

Zusammenspiel von Defekten der pH-Regulation,
des Transports und der Glykosylierung
bei der Entstehung der
autosomal rezessiven Cutis laxa typ 2A

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Guido Vogt

2020

Diese Dissertation wurde
vom 01.10.2015 bis 31.07.2020

am

Institut für medizinische Genetik und Humangenetik der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

und

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin

angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Kornak

2. Gutachter: Prof. Dr. Sigmar Stricker

Disputation am 11.12.2020

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel und Literaturquellen vollständig angegeben worden sind. Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig eine Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Cutis laxa – Eine heterogene Gruppe von Erbkrankheiten	1
1.2. Autosomal rezessive cutis laxa typ 2A und <i>Wrinkled Skin</i> -Syndrom	4
1.3. Pflasterstein-Lissenzephalie	7
1.4. Die vakuoläre ATPase.....	8
1.4.1. Aufbau	8
1.4.2. Protonen-Transport der v-ATPase	9
1.4.3. Regulation der v-ATPase	9
1.4.4. Die v-ATPase als Regulator	9
1.4.5. Die verschiedenen α -Isoformen	9
1.5. Der Golgi-Apparat und das Zisternen-Reifungsmodell	11
1.6. Bildung und Transport von COPII- und COPI-Vesikeln	12
1.6.1. COPII-Transport	12
1.6.2. COPI-Transport	12
1.7. Regulation der Ionen-Homöostase und des pH-Werts des Golgi-Apparats. 14	
1.8. Glykosylierung	15
1.8.1. N-Glykosylierung	15
1.8.2. O-Glykosylierung	16
1.9. Das endosomale Transport-System.....	18
1.9.1. Clathrin vermittelte Endozytose	18
1.9.2. Endosomen Biogenese	18
1.10. Spermienentwicklung	20
1.10.1. Akrosomenbiogenese	20
1.10.2. Entwicklung der Manschette und des Flagellums	21
1.11. Zielstellung	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Materialien.....	23
2.1.1. Geräte	23
2.1.2. Chemikalien.....	24
2.2. Methoden	29
2.2.1. <i>Atp6v0a2</i> -Mausmodelle	29
2.2.2. Mausgenotypisierung	29
2.2.3. Histologie.....	31
2.2.4. Transmissionselektronenmikroskopie	33
2.2.5. Immunoblotting.....	33
2.2.6. Quantitative Analyse von Lipiden (<i>Lipidomics</i>)	35
2.2.7. <i>Complexome-Profiling</i> des zerebralen Kortex.....	35
2.2.8. Analyse der N-Glykane durch Massen-Spektrometrie	35
2.2.9. Erzeugung und Kultivierung von e13,5 Mefs	36

2.2.10. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	36
2.2.11. Brefeldin A (BFA)-Test zur Untersuchung des retrograden Transports ..	36
2.2.12. Metabolische Markierung mit ManNAz	36
2.2.13. Analyse des pH-Werts im Golgi-Apparat	37
2.2.14. Die Analyse des Proteoms und Sekretoms von Mefs	37
2.2.15. Messung der Spermien-Motilität und -Konzentration	38
2.2.16. Statistische Analyse	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Verminderung von Gewichtszunahme und Längenwachstum bei beiden <i>Atp6v0a2</i> -defizienten Mausmodellen	39
3.2. Neuronale Veränderungen <i>Atp6v0a2</i> -Mausmodelle	40
3.2.1. Vermehrte Krampfanfälle mit stärkerer Ausprägung bei <i>Atp6v0a2</i> ^{RQ/RQ} - Mäusen.....	40
3.2.2. Veränderte Schichtung von Neuronen im frontalen Kortex.....	40
3.2.3. Die neuronale Übermigration beginnt im Embryonalstadium 13,5.....	41
3.2.4. Eine verringerte O-Glykosylierung von α -Dag1 führt zu einer Unterbrechung der Plasmamembran	42
3.2.5. Übermigrierte Neuronen sind Ctip2 ⁺ und Veränderung der neuronalen Schichtung.....	46
3.2.6. Neurodegeneration und Hinweise auf eine neuronale Speicherkrankheit	47
3.2.7. Ultrastrukturelle Analyse des lysosomalen Speichermaterials.....	51
3.2.8. Akkumulation von Autophagosomen in Neuronen	52
3.2.9. Akkumulation von Sphingolipiden im präfrontalen Kortex.....	53
3.2.10. Einfluss der Mutationen auf die Assemblierung der v-ATPase	54
3.2.11. Veränderung der CopI-Assemblierung im Kortex der <i>Atp6v0a2</i> - Mausmodelle und <i>ATP6V0A2</i> defizienten Patienten-Fibroblasten	56
3.2.12. Der Funktionsverlust von <i>Atp6v0a2</i> beeinträchtigt nicht die N-Glykosylierung im adulten Mausgehirn	58
3.3. Reduktion der Dermis-Dicke und Verringerung des Elastin-Gehalts in den <i>Atp6v0a2</i> -Mausmodellen	61
3.3.1. Stärkere Glykanierung in der Haut und veränderte Sekretion von Decorin	64
3.3.2. Deregulierter TGF- β Signalweg	66
3.4. Unfruchtbarkeit und Globozoospermie in den <i>Atp6v0a2</i> -Mausmodellen	67
3.4.1. Die Spermien sind immotil und deren Anzahl ist reduziert.....	69
3.4.2. Die Bildung des Akrosoms bricht innerhalb der Golgi-Phase ab	69
3.4.3. Ultrastrukturelle Aufnahmen offenbaren einen Vesikelfusionsdefekt des Akrosoms	71
3.4.5. Erhöhte Expression von Gopc im Hoden	73
3.4.6. Reduktion von Galactosyl-(β -1,3) N-acetylgalactosamin-Glykane im Hoden	73
3.4.7. Normale Expression von <i>Atp6v0a2</i> ^{RQ} im Hoden	73
3.5. Molekulare Charakterisierung <i>Atp6v0a2</i> defizienter Mefs.....	75

3.5.1. Erhöhung des pH-Wertes im Golgi-Apparat durch Funktionsverlust von <i>Atp6v0a2</i>	75
3.5.2. Reduzierter retrograder Transport im Golgi-Apparat	76
3.5.3. Beeinträchtigung der Sialylierung	77
3.5.4. Erhöhtes freies Cholesterin in Mefs	79
3.5.5. Störung des intrazellulären Transports und eine Erhöhung der Cholesterin-Synthese aus der Proteom-Analyse	80
3.5.6. Veränderungen der Sekretion und Assemblierung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix	82
4. Diskussion	84
4.1. Die <i>Atp6v0a2</i> -Mausmodelle rekapitulieren den Phänotyp von WSS und ARCL2A	84
4.2. Die <i>Atp6v0a2</i> -Mausmodelle als Verbindung zwischen pflastersteinartigen Kortex und einer Speichererkrankung in Neuronen	86
4.2.1. Ein Defekt in der Piabasalmembran als Ursache einer Pflasterstein-Lissenzephalie.....	86
4.2.2. Die Löcher in der Piabasalmembran resultieren aus einem	87
O-Glykosylierungsdefekt von α -Dag1	87
4.2.3. Entwicklung von Krampfanfällen und Astroglieose	89
4.2.4. Anreicherung von Lipiden	90
4.2.5. Die Beeinträchtigung der lysosomalen Aktivität von CtsD gab einen Hinweis auf eine Störung des endosomalen Transportweges	91
4.2.6. Veränderungen in der Autophagie	92
4.2.7. Ein Einblick in den Pathomechnismus der neuronalen Speicherkrankheit	93
4.2.8. Die Astrozyten als mögliche Verbindung zwischen dem neuronalen Migrationsdefekt, Kampfanfällen und der neuronalen Speicherung	96
4.3. Die <i>Atp6v0a2</i> -Mausmodelle rekapitulieren den Hautphänotyp der WSS- und ARCL2A-Patienten	97
4.3.1. Veränderung der Haut und Reduktion der elastischen Fasern	97
4.3.2. Ein Glykosylierungsdefekt als Ursache für Reduktion der elastischen Fasern?	98
4.3.3. Deregulierter TGF- β Signalweg	99
4.4. Ein unerwarteter Spermienphänotyp und seine Interpretation hinsichtlich des Pathomechanismus.....	100
4.4.1. Eine gestörte Akrosomenbiogenese weist auf eine Vesikelfusionsfunktion der v-ATPase hin.....	101
4.4.2. Deregulation des endosomalen Vesikeltransports	102
4.4.3. Welche Rolle spielt der pH-Wert im Golgi-Apparat und den proakrosomalen Vesikeln für die Bildung des Akrosoms?	103
4.4.4. Veränderte Glykosylierung im <i>Atp6v0a2</i> defizienten Maushoden.....	104
4.5. Der Einfluss der <i>Atp6v0a2</i> -Defekte auf den pH-Wert des Golgi-Apparats, dessen Vesikelfusion und die Glykosylierung	105
4.5.1. Gestörter retrograder Transport über den CopI- und Cog- Komplex und Vesikelfusion	105

4.5.2. Fehlerhafte Glykosylierung	106
4.6. Wie und warum überschneiden sich die Phänotypen und die Pathomechanismen von ARCL2 und ARCL3?	107
5. Ausblick	109
5.1. Weitere Charakterisierung des Gehirnphänotyps und Therapie-Ansatz....	109
5.2. Aufklärung des Hautphänotyps	110
5.3. Globozoospermie und die Funktion von <i>Atp6v0a2</i>	111
6. Literaturverzeichnis	112
7. Abkürzungsverzeichnis	125
8. Danksagung	126
9. Anhang	128
9.1. Auszug <i>Complexome</i> -Profiling eines ATP6V0A2-Patienten	128
9.2. Proteom- und Sekretom-Daten von Mefs der <i>Atp6v0a2</i> -Mausmodelle.....	130

Zusammenfassung

Die autosomal rezessive Cutis laxa Typ 2A (ARCL2A, auch *Wrinkly Skin Syndrome*) ist assoziiert mit einer faltigen Haut, einer Pflasterstein-Lissenzephalie, einer Entwicklungsverzögerung, epileptischen Anfällen und einem angeborenen Glykosylierungsdefekt. ARCL2A resultiert aus *loss of function*-Mutationen in *ATP6V0A2*. Dieses Gen kodiert für die Untereinheit $\alpha 2$ der V_0 -Domäne der vakuolären ATPase (v-ATPase), die diesen Proteinkomplex zum Golgi-Apparat und den frühen Endosomen rekrutiert. In diesen Organellen transportiert die v-ATPase Protonen durch die Membran und säuert diese an. Außerdem reguliert $\alpha 2$ über eine Interaktion mit ARNO oder anderen Interaktionspartnern den Vesikeltransport. Um die Rolle dieser Funktionen der *Atp6v0a2*-v-ATPase im Pathomechanismus der ARCL2A zu unterscheiden, wurden ein *Knockout*-Mausmodell (*Atp6v0a2*^{-/-}) und ein *Knockin*-Mausmodell (*Atp6v0a2*^{RQ/RQ}) vergleichend charakterisiert. Während im *Atp6v0a2*^{-/-} das Protein fehlt, wurde im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ} die Aminosäure Arginin 755 durch ein Glutamin ersetzt. Durch diese Veränderung kann $\alpha 2$ keine Protonen transportieren, steht aber für Proteininteraktionen zur Verfügung. Beide Mausmodelle rekapitulierten die klinischen Merkmale der ARCL2A. Die Haut zeigte einen Cutis laxa-Phänotyp durch eine Reduktion der Dicke der Dermis und elastischen Fasern. Dies war verbunden mit Veränderungen im TGF- β -Signalweg und der N-Glykosylierung mit Betonung im *Atp6v0a2*^{-/-}. Im Gehirn bestand eine Übermigration kortikaler Neuronen im Neokortex, welche mit einer verminderten O-Glykosylierung von α -Dystroglykan korrelierte und im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ} stärker ausgeprägt war. Zusätzlich entstanden eine Astrogliose und Krampfanfälle durch eine neuronale Speicherkrankheit. Diese Speicherkrankheit steht vermutlich im Zusammenhang mit einer Dysregulation der Lipid-Homöostase, des endosomalen Transports und der Autophagie in Neuronen. Beide Mausmodelle zeigten eine männliche Infertilität aufgrund einer Globozoospermie mit Fehlbildung des Akrosoms und immobilen Spermien. Die akrosomale Fehlbildung war im *Atp6v0a2*^{-/-} verstärkt. Zellbiologische Untersuchungen anhand von embryonalen Fibroblasten zeigten eine Erhöhung des pH-Werts im Golgi-Apparat ausgeprägt im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}, während der retrograde Transport im Golgi-Kompartiment vom *Atp6v0a2*^{-/-} stärker beeinträchtigt war. Eine Akkumulation von Cholesterin in den Zellen beider Mauslinien gab einen Hinweis auf eine Störung der endosomalen Funktion. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die verschiedenen Funktionen von $\alpha 2$ eng miteinander verknüpft sind. Jedoch ergaben sich Hinweise, dass im *Atp6v0a2*^{-/-} die N-Glykosylierung und im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ} der vesikuläre Transport stärker gestört sind. Dies korrelierte mit dem Haut- und Gehirnphänotyp, woraus sich eine größere Sensitivität der Neuronen für den gestörten Vesikeltransport im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ} ableiten ließ.

Summary

Autosomal recessive cutis laxa typ 2A (ARCL2A, or Wrinkly Skin Syndrome) is associated with wrinkled skin, cobblestone lissencephaly, developmental delay, epileptic seizures and a congenital disorder of glycosylation. ARCL2A results by loss of function mutations in *ATP6V0A2*. This gene encoded the $\alpha 2$ subunit of V_0 of the vacuolar ATPase (v-ATPase), targets this protein complex to Golgi apparatus and endosomal compartments. The V-ATPase acidifies these organelles by proton transport through the membrane. Additionally, $\alpha 2$ regulates vesicle trafficking about interactions by ARNO or other interacting proteins. To differentiate the role of these functions of *Atp6v0a2*-v-ATPase to the pathomechanism of ARCL2A, a knockout mouse model (*Atp6v0a2*^{-/-}) and a knockin mouse model (*Atp6v0a2*^{RQ/RQ}) were comparatively characterized. While the $\alpha 2$ subunit-containing v-ATPase cannot be formed in *Atp6v0a2*^{-/-}, in *Atp6v0a2*^{RQ/RQ} results in a stable $\alpha 2$ subunit incapable of proton transport, which is however available for protein interactions.

Both mouse models recapitulated clinical features of ARCL2A. The skin showed a cutis laxa phenotype with reduced thickness of the dermis and elastic fibers. This was associated with a change in the TGF- β signaling and N-glycosylation with an emphasis in *Atp6v0a2*^{-/-}. The brain showed an overmigration of cortical neurons in neocortex correlated with a decreased O-glycosylation of α -dystroglycan which was more pronounced in *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}. In addition, astrogliosis and seizures were caused by a neuronal storage disease. This storage disease is presumably related to dysregulation of lipid homeostasis, endosomal transport and autophagy in neurons.

In both mouse models, male infertility due to globozoospermia with abnormal acrosome formation and immobile sperms. The acrosomal malformation was more impaired in *Atp6v0a2*^{-/-}.

Cell biological investigations using embryonic fibroblasts showed increase in pH-value in the Golgi apparatus pronouncedly in *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}, while retrograde transport in Golgi compartment was strongly affected by *Atp6v0a2*^{-/-}. An accumulation of cholesterol in cells of both mouse models was an indication of a disturbance of endosomal function. However, there was evidence that N-glycosylation is severely impaired in *Atp6v0a2*^{-/-} and vesicular transport is more disrupted in *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}. This correlated with skin and brain phenotype, from which a greater sensitivity of the neurons for the disturbed vesicular transport in the *Atp6v0a2*^{RQ/RQ} can be deduced.

1. Einleitung

1.1. Cutis laxa – Eine heterogene Gruppe von Erbkrankheiten

Cutis laxa bedeutet im deutschen „schlaffe oder faltige Haut“, welches das prägnanteste visuelle und gemeinsame Merkmal einer ansonsten sehr heterogenen Gruppe von angeborenen progeroiden Erkrankungen darstellt. Die faltige Haut wird dabei von Defekten in der extrazellulären Matrix verursacht¹. Diesen liegen Mutationen in den Genen der Strukturproteine oder deren Metabolismus zugrunde (Tabelle 1). Bei den verschiedenen Formen der autosomal rezessiven Cutis laxa (ARCL) liegt ein kompletter Funktionsverlust des betroffenen Proteins vor (*loss of function*-Mutationen). Nach klinischen Merkmalen werden die ARCL-Varianten in 1 bis 3 unterteilt. Die ARCL1 zeigt einen schwereren Verlauf, da zusätzlich zur Haut, die Lunge und das Cardio-Vaskuläre-System betroffen sind. Die Funktion dieser Gewebe ist stark von ihrer Elastizität abhängig, wodurch sich Mutationen, welche die Assemblierung der elastischen Fasern direkt betreffen, besonders stark auswirken. Beispiele sind Fibulin 4 (*EFEMP2*) und 5 (*FBN5*)^{2,3}.

