*^{-/-} KO Mäusen dokumentiert. Sie hatten eine Fehlposition der Vorderpfoten, eine Spina bifida, Fehlbildungen der Rippen und des Sternums, eine Deformation der Schlüsselbeine und eine Gaumenspalte gemeinsam (siehe **Tab. 1**). Die untersuchten Komponenten der Signalwege konnten nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurden die intrazellulären Aktivitäten des TGF- β - und des BMP-Signalwegs untersucht. Als erstes wurde die TGF- β 2-Signalaktivität in *Vti1a*- und *Vti1b*-defizienten MEF untersucht. Für diesen Assay wurden primäre MEF aus mausembryonaler Haut (E18.5) isoliert, kultiviert und für vier Stunden gehungert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Liganden TGF- β 2 stimuliert und die Signalaktivität nach definierten Zeiträumen durch die Quantifizierung der resultierenden Smad2 Phosphorylierung (pSmad2) in Relation zu Smad2 im Western Blot untersucht.

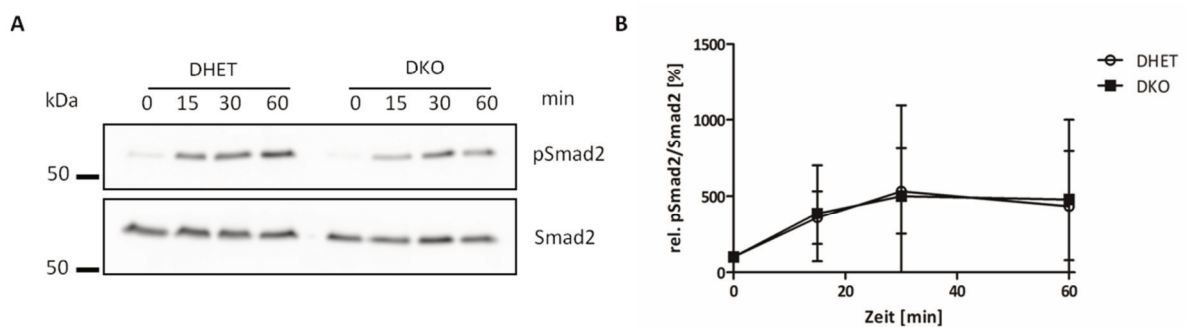


Abb. 5.9 Stimulation primärer MEF mit TGF- β 2

In A ist ein repräsentativer Western Blot der über 60 min andauernden TGF- β 2 Stimulation dargestellt. Nachgewiesen wurde pSmad2 und Smad2 (60 kDa). Die Quantifizierung in B zeigte keine Unterschiede zwischen DHET und DKO Zellen. Die Standardabweichung ist anhand der Fehlerbalken zu sehen (n=3).

Nach Stimulation mit TGF- β 2 wurde sowohl für die DHET als auch für die DKO Zellen ein Anstieg des pSmad2 Levels detektiert. Bei 30 min wurde der höchste Wert gemessen (**Abb. 5.9**). Zwischen 30 min und 60 min war ein leichter Abfall zu erkennen. Für beide Genotypen wurde ein nahezu identischer Verlauf dokumentiert. Obwohl die phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen TGF- β 2-defizienten und *Vti1a*- und *Vti1b*-defizienten Mäusen vorhanden sind, war die Signaltransduktionsaktivität in DKO Zellen normal.

Neben TGF- β 2 ist TGF- β 1 ein weiterer Ligand des TGF- β -Rezeptors. Auch wenn die benötigten Signalproteine die gleichen sind, ist die initiale Bindung der beiden Liganden an den Rezeptoren unterschiedlich. TGF- β 2 braucht eine Kombination aus beiden Rezeptortypen (Typ I und Typ II), während für TGF- β 1 ein Rezeptortyp ausreichend ist (Boesen *et al.*, 2002; Hart *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Differenzen könnte auch die *Vti1a*- und *Vti1b*-Doppeldefizienz einen unterschiedlichen Einfluss haben. So sollten mit TGF- β 1 ebenfalls Stimulationsexperimente durchgeführt werden.

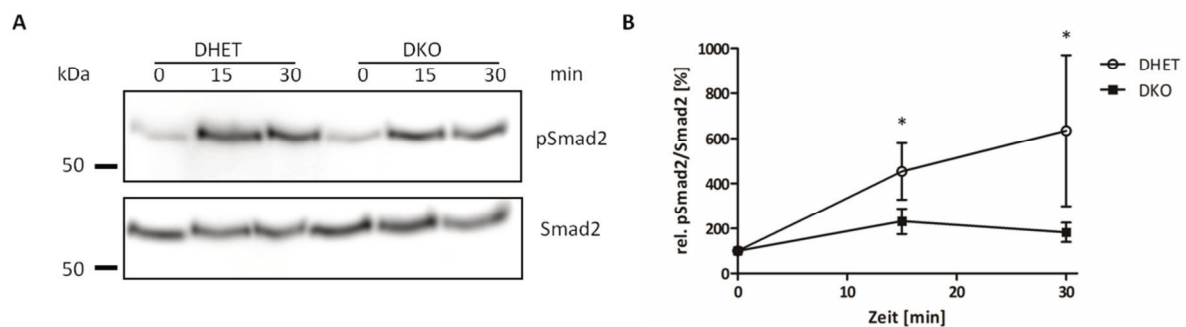


Abb. 5.10 Stimulation primärer MEF mit TGF- β 1

Gezeigt ist die Stimulation der *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} DHET und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO MEF mit TGF- β 1 über einen Zeitraum von 30 min. In A ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt. Die Quantifizierung von pSmad2 und Smad2 (60 kDa) erfolgte in B. *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen zeigten nach 15 und 30 min ein signifikant niedrigeres pSmad2/Smad2-Verhältnis (ungepaarter t-Test, n=4, zweiflächig, *=p<0,05).

Ähnlich wie bei den Versuchen mit TGF- β 2 wurde nach 15 minütiger Stimulation mit TGF- β 1 ein Anstieg des pSmad2/Smad2 Levels bei beiden Genotypen beobachtet (**Abb. 5.10**). Die Steigung fällt im DHET deutlich stärker aus als im DKO und setzt sich bis 30 min weiter fort. Im DKO wurde bereits nach 15 min ein maximaler Wert des pSmad2/Smad2 Levels erreicht. Die beschriebenen Unterschiede im pSmad2/Smad2 Level zwischen DHET und DKO waren, im Gegensatz zur Stimulation mit TGF- β 2, sowohl bei 15 min als auch bei 30 min signifikant. Da beide Liganden an die gleichen Rezeptoren binden, könnte der Unterschied eventuell auf

die initiale Rezeptorbindung oder eine generell unterschiedliche Bindungsaffinität zurückzuführen sein.

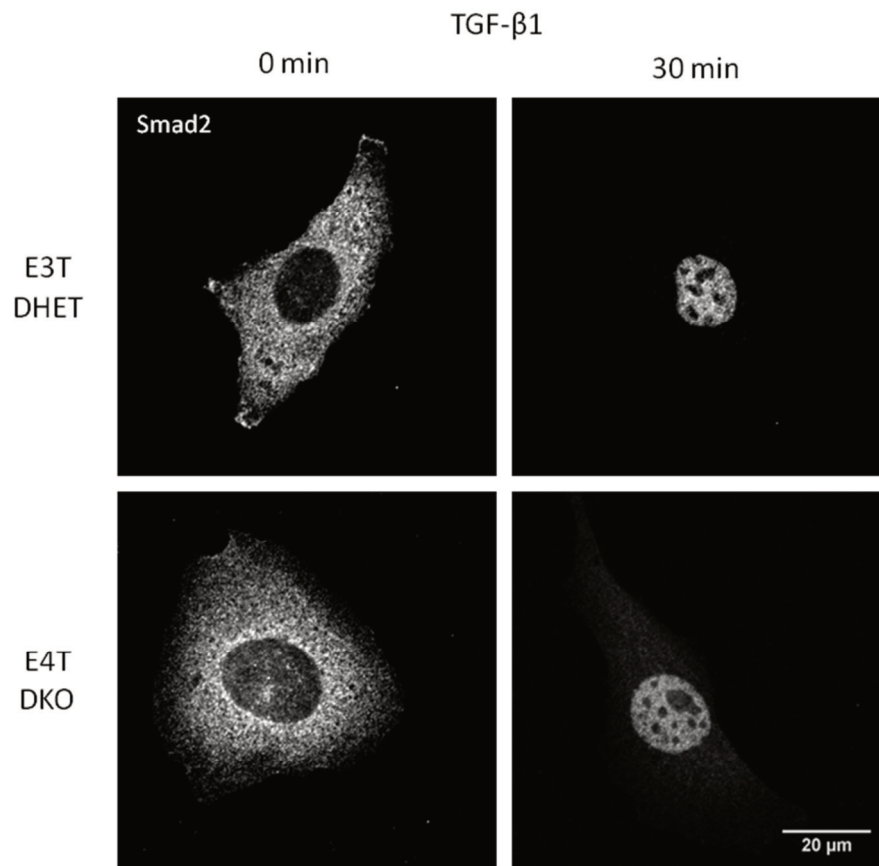


Abb. 5.11 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Smad2 in MEF

Immunzytochemie von Smad2 in *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF unter unstimulierten Bedingungen (0 min) und nach 30 minütiger Stimulation mit TGF- β 1. Das zunächst im Zytoplasma lokalisierte Smad2 war nach Zugabe von TGF- β 1 im Zellkern lokalisiert. 400fache Vergrößerung, Maßstab entspricht 20 μ m.

Im Folgenden wurde überprüft, ob die im Western Blot detektierte Phosphorylierung der Smads in beiden Genotypen gleichermaßen mit einer Translokation der phosphorylierten Variante in den Zellkern korrespondiert. Hierfür bietet sich die Immunzytochemie an, die eine subzelluläre Auflösung ermöglicht. Nach 30 minütiger Stimulation von MEF mit TGF- β 1 sollte die Translokation von Smad2 in den Zellkern nachweisbar sein, welches mittels Antikörper detektiert wurde. Im DKO und im DHET war Smad2 zum Zeitpunkt 0 min im Zytoplasma der Zellen als punktuelle Strukturen detektierbar. Eine 30 minütige Stimulation mit TGF- β 1 führte zu der in der Literatur beschriebenen Translokation des Proteins in den Zellkern (Dijke und Hill, 2004). Der im Western Blot gezeigte Effekt, ein verringertes pSmad2/Smad2 Verhältnis in *Vti1a*- und *Vti1b*-doppeldefizienten Zellen, hatte keine Folgen

für die sich anschließende Smad2-Translokation. Eine quantitative Auswertung dieses Vorgangs war aufgrund der Variabilität einzelner Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch nicht möglich. In einer von mir betreuten Bachelorarbeit wurde dieser Vorgang daher durch eine Zellkernisolation quantifiziert (Dörr, Bachelorarbeit, 2017). Dabei zeigten *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Zellen nach 30 minütiger Stimulation mit TGF-β1 ein höheres Kern/Zytosol Verhältnis von Smad2 im Vergleich zu *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen. Die ermittelten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien waren nicht signifikant.

Die durch TGF-β1 induzierte Signalaktivität, detektiert durch das pSmad2/Smad2 Level, scheint bei Fehlen von Vti1a und Vti1b gestört zu sein. Ein möglicher Mechanismus wäre eine Veränderung der Sortierung des Rezeptors nach Stimulation. Nach Bindung des Liganden am Rezeptor wird der Ligand-Rezeptor-Komplex unter anderem Clathrin-abhängig endozytiert. Dieser akkumuliert in den frühen Endosomen. Hier erfolgt die Signalweitergabe durch die rezeptorabhängige Phosphorylierung der Smads (Hayes *et al.*, 2002). Der Rezeptor wird im Anschluss degradiert oder zurück zur Zytoplasmamembran transportiert (*Recycling*). Es sollte untersucht werden, ob in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen ein Internalisierungsdefekt vorliegt. Mit Durchflusszytometrie wurde daher die Internalisierungsrate des Ligand-Rezeptor-Komplexes in *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} DHET und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO MEF nach 30 minütiger Stimulation mit TGF-β1 ermittelt. Die Zellen wurden mit einem Phycoerythrin gekoppelten Anti-TGF-βRII-Antikörper inkubiert, der die Detektion des TGF-β-Rezeptors anhand des Fluoreszenz-Signals ermöglichte. Von den im Durchflusszytometer detektierten Zellen, wurde für die nachfolgenden Messungen zunächst die geeignetste Population gewählt (*gating*).

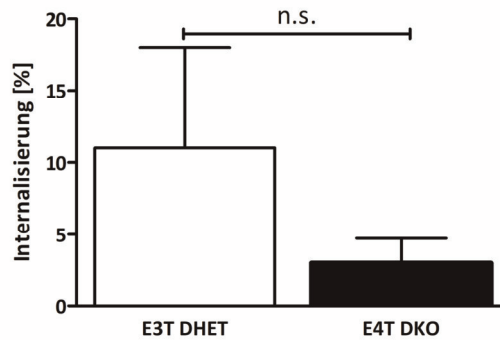


Abb. 5.12 Bestimmung der Internalisierungsrate des TGF- β Rezeptors in MEF

Gezeigt ist die mit Durchflusszytometrie bestimmte Internalisierungsrate des Ligand-Rezeptorkomplexes in T-immortalisierten DHET und DKO MEF. Die Zellen wurden hierfür 30 min mit TGF- β 1 stimuliert. Die Detektion erfolgte mittels Phycoerythrin gekoppeltem Anti-TGF- β RII-Antikörper (FL2). Vor der eigentlichen Messung wurde durch das *gating* die geeignetste Zellpopulation ausgewählt. Nach 30 minütiger Stimulation mit TGF- β 1 wurde eine Internalisierungsrate von 11 % für DHET und 3 % für DKO Zellen ermittelt. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (ungepaarter t-Test, n=3, zweiflächig, n.s.=nicht signifikant).

Das bei 0 min ermittelte Fluoreszenzsignal spiegelte den *steady state*- bzw. den Ausgangszustand wieder. Die Differenz zwischen den gemessenen Signalen bei 0 min und bei 30 min entsprach der Menge an internalisierten Rezeptoren, die auf den Ausgangszustand normiert wurde. Die so bestimmte Internalisierungsrate des TGF- β Rezeptors betrug für die DHET MEF 11 % und für die DKO MEF 3 % (**Abb. 5.12**). Dies war für beide Genotypen eine unerwartet niedrige Rate. Der Unterschied zwischen DHET und DKO Zellen war nicht signifikant. Dieser Prozess scheint durch den Verlust von Vti1a und Vti1b nicht nachweislich beeinflusst zu sein.

Neben einer veränderten Transkription könnten Vti1a und Vti1b auch einen Einfluss auf die Translation und den *turnover* der Smads nehmen. Um dies zu untersuchen, wurde beispielhaft das Vorkommen von Smad3, in den mausembryonalen Organen (E18.5) Haut, Herz, Leber, Lunge und Niere sowie in Paraffinschnitten von Embryonen (E15.5 und E18.5) analysiert (**Abb. 5.13**).

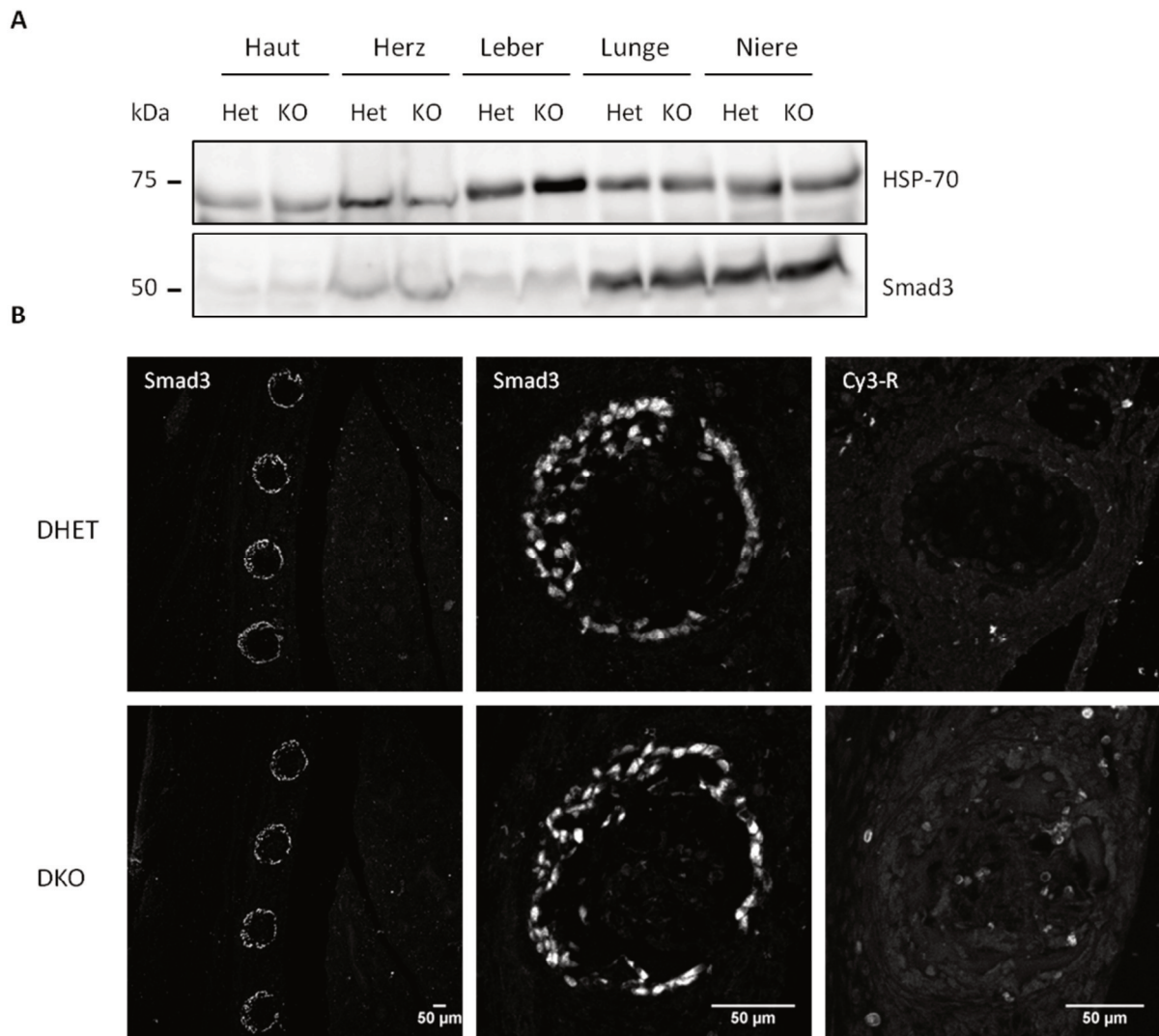


Abb. 5.13 Nachweis von Smad3 in Organen und Geweben

Nachweis von Smad3 (52 kDa) in den Organen Haut, Herz, Leber, Lunge und Niere. Diese wurden Mausembryonen (E18.5) entnommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (A). Unabhängig vom Genotyp wurde Smad3 in den getesteten Geweben nachgewiesen. B zeigt die immunhistologische Untersuchung von E15.5 Mausembryonen zur Expression von Smad3. Eine besonders hohe Expression wurde in verknöcherten Strukturen der Rippen detektiert. Als Negativkontrolle wurden die Gewebeproben ausschließlich mit dem sekundären Antikörper (Cy3-R) inkubiert. Konfokale Übersicht- und Detail-Aufnahmen, 100fache Vergrößerung, Maßstab entspricht 50 μm .

Eine starke Smad3 Expression wurde in den mausembryonalen Organen (E18.5) Lunge und Niere detektiert, wohingegen diese in Herz, Leber und Haut vergleichsweise schwächer ausfiel (**Abb. 5.13A**). Die histologische Untersuchung von E15.5 Mausembryonen ergab starke Smad3 Signale in verknöcherten Strukturen (**Abb. 5.13B**). Des Weiteren konnte in Mausembryonen (E18.5) eine Expression in knorpeligem Gewebe nachgewiesen werden (siehe Anhang, **Abb. 9.1**). Deutliche Unterschiede im Expressionslevel von Smad3 zwischen *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Tieren ergaben sich nicht.

Neben den Signalwegen, die durch Liganden der TGF- β -Familie aktiviert werden, gibt es weitere, BMP-abhängige Signaltransduktionen. Prinzipiell laufen diese auf ähnliche Weise ab, indem ein BMP-Ligand am -Rezeptor bindet und dadurch die Smad-abhängige Signalkaskade aktiviert. Wo beim TGF- β Signalweg die R-Smads Smad2 und Smad3 eine Rolle spielen, sind es beim BMP-Rezeptor Smad1, Smad5 und Smad9 (Dijke und Hill, 2004). Weitere phänotypische Übereinstimmungen der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO wurden mit BMP-7 KO Mäusen dokumentiert. Beide Mauslinien weisen einen fehlenden Lendenwirbel sowie eine Fehlbildung der Rippen und des Sternums auf (siehe **Tab. 1**). Daher stellte sich die Frage, ob dieser Signalweg durch den Verlust der beiden SNARE-Proteine beeinflusst wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF mit verschiedenen BMPs stimuliert. Ausgewählt wurden neben BMP-7 auch die homologen Proteine BMP-2 und BMP-4. Nach Stimulation wurde die resultierende Smad1/5/9 Phosphorylierung gemessen.

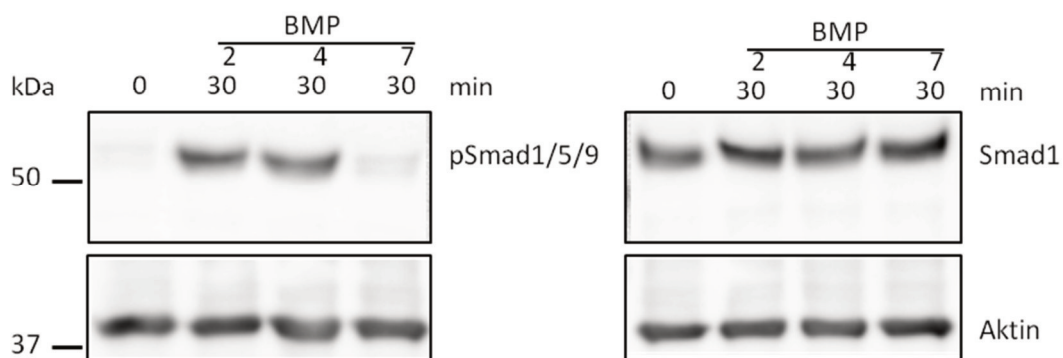


Abb. 5.141 Stimulation T-immortaler DHET MEF mit BMP-2,-4 und -7

Dargestellt ist die Stimulation der T-immortalisierten DHET MEF mit BMP-2, -4 und -7 für 30 min und der anschließende Nachweis von pSmad1/5/9 und Smad1 (60 kDa) im Western Blot. Als Ladekontrolle wurde Aktin (42 kDa) verwendet. Bis auf die Stimulation mit BMP-7 wurden für alle weiteren Ansätze pSmad1/5/9-Signale detektiert.

Nach 30 minütiger Stimulation mit BMP-2 und BMP-4 waren pSmad1/5/9 Signale auf dem Western Blot detektierbar (**Abb. 5.14**). Die Stimulation mit BMP-7 war nicht erfolgreich, da ausschließlich Smad1 und nicht, wie erwartet, die phosphorylierte Variante dieses Proteins, nachgewiesen wurde. Signale für die Ladekontrolle Aktin waren für alle Stimulationen gleichermaßen vorhanden. Da BMP-7 in MEF scheinbar nicht zu einem messbaren pSmad1/5/9 Level führte, war es für weitere Stimulationen in diesem Zellsystem ungeeignet. Da BMP-2, analog zu BMP-7, eine Rolle bei der Knochenentwicklung spielt (Chen *et al.*,

2012), wurde im Folgenden die Signalaktivität in *Vti1a*- und *Vti1b*-defizienten MEF nach 15 und 30 minütiger Stimulation mit BMP-2 untersucht.

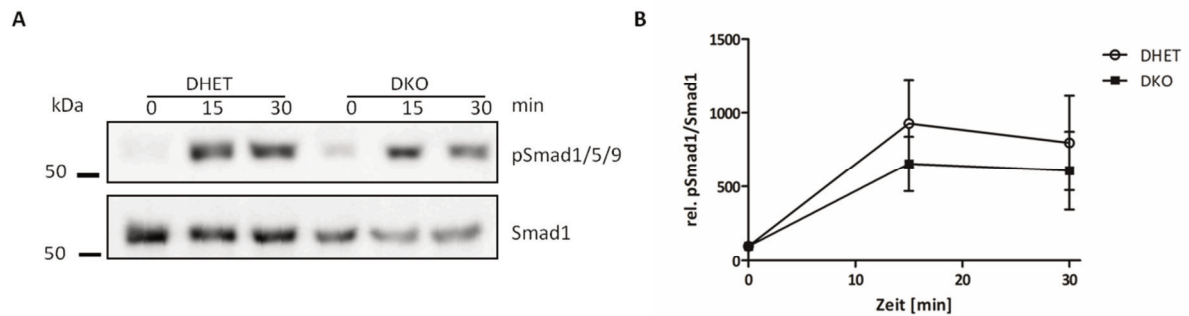


Abb. 5.15 Stimulation primärer MEF mit BMP-2

Stimulation der *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} DHET und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO MEF mit BMP-2 für 0, 15 und 30 min. Der Nachweis von pSmad1/5/9 und Smad1 (60 kDa) erfolgte im Western Blot (A). B zeigt die Quantifizierung der gemessenen Signale inklusive der Standardabweichung, die als Fehlerbalken angegeben ist. DKO MEF zeigten im Vergleich zu DHET MEF ein nicht signifikant (ungepaarter t-Test, n=3, zweiflächtig) verringertes pSmad1/5/9 Level nach 15 bzw. 30 min Stimulation mit BMP-2.

Nach Stimulation mit BMP-2 wurde in beiden Zelllinien zum Zeitpunkt t=15 min ein maximaler Wert des pSmad1/5/9 Levels detektiert (**Abb. 5.15**). Nach 15 min fiel dieses Proteinlevel leicht ab. Der Verlauf des Graphen war bei beiden Genotypen ähnlich, wobei die *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF zu den beiden Zeitpunkten im Vergleich zum DKO ein nicht signifikant geringeres pSmad1/5/9 Niveau aufwiesen.

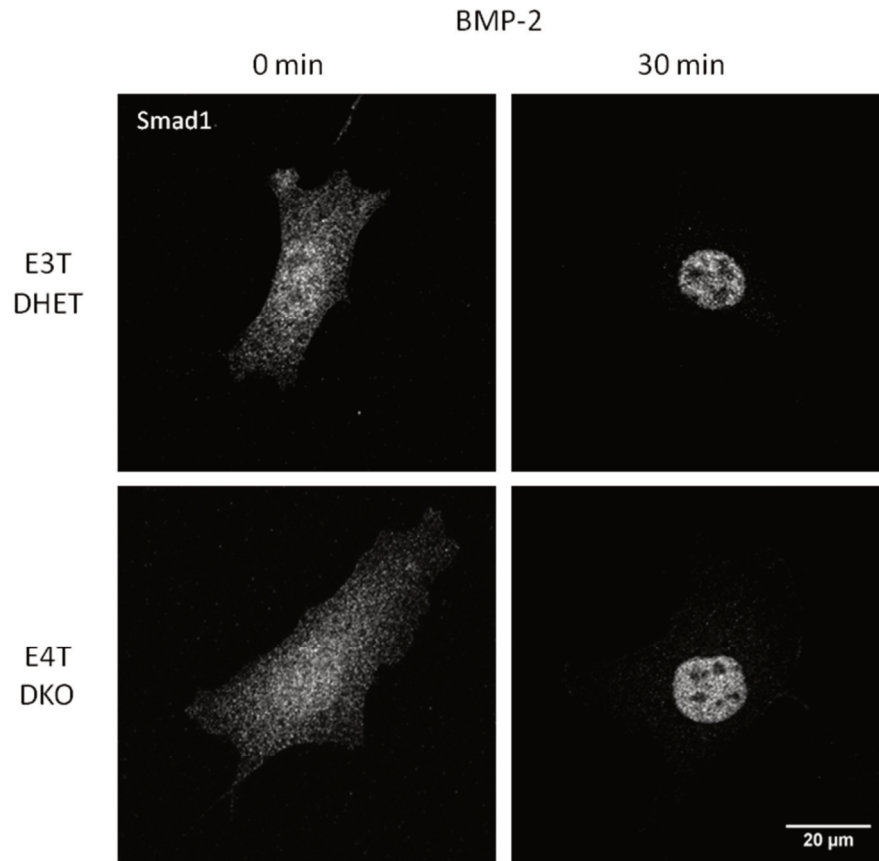


Abb. 5.16 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Smad1 in MEF

Gehungerte DHET und DKO MEF wurden für 0 und 30 min mit BMP-2 stimuliert und mittels Smad1 Antikörper gefärbt. Im unstimulierten Zustand war Smad1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektierbar. Nach 30 minütiger Stimulation war Smad1 ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Konfokale Aufnahmen, 400fache Vergrößerung, Maßstab entspricht 20 µm.

Für BMP-2 sollte analog zu TGF- β 1 eine Immunzytochemie Aufschluss über die subzelluläre Verteilung von Smad1 nach Stimulation zu den Zeitpunkten 0 min und 30 min liefern (**Abb. 5.16**). Sowohl in DHET als auch in DKO Zellen wurde Smad1 in punktförmigen Strukturen gesehen. Vor der Zugabe des Stimulans war Smad1 sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma detektierbar und nach 30 minütiger Zugabe von BMP-2 war Smad1 ausschließlich im Zellkern der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} sowie *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Zellen nachweisbar. Unterschiede zwischen den beiden Genotypen waren nicht detektierbar. Anschließend wurde dieser Prozess mittels Zellkernisolation quantifiziert (siehe Anhang, **Abb. 9.2**). Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden getesteten Genotypen detektiert, so dass der Verlust von *Vti1a* und *Vti1b* vermutlich keinen Einfluss auf die Translokation von Smad1 hat. Nach den ersten Untersuchungen in MEF sollten weitere in einem spezialisierten Zelltyp erfolgen. Knochengewebe kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen

entstehen. Ein Großteil der Schädelknochen wird durch desmale Ossifikation gebildet. Hierbei entsteht das Knochengewebe direkt aus mesenchymalen Zellen, wohingegen sich die chondrale Ossifikation durch ein zunächst knorpelig angelegtes Skelett auszeichnet, bevor es in einem komplexen Vorgang durch knöchiges Gewebe ersetzt wird (Berendsen *et al.*, 2015). Da sich das murine Skelett größtenteils durch chondrale Ossifikation entwickelt und vor allem an diesen Veränderungen im Vti1a- und Vti1b-DKO nachgewiesen wurden, die z.B. das Sternum oder die Rippen betrafen (Schöning, Dissertation, 2014), wurden Chondrozyten als zelluläres Modell für weitere Untersuchungen gewählt. Chondrozyten sind der Hauptzelltyp im Knorpelgewebe. Hierzu musste zunächst die Präparation dieses Zelltyps etabliert werden. Das Brustbein von Mausembryonen (E18.5) wird dabei entnommen, von anhängendem Muskelgewebe weitestgehend befreit und durch Kollagenase abgebaut. Die daraus resultierenden Chondrozyten werden in Kultur genommen. Für die Validierung der Reinheit dieser Zellkulturen wurde eine histologisch etablierte Alzianblaufärbung und eine auf Antikörper beruhende Immunfluoreszenz gegen Kollagen Typ II vorgenommen (**Abb. 5.17**). Als Negativkontrolle dienten primäre Fibroblasten, die aus der Haut der entsprechenden Mausembryonen (E18.5) gewonnen wurden. Ausschließlich Chondrozyten sollten für die angewandten Färbungen Signale aufweisen.

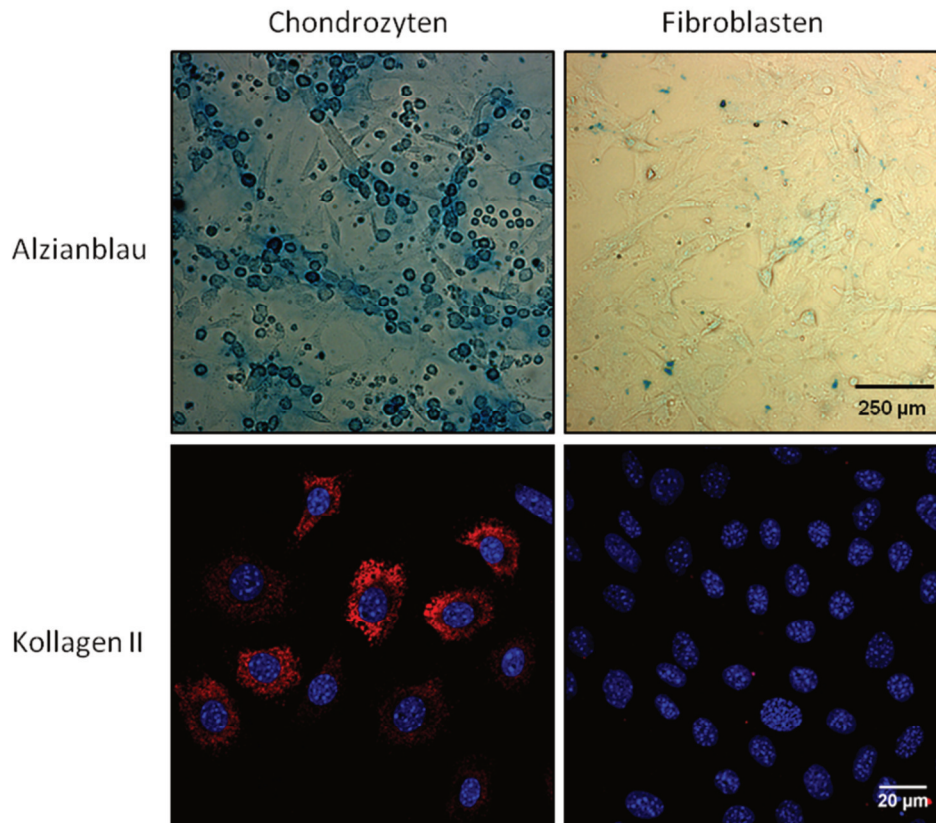


Abb. 5.17 Alzianblau- und Kollagen II-Färbung von Chondrozyten und primären MEF

Färbung von Chondrozyten und primären MEF (Negativkontrolle) mit Alzianblau und Kollagen II. Alzianblau färbt saure Polysaccharide bei niedrigem pH-Wert blau an, wie es bei den gezeigten Chondrozyten zu sehen war. Kollagen II (Cy3/rot) wird typischerweise von Chondrozyten produziert und sekretiert. Es wurde mittels eines spezifischen Antikörpers in diesen Zellen detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Lichtmikroskopische und konfokale Aufnahmen, Maßstab entspricht 250 µm bzw. 20 µm.

Die Färbung saurer Polysaccharide mittels Alzianblau ermöglicht die Identifizierung von Chondrozyten, wohingegen sich Fibroblasten nicht färben lassen. Letztere können allerdings als Verunreinigung in den präparierten Chondrozyten-Kulturen vorkommen. Ausschließlich Chondrozyten zeigten eine blaue Färbung außerhalb des Zellkörpers, was auf sekretierte, saure Polysaccharide hindeutet. Die Synthese von Kollagen Typ II ist spezifisch für Chondrozyten. Mittels des Kollagen II-Antikörpers wurde eine zytoplasmatische Färbung in den Zellen detektiert. In der Literatur wurde die beschriebene, subzelluläre Verteilung ebenso nachgewiesen und auf das Typ II Prokollagen zurückgeführt, welches in großen Vesikeln verpackt zu sein scheint (Mark *et al.*, 1977). In MEF ist Kollagen Typ II nicht exprimiert, so dass mittels dieser Methode die Reinheit der Kulturen bestimmt werden konnte. Die primären Chondrozyten Kulturen wiesen nur selten MEF auf, so dass sie als Modellsystem verwendet werden konnten. Analog zu den Analysen in MEF sollten die

Signalwege durch Stimulation mit BMP-7, TGF- β 1 und BMP-2 in Chondrozyten untersucht werden. *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} DKO Mäuse und BMP-7 KO Mäuse weisen einen fehlenden Lendenwirbel sowie eine Fehlbildung der Rippen und des Sternums auf (siehe **Tab. 1**). Aufgrund dieser phänotypischen Ähnlichkeiten wurden *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Chondrozyten zusätzlich mit BMP-7 stimuliert und die resultierende Signalaktivität bestimmt.

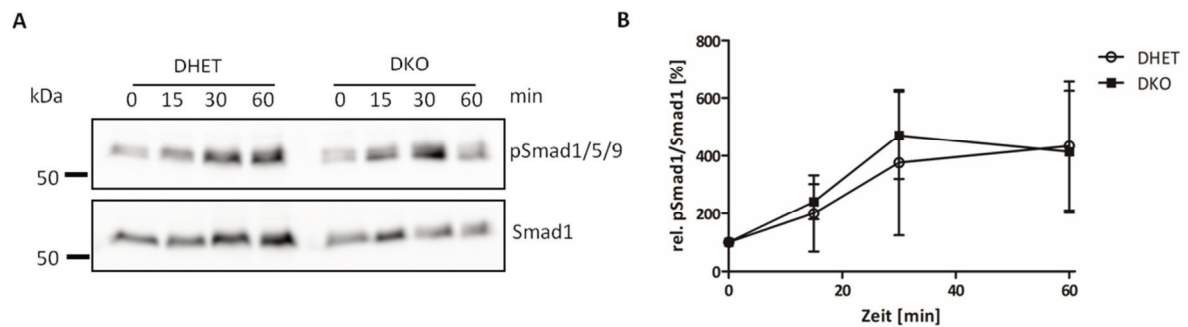


Abb. 5.18 Stimulation von Chondrozyten mit BMP-7

A zeigt einen repräsentativen Western Blot einer Stimulation mit BMP-7 von DHET und DKO Chondrozyten über einen Zeitraum von 60 min. Nachgewiesen wurden pSmad1/5/9 und Smad1 (60 kDa). Die zugehörige quantitative Auswertung ist in B gezeigt und weist keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen auf (n=3). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Im Gegensatz zur Stimulation mit BMP-7 in MEF konnte in Chondrozyten ein pSmad1/5/9 Signal detektiert und analysiert werden (**Abb. 5.18**). Der Grund für die unterschiedliche Reaktion der beiden Zelltypen auf BMP-7 konnte nicht abschließend geklärt werden. Für die Untersuchung der Chondrozyten wurde ein Stimulationszeitraum von 0 bis 30 min gewählt. Der maximale Wert des pSmad1/5/9-Levels wurde in dieser Zeitspanne nicht erreicht. Daher wurde der Stimulationszeitraum auf 60 min erweitert. Erst so war zumindest für die *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen nach 30 min ein Abfall des pSmad1/5/9 Levels zu erkennen. Der Verlauf der Graphen war bei DHET und DKO Chondrozyten ähnlich und die Unterschiede nur minimal. Im Folgenden sollte die Stimulation mit TGF- β 1 und BMP-2, analog zu den Analysen in MEF, durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob der Verlust von *Vti1a* und *Vti1b* auch Auswirkungen auf die Signalwege in Chondrozyten zeigt.

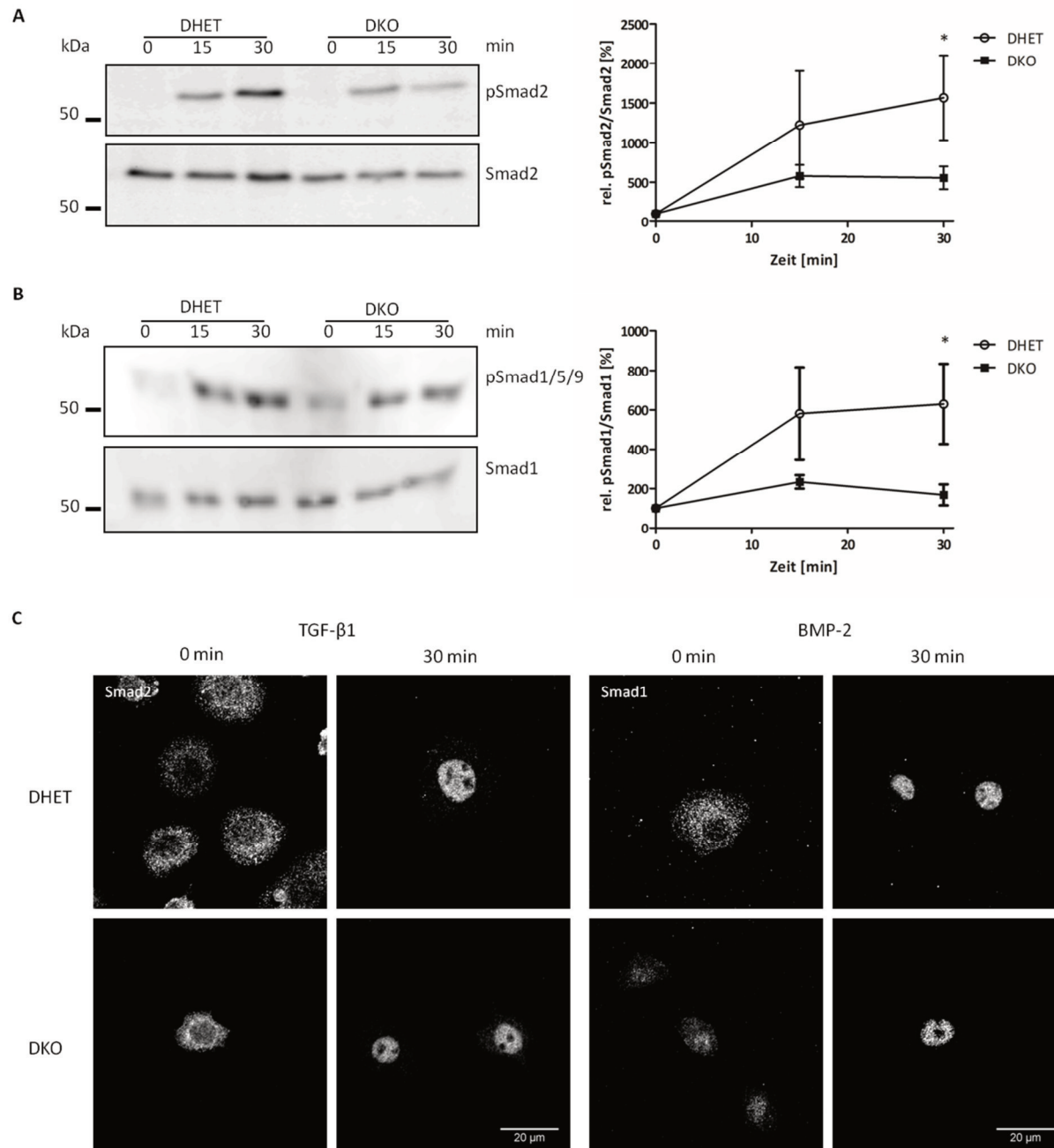


Abb. 5.19 Stimulation von Chondrozyten mit TGF- β 1 und BMP-2

In A sind der repräsentative Western Blot und die zugehörige Quantifizierung der mit TGF- β 1 stimulierten DHET und DKO Chondrozyten gezeigt. Analog dazu wurden in B Chondrozyten beider Genotypen mit BMP-2 stimuliert. Sowohl für die TGF- β 1 als auch für die BMP-2 Stimulation wurde in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen nach 30 min ein signifikant verringertes pSmad Signal detektiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (t-Test, n=3, ungepaart, zweiflächig, *= $p < 0,05$). Mittels Immunfluoreszenz (C) wurden Smad2 bzw. Smad1 intrazellulär mit und ohne Zugabe von TGF- β 1 und BMP-2 dargestellt. Konfokale Aufnahmen, 400fach vergrößert, Maßstab entspricht 20 μ m.

In Chondrozyten ließen sich die bereits in MEF gezeigten signifikanten Unterschiede zwischen *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} und *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Zellen bei der TGF- β 1 Stimulation bestätigen (Abb. 5.19A). Im Gegensatz zu den in den MEF erhaltenen Ergebnissen zeigten die BMP-2

Stimulationen signifikante Unterschiede im Phosphorylierungsstatus von Smad1 (**Abb. 5.19B**). Während die DHET Chondrozyten einen schnellen Anstieg des pSmad1/5/9- und des pSmad2-Levels in den ersten 15 min der BMP2- und TGF- β 1-Stimulation aufwiesen, war dieser in den entsprechenden DKO Chondrozyten deutlich langsamer. Selbst nach dem 15 min-Wert war für die DHET Chondrozyten ein weiterer Anstieg zu verzeichnen, wohingegen das pSmad-Level im DKO zu diesem Zeitpunkt bereits abfiel. In der rein qualitativ durchgeführten Immunfluoreszenz wurden die R-Smad-Proteine im unstimulierten Zustand als punktuelle Strukturen im Zytoplasma detektiert (**Abb. 5.19C**). Nach 30 minütiger Stimulation wurden die Smad-Proteine hauptsächlich im Nukleus der Zellen nachgewiesen. Analog zu den immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen in MEF war auch hier Smad1 im unstimulierten Zustand bereits im Zellkern detektierbar. *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Chondrozyten verhielten sich ähnlich zu *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Chondrozyten.

Neben Auffälligkeiten am Skelett der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse wurden weitere Veränderungen am Schädel der Tiere gezeigt. Schöning konnte z.B. eine Gaumenspalte nachweisen (Dissertation, 2014), die in weiteren Experimenten verifiziert wurde. Diese betrifft 50 % der DKO Tiere (DKO n=10, DHET n=6). Zudem waren die Schädel der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse kleiner als die der *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Wurfgeschwister. Die Kieferknochen der DKO Tiere waren zudem deformiert (Schöning, Dissertation, 2014). Diese Knochenarten entstehen durch desmale Ossifikation, bei der keine Knorpelvorstufe gebildet wird, daher sollten Osteoblasten zur Untersuchung herangezogen werden. Hierfür musste die Präparation dieses Zelltyps etabliert werden. Osteoblasten wurden aus Schädeldecken der Embryonen (E18.5) isoliert und mittels Osteocalcin, einem entsprechenden Markerprotein (Raymond *et al.*, 1999), immunfluoreszenzmikroskopisch identifiziert (**Abb. 5.20**).

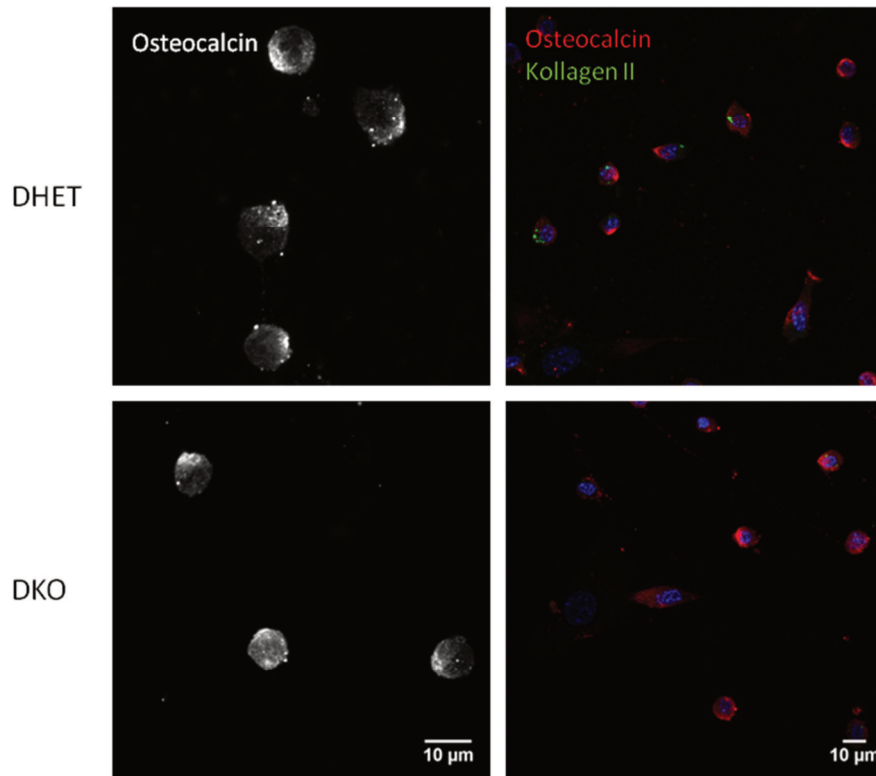


Abb. 5.20 Immunzytochemie von Osteocalcin in murinen Osteoblasten

Gezeigt sind DHET und DKO Osteoblasten, die aus den Schädeldecken von Mäusen (E18.5) isoliert wurden. Durch den Nachweis von Osteocalcin (Cy3/rot), einem Osteoblasten-spezifischen Protein, erfolgte die Verifizierung der Qualität der Kulturen. Die Färbung mit Kollagen Typ II (Cy2/grün) ermöglichte die Abgrenzung von Chondrozyten. Die Zellkernfärbung wurde mittels Hoechst (blau) vorgenommen. Konfokale Aufnahmen, 400fache Vergrößerung, Maßstab entspricht 10 µm.

Osteocalcin ist in den isolierten *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Osteoblasten nachweisbar. Eine organellspezifische Lokalisation war nicht zu erkennen. In den Zellen wurde ein schwaches Kollagen II Signal detektiert. DHET und DKO Osteoblasten unterschieden sich nicht. In weiteren Experimenten könnte eine detaillierte Analyse dieses Zelltyps erfolgen, indem die Auswirkungen des gleichzeitigen *Vti1a*- und *Vti1b*-Verlusts auf verschiedene Signalwege untersucht werden.

Um Signaltransduktion zu initiieren, werden Liganden benötigt, die an membranständige Rezeptoren binden. Diese Liganden werden intrazellulär synthetisiert, über vesikuläre Mechanismen transportiert und abschließend sekretiert. Diese Vorgänge benötigen Membranfusionen, so dass ein Verlust von *Vti1a* und *Vti1b* Auswirkungen auf den Transport von Liganden haben könnte. Um diese Prozesse in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen zu untersuchen, wurde ein Reporterprotein als Modellsystem verwendet. Dieses beinhaltet das *human growth hormone* und eine mutierte Variante des FKBP Proteins, welches intrazellulär

reversible Dimere bildet. Werden mehrere solcher FKBP-Domänen hintereinander geschaltet, kommt es zur Bildung von großen Aggregaten, die das ER nicht verlassen können. Nach Zugabe von Rapamycin werden diese Dimere bzw. Aggregate aufgelöst, das Reporterprotein anterograd vom ER zum Golgi transportiert und anschließend sekretiert. Die Verwendung eines GFPs ermöglicht die Detektion. Dafür kann entweder die Zunahme des GFP-Signals im Medium bestimmt oder der intrazelluläre Transport mikroskopisch in Echtzeit verfolgt werden (Gorden *et al.*, 2010). Da die Detektion der GFP-Zunahme bisher nicht etabliert werden konnte, wurde die GFP-Halbwertszeit in den Zellen mittels *live cell imaging* gemessen. Für dieses Experiment wurden MEF beider Genotypen in Kammerdeckgläser ausgesät und mit dem Reporterkonstrukt transfiziert (**Abb. 5.21**). Die Messung wurde durch Zugabe von Rapamycin (=0 min) gestartet.

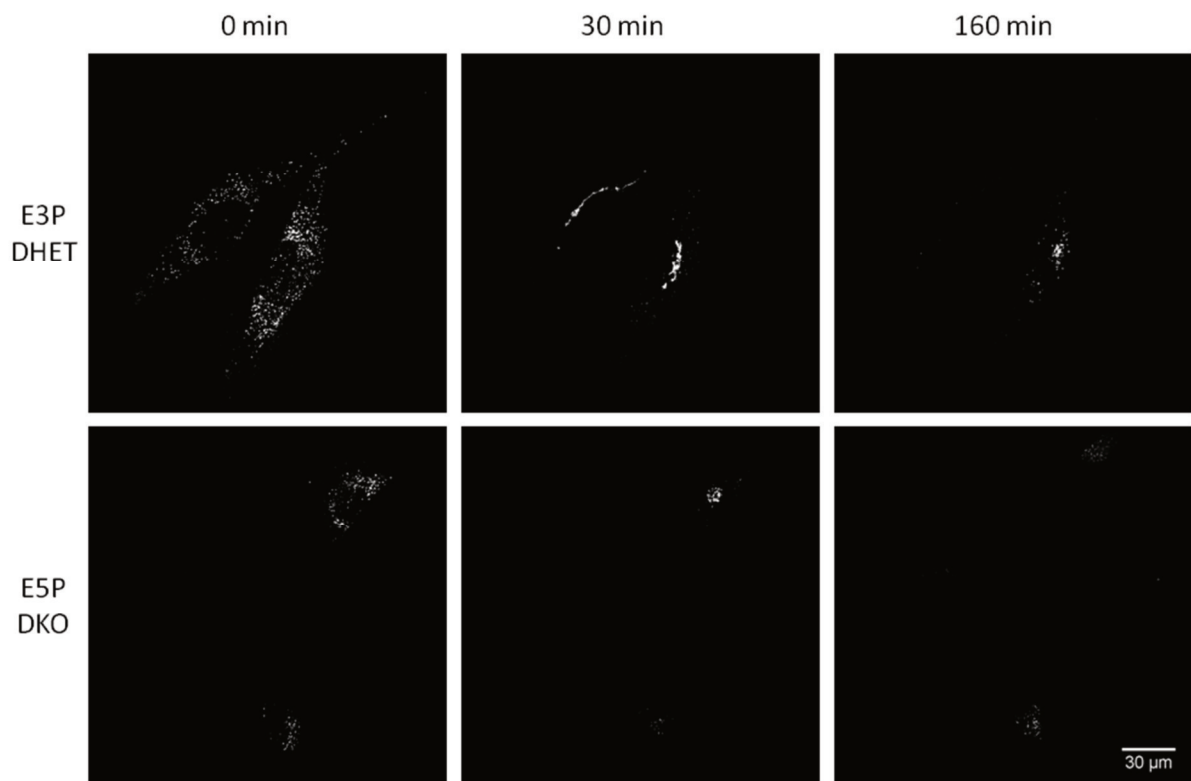


Abb. 5.21 Darstellung des Reporterproteins zu verschiedenen Zeitpunkten in DHET und DKO MEF

Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisation des Reporterproteins in DHET und DKO MEF nach 0, 30 und 160 min. Das zum Zeitpunkt $t=0$ min im ER lokalisierte Reporterprotein wurde nach der Zugabe von Rapamycin in den Golgi transportiert (ca. 30 min). Nach ca. 160 min war nur noch ein geringer Anteil des Reporterproteins in der Zelle zu sehen. Konfokale Aufnahmen, 400fach vergrößert, Maßstab entspricht 30 µm.

Nach erfolgreicher Transfektion war das Reporterprotein im ER der Zellen lokalisiert und konnte dieses, wegen der vorliegenden Aggregationen, nicht verlassen (0 min). Erst die Zugabe von Rapamycin ermöglichte eine Auflösung dieser Aggregate und den Transport in

den Golgi (30 min). Abschließend wurde das Reporterprotein vom Golgi aus über vesikulären Transport ins Kulturmedium sekretiert (ca. 160 min). Dieser Vorgang wurde mit *live cell imaging* am LSM in verschiedenen Zelllinien untersucht und mit ImageJ ausgewertet, indem die Signalintensität der gesamten Zelle bestimmt wurde. Es wurden zunächst die gemittelten Werte aus je drei unabhängigen Versuchen graphisch aufgetragen. Des Weiteren wurde eine nicht-lineare Anpassung (*one phase decay*) durchgeführt, um die GFP-Halbwertszeit zu bestimmen. Der Startwert wurde auf 100 % gesetzt (**Abb. 5.22A und B**).

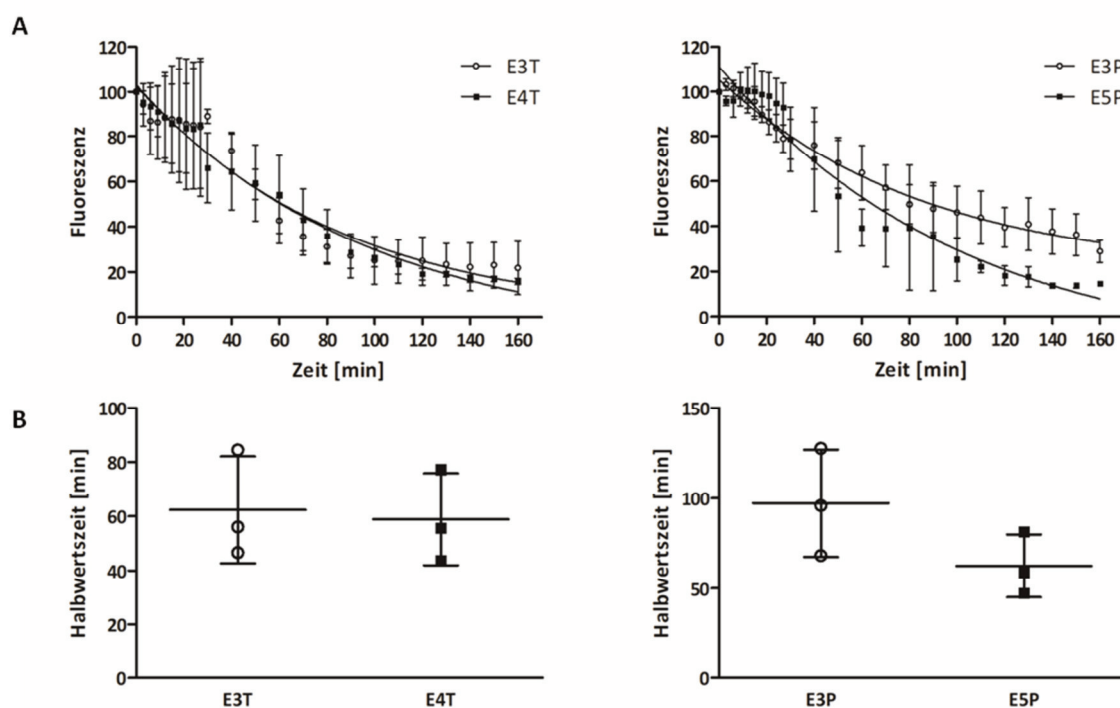


Abb. 5.22 Quantitative Auswertung des Reporterassays zur Bestimmung der GFP-Halbwertszeit

Für die Quantifizierung der emittierten Fluoreszenz der Zelllinien E3T (DHET, T-immortal), E4T (DKO, T-immortal), E3P (DHET, P-immortal) und E5P (DKO, P-immortal) wurde ImageJ verwendet. Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurde die Zeit in Minuten auf der Abszisse und das Fluoreszenzsignal auf der Ordinate aufgetragen. Der Startwert wurde auf 100 % gesetzt. Anschließend wurden die Kurven angepasst (*one phase decay*, A). In B sind die ermittelten GFP-Halbwertszeiten ablesbar. Fehlerbalken (A, B) geben die Standardabweichung an. Unterschiede zwischen den getesteten DHETs und DKO waren nicht vorhanden.

Der Transport des Reporterproteins war für die beiden Zelllinien E3T ($Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}$) und E4T ($Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}$) nicht signifikant unterschiedlich. Die Halbwertszeit betrug für die E3T Zelllinie 62,4 min und für die E4T Zelllinie 58,9 min. Für die durch Passage immortalisierten DHET bzw. DKO Zelllinien E3P (97,2 min) und E5P (62,6 min) war der Unterschied der Halbwertszeiten der beiden Genotypen deutlicher, aber dennoch nicht signifikant. Es

wurden für *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF keine Defekte im Transport des Reporterproteins vom ER über den Golgi bis zur Plasmamembran bzw. in den Extrazellularraum detektiert.

5.2.2 Analyse des MAPK-Signalwegs in MEF

Der Vergleich der Phänotypen EGFR-defizienter Mäuse mit *Vti1a*- und *Vti1b*-defizienten Mäusen ergab in Bezug auf den fehlenden Gaumenschluss eine Übereinstimmung (siehe **Tab. 1**). Daher sollte im Folgenden die Funktionalität dieses Signalwegs in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen untersucht werden. Vorherige Analysen führten bereits zu interessanten Ergebnissen (Browski, Dissertation, 2010; Schmücker, Masterarbeit, 2013). Während EGF-Konzentrationen von 500 ng/mL keine Effekte in den *Vti1a*- und *Vti1b*-doppeldefizienten Zellen hervorriefen (Browski, Dissertation, 2010; Kunwar *et al.*, 2011), wurde eine reduzierte EGFR Menge aber keine veränderte Signalaktivität (pErk/Erk) nach Stimulation mit physiologischen EGF-Konzentrationen (1-2 ng/mL im Serum; Sigismund *et al.*, 2005) in T-immortalen *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} im Vergleich zu *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Zellen detektiert. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse durch Untersuchungen in primären MEF komplettiert.