Patienten mit ARCL2 zeigen neben der faltigen Haut, auch progeroide Gesichtszüge, Veränderungen des Skeletts, eine geistige Retardierung, eine Entwicklungsverzögerung und eine Muskelhypotonie¹. Ist bei Cutis laxa-Patienten ein Glykosylierungsdefekt nachweisbar, verfügen diese häufig über eine Mutation in der vakuolären ATPase^{4,5} (v-ATPase, Gene: *ATP6V0A2*, *ATP6V1A*, *ATP6V1E1*). Zusätzlich führt eine Mutation in *PYCR1*, welches die Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktase 1 (*PYCR1*) und damit die Prolin-Synthese beeinträchtigt, zu einem ähnlichen Phänotyp^{6,7}. Außerdem lokalisiert *PYCR1* in Mitochondrien, wodurch sein Fehlen eine mitochondriale Dysfunktion verursacht.

Weiterhin führen Missens-Mutationen in dem Assemblierungsfaktor der v-ATPase *ATP6AP2* zu einer neuen Form der Cutis laxa mit einer Immundefizienz, Leberkrankheit, psychomotorischen Beeinträchtigung, Glykosylierungsdefekt und einem Defekt in der Autophagie⁸. Das Besondere an dieser Form der Cutis laxa ist deren X-chromosomaler Erbgang. Nur die Menkes-Krankheit oder dessen mildere Form das Okzipitalhorn-Syndrom werden ebenfalls X-chromosomal vererbt⁹. Beiden Krankheiten liegen Mutationen von *ATP7A* zugrunde, welches für den Kupfertransport innerhalb der Zelle verantwortlich ist. Ein Defekt von *ATP7A* führt zu einer fortschreitenden Neurodegeneration, Muskelhypotonie und hypermobilen Gelenken^{10,11}.

ARCL3, welches auch als De Barsy Syndrom bezeichnet wird, zeigt einen progeroiden Phänotyp mit geistiger Retardierung, verzögerten psychomotorischen Entwicklung und Muskelhypotonie. Für ARCL3 ist ebenfalls eine Mutation in *PYCR1* verantwortlich und zusätzlich Mutationen in *ALDH18A1*, dass für die Pyrrolin-5-

Cyrboxlyat Synthetase (P5CS) kodiert und somit ebenfalls die Prolin-Synthese beeinflusst^{6,12}.

Einen milderen Verlauf nehmen hingegen die autosomal dominanten Cutis laxa (ADCL)-Varianten. Hier führt ein mutiertes Allel mit Funktionszugewinn (*Gain of function*-Mutation) zum Phänotyp. Beispielsweise führen Mutationen in den Genen von Elastin (*ELN*) und *FBN5* zu einem stabilen Protein, allerdings mit einer verringerten Löslichkeit. Dadurch aggregieren diese Proteine und die Assemblierung der extrazellulären Matrix wird beeinträchtigt^{13,14}.

Zusätzlich werden weitere Erkrankungen der Cutis laxa zugeordnet. Hervorzuheben sind an dieser Stelle Geroderma osteodysplastica (GO) und das Makrozephalie Alopezie-Cutis laxa-Skoliose (MACS)-Syndrom, welche molekularbiologisch mit einem veränderten Vesikel-Transport assoziiert sind^{15,16}. GO- und MACS-Patienten besitzen zusätzlich zum Cutis laxa-Phänotyp eine sich früh entwickelnde Osteoporose (GO) und Skelettanomalien (MACS). Verantwortlich für GO ist eine Mutation in *SCYL1BP1*, welche zu einem Verlust eines *coiled coil*-Proteins (GORAB) im Golgi-Apparat führt¹⁷. GORAB interagiert mit *Ras-related in brain* (RAB) 6 und *ADP-ribosylation factor* (ARF) 1 und 5¹⁸. Patienten mit MACS-Syndrom zeigen eine Mutation des Golgi-Proteins *Ras and rab interactor* (*RIN*) 2. RIN2 interagiert mit RAB5 und wirkt dadurch in der Endozytose. MACS-Patienten verfügen außerdem über einen O-Glykosylierungsdefekt¹⁹.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Cutis laxa-Syndrome, einschließlich betroffener Gene und assoziierten Defekten.

Krankheit	Gen	Defekt
Autosomal dominante Cutis laxa (ADCL)	<i>ELN</i>	Abnormale Elastin Synthese/Degradation
	<i>FBN5</i>	Fibulin-5 Synthese/Aggregation
	<i>ALDH18A1</i>	Umwandlung von Glutamat, Ornithin und Prolin/ Mitochondriale Dysfunktion
Autosomal rezessive cutis laxa typ 1 (ARCL1)	<i>EFEMP2</i>	Fibulin-4 Synthese
	<i>FBN5</i>	Fibulin-5 Synthese
	<i>LTBP4</i>	Deregulation TGF- β 1-Signalweg
Autosomal rezessive cutis laxa typ 2 (ARCL2)	<i>ATP6V0A2</i>	v-ATPase
	<i>PYCR1</i>	Prolin-Synthese/ Mitochondriale Dysfunktion
	<i>ATP6V1E1</i>	v-ATPase
	<i>ATP6V1A</i>	v-ATPase
De Barys Syndrom (ARCL3)	<i>ALDH18A1</i>	Umwandlung von Glutamat, Ornithin und Prolin/ Mitochondriale Dysfunktion
	<i>PYCR1</i>	Prolin-Synthese/ Mitochondriale Dysfunktion
X-Chromosomale Cutis laxa	<i>ATP6AP2</i>	v-ATPase
	<i>ATP7A</i>	Cu ²⁺ -Transport
Geroderma osteodysplastica	<i>GORAB</i>	Defekter Vesikel-Transport im Golgi-Apparat
Makrozephalie Alopezie-Cutis laxa-Skoliose Syndrom	<i>RIN2</i>	Rab5 vermittelte Endozytose
Arterial-Tortuosity-Syndrom	<i>SLC2A10</i>	Glucose-Transporter 10

1.2. Autosomal rezessive cutis laxa typ 2A und *Wrinkled Skin*-Syndrom

Autosomal rezessive Cutis laxa typ 2A (MIM 219200; ARCL2A) und *Wrinkly Skin*-Syndrom, (Faltige Haut-Syndrom, MIM 278250; WSS) sind unterschiedliche Ausprägungen desselben Krankheitsbildes. Beiden liegen Mutationen in *ATP6V0A2* zugrunde, welche zu einem Funktionsverlust des Proteins führen⁴. Auffälligstes Merkmal ist deren schlaffe faltige Haut, die geprägt ist durch abnormale elastische Fasern (verkürzt, fragmentiert), welche einen verringerten Gehalt an Elastin aufweisen^{1,20,21}. Patienten mit WSS besitzen diese Hautfalten hauptsächlich an Abdomen, Händen und Füßen, wohingegen die Patienten mit ARCL2A global eher grobe Hautfalten zeigen²¹ (Abbildung 1A,B). Typisch für beide Erbkrankheiten ist deren lange Gesichtsform, welche zusätzlich zur schlaffen Haut, ein gewölbtes Nasenprofil und eine abwärts gerichtete Lidspalte zeigen (Abbildung 1A).

Stärker als diese optischen Merkmale beeinträchtigen die Patienten jedoch neurologische Probleme. MRI-Aufnahmen zeigen eine verschlechterte Gyrierung mit pflastersteinartigen angeordneten Neuronen im kortikalen Gehirn (Pflasterstein-Lissenzephalie, *Cobblestone malformation*)^{1,22,23} (Abbildung 1 C). Diese Gehirnfehlbildungen sind assoziiert mit einer Mikrozephalie und einem verlangsamten Verschluss der Fontanelle. Zusätzlich ist die geistige Entwicklung der Patienten leicht verzögert. Später im Verlauf entwickeln die Patienten Krampfanfälle, deren Ursache unbekannt ist²³. Außerdem gibt es bei einigen Patienten Hinweise auf neurodegenerative Prozesse.

In variabler Ausprägung werden bei Patienten mit ARCL2A eine verringerte Knochendichte (Osteopenie), Veränderungen der Augen, der Leber, des kardiovaskulären Systems, eine Hypotonie, Leistenhernien und eine Störung der Wundheilung und Blutgerinnung beobachtet^{20,21,23-26}.

Zusätzlich besteht bei ARCL2A und WSS ein angeborener N- und O-Glykosylierungsdefekt (engl. *Congenital disorder of glycosylation*, CDG)⁴. Nach aktueller Nomenklatur wird dieser CDG als *AT6V0A2-CDG* bezeichnet. In der klinischen Diagnostik werden zur Untersuchung von CDGs die isoelektrische Fokussierung von Transferrin für die N-Glykosylierung, sowie Apolipoprotein CIII für O-Glykosylierung eingesetzt. Im Gegensatz zu gesunden Menschen bei denen am häufigsten Tetra-Sialotransferrin detektiert wird, werden bei Kindern mit ARCL2A Erhöhungen der tri- und di-salierten Form gefunden (Abbildung 1D), welche sich im erwachsenen Alter wieder normalisieren²⁰. Dass dieser CDG global auf die N-Glykosylierung übertragen werden kann, zeigen Messung der N-Glykane mittels MALDI-TOF, bei der ebenfalls eine Verringerung Sialierung in den ARCL2A-Patienten im Serum beobachtet werden kann (Abbildung 1E)⁴. Ebenso zeigen ARCL2A-Patienten eine Verminderung von di-salierten Apolipoprotein CIII und eine Erhöhung von einfach salierten Apolipoprotein CIII^{20,23}.

Dieser CDG wurde in der Literatur auf eine Veränderung des pH-Wertes im Trans-Golgi-Apparat und auf eine Fehllokalisierung der Glykosylierungsenzyme durch einen veränderten vesikulären Transport zurückgeführt.

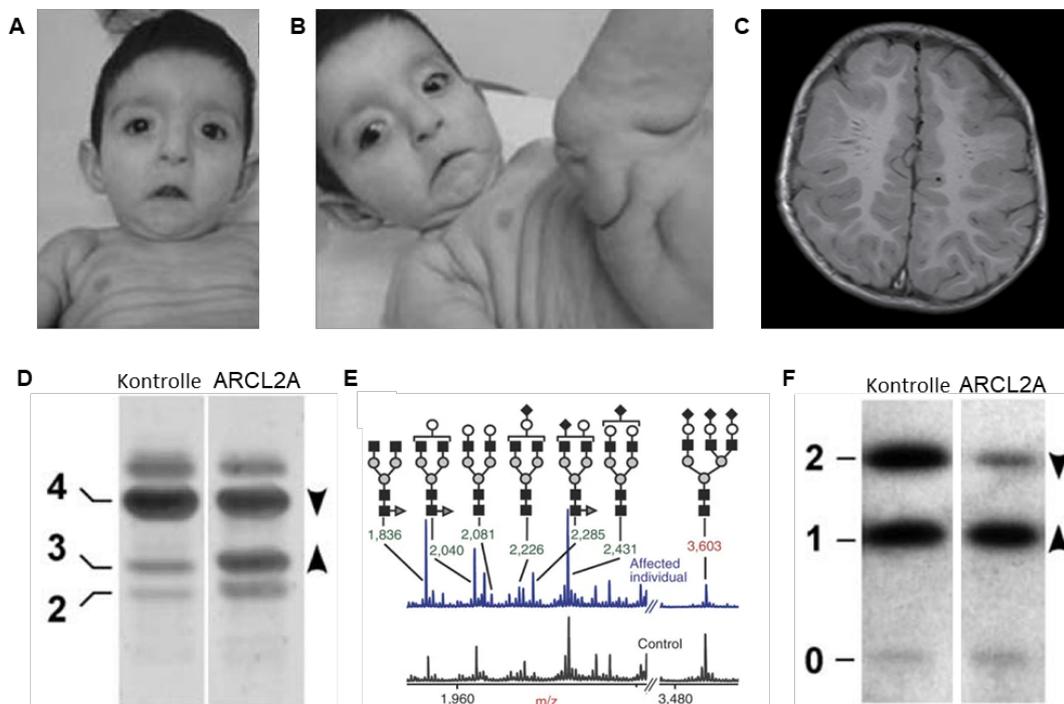


Abbildung 1: (A-C) Charakteristische Eigenschaften von ARCL2A. (A, B) Aufnahme eines Kindes. Erkennbar sind globale Hautfalten, eine kurze Nase mit breitem Rücken, ein langes Philtrum und herunterhängende Mund- und Augenlidspalten. Aufnahmen von Huchtagowder, V. et al. (2009)²⁰, modifiziert. (C) MRI-Aufnahme eines Gehirns mit einer Pflasterstein-Lissenzephalie. Deutlich erkennbar ist eine verschlechterte Gyrierung des Gehirns. Aufnahme von Bahena-Bahena, D. et al. (2014)²². (D-F) Glykosylierungsanomalien aus dem Serum von ARCL2A-Patienten von Huchtagowder, V. et al. (2009)²⁰, modifiziert und Kornak U. et al. (2008)⁴. (D) Isoelektrische Fokussierung von Serum Transferrin. Erkennbar ist eine Verschiebung der Intensität von tetra-sialyierten Transferrin zu tri- und di-sialyierten Transferrin. (E) N-Glykanspektrum vom Serum. Deutlich wird eine Reduktion der hochsialyierten Glykane (3,603 m/z). Dafür nimmt die Menge wenig sialyierter Glykane (2,285 m/z) und unsialyierter Glykane (1836- 2,226 m/z) zu. (F) Isoelektrische Fokussierung von Apolipoprotein CIII. Erkennbar ist die Reduktion der di-sialyierten Form.

Molekularbiologische Untersuchungen von *ATP6V0A2* defizienten Patienten-Fibroblasten zeigten einen fragmentierten und aufgeschwollen Golgi-Apparat (Abbildung 2A-C). Zusätzlich weist der Golgi-Apparat einen gestörten retrograden Vesikeltransport während der Inkubation von Brefeldin A (BFA) auf, welches die kleine GTPase ARF1 dysreguliert²⁷. Außerdem wurden Akkumulationen von multivesikulären Körperchen (späten Endosomen), Lysosomen und Autophagosomen entdeckt²⁰ (Abbildung 2B-D). Dies deutet auf Veränderungen im endosomalen Vesikeltransport hin.

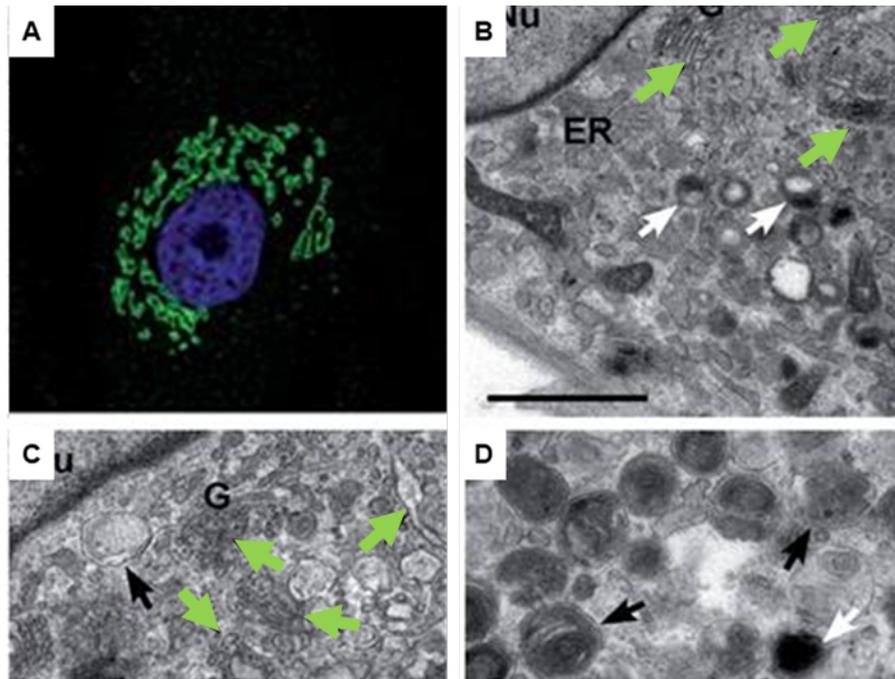


Abbildung 2: Fragmentierter, geschwollener Golgi-Apparat in ARCL2A-Patienten-Fibroblasten (A, grüne Pfeile in B und C) mit Akkumulation von Lysosomen (weiße Pfeile in B und D), Autophagosomen und multivesikulären Körperchen, (schwarze Pfeile in C und D). Immunfluoreszenz- (A) und ultrastrukturelle Aufnahmen (B-D) von Huchtagowder, V. et al. (2009)²⁰, modifiziert. ER= Endoplasmatisches Retikulum, G= Golgi-Apparat, Maßstab = 2 µm.

1.3. Pflasterstein-Lissenzephalie

Auch bekannt als Typ-2-Lissenzephalie beschreibt die Pflasterstein-Lissenzephalie eine unebene Oberfläche des Gehirns mit einer verschlechterten Gyrierung, durch flache Furchen (Abbildung 3). Häufig wird eine Pflasterstein-Lissenzephalie durch autosomal-rezessive Mutationen der O-Glykosylierung des Proteins α -Dystroglykan verursacht (Punkt 1.8.2.), weshalb diese als Dystroglykanopathien bezeichnet werden. Dazu zählen als schwere Form das Walker-Warburg-Syndrom, sowie Muskel-Auge-Gehirnkrankheit und die Muskeldystrophie vom Fukuyama-Typ²⁸⁻³¹. Das Walker-Warburg-Syndrom ist neben der Veränderung des Gehirns auch assoziiert mit einer Netzhautdysplasie und einer Muskeldystrophie³².