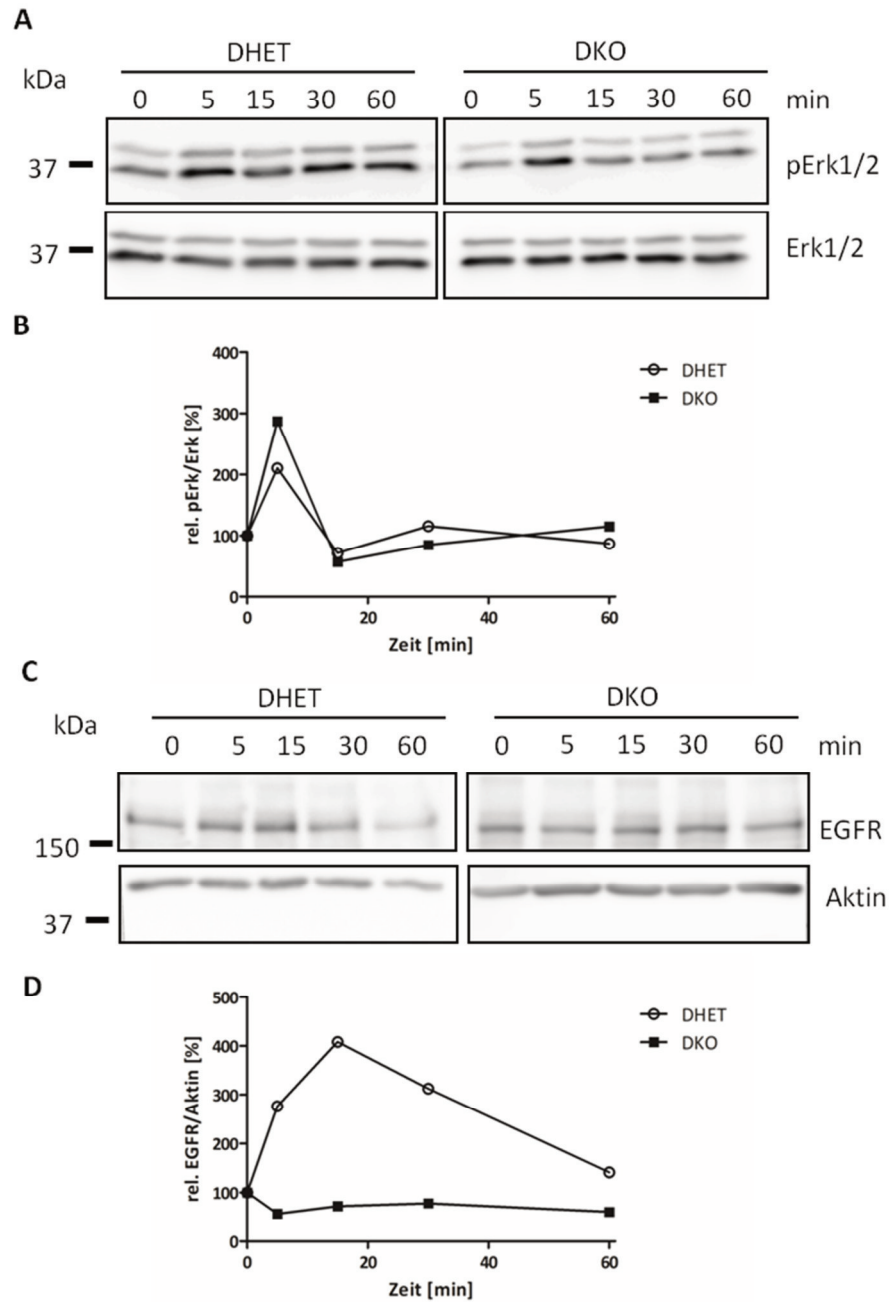


Abb. 5.23 Stimulation primärer MEF mit EGF und anschließender Detektion von Erk1/2 bzw. pErk1/2 sowie EGFR

Primäre DHET und DKO MEF wurden mit 1,5 ng/mL EGF für 0, 5, 15, 30 und 60 min stimuliert und die resultierende Aktivierung der MAP Kinase wurde mittels Western Blot ermittelt (A). Dazu wurde sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Proteinvariante von Erk1 (42 kDa) und Erk2 (44 kDa) detektiert. Anschließend wurde das Verhältnis zwischen beiden Varianten berechnet (B). In C wurde die Proteinmenge des EGFR (170 kDa) nach EGF Stimulation über 0, 5, 15, 30 und 60 min in primären DHET und DKO MEF mittels Western Blot bestimmt. Die EGFR Proteinmenge wurde auf das interne Aktin normiert (D). In *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen zeigte sich nach EGF-Stimulation eine verringerte EGFR Menge.

In primären MEF wurde gezeigt, dass das Fehlen von Vti1a und Vti1b die EGF-abhängige Phosphorylierung von Erk1/2 und damit die Signalaktivität nicht beeinflusst (**Abb. 5.23A und**

B). Nach Zugabe von EGF wurde sowohl für primäre DHET (210 %), als auch für primäre DKO (287 %) MEF bereits nach 5 min das Maximum der Erk1/2 Phosphorylierung erreicht. Es wurde ein ähnlicher zeitlicher Verlauf detektiert und somit das Ergebnis der Masterarbeit unterlegt. Dagegen wurde gezeigt, dass sich die EGFR-Menge zwischen primären DHET und primären DKO unterscheidet (**Abb. 5.23C und D**). Dabei wurde das Signal des EGFR auf Aktin bezogen. Während beim DHET nach Stimulation ein starker Anstieg der Rezeptormenge auf ein Maximum von 402 % detektierbar war, war im DKO zu diesem Zeitpunkt eine Abnahme auf 72 % sichtbar. Der starke Anstieg im DHET könnte auf eine Neusynthese des Rezeptors hindeuten, die im DKO ausbleibt. Ab 15 min war im DHET ein deutlich stärkerer Abfall der Rezeptormenge als im DKO zu detektieren. Auch hier bestätigten die in primären Zellen erhaltenen Ergebnisse das bereits in der Masterarbeit gezeigte Resultat. Möglicherweise sind die SNARE-Proteine Vti1a und Vti1b für die postendozytische Sortierung (ab 15 min) zuständig. Die Regulation zwischen Degradation und Recycling des Rezeptors könnte in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen gestört sein.

5.2.3 Studien zur Zellmigration in MEF

Die Zellmigration ist ein wichtiger und hochkomplexer zellulärer Prozess, der u.a. auch für die Knochenentwicklung eine Rolle spielt (Ridley *et al.*, 2003). Die dafür notwendigen intrazellulären Umstrukturierungen könnten durch einen Verlust von Vti1a und Vti1b beeinflusst sein, denn SNARE-Proteine werden für die gerichtete Bewegung von Zellen benötigt. Sie sind für die Regulation der intrazellulären Verteilung von Integrinrezeptoren zuständig und unterstützen die Membranremodellierung (Tayeb *et al.*, 2005). Ein möglicher Effekt der Doppeldefizienz von Vti1a und Vti1b sollte daher durch Zellmigrationsassays untersucht werden. Dazu wurden die Zellen ausgesät, bis zu einer vollständigen Konfluenz kultiviert und in der Zellschicht mit einer Pipettenspitze eine Wunde erzeugt. Die Wundgröße wurde anschließend in definierten Zeitintervallen vermessen (**Abb. 5.24**).

ohne FKS) zu beobachten (**Abb. 5.24C**). Mit diesen Kultivierungsbedingungen sollten vor allem Proliferationseffekte unterdrückt werden. Bereits nach 16 h war die Wundgröße der T-immortalen DHET Linie (E3T) auf 24 % gesunken, wohingegen die Wunden der beiden getesteten DKO Linien E2T und E4T mit 55 % bzw. 63 % signifikant größer waren. Nach 24 h war der Wundschluss der E3T DHET Kultur fast vollständig, wohingegen die beiden DKO Kulturen eine Wundgröße von 35 % bzw. 47 % zeigten. Dagegen war bei den P-immortalen Zelllinien E3P (DHET) und E5P (DKO) kein Effekt beobachtbar, was auf die Art der Immortalisierung zurückgeführt werden könnte.

Verschiedene Wachstumsfaktoren können einen Einfluss auf die Zellmigration haben (Tang *et al.*, 2009; Lind *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit waren besonders TGF- β 1, BMP-2 und EGF interessant, da in vorhergehenden Stimulationsexperimenten hier Unterschiede zwischen DHET und DKO Zellen nachweisbar waren.

In weiteren Untersuchungen wurde die Zellmigration unter Einfluss von TGF- β 1, BMP-2 und EGF analysiert, indem eine Wunde erzeugt, das Stimulans hinzugegeben und die resultierende Wundgröße zu definierten Zeitpunkten dokumentiert wurde. Für TGF- β 1 und EGF wurde kein Einfluss auf die Migration detektiert (siehe Anhang, **Abb. 9.3**). Exemplarisch soll die BMP-2 abhängige Migration präsentiert werden, da hier ein stärkerer Effekt im Vergleich zu den anderen Liganden detektierbar war (**Abb. 5.25**).

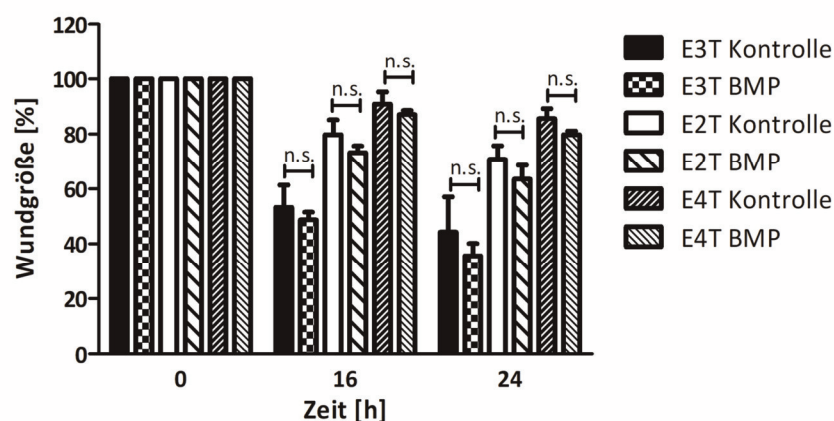


Abb. 5.25 BMP-2 stimulierte Zellmigration in MEF

Zellen der Zelllinien E3T (DHET), E2T (DKO) und E4T (DKO) wurden in 6 *well* Schalen ausgesät und 24 h bis zur Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden sie für 2 h gehungert (DMEM ohne FKS) und eine Wunde in der Zellschicht erzeugt. Pro Zelllinie gab es zwei Ansätze, einer wurde mit 40 ng/mL BMP-2 stimuliert, die Kontrolle verblieb im Hungermedium. Die Dokumentation der Wundgröße erfolgte über einen Zeitraum von 24 h. BMP-2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der Wunde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (ungepaarter t-Test, n=3, zweiflächig, n.s.=nicht signifikant).

Das in **Abb. 5.25** gezeigte Experiment zeigt die Migration nach Zugabe von BMP-2. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Kontroll- und den zugehörigen BMP-2 Ansätzen nicht signifikant. Eine Tendenz war in der Hinsicht zu erkennen, dass nach Zugabe von BMP-2 in allen getesteten Zelllinien eine schnellere Wundheilung detektierbar war. Möglicherweise reichen die aus den Stimulationsexperimenten gewählten Konzentrationen nicht aus, um die Zellmigration zu beeinflussen.

Um zu verifizieren, dass die im DKO gezeigten Defekte in der Zellmigration nicht ein Resultat mangelnder Zellteilung bzw. verstärkter Apoptose waren, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen vorgenommen. Migrierende Zellen sind anhand ihrer Golgi Lokalisation zu erkennen. Kupfer *et al.* (1982) wiesen nach, dass sich der Golgi in Richtung der Migration bzw. der erzeugten Wunde ausrichtet, während er in Zellen des ungestörten *monolayers* zufällig lokalisiert ist. Im Folgenden wurde dies am Beispiel der Zelllinien E3T und E4T gezeigt, indem der *cis*-Golgi angefärbt wurde. Für den Nachweis von apoptotischen Zellen, wurde eine Cleaved Caspase-3 Färbung durchgeführt.

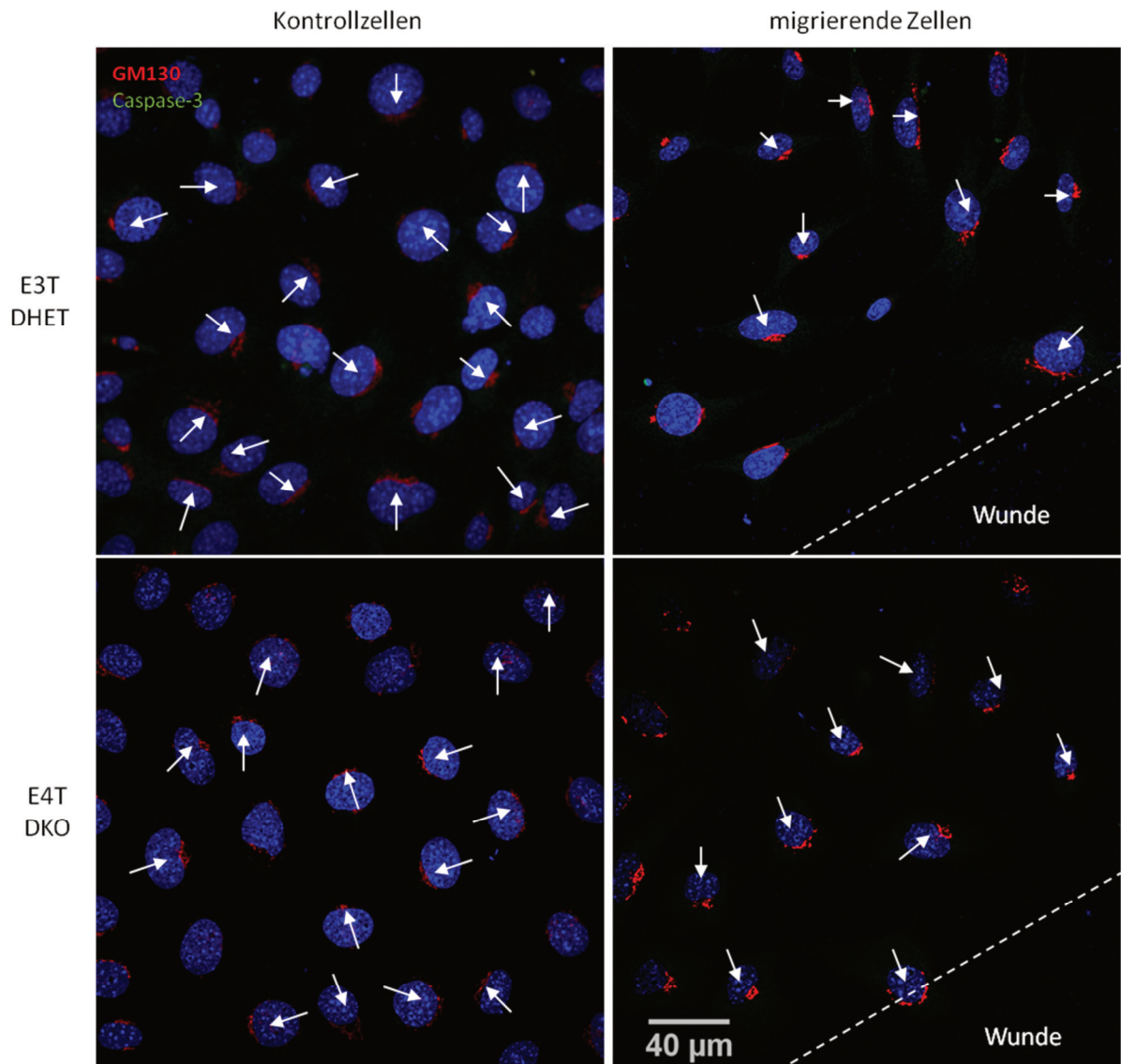


Abb. 5.26 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Zellmigration in DHET und DKO MEF

Vti1a^{+/-} *Vti1b*^{+/-} (E3T) und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} (E4T) Zellen wurden in 24 well Schalen ausgesät und nach 24 h wurde eine Wunde in der Zellschicht erzeugt. Die Zellen wurden unter Hungerbedingungen weitere 24 h kultiviert, anschließend fixiert und GM130 (Cy3/rot) sowie Cleaved Caspase-3 (Cy2/grün) wurden dargestellt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Eine vermehrte Apoptose (Caspase-3 positive Zellen) war in der E4T Kultur nicht zu sehen. Die Färbung des *cis*-Golgis zeigte in beiden Genotypen eine Ausrichtung zur Wunde hin. Konfokale Aufnahmen, 400fache Vergrößerung, Maßstab entspricht 40 µm.

Ein langsamer Wundschluss kann durch eine verlangsamte Proliferation hervorgerufen werden (**Abb. 5.26**). Die Lokalisation des *cis*-Golgis sollte daher zeigen, dass die Effekte nicht auf die Proliferationseigenschaften der Zellen zurückzuführen waren. Bei der Migration sollte sich der Golgi in Richtung der Wunde ausrichten. Dies wurde sowohl bei den *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} als auch bei den *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF gesehen. Die Kontrollzellen zeigten häufig einen willkürlich ausgerichteten *cis*-Golgi. Des Weiteren kann ein verlangsamter Wundschluss auch auf eine vermehrte Apoptose hindeuten, weshalb eine Cleaved Caspase-3 Färbung der Zellen

durchgeführt wurde. In beiden Kulturen wurden wenige apoptotische Zellen detektiert, so dass die gezeigten Effekte nicht auf ein vermehrtes Sterben der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen zurückgeführt werden können.

5.3 Der mögliche Ersatz von Vti1a und Vti1b durch Qbc-SNAREs

Der DKO von *Vti1a* und *Vti1b* ist für den Organismus letal. Trotzdem können Zellen dieses Genotyps in Kultur genommen werden. Bisher kultivierte Zelltypen sind mausembryonale Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Neuronen. In diesen Zellen fehlen *Vti1a* und *Vti1b*, wodurch sich die Frage stellt, wie die Zellen den Verlust dieser beiden SNAREs kompensieren können. Möglicherweise gibt es andere SNARE-Proteine, die die Aufgaben von *Vti1a* und/oder *Vti1b* übernehmen und daher als funktionellen Ersatz dienen können. Erste Untersuchungen wurden zu diesem Thema bereits vorgenommen, die bisher keinen gesicherten Beweis für einen Ersatz liefern konnten (Schöning, Dissertation, 2014; Schmücker, Masterarbeit, 2013).

5.3.1 Untersuchung möglicher Ersatzkandidaten in *S. cerevisiae*

Eine Deletion von *Vti1p* in *Saccharomyces cerevisiae* ist für diesen Organismus letal (Fischer von Mollard *et al.*, 1997). In Säugerzellen erfüllen die homologen Proteine *Vti1a* und *Vti1b* die Funktionen von *Vti1p* (Klopper *et al.*, 2008). Es besteht die Vermutung, dass bei Deletion von *Vti1a* oder *Vti1b* das jeweilige andere SNARE-Protein die Funktion übernehmen kann. Werden jedoch beide Proteine gleichzeitig deletiert, so ist dies für den Organismus letal (Kunwar *et al.*, 2011). Trotzdem können *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen *in vitro* kultiviert und untersucht werden. Eventuell werden *Vti1a* und *Vti1b* durch andere SNAREs ersetzt, so dass essentielle zelluläre Funktionen aufrechterhalten bleiben. Die Mitglieder der SNARE-Qbc-Familie weisen sowohl ein Qb- als auch ein Qc-SNARE Motiv auf und könnten somit mögliche Ersatzkandidaten sein. Im Gegensatz zu SNAP-23 und SNAP-25, die in definierten Geweben exprimiert werden und Membranverankerungen aufweisen (Ravichandran *et al.*, 1996; Oyler *et al.*, 1989), besitzen SNAP-29 und SNAP-47 keine Membrananker und zeigen eine vergleichsweise breite subzelluläre Verteilung. Zudem kommen sie ubiquitär im Organismus vor (Steggmaier *et al.*, 1998; Holt *et al.*, 2006). SNAP-29 und SNAP-47 besitzen keine

homologen Proteine in Hefe, welche für einen funktionellen Ersatz von Vti1p in Frage kommen könnten, wohingegen ein SNAP-23/SNAP-25 Hefehomolog vorhanden ist (Brennwald *et al.*, 1994). Erste Untersuchungen ergaben eine teilweise Kollokalisierung von SNAP-29 und SNAP-47 mit diversen Komplexpartnern von Vti1a und Vti1b (Schöning, Dissertation, 2014). Für weitere Untersuchungen wurden die Gensequenzen der SNARE-Proteine SNAP-23, SNAP-25, SNAP-29 und SNAP-47 in einen Hefe-Expressionsvektor kloniert und in den temperatursensitiven Hefestämmen *vti1-2* und *vti1-11* exprimiert. Diese Hefestämme weisen Mutationen in Vti1p auf. *Vti1-2* trägt die Mutationen S130P und I151T. In *vti1-11* wurden acht Aminosäuren ausgetauscht (Y8R, K20R, H40R, N61S, K73R, Q84R, E145G und L155F). *Vti1-2* und *vti1-11* weisen bei der restriktiven Temperatur von 37 °C einen Wachstumsdefekt auf, der auf diese Mutationen in Vti1p zurückzuführen ist. Im *vti1-2* Stamm ist der Transport vom Golgi über die späten Endosomen zur Vakuole gestört. Zudem weisen sie einen Defekt beim Transport von frühen Endosomen zum Golgi auf. *Vti1-11* Mutanten weisen einen Transportdefekt vom TGN zu späten Endosomen und zur Vakuole auf. Des Weiteren ist der Transport innerhalb der Golgi-Zisterne nicht funktional. Diese Zellen weisen einen deutlich stärkeren Wachstumsdefekt bei 37 °C auf, vermutlich aufgrund des Defektes im retrograden Transport (Fischer von Mollard und Stevens, 1997). Nach erfolgreicher Klonierung der Plasmidkonstrukte wurden die beiden Hefestämme mit diesen transformiert. Es wurde ein Wachstumstest durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Qbc-SNAREs in der Lage sind den Vti1p-abhängigen Wachstumsdefekt aufzuheben.

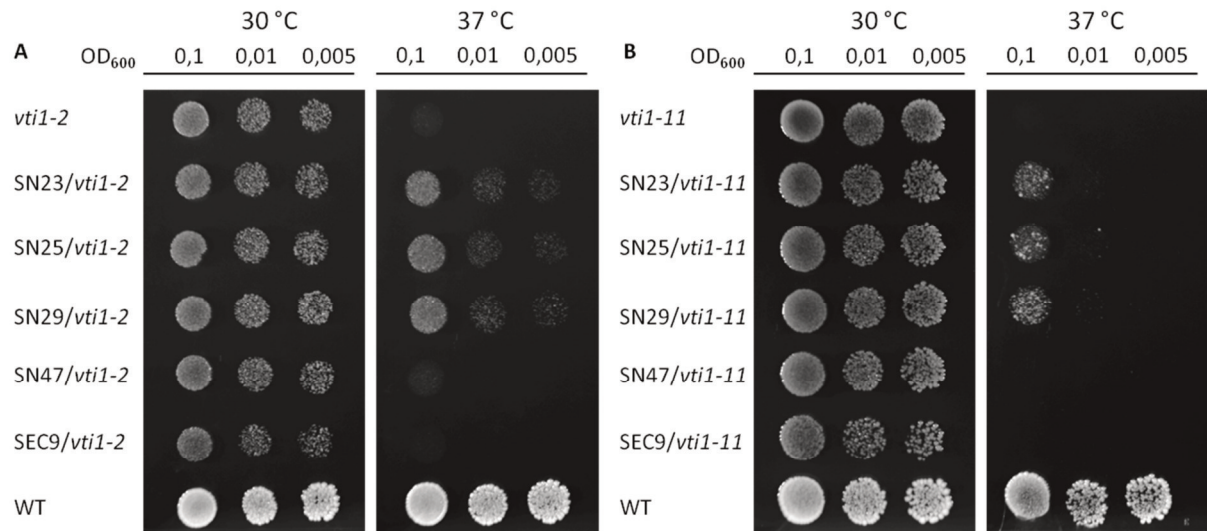


Abb. 5.27 Wachstumstests der mit unterschiedlichen Konstrukten transformierten Hefestämme *vti1-2* und *vti1-11*

Gezeigt sind Wachstumstests in den *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen *vti1-2* und *vti1-11*. Diese wurden mit den SNARE-Proteinen SNAP-23 (SN23), SNAP-25 (SN25), SNAP-29 (SN29) oder SNAP-47 (SN47) transformiert und bei 30 °C oder 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden die nicht transformierten Stämme *vti1-2* bzw. *vti1-11*, SEC9/*vti1-2* bzw. SEC9/*vti1-11* (Homolog des SNAP-25 in der Hefe) und der Wildtypstamm (WT) mit kultiviert. Die mit SNAP-23, SNAP-25 und SNAP-29 transformierten Hefestämme sowie der Wildtypstamm zeigten bei der restriktiven Temperatur Wachstum.

Im Wachstumstest konnte bei 30 °C ein gleichmäßiges Wachstum der getesteten *S. cerevisiae* Stämme bei allen Verdünnungen gezeigt werden (**Abb. 5.27A und B**). Bei der restriktiven Temperatur von 37 °C wuchsen ausschließlich die Stämme, die mit SNAP-23, SNAP-25 oder SNAP-29 transformiert wurden. Die Stärke des Wachstums nahm mit steigender Verdünnung ab. Nur der Wildtyp (Positivkontrolle) zeigte für alle Verdünnungen ein gleichmäßiges Wachstum. In den Hefezellen der Negativkontrolle wurde Sec9p im Stamm *vti1-2* und *vti1-11* exprimiert (Hefehomolog von SNAP-25; Brennwald *et al.*, 1994). Diese Stämme wuchsen bei 37 °C nicht. Generell war ein deutlich stärkerer Wachstumsdefekt für den Stamm *vti1-11* erkennbar. Nach Transformation dieses Stammes mit SNAP-23, SNAP-25 oder SNAP-29 waren ausschließlich für eine OD₆₀₀ von 0,1 Kolonien zu detektieren. Auffällig war das fehlende Wachstum der SNAP-47 Hefekclone. Um Mutationen in den Gensequenzen auszuschließen, wurden die Konstrukte sequenziert.

Zur Überprüfung der Expression bzw. der intrazellulären Lokalisation wurden Proteinextrakte sowie differenzielle Zentrifugationen mit anschließenden SDS-Gelelektrophoresen und Western Blots durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen SNAP-23, SNAP-25, SNAP-29 und SNAP-47.

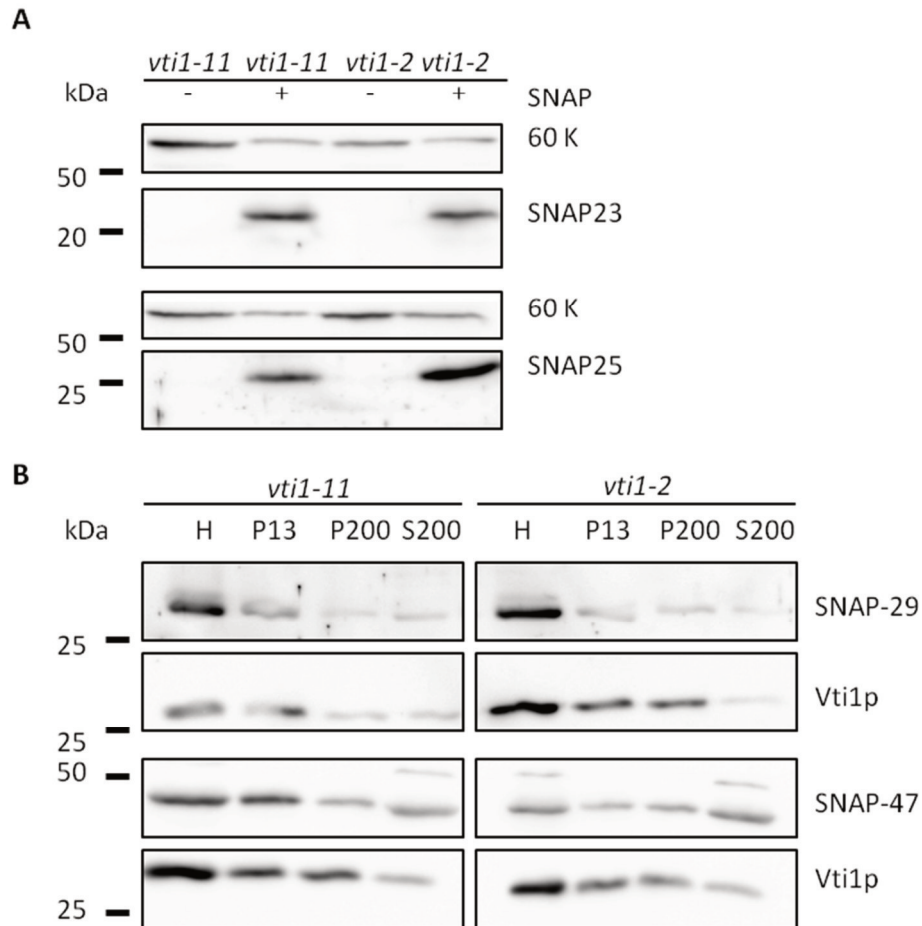


Abb. 5.28 SDS-Gele und differentielle Zentrifugationen der SNAP-exprimierenden Hefestämme

Die Expressionsnachweise des 23 kDa großen SNAP-23 und des 25 kDa großen SNAP-25 wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot gezeigt (A). Als Ladekontrolle wurde die 60 kDa große Untereinheit der V-ATPase (60 K) detektiert. Für SNAP-29 (29 kDa) und SNAP-47 (47 kDa) wurde die Expression ebenso nachgewiesen (B). Es wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt, um die intrazelluläre Lokalisation der Proteine mit der des Vti1p (27 kDa) zu vergleichen. Die Fraktionen H, P13, P200 und S200 entsprachen unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten sowie -zeiten und zeigten somit eine Sedimentationskoeffizient-abhängige Anreicherung von Organellen. Für SNAP-29 und SNAP-47 wurde eine ähnliche Lokalisation wie für Vti1p detektiert. Für beide Proteine wurde eine Membranassoziation nachgewiesen.