Die Ursache für die verschlechterte Gyrierung liegt in der gestörten Laminin-Struktur der Piabasalmembran (Basallamina an der Pialoberfläche) im Neokortex³³. Dies führt zu einer Desorganisation der radialen Glia Zellen, weil deren Endfüßchen an der Glia limitans ansetzen³⁴. Während der radialen Migration im Neokortex migrieren die Neuronen über die radialen Glia Zellen³⁵ und werden nicht durch die Glia limitans gestoppt. Ist diese Lamina nicht intakt, führt dies zu einer Übermigration der Neuronen in die marginale Zone^{28,29,32,36}.

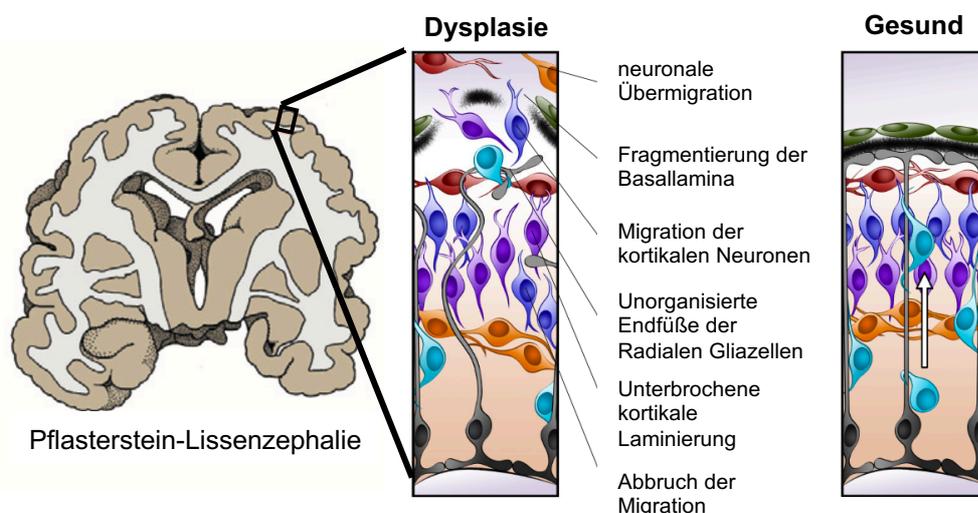


Abbildung 3: Pflasterstein-Lissenzephalie. Für die verschlechterte Gyrierung im Gehirn und Übermigration der Neuronen sind Löcher in der Piabasalmembran verantwortlich. Im gesunden Gehirn stoppt die Basallamina die radiale Migration der Neuronen. Abbildungen von J. LoTurco et al. (2013)³³ und A. Nickolls et al. (2018)³², modifiziert.

1.4. Die vakuoläre ATPase

Der saure pH-Wert von intrazellulären Kompartimenten ist kritisch für viele biologische Prozesse, beispielsweise für die Glykosylierung und den Vesikeltransport im Golgi-Apparat oder für den Abbau intrazellulärer Stoffwechselprodukte in den Lysosomen. Eine zentrale Rolle bei der Ansäuerung dieser Zellorganellen spielen dabei ATP getriebene Protonenpumpen, die vakuolären ATPasen (v-ATPasen).

1.4.1. Aufbau

Die v-ATPasen sind aus zwei funktionellen Domänen zusammengesetzt. Eine ATP-hydrolysierende Einheit (V_1), welche die Energie für die Rotation der v-ATPase erzeugt und eine membrangebundene Protonen-transportierende Einheit (V_0) (Abbildung 4). V_1 ist aufgebaut aus einem Hexamer aus drei A- und drei B-Untereinheiten mit drei peripheren Stäben aus E, G, H und C-Einheiten. Die D-Untereinheit wird ebenfalls in V_1 eingeschlossen und stellt die zentrale Achse der v-ATPase dar. V_0 ist zusammengesetzt aus einem Proteolipid-Ring von 10 c-Einheiten und einer a-, d-, e-, ap1- und ap2-Einheit³⁷.

Die a-Untereinheit bildet zusammen mit den peripheren Stäben und der D-Untereinheit die Verbindung zwischen V_1 und V_0 ³⁸. Weiterhin enthält die a-Untereinheit zwei Hemi-Kanäle für den H^+ -Transport, in der sich auf der luminalen Seite ein Arginin-Rest befindetet, welcher für die Protonentranslokation verantwortlich ist³⁹ (R735 in *S. cerevisiae*; R741 für a1- und R755 für die a2-Isoform in Mensch und Maus). Die V_0 -Domäne ist eingebettet in die Membran der Organellen und verantwortlich für die Lokalisation der v-ATPase.

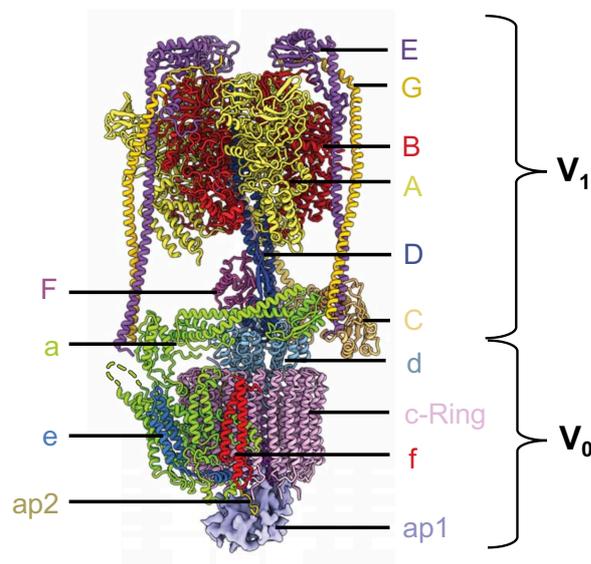


Abbildung 4: Die Zusammensetzung der v-ATPase aus zwei funktionalen Einheiten, der V_1 - und V_0 -Domäne. V_1 erzeugt Energie durch die Hydrolyse von ATP, wodurch eine Rotation von V_0 ermöglicht wird. Durch die Rotation von V_0 werden H^+ -Ionen durch eine Membran transportiert. Abbildung aus Abbas, Y. et al. (2020)³⁷, modifiziert.

1.4.2. Protonen-Transport der v-ATPase

Der Protonentransport funktioniert über einen Rotationsmechanismus⁴⁰ und beginnt mit der Rekrutierung von H⁺ in die zytoplasmatische Seite des Hemi-Kanals der a-Einheit (Abbildung 5B). Dort wird zu dessen Neutralisierung ein Glutamin-Rest des c-Rings protoniert. Die Rotation des c-Rings, inklusive der Einheiten d, D und F, wird durch die ATP-Hydrolyse der A- und B-Einheiten erleichtert. Diese bleiben zur Position der a-Untereinheit starr. Folgend der Rotation des c-Rings erreichen die protonierten Glutamin-Reste die luminal Seite des H⁺-Kanals von a. Dabei interagiert R741 (oder R755) der a-Einheit mit dem Glutamin-Rest des c-Rings, wodurch H⁺ in die luminal Seite des Hemi-Kanals der a-Untereinheit entlassen wird³⁸.

1.4.3. Regulation der v-ATPase

Die Aktivität der v-ATPasen ist äußerst exakt über der Dissoziation von V₁ und V₀ geregelt. Dabei ist ein Hauptregulator der v-ATPase die Verfügbarkeit von Glukose⁴¹. Die Aldolase verknüpft dabei die v-ATPase mit der Glykolyse^{42,43}. Zusätzlich hängt die Aktivität der v-ATPase von der Cholesterin-Konzentration oder der Fluidität in der Membran ab⁴⁴. Weiterhin beeinflusst die Konzentration von Aminosäuren die Assemblierung von V₁ und V₀ in den Lysosomen. Hierdurch wird der v-ATPase eine Rolle als Aminosäure-Sensor zuteil⁴⁵.

1.4.4. Die v-ATPase als Regulator

Dass die v-ATPase auch als Regulator fungiert, zeigt eine Notwendigkeit der assemblierten v-ATPase für die Aktivierung des mTORC1-Komplexes über die *AMP-activated protein kinase* (AMPK) bei einem hohen zellulären Energielevel⁴⁶. Neben dem Protonentransport steuert die v-ATPase den endosomalen Transport. Dies geschieht durch eine pH-Wert abhängige Rekrutierung des *Guanine nucleotide exchange factor* (GEF) *ADP-ribosylation factor nucleotide site opener* (ARNO) zur a2-Isoform (ATP6V0A2). Zusätzlich wird Arf6 zu den c-Einheiten rekrutiert⁴⁷. Somit fungiert die v-ATPase als pH-Sensor in frühen Endosomen.

1.4.5. Die verschiedenen a-Isoformen

Die v-ATPase wurde in der Membran vom Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen und in der Plasmamembran detektiert^{48,49}. Für diese Unterschiede in der molekularen Lokalisation ist deren a-Untereinheit in der V₀-Domaine verantwortlich. In Mensch und Maus existieren vier Isoformen des Proteins ATP6V0A1, ATP6V0A2, ATP6V0A3 (TCIRG1) und ATP6V0A4. Von diesen Isoformen zeigen ATP6V0A1 und ATP6V0A4 die höchste Identität mit 61 %^{50,51}. Die vier Isoformen werden von vier unterschiedlichen Genen exprimiert. Dies führt zu gewebsspezifischen Expressionsmustern und ermöglicht außerdem verschiedene Funktionen der v-ATPase. Selbst die Lokalisation der einzelnen Isoformen scheint vom Zelltyp abhängig zu sein. Zum Beispiel lokalisiert ATP6V0A1 in Neuronen vorwiegend in synaptischen Vesikeln und in der Plasmamembran⁵² und wiederum in Osteoklasten im Golgi-Apparat⁴⁸. Die Lokalisation von ATP6V0A2 gestaltet sich als sehr divers im endosomalen Transportweg. In

Osteoklasten, Fibroblasten und Hela-Zellen befindet sich ATP6V0A2 im Golgi-Apparat^{20,48,53}, in Epithelzellen des proximalen Tubulus in frühen Endosomen⁴⁷ und in Spermien im Akrosom⁵⁴, ein den Lysosomen verwandtes Organell. Hingegen lokalisiert ATP6V0A3 in Organellen, in denen ein niedriger pH-Wert erforderlich ist, wie den Lysosomen und der Lakune von Osteoklasten⁵⁵. ATP6V0A4 wird spezifisch in Niere und Innenohr exprimiert und es konnte eine Lokalisation innerhalb der Plasmamembran in Typ A interkalierenden Zellen der Niere nachgewiesen werden⁵⁶.

Die Struktur der a-Untereinheit wurde durch Analysen von *S. cerevisiae* aufgeklärt. *S. cerevisiae* besitzt allerdings nur zwei Isoformen, welche im Golgi-Apparat und der Vakuole lokalisieren⁵⁷. Durch die Übertragung der Kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen der *Thermus thermophilus* v/a-ATPase auf die Proteinsequenz von *S. cerevisiae* und der Ratte konnte gezeigt werden, dass die a-Untereinheit in Eukaryonten acht Membran-Helices aufweist^{37,58} (Abbildung 5A). Die Helices 7 und 8 bilden in diesem Modell die Hemi-Kanäle für den H⁺-Transport (Abbildung 5B). Zudem befinden sich der C- und der N-Terminus des Proteins in räumlicher Nähe auf der zytoplasmatischen Seite. Der N-Terminus verbindet die V₀-Domäne mit der G- und E-Untereinheit des Rotors⁵⁹. Durch diese Position kann der N-Terminus ebenfalls mit dem luminalen Hemi-Kanal interagieren und eine regulatorische Funktion während des H⁺-Transports ausüben. Außerdem verfügt der N-Terminus in *S. cerevisiae* und Säugetieren über eine hohe Sequenz-Varianz, wodurch Unterschiede in Proteininteraktionen und der Regulation möglich sind. Die Helices 2 und 3 stehen mit der c-Untereinheit in Kontakt⁵⁸. Die Aminosäure R735, R741 oder R755 befindet sich in der Transmembrandomäne 7^{37,58,60}.

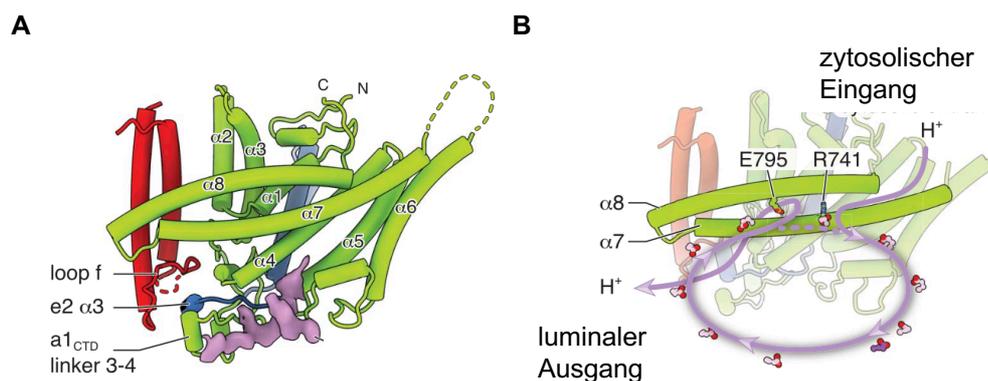


Abbildung 5: Modell der a-Untereinheit in der v-ATPase. (A) Räumliche Anordnung der acht Transmembranhelices. Der N- und C-Terminus ragen in die zytoplasmatische Seite der Membran. (B) Helices 7 und 8 bilden die Hemi-Kanäle für den H⁺-Transport und enthalten die Aminosäuren R741 und E795 für die a1-Isoform, welche wichtig sind für die H⁺-Translokation auf den Proteolipid-Ring der c-Einheiten (dargestellt in lila). Abbildungen aus Abbas, Y. et al. (2020)³⁷, modifiziert.

1.5. Der Golgi-Apparat und das Zisternen-Reifungsmodell

Der Golgi-Apparat ist eine Organelle in eukaryotischen Zellen und ist Teil des sekretorischen Wegs. Er dient der Modifikation und Verteilung neu synthetisierter Proteine und Lipide. Aufgebaut ist der Golgi-Apparat aus mehreren Stapeln, welche wiederum aus Golgi-Zisternen bestehen und membrangebundene Reaktionsräume darstellen. Die verschiedenen Stapel des Golgi-Apparats sind polarisiert und unterscheiden sich durch die enthaltenen Enzyme und des pH-Werts.

Bisher wurden verschiedene Modelle für den Transport innerhalb des Golgi-Apparats beschrieben^{61,62}. Kein einziges Modell kann alle Ergebnisse der Forschung erklären. Das Zisternen-Reifungsmodell ist das am meisten akzeptierte⁶³, deshalb wird der Transport innerhalb des Golgi-Apparats anhand dieses Modells beschrieben (Abbildung 6). Der anterograde Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Cis-Golgi-Apparat findet über *Coat protein complex* (COP) II beschichtete Vesikel statt⁶⁴. Diese Vesikel werden innerhalb der *Exit-Sites* vom ER mit Fracht beladen⁶⁵ und anschließend über Mikrotubuli⁶⁶ zum ER-Golgi *intermediate compartment* (ERGIC) transportiert⁶⁷. Dort löst sich die Beschichtung der Vesikel und diese fusionieren mit der Membran⁶⁸, wodurch die Fracht entlassen wird. Der Cis-Golgi-Apparat reift dynamisch zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Vom TGN wird die Fracht in sekretorische Vesikel oder Endosomen verpackt und anschließend zu ihrem Zielort transportiert. Die Enzyme für die posttranslationale Modifikation und die Lipide der Membranen werden mittels retrograden Transports über COPI umhüllte Vesikel zurücktransportiert und recycelt^{69,70}.

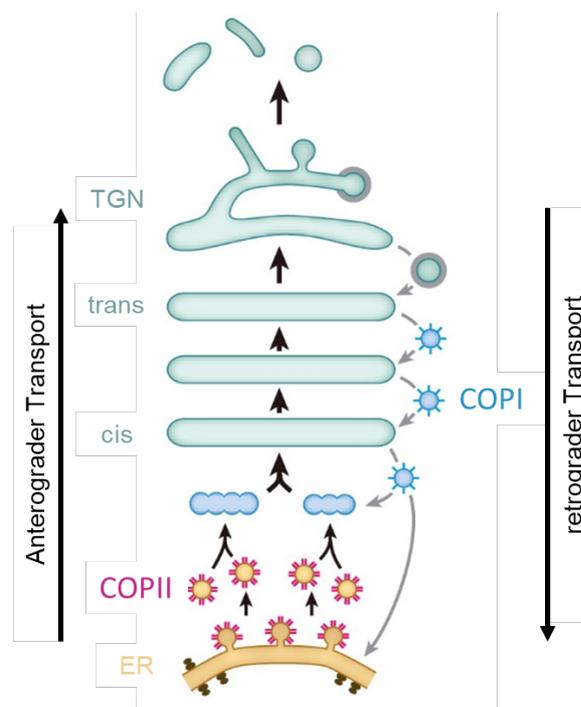


Abbildung 6: Transport durch den Golgi-Apparat, modifiziert von Glick et al. 2009⁶⁸.

1.6. Bildung und Transport von COPII- und COPI-Vesikeln

Ungeachtet des Transport-Modells erfolgt der Transport zum, von und innerhalb des Golgi-Apparats über Vesikel. Diese Vesikel müssen gebildet, von Membranen abgeschnürt werden und nach dem Transport erneut mit der Membran fusionieren. Dafür müssen die entstehenden Vesikel ihre Fracht erkennen. Die Markierung der Vesikel erfolgt über die COPI- und COPII-Hüllproteine (Abbildung 6).

1.6.1. COPII-Transport

COPII-Vesikel sind für den anterograden Transport verantwortlich⁶⁴. Die Bildung von COPII-Vesikeln beginnt mit der Assemblierung der inneren Hülle des COPII-Komplexes (Abbildung 7A). Dafür aktiviert der GEF SEC12 die GTPase *Secretion-Associated RAS-related 1* (SAR1) und es entsteht die GTP gebundene Form von SAR1⁷¹. SAR1 bildet über eine Interaktion mit SEC23 das Heterodimer SEC23-SEC24⁷². SEC23 stellt ein *GTPase-activating protein* (GAP) dar⁷³ und SEC24 fungiert als Adapter für die Fracht in dem es deren Signalsequenz erkennt⁷⁴. Im letzten Schritt bindet der SEC13-SEC31-Komplex und bildet die äußere Hülle durch eine Polymerisierung des SAR1-SEC23-SEC24-Fracht-Komplexes⁷⁵. Dieser Komplex wird vom ER abgeschnürt, die äußere Hülle von SEC13-SEC31 depolymerisiert und die COPII-Vesikel werden zum ERGIC transportiert. Dort findet eine Dephosphorylierung der Vesikel statt, welche mit der Membran fusionieren⁷⁶.

1.6.2. COPI-Transport

COPI-Vesikel erleichtern den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER und besitzen außerdem eine Funktion im endosomalen Transport. Die Bildung von COPI-Vesikel wird durch den Austausch eines GDP von ARF1 zu GTP durch einen im Golgi-Apparat lokalisierten GEF initialisiert⁷⁷ (Abbildung 7B). In der GTP gebundenen Form integriert ARF1 eine amphipatische Helix (myristoyliert, N-Terminal) in die Membran des Golgi-Apparats^{78,79}. Als „Block“ wird nun das Coatomer aus dem Zytosol rekrutiert, welches aus den Komplexen $\beta\delta/\gamma\zeta$ -COP und $\alpha\beta'\epsilon$ -COP besteht⁸⁰. Der $\alpha\beta'\epsilon$ -COP-Komplex bindet und erkennt die Fracht⁸¹. Dieses Gerüst rekrutiert Lipide und spaltet sich von der Membran ab. Auf welche Weise dies geschieht, ist bis heute unklar. Möglich wäre eine Konformationsänderung des Coatomers⁸². Nach der Abspaltung wird die Vesikelhülle entfernt. Welche Aufgabe ARF1 dabei übernimmt, ist unklar. Die Hydrolyse von GTP spielt allerdings scheinbar keine Rolle⁸³. Generell ist die Vesikelhülle nach der Abspaltung von der Membran überflüssig und meistens ist die Entfernung der Hülle notwendig für die Fusion mit der Zielmembran, da sonst der Zugang zu den Fusionsproteinen nicht gewährleistet ist⁸⁴. Der Vesikeltransport ist beendet, wenn die Vesikel das Zielorganell erreicht haben und mit der Membran fusionieren. Hierbei unterstützt das *Tethering* (Einfangen/ Anbinden) diesen letzten Schritt. Dies kann durch verschiedene *Tethering*-Faktoren wie Rab-GTPasen oder *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor*

attachment receptors (SNAREs) erfolgen oder durch die Bindung anderer Komplexe an der Hülle, wie den *Conserved oligomeric Golgi* (COG)-Komplex^{85,86}.

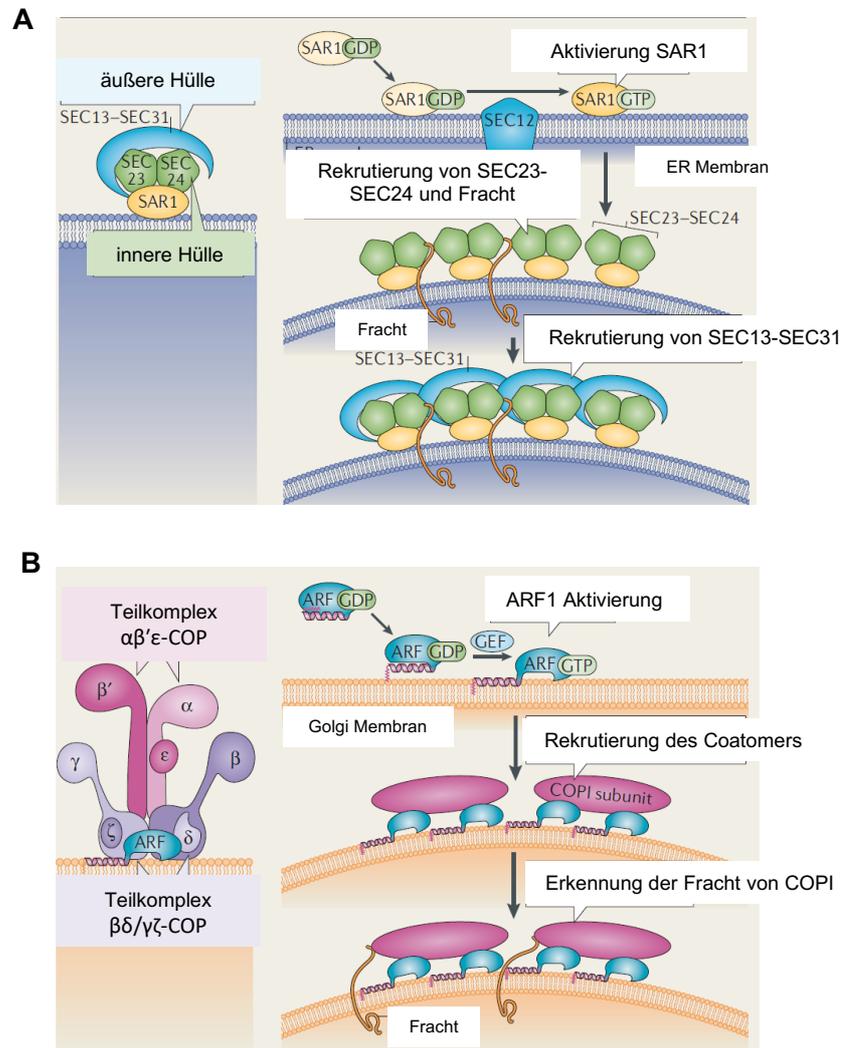


Abbildung 7: Bildung der COPII- (A) und COPI-Vesikel (B). Abbildung übersetzt von Brandizzi et al. (2013)⁸⁷.

1.7. Regulation der Ionen-Homöostase und des pH-Werts des Golgi-Apparats

Die Ansäuerung des Golgi-Apparats entsteht hauptsächlich durch den Transport von H^+ -Ionen durch die v-ATPase. Ebenso bedeutend für den pH-Wert ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Ionen-Transporter, wodurch ein Ionen-Gleichgewicht von H^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mn^{2+} und K^+ und somit eine Homöostase dieser Ionen entsteht (Abbildung 8). Zusätzlich entsteht durch den Austausch von Vesikeln ein pH-Gradient von 6,7 im Cis-Golgi-Apparat bis 6,2 im Trans-Golgi-Apparat⁸⁸⁻⁹⁰. Diese Ionen-Homöostase ist wichtig für die Glykosylierung, den Vesikeltransport und die Sortierung der Proteine⁹¹.

Die Ansäuerung des Golgi-Apparats wird angetrieben über die v-ATPase, durch den Transport von H^+ -Ionen. Dadurch erhöht sich das Membranpotential im Inneren der Membran, welches durch Cl^- -Ionen ausgeglichen wird. Dafür transportiert der Golgi pH Regulator (GPHR) Cl^- -Ionen ins Innere des Golgi-Apparats⁹². Ein weiterer Chloridkanal, welcher allerdings eine untergeordnete Rolle im Golgi-Apparat einnimmt, ist CIC-3B⁹³. Zusätzlich gelangen K^+ -Ionen durch die passive Diffusion oder einem unbekanntem Ionen-Kanal durch die Golgi-Membran und werden durch einen Na^+/K^+ -Ionen-Transporter wieder nach außen transportiert⁹⁴. Die Na^+ -Ionen werden anschließend vom Na^+/H^+ -exchanger (NHE) 7 für eine leichte Ansäuerung des Golgi-Lumens verwendet⁹⁵. Kürzlich wurde entdeckt, dass Mutationen in dem Mn^{2+} -Transporter TMEM165 zu einem CDG führen⁹⁶. Dies zeigt den Einfluss der Ionen-Homöostase auf die Glykosylierung und möglicherweise einen Einfluss von Mn^{2+} auf den pH-Wert des Golgi-Apparats.

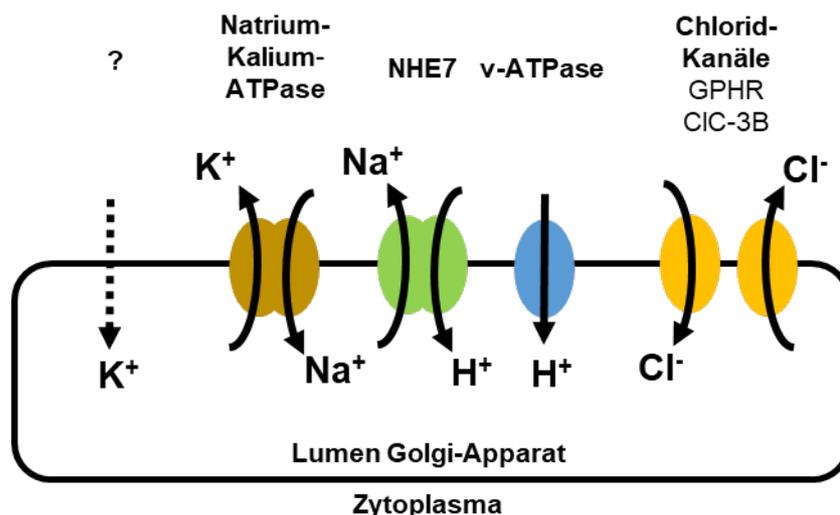


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung zur Regulation der Ionen-Homöostase im Golgi-Apparat.

1.8. Glykosylierung

Allgemein wird als Glykosylierung die Modifikation von Proteinen und Lipiden mit verschiedenen Zuckern bezeichnet. Abhängig von der modifizierten Aminosäure wird diese weiter in N- oder O-Glykosylierung unterteilt (Abbildung 9).

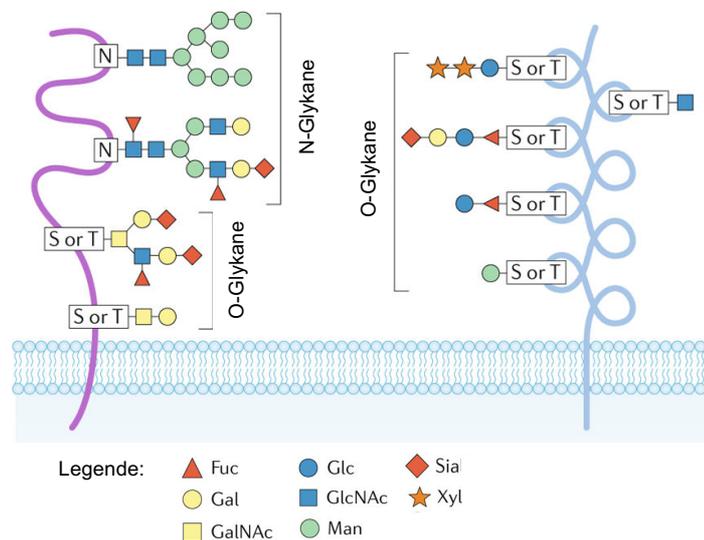


Abbildung 9: Typen von Protein-Glykanen. Die Glykane sind kovalent auf die Proteine übertragen und werden abhängig von der modifizierten Aminosäure als N-Glykane (Asparagin) oder O-Glykane (OH-Gruppe von Serin, Threonin, Hydroxylysin) bezeichnet. Abbildung von Reily, C. et al. (2019)⁹⁷, modifiziert.

1.8.1. N-Glykosylierung

Die Asparagin (Asn,N)-verknüpfte Glykosylierung ist kritisch für eine Vielzahl von intrazellulären und extrazellulären Prozessen⁹⁷. Der Prozess der N-Glykosylierung startet auf der zytosolischen Seite des ER mit dem Transfer nukleotid-aktivierter N-Acetylglucosamine (GlcNAc) und Mannose (Man)-Reste auf den Lipidtransporter Dolichol-Phosphat bis das Zwischenprodukt Dolichol-Phosphat-GlcNAc₂Man₅ entsteht⁹⁸. Als Nächstes wird dieses Zwischenprodukt gedreht, wodurch die Zuckerreste der luminalen Seite des ER zugewandt sind⁹⁹. Den Zuckerketten werden weitere Man- und Glucose (Glc)-Reste durch verschiedene Mannosyl- und Glucosyltransferasen hinzugefügt¹⁰⁰. Der entstandene Zuckerbaum GlcNAc₂Man₉Glc₃ wird über das Enzym Oligosaccharyltransferase (OST) auf das entstehende Glykoprotein transferiert¹⁰¹ (Abbildung 10). Bei der N-Glykosylierung ist die Signalsequenz Asn-X-Ser/Thr entscheidend (X darf jede Aminosäure außer Prolin sein) für das Erkennen des Asn und den Transfer des Zuckerbaums auf die Seitenkette von Asn¹⁰². Nach dem Transfer werden drei Glc und ein Man-Rest wieder entfernt¹⁰³. Dieser Prozess ist wichtig für die Qualitätskontrolle und Faltung von Proteinen. Die Glykoproteine werden über COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert. Im Cis-Golgi-Apparat werden weitere Man-Reste abgespalten und durch GlcNAc ersetzt. Bevor die Glykoproteine zu ihrem Zielort transportiert

werden, wird an die Zuckerbäume im Trans-Golgi-Apparat noch Galaktose (Gal) und Sialinsäure (Sia) angehängen^{104,105}.

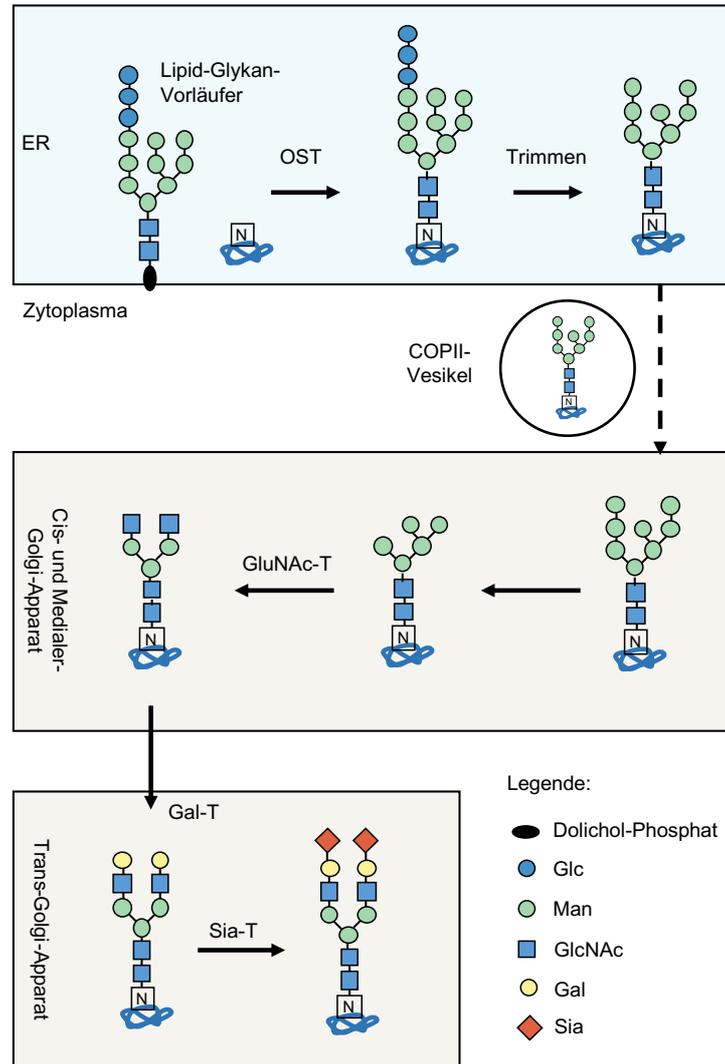


Abbildung 10: Biosynthese der N-Glykane. Die OST transferiert das Vorläufer-Glykan vom Dolichol-Phosphat auf das entstehende Protein. Glc und Man wird von den Glucosidasen und Mannosidasen entfernt und das Glykoprotein über COPII-Vesikel zum ERGIC transportiert. Im Cis-Golgi-Apparat werden weitere Man entfernt und während der Reifung der Golgi-Stapel weitere Zuckermoleküle durch die GluNAc-, Gal-, und Sia-Transferasen übertragen.