Die Expression von SNAP-23 und SNAP-25 in den Stämmen *vti1-11* und *vti1-2* wurde durch Western Blots nachgewiesen (**Abb. 5.28A und B**). Mit der differentiellen Zentrifugation sollte untersucht werden, ob die subzelluläre Lokalisation von SNAP-29 und SNAP-47 sich mit der von Vti1p überschneidet (**Abb. 5.28B**). Die über eine Serie an Zentrifugationsschritten erhaltenen Fraktionen H, P13, P200 und S200 enthielten ein definiertes Set an Organellen, die nach Sedimentationskoeffizient fraktioniert wurden. Probe H entsprach dem Zelllysat und sollte alle Organellen enthalten. In Probe P13 befanden sich große Organellen wie ER, Vakuole und Plasmamembran. Vesikel, Golgi und Endosomen waren in Probe P200 nachzuweisen. Probe S200 enthielt lösliche Proteine. Für Vti1p wurde das bereits publizierte

Fraktionsmuster erhalten und die Lokalisation in Vakuole, Endosomen und Golgi-Apparat verifiziert (Zimmermann *et al.*, 2010). SNAP-29 war, analog zu Vti1p, in allen Fraktionen detektierbar. Das Signal in P200 war für SNAP-29 schwächer als für Vti1p. Dagegen wurde für SNAP-47 eine sehr breite Verteilung bis einschließlich in Fraktion S200 detektiert. Die Signalstärke in den einzelnen Fraktionen unterschied sich von der für Vti1p. Für SNAP-29 als auch für SNAP-47 wurde über die differenzielle Zentrifugation eine Membranassoziation gezeigt, so dass eine Interaktion mit anderen SNARE-Proteinen möglich wäre. Dies macht einen Ersatz noch wahrscheinlicher. Zur weiteren subzellulären Lokalisationsuntersuchung wurde eine Immunzytochemie durchgeführt. Da die verwendeten Antikörper unspezifische Reaktionen zeigten, war eine Auswertung nicht möglich.

SNAP-29 ist, aufgrund seiner Eigenschaften und der im Wachstumstest erhaltenen Ergebnisse, der aussichtsreichste Kandidat für einen funktionellen Ersatz von Vti1a und/oder Vti1b. Diese Hypothese wurde in einem 5-FOA Assay überprüft. Für diesen Assay wird dem Nährmedium 5-Fluororotsäure (5-FOA) zugesetzt. Dabei handelt es sich um ein Pyrimidin-Analogon, welches durch Ura3p in Hefezellen umgesetzt werden kann. Das dabei entstehende Produkt ist toxisch und führt zum Absterben der Hefen. Ist die *URA3*-Sequenz extrachromosomal lokalisiert, können die Zellen überleben, die das entsprechende Plasmid verloren haben. Für den 5-FOA Assay wurde der Hefestamm mit einem Plasmid transformiert, auf dem sowohl der *URA3*-Marker als auch die *VTI*-Sequenz kodiert waren. Auf einem weiteren Plasmid war die Sequenz von einem der zu testenden Qbc-SNAREs kodiert. Bei Vorhandensein von 5-FOA im Nährmedium verlieren die Zellen zufällig das *URA3*-kodierende Plasmid zusammen mit der essentiellen *VTI*-Information. Da der Verlust von Vti1p letal ist, können die Zellen nur dann überleben, wenn die zu testenden Qbc-SNARE-Proteine dessen Funktion übernehmen können. Um diesen Assay durchzuführen, mussten zunächst entsprechende Plasmidkonstrukte durch Klonierungen hergestellt werden.

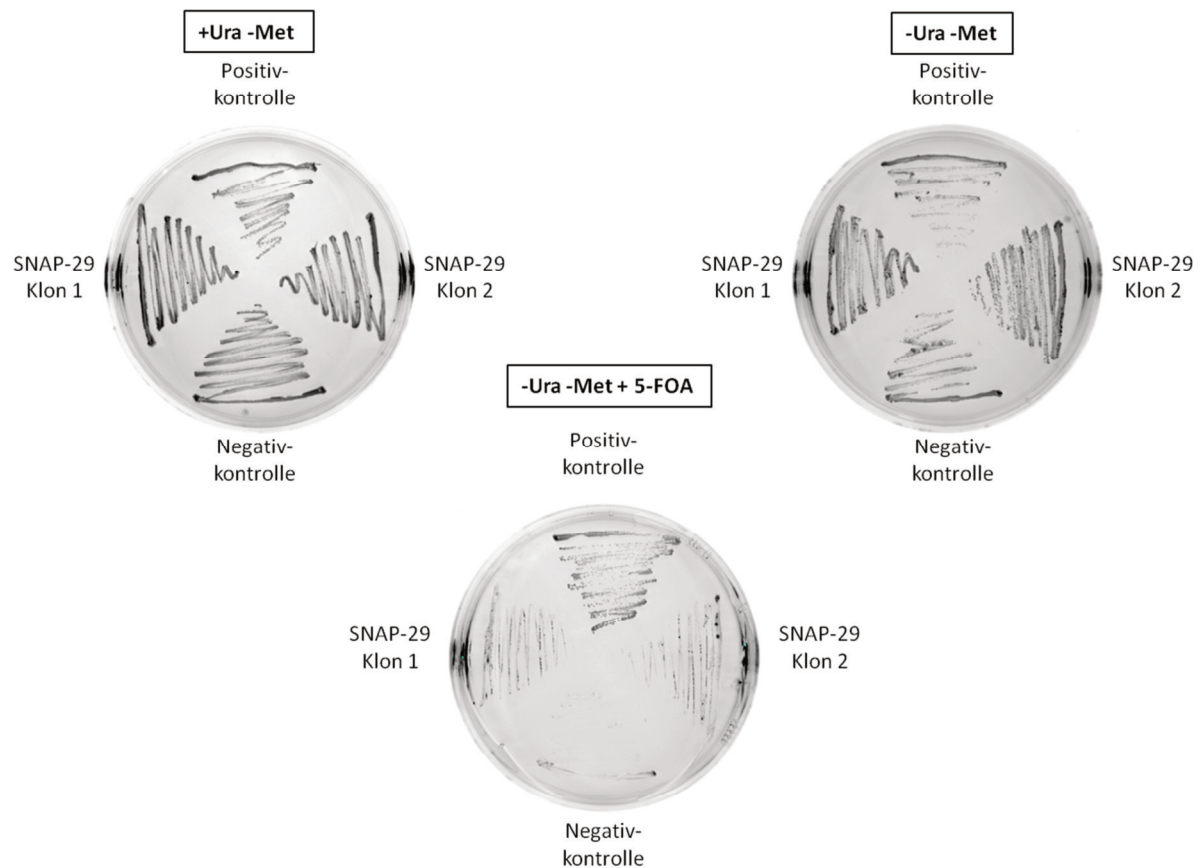


Abb. 5.29 5-FOA Assay zum Nachweis eines möglichen Ersatzes von Vti1p durch SNAP-29

Dargestellt ist der 5-FOA Assay, in dem zwei unterschiedliche SNAP-29 Hefeklone (Klon 1 und Klon 2) auf ihre Funktion als einen möglichen Ersatz von Vti1p getestet wurden. Hierfür wurde der Hefestamm FvMY6 mit den Plasmiden pFvM29 (CEN *VTI URA3*) und pSIS2 (2 μ *LEU2 SNAP-29*) transformiert. Als Positivkontrolle wurde dieser Hefestamm statt mit pSIS2 mit pFvM28 (CEN *VTI TRP1*) und als Negativkontrolle mit pRS314 (CEN *TRP1*) transformiert. Die Kontrollansätze, die auf +Ura -Met und -Ura -Met Agar angezogen wurden, zeigten nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C ein Wachstum für alle getesteten Ansätze. Nach Zusatz von 0,5 mg/mL 5-FOA zum -Ura -Met Agar wuchs nur noch die Positivkontrolle. Beide getesteten SNAP-29 Klone waren nicht in der Lage einen vollständigen Ersatz von Vti1p zu liefern, da kein Wachstum auf den entsprechenden Agarplatten gesehen wurde.

Im 5-FOA Assay wurde getestet, ob SNAP-29 alle Vti1p-abhängigen Membranfusionen übernehmen und so die Letalität der Vti1p Deletion aufheben kann (**Abb. 5.29**). Dazu wurde das SNAP-29-Konstrukt pSIS2 in den Hefestamm FvMY6 transformiert, der *VTI* und *URA3* extrachromosomal auf dem Plasmid pFvM29 aufwies. Nach 5-FOA Zugabe überleben nur die Zellen, die das Plasmid verloren haben. Gleichzeitig geht damit die genetische Information für die Expression von *VTI* verloren. Ein Verlust von Vti1p ist in Hefen letal (Fischer von Mollard *et al.*, 1997). Kann SNAP-29 die Funktionen von Vti1p übernehmen, so sollte die Letalität aufgehoben werden. Da die getesteten SNAP-29 Hefeklone 1 und 2 nach Zugabe von 5-FOA nicht wuchsen, konnte ein Ersatz der Vti1p Funktionen durch SNAP-29 nicht nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde ein Stamm verwendet, der neben pFvM29

eine weitere, nicht an einen *URA*-Marker gekoppelte, *VTI*-Genkopie auf einem zweiten Plasmid aufwies. Hier war ein Wachstum der Hefen detektierbar. Als Negativkontrolle wurde ein Plasmid verwendet, das bis auf einen *TRP1*-Marker keine weiteren genetischen Informationen besaß, so dass diese Zellen auf dem 5-FOA Agar nicht wuchsen.

5.3.2 Analyse des *knockdowns/knockouts* von SNAP-29 oder SNAP-47

Eine weitere Möglichkeit einen potentiellen Ersatz von *Vti1a* und *Vti1b* durch die Qbc-SNAREs SNAP-29 und SNAP-47 zu untersuchen, besteht darin einen *knockdown* (KD) dieser Proteine in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen durchzuführen. Dienen beide bzw. eins der beiden Qbc-SNAREs als Ersatz für *Vti1a*- und/oder *Vti1b*-abhängige Membranfusionen, so könnte ein KD Auswirkungen auf diese Prozesse haben oder letal sein. Erste Versuche wurden bereits in der eigenen Masterarbeit (Schmücker, Masterarbeit, 2013) durchgeführt. Zelllinien, die einen KD von SNAP-29 oder SNAP-47 aufweisen, konnten in der Masterarbeit nicht etabliert werden. In der Veröffentlichung Jurado *et al.*, 2013 wurde ein erfolgreicher KD von SNAP-47 mittels shRNA (*short hairpin* RNA) beschrieben. Daher wurden in dieser Arbeit die dort beschriebenen Oligonukleotide verwendet und in einen entsprechenden Vektor kloniert. Das so entstandene KD-Konstrukt wurde in murine Neuro-2a (N2a) transfiziert, da diese eine deutlich höhere Transfektionsrate als die verwendeten MEF-Linien haben. Analog zu Jurado *et al.*, 2013 wurde nach Transfektion eine 10 tägige Hygromycinselektion durchgeführt. Der KD von SNAP-47 in den erhaltenen Mischkulturen wurde anhand eines Western Blots beurteilt (**Abb. 5.30**).

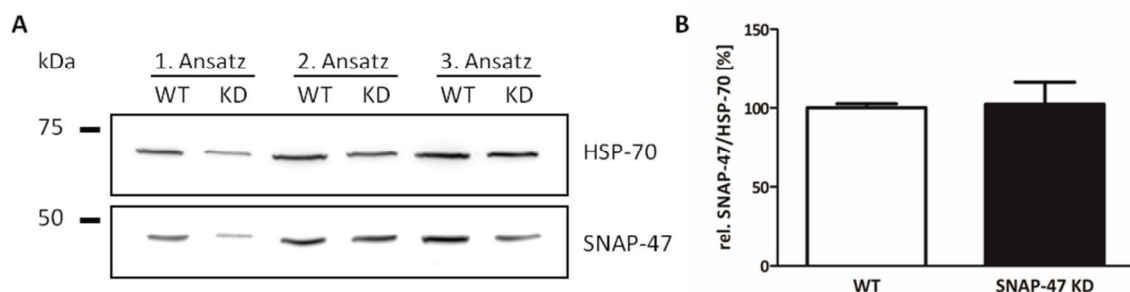


Abb. 5.30 Nachweis eines SNAP-47 KD in N2a

In drei biologischen Replikaten (Ansatz 1-3) wurden die Zellen mit dem SNAP-47 KD Konstrukt transfiziert, über 10 d mittels Hygromycin selektioniert und die Mischkulturen im Western Blot (A) auf einen SNAP-47 KD untersucht. Das detektierte Bandenmuster wurde densitometrisch ausgewertet (B). Zur Normierung wurde der HSP-70 (70 kDa) Gehalt bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Es wurde kein KD von SNAP-47 nachgewiesen.

Da das Konstrukt einen GFP-tag aufwies, war es möglich, die Transfektionsrate fluoreszenzmikroskopisch abzuschätzen. Trotz erfolgreicher Transfektion mit anschließender Selektion wurde kein SNAP-47 KD in den getesteten N2a-Zellen nachgewiesen. Daher sollte im Folgenden das neu etablierte CRISPR-Cas9 *knockout* System verwendet werden, wodurch es nicht nur zu einem *knockdown* durch Verringerung des mRNA-Levels kommt, sondern einem *knockout* auf genomischer Ebene.

CRISPR-Cas9 ist eine essentielle Komponente des adaptiven Immunsystems von Bakterien und Archaeen. Es ermöglicht dem Organismus eindringendes genetisches Material unschädlich zu machen. Methodisch wird dieses System verwendet, um Veränderungen ins Genom einzubringen. Die wichtigste Komponente ist das CRISPR-assoziierte Protein 9 (Cas9), welches aus *Streptococcus pyogenes* stammt. Dieses Enzym generiert DNA-Doppelstrangbrüche (Nukleaseaktivität). Für eine gezielte genomische Mutation wird eine synthetische *guide* RNA (sgRNA) benötigt, die CRISPR RNA (cRNA) und *transactivating* RNA (tracrRNA) vereint. Diese 20 nt große sgRNA ist komplementär zur Zielsequenz, bindet DNA und ermöglicht so die korrekte Positionierung des Enzyms im Genom. Wichtig hierbei ist, dass sich ein PAM Motiv (5'-NGG *protospacer-adjacent motif*) an die Sequenz anschließt. Die durch Cas9 herbeigeführten Strangbrüche aktivieren zwei unterschiedliche zelluläre Reparaturmechanismen. Das sogenannte *nonhomologous end joining* (NHEJ) ist ein fehlerbehafteter Prozess und generiert Insertionen und Deletionen, so dass es zu einer Verschiebung des Leserasters kommen und/oder ein vorzeitiges Stoppcodon entstehen kann. Nachteil dieses Systems ist die mit 20 nt eher kurze sgRNA, die, aufgrund ihrer Kürze, auch an ungewünschten Bereichen im Genom binden kann. Desweiteren ist für die Erkennung keine 100 %ige Komplementarität notwendig. Beide Faktoren können so zu ungewollten *off-target* Effekten führen (Ran *et al.*, 2013a). Um dieses Problem zu minimieren, wurde die Cas9 mutiert (D10A), so dass sie nur noch in der Lage ist Einzelstrangbrüche zu erzeugen. Um nun eine Änderung im Genom zu erzeugen, müssen zwei sgRNAs verwendet werden, die in einem entsprechenden Abstand zueinander an der DNA binden, wodurch die Spezifität deutlich erhöht wird (Doppel-Nickase-Strategie; Ran *et al.*, 2013b).

Für den *knockout* von SNAP-29 und SNAP-47 wurden mittels des webbasierten *CRISPR design tools* entsprechende Paare an sgRNA-Sequenzen identifiziert, die zu einem KO der beiden Proteine führen könnten. Dieses *Tool* bietet den Vorteil, dass es direkt mögliche,

genomweite *off-target* Effekte identifiziert und entsprechend spezifische sgRNAs anzeigt. Nach Eingabe der genomischen Sequenz wird eine Rangliste möglicher sgRNAs ausgegeben. Dabei gibt der *score* (0 bis 100 %) die wahrscheinliche *on-target* Aktivität an. Das SNAP-29 Gen setzt sich u.a. aus fünf Exons zusammen. Es wurde die Sequenz des ersten Exons mittels des *CRISPR design tools* auf potentielle Bindungsstellen für sgRNAs hin untersucht. Auch SNAP-47 besteht aus fünf Exons, wobei das erste Exon 85 nt lang ist. Es wurde das zweite Exon auf mögliche Bindungsstellen für sgRNAs analysiert (**Abb. 5.31**).



Abb. 5.31 Sequenzanalyse auf mögliche *guide* Bindestellen für einen KO von SNAP-29 und SNAP-47

In A ist ein Bereich aus dem ersten Exon des murinen SNAP-29 (SN29) Gens gezeigt. In grau unterlegt sind die entsprechend ausgewählten Oligonukleotide, die für einen CRISPR Cas9n basierten *knockout* geeignet erscheinen. B zeigt einen Teilbereich des zweiten Exons vom murinen SNAP-47 (SN47) Gen mit den für einen KO vorgesehenen Oligonukleotiden.

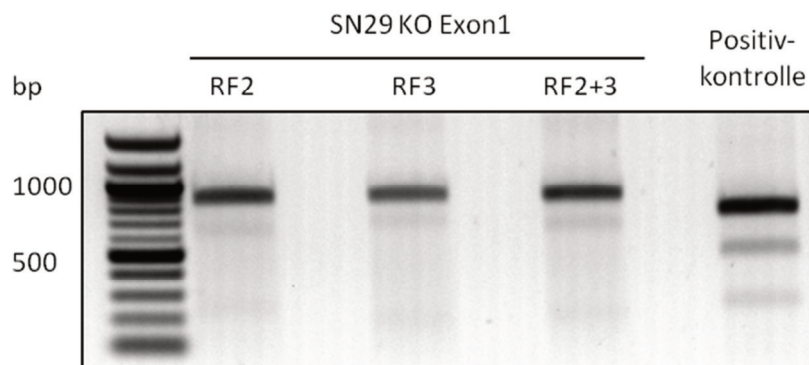
Die durch CRISPR-Cas9n eingefügten Genmodifikationen sollten zu dessen Funktionsverlust führen (Popp und Maquat, 2016). Nach Bestimmung geeigneter Sequenzabschnitte wurden für den KO von SNAP-29 und SNAP-47 unterschiedliche Nuklease- und Nickase-Konstrukte hergestellt (**Tab. 2**). Die sgRNA Sequenzen wurden in die Plasmide pSpCas9(BB)-2A-Puro (Nuklease) bzw. pSpCas9n(BB)-2A-Puro (Nickase) kloniert. Mittels Kolonie-PCR wurden die erhaltenen Klone kontrolliert. Hierbei wurde ein im Vektorrückgrat bindender Primer mit einem sgRNA-Oligo als Primer kombiniert, sodass nur bei erfolgreicher Klonierung ein PCR-Produkt entstehen sollte. Abschließend wurde die Plasmid-DNA der in der Kolonie-PCR positiv getesteten Klone sequenziert.

Tab. 2 CRISPR-guides für einen KO von SNAP-29 und SNAP-47

Übersicht über die für den CRISPR-basierten KO von SNAP-29 und SNAP-47 hergestellten *guides*, die entweder auf der Nuklease- oder Doppel-Nickase-Strategie beruhen.

<i>guide</i> -Name	als pSp Cas9n-Konstrukt	als pSp Cas9-Konstrukt
SNAP-29 Exon1 RF2	ja	ja
SNAP-29 Exon1 RF3	ja	ja
SNAP-47 Exon2 RF1.2	ja	ja
SNAP-47 Exon2 RF3	ja	ja

Die durch CRISPR-Cas9(n) erzeugten, genomischen Modifikationen wurden mittels Surveyor-Assay nachgewiesen. Für diesen Assay wurden Zellen zunächst mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und die genomische DNA dieser Zellen isoliert. Mittels PCR wurde der eventuell modifizierte Genabschnitt amplifiziert. Abschließend wurden die so hergestellten PCR-Produkte mit Wildtyp-DNA hybridisiert und mit der T7-Endonuklease I inkubiert. Dieses Enzym schneidet die Hybride nur bei Fehlpaarungen bzw. Vorhandensein genomischer Modifikationen. Exemplarisch soll das Ergebnis des Surveyor-Assays für SNAP-29 gezeigt werden. Für SNAP-47 wurde dieser Assay in einer von mir angeleiteten Bachelorarbeit (Karsten, Bachelorarbeit, 2015) durchgeführt.

**Abb. 5.32 Surveyor-Assay für den SNAP-29 KO**

Dargestellt ist der Surveyor-Assay für den *knockout* von SNAP-29 mit drei Kombinationen an Oligonukleotiden SN29 KO Exon 1 RF2/RF3/RF2+3, die in N2a-Zellen transfiziert wurden. Nachdem die genomische DNA der transfizierten Zellen isoliert wurde, konnte der betroffene Genabschnitt mittels PCR amplifiziert und mit entsprechender Wildtyp-DNA hybridisiert werden. Abschließend wurde die Restriktion mit der T7-Endonuklease I durchgeführt und die Produkte auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Als Positivkontrolle wurde der Ursprungsvektor mit einem Oligonukleotid-enthaltenen Vektor hybridisiert und analog zu den Proben behandelt. Für alle drei getesteten Ansätze (RF2/RF3/RF2+3) waren Spaltprodukte auf dem Agarosegel zu detektieren.

Der Surveyor-Assay (**Abb. 5.32**) ermöglichte die Detektion von KO-Konstrukten, die zu genomischen Mutationen im Locus führten. So schnitt die T7-Endonuklease I die hybridisierten PCR-Produkte nur dann, wenn durch Cas9(n) Mutationen in die genomische DNA-Sequenz eingefügt wurden. Für alle getesteten Produkte wurden entsprechende DNA-Fragmente detektiert. Mit der in Ran *et al.* (2013a) publizierte Formel ließ sich die InDel-Häufigkeit bestimmen. Diese lag bei 4 % für RF2 (Nuklease), 2 % für RF3 (Nuklease) und 3 % für RF2+3 (Nickase).

Um die Funktionalität der Konstrukte auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden diese in N2a-Zellen transfiziert und nach 72 h Proteinextrakte hergestellt. Diese wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot auf die Proteinmenge von SNAP-29 untersucht.

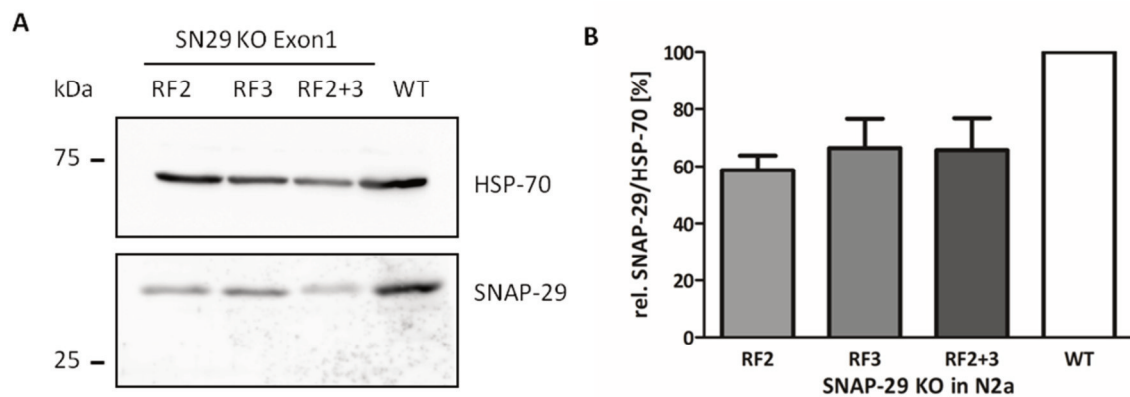


Abb. 5.33 Quantifizierung des SNAP-29 KO in einer N2a Mischkultur

N2a wurden mit den *knockout*-Konstrukten SNAP-29 KO Exon 1 RF2, RF3 und RF2 + RF3 (Doppel-Nickase-Strategie) transfiziert und 72 h nach Transfektion wurden Zelllysate hergestellt. Diese wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf SNAP-29 (29 kDa) hin analysiert. Zur Quantifizierung und Normierung wurde der HSP-70 (70 kDa) Gehalt der Extrakte bestimmt. Das Proteinlevel lag für das SNAP-29 KO Konstrukt RF2 bei 59 %, für das RF3 bei 66 % und für die Konstrukte RF2+3 bei 66 %.

Bereits in den Mischkulturen konnte anhand des Western Blots (**Abb. 5.33**) eine Reduktion des SNAP-29 Proteinlevels detektiert werden. Die Quantifizierung zeigte eine Verringerung um 59 % für das SNAP-29 KO Konstrukt RF2, um 66 % für RF3 und um 66 % für das Doppel-Nickase-System RF2 + 3. Da der Nachweis in Mischkulturen durchgeführt wurde, die sowohl transfizierte als auch untransfizierte Zellen enthielten, war eine Verringerung des Proteingehalts um ca. 40 % bereits ein erster Hinweis auf die Funktionalität der erstellten KO-Konstrukte. Im Folgenden wurden sowohl die SNAP-29 KO Doppel-Nickase-Konstrukte als auch die entsprechenden SNAP-47 KO Konstrukte in MEF transfiziert. Es wurde die Doppel-Nickase-Strategie gewählt, da diese weitaus weniger *off-target* Effekte hervorruft. Aufgrund

der geringen Transfektionseffizienz in MEF, die sich auch durch Anwendung verschiedener Transfektionsreagenzien wie Lipofectamine[®], PEI, Screenfect A/A+, Xfect und Turbofect nicht verbessern ließ, wurden die transfizierten Zellen mittels FACS zunächst isoliert und anschließend in 96 *well* Schalen vereinzelt. Hierfür mussten die Zellen mit dem Vektor pEGFP-C1 kotransfiziert werden, da der CRISPR-Cas9(n) Vektor selbst keine GFP-kodierende Sequenz besitzt. Die Zellen starben nach der Vereinzellung, so dass diese Vorgehensweise überarbeitet werden muss.

Es wurden CRISPR-Cas9(n)-Konstrukte generiert, die zu einem KO von SNAP-29 bzw. SNAP-47 in murinen Zellen führen. Nach der Herstellung stabil transfizierter Zelllinien steht ein geeignetes System zu Verfügung, um den funktionellen Ersatz von Vti1a und Vti1b durch die beiden Qbc-SNAREs zu überprüfen.

6. Diskussion

Für den intrazellulären Transport in eukaryotischen Zellen sind SNARE-Proteine essentiell. Die Qb-SNAREs Vti1a und Vti1b vermitteln eine Vielzahl von Membranfusionen an unterschiedlichen Zellorganellen im Säuger. Dazu gehören zum Beispiel die Fusion früher Endosomen (Brandhorst *et al.*, 2006) und die der späten Endosomen (Antonin *et al.*, 2000b). Der KO von Vti1a oder Vti1b beeinträchtigt die Tiere kaum und führt zu lebensfähigen sowie fertilen Tieren, wohingegen der gleichzeitige KO von beiden SNARE-Proteinen (*Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-}) für den Organismus letal ist (Kunwar *et al.*, 2011). Mausembryonen (E18.5) dieses Genotyps sind signifikant kleiner (Schöning, Dissertation, 2014) und leichter als ihre DHET (*Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-}) Wurfgeschwister. Sie weisen eine Vielzahl an Auffälligkeiten auf, die u.a. das Skelett betreffen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die molekularen Ursachen bzw. Mechanismen erforscht werden, die zu diesem spezifischen Phänotyp führen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Zellen von *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Embryonen herangezogen. Trotz der Letalität im Tier ist die Kultivierung primärer DKO Zellen möglich. Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Neuronen können aus dem embryonalen Organismus isoliert und in Kultur genommen werden. Je nach Gewebe war die Anzahl der Zellen, die gewonnen werden konnte, begrenzt. In dieser Arbeit wurden mausembryonale Fibroblasten und Chondrozyten untersucht. Die Kultivierung von Osteoblasten wurde erfolgreich etabliert, allerdings wurden bisher noch keine Untersuchungen durchgeführt. Die immunzytochemische Untersuchung der Organellen in DHET, DKO, und Wildtyp (WT) Zellen ergab keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Daher sollte im Folgenden die Analyse der Lysosomen im Detail erfolgen.