1.8.2. O-Glykosylierung

Die O-Glykosylierung ist ein weitaus komplexerer Prozess als die N-Glykosylierung. Im Menschen sind sieben verschiedene Typen von O-Glykanen bekannt, diese werden nach dem Typ des ersten Zuckers klassifiziert, welcher mit der Aminosäure verknüpft wird¹⁰⁶. Die häufigsten sind die Mucin-typ O-Glykane, welche mit GalNAc beginnen und bei extrazellulären und sekretierten Proteinen vorkommen. Weniger häufig, allerdings sehr wichtig für die Entwicklung des Gehirns, sind die O-Mannosyl-Glykane. Am besten charakterisiert davon ist die Glykosylierung von α -Dystroglycan (α -DAG1) durch die Erforschung einer seltenen Gruppe von Erbkrankheiten, den Dystroglykanopathien³² (Abbildung 11). Es sind drei Kernstrukturen der Glykosylierung von α -DAG1 nachgewiesen: M1, M2 und M3. Nach dem Transfer von Man

auf Dolichol-Phosphat beginnt die Biosynthese im ER mit dem Transfer von Man auf die funktionelle OH-Gruppe der Aminosäuren Serin und Threonin von α -DAG1 durch zwei Protein-O-Mannosyltransferasen (POMT1, POMT2)¹⁰⁷. Die Synthese der Kernstruktur M1 wird im Golgi-Apparat durch die Addition von GlcNAc durch das Enzym β -1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGNT1) begonnen¹⁰⁸. Der Kern M2 wird gebildet durch die Enzyme POMGNT1 und β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase IX¹⁰⁹. Anschließend werden an die M1- und M2-Kerne weitere Zuckerreste angehängen. Die Kernstruktur M3 wird im ER gebildet und ist besonders wichtig für die Bindung von α -DAG1 an Laminin. POMGNT2 verlinkt GlcNAc auf den Man-Rest¹¹⁰ und addiert die β -1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase 2 (B3GALNT2) GalNAc¹¹¹. Anschließend wird Man von M3 von der Protein O-Mannose-Kinase (POMK) phosphoryliert¹¹². Die Enzyme Fukutin (FKTN) und *Fukutin related protein* (FKRP) ¹¹⁰transferieren je ein Ribitol-Phosphat¹¹³. In den nächsten beiden Schritten transferieren je Ribitol-5-phosphat-Xylosyltransferase 1 (TMEM5) den ersten Xylose (Xyl)-Rest¹¹⁴ und die β -1,4-Glucuronyltransferase (B4GAT1) den ersten Glucuronat (GlcA)-Rest¹¹⁵ auf den Kern M3. Am Ende verbindet die bifunktionale Glykosyltransferase *Like-Acetylglucosaminyltransferase* (LARGE) eine Verbindung aus einer wiederholenden Xyl und GlcA zwischen α -DAG1 und Laminin¹¹⁶.

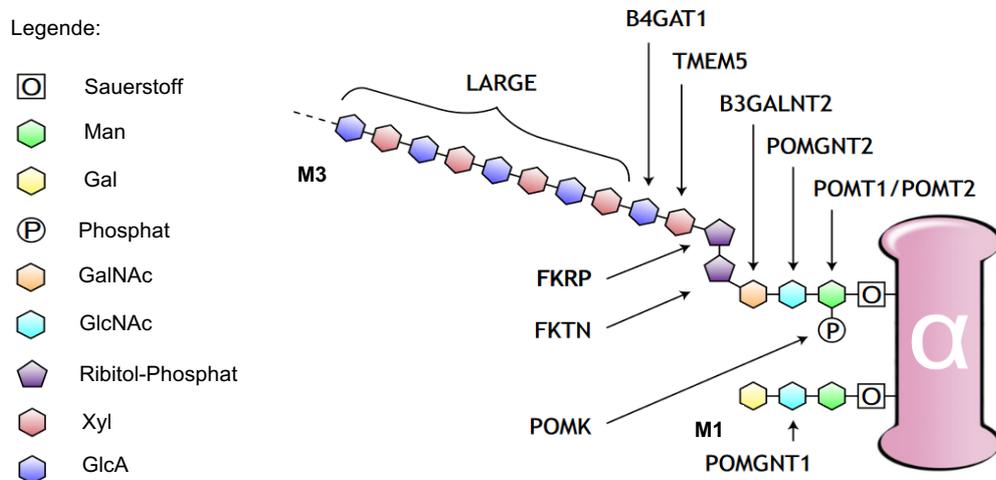


Abbildung 11: O-Glykosylierung von α -DAG1. Für die Biosynthese der Kernstruktur M3 sind mehrere Glykosyltransferasen verantwortlich (siehe Text). M3 ist essentiell für die Bindung zum Laminin. Abbildung von Nickolls, A. (2018)³², modifiziert.

1.9. Das endosomale Transport-System

Als Endozytose wird ein Prozess bezeichnet, bei dem Flüssigkeiten, gelöste Stoffe, Makromoleküle, Plasmamembranbestandteile und andere Partikel durch die Einstülpung der Plasmamembran aufgenommen werden. Zu diesem Prozess zählt auch die Bildung von Vesikeln durch Membranspaltung und deren Transport zu verschiedenen Zielorganellen¹¹⁷.

1.9.1. Clathrin vermittelte Endozytose

Sowohl für die Aufnahme von außen als auch die Sortierung der Fracht im intrazellulären Transport übernimmt die Clathrin vermittelte Endozytose (*clathrin coated endocytosis*, CCE) eine Hauptaufgabe¹¹⁸⁻¹²⁰ (Abbildung 12). Nach der Initiation durch die Aufnahme eines Rezeptors durch dessen Fracht werden verschiedene Proteine aus dem Zytoplasma rekrutiert und die Plasmaregion von Clathrin umhüllt (Formation der *Clathrin-coated Vesikels*)¹²¹. Währenddessen wird die Fracht von spezifischen Adapter-Molekülen und dem *Adapter protein 2* (AP-2) umgeben, welches die Fracht mit der Clathrin-Hülle verbindet¹²². Vermutlich werden die Vesikel über ein Aktin-Gerüst verlängert^{123,124} und anschließend mittels eines Rings aus Dynamin abgeschnürt¹²⁵. Im letzten Schritt wird die Clathrin-Hülle entfernt und die frühen endozytischen Vesikel fusionieren zu den frühen Endosomen¹²⁶

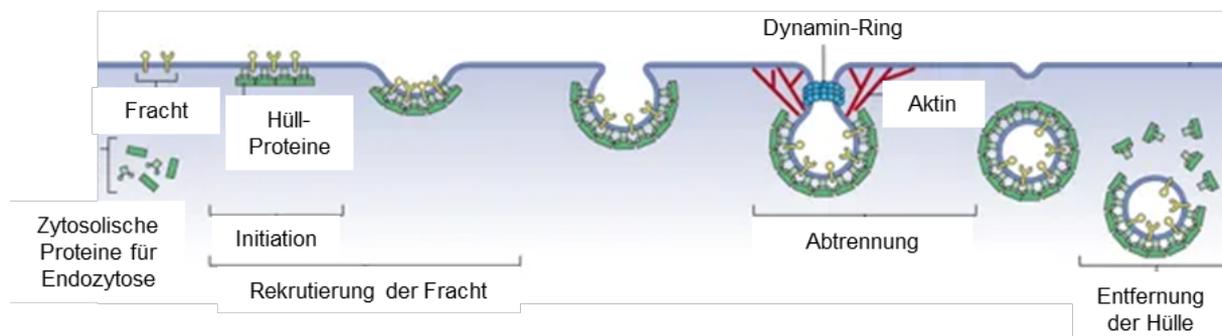


Abbildung 12: Die Abschnitte der Clathrin vermittelten Endozytose. Nach der Initiation wird die Fracht von Rezeptoren rekrutiert und von Clathrin und Adaptermolekülen umhüllt. Anschließend werden die *Clathrin-coated Vesikels* mittels eines Dynamin-Rings und Aktin-Gerüsts von der Membran abgetrennt. Nach der Entfernung der Hülle fusionieren die Vesikel mit den frühen Endosomen. Abbildung aus Kaksonen et al. (2018)¹¹⁹, modifiziert.

1.9.2. Endosomen Biogenese

Entlang des degradativen Weges der Zellen reifen die frühen Endosomen zu späten Endosomen und fusionieren später mit den Lysosomen (Abbildung 13A). Diese Reifung wird durch die Hauptregulatoren gesteuert, den GTPasen RAB5 und RAB7. Initiiert wird die Reifung der frühen Endosomen von RAB5 durch den Austausch von GDP zu GTP¹²⁷. RAB5-GTP und dessen Effektor-Komplex aus *Vacuolar protein sorting protein* (VPS) 34 /p150 generieren Phosphoinositide (PI)3P, welche für die Identität der Endosomen wichtig sind¹²⁸. Während der Reifung zu den späten Endosomen wird RAB7 durch eine Signalkaskade durch RAB5 aktiviert, welches anschließend wiederum durch RAB7 ersetzt wird¹²⁹. RAB7 interagiert mit dem *homotypic fusion and protein sorting* (HOPS)-Komplex¹³⁰. Der HOPS-Komplex ist zusammen

mit dem Core vacuole/ endosome tethering- (CORVET)- Komplex (Interaktion mit RAB5) verantwortlich für das Tethering der frühen und späten Endosomen^{130,131}. Dabei handelt es sich um zwei hexamerische Tethering-Komplexe, welche sich durch zwei VPS-Proteine unterscheiden¹³² (Abbildung 13B). Während der Reifung von frühen Endosomen zu den Lysosomen sinkt der pH-Wert in diesen Vesikeln stark, von 6,2 (frühe Endosomen) bis zu 5,2 (Lysosomen)¹³³. Im sauren Milieu sind die lysosomalen Verdauungsenzyme aktiv und degradieren die Fracht¹³⁴.

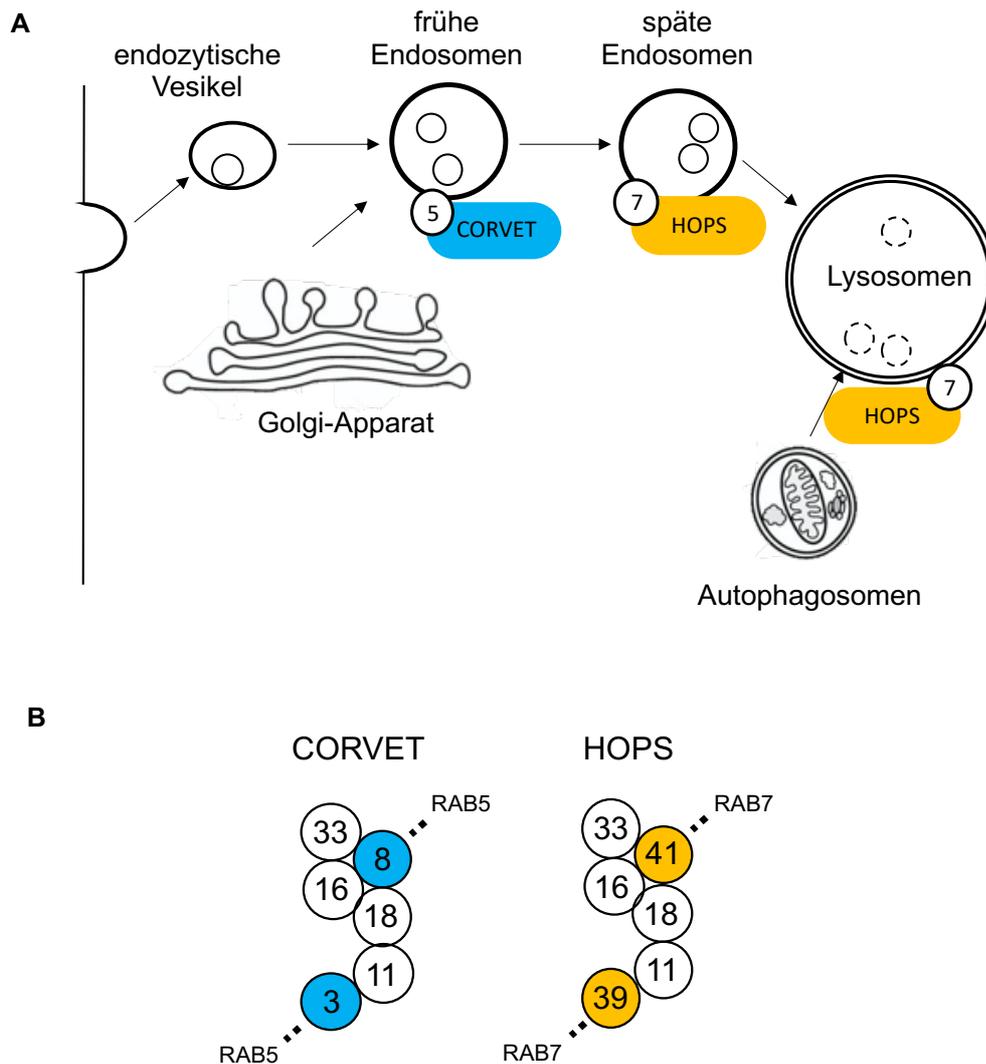


Abbildung 13: Die Funktion von CORVET und HOPS im degradativen Weg. (A) Die endozytischen Vesikel fusionieren zu den frühen Endosomen. Anschließend unterstützt CORVET/Rab5 die Endosomen-Fusion. In den späten Endosomen wird Rab5 durch Rab7 und HOPS ersetzt, welche die Fusion mit dem Lysosomen unterstützen. Außerdem unterstützt HOPS die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen. (B) Der Aufbau von CORVET und HOPS besteht aus einem Gerüst von VPS11, VPS16, VPS18 und VPS33, welche sich nur durch die Proteine VPS3/VPS8 und VPS39/VPS41 unterscheiden.

1.10. Spermienentwicklung

Spermien sind die männlichen Gameten, welche mit der Vereinigung der Oozyte zu dessen Befruchtung führt. Dabei handelt es sich um bewegliche Zellen, welche ein Flagellum und einen haploiden Chromosomensatz besitzen¹³⁵. Die Entwicklung der Spermien findet in den Tubuli seminiferi der Hoden statt. Dabei sind die Spermiovorläuferzellen von den Sertoli-Zellen umgeben, welche die Mikroumgebung für die Entwicklung generieren¹³⁶. Die Entwicklung der Spermien kann in drei Phasen eingeteilt werden. Der Mitose, in der die spermatogonalen Stammzellen sich teilen und selbst erneuern. Ein Teil der spermatogonalen Stammzellen differenziert zu B-Spermatogonien, welche durch die Meiose haploide Spermatiden formen. Die Spermatiden durchlaufen die Spermatogenese (Abbildung 14), in der diese sich zu reifen Spermien entwickeln und dabei das Akrosom, das Flagellum (Axoneme) und die Manschette ausbilden¹³⁶. Zusätzlich kondensiert der Zellkern, die Histone werden durch Protamine ersetzt¹³⁷ und überschüssiges Zytoplasma wird entfernt.

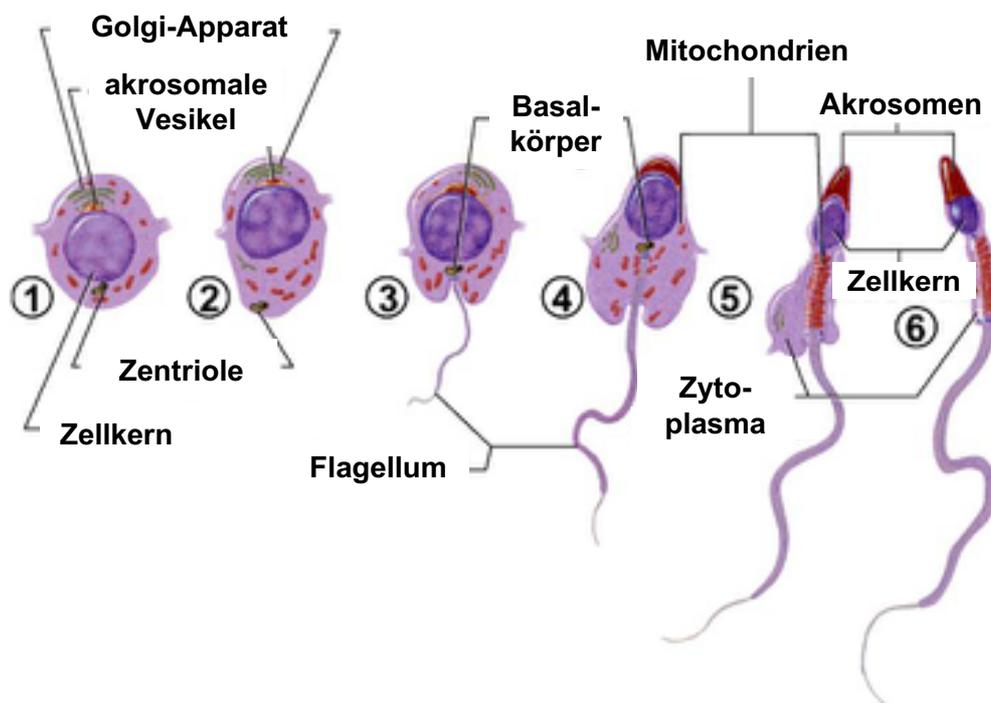


Abbildung 14: Spermatogenese. Die proakrosomalen Vesikel werden vom Trans-Golgi-Apparat abgeschnürt, zum Zellkern transportiert und fusionieren zum Proakrosom. Die Zentriole wandert zur gegenüberliegenden Seite des Proakrosoms. Die Entwicklung des Flagellums beginnt (1-3. Golgi-Phase). Das Proakrosom streckt sich über den Zellkern (4. Kappenphase). Das Akrosom wird schmaler, der Zellkern kondensiert, die Mitochondrien ordnen sich am Mittelstück an und überschüssiges Cytoplasma wird entfernt. (5. Akrosomphase). In der letzten Phase ist das Akrosom und der Zellkern kondensiert und das Flagellum vollständig ausgebildet (6. Reifungsphase). Abbildung von Wade, D.¹³⁸, übersetzt.

1.10.1. Akrosomenbiogenese

Das Akrosom enthält die lytischen Enzyme, welche erforderlich sind, um in die Zona pellucida der Oozyte zu durchdringen. Während der Golgi-Phase werden die proakrosomalen Vesikel

initial vom Trans-Golgi-Apparat abgeschnürt und zum Zellerkern transportiert (Abbildung 15). Dort fusionieren diese Vesikel zu einer Vorstufe des Akrosoms in einem subakrosomalen Raum an das Akroplaxom, einem Zytoskelettring aus F-Aktin und Keratin¹³⁹. Während der Golgi-Phase wird das Proakrosom größer und legt sich wie eine Kappe über den Zellkern (Kappenphase). In der Akrosomphase beginnt der Zellkern zu kondensieren um das Akrosom wird schmaler. In der Reifungsphase ist der Zellkern kondensiert und das Akrosom vollständig ausgebildet¹⁴⁰. Mehrere Proteine sind bekannt, durch deren Funktionsverlust die Vesikelfusion (Hrb¹⁴¹, Vps54¹⁴²), oder der Vesikeltransport (Gopc¹⁴³, Pick1¹⁴⁴) beeinflusst und dadurch die Entwicklung des Akrosoms beeinträchtigt wird.

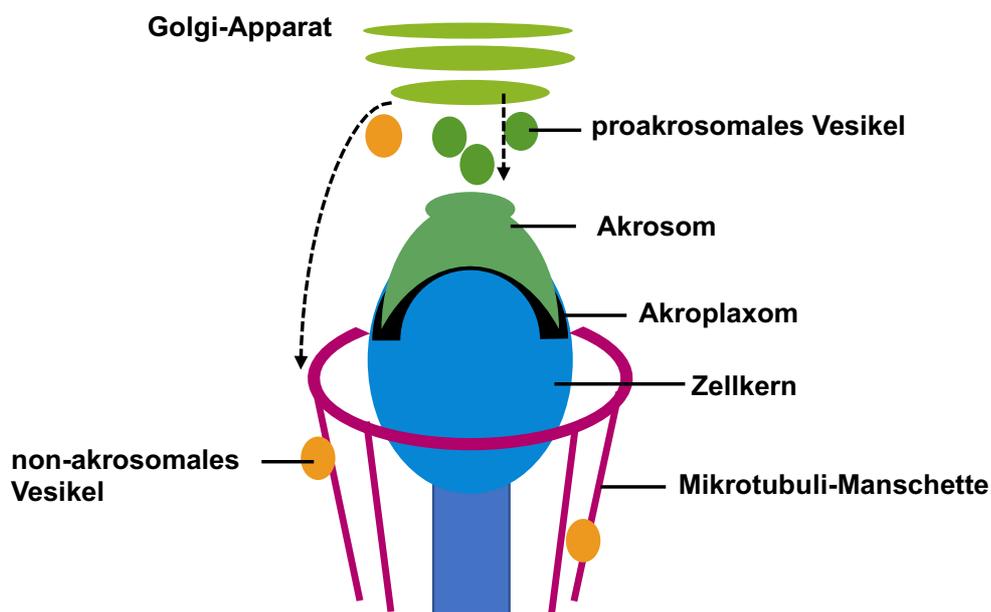


Abbildung 15: Biogenese des Akrosoms und des Flagellums. Proakrosomale Vesikel werden vom Trans-Golgi-Apparat abgeschnürt und fusionieren am Akroplaxom zum Akrosom. Es bildet sich temporär eine Mikrotubuli-Manschette. Über diese Manschette werden die non-akrosomalen Vesikel ebenfalls vom Trans-Golgi-Apparat abgeschnürt, hin zur Zentriole transportiert und bilden das Flagellum.

1.10.2. Entwicklung der Manschette und des Flagellums

Nach dem Start der Akrosomenbiogenese beginnt die Assemblierung der Manschette aus den Mikrotubuli. Diese Manschette wird nur temporär gebildet und deassembliert nach der Kondensation des Zellkerns. Sie ist allerdings wichtig für die Bildung des Flagellums. Außer den proakrosomalen Vesikeln werden zusätzlich non-akrosomale Vesikel mit den Bestandteilen des Flagellums vom Trans-Golgi-Apparat abgeschnürt. Diese Vesikel werden über das „Manschetten-Zytoskelett“ zur Zentriole transportiert, wo die Bildung des Flagellums beginnt. Die Manschette ist über das Akroplaxom mit dem Akrosom verbunden¹³⁹. Dies erklärt, warum Defekte in der Manschette, sowie Fehlbildungen des Akrosoms zu einer Beeinträchtigung der Spermien-Motilität und Unfruchtbarkeit führen.

1.11. Zielstellung

ARCL2A-Patienten weisen neben einer faltigen Haut eine Pflasterstein-Lissenzephalie und Krampfanfälle auf. Ursache sind Mutationen in *ATP6V0A2*, dass für die $\alpha 2$ Untereinheit des V_0 -Sektors der v-ATPase kodiert. Durch die vielfältigen Funktionen der v-ATPase ist wenig darüber bekannt auf welche Weise diese Mutationen zur Fehlentwicklung des Gehirns und der Haut führen.

Die v-ATPase ist verantwortlich für die Ansäuerung von Organellen und erfüllt darüber hinaus über Proteininteraktionen regulatorische Funktionen hinsichtlich Vesikeltransport und der Aktivierung des mTORC1-Komplexes. Als Teil der v-ATPase navigiert $\alpha 2$ diese zum Golgi-Apparat oder zu den frühen Endosomen. Damit könnte eine defekte Ansäuerung des Trans-Golgi-Apparats, der frühen Endosomen, ein CDG oder eine Deregulation des endosomalen Transports für die Phänotypen der ARCL2A-Patienten ursächlich sein.

Molekularbiologische Analysen von Fibroblasten und Hela-Zellen mit *ATP6V0A2*-Defizienz wurden durchgeführt, können jedoch nur bedingt auf andere Zelltypen übertragen werden, oder die Auswirkungen auf Organe oder den Organismus darstellen.

Aus diesen Gründen wurden in dieser Dissertation zwei ARCL2A-Mausmodelle charakterisiert. Bei einem Mausmodell handelt es sich um ein patientennahes Modell mit einem *Knockout* in *Atp6v0a2* (*Atp6v0a2^{-/-}*). Bei diesem Mausmodell kann die *Atp6v0a2*-v-ATPase nicht gebildet werden. Zusätzlich wurde ein *Knockin*-Mausmodell charakterisiert, bei dem in *Atp6v0a2* die Aminosäure Arginin (R) 755 durch ein Glutamin (Q) ersetzt wurde (*Atp6v0a2^{RQ/RQ}*). In diesem Mausmodell wird die *Atp6v0a2^{RQ}*-v-ATPase gebildet, welche für Proteininteraktionen zur Verfügung steht. Dennoch kann durch die RQ-Mutation *Atp6v0a2* nicht mit den c-Untereinheiten der v-ATPase interagieren, wodurch kein Protontransport stattfindet. Durch den Vergleich der Mausmodelle soll zwischen den Aufgaben der *Atp6v0a2*-v-ATPase - dem Protonentransport versus Vesikeltransport - hinsichtlich deren Einfluss auf den Pathomechanismus unterschieden werden.

Darüber hinaus soll in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf die Aufklärung des Gehirnphänotyps gelegt werden, da dieser neurologische Defekt bei den Patienten zu Krampfanfällen führt und keine Möglichkeiten zur Therapie zur Verfügung stehen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 2: In dieser Dissertation verwendete Geräte für die Histologie, Mikroskopie, *Immunoblotting* und Spermienanalyse.

Gerät	Hersteller
TP 1020 Gewebeprozessierung	Leica (Wetzlar)
Einbettstation EC350	Microm (Walldorf)
Microtom HM35 S	Microm (Walldorf)
Cryostat CM3050S	Leica (Wetzlar)
Mikroskop BX60	Olympus (Hamburg)
Mikroskop LSM700	Zeiss (Jena)
CellDiscoverer 7	Zeiss (Jena)
Operetta High Content Imaging System	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Axio Examiner.A1	Zeiss (Jena)
Mini-Protean 3 System	BioRad (Hercules, USA)
Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab (Erlangen)
Western Blot Imaging System Odyssey Fc	LI-COR (Lincoln, USA)
Spermien-Analysegerät Hamilton Thorne	Hamilton Thorne (Beverly, USA)

2.1.2. Chemikalien

Allgemeine Chemikalien, die in den folgenden Tabellen nicht aufgeführt sind, wurden diese bei Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder J.T.Baker (Phillipsburg, USA) bestellt.

2.1.2.1. Genotypisierung

Tabelle 3: Chemikalien für die Genotypisierung.

Chemikalie	Hersteller
5x FIREPol Master Mix (12,5 mM MgCl ₂)	Solis Biodyne (Tartu, Estland)
GeneRuler Mix	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Agarose, Ultra-Qualität	Carl Roth (Karlsruhe)

Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer für die Genotypisierung.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA
Neutralisationspuffer	40 mM TrisHCl
6x Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin
50x Laufpuffer (TAE)	2 M TRIS, 50 mM EDTA, 1 M Essigsäure, pH 8

Tabelle 5: Genotypisierungsprimer

Primer	Sequenz
Atp6v0a2_i14F	TGACCGCCTCTTCTCATGAG
loxp1_R	TGGAAGTGGAGCCATCGC
Atp6v0a2_i17R	GCAGATCCGAGGCGTAAATC

Die Primer der Genotypisierung wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg) produziert.

2.1.2.2. Histologie und Färbungen

Tabelle 6: Chemikalien für die Histologie und Färbungen.

Chemikalien	Hersteller
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tissue-Tek O.C.T	Sakura (Ōsaka, Japan)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck Millipore (Darmstadt)
Pepsin Antigen-Retiver	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Saponin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Entellan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fluoromount-G	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Kresylviolett	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mayers Hämalaunlösung	Merck Millipore (Darmstadt)
Eosin G-Lösung	Merck Millipore (Darmstadt)
Human Tubal Fluid-Medium	Merck Millipore (Darmstadt)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Normal Donkey Serum	Abcam (Cambridge, England)
Normal Goat Serum	Abcam (Cambridge, England)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Filipin III	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.2.3. Zellkultur

Tabelle 7: Chemikalien für die Kultivierung primärer Mauszellen.

Chemikalie	Hersteller
DMEM 4,5 g D-Glucose ohne Pyruvat	Lonza (Basel, Schweiz)
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco/ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Ultra-Glutamin I	Lonza (Basel, Schweiz)
Penicillin-Streptomycin	Lonza (Basel, Schweiz)
DPBS (steril, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Gibco/ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Trypsin-EDTA	Gibco/ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloroquin Diphosphatsalz	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bafilomycin A1 (Baf)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tunicamycin-Lösung, 5 mg/mL	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Cholera Toxin B FITC-Konjugat (CTB-FITC)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.2.4. Metabolische Markierung mit ManNAz

Tabelle 8: Chemikalien für die metabolische Markierung mit ManNAz

Chemikalie	Hersteller
N-azidoacetylatedmannosamine-tetraacylated (ManNAz)	Jena Bioscience (Jena)
Natriumascorbat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
BTAA	Jena Bioscience (Jena)
Fluor 488-Alkyne (AzidoFluor 488)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.2.5. Immunoblotting

Tabelle 9: Chemikalien für das *Immunoblotting*

Chemikalien	Hersteller
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid, Bisacrylamid)	Carl Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sodiumdodysulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck Millipore (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
<i>Blocking buffer</i>	LI-COR (Lincoln, USA)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
<i>ECL Western Blotting-Substrat</i>	Pierce/ Thermo Fisher (Waltham, USA)
<i>WGA-Agarose-Beads</i>	Vector Labs (Burlingame, USA)

Tabelle 10: Puffer für das *Immunoblotting*

Puffer	Rezept
RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 1 % Triton X, 0,25 % Desoxycholsäure, 0,1 % SDS
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS, 0,4 % SDS, pH 8,8
Sammelgelpuffer	1,5 M TRIS, 0,4 % SDS pH 6,8
5x Ladepuffer	150 mM TRIS-HCl, 80 % Glycerol, 5 % SDS, 0,2 % Orange G, 10 % β -Mercaptoethanol
10x Transferpuffer	250 mM TRIS, 2 M Glycin
1x Transferpuffer	25 mM TRIS, 200 mM Glycin, 20 % Methanol
Laufpuffer	25 mM TRIS, 200 mM Glycin, 1 % SDS
10x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ add 1 L
Waschpuffer	0,1 % Tween oder 0,1 % NP-40 in 1x PBS

Die sekundären Antikörper mit Fluoreszenz-Signalen (680RD, 800CW) wurden von der Firma LI-COR (Lincoln, USA) und HRP markierte Antikörper von Thermo Fisher (Waltham, USA) bezogen. Die Lecitine wurden mit 800CW Streptavidin LI-COR (Lincoln, USA) detektiert.

2.1.2.6. Antikörper und Lektine

Tabelle 11: Primäre Antikörper mit den eingesetzten Verdünnungen für Immunfluoreszenz (IF), *Immunoblotting* (IB) und Immunhistochemie (IHC).

Antikörper	Verdünnungen				Produktnr.	Hersteller
	IF Gewebe	IF Zellen	IB	IHC		
Anti-Laminin	1:500	-	-	-	L9393	Sigma-Aldrich
Anti-IIH6 α -Dag1	1:200	-	1:500	-	05-593	Merck Millipore
Anit- α -Dag1	-	-	1:1000	-	ab242442	Abcam
Anti- β -Dag1	1:200	-	1:200	-	7D11	DSHB
Anti-Tbr2	1:500	-	-	-	AB15894	Merck Millipore
Anti-Ctip2	1:250	-	-	-	ab18465	Abcam
Anti-Gm130	1:500	1:800	-	-	610823	BD Biosciences
Anti-Giantin	-	1:800	-	-	924302	Biolegend
Anti-Gfap	1:500	-	-	-	G3893	Sigma-Aldrich
Anti-Tgn38	-	-	1:500	-	ab16059	Abcam
Anti-Grp56	-	-	1:500	-	MABN310	Merck Millipore
Anti-Col3a	-	-	1:500	-	C2C3	GeneTex
Anti-CtsD	-	-	1:500	-	ab75852	Abcam
Lamp1	1:500	1:500	-	-	ab24170	Abcam
Lamp2	-	-	1:100	-	ABL-93	DSHB
Anti-LC3A/B	-	-	-	1:1000	4108	Cell signaling
Anti-Eln	-	-	1:500	-	RA75	Elastin Products Company
Anti-Dcn	-	-	1:2000	-	LF-114	Kerafast
Anti-pSmad	-	-	1:1000	-	3101	Cell signaling
Anti-Smad2	-	-	1:1000	-	3102	Cell signaling
Anti-Gopc	-	-	1:1000	-	ab109119	Abcam
Anti-Pick1	-	-	1:500	-	ab77178	Abcam
Anit-Atp6v0a2	-	-	1:1000	-	ab96803	Abcam
Anti-Gapdh	-	-	1:40000	-	AM4300	Thermo Fisher
Anti-Aktin	-	-	1:4000	-	4970	Cell signaling

Tabelle 12: Lektine mit den eingesetzten Verdünnungen für für Immunfluoreszenz (IF) und *Immunoblotting* (IB).

Lektine	Verdünnung		Hersteller
	IF Gewebe	IB	
Peanut Agglutinin (PNA)	1:1000	1:1000	Vector Labs
Sambucus Nigra Lectin (SNA)	-	1:1000	Vector Labs
Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin (E-Pha)	-	1:1000	Vector Labs

2.1.2.7. Kits

Tabelle 13: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Periodic Acid Schiff Stain	Abcam (Cambridge, England)
DNA/RNA/Protein Allprep	Qiagen (Hilden)
Pierce BCA Protein	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Vectastain ABC Kit	Vector Labs (Burlingame, USA)

2.1.2.8. Software

Tabelle 14: Verwendete Software mit Versionsnummer und dessen Herausgeber.