6.1 Der Verlust von Vti1a und Vti1b verursacht leichte lysosomale Defekte

Lysosomen kommen in allen Zelltypen vor und zeichnen sich durch eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme aus. Hydrolasen dienen der hydrolytischen Spaltung diverser Verbindungen. Zu ihnen zählen Glykosidasen, Lipasen, Nukleasen, Phosphatasen, Proteasen und Sulfatasen. Proteasen spalten z.B. Peptidbindungen und ermöglichen so den Abbau von

Proteinen (Alroy und Lyons, 2014). Für ihre Aktivität weist das Lysosom einen pH-Wert von 4,5 bis 5 auf. Lysosomen sind wichtig für den Abbau und das *Recycling* von intra- und extrazellulären Makromolekülen. Diese Prozesse liefern somit auch Bausteine für zelluläre Synthesen. Die Synthese lysosomaler Enzyme startet im ER und die Reifung setzt sich im Golgi fort. In diesen Organellen werden die Enzyme posttranslational modifiziert und abschließend zum Lysosom transportiert. Für einen Großteil der lysosomalen Hydrolasen erfolgt der Transport zum Lysosom M6P-abhängig. Im TGN binden M6P-Rezeptoren saure Hydrolasen, die einen entsprechenden M6P-Rest aufweisen, und transportieren sie mittels membranumschlossener Vesikel zu den frühen Endosomen. Die Reifung der frühen zu den späten Endosomen geht mit einer schrittweisen Ansäuerung des Organelllumens einher (Huotari und Helenius, 2011). Der saure pH-Wert in diesen Organellen führt zur Dissoziation von Hydrolasen und Rezeptoren. Dynamische Fusionsvorgänge zwischen späten Endosomen und lysosomalen Kompartimenten sorgen dafür, dass die Enzyme an ihren Bestimmungsort gelangen (Gosh *et al.*, 2003). Neben dem M6P-abhängigen Transport von Hydrolasen gibt es weitere Wege diese Enzyme ins Lysosom zu transportieren. Die β -Glucocerebrosidase wird z.B. unabhängig von M6P ins Lysosom transportiert. Hier dient LIMP-2 als Rezeptor (Reczek *et al.*, 2007). Der neutrale pH-Wert im ER erlaubt die Assoziation von Rezeptor und Hydrolase. Anschließend erfolgt der Transport über den Golgi zu den Endosomen. Auch hier führt die allmähliche Ansäuerung zur Dissoziation von LIMP-2 und β -Glucocerebrosidase (Zachos *et al.*, 2012). Mutationen im LIMP-2-Gen können zu einer progressiven myoklonischen Epilepsie führen. Bei der Gaucher Erkrankung kommt es zu Mutationen in der β -Glucocerebrosidase, wodurch dessen Substrat Glucosylceramid akkumuliert (Rothaug *et al.*, 2014). Lysosomale Speichererkrankungen können ererbt oder erworben werden. Häufig führt der Verlust bzw. eine deutlich verringerte Aktivität eines oder mehrerer lysosomaler Enzyme zu klinischen Manifestationen. Fällt die Aktivität des Enzyms unter einen Schwellenwert von 10 % bis 15 %, so akkumuliert das entsprechende Substrat in den Zellen und kann nicht abgebaut werden (Alroy und Lyons, 2014). Auf zellulärer Ebene hat dies mehrere, negative Folgen für Strukturen und Funktionen, da die akkumulierten Substrate sich intrazellulär meist in den Lysosomen ansammeln. Bei der Gaucher Erkrankung wird z.B. von Gaucher Zellen gesprochen, die sich in einer Vielzahl an Geweben befinden und sich durch eine starke Akkumulation von Glucocerebrosiden auszeichnen (Zhao und Grabowski, 2002).

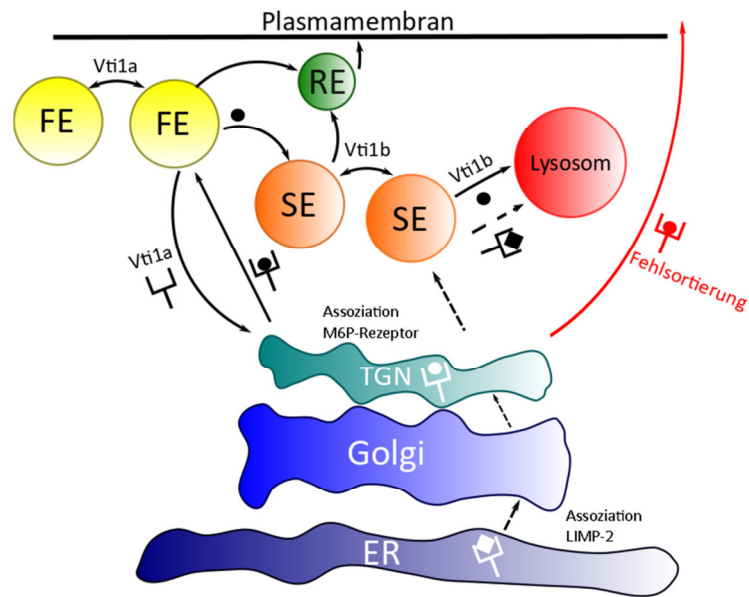


Abb.6.1 Untersuchte lysosomale Transportwege

Die Assoziation von M6P-Rezeptoren und lysosomalen Hydrolasen erfolgt im TGN. Anschließend wird der Komplex zu den frühen (FE) bzw. späten (SE) Endosomen transportiert. Durch den sauren pH-Wert kommt es zur Disassemblierung. Der Rezeptor wird zurück ins TGN und die Hydrolasen werden zum Lysosom transportiert. Im Gegensatz dazu erfolgt die Assoziation von LIMP-2 und β -Glucocerebrosidase im ER. Der Transport erfolgt über den Golgi, das TGN und die späten Endosomen zum Lysosom. Bei verschiedenen Schritten werden Vti1a und Vti1b benötigt. Eine Fehlsortierung von Hydrolasen wurde in *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Chondrozyten nicht nachgewiesen, obwohl sie für MEF und Neuronen durch Browski (Dissertation, 2010) und Schöning (Dissertation, 2014) dokumentiert wurde.

Vti1b, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und VAMP7 vermitteln die heterotypische Fusion später Endosomen mit Lysosomen, was durch Antikörper-Inhibitionsexperimente gezeigt wurde (Pryor *et al.*, 2004). Ein DKO von Vti1a und Vti1b könnte sich hinsichtlich lysosomaler Funktionen bemerkbar machen, da die beschriebenen Transportwege eine Abfolge von Membranfusionen umfassen. Vti1a ist zwar nicht direkt an der Fusion später Endosomen mit Lysosomen involviert, ermöglicht aber Transportprozesse innerhalb der Golgi-Zisterne und Membranfusionen, die die frühen Endosomen umfassen (**Abb. 6.1**; Kreykenbohm *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1998; Brandhorst *et al.*, 2006). Daher stellt sich die Frage, ob der DKO einen Einfluss auf lysosomale Prozesse hat. Mit einem Sekretionsassay wurde daher durch Browski und Schöning untersucht, ob es zu einer vermehrten Sekretion lysosomaler Hydrolasen kommt. Dieser enzymatische Nachweis ermöglicht den Vergleich der Aktivität definierter Hydrolasen im Zellüberstand bezogen auf die Gesamtaktivität. So konnte Browski (Dissertation, 2010) eine vermehrte Sekretion der M6P-abhängigen, lysosomalen Hydrolasen β -Hexosaminidase, β -Mannosidase, β -Galaktosidase und β -Glucuronidase in *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* MEF nachweisen. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch Schöning (Dissertation, 2014) in

Neuronen beschrieben. Da die DKO Mäuse Auffälligkeiten am Skelett in Form von Fehlbildungen an Rippen und Sternum aufweisen, wurde der Sekretionsassay in kultivierten Chondrozyten etabliert. Da das Zellmaterial für dieses Modellsystem begrenzt war, wurden ausschließlich die beiden Hydrolasen β -Hexosaminidase und β -Galaktosidase untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} und *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Chondrozyten nachgewiesen.

Zur Vollständigkeit und besseren Vergleichbarkeit könnte der Assay in fortführenden Studien auch für die β -Mannosidase und β -Glucuronidase durchgeführt werden. Ebenso wäre eine Untersuchung von Osteoblasten auf vermehrte Sekretion von lysosomalen Hydrolasen interessant, da diese zusammen mit den Chondrozyten wichtig für die Knochenbildung sind. Für den Transport der β -Glucocerebrosidase wurde ein enzymatischer Assay durchgeführt, der den Vergleich der enzymatischen Aktivität dieses Proteins zwischen beiden Genotypen erlaubte. Dazu wurden immortalisierte MEF Zelllinien verwendet, da für die Etablierung des Nachweises so unbegrenzt Zellmaterial zur Verfügung stand. Die spezifische β -Glucocerebrosidaseaktivität wurde in Zellextrakten bestimmt. Hierbei wurden für die T-immortalen MEF E3T (DHET) und E4T (DKO) keine signifikanten Unterschiede in der β -Glucocerebrosidaseaktivität detektiert. Auffällig war die Zelllinie E7P (DKO), die eine signifikant höhere Aktivität als die Zelllinien E3P (DHET) und E1P (DHET) aufwies. E5P (DKO) war dahingegen nicht signifikant unterschiedlich zu den P-immortalen DHET Zelllinien. Dieses Ergebnis ist kritisch zu betrachten, da im DKO eher verringerte Aktivitäten aufgrund möglicher Fehlsortierungen, hervorgerufen durch den Verlust von *Vti1a* und *Vti1b*, erwartet wurden. Dies wurde bereits in MEF und Neuronen durch Browski und Schöning für verschiedene, M6P-abhängige lysosomale Hydrolasen gezeigt (Dissertationen, 2010 und 2014). Die Heterogenität der P-immortalen Zellkulturen, welche durch die Art der Immortalisierung bedingt ist, könnte dieses Ergebnis eventuell begründen. Häufig tragen diese Zellen heterogene Mutationen, die unterschiedliche Auswirkungen auf den Phänotyp haben können. Eine durch den *Vti1a* und *Vti1b* Verlust resultierende Fehlverteilung der lysosomalen Rezeptoren könnte durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen analysiert werden. Für die beiden M6P-Rezeptoren wurden diese bereits in verschiedenen MEF-Linien von Browski (Dissertation, 2010) durchgeführt. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen DHET und DKO Zellen detektiert. Es wäre sicherlich auch interessant, in weiteren Untersuchungen die Verteilung von LIMP-2 in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF zu bestimmen.

Dabei könnte auf spezialisierte Zellen, wie z.B. Chondrozyten oder Osteoblasten zurückgegriffen werden, um gewebsspezifische Unterschiede nachzuweisen. Beide Zelltypen sind interessant, da der Phänotyp der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse vor allem Defekte in Bereichen zeigt, deren Zellen sich vor allem aus Chondrozyten und/oder Osteoblasten zusammensetzen (Schöning, Dissertation, 2014).

Neben den bereits untersuchten Transportwegen gibt es weitere lysosomale Routen, die analysiert werden könnten. Abgesehen von den löslichen Hydrolasen sind integrale Membranproteine für die Funktion der Lysosomen wichtig. Sie ermöglichen die Ansäuerung des Organelllumens, den Proteinimport und den Transport von Degradationsprodukten ins Zytoplasma sowie die Membranfusion (Saftig und Klumpermann, 2009). So werden z.B. lysosomale Membranproteine anhand zweier, Dileucin- bzw. Tyrosin-basierender Motive sortiert (Braulke und Bonifacino, 2009). Auch hier wäre eine Untersuchung im Hinblick der *Vti1a*- und *Vti1b*-Doppeldefizienz interessant, die Aufschluss darüber geben könnte, ob in diesen Zellen lysosomale Membranproteine fehlsortiert sind. Zu dieser Klasse an Proteinen zählen z.B. LAMP-1, LAMP-2, LIMP-2 und CD63 (Saftig und Klumpermann, 2009). LAMP-1 und LIMP-2 wurden bereits immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurde vor allem die Verteilung sowie Kolo-kalisation von LAMP-1 und LIMP-2 in immortalen DHET und DKO MEF beurteilt. Beide Proteine kolo-kalisiert in vesikulären Strukturen. Die Untersuchung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden getesteten Genotypen. Für LAMP-2 und CD63 könnten diese Analysen ebenfalls durchgeführt werden.

Lysosomale Defekte konnten durch Browski (Dissertation, 2010) und Schöning (Dissertation, 2014) in Form von erhöhter Sekretion lysosomaler Hydrolasen in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen nachgewiesen werden. In Chondrozyten dieses Genotyps wurde dieser Effekt nicht detektiert. Auch die endolysosomalen Organellen waren unauffällig. Beim DKO könnte ein defekter *Vti1a*- und *Vti1b*-abhängiger Transportschritt dazu führen, dass entsprechende Proteine, die für den Transport von lysosomalen Enzymen zuständig sind, fehlsortiert sind. Lysosomale Enzyme, die auf dieses Transportprotein angewiesen sind, gelangen nicht ins Lysosom. Ganley *et al.* (2008) konnten dies für die Deletion von Syntaxin 10 zeigen. Zusammen mit *Vti1a*, Syntaxin 16 und VAMP3 ist Syntaxin 10 für das *Recycling* des M6P-Rezeptors von den späten Endosomen zum Golgi-Apparat zuständig. Ein Verlust von Syntaxin 10 führte zu einer vermehrten Sekretion des lysosomalen Enzyms Hexosaminidase. Lysosomale Speicherkrankheiten gehen daher meist mit einer Akkumulation der betroffenen

Substrate einher (Futerman und van Meer, 2004). Die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von LAMP-1, einem lysosomalen Membranprotein, zeigte im *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Mausembryo keine veränderten Lysosomen im Vergleich zum *Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}*. Andererseits könnten Substrate durch den Verlust eventuell nicht mehr oder nur zu einem geringen Anteil zum Abbau ins Lysosom gelangen und infolgedessen extralysosomal akkumulieren (Vellodi, 2005). Auch hier lieferten die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen keine abweichenden bzw. auffälligen Organellstrukturen in den DKO Zellen.

Eine vermehrte Sekretion lysosomaler Enzyme, die durch Schöning und Browski in *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Zellen nachgewiesen wurde (Dissertationen, 2010 und 2014), zeigt auch die Mukopolipidose II bzw. I-Zellkrankheit (*inclusion cell disease*). Bei dieser lysosomalen Speichererkrankung kommt es zu einem Defekt in der N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase. Dieses Enzym überträgt im Golgi während der Prozessierung M6P-Reste auf lysosomale Hydrolasen, welche bei einem Defekt als Folge sekretiert werden (Leroy und Demars, 1967; Leroy *et al.*, 1971; Tiede *et al.*, 2005).

Neben der Fusion von späten Endosomen mit den Lysosomen ist Vti1b an einer weiteren lysosomalen Membranfusion beteiligt. Vti1b, VAMP7, Syntaxin 7 und Syntaxin 8 regulieren die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen. Desweiteren ist Vti1b im Komplex mit den gleichen SNARE-Proteinen in der homotypischen Fusion von Phagophoren-Vorläufern involviert (Moreau *et al.*, 2013). Die Autophagozytose ist ein Prozess, der die Beseitigung von zytoplasmatischen Komponenten und Organellen ermöglicht. Im Zentrum steht dabei die Bildung von neuen Organellen aus isolierten Membranen, den sogenannten Phagophoren, die durch Expansionen zu Autophagosomen werden und eine Doppelmembran aufweisen. Diese Organellen fusionieren mit Lysosomen, was den Abbau des eingeschlossenen Materials samt innerer Membran ermöglicht. Dieser Vorgang wird durch unterschiedliche physiologische Signale induziert (Nakatogawa *et al.*, 2009). Erste Untersuchungen zur Autophagozytose im Zusammenhang mit Vti1a und Vti1b wurden von Browski (Dissertation, 2010) und Moreth (Dissertation, 2014) durchgeführt. Es konnte bisher kein Einfluss des DKOs auf diesen Prozess detektiert werden, obwohl es sich bei der Bildung von Autophagosomen und deren Fusion mit Lysosomen um Vti1b-abhängige Vorgänge handelt.

Fraldi *et al.* (2010) konnten durch die Analyse der neurodegenerativen Speichererkrankungen Multiple Sulfatase Defizienz und Mukopolysaccharidose Typ IIIA zeigen, dass es dort zu einer ungewöhnlich hohen Akkumulation von Cholesterin in

endolysosomalen Membranen kommt. Hierdurch wird die Fusion dieser Organellen mit endozytotischen bzw. autophagozytotischen Vesikeln stark beeinträchtigt. In diesen Cholesterin-reichen Regionen der endolysosomalen Membranen werden SNARE-Proteine, wie z.B. Vti1b, eingelagert und verbleiben dort in komplexierter Form, so dass sie für eine Sortierung bzw. ein *Recycling* und damit für Membranfusionen nicht zur Verfügung stehen. Fraldi *et al.* (2010) senkten *in vitro* den Cholesterin-Gehalt in diesen Membranen und konnten zeigen, dass dadurch der Funktionsblock aufgehoben und die Membranfusion der Lysosomen mit Vesikeln ermöglicht wird. Genauso führte eine *in vitro* Erhöhung des Cholesteringehalts in Wildtyp Zellen zu den beschriebenen Phänomenen der Speichererkrankungen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der EGFR in den krankheitsassoziierten Zellen nicht abgebaut wird, was darauf hindeutet, dass der Transport bzw. die Membranfusion zwischen Endosomen und Lysosomen blockiert ist (Fraldi *et al.*, 2010). Der Verlust von Vti1a und Vti1b könnte einen ähnlichen Phänotyp hervorrufen, da beide SNARE-Proteine an betroffenen Transportschritten beteiligt sind. In weiteren Untersuchungen könnte eine Filipin-Färbung Aufschluss über den intrazellulären Cholesteringehalt bzw. die subzelluläre Cholesterinverteilung in Vti1a- und Vti1b-doppeldefizienten Zellen geben. Interessanterweise konnte Browski (Dissertation, 2010) durch eine Nilrotfärbung in einer von vier getesteten DKO Zelllinien eine erhöhte Lipidakkumulation nachweisen.

Vti1a und Vti1b spielen eine Rolle bei lysosomalen Transporten, daher wurde untersucht, ob ein DKO der beiden Proteine einen Einfluss auf diese Vorgänge hat. Die Untersuchung von *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Chondrozyten zeigte keine signifikant vermehrte Sekretion der getesteten lysosomalen Hydrolasen. Der LIMP-2-abhängige Transport war durch den Verlust von Vti1a und Vti1b nicht beeinträchtigt. Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen der Lysosomen waren ebenso unauffällig. In dieser Arbeit wurden daher keine lysosomalen Defekte in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen nachgewiesen.

6.2 Die *Vti1a*- und *Vti1b*-Doppeldefizienz führt zu einer reduzierten Aktivität der TGF- β /BMP-Signalwege

Zwei unterschiedliche Mechanismen sorgen für die Knochenbildung. Bei der chondralen Osteogenese wird aus mesenchymalen Zellen zunächst eine Knorpelvorstufe gebildet, woraus später das Knochengewebe entsteht. Im Gegensatz dazu beschreibt die desmale Osteogenese einen Prozess, bei dem der Knochen direkt aus Mesenchymzellen gebildet wird (Berendsen *et al.*, 2015). Interessanterweise zeigten *Vti1a*- und *Vti1b*-doppeldefiziente Mäuse phänotypische Veränderungen, die diese Prozesse betreffen. Bei diesen Embryonen waren hauptsächlich Rippen, Sternum und Vorderpfoten verändert, die durch chondrale Ossifikation entstehen. Gleichzeitig wurde eine Veränderung in der Kalzifizierung von knorpeligem Gewebe detektiert (Schöning, Dissertation, 2014). Diese Auffälligkeiten treten häufig dann auf, wenn Komponenten von Signaltransduktionswegen nicht vorhanden sind oder Fehlregulationen aufweisen. In den bisherigen Untersuchungen, die vor allem Struktur und Funktion von Organellen betrafen, zeigten Zellen *Vti1a*- und *Vti1b*-doppeldefizienter Mäuse keine signifikanten Unterschiede zu ihren Wurfgeschwistern. Daher wurden *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse mit Tieren verglichen, denen unterschiedliche, für die Entwicklung wichtige, Signalproteine wie TGF- β 2, TGF- β 3, EGFR oder BMP-7 fehlten. Dabei konnten einige Übereinstimmungen hinsichtlich ihrer phänotypischen Defekte nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede in der Reaktion von DKO und DHET Zellen wurden nach Zugabe von TGF- β 1 und BMP-2 detektiert. Mit diesen Experimenten wurde durch Zugabe des Liganden die zeitabhängige Phosphorylierung der zugehörigen R-Smads gemessen und quantifiziert, um die Aktivität dieser Signalwege in beiden Genotypen zu vergleichen. Ein verringertes Level an phosphoryliertem R-Smad nach Zugabe von TGF- β 1 und BMP-2 im DKO zu detektieren war unerwartet. Unterschiede wurden vor allem bei TGF- β 2 und BMP-7 vermutet, weil die entsprechend defizienten Tiere den *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäusen phänotypisch ähnelten. Hier waren die Level an phosphoryliertem R-Smad nach entsprechender Stimulation zwischen DHET und DKO identisch. Ein durchaus wichtiger Diskussionspunkt ist, dass zwar die Rezeptoren und die intrazellulären Signalproteine für alle BMP/TGF- β -Familienmitglieder gleich sind, es allerdings Unterschiede in der initialen Bindung des Liganden gibt. So benötigen TGF- β 2 und BMP-7 für die erste Bindung eine Kombination aus beiden Rezeptortypen, während für die anderen Liganden ein Rezeptortyp ausreicht, weshalb der Verlust von *Vti1a* und *Vti1b* bei der Stimulation mit TGF- β 2 und BMP-7 stärker

zum Tragen kommen müsste (Boesen *et al.*, 2002; Greenwald *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2002). Ein sehr wichtiger Prozess bei der rezeptorvermittelten Signaltransduktion ist die Endozytose dieser Rezeptor-Ligand-Komplexe in frühe Endosomen. Hayes *et al.* (2002) zeigten, dass die Internalisierungsrate des Rezeptors mit der Translokationsrate von Smad2 in den Zellkern korreliert. Des Weiteren wiesen ihre Ergebnisse darauf hin, dass der Prozess der Endozytose die TGF- β -Signaltransduktion positiv reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Internalisierung des TGF- β -Rezeptors in MEF untersucht. Es wurde für beide Genotypen, DHET und DKO, eine eher geringe Internalisierungsrate beobachtet. Die ermittelten Werte wiesen dadurch hohe Standardabweichungen auf, weshalb statistische Tests keine Signifikanz zeigten. Die Differenz der Mittelwerte von DHET und DKO war jedoch eher gering, so dass es vermutlich keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen gibt. Dieser Versuchsansatz wurde nicht weiter verfolgt. Ein weiterer Ansatz, um die Internalisierung der TGF- β - bzw. BMP-Rezeptoren zu untersuchen, wäre z.B. eine Oberflächenbiotinylierung. Diese Methode bietet den Vorteil, dass sie nicht von einer Antikörperbindung abhängig ist, wie es beim Nachweis im Durchflusszytometer der Fall war. Des Weiteren kann der Versuchsablauf so gestaltet werden, dass nur internalisiertes Protein nachgewiesen wird. Hier wirken sich Prozesse wie z.B. das *Recycling* von Rezeptoren weniger auf das Ergebnis aus, als an der Zelloberfläche. Vermutlich würden dadurch auch deutlich höhere und damit weniger fehleranfällige Werte erhalten. Allerdings ist die Etablierung dieses Nachweissystems anspruchsvoll.

Der phänotypische Vergleich der *Vti1a*- und *Vti1b*-doppeldefizienten Mausembryonen zeigte Gemeinsamkeiten mit Tieren, denen TGF- β -Proteine fehlten. Die Zellen dieser Mäuse waren demnach nicht in der Lage TGF- β zu sekretieren, um Signaltransduktionswege in benachbarten Zellen des Zellverbandes zu initiieren. Die Komponenten dieser Wege, wie z.B. zugehörige Smads, sollten dennoch exprimiert werden. Daher lag im nächsten Schritt dieser Arbeit der Fokus auf der Sekretion von Signalmolekülen. TGF- β durchläuft eine Reihe von Modifikationen bis das eigentliche Signalmolekül sekretiert werden kann (Clark und Coker, 1998). Veränderungen im sekretorischen Transportweg der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen sollten durch ein Reportersystem (Gordon *et al.*, 2010) aufgedeckt werden. Dieses akkumuliert unter Standardbedingungen im ER und wird erst durch Zugabe eines Liganden vom ER in den Golgi transportiert und abschließend sekretiert. Aufgrund der sehr geringen Transfektionseffizienz und der geringen Zellausbeute eigneten sich primäre Zellen für diesen

Assay nicht, weshalb auf immortalisierte Zelllinien zurückgegriffen wurde. Diese wurden mit dem Reporterkonstrukt transient transfiziert. Da die Halbwertszeiten der GFP-Fluoreszenz der DKO MEF nicht signifikant unterschiedlich zu denen der DHET MEF waren, lässt sich daraus schließen, dass der intrazelluläre Transport bzw. die Sekretion des Reporterkonstrukts durch einen Verlust von Vti1a und Vti1b vermutlich nicht beeinflusst wurde. Diese Methode lässt erste Rückschlüsse auf mögliche Defekte in der Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- β , zu. Wenn der Transport des Reporterkonstrukts unbeeinflusst ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch der Transport bzw. die Sekretion von Wachstumsfaktoren unverändert stattfindet. Allerdings müssen hierbei auch die Unterschiede zwischen einem Reporterkonstrukt und Wachstumsfaktoren in Betracht gezogen werden. So wird z.B. TGF- β als Pre-Pro-Peptid synthetisiert und durchläuft eine Vielzahl an Modifikationen. Es wird als inaktives Molekül, assoziiert mit *Latency Associated Peptide* (LAP) und *Latent TGF- β -Binding Protein* (LTBP), sekretiert. Im Extrazellularraum bindet es zunächst an M6P-Rezeptoren oder an der ECM (*extracellular Matrix*), bis es durch enzymatische Prozesse in seine aktive Form übergeht und so Signaltransduktion induzieren kann (Clark und Coker, 1998; Rifkin, 2005). Dieser komplexe Prozess wird durch das verwendete Reportersystem nicht überprüft.

Zellmigration beschreibt die Bewegung von Zellen innerhalb eines Organismus, einen Vorgang, der für viele zelluläre Prozesse wichtig ist und nach einem definierten Schema abläuft. Im ersten Schritt bildet die Zelle Fortsätze, wie Lamellipodien und Filopodien, und polarisiert sich in Richtung eines migrationsauslösenden Signals. Bei diesem Prozess spielt vor allem die Aktinpolymerisation eine große Rolle. Die Zellfortsätze werden durch Interaktionen von Transmembranrezeptoren, hauptsächlich Integrinen, mit der extrazellulären Matrix bzw. benachbarten Zellen stabilisiert. Diese Adhäsionspunkte sind besonders wichtig für den Migrationsprozess, wohingegen beschriebene Interaktionen in der Migration entgegengesetzten Richtung aufgelöst werden (Ridley *et al.*, 2003). SNARE-Proteine werden für die gezielte Migration von Zellen benötigt. Sie regulieren die intrazelluläre Verteilung von Integrinrezeptoren und unterstützen die Membranremodellierung, welche für die Verlängerung der beim Migrationsprozess ausgebildeten Lamellipodien benötigt wird (Tayeb *et al.*, 2005). Die Inhibition der SNARE-Funktion führt zu einem moderaten Abfall der Zelloberflächenintegrine, welche mit einer verringerten Zellmigrationseffizienz einhergeht. Tayeb *et al.* (2005) konnten dies mit Hilfe einer dominant

negativen NSF-Mutante (E329Q) zeigen. Diese ATPase ist für die Disassemblierung von SNARE-Komplexen zuständig (Whiteheart *et al.*, 1994). Die mutierte Variante dieses Enzym ist nicht in der Lage ATP zu hydrolysieren und führt zu einer intrazellulären Akkumulation von SNARE-Komplexen. Infolgedessen kommt es zu einer Reduktion von freien SNARE-Proteinen, die für Membranfusionen zur Verfügung stehen (Tayeb *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die E329Q-Mutante verringerte Mengen des Fibronectin Rezeptors ($\alpha 5\beta 1$), einem Zelloberflächenintegrin, aufwies. Dieses Resultat kann anhand von zwei Modellen erklärt werden. In einem ersten Modell verursacht die Inhibition der SNARE-Proteine eine Verringerung der membranständigen Integrine, wodurch es zu fehlenden Kontakten zwischen Membranextensionen und ECM-Substraten kommt. Folglich können die Lamellipodien nicht an der Matrix binden und bilden sich zurück. Die Migration wird dadurch negativ beeinflusst. Ein zweites Modell beschreibt, dass der SNARE-abhängige Transport von membranumschlossenen Vesikeln direkt für die Ausbildung der Lamellipodien benötigt wird, da diese Vesikel das entsprechende Membranmaterial liefern (Tayeb *et al.*, 2005). Da Vti1a und Vti1b für eine Vielzahl an Membranfusionen an unterschiedlichen Zellorganellen, wie z.B. frühen und späten Endosomen, essentiell sind, kann der Verlust beider Proteine die Migrationseffizienz der Zellen stark beeinflussen (**Abb. 6.2**).

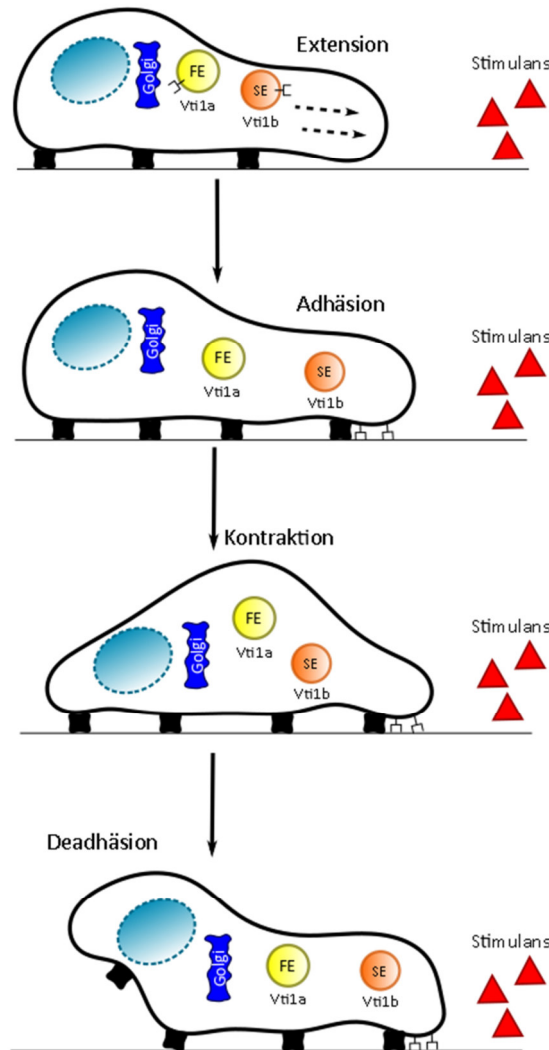


Abb. 6.2 Schematische Darstellung einer migrierenden Zelle

Die Zellmigration kann in verschiedene Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt kommt es in Richtung des Stimulus (Stimulans) zu Membranausstülpungen bzw. -verlängerungen. Anschließend heften sich diese Extensionen an das Substrat an. Die Zelle kontrahiert und löst die Verknüpfungen zum Substrat am anderen Ende der Zelle. Vti1a und Vti1b könnten in diesen Prozessen involviert sein, indem sie z.B. die Lieferung des nötigen Membranmaterials oder der Rezeptoren ermöglichen (FE= frühes Endosom, SE= spätes Endosom).