Software	Herausgeber
Graphpad Prism 8 (v8.3.0)	GraphPad Software (San Diego, USA)
Zen blue 3.0 lite (v3.0.79.0000)	Zeiss (Jena)
Zen black lite (v16.0.1.306)	Zeiss (Jena)
Image Studio (v5.2.5)	LI-COR (Lincoln, USA)
ImageJ (v2.0.0)	bio7.org
Persus (v1.6.1.3)	FG Computational Systems Biochemistry, (MPI für Biochemie, Martinsried)

2.2. Methoden

2.2.1. *Atp6v0a2*-Mausmodelle

Die in dieser Arbeit verwendeten *Atp6v0a2*-Mausmodelle wurden von Denise Jahn während ihrer Dissertation generiert⁵³. Es wurde ein *Atp6v0a2*-Knockout (*Atp6v0a2*^{-/-}) Mausmodell erstellt, in dem die Exons 15 bis 17 durch die Cre-Rekombinase entfernt wurden (Abbildung 16A). Für das *Atp6v0a2*-Knockin (*Atp6v0a2*^{RQ/RQ}) Mausmodell wurde eine Missens-Mutation an Position in Exon 18 eingefügt, wodurch ein Aminosäure-Austausch von Arginin 755 zu Glutamin (R755Q) stattfand (Abbildung 16B). Die Neomycin-Resistenz der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Linie wurde durch die Verpaarung mit einer Flippase-*Deleter*-Mauslinie entfernt, wodurch die Flippase den Genabschnitt heraus rekombiniert.

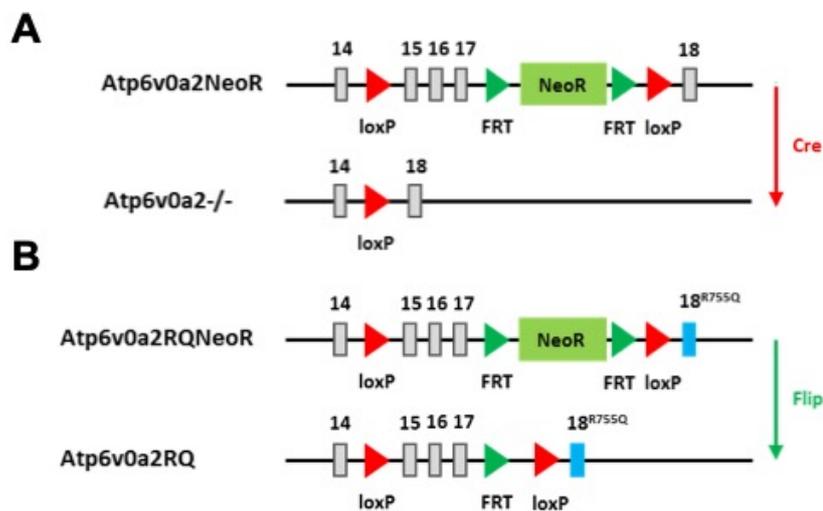


Abbildung 16: *Targeting strategy* der *Atp6v0a2*-Mausmodelle. (A) Im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell wurden, durch die Verpaarung von Maus-Chimären mit Hprt-Cre-Rekombinase, die Exons 15 bis 17 keimbahngängig durch die Rekombination der *loxP*-Sites entfernt. (B) Zur Erzeugung des *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodells wurde vor der Aggregation der embryonalen Stammzellen im Zielvektor die Aminosäure Arginin 755 zu Glutamin in *Atp6v0a2* mutiert. Die entstandenen Chimären wurden zur Entfernung der Neomycin-Resistenz mit einer Flippase-*Deleter*-Mauslinie verpaart. Hierdurch fand die Rekombination der *Flippase recognition target* (*FRT*)-sites statt.

2.2.2. Mausgenotypisierung

2.2.2.1. DNA Isolation für die Mausgenotypisierung

Von den Mäusen wurde während der Markierung eine Ohrstanze entnommen. Dieses Gewebe wurde in 50 µl Lysepuffer (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) für 60 min bei 95 °C erhitzt, und anschließend mit 50 µl Neutralisationspuffer (40 mM Tris-HCl) versehen.

2.2.2.2. PCR zur Mausgenotypisierung

Zur Genotypisierung wurden für die *Atp6v0a2*^{-/-} sowie für die *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}- Linie eine drei Primer-PCR mittels 5x FIREPol Master Mix durchgeführt. Von der isolierten DNA wurde je 1 µl verwendet. Das ergibt den Reaktionsmix in Tabelle 15 und wurde mit einer verkürzten Version des Temperaturprogramms *MS-Long* durchgeführt (Tabelle 16).

Zur Bestimmung der Genotypen wurde ein 1,5 % Agarosegel verwendet und die PCR-Produkte wie in (Tabelle 17) unterschieden.

Tabelle 15: Reaktionsmix für die Mausgenotypisierung

5x FIREPol Master Mix	4 μ l
Atp6v0a2_i14F (10 μ M)	0,4 μ l
loxp1_R (10 μ M)	0,4 μ l
Atp6v0a2_i17R (10 μ M)	0,4 μ l
H2O	13,8 μ l
DNA	1 μ l

Tabelle 16: Temperaturverlauf von „MS-long kurz“

T [°C]	t [min]	Zyklen
95	03:00	
95	00:30	
61	00:45	x3
72	01:30	
95	00:30	
59	00:45	x3
72	01:30	
95	00:30	
57	00:45	x3
72	01:30	
95	00:30	
55	00:45	x33
72	00:45	
72	10:00	
4	∞	

Tabelle 17: Produktgrößen der Mausgenotypisierungs-PCR

Allel	Größe [bp]
Atp6v0a2 ^{Wt}	680
Atp6v0a2 ⁻	458
Atp6v0a2 ^{RQ}	572

2.2.3. Histologie

2.2.3.1. Fixierung und Einbetten von Gewebe in Paraffin

Die Haut von p35 Mäusen, die Hoden von p105 Mäusen und die Köpfe von e13,5 Embryonen wurden entnommen und mit 4 % PFA immersionsfixiert. Für die Analyse des Gehirns von p35 Mäusen wurde eine Perfusion vorgenommen. Den Mäusen wurden i.p. 100 µL 1 Ketavet (10%): 1 Rompun (2%): 8 NaCl (0,9 %) pro 10 g Körpergewicht injiziert und dadurch in eine tiefe Narkose gelegt. Anschließend wurde der Thorax geöffnet, der rechte Vorhof des Herzens angeschnitten und in die linke Herzkammer zuerst 20 mL Heparin/NaCl und anschließend 20 mL 4 % PFA injiziert. Die Gehirne wurden entnommen und über Nacht mit 4 % PFA immersionsfixiert. Die Gewebe wurden zweimal mit PBS gewaschen. Dann erneut für 30 min in 50 % Ethanol gewaschen und anschließend in 70 % Ethanol gelagert bis diese mittels des Entwässerungsautomaten TP1020 in Paraffin überführt wurden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Programm zur Gewebedehydratation von TP1020

Zeit	Lösung
2 h	90% Ethanol
2 h	95% Ethanol
2 h	100% Ethanol
2 h	100% Ethanol
2 h	100% Ethanol
15 min	Ultraclear
15 min	Ultraclear
30 min	Ultraclear
3 min	1:1 Ultraclear:Paraffin
3 min	Paraffin

2.2.3.2. Einbetten von Gewebe in Optimal Cutting Temperature Compound (OCT)

P35 Mäuse wurden einer Perfusion unterzogen (Punkt 2.2.3.1.), die Gehirne entnommen und in OCT eingelegt. Nach 5 min wurden die Gehirne erneut in OCT überführt und mittels in flüssigen Stickstoff vorgekühltem Isopentan eingefroren.

2.2.3.3. Nissl-Färbung

Von den Geweben wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Histobond Objektträger getrocknet. Das Paraffin der Gewebe wurde zweimal mit 5 min Xylol entfernt und zur Entfernung des Xylols für zweimal 5 min in 100 % Ethanol überführt. Darauf folgte eine Hydrierung mittels absteigender Ethanolreihe: 5 min 90 % Ethanol, 5 min 70 % Ethanol, 5 min 50 % Ethanol und 5 min Wasser. Die Neuronen wurden mit 0,4 % Kresylviolett in Acetat-Puffer pH 4,0 überfärbt und zweimal kurz mit Acetat-Puffer differenziert. Anschließend wurden die Schnitte jeweils kurz zweimal mit 96% Ethanol und 100 % Ethanol dehydriert, getrocknet und mit Entellan eingedeckelt.

2.2.3.4. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Nach der Entfernung des Paraffins und der Hydrierung (Punkt 2.2.3.3.), wurden die Schnitte für 7 min in 50 % Hämatoxylin inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal mit destilliertem Wasser kurz gespült und mit 0,25 % HCl/ 70 % Ethanol differenziert. Dann wurden die Schnitte 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und für 2 min mit 0,2 % angesäuertem Eosin gefärbt. Anschließend wurden die Proben zweimal kurz mit 96 % Ethanol gespült und zweimal 2 min mit 100 % Ethanol entwässert. Zuletzt wurden die Schnitte zweimal 2 min mit Xylol inkubiert und mit Entellan eingedeckelt.

2.2.3.5. Periodsäure-Schiff-Reaktion (engl. Periodic Acid-Schiff, PAS)

Die PAS-Reaktion wurde mittels des *Periodic Acid Schiff stain*-Kits durchgeführt: P35 Gehirnschnitte wurden entparaffiniert und hydriert (Punkt 2.2.3.3.). Es folgte eine 5 min Oxidation der Zuckerketten mit Periodsäure. Diese wurde durch viermal Waschen mit Wasser entfernt. Im nächsten Schritt folgte eine 15 min Reaktion mit Schiff-Reagens gefolgt von 5 min Waschen mit fließendem Leitungswasser. Die Zellkerne wurden 2 min mit Hämatoxylin gefärbt und erneut 2 min mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die gefärbten PAS-Stoffwechselprodukte 30 s mit Bläuungsreagenz inkubiert. Dann wurden die Gewebeschnitte zweimal 5 min mit Wasser gewaschen und je zweimal 3 min mit 95 % Ethanol, 100 % Ethanol und Xylol dehydriert. Am Ende wurden die Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckelt.

2.2.3.6. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Von den OCT-Präparaten wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt, welche nach der Lagerung aufgetaut und getrocknet wurden. Hingegen wurden Paraffinschnitte entparaffiniert (Punkt 2.2.3.3.). Anschließend wurden die Schnitte zweimal 5 min bei RT in PBS äquilibriert. Es erfolgte eine Antigen-Demaskierung mittels 10 min kochen in Zitronensäure pH 6,0 oder 10 min Inkubation mit *Pepsin Antigen Retriever* bei 60 °C. Die Wahl der Antigen-Demaskierung fiel entsprechend der Bindungseigenschaften des primären Antikörpers aus. Die Gewebeschnitte wurden zweimal 5 min mit PBS gewaschen und dann mittels 0,2 % Triton X/ 5 % BSA/5 % Eselserum oder 5 % Ziegen Serum für 30 min geblockt und permeabilisiert. Die Gewebeschnitte wurden einmal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte dreimal mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dann wurden die Schnitte 10 min mit 1:1000 verdünntem DAPI inkubiert. Am Ende wurden die Gewebeschnitte dreimal mit PBS gewaschen und in Fluoromount G eingebettet.

2.2.3.7. Immunhistochemie von Gewebeschnitten

Die Paraffinschnitte wurden wie unter Punkt 2.2.3.3. entparaffiniert. Die Schnitte wurden zweimal 5 min bei RT in PBS äquilibriert. Es folgte eine Antigen-Demaskierung mittels 10 min kochen in Zitronensäure pH 6,0. Für die immunhistochemische Färbung wurde das Vectastain

ABC Kit verwendet. Die Gewebeschnitte wurden 20 min mit Protein-Block inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit primärem Antikörper in 3 % BSA über Nacht bei 4 °C. Die Gewebeschnitte wurden zweimal 5 min mit PBS gewaschen, 30 min mit 1:200 verdünntem biotinylierten sekundären Antikörper inkubiert und erneut mit zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine 30 min Inkubation mit ABC Reagenz bei RT und zweimal Waschen mit PBS. Dann wurden die Gewebeschnitte ca. 5 min mit der Substratlösung inkubiert und mit Leitungswasser gespült.

2.2.4. Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.4.1. Gewebeentnahme und Fixierung

Für die Analyse des Gehirns wurden p35 Mäuse mit 1 % Glutaraldehyd/ 2 % PFA in PBS wie unter Punkt 2.2.3.1. beschrieben einer Perfusion unterzogen. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht bei 4 °C immersionsfixiert und im Fixans gelagert. Für die Analyse der Haut von p35 Mäusen wurde ein 5x5 mm großes Stück vom Nacken entnommen und in 2,5 % Glutaraldehyd/ 50 mM Cacodylatpuffer über Nacht fixiert und bis zur weiteren Bearbeitung darin gelagert. Für die Analyse der Hoden wurde von p105 Mäusen diese entnommen und in 1,5 % Glutaraldehyd/ 1,5 % PFA in 0,15 M HEPES-Puffer pH 7,35 über Nacht bei 4 °C immersionsfixiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe mit HEPES-Puffer gewaschen.

2.2.4.2. Einbetten der Gewebe und Analyse

Das Einbetten der Gewebe und die ultrastrukturellen Analysen wurden von Dr. Michaela Schweizer (Gehirn), Dr. Ingrid Haußer-Siller (Haut) und Prof. Dr. Andreas Meinhardt (Hoden) vorgenommen, welche eine hohe Expertise auf der Analyse dieser Gewebe besitzen. Es folgt eine kurze Beschreibung der Probenvorbereitung: Die geschnittenen Gewebe wurden mit wässrigem Osmiumtetroxid nachfixiert. Anschließend wurden die Proben mit Wasser gespült, durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe dehydriert, in Propylenoxid überführt und in Epoxidharz eingebettet. Es wurden Ultradünn-Schnitte (60- 80 nm) erstellt und mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Für die Lichtmikroskopie wurden Semidünnschnitte auf Glasobjektträger aufgezogen und mit Toluidinblau gefärbt.

2.2.5. Immunoblotting

2.2.5.1. Proteinextraktion aus Gewebe

Für die Extraktion von Protein und RNA aus dem frontalen Kortex des Gehirns und der Haut wurde das DNA/RNA/Protein Allprep (Qiagen) verwendet: Pro Probe wurden 15 mg Gewebe mittels Stickstoff schockgefroren und Mörser zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe in 600 µL RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol aufgenommen, mittels 20 G Kanüle homogenisiert und 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben 3 min bei 18000 g zentrifugiert und der Überstand in die AllPrep DNA-*spin column* übertragen. Die DNA-*spin column* wurde bei 8000 g zentrifugiert, der Durchfluss mit 430 µL reinem Ethanol versetzt und auf die RNA-*spin column* aufgetragen. Zur Extraktion der DNA wurde die DNA-*spin*

column erst mit 500 µL AW1-Puffer und anschließend mit 500 µL AW2-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Die DNA wurde vom Filter mit 100 µL Wasser eluiert. Zur Extraktion der RNA wurde die *RNA-spin column* 15 s bei 8000 g zentrifugiert und das Eluat zur Extraktion des Proteins aufgefangen. Die RNA spin column wurde mit 700 µL RW1-Puffer gewaschen und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Dann wurde die RNA spin column zweimal mit 500 µL RPE-Puffer gewaschen und erst 30 s und im zweiten Schritt 2 min bei 8000 g zentrifugiert. Die RNA wurde mit 50 µL RNase freiem Wasser bei 1 min 8000 g eluiert. Es folgte die Proteinisolation aus dem Eluat der *RNA-spin column*. Zu dem Eluat wurde 1 mL APP-Puffer gegeben und 10 min bei RT präzipitiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 18000 g für 1 min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µL 70 % Ethanol gewaschen und erneut 1 min bei 18000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet 10 min bei RT getrocknet. Zum Lösen des Pellets wurde es in RIPA-Puffer mit 5 % SDS aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung kurz auf 60 °C erwärmt und 1:3 mit RIPA-Puffer verdünnt.

Für die Hodenhomogenate wurde ein p105 Maushoden in 500 µL RIPA-Puffer aufgenommen, mittels Ultra-Turrax zerkleinert und 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden diese bei 18000 g abzentrifugiert und 1:7 in RIPA-Puffer verdünnt.

Zur Herstellung von Zellhomogenaten aus Mefs wurden diese konfluent mit $4 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen ausgesät. Diese wurden in 100 µL RIPA-Puffer aufgenommen, 45 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 18000 g abzentrifugiert und der Überstand entnommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bicinchoninsäure Analyse (engl. Bicinchoninic acid analysis, BCA) bestimmt.

Für die Analyse von α -Dag1 wurde Protein aus e13,5 Köpfen und Embryonen nach dem Protokoll von Michele et. al (2002) extrahiert und angereichert²⁹. Das Gewebe wurde mittels Stickstoff schockgefroren, Mörser zerkleinert und in 1 mL 1 % Triton X aufgenommen und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels BCA bestimmt und für die e13,5 Embryoköpfe 700 µg Protein und für kompletten Embryonen 4000 µg Protein in 1 mL 1 % Triton X verdünnt. Das Protein wurde über Nacht bei 4 °C mittels 200 µL WGA-Agarose-Beads angereichert. Folgend wurden die WGA-Beads dreimal mit 0,1 % Triton X gewaschen und die Glykoproteine durch 10 min Inkubation bei 95 °C in 150 µL Ladebuffer eluiert. 50 µL des Eluats wurden direkt auf das Acrylamidgel aufgetragen.

2.2.5.2. Probenvorbereitung

Abhängig vom zu analysierenden Protein wurden 15 bis 20 µg Protein der Gewebhomogenate und 10 bis 20 µg Protein der Zellhomogenate eingesetzt. Das Volumen der Homogenate wurde mittels RIPA-Puffer angeglichen und mit 5x Ladebuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 98 °C aufgekocht und sonifiziert.