Als Resultat wäre der beschriebene Knochenphänotyp denkbar, da die Migration eine bedeutende Rolle in der Knochenbildung spielt. Tang *et al.* (2009) zeigten, dass eine TGF- β 1 abhängige Signalaktivität die Migration von humanen und tierischen mesenchymalen Knochenstammzellen induziert, um Knochenresorption und -bildung zu koordinieren. Ein Effekt in T-immortalen DKO MEF ist ein deutlich langsamerer Wundschluss im Vergleich zu DHET Zellen. In zwei unterschiedlichen Ansätzen wurde dazu die Zellmigration in verschiedenen T- und P-immortalen MEF-Zelllinien untersucht. Dabei wurden die Zellen im ersten Schritt unter Standardbedingungen kultiviert. Hier konnte nach 24 h ein signifikant

langsamerer Wundschluss in T-immortalen DKO detektiert werden. Unter Hungerbedingungen, bei denen die Zellteilung einen geringeren Einfluss auf die migratorische Aktivität haben sollte, war ein deutlich stärkerer Effekt zu beobachten. So war der Wundschluss bereits nach 16 h in zwei verschiedenen T-immortalen DKO Zelllinien signifikant langsamer. Interessanterweise war bei den P-immortalen Zellen kein Effekt zu beobachten. Dieses Resultat könnte auf die Heterogenität der Zellen zurückgeführt werden, welche durch die Art der Immortalisierung hervorgerufen wurde. Hierbei kann es zu verschiedenen spontanen Mutationen kommen, die die Zellen unterschiedlich beeinflussen können. Die verlangsamte Migration in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen geht eventuell mit einer veränderten Integrinlokalisierung und -menge einher, welche entsprechend untersucht werden sollte. Eine Möglichkeit besteht z.B. in der Verwendung eines Durchflusszytometers, um Antikörper-markierte Oberflächenintegrine zu quantifizieren.

Die Zellmigration ist ein Prozess, der von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird. Auch der MAPK-Weg ist in migratorische Prozesse involviert. PTH (*parathyroid hormone*) stimuliert z.B. Osteoblasten und Osteozyten zur Freisetzung von Amphiregulin. Dieses Protein bindet am EGFR in mesenchymalen Vorläuferzellen und stimuliert so die Zellmigration (Zhu *et al.*, 2012). In *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF wurde im Vergleich zu *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} eine veränderte postendozytotische Sortierung nach 15 minütiger EGF-Stimulation detektiert. Während die Proteinmenge im DKO annähernd konstant blieb, war zu Beginn der Stimulation im DHET eine Neusynthese des Rezeptors nachweisbar. Diese Unterschiede betrafen sowohl T-immortale MEF (Schmücker, Masterarbeit, 2013), als auch primäre MEF. Möglicherweise sind *Vti1a* und *Vti1b* für die postendozytotische Sortierung verantwortlich, da sie an den betroffenen Organellen lokalisiert sind. In der Literatur wurde nach 70 minütiger EGF-Stimulation von HeLa Zellen noch 50 % der ursprünglichen Menge des EGFR detektiert (Sigismund *et al.*, 2008). Eine annähernd ähnliche Degradationsrate konnte ausschließlich für die DHET MEF nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten Antonin *et al.* (2000b) zeigen, dass die Antikörper-abhängige Inhibition von *Vti1b* den EGF-Transport zu den Lysosomen negativ beeinflusst.

Eine Auswirkung des DKOs auf die EGF-stimulierte Zellmigration wäre durchaus denkbar. Auch BMP-2 stimuliert die chemotaktische Migration von verschiedenen Osteoblastentypen und könnte damit eine Funktion in der Knochenremodellierung und -heilung haben (Lind *et al.*, 1996). Bereits 1987 konnten Postlethwaite *et al.* zeigen, dass auch TGF-β die

chemotaktische Migration in Fibroblasten stimulieren kann. Um den Einfluss von TGF- β , BMP und EGF auf die Zellmigration von MEF zu untersuchen, wurden DHET und DKO Zellen mit diesen Faktoren stimuliert. Unterschiede zwischen stimulierten und nicht stimulierten Migrationsansätzen wurden, unabhängig vom Genotyp, nicht detektiert. Aufgrund des verringerten pSmad/Smad-Levels und der verringerten EGFR-Menge in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF wurde erwartet, dass die Zellmigration ebenso beeinflusst ist, da bei verringerter Signaltransduktion eine Vielzahl an zellulären Prozessen reduziert sein könnte, die mit der Zellmigration im Zusammenhang stehen. Weitere Untersuchungen sollten daher in spezialisierten Zellen, wie z.B. Osteoblasten, erfolgen. Hierbei sollte vor allem die chemotaktische Migration untersucht werden, da sie für den Organismus essentiell ist. Sie spielt z.B. bei Knochen bildenden Zellen eine große Rolle, da sie sowohl für die Knochenheilung als auch für den -umbau benötigt wird (Lind *et al.*, 1996). In diesem Bereich weisen *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäuse diverse Defekte auf, die mit Knochendefekten und -Fehlstellungen einhergehen.

Da die molekulare Basis des beschriebenen Phänotyps der DKO Mäuse mit den bisherigen Ergebnissen nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, sollten weitere Analysen folgen. In diesem Rahmen wäre die Untersuchung der Mäuse hinsichtlich Runx2 (*Runt related transcription factor 2*), auch bekannt als Cbfa1 (*core binding factor α 1*), interessant. Dabei handelt es sich um ein wichtiges Gen für die Osteoblastendifferenzierung. Die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors wird beispielsweise durch TGF- β und BMP über die entsprechenden Smad-Proteine reguliert, weshalb Defekte im TGF- β und BMP-Signalweg, wie die im DKO verringerten Level an pSmad/Smad, Auswirkungen auf dieses Protein haben könnten (Ito und Miyazono, 2003). Die Deletion von Runx2 betrifft sowohl die desmale als auch die chondrale Ossifikation und resultiert in einem kompletten Verlust der Knochenbildung, welcher durch einen Reifungsarrest der Osteoblasten hervorgerufen wird. Mäuse dieses Genotyps sterben direkt nach ihrer Geburt ohne geatmet zu haben (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass Runx2 ein essentieller Faktor für die Osteoblastendifferenzierung ist. Zudem spielt er eine wichtige Rolle in der Chondrozytenreifung innerhalb der chondralen Ossifikation. Die Expression von Runx2 wird in mesenchymalen Zellen initiiert, bevor sie sich zu Chondrozyten differenzieren. Die Expression wird in diesen Zellen aufrechterhalten, bis ihre Differenzierung vollständig abgeschlossen ist. Das Expressionslevel variiert bei diesem Prozess. Interessanterweise

verlieren Runx2^{-/-} Chondrozyten ihren charakteristischen Phänotyp und durchlaufen eine Differenzierung zu Adipozyten. Ein vollständiger Runx2 Verlust kann in den *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Tieren ausgeschlossen werden, da die Knochenbildung generell vorhanden ist und nur lokal Defekte auftreten, wie z.B. die verringerte Kalzifizierung des Sternums und das fehlende 13. Rippenpaar (Schöning, Dissertation, 2014). Allerdings wäre ein verringertes Expressionslevel oder eine Fehlregulation denkbar, die den gezeigten Phänotyp erklären könnte (Enomoto *et al.*, 2004). Da in den *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäusen Runx2 bisher noch nicht untersucht wurde, wäre eine Expressionsanalyse sinnvoll. Je nach Ergebnis könnten sich entsprechend weitere Experimente anschließen. Inada *et al.* (1999) stellten die Hypothese auf, dass Runx2/Cbfa1 direkt oder indirekt Hox-Gene beeinflussen kann. Hox-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, deren zeitlich- und räumlich-abhängige Expression wichtig für die Embryonalentwicklung ist. Defekte in der Expression dieser Gene im *Vti1a*- und *Vti1b*-defizienten Organismus können nicht ausgeschlossen werden. Der im DKO fehlende Lendenwirbel könnte z.B. ein Hinweis auf eine Hox-Gen-Problematik sein und sollte daher näher untersucht werden. Der Nachweis dieser Gene könnte auf mRNA-Ebene über *in-situ*-Hybridisierung erfolgen, um die Aktivität von verschiedenen Genen in unterschiedlichen Stadien der Embryogenese zu analysieren. So konnten z.B. Davis und Joyner (1988) mittels *in-situ*-Hybridisierung nachweisen, dass die murinen Hox-Gene *En-1* und *En-2* für die Entwicklung des zentralen Nervensystems zuständig sind. Später in der Entwicklung könnten sie eine zusätzliche Funktion in der Neurogenese haben. Eine *in-situ*-Hybridisierung könnte eventuell Aufschluss darüber geben, ob es in den *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Mäusen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Aktivität der für die Embryonalentwicklung essentiellen Gene im Vergleich zu heterozygoten Wurfgeschwistern gibt.

Vti1a- und *Vti1b*-defiziente Mausembryonen zeigen diverse phänotypische Ähnlichkeiten mit Tieren, denen Signalproteine des TGF- β -/BMP-/EGF-Signalwegs fehlen (Schöning, Dissertation, 2014; Sanford *et al.*, 1997; Heupel *et al.*, 2008; Dünker und Kriegelstein, 2002; Jena *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1995; Miettinen *et al.*, 1999). Untersuchungen dieser Signalwege in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen zeigten im Vergleich zu *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Zellen ein verringertes pSmad/Smad-Verhältnis bzw. eine verringerte EGFR-Menge nach Stimulation mit den zugehörigen Liganden. Die Zellmigration ist in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen ebenso auffällig verändert, denn sie ist im Vergleich deutlich verlangsamt. Zusammengenommen könnten diese zellulären Effekte erste Hinweise auf die molekulare Basis der phänotypischen

Manifestationen liefern. Ergebnisse weiterer Untersuchungen könnten den beschriebenen Zusammenhang ausbauen.

6.3 SNAP-29 und SNAP-47 sind mögliche Kandidaten für einen funktionellen Ersatz von Vti1a und Vti1b

Vti1a und Vti1b vermitteln verschiedene Membranfusionen an unterschiedlichen Organellen wie z.B. TGN, Endosomen und Lysosomen. Damit regulieren sie essentielle Schritte im Transportsystem der Zelle. In *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Zellen wurden bisher keine auffälligen Veränderungen der Organellstrukturen nachgewiesen. Die detaillierte Untersuchung der Lysosomen ergab keine Abweichungen zu Wurfgeschwistern. Auch die Analyse diverser Signalwege zeigte nur geringe Effekte. Auch *Vti1a^{+/-} Vti1b^{-/-}* bzw. *Vti1a^{-/-} Vti1b^{+/-}* Tiere weisen wenige Auffälligkeiten auf (Atlashkin *et al.*, 2003; Kunwar *et al.*, 2011). Hier liegt die Vermutung nahe, dass das verbliebene SNARE die Funktion des Deletierten übernehmen kann. Dies könnte ein erster Hinweis auf einen funktionellen Ersatz von Vti1a und Vti1b durch andere SNARE-Proteine sein (Kunwar *et al.*, 2011). In der SNARE-Proteinfamilie ist dieses Prinzip an anderen Beispielen bereits beschrieben worden. Yang *et al.* (2001) charakterisierten VAMP3 KO Mäuse und zeigten, dass sie phänotypisch hinsichtlich ihrer Glukose Homöostase, ihres Glukose Transports, ihrer Pinozytose und im generellen *Recycling* von membranständigen Rezeptoren unauffällig waren. Dies war ein unerwartetes Ergebnis, da VAMP3 für die Verschmelzung von GLUT4 (Glukose Transporter Typ 4) Vesikeln mit der Plasmamembran benötigt wird (Volchuk *et al.*, 1995). Sie vermuteten, dass VAMP2 bzw. ein anderes SNARE-Protein den Verlust von VAMP3 kompensieren kann. Dieses Protein konnte ebenso in GLUT4 Vesikeln gefunden werden (Volchuk *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1996). In anderen Untersuchungen wurde an Synapsen hippocampaler Neuronen aus VAMP2 KO Mäusen gezeigt, dass es zu einer 10fachen Abnahme in der spontanen, synaptischen Neurotransmitterfreisetzung, einem ähnlichen Abfall in der Sucrose-ausgelösten und sogar einem mehr als 100fachen Abfall in der Ca²⁺-induzierten Freisetzung kommt. Diese Ergebnisse zeigten, dass ein Verlust von VAMP2 bei der synaptischen Fusion generell kompensiert werden kann, aber die hohe Rate an Fusionen bei Stimulation an Synapsen nicht erreicht wird. Die Autoren stellten verschiedene Hypothesen zu diesen Resultaten auf. Dabei vermuteten sie, dass VAMP2 durch andere SNARE-Proteine ersetzt werden kann. Dies

würde auch die verbleibende Fusionsaktivität erklären. Für den Ersatz von VAMP2 kommen die verwandten Proteine Synaptobrevin 1 und Cellubrevin/VAMP3 in Frage. Deren Expression konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, da das Expressionslevel wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze lag (Schoch *et al.*, 2001). Ebenso konnten Borisovska *et al.* (2005) zeigen, dass VAMP2 im Falle eines KO durch VAMP3 ersetzt werden kann, indem die Ca^{2+} -abhängige Exozytose von chromaffinen Granula in neuroendokrinen Zellen untersucht wurde. Auch im Hefemodell wurde eine funktionelle Redundanz von SNARE-Proteinen dokumentiert. Sec22p ist für den subzellulären Transport zwischen ER und Golgi wichtig. Liu und Barlowe (2002) konnten zeigen, dass bei Abwesenheit von Sec22p das SNARE Ykt6p hochreguliert wird und dessen Funktion im beschriebenen Transportweg ersetzen bzw. mit den zuständigen anderen SNARE-Proteinen interagieren kann. Ykt6p kommt bei multiplen Transportschritten vor. Es vermittelt Fusionsvorgänge im retrograden Transport zum *cis*-Golgi, in der homotypischen Vakuolenfusion und im anterograden Transport vom Golgi-Apparat zur Vakuole (McNew *et al.*, 1997; Ungermann *et al.*, 1999; Dilcher *et al.*, 2001). Interessanterweise kann das humane Vti (hVti) das Vti1a bzw. Vti1b homologe Qb-SNARE Vti1p in der Hefe ersetzen (Fischer von Mollard und Stevens, 1998). Vti1p interagiert mit weiteren SNARE-Proteinen in vier verschiedenen Komplexen. Es katalysiert, ähnlich dem Vti1b im Säuger, die Fusion später Endosomen und Membranfusionen mit der Vakuole (Dilcher *et al.*, 2001; Kweon *et al.*, 2003; Lewis und Pelham, 2002; Ungermann *et al.*, 1999). Homotypische Fusionen am TGN sowie der retrograde Transport von frühen Endosomen zum TGN werden von Vti1p vermittelt (Brickner *et al.*, 2001; Holthuis *et al.*, 1998). Analog zu Vti1a, ist es für retrograde Fusionen am Golgi zuständig (Banfield *et al.*, 1995; Lupashin *et al.*, 1997; McNew *et al.*, 1997). Der KO von Vti1p ist letal und die Funktionen dieses Proteins werden scheinbar nicht durch ein anderes SNARE übernommen (Fischer von Mollard *et al.*, 1997).

Das Thema funktionelle Redundanz ist für Vti1a und Vti1b in zwei Aspekten von Bedeutung. Zum einen scheinen die beiden SNAREs die Funktion des jeweils anderen teilweise übernehmen zu können. Dies wird bei dem sehr schwach ausgeprägten Phänotyp der *Vti1a^{+/-} Vti1b^{-/-}* bzw. *Vti1a^{-/-} Vti1b^{+/-}* Mäuse deutlich. Zum anderen stellt sich die Frage, warum zwar der DKO Organismus nicht lebensfähig ist, aber Zellen aus den Embryonen dieses Genotyps isoliert und kultiviert werden können. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass der Organismus komplexer ist als eine kultivierte Zellpopulation, der

optimal abgestimmte Nährstoffe, wie z.B. Vitamine und Zucker, zugeführt werden. Das hormonelle System sowie die Versorgung von komplexen Organen bzw. Geweben und das Zusammenspiel als ganzer Organismus sind Faktoren, die hier keine Rolle spielen.

Qb-SNAREs, wie z.B. Sec20, Gosr2 und Gosr1, können die Aufgaben von Vti1a und Vti1b vermutlich nicht übernehmen, da sie intrazellulär nicht entsprechend lokalisiert sind (Jahn und Scheller, 2006; Kloepper *et al.*, 2008). Besonders geeignete Kandidaten für den funktionalen Ersatz von Vti1a und Vti1b sind die Qbc-SNAREs SNAP-29 und SNAP-47, da sie die für diese Aufgabe benötigten Eigenschaften besitzen. Sie weisen das erforderliche Qb-SNARE-Motiv auf und besitzen keine Transmembrandomäne. SNAP-29 und SNAP-47 werden ubiquitär exprimiert und sind intrazellulär breit verteilt, so dass die Funktionen von Vti1a und Vti1b an den verschiedenen Organellen, wie z.B. frühen und späten Endosomen ersetzt werden könnten und es nicht bereits durch die subzelluläre Lokalisation eine Limitierung gibt (Stegmaier *et al.*, 1998; Holt *et al.*, 2006). Des Weiteren besitzen SNAP-29 und SNAP-47 keine homologen Proteine in der Hefe, die eine Defizienz von Vti1p kompensieren könnten (Kunwar *et al.*, 2011).

Erste Untersuchungen zum Ersatz wurden bereits durchgeführt, in dem z.B. *knockdown*-Konstrukte für SNAP-29 und SNAP-47 generiert wurden (Schmücker, Masterarbeit, 2013). Des Weiteren wurde in diversen Geweben von *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} und *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} Mäusen eine vergleichbare Expression der Qbc-SNAREs detektiert. Dies muss kein Ausschluss für die getesteten Ersatzkandidaten sein, da kompensatorische SNARE-Proteine häufig keine erhöhte Expression aufweisen (Borisovska *et al.*, 2005). Die subzelluläre Verteilung von SNAP-29 und SNAP-47 in *Vti1a*- und *Vti1b*-doppeldefizienten Zellen wurde mit der in doppelheterozygoten Zellen verglichen. Dabei ergaben sich keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Untersuchungen zu Koloalisationen von SNAP-29 und SNAP-47 mit Komplexpartnern von Vti1a und Vti1b lieferten Übereinstimmungen für SNAP-29 und Syntaxin 6 bzw. Syntaxin 7 sowie SNAP-47 und Syntaxin 7. In *Yeast-three/four-Hybrid* Interaktionsassays waren die Ergebnisse nicht eindeutig und zeigten, dass schwache Interaktionen von SNAP-29 und SNAP-47 mit Vti1a und Vti1b Komplexpartnern möglich waren (Schöning, Dissertation, 2014).

In dieser Arbeit folgten Experimente, bei denen der mögliche Ersatz von Vti1p in Hefe durch die Säuger Qbc-SNAREs SNAP-23, SNAP-25, SNAP-29 und SNAP-47 untersucht wurde. Diese Analysen in Hefe durchzuführen bietet einige Vorteile. Die Transformation von Hefezellen

mit einem oder mehreren Plasmiden geht mit einer hohen Effizienz einher, da dieser Organismus genetisch leicht beeinflussbar ist. Hefen bieten den Vorteil von relativ kurzen Anzuchtzeiten und gleichzeitig niedrigen Kosten, da Kultivierungsmedien günstig hergestellt werden können. Allerdings gibt es auch Nachteile. Die Hefe ist ein eukaryotisches System und damit sind posttranslationale Modifikationen möglich, aber die Glykosylierung unterscheidet sich im Vergleich zum Säugetier und kann daher bei der Expression von Säugerproteinen zu Problemen führen. So kommt es in der Hefe häufig zu mannosereichen N-Glykanen, die im Säugersystem unüblich sind (Pourcq *et al.*, 2010).

Weiterhin wurde für diese Arbeit untersucht, ob die Säuger Qbc-SNAREs in der Lage sind, die Funktionen von Vti1p zu übernehmen. Für diese Analyse bieten sich verschiedene Hefestämme an, die Mutationen im Vti1p-Gen aufweisen (**Abb. 6.3**). Bei 37 °C ist in *vti1-2* (VTI-Mutationen: S130P, I151T) Zellen der Transport der alkalischen Phosphatase (ALP) defekt (Fischer von Mollard und Stevens, 1999). Auch ist in diesen Mutanten das *Recycling* von GFP-Snc1p von der Plasmamembran zum TGN gestört (Stein *et al.*, 2009). Ebenso wurde eine vermehrte Sekretion der Golgi-Proform p2CPY, einer Vorläuferform der reifen, vakuolären Carboxypeptidase Y (CPY), detektiert, was auf einen defekten Transport vom TGN zum späten Endosom hindeutet. *Vti1-2* Mutanten weisen einen leichten Wachstumsdefekt bei 37 °C auf (Fischer von Mollard *et al.*, 1997). In *vti1-11* (VTI-Mutationen: Y8R, K20R, H40R, N61S, K73R, Q84R, E145G und L155F) Zellen ist der retrograde Transport zum *cis*-Golgi blockiert, wodurch die ER-Proform p1CPY in der Zelle akkumuliert. Gleichzeitig wird etwas p2CPY sekretiert, was zeigt, dass der Transport vom TGN zum späten Endosom ebenfalls beeinträchtigt ist. *Vti1-11* Zellen zeigen einen Wachstumsdefekt bei 37 °C (Fischer von Mollard *et al.*, 1997). GFP-Snc1 *Recycling* ist in *vti1-11* Zellen, im Vergleich zur *vti1-2* Mutante, nicht beeinflusst (Stein *et al.*, 2009).

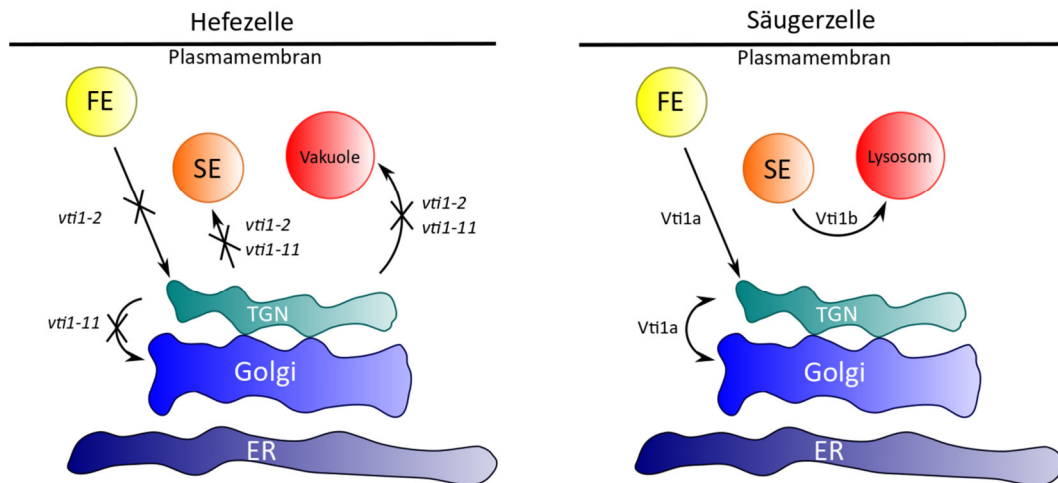


Abb. 6.3 Defekte Vti1p-abhängige Transportwege der Stämme *vti1-2* und *vti1-11*

Bei der restriktiven Temperatur zeigen die Stämme *vti1-2* und *vti1-11* diverse Defekte im intrazellulären Transport. Davon betroffen ist der Transport vom TGN zum späten Endosom (SE) und zur Vakuole. In *vti1-11* Zellen ist zudem der retrograde Transport vom TGN zum Golgi, in *vti1-2* Zellen der retrograde Transport vom frühen Endosom (FE) zum TGN dysfunktional. SNAP-29 konnte den Wachstumsdefekt der beiden Stämme aufheben. Möglicherweise ist es in der Lage in den gezeigten Transportschritten zu wirken, indem es die SNARE-Funktion von Vti1p übernimmt. Im Vergleich dazu übernehmen Vti1a und Vti1b die Funktionen von Vti1p in der Säugerzelle. Eventuell könnte SNAP-29 in den entsprechenden Wegen Funktionen von Vti1a und Vti1b übernehmen und daher als Ersatz in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen wirken.

SNAP-29 ist ein SNARE-Protein, welches in einer Vielzahl an SNARE-Komplexen involviert und damit ein potentieller Kandidat für einen funktionellen Ersatz für Vti1a und/oder Vti1b ist. Des Weiteren wurden bereits Interaktionen von SNAP-29 mit den Vti1a- bzw. Vti1b-SNARE-Komplexpartnern Syntaxin 6 und Syntaxin 7 nachgewiesen (Hohenstein und Roche, 2001). Itakura *et al.* (2012) konnten zeigen, dass SNAP-29 zusammen mit Syntaxin 17 und VAMP8 einen SNARE-Komplex bildet und so die Fusion von Autophagosomen und Endosomen/Lysosomen ermöglicht. Es wirkt daher funktionell ähnlich wie Vti1b, dass u.a. auch die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen vermittelt (Moreau *et al.*, 2013). Im Wachstumstest wurde der Wachstumsdefekt der beiden Stämme *vti1-2* und *vti1-11* nach Transformation mit SNAP-29 aufgehoben. Möglicherweise war SNAP-29 in der Lage die Funktion von Vti1p in den entsprechenden Transportwegen zu ersetzen. Auch für SNAP-23 und SNAP-25 wurden überraschenderweise gleiche Ergebnisse erzielt. Beide Proteine waren nicht in die Auswahl der potentiellen Ersatzkandidaten gekommen, da sie aufgrund ihrer Gewebe-spezifischen Expression und abweichenden intrazellulären Lokalisation sowie ihrer Membrananker nicht in Frage kamen (SNAP-25) bzw. weniger wahrscheinlich waren (SNAP-23). Eventuell können sie Vti1a und Vti1b ersetzen, allerdings nur in bestimmten Geweben (z.B. für SNAP-25 in

neuroendokrinen Zelltypen) bzw. definierten Transportwegen (z.B. für SNAP-23 in der Nähe der Plasmamembran). Diese eingeschränkten Ersatzmöglichkeiten könnten für das Überleben des Organismus nicht ausreichend sein und wären eine mögliche Erklärung, warum der funktionelle Ersatz durch SNAP-23 und/oder SNAP-25 die Letalität des DKO nicht beheben kann. Interessant war das Ergebnis des Wachstumstests für SNAP-47. Dieses in allen Geweben exprimierte Protein hat keine bekannte Membranverankerung und könnte daher an vielen subzellulären Lokalisationen wirken (Holt *et al.*, 2006). Im Wachstumstest wurde für SNAP-47 als einziges getestetes Säuger Qbc-SNARE kein Substitutionspotential nachgewiesen, da bei der restriktiven Temperatur von 37 °C kein Wachstum der Hefe Stämme *vti1-2* und *vti1-11* erfolgte.

Für alle getesteten Qbc-SNAREs konnte der Nachweis der Expression im Western Blot gezeigt werden. Für SNAP-29 und SNAP-47 wurde zudem eine differenzielle Zentrifugation durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation von Vti1p mit der der beiden Ersatzkandidaten zu vergleichen. Dabei zeigten SNAP-29 und SNAP-47 eine relativ breite intrazelluläre Verteilung. Eine Membranassoziation wurde daher für beide Proteine nachgewiesen. Die Durchführung einer Dichtegradientenzentrifugation und die Analyse weiterer Markerproteine wie z.B. Golgi- oder Vakuolenmarker, würde eine genauere Lokalisationsbestimmung von SNAP-29 und SNAP-47 in den transformierten Hefestämmen ermöglichen. Weiterhin könnten Antikörper beschafft werden, die, im Vergleich zu den bereits getesteten Antikörpern, in der Immunfluoreszenz keine Kreuzreaktionen zeigen und daher eine Lokalisationsuntersuchung ermöglichen. Eventuell könnte so eine Kolo-kalisation der Qbc-SNAREs mit Vti1p gezeigt werden. Da SNAP-29 die Wachstumsdefizienz der Stämme *vti1-11* und *vti1-2* aufheben konnte, wurde mittels 5-FOA Assay getestet, ob SNAP-29 alle Funktionen von Vti1p ersetzen kann. Durch Zugabe von 5-FOA überleben nur die Zellen, die das Plasmid mit der *URA3*- und der essentiellen *VTI*-Gensequenz verloren haben, da Ura3p in der Lage ist 5-FOA zu einem zytotoxischen Stoff umzusetzen. Der damit einhergehende Verlust von Vti1p ist letal, wenn nicht das zu testende Protein die zellulären Aufgaben von Vti1p übernehmen kann. Das fehlende Wachstum der Hefezellen zeigte, dass SNAP-29 nicht in der Lage war den Verlust zu kompensieren. Ein teilweiser Ersatz in definierten aber nicht allen Transportwegen würde die Letalität des DKO und die gleichzeitige Kultivierbarkeit von Zellen dieses Genotyps erklären. Des Weiteren könnten verschiedene Assays durchgeführt werden, die einen genaueren Aufschluss darüber geben, welche Vti1p-abhängigen

Transportwege durch die Qbc-SNAREs substituiert werden konnten. Das R-SNARE Snc1p vermittelt die Fusion von Vesikeln, die vom TGN kommen, mit der Plasmamembran. Es interagiert dazu mit Sso1p oder Sso2p und Sec9p. Snc1p ist hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert und wird über die frühen Endosomen zurück zum TGN transportiert. Dabei werden die benötigten Membranfusionen durch einen Komplex bestehend aus Tlg2p, Vti1p, Tlg1p und Snc1/2p ermöglicht. Ist dieser beschriebene retrograde Transportweg nicht möglich, so kommt es zur intrazellulären Akkumulation von Snc1p, was über eine entsprechende Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden kann (Protopopov *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 2000). Dieser Nachweis sollte im *vti1-2* Modellsystem, das den beschriebenen Defekt aufweist (Stein *et al.*, 2009), durchgeführt werden, um eine Aufhebung dieses spezifischen Transportblocks durch die Säuger Qbc-SNAREs zu untersuchen. Die entsprechenden Stämme wurden bereits mit dem Snc1-GFP-Plasmid transformiert und bei -80 °C gelagert. Eine weitere Möglichkeit, die Substitutionseigenschaften der Qbc-SNAREs in Hefe zu untersuchen, besteht darin, den Transport der Invertase zu verfolgen. Die Invertase wird vesikulär vom ER zum Golgi-Apparat überführt. In beiden Kompartimenten finden Proteinmodifikationen statt. Vom Golgi-Apparat aus wird das Enzym in das Periplasma sekretiert. In *vti1-11* Zellen wird bei der restriktiven Temperatur eine unreife Form der Invertase produziert, die intrazellulär akkumuliert (Fischer von Mollard *et al.*, 1997). In diesem Assay wird anhand der enzymatischen Aktivität der erfolgreiche Transport des Proteins beurteilt. Dazu werden die Stämme mit dem Invertasekodierenden Gen *SUC2* transformiert. Für den Assay erfolgt die Induktion des Transports durch die Kultivierung im Glukosemangelmedium. Die enzymatische Gesamtaktivität und die extrazelluläre Aktivität werden bestimmt (Berkenkamp, Diplomarbeit, 2008).