2.2.5.3. SDS-PAGE und Westernblot

SDS-Polyacrylamidgele wurden in das Mini-Protean System eingesetzt und die Kammer mit Laufpuffer befüllt. Abhängig vom Molekulargewicht des Proteins wurde für die Gele eine Acrylamidkonzentration von 6 bis 14 % gewählt. Die vorbereiteten Homogenate wurden aufgetragen, bei 60 V einlaufen gelassen und dann mit 120 V aufgetrennt.

Anschließend wurden die Proteine mittels Semi-Dry Elektroblogger auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Nitrozellulose-Membran und das Filterpapier wurden in Transferpuffer eingeweicht. Dann wurden Gel und Membran zwischen zwei Filterpapieren eingespannt und ein Strom von 180 mA und maximal 14 V angelegt. Nach 2 h wurden die unspezifischen Antikörperbindungsstellen mit *Blocking Puffer* 1 h blockiert und der primäre Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal mit 0,1 % Tween/PBS oder 0,1 % NP-40/PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Am Ende wurde die Membran wieder dreimal mit 0,1 % Tween/PBS oder 0,1 % NP 40/PBS gewaschen und die Membran am Imaging System Odyssey Fc entwickelt. Je nach Eigenschaften des primären Antikörpers wurden sekundäre Antikörper gewählt, welche mit 680RD, 800CW oder HRP markiert waren. Das Infrarot-Signal von 680RD oder 800CW konnte direkt gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurden das Signal der HRP-Antikörper mittels ECL-Reagenz entwickelt.

2.2.6. Quantitative Analyse von Lipiden (*Lipidomics*)

Die Analyse der zellulären Lipide wurde im Labor von Prof. Britta Brügger nach ihrem publizierten Protokoll in Özbalci C. et al. (2013) vorgenommen¹⁴⁵. Für diese Analyse wurde das Gewebe des zerebralen Kortex von vier Mäusen pro Genotyp analysiert.

2.2.7. *Complexome-Profiling* des zerebralen Kortex

Das *Complexome* des zerebralen Kortex von p35 Tieren wurde im Labor von Prof. Ulrich Brandt nach den publizierten Protokollen in Van Damme, T. et al. (2017) und in Heide H. und Bleier L. et al. (2012) vorgenommen^{5,146}. Es wurden zwei Tiere pro Genotyp analysiert.

2.2.8. Analyse der N-Glykane durch Massen-Spektrometrie

Die N-Glykane des frontalen Kortex und der Haut wurden durch Dr. Willy Morelle von der Universität Lille gemessen. Dafür wurden die Proteine und Glykoproteine reduziert und carboxyamidomethyliert, gefolgt von einem sequentiellen Verdau mit Trypsin/ Peptid N-Glycosidase F und einer Aufreinigung mittels Sep-Pak Säule. Die Permethylierung der gefriergetrockneten Glykane und MALDI-TOF-MS wurden wie unter W. Morelle und JC. Michalski (2007) beschrieben durchgeführt¹⁴⁷.

2.2.9. Erzeugung und Kultivierung von e13,5 Mefs

Zur Erzeugung von e13,5 *Mouse embryonic fibroblasts* (Mefs) wurden Embryonen aus dem Uterus entnommen, der Kopf und die Organe entfernt und in PBS zerkleinert. Anschließend wurde der Embryo für 10 min bei 37 °C in Trypsin inkubiert, die herausgelösten Zellen gemischt und mittels 0,45 µm FACS-Filter vereinzelt. Die Zellen wurden in einem Medium aus DMEM mit 10 % FCS, 1 % Ultra-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert.

2.2.10. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Hier für erfolgte die Kultivierung der Zellen auf Glasplättchen. Zur Fixierung wurden die Zellen 10 min mit 4 % PFA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min mit 0,1 % Saponin in 3 % BSA bei RT permeabilisiert und geblockt. Die primären Antikörper wurden in 3 % BSA verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit den Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die sekundären Antikörper in 3 % BSA verdünnt und mit den Zellen für 1 h inkubiert. Die Zellkerne wurde mit 1 µg/ml DAPI in PBS für 10 Minuten gefärbt, im Anschluss noch dreimal mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen wurden mit Fluoromount G eingebettet.

Für die Färbung mit Filipin wurde das Protokoll wie oben verwendet, aber anstatt DAPI 0,5 mg/ml Filipin in PBS auf die Zellen gegeben und 2 h bei RT inkubiert.

2.2.11. Brefeldin A (BFA)-Test zur Untersuchung des retrograden Transports

Es wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen auf Glasplättchen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 5 µg/mL BFA bei RT behandelt. Es folgte eine Fixierung der Zellen mit 4 % PFA. Im nächsten Schritt wurden wie unter Punkt 2.2.10. beschrieben der Golgi-Apparat über den Marker Gigantin gefärbt und pro Kondition mindestens 100 Zellen mit dem Mikroskop aufgenommen. Zur Auswertung wurde der Golgi-Apparat der Zellen in kollabiert und nicht kollabiert eingeteilt.

2.2.12. Metabolische Markierung mit ManNAz

Es wurden 10^3 Zellen pro Vertiefung einer 96 Vertiefungsplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 6 h bei 37 °C mit 50 µM ManNAz inkubiert. Anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA für 15 min fixiert. Die Vertiefungen wurden mit PBS gewaschen, die Zellen 15 min mit 0,5 % Triton X permeabilisiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die „Klick-Reaktion“ nach dem Mix in Tabelle 19. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellkerne mit 1 µg/ml DAPI für 10 min gefärbt. Zum Abschluss wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen und mit dem Hochdurchsatz-Mikroskop fünf Bilder von jeder Vertiefung aufgenommen.

Tabelle 19: Reaktionsmix für die Klick-Reaktion

Reagenz	c [mM]
K ₂ HPO ₄	100
Natriumascorbat	2,5
CuSO ₄ ²⁻ - H ₂ O	0,15
BTTAA	0,3
AzidoFluor 488	0,01

Als Kontrollen wurden vor der Durchführung Wildtyp-Mefs jeweils mit 1 μ M BFA, 50 μ M CQ, 200 mM Baf, 2 μ M TNCM und 25 mM NH₄Cl über Nacht inkubiert. Diese Konzentrationen wurden während der ManNAz-Inkubation aufrechterhalten.

2.2.13. Analyse des pH-Werts im Golgi-Apparat

2.2.13.1. Vorbereitung der Zellen und Messung

Die Zellen wurden teil-konfluent auf einer Zellkulturschale für Lebend-Zell-Mikroskopie ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Puls mit 1 μ g/mL Cholera Toxin B-FITC (CTB-FITC) für 120 min. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und erneut 90 min bei 37 °C mit DMEM inkubiert, damit alles aufgenommene CTB-FITC im Golgi-Apparat lokalisiert. Final wurden 15-20 Zellen pro Kondition in PBS mittels Lebend-Zell-Mikroskop bei 480 nm für die Intensität und bei 430 nm für die Referenz aufgenommen. Die FITC-Intensität des Golgi-Apparats wurde über das Programm ImageJ ermittelt. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Zellen nach der Aussaat mit 50 μ M CQ, 200 mM Baf, und 25 mM NH₄Cl über Nacht inkubiert. Diese Konzentration wurde während des Tests aufrechterhalten.

2.2.13.2. Erstellung einer Kalibriergeraden

Wildtyp-Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.13.1. beschrieben mit CTB-FITC vorbereitet und anschließend der pH-Wert des Golgi-Apparats mit „Clamping Puffer“ (150 mM KCl, 5 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 50 μ M Monensin and 50 μ M Nigericin) eingestellt. Für die Kalibriergerade wurden verschiedene Konditionen des Clamping Puffer von pH 5 bis 7,5 in pH 0,5 Schritten erstellt und die Zellen jeweils 45 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte ebenfalls in Clamping Puffer.

2.2.14. Die Analyse des Proteoms und Sekretoms von Mefs

2.2.14.1. Probenvorbereitung

Es wurden 1*10⁶ Zellen von Mefs in 10 cm Schalen konfluent ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Serumbestandteile durch zweimal Waschen mit HBSS und einmal Waschen mit Medium ohne fetales Kälber-Serum entfernt. Die sekretierten Proteine wurden 24 h in 6 mL Medium ohne fetales Kälber-Serum und ohne Phenolrot gesammelt und nach Punkt 2.2.14.2. gefällt. Für die Analyse des Proteoms wurden die Zellen in einem Lysis-Puffer aus 3 M

Guanidiniumchlorid/ 5 mM Tris(2 carboxyethyl)phosphin, 20 mM Chloroacetamide und 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan pH 8,5 aufgenommen und 10 min bei 96 °C inkubiert.

2.2.14.2. Fällung sekretorischer Proteine

Das Medium mit den sekretorischen Proteinen wurde in ein *low protein binding* Gefäß überführt und 10 min bei 2000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Davon wurden 5,5 mL Medium in ein neues Gefäß überführt und die Proteine 2 h durch die Zugabe von 750 µL 100 % Trichloressigsäure gefällt (finale Konzentration 12 %). Die Proteine wurden bei 3500 x g für 10 min bei 4 °C präzipitiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 2 mL Tetrahydrofuran gewaschen und in *Lysis*-Puffer (Punkt 2.2.14.1.) aufgenommen.

2.2.14.3. Markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (Label-free Quantification, FLQ)

Die Messung erfolgte in der *Mass Spectrometry Facility* vom Max-Planck-Institut für molekulare Genetik von Dr. David Meierhofer, nach dem publiziertem Protokoll¹⁴⁸. Die Rohdaten wurden mit der MaxQuant Software (v1.6.0.1) ausgewertet¹⁴⁹.

2.2.14.4. Erstellung der Vulkan-Plots

Aus den LFQ-Intensitäten wurden mit dem Programm Perseus die Nullwerte entfernt und aus den Triplikaten der drei primären Zellkulturen der negative dekadische Logarithmus des p-Werts mittels t-Test, sowie der log₂-Wert berechnet. Anschließend wurden mit Graphpad Prism 8 die log₂-Werte gegen den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts aufgetragen.

2.2.15. Messung der Spermien-Motilität und -Konzentration

Die Spermien wurden frisch aus der Cauda Epididymis isoliert und für 5 min in *Human Tubal Fluid*-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Spermien 1:50 verdünnt und die Spermien-Motilität und -Konzentration mittels IVOS Spermien-Analysegerät gemessen. Die Spermien wurden 30 s lang beobachtet und die Bilder mit einer Frequenz von 60 Hz aufgenommen. Der Cutoff der beweglichen Spermien betrug 30 µm/s für die lineare Geschwindigkeit.

2.2.16. Statistische Analyse

Für alle Experimente wurde die zweifache Analyse der Varianz (ANOVA) mit GraphPad Prism 8 durchgeführt. Dabei wurden mindestens drei Tiere pro Genotyp oder drei primäre Zelllinien untersucht. Für die ultrastrukturellen Aufnahmen wurde jeweils ein Tier pro Genotyp untersucht und die Ergebnisse über *Immunoblotting*, histologisch oder mit Immunfärbungen validiert.

Für multiples Testen der Proteome-Daten wurde eine Korrektur nach Dunn-Sidak vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Verminderung von Gewichtszunahme und Längenwachstum bei beiden *Atp6v0a2*-defizienten Mausmodellen

Drei Tage nach der Geburt war erkennbar, dass die homozygoten *Atp6v0a2*-Mäuse kleiner und leichter waren als ihre Wildtyp- und heterozygoten Wurfgeschwister (Abbildung 17). Diese Beobachtung traf auf beide Geschlechter zu. Im Mittel lag der Gewichtsunterschied bei 20 % und blieb bis zum Ende der Versuchsaufzeichnung bestehen. Wie ihre Wildtyp- und heterozygoten Geschwister nahm das Gewicht der *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse linear bis d50 zu, flachte anschließend bis zum Ende der Versuchsaufzeichnung ab.

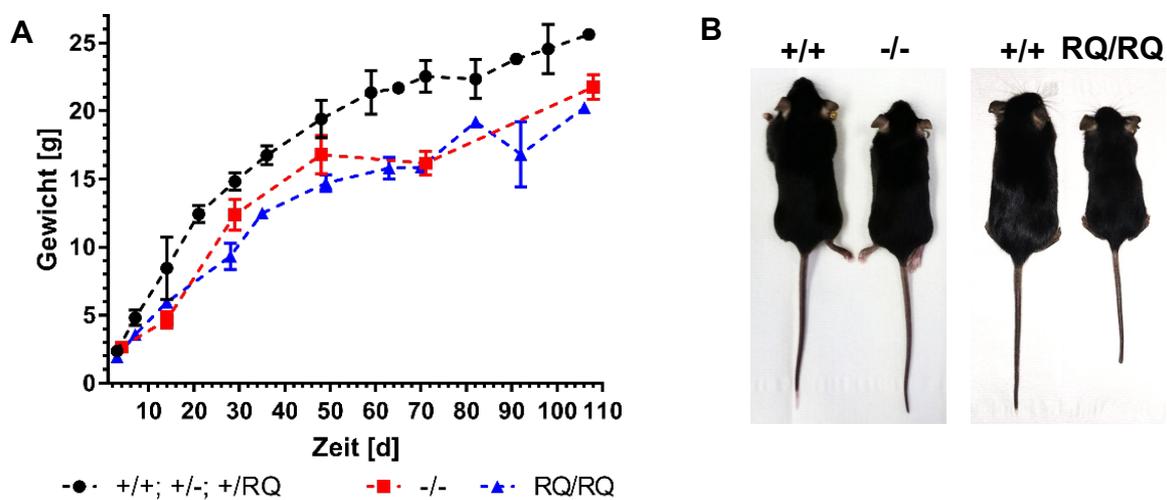


Abbildung 17: (A) Entwicklung des Körpergewichtes der *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ} (RQ/RQ)-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp (+/+)- und heterozygoten (+/-; +/RQ) Wurfgeschwister bis d108. (B) P35 *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Tiere mit Wildtyp-Geschwister (Daten und Abbildung des *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodells wurden von Denise Jahn zur Verfügung gestellt⁵³).

3.2. Neuronale Veränderungen *Atp6v0a2*-Mausmodelle

3.2.1. Vermehrte Krampfanfälle mit stärkerer Ausprägung bei *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen

Krampfanfälle entstehen durch eine unkontrollierte Verbreitung neuronaler Aktivität im Gehirn. Daran beteiligt sind einerseits Veränderungen der Funktion der Neuronen hinsichtlich Aktivität und Erregbarkeit, andererseits aber auch Veränderungen ihrer Verknüpfung. Vergleichbar mit ARCL2A-Patienten setzten bei den homozygoten *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen im Erwachsenenalter (frühestens 30 Wochen) Krampfanfälle ein. Diese Krampfanfälle wurden bei 21,4 % der *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäuse und bei 50,0 % der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse beobachtet (Tabelle 20).

Tabelle 20: Grad der Krampfanfälle der homozygoten *Atp6v0a2*-Mausmodelle. Ein Funktionsverlust von *Atp6v0a2* kann zu Krampfanfällen bei Mäusen führen. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Krampfanfällen ist bei dem *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell höher als bei den *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäusen. In dieser Tabelle sind alle Mäuse zusammengefasst, welche ein Alter von 30 Wochen überschritten hatten.

Genotyp	-/-	RQ/RQ
Tiere mit Krampfanfällen	6	8
Gesamtanzahl	28	16
[%]	21,4	50,0

3.2.2. Veränderte Schichtung von Neuronen im frontalen Kortex

Die pflastersteinartig angeordneten Neuronenschichten im frontalen Kortex der ARCL2A-Patienten lassen auf eine Störung der Gehirnentwicklung schließen. Deshalb wurden histologische Untersuchungen des Gehirns vorgenommen und Serienschritte von p35 Mausgehirnen mittels Kresylviolett gefärbt (Abbildung 18A). Innerhalb dieser Sagittalschnitte waren eingewanderte pyramidale Neuronen in die erste Schicht des präfrontalen Kortex der *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Gehirne erkennbar. Punktuell war diese Übermigration der pyramidalen Neuronen verstärkt und führte zur Bildung neuronaler Anhäufungen. Die neuronale Übermigration war bei den *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäusen allerdings weniger stark ausgeprägt als in den *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen und erst in lateraleren Schnittebenen erkennbar. Auffällig war in beiden Mausmodellen, dass in bestimmten Bereichen Neuronen fehlten. Dies sprach zusätzlich für eine veränderte Schichtung der Neuronen. Zur Quantifizierung der Übermigration wurden die Neuronen innerhalb der ersten Schicht des präfrontalen Kortex von vier vergleichbaren Schnittebenen 150 µm (medial), 300 µm, 450 µm und 600 µm (lateral) ausgehend von der medialen Begrenzung der Gehirnhemisphären gezählt. (Abbildung 18B). Diese Quantifizierung der Neuronen in der ersten Schicht im präfrontalen Kortex ergab im Mittel 3144 Neuronen im *Atp6v0a2*^{-/-}- und 4360 Neuronen im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell. Bei den Kontroll-Geschwistertieren betrug die Anzahl der Neuronen hingegen 2265 und war damit signifikant unterschiedlich zum *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell.