Um die Funktion eines Proteins in einer Zelle zu untersuchen wird in der Forschung häufig auf einen KO (*knockout*) oder KD (*knockdown*) zurückgegriffen. Für die Untersuchung der funktionellen Ersatzkandidaten von Vti1a und Vti1b sollte ein KD bzw. KO der beiden Qbc-SNAREs SNAP-29 und SNAP-47 in Säugerzellen durchgeführt werden. Sind SNAP-29 und/oder SNAP-47 in der Lage Funktionen von Vti1a und Vti1b zu übernehmen, so könnte der KO oder KD der beiden Proteine eine Auswirkung auf die *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen haben. Ein KO der beiden Qbc-SNAREs SNAP-29 und SNAP-47 wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Ausschließlich ein siRNA-basierter KD konnte erfolgreich dokumentiert werden (Pan *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2013). Ein KD führt zu einer Reduktion des Proteinlevels auf Ebene der

mRNA. Im Gegensatz dazu erfolgt bei einem KO die Veränderung auf genomischer Ebene, sodass keine funktionale mRNA gebildet und daher kein bzw. nur ein dysfunktionales Protein hergestellt werden kann. Generell stellt sich die Frage, ob ein KO dieser beiden Proteine für den Organismus letal und damit gar nicht möglich sein könnte. Daher sollten zunächst KD-Konstrukte generiert werden, die eine Reduktion des Proteinlevels von SNAP-29 bzw. SNAP-47 induzieren (u.a. auch in Schmücker, Masterarbeit, 2013). Bethani *et al.* (2009) generierten einen KD der früh endosomalen SNAREs Syntaxin 13, Syntaxin 6 und Vti1a in PC12 Zellen. Dies führte nicht zu messbaren Änderungen des endosomalen Transports oder der Fusion. Die verbliebenen SNAREs, ca. 10 % des normalen Levels, waren für die essentiellen Interaktionen ausreichend. Bethani *et al.* (2009) vermuteten, dass häufig mehr SNARE-Proteine synthetisiert, als eigentlich benötigt werden. Diese SNAREs befinden sich in Klustern und werden erst bei zellulärem Bedarf freigesetzt. Rückschließend auf diese Ergebnisse sollte ein KD von SNAP-29 und SNAP-47 daher sehr effizient sein. Allerdings konnte dieser nicht erfolgreich durchgeführt werden, weshalb auf das CRISPR-Cas9 System zurückgegriffen wurde. Hierdurch sollte ein KO der beiden Proteine induziert werden. Für die Doppel-Nickase-Strategie wurden benötigte sgRNAs erzeugt und im Surveyorassay analysiert. Die Funktionalität des CRISPR-Cas9-Systems wurde für die SNAP-29 KO Konstrukte in N2a-Zellen nachgewiesen. Der KO von SNAP-29 bzw. SNAP-47 sollte in MEF der Genotypen *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} durchgeführt werden. Nach Transfektion wurden die Zellen mittels FACS sortiert und in 96 *well* Schalen kultiviert. Leider konnten keine Zellklone gewonnen werden. Dies könnte mehrere Gründe haben. Die Sortierung der Zellen am FACS müsste optimiert werden, damit es zu einer Reduktion des zellulären Stresspegels kommt. Mit einem deutlich beschleunigten Arbeitsablauf könnten die Zellen schneller wieder unter ihren optimalen Inkubationsbedingungen kultiviert werden. Die vereinzelte Aussaat der Zellen in eine 96 *well* Schale könnte verbessert werden, indem nicht nur eine Zelle pro *well*, sondern zwei oder mehrere Zellen ausplattiert werden. Eventuell müsste im Anschluss ein weiterer Selektionsschritt durchgeführt werden, um einzelne Zellklone zu erhalten.

Können lebensfähige SNAP-29- bzw. SNAP-47 KO-Zellen herangezogen werden, so könnte zunächst die Organellmorphologie und im Anschluss daran, unterschiedliche intrazelluläre Transportrouten analysiert werden. Die Transportwege bzw. Membranfusionen, die ursprünglich durch Vti1a und Vti1b katalysiert wurden, sind bei diesen Untersuchungen von

besonderem Interesse, da sie Aufschluss über die Effizienz des Ersatzes geben könnten. Die Komplexpartner von Vti1a sind Syntaxin 13, Syntaxin 6, Syntaxin 16, VAMP3 und VAMP4 (Mallard *et al.*, 2002; Brandhorst *et al.*, 2006). Vti1b bildet SNARE-Komplexe mit Syntaxin 7, Syntaxin 8, VAMP7 und VAMP8 (Antonin *et al.*, 2000b; Pryor *et al.*, 2004). Ersatzkandidaten müssten in der Lage sein, mit diesen SNARE-Proteinen Komplexe für eine Membranfusion zu formen. Studien über die Komplexbildung könnten Aufschluss über mögliche Interaktionen zwischen Ersatz-SNAREs und Vti1-Komplexpartnern geben. Eine durch Schöning (Dissertation, 2014) bereits durchgeführte Koimmunpräzipitation führte aufgrund von unspezifischen Reaktionen der verwendeten Antikörper zu keinem eindeutigen Ergebnis. Die Proteine müssten hergestellt werden und im Anschluss die Komplexbildung *in vitro* analysiert werden. Mit Hilfe von Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) können ebenso Interaktionsstudien mit subzellulärer Auflösung durchgeführt werden. Lauer *et al.* (2006) generierten ein Reportersystem, in dem die fluoreszierenden Proteine CFP (*cyan fluorescent protein*) und YFP (*yellow fluorescent protein*), anstatt der üblichen Transmembrandomäne, an den C-Terminus der zu untersuchenden SNARE-Proteine fusioniert wurden. Kommen die entsprechenden SNARE-Proteine bei der Komplexbildung in räumliche Nähe so kommt es zum FRET zwischen CFP und YFP und damit zum Nachweis einer Interaktion. Ein ähnlicher Nachweis gelingt mit dem *bimolecular-fluorescence complementation* (BiFC) Assay, der auch als *split YFP (yellow fluorescent protein)* Assay bezeichnet wird. Bei einer Protein-Protein Interaktion fügen sich ein N- und C-terminaler YFP Teil zu einem funktionellen, fluoreszierenden Protein zusammen. Kwaaitaal *et al.* (2010) kombinierten beide Techniken, um Interaktionsstudien zwischen mehr als zwei SNARE-Proteinen durchzuführen.

Bethani *et al.* (2009) konnten ein verstärktes Vesikel-/Organell-*Docking* in den KD Zellen beobachten. Das *Docking* involviert verschiedene Proteine. Im endosomalen System spielt die GTPase Rab5 eine große Rolle bei diesen Prozessen. Auch Syntaxin 13 scheint daran beteiligt zu sein, in dem es mit dem Rab5 Effektorprotein EEA1 interagiert (McBride *et al.*, 1999). In Syntaxin 13 KD Zellen ist das EEA1 Expressionslevel unverändert. Allerdings ist die subzelluläre Verteilung auffällig. Endosomen dieser Zellen zeigen mehr membran-gebundenes EEA1. Dieser Effekt konnte auch in anderen KD Zellen detektiert werden. Der eigentliche Nachweis eines verstärkten *Dockings* wurde über Distanzmessungen zwischen Endosomen ermöglicht. Nach KD von Syntaxin 13 und Syntaxin 6 wurde ein starker Anstieg *dockender* Organellen nachgewiesen (Bethani *et al.*, 2009). Interessant wäre eine

entsprechende Untersuchung der *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} Zellen. Eventuell kommt es in diesen Zellen auch zu einem vermehrten *Docking* von Organellen und Vesikeln, was die Kompensation durch andere SNAREs unterstützen würde.

Die Untersuchung des funktionellen Ersatzes von *Vti1a* und *Vti1b* sollte Aufschluss darüber geben, welches SNARE-Protein in der Lage ist, *Vti1a* und *Vti1b* intrazellulär zu vertreten. Es wurde gezeigt, dass die Qbc-SNAREs SNAP-23, SNAP-25 und SNAP-29 das Wachstum von den temperatursensitiven *Vti1p*-Hefestämmen *vti1-2* und *vti1-11* positiv beeinflussen. Weiterhin wurden funktionale CRISPR-Cas9-Vektoren für einen KO von SNAP-29 und/oder SNAP-47 erzeugt, die nun für eine stabile Transfektion von *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} bzw. *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} MEF zur Verfügung stehen, um einen möglichen Ersatz von *Vti1a* und *Vti1b* durch diese beiden Vertreter der SNAP-25-Familie zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

Die eukaryotische Zelle besteht aus einem komplexen System verschiedener Kompartimente, zwischen denen Transportsysteme für den Stoffaustausch sorgen. SNARE-Proteine spielen eine Schlüsselrolle in diesen Prozessen. Die Qb-SNAREs Vti1a und Vti1b ermöglichen endosomale Membranfusionen (Brandhorst *et al.*, 2006; Antonin *et al.*, 2000b). Der KO von Vti1a oder Vti1b führt zu vitalen und fertilen Mäusen, die auf embryonaler Ebene nahezu phänotypisch unauffällig sind. Der DKO beider SNAREs ist perinatal letal (Kunwar *et al.*, 2011). Vti1a- und Vti1b-doppeldefiziente Embryonen weisen multiple Veränderungen am Skelett auf (Schöning, Dissertation, 2014). Erste Untersuchungen der Organellstrukturen ergaben auf zellulärer Ebene keine Unterschiede zwischen *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* und *Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}* Zellen. Da Vti1b für die Fusion später Endosomen mit Lysosomen verantwortlich ist (Pryor *et al.*, 2004), wurde der Fokus zunächst auf die detaillierte Analyse der Lysosomen und zugehöriger Transportwege gelegt. Um mögliche Auswirkungen des Verlusts von Vti1a und Vti1b auf lysosomale Transportwege zu identifizieren, wurden enzymatische Assays durchgeführt, die jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* und *Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}* Chondrozyten bzw. MEF zeigten. Auch die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der LIMP-2 und LAMP-1 Verteilung erwies sich in Vti1a- und Vti1b-doppeldefizienten MEF als unauffällig.

Bei dem Literaturvergleich von *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Mausembryonen mit Tieren, denen Signalproteine wie TGF- β 2, TGF- β 3, BMP-7, EGFR oder TGF- β 2 und TGF- β 3 fehlen, wurden Gemeinsamkeiten festgestellt. Einige der Veränderungen betrafen Knochen und Knorpel, weshalb die Aktivität der verantwortlichen Signalwege untersucht wurde. Hierbei wurde in *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Chondrozyten nach Stimulation mit TGF- β 1 und BMP-2 eine signifikant verringerte Smad Phosphorylierung detektiert, die einen ersten Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp dieser Embryonen und den TGF- β - bzw. BMP-Signalwegen lieferte. Auch die EGFR-Proteinmenge fällt in primären *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* MEF nach EGF-Stimulation signifikant langsamer als in *Vti1a^{+/-} Vti1b^{+/-}* MEF, was auf einen Defekt in der postendozytotischen Sortierung des Rezeptors zurückzuführen sein könnte. Des Weiteren zeigten T-immortalisierte *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Fibroblasten eine signifikant verlangsamte Zellmigration. Der Verlust von Vti1a und Vti1b könnte Auswirkungen auf den für die

Zellmigration benötigten Transport von Membranmaterial oder Integrinrezeptoren haben. Ein KO des Vti1a- und Vti1b-homologen Proteins Vti1p ist in *S. cerevisiae* letal (Fischer von Mollard *et al.*, 1997). Da Vti1a- und Vti1b-doppeldefiziente Zellen kultiviert werden können, wird vermutet, dass ihre Funktionen durch andere SNARE-Proteine übernommen werden. Aufgrund ihrer Verteilung und ihrer Eigenschaften sind SNAP-29 und SNAP-47 potentielle Ersatzkandidaten (Kunwar *et al.*, 2011). In einem Wachstumstest konnte SNAP-29 den Wachstumsdefekt von Vti1p-Hefemutanten aufheben, was bedeutet, dass dieses Protein in der Lage war, Funktionen von Vti1p zu übernehmen. Ein KO von SNAP-29 und SNAP-47 in *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Zellen ist eine weitere Möglichkeit einen potentiellen, funktionellen Ersatz zu analysieren. Für diese Untersuchung wurden funktionsfähige CRISPR-Cas9(n) Konstrukte hergestellt.

Mit den erzielten Ergebnissen wurde ein erster Zusammenhang zwischen den zellulären Grundlagen und den knochenphänotypischen Manifestationen der *Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-}* Mäuse hergestellt. Zudem wurde gezeigt, dass SNAP-29 Funktionen von Vti1p übernehmen konnte, so dass es auch in Säugerzellen ein potentieller Ersatz für Vti1a und Vti1b sein könnte.

Summary

In eukaryotic cells the exchange of molecules between different compartments is ensured by a complex vesicular transport system. SNARE-proteins play a critical role during membrane fusion within these processes. Vti1a and Vti1b are Qb-SNAREs involved in endosomal transport (Brandhorst *et al.*, 2006; Antonin *et al.*, 2000b). The KO of Vti1a or Vti1b results in viable and fertile mice, which are similar to wildtype. The DKO of both SNARE-proteins, however, is perinatal lethal (Kunwar *et al.*, 2011) and Vti1a- and Vti1b-double deficient embryos show multiple alterations in bone formation (Schöning, Dissertation, 2014). On the cellular level, differences in the organelle structure due to loss of Vti1a and Vti1b are not detectable in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} cells.

Hence, this work was focused on the detailed analysis of lysosomes and associated transport pathways in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} cells. The fusion of late endosomes and lysosomes is catalyzed by Vti1b (Pryor *et al.*, 2004). The transport of hydrolases to the lysosomes occurs via different pathways mediated by membrane fusion events (Luzio *et al.*, 2007). To analyze possible effects of the loss of Vti1a and Vti1b on these transport processes, different assays for lysosomal enzymes were undertaken. Here, no significant impact of the DKO was detected in chondrocytes or MEF. Furthermore, the distribution of the lysosomal proteins LIMP-2 and LAMP-1 was normal in Vti1a- and Vti1b-doubledeficient MEF. The comparison of the embryonic *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} with *Tgf-β2*^{-/-}, *Tgf-β3*^{-/-}, *Bmp-7*^{-/-}, *Egfr*^{-/-} or *Tgf-β2*^{-/-} and *Tgf-β3*^{-/-} mice respectively showed that there were similarities to *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} mice relating to the development of bones and cartilage. To further elucidate the underlying mechanisms, the responsible pathways were analyzed in detail. The results revealed a significantly reduced Smad phosphorylation in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} chondrocytes after stimulation with BMP-2 and TGF-β1, leading to a putative association between the phenotype of these embryos and the TGF-β and BMP signaling pathways. The stability of EGFR 15 min after stimulation was increased in primary *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF, which could be caused by altered postendocytic sorting of the receptor. Moreover, T-immortalized *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF showed significantly slower cell migration. The loss of Vti1a and Vti1b may have an effect on the transport of membrane material or integrin receptors, which both are essential for cell migration.

The KO of Vti1p in *S. cerevisiae*, which is a homologue of Vti1a and Vti1b, is lethal (Fischer von Mollard *et al.*, 1997) but Vti1a- and Vti1b-doubledeficient cells can be cultivated. Hence, the function of these proteins seems to be taken over by other SNARE proteins. With regard

to a substitution for Vti1p, SNAP-29 and SNAP-47 could be potential candidates in terms of their distribution and properties. In a growth experiment SNAP-29 was able to suppress the growth defect of *vti1-2* and *vti1-11* in yeast cells, suggesting that it was able to substitute functionally for Vti1p. The KO of SNAP-29 and SNAP-47 in *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} cells could be useful to investigate the putative functional replacement. For this purpose, CRISPR-Cas9(n) constructs were created.

The results obtained from this work suggest initial connections between the phenotypic manifestations and the cellular basics of the role of Vti1a and Vti1b in bone development. Furthermore, with SNAP-29 a possible substitution of Vti1p was detected, which may suggest a new functional association to Vti1a and Vti1b in mammalian cells.

8. Literaturverzeichnis

- Alroy, J. & Lyons, J. A. Lysosomal Storage Diseases. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* **2**, 232640981351766 (2014).
- Antonin, W., Riedel, D. & Mollard, G. F. von. The SNARE Vti1a- β is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 5724–5732 (2000a).
- Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. & Schneider, T. R. Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nature structural biology* **9**, 107–111 (2002).
- Antonin, W. *et al.* A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *The EMBO Journal* **19**, 6453–6464 (2000b).
- Atlashkin, V. *et al.* Deletion of the SNARE vti1b in Mice Results in the Loss of a Single SNARE Partner, Syntaxin 8. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 5198–5207 (2003).
- Banfield, D. K., Lewis, M. J. & Pelham, H. R. A SNARE-like protein required for traffic through the Golgi complex. *Nature* **375**, 806–809 (1995).
- Bark, I. C., Hahn, K. M., Ryabinin, A. E. & Wilson, M. C. Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 1510–1514 (1995).
- Barlowe, C. *et al.* COPII. A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895–907 (1994).
- Bastow, E. R. *et al.* Evidence for lysosomal exocytosis and release of aggrecan-degrading hydrolases from hypertrophic chondrocytes, in vitro and in vivo. *Biology open* **1**, 318–328 (2012).
- Beguinet, L., Lyall, R. M., Willingham, M. C. & Pastan, I. Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 2384–2388 (1984).
- Berendsen, A. D. & Olsen, B. R. Bone development. *Bone* **80**, 14–18 (2015).
- Berkenkamp, B. *Analyse des Hefe ER-SNAREs Use1p und dessen genetischen Interaktionspartnern* (Universität Bielefeld, 2008).
- Bethani, I. *et al.* Endosomal fusion upon SNARE knockdown is maintained by residual SNARE activity and enhanced docking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **10**, 1543–1559 (2009).
- Blasi, J. *et al.* Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* **365**, 160–163 (1993).
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A. & Scheller, R. H. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**, 839–841 (2001).

- Boesen, C. C., Radaev, S., Motyka, S. A., Patamawenu, A. & Sun, P. D. The 1.1 Å crystal structure of human TGF- β type II receptor ligand binding domain. *Structure (London, England : 1993)* **10**, 913–919 (2002).
- Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–166 (2004).
- Borisovska, M. *et al.* v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *The EMBO Journal* **24**, 2114–2126 (2005).
- Boulton, T. G., Gregory, J. S. & Cobb, M. H. Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry* **30**, 278–286 (1991a).
- Boulton, T. G. *et al.* ERKs. A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663–675 (1991b).
- Brandhorst, D. *et al.* Homotypic fusion of early endosomes. SNAREs do not determine fusion specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2701–2706 (2006).
- Braulke, T. & Bonifacino, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 605–614 (2009).
- Brennwald, P. *et al.* Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79**, 245–258 (1994).
- Brickner, J. H., Blanchette, J. M., Sipos, G. & Fuller, R. S. The Tlg SNARE complex is required for TGN homotypic fusion. *The Journal of Cell Biology* **155**, 969–978 (2001).
- Browski, S. *Charakterisierung des murinen Doppelknockouts der endosomalen Qb-SNARES Vti1a und Vti1b. Dissertation* (Universität Bielefeld, 2010).
- Chen, D. & Whiteheart, S. W. Intracellular localization of SNAP-23 to endosomal compartments. *Biochemical and biophysical research communications* **255**, 340–346 (1999).
- Chen, G., Deng, C. & Li, Y.-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences* **8**, 272–288 (2012).
- Chen, J. W., Murphy, T. L., Willingham, M. C., Pastan, I. & August, J. T. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *The Journal of Cell Biology* **101**, 85–95 (1985).
- Chen, R. H. & Derynck, R. Homomeric interactions between type II transforming growth factor- β receptors. *The Journal of biological chemistry* **269**, 22868–22874 (1994).
- Chen, X., Rubock, M. J. & Whitman, M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling. *Nature* **383**, 691–696 (1996).
- Clark, D. A. & Coker, R. Transforming growth factor- β (TGF- β). *The international journal of biochemistry & cell biology* **30**, 293–298 (1998).
- Davis, C. A. & Joyner, A. L. Expression patterns of the homeo box-containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene int-1 diverge during mouse development. *Genes & development* **2**, 1736–1744 (1988).
- Dent, P. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* **257**, 1404–1407 (1992).

- Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
- Dijke, P. ten & Hill, C. S. New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends in biochemical sciences* **29**, 265–273 (2004).
- Dilcher, M., Köhler, B. & Mollard, G. F. von. Genetic interactions with the yeast Q-SNARE VTI1 reveal novel functions for the R-SNARE YKT6. *The Journal of biological chemistry* **276**, 34537–34544 (2001).
- Dörr, H. *Auswirkungen der Vti1a- und Vti1b-Doppeldefizienz auf den TGF- β - und MAPK-Signalweg. Bachelorarbeit* (Bielefeld, 2017).
- Dressel, R., Elsner, L., Novota, P., Kanwar, N. & Fischer von Mollard, G. The exocytosis of lytic granules is impaired in Vti1b- or Vamp8-deficient CTL leading to a reduced cytotoxic activity following antigen-specific activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 1005–1014 (2010).
- Dünker, N. & Kriegelstein, K. Tgf β 2^{-/-} Tgf β 3^{-/-} double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anatomy and embryology* **206**, 73–83 (2002).
- Enomoto, H. *et al.* Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *Journal of cell science* **117**, 417–425 (2004).
- Eppert, K. *et al.* MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF β -regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* **86**, 543–552 (1996).
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T. & Jahn, R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex. SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15781–15786 (1998).
- Fraldi, A. *et al.* Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders. *The EMBO Journal* **29**, 3607–3620 (2010).
- Futerman, A. H. & van Meer, G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 554–565 (2004).
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J. & Hopkins, C. R. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *The Journal of Cell Biology* **132**, 1011–1023 (1996).
- Ganley, I. G., Espinosa, E. & Pfeffer, S. R. A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *The Journal of Cell Biology* **180**, 159–172 (2008).
- Ghosh, P., Dahms, N. M. & Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate receptors. New twists in the tale. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 202–212 (2003).
- Gordon, D. E., Bond, L. M., Sahlender, D. A. & Peden, A. A. A targeted siRNA screen to identify SNAREs required for constitutive secretion in mammalian cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **11**, 1191–1204 (2010).
- Greenfield, C. *et al.* Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *The EMBO Journal* **8**, 4115–4123 (1989).

- Greenwald, J. *et al.* The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Molecular cell* **11**, 605–617 (2003).
- Gruenberg, J. The endocytic pathway. A mosaic of domains. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 721–730 (2001).
- Hahn, S. A. *et al.* DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science (New York, N.Y.)* **271**, 350–353 (1996).
- Hart, P. J. *et al.* Crystal structure of the human T β R2 ectodomain-TGF- β 3 complex. *Nature structural biology* **9**, 203–208 (2002).
- Hata, A. & Chen, Y.-G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **8** (2016).
- Hayashi, H. *et al.* The MAD-Related Protein Smad7 Associates with the TGF β Receptor and Functions as an Antagonist of TGF β Signaling. *Cell* **89**, 1165–1173 (1997).
- Hayes, S., Chawla, A. & Corvera, S. TGF β receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes. Role in signaling to Smad2. *The Journal of Cell Biology* **158**, 1239–1249 (2002).
- Heldin, C. H., Miyazono, K. & Dijke, P. ten. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465–471 (1997).
- Hess, D. T., Slater, T. M., Wilson, M. C. & Skene, J. H. The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**, 4634–4641 (1992).
- Heupel, K. *et al.* Loss of transforming growth factor- β 2 leads to impairment of central synapse function. *Neural development* **3**, 25 (2008).
- Hohenstein, A. C. & Roche, P. A. SNAP-29 is a promiscuous syntaxin-binding SNARE. *Biochemical and biophysical research communications* **285**, 167–171 (2001).
- Holt, M. *et al.* Identification of SNAP-47, a novel Qbc-SNARE with ubiquitous expression. *The Journal of biological chemistry* **281**, 17076–17083 (2006).
- Holthuis, J. C., Nichols, B. J., Dhruvakumar, S. & Pelham, H. R. Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *The EMBO Journal* **17**, 113–126 (1998).
- Hong, W. SNAREs and traffic. *Biochimica et biophysica acta* **1744**, 493–517 (2005).
- Hoodless, P. A. *et al.* MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* **85**, 489–500 (1996).
- Horikawa, H. P. *et al.* A complex of rab3A, SNAP-25, VAMP/synaptobrevin-2 and syntaxins in brain presynaptic terminals. *FEBS letters* **330**, 236–240 (1993).
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S. & Sorkin, A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Molecular cell* **21**, 737–748 (2006).
- Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *The EMBO Journal* **30**, 3481–3500 (2011).
- Imamura, T. *et al.* Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature* **389**, 622–626 (1997).

- Inada, M. *et al.* Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **214**, 279–290 (1999).
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C. & Mizushima, N. The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. *Cell* **151**, 1256–1269 (2012).
- Ito, Y. & Miyazono, K. RUNX transcription factors as key targets of TGF- β superfamily signaling. *Current opinion in genetics & development* **13**, 43–47 (2003).
- Jahn, R. & Scheller, R. H. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 631–643 (2006).
- Jena, N., Martín-Seisdedos, C., McCue, P. & Croce, C. M. BMP7 null mutation in mice. Developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Experimental cell research* **230**, 28–37 (1997).
- Jurado, S. *et al.* LTP requires a unique postsynaptic SNARE fusion machinery. *Neuron* **77**, 542–558 (2013).
- Karsten, L. *Herstellung von SNAP-47/ Syntaxin 7-/ Syntaxin 16-Vektorkonstrukten für einen Split-Ubiquitin Assay & CRISPR-Cas9 induzierter knockout von SNAP-47. Bachelorarbeit* (Bielefeld, 2015).
- Kloepper, T. H., Kienle, C. N. & Fasshauer, D. An elaborate classification of SNARE proteins sheds light on the conservation of the eukaryotic endomembrane system. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 3463–3471 (2007).
- Kloepper, T. H., Kienle, C. N. & Fasshauer, D. SNAREing the basis of multicellularity. Consequences of protein family expansion during evolution. *Molecular biology and evolution* **25**, 2055–2068 (2008).
- Koland, J. G. & Cerione, R. A. Growth factor control of epidermal growth factor receptor kinase activity via an intramolecular mechanism. *The Journal of biological chemistry* **263**, 2230–2237 (1988).
- Komori, T. *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).
- Kretschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J. & Massagué, J. The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes & development* **11**, 984–995 (1997).
- Kreykenbohm, V., Wenzel, D., Antonin, W., Atlachkine, V. & Mollard, G. F. von. The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *European journal of cell biology* **81**, 273–280 (2002).
- Kunwar, A. J. *et al.* Lack of the endosomal SNAREs vti1a and vti1b led to significant impairments in neuronal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 2575–2580 (2011).
- Kupfer, A., Louvard, D. & Singer, S. J. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 2603–2607 (1982).

- Kuster, A. *et al.* The Q-soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor (Q-SNARE) SNAP-47 Regulates Trafficking of Selected Vesicle-associated Membrane Proteins (VAMPs)*. *The Journal of biological chemistry* **290**, 28056–28069 (2015).
- Kwaaitaal, M., Keinath, N. F., Pajonk, S., Biskup, C. & Panstruga, R. Combined bimolecular fluorescence complementation and Forster resonance energy transfer reveals ternary SNARE complex formation in living plant cells. *Plant physiology* **152**, 1135–1147 (2010).
- Kweon, Y., Rothe, A., Conibear, E. & Stevens, T. H. Ykt6p is a multifunctional yeast R-SNARE that is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 1868–1881 (2003).
- Kyriakis, J. M. *et al.* Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417–421 (1992).
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. & Massagué, J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- β signalling pathways. *Nature* **383**, 832–836 (1996).
- Laiho, M., Weis, F. M., Boyd, F. T., Ignatz, R. A. & Massagué, J. Responsiveness to transforming growth factor- β (TGF- β) restored by genetic complementation between cells defective in TGF- β receptors I and II. *J. Biol. Chem.* **266**, 9108–9112 (1991).
- Laiho, M., Weis, M. B. & Massagué, J. Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)- β receptor types I and II in TGF- β -resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction. *J. Biol. Chem.* **265**, 18518–18524 (1990).
- Lauer, J. M., Dalal, S., Marz, K. E., Nonet, M. L. & Hanson, P. I. SNARE complex zero layer residues are not critical for N-ethylmaleimide-sensitive factor-mediated disassembly. *The Journal of biological chemistry* **281**, 14823–14832 (2006).
- Lee, M. K. *et al.* TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO Journal* **26**, 3957–3967 (2007).
- Lefloch, R., Pouysségur, J. & Lenormand, P. Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **8**, 705–711 (2009).
- Lenormand, P. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* **122**, 1079–1088 (1993).
- Leroy, J. G. & Demars, R. I. Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)* **157**, 804–806 (1967).
- Leroy, J. G., Spranger, J. W., Feingold, M., Opitz, J. M. & Crocker, A. C. I-cell disease. A clinical picture. *The Journal of Pediatrics* **79**, 360–365 (1971).
- Letourneur, F. *et al.* Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199–1207 (1994).
- Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H. & Pelham, H. R. Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 23–38 (2000).
- Lewis, M. J. & Pelham, H. R. B. A new yeast endosomal SNARE related to mammalian syntaxin 8. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **3**, 922–929 (2002).

- Lind, M., Eriksen, E. F. & Bünger, C. Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. *Bone* **18**, 53–57 (1996).
- Liu, Y. & Barlowe, C. Analysis of Sec22p in Endoplasmic Reticulum/Golgi Transport Reveals Cellular Redundancy in SNARE Protein Function. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 3314–3324 (2002).
- Luo, G. *et al.* BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes & development* **9**, 2808–2820 (1995).
- Lupashin, V. V., Pokrovskaya, I. D., McNew, J. A. & Waters, M. G. Characterization of a Novel Yeast SNARE Protein Implicated in Golgi Retrograde Traffic. *Molecular Biology of the Cell* **8**, 2659–2676 (1997).
- Luzio, J. P., Pryor, P. R. & Bright, N. A. Lysosomes. Fusion and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 622–632 (2007).
- Macías-Silva, M. *et al.* MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* **87**, 1215–1224 (1996).
- Malhotra, V., Orci, L., Glick, B. S., Block, M. R. & Rothman, J. E. Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* **54**, 221–227 (1988).
- Mallard, F. *et al.* Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *The Journal of Cell Biology* **156**, 653–664 (2002).
- Mark, K. von der, Gauss, V., Mark, H. von der & Müller, P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* **267**, 531–532 (1977).
- Martin, S. *et al.* The glucose transporter (GLUT-4) and vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP-2) are segregated from recycling endosomes in insulin-sensitive cells. *The Journal of Cell Biology* **134**, 625–635 (1996).
- Mathews, L. S. & Vale, W. W. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* **65**, 973–982 (1991).
- May, T., Wirth, D., Hauser, H. & Mueller, P. P. Transcriptionally regulated immortalization overcomes side effects of temperature-sensitive SV40 large T antigen. *Biochemical and biophysical research communications* **327**, 734–741 (2005).
- McBride, H. M. *et al.* Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* **98**, 377–386 (1999).
- McNew, J. A. *et al.* Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport. *The Journal of biological chemistry* **272**, 17776–17783 (1997).
- Medigeshi, G. R. & Schu, P. Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **4**, 802–811 (2003).
- Miettinen, P. J. *et al.* Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nature genetics* **22**, 69–73 (1999).

- Mollard, G. F. von, Nothwehr, S. F. & Stevens, T. H. The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *The Journal of Cell Biology* **137**, 1511–1524 (1997).
- Mollard, G. F. von & Stevens, T. H. A human homolog can functionally replace the yeast vesicle-associated SNARE Vti1p in two vesicle transport pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 2624–2630 (1998).
- Mollard, G. F. von & Stevens, T. H. The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p Is Required for Multiple Membrane Transport Pathways to the Vacuole. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1719–1732 (1999).
- Moran, M. F. *et al.* Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 8622–8626 (1990).
- Moreau, K., Renna, M. & Rubinsztein, D. C. Connections between SNAREs and autophagy. *Trends in biochemical sciences* **38**, 57–63 (2013).
- Moreth, A. Untersuchungen zur Funktion von Vti1a und Vti1b in Phagozytose und Phagosomenreifung und Charakterisierung der DNA-Interaktion und cytotoxischen Eigenschaften der Übergangsmetallkomplexe $\text{Cu}_2(\text{OAc})_2$ und $\text{Ni}_2(\text{OAc})_2$. Dissertation (Universität Bielefeld, 2014).
- Mu, F. T. *et al.* EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved α -helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *The Journal of biological chemistry* **270**, 13503–13511 (1995).
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N. & Maxfield, F. R. Endocytosis. *Physiological reviews* **77**, 759–803 (1997).
- Murray, R. Z., Kay, J. G., Sangermani, D. G. & Stow, J. L. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science (New York, N.Y.)* **310**, 1492–1495 (2005a).
- Murray, R. Z., Wylie, F. G., Khromykh, T., Hume, D. A. & Stow, J. L. Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis Factor- α . *The Journal of biological chemistry* **280**, 10478–10483 (2005b).
- Nakamura, N. *et al.* Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *The Journal of Cell Biology* **131**, 1715–1726 (1995).
- Nakao, A. *et al.* Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* **389**, 631–635 (1997b).
- Nakao, A. *et al.* Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor β signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 2896–2900 (1997a).
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms. Lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 458–467 (2009).
- Nekrasova, T. *et al.* ERK1-Deficient Mice Show Normal T Cell Effector Function and Are Highly Susceptible to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **175**, 2374–2380 (2005).

- Oho, C., Seino, S. & Takahashi, M. Expression and complex formation of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptors in clonal rat endocrine cells. *Neuroscience letters* **186**, 208–210 (1995).
- Oksvold, M. P., Skarpen, E., Wierød, L., Paulsen, R. E. & Huitfeldt, H. S. Re-localization of activated EGF receptor and its signal transducers to multivesicular compartments downstream of early endosomes in response to EGF. *European journal of cell biology* **80**, 285–294 (2001).
- Osen-Sand, A. *et al.* Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature* **364**, 445–448 (1993).
- Otto, F. *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765–771 (1997).
- Oyler, G. A. *et al.* The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *The Journal of Cell Biology* **109**, 3039–3052 (1989).
- Oyler, G. A., Polli, J. W., Wilson, M. C. & Billingsley, M. L. Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 5247–5251 (1991).
- Pagès, G. & Guérin S. Defective Thymocyte Maturation in p44 MAP Kinase (Erk 1) Knockout Mice. *Science* **286**, 1374–1377 (1999).
- Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science (New York, N.Y.)* **189**, 867 (1975).
- Pan, P.-Y. *et al.* SNAP-29-mediated Modulation of Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Neurons*. *The Journal of biological chemistry* **280**, 25769–25779 (2005).
- Pearse, B. M. Coated vesicles from pig brain. Purification and biochemical characterization. *Journal of molecular biology* **97**, 93–98 (1975).
- Penheiter, S. G. *et al.* Internalization-Dependent and -Independent Requirements for Transforming Growth Factor β Receptor Signaling via the Smad Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 4750–4759 (2002).
- Platta, H. W. & Stenmark, H. Endocytosis and signaling. *Current opinion in cell biology* **23**, 393–403 (2011).
- Popp, M. W. & Maquat, L. E. Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell* **165**, 1319–1322 (2016).
- Postlethwaite, A. E., Keski-Oja, J., Moses, H. L. & Kang, A. H. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β . *The Journal of experimental medicine* **165**, 251–256 (1987).
- Pourcq, K. de, Schutter, K. de & Callewaert, N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi. Current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **87**, 1617–1631 (2010).
- Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P. & Gerst, J. E. Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* **74**, 855–861 (1993).

- Pryor, P. R. *et al.* Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Reports* **5**, 590–595 (2004).
- Rafferty, L. A., Twombly, V., Wharton, K. & Gelbart, W. M. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* **139**, 241–254 (1995).
- Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380–1389 (2013b).
- Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* **8**, 2281–2308 (2013a).
- Ravichandran, V., Chawla, A. & Roche, P. A. Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *The Journal of biological chemistry* **271**, 13300–13303 (1996).
- Ray, L. B. & Sturgill, T. W. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 3753–3757 (1988).
- Raymond, M. H., Schutte, B. C., Torner, J. C., Burns, T. L. & Willing, M. C. Osteocalcin. Genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics* **60**, 210–217 (1999).
- Reczek, D. *et al.* LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of β -glucocerebrosidase. *Cell* **131**, 770–783 (2007).
- Ridley, A. J. *et al.* Cell migration. Integrating signals from front to back. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 1704–1709 (2003).
- Rifkin, D. B. Latent transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteins. Orchestrators of TGF- β availability. *The Journal of biological chemistry* **280**, 7409–7412 (2005).
- Roskoski, R. ERK1/2 MAP kinases. Structure, function, and regulation. *Pharmacological research* **66**, 105–143 (2012).
- Rothaug, M. *et al.* LIMP-2 expression is critical for β -glucocerebrosidase activity and α -synuclein clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 15573–15578 (2014).
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. & Bowtell, D. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* **363**, 83–85 (1993).
- Sadoul, K. *et al.* SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. *The Journal of Cell Biology* **128**, 1019–1028 (1995).
- Saftig, P. & Klumperman, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins. Trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 623–635 (2009).
- Sanford, L. P. *et al.* TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development (Cambridge, England)* **124**, 2659–2670 (1997).
- Savage, C. *et al.* *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 790–794 (1996).

- Schmücker, S. *Weitere Analysen der Vti1a- und Vti1b-doppeldefizienten mausembryonalen Fibroblasten. Masterarbeit* (Universität Bielefeld, 2013).
- Schoch, S. *et al.* SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science (New York, N.Y.)* **294**, 1117–1122 (2001).
- Schöning, S. *Funktionelle Analysen der endosomalen Qb-SNAREs Vti1a und Vti1b in der Embryogenese sowie ihr potentieller Ersatz durch Qbc-SNAREs. Dissertation* (Universität Bielefeld, 2014).
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. & Gelbart, W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**, 1347–1358 (1995).
- Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
- Sigismund, S. *et al.* Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental cell* **15**, 209–219 (2008).
- Sigismund, S. *et al.* Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2760–2765 (2005).
- Söllner, T. *et al.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318–324 (1993).
- Sprecher, E. *et al.* 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. *American Journal of Human Genetics* **77**, 242–251 (2005).
- Stegmaier, M. *et al.* Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *The Journal of biological chemistry* **273**, 34171–34179 (1998).
- Stein, I. S., Gottfried, A., Zimmermann, J. & Fischer von Mollard, G. TVP23 interacts genetically with the yeast SNARE VTI1 and functions in retrograde transport from the early endosome to the late Golgi. *Biochemical Journal* **419**, 229–236 (2009).
- Su, Q., Mochida, S., Tian, J.-H., Mehta, R. & Sheng, Z.-H. SNAP-29. A general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14038–14043 (2001).
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. & Brunger, A. T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347–353 (1998).
- Tang, Y. *et al.* TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature medicine* **15**, 757–765 (2009).
- Tayeb, M. A. *et al.* Inhibition of SNARE-mediated membrane traffic impairs cell migration. *Experimental cell research* **305**, 63–73 (2005).
- Tiede, S. *et al.* Mucopolidiosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the α/β GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nature medicine* **11**, 1109–1112 (2005).
- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. & Wrana, J. L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor. *Cell* **95**, 779–791 (1998).

- Ungermann, C. *et al.* Three v-SNAREs and two t-SNAREs, present in a pentameric cis-SNARE complex on isolated vacuoles, are essential for homotypic fusion. *The Journal of Cell Biology* **145**, 1435–1442 (1999).
- Vellodi, A. Lysosomal storage disorders. *British journal of haematology* **128**, 413–431 (2005).
- Volchuk, A. *et al.* Cellubrevin is a resident protein of insulin-sensitive GLUT4 glucose transporter vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **270**, 8233–8240 (1995).
- Walter, A. M. *et al.* The SNARE protein vti1a functions in dense-core vesicle biogenesis. *The EMBO Journal* **33**, 1681–1697 (2014).
- Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 875–885 (2004).
- Wesolowski, J., Caldwell, V. & Paumet, F. A Novel Function for SNAP29 (Synaptosomal-Associated Protein of 29 kDa) in Mast Cell Phagocytosis. *PLoS ONE* **7** (2012).
- Wheeler, M. B. *et al.* Characterization of SNARE protein expression in β cell lines and pancreatic islets. *Endocrinology* **137**, 1340–1348 (1996).
- Whiteheart, S. W. *et al.* N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. A trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *The Journal of Cell Biology* **126**, 945–954 (1994).
- Wong, S. H. *et al.* GS32, a Novel Golgi SNARE of 32 kDa, Interacts Preferentially with Syntaxin 6. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 119–134 (1999).
- Wood, K. W., Sarnecki, C., Roberts, T. M. & Blenis, J. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases. MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**, 1041–1050 (1992).
- Wrana, J. L. *et al.* TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**, 1003–1014 (1992).
- Wrana, J. L. *et al.* Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 944–950 (1994).
- Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C. & Lodish, H. F. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *The Journal of biological chemistry* **276**, 39404–39410 (2001).
- Xu, Y. *et al.* A 29-kilodalton Golgi soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Vti1-rp2) implicated in protein trafficking in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 21783–21789 (1998).
- Yang, C. *et al.* VAMP3 Null Mice Display Normal Constitutive, Insulin- and Exercise-Regulated Vesicle Trafficking. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 1573–1580 (2001).
- Yao, Y. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12759–12764 (2003).
- Zachos, C., Blanz, J., Saftig, P. & Schwake, M. A critical histidine residue within LIMP-2 mediates pH sensitive binding to its ligand β -glucocerebrosidase. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **13**, 1113–1123 (2012).

-
- Zhang, Y., Feng, X., We, R. & Derynck, R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature* **383**, 168–172 (1996).
- Zhao, H. & Grabowski, G. A. Gaucher disease. Perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **59**, 694–707 (2002).
- Zhu, J. *et al.* Amphiregulin-EGFR Signaling Mediates the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Progenitors toward PTH-Stimulated Osteoblasts and Osteocytes. *PLoS ONE* **7** (2012).
- Zimmermann, J., Chidambaram, S. & Fischer von Mollard, G. Dissecting Ent3p. The ENTH domain binds different SNAREs via distinct amino acid residues while the C-terminus is sufficient for retrograde transport from endosomes. *Biochemical Journal* **431**, 123–134 (2010).

9. Anhang

9.1 Zusätzliche Daten

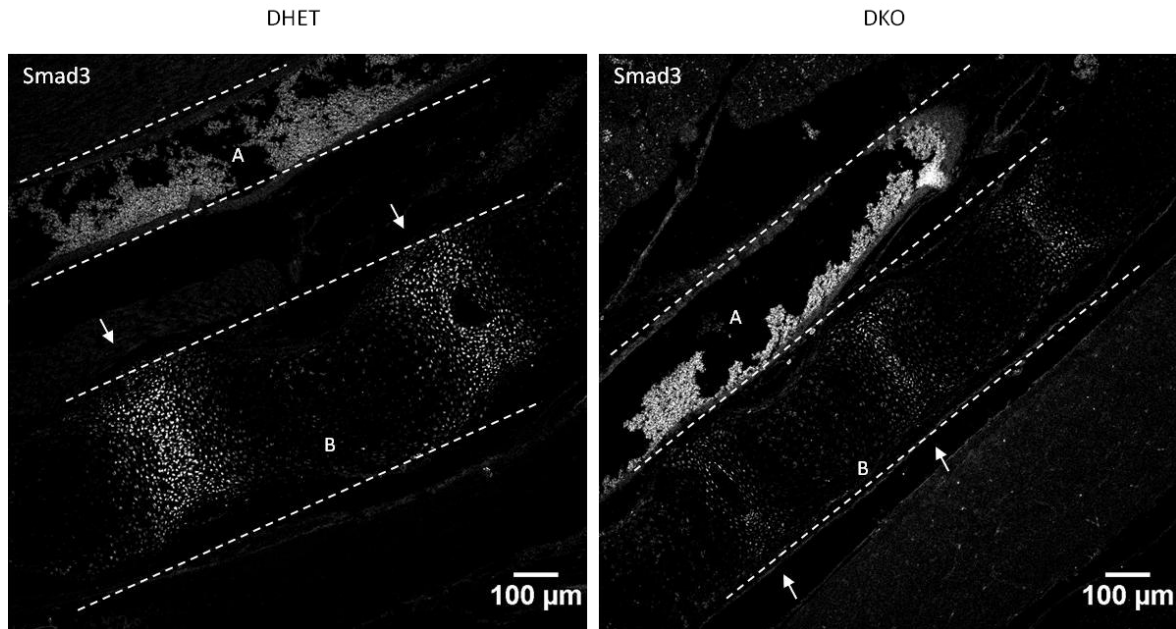


Abb. 9.1 Immunhistologische Färbung von Smad3 im Gewebe

Nachweis von Smad3 in *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} (DHET) und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} (DKO) Mausembryonen (E18.5) durch Immunhistologie. Smad3 wurde in knorpeligem Gewebe (Pfeile) detektiert. Als Negativkontrolle wurden die Gewebeschnitte ausschließlich mit sekundärem Antikörper (Cy3-R) behandelt (nicht gezeigt). Bei A handelt es sich um die Aorta und B kennzeichnet die Wirbelsäule. Konfokale Übersichtsaufnahmen, 100fache Vergrößerung, Maßstab entspricht 100 μm.

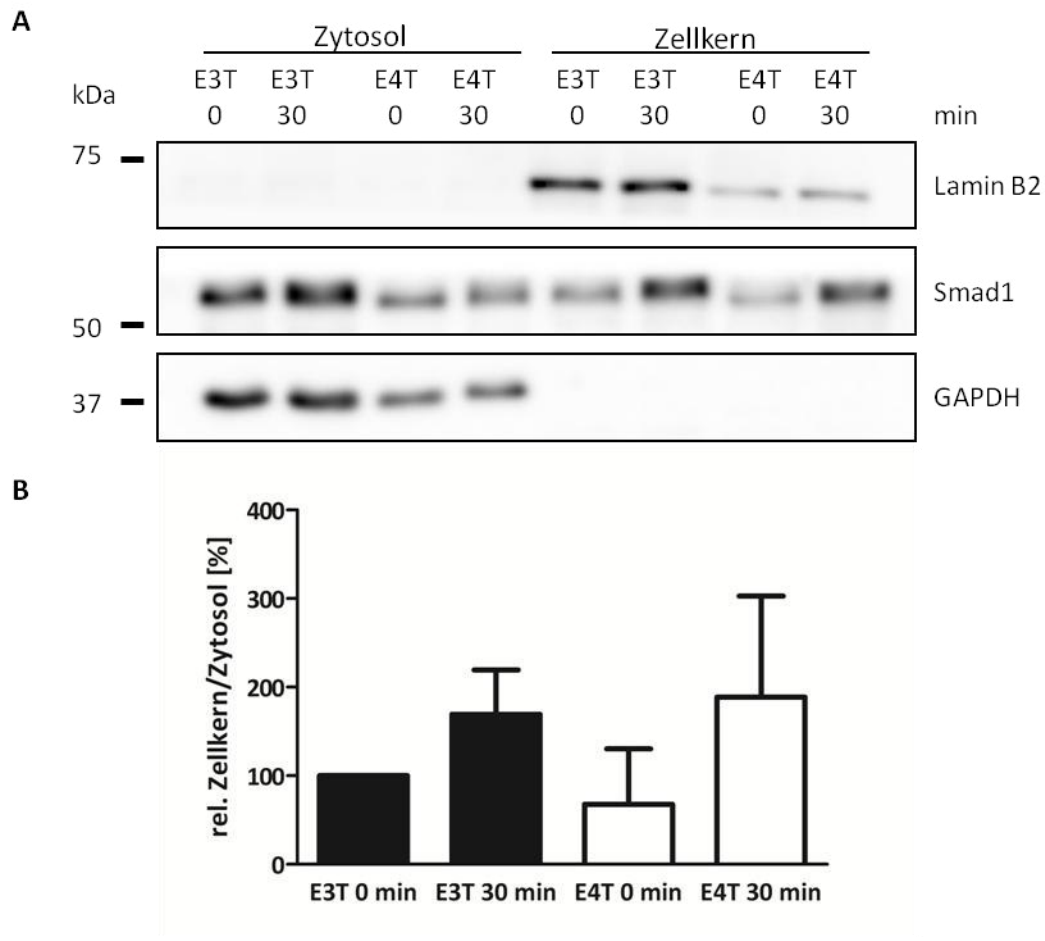


Abb. 9.2 Zellkernisolation nach Stimulation von E3T und E4T mit BMP-2

E3T (DHET) und E4T (DKO) MEF wurden ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden gehungert und anschließend mit 40 ng/mL BMP-2 für 30 min stimuliert. Anschließend wurden Zellkerne vom Zytoplasma separiert. Die Auswertung erfolgte mittels einem 10 %igen SDS-Gel mit anschließendem Western Blot (A). Die erhaltenen Smad1-Signale (60 kDa) wurden mit ImageJ quantifiziert (B). Dabei wurde das Verhältnis zwischen Zellkern und Zytosol bestimmt. Der Wert der unstimulierten E3T (E3T 0 min) wurde auf 100 % gesetzt. Als Kontrolle wurden GAPDH (37 kDa) und Lamin B2 (68 kDa) nachgewiesen. GAPDH sollte sich ausschließlich in der zytosolischen Fraktion befinden, wohingegen Lamin B2 nur in der Kernfraktion detektierbar sein sollte. Das Zellkern/Zytosol Verhältnis unterschied sich nicht signifikant zwischen *Vti1a*^{+/-} *Vti1b*^{+/-} und *Vti1a*^{-/-} *Vti1b*^{-/-} MEF (n=3).

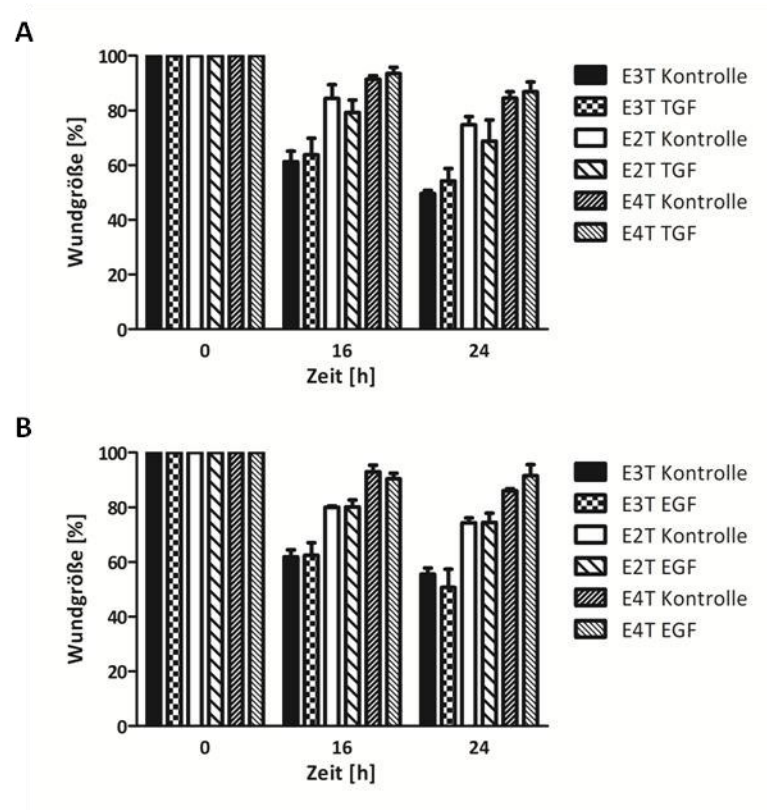


Abb. 9.3 TGF- β 1- und EGF-stimulierte Zellmigration

T-immortale MEF (E3T/DHET, E2T/DKO, E4T/DKO) wurden ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden in FKS-freiem Medium gehungert und eine Wunde wurde in der Zellschicht erzeugt. Es wurde 2 ng/mL TGF- β 1 (A) oder 1,5 ng/mL EGF (B) hinzugegeben. Die Kontrollansätze (Kontrolle) enthielten kein Stimulans und wurden in FKS-freiem Medium kultiviert. Die Wundgröße wurde zu 0, 16 und 24 h dokumentiert und mittels ImageJ vermessen. Die Wundgröße bei 0 h wurde auf 100 % gesetzt. Einen Einfluss der Stimulanzen auf die Migration der Zellen wurde weder für DHET noch für DKO MEF detektiert (n=3).

9.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
AAA+	<i>ATPases associated with various cellular activites</i>
Abb.	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolepropionic acid</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	<i>bimolecular-fluorescence complementation</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Cas9	CRISPR-assoziierte Protein 9
Cbfa1	<i>core binding factor α1</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
COP	<i>coat protein complex</i>
CPY	Carboxypeptidase Y
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
cRNA	<i>CRISPR RNA</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHET	Doppel-Heterozygot, hier <i>Vti1a^{+/-}, Vti1b^{+/-}</i>
DKO	Doppel-Knockout, hier <i>Vti1a^{-/-}, Vti1b^{-/-}</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPC4	<i>deleted in pancreatic carcinoma</i>
Dpp	<i>decapentaplegic</i>
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced Chemolumineszenz</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
et al.	et alteri
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>

FE	frühes Endosom
FKS	fötales Kälberserum
FOA	<i>5-Fluoroorotic acid</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLUT4	Glukose Transporter 4
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HF	<i>high fidelity</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
hVti	humanes Vti
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
KD	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
L	Liter
LAMP	<i>lysosome associated membrane protein</i>
LAP	<i>latency associated peptide</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Leu	Leucin
LIMP-2	<i>lysosomal integral membrane protein type 2</i>
LiOAc	Lithiumacetat
LTBP	<i>latent TGF-β-binding protein</i>
m	milli
M	Molar
M6P	Mannose-6-Phosphat
M6PR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
Mad	<i>mothers against decapentalegic</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEF	mausembryonale Fibroblasten
MEK	<i>mitogen-activated proteinkinase</i>
Met	Methionin
MH	<i>mad homology</i>
min	Minute
MU	Methylumbelliferyl
N2a	Neuro-2a
NHEJ	<i>nonhomologous end joining</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAM Motiv	5'-NGG <i>protospacer-adjacent motif</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polythylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PLATE	Polyethylen glykol 4000, Lithiumacetat, Tris, EDTA
PMSF	<i>phenylmethylsulfonylfluoride</i>
PTB	<i>phosphotyrosine binding domain</i>
PTH	<i>parathyroid hormone</i>
Rab	<i>ras related in the brain</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
Runx2	<i>runt related transcription factor 2</i>
SARA	<i>smad anchor for receptor activation</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	spätes Endosom
sgRNA	synthetische <i>guide RNA</i>
SH2	<i>src Homology 2</i>
Shc	<i>src Homology and collagen A</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SM-Proteine	Sec1/Munc18-Proteine
Smurf	<i>smad ubiquitination regulatory factor</i>
SN	SNAP
SNAPs	<i>soluble NSF attachment proteins</i>
SNAP-	<i>synaptosomal-associated Protein-</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE β	Tris, EDTA, β -Mercaptoethanol
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGFR	<i>transforming growth factor receptor</i>
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
tracrRNA	<i>transactivating RNA</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
u.a.	unter anderem
Ura	Uracil

V	Volt
v-/t-SNAREs	<i>vesicle-/target-SNAREs</i>
VAMP	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein</i>
Vti	<i>vps10 interacting</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel

9.3 Akademischer Werdegang

- 2007 – 2010 Universität Bielefeld
Bachelor of Science, Biochemie, Abschlussnote: 1,4
„Konstruktion von YFP-Säugerexpressionsvektoren für Dynamin-2 Wildtyp bzw. K44A und Rap1-PDZ-GEF1 und deren intrazelluläre Detektion in Neuroblastomazellen“
- 2010 – 2013 Universität Bielefeld
Master of Science, Biochemie, Abschlussnote: 1,3
„Weitere Analysen der Vti1a- und Vti1b-doppeldefizienten mausembryonalen Fibroblasten“
- 2013 – heute Universität Bielefeld
Promotion, Biochemie
„Charakterisierung der molekularen Grundlagen knochenphänotypischer Manifestationen von Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-} Mäusen und kompensatorischer SNARE-Proteine“

Posterpräsentationen

- 2017 4. International Symposium on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg

Veröffentlichungen

- Schmücker *et al.* Alterations in the signaling of the TGF- β /BMP superfamily and cell migration contribute to bone and muscular malformation in Vti1a^{-/-} Vti1b^{-/-} DKO mice.
 (Einreichung geplant)

9.4 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard, die mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Promotion ermöglicht hat. Dank eines sehr interessanten Themas konnte ich meine forschersische Kreativität ausleben und ein hohes Maß an Selbstständigkeit erlernen.

Herrn Prof. Dr. Torben Lübke möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein großes Dankeschön haben sich Christian Bollmann und Christiane Wiegand verdient, indem sie zusammen mit mir das „Säugerlabor“ unsicher gemacht haben. Trotz aller Steine im Weg hatten wir eine schöne Zeit, für die ich mich bei euch bedanken möchte.

Bei Judith Koliwer bedanke ich mich für die Unterstützung und die vielen Aufmunterungen in der Endphase meiner Promotion.

Beim „Strickclub“ bedanke ich mich für kreative Auszeiten, in denen Küken, Schlangen, Lappen/Decke, Armstulpen und vieles mehr entstanden sind. Für die wöchentliche Gitarren Session bedanke ich mich bei „Caught in the cell“. Ich hatte immer viel Freude und hoffe, dass wir auch in Zukunft die Saiten anschlagen werden. Auch für gemeinsame Spieleabende möchte ich mich bedanken. Danke an Svenja „Bloß“, Lara „Croft“, „Howard“ Marcendale, Judith „Koldliwer“ und Christiane „eeee“ für die gemeinsame (Frei-)Zeit.

Auch bei der restlichen BCIII und ehemaligen Arbeitskollegen, die bisher noch unerwähnt blieben, möchte ich mich ganz herzlich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht an Marli Morais Duarte, Thorsten Kunz, Katharina Hahn, Jörn Michael Völker, Niklas Krause, Susanne Schöning, Alexander Moreth, Tim Take, Rimma Bachmann und Michael Gossing.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Bachelorstudenten/innen Lisa Hüttemann, Lennard Karsten, Vanessa Schmidt und Hannah Dörr. Des Weiteren danke ich allen Auszubildenden, die auf meinem Thema mit gearbeitet haben.

Auch den Mitgliedern der BCI möchte ich für die tolle Zusammenarbeit danken.

Ein großes Dankschön geht an meine Korrekturleser, die sich die Zeit genommen haben, meine Arbeit auf Herz und Nieren zu prüfen.

Christof Eigner danke ich für seine unendliche Geduld und unterstützenden Aufmunterungen, vor allem in den schwierigen Zeiten. Aber auch für die schönen, gemeinsam verbrachten Stunden möchte ich ihm herzlichst danken.

Auch bei meinen Eltern Anne und Karl Schmücker und Geschwistern Tanja Kraft und Dennis Schmücker möchte ich mich für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung bedanken.

9.5 Eigenständigkeitserklärung

Diese Dissertation ist in der Arbeitsgruppe Biochemie III der Universität Bielefeld unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard im Zeitraum von November 2013 bis März 2018 entstanden. Ich versichere hiermit, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen sowie Hilfsmittel verwendet habe. Des Weiteren habe ich an keiner anderen Fakultät oder Hochschule einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt und diese Arbeit weder in der aktuellen noch in einer anderen Fassung vorgelegt.

Bielefeld, den 15.03.18

Simone Schmücker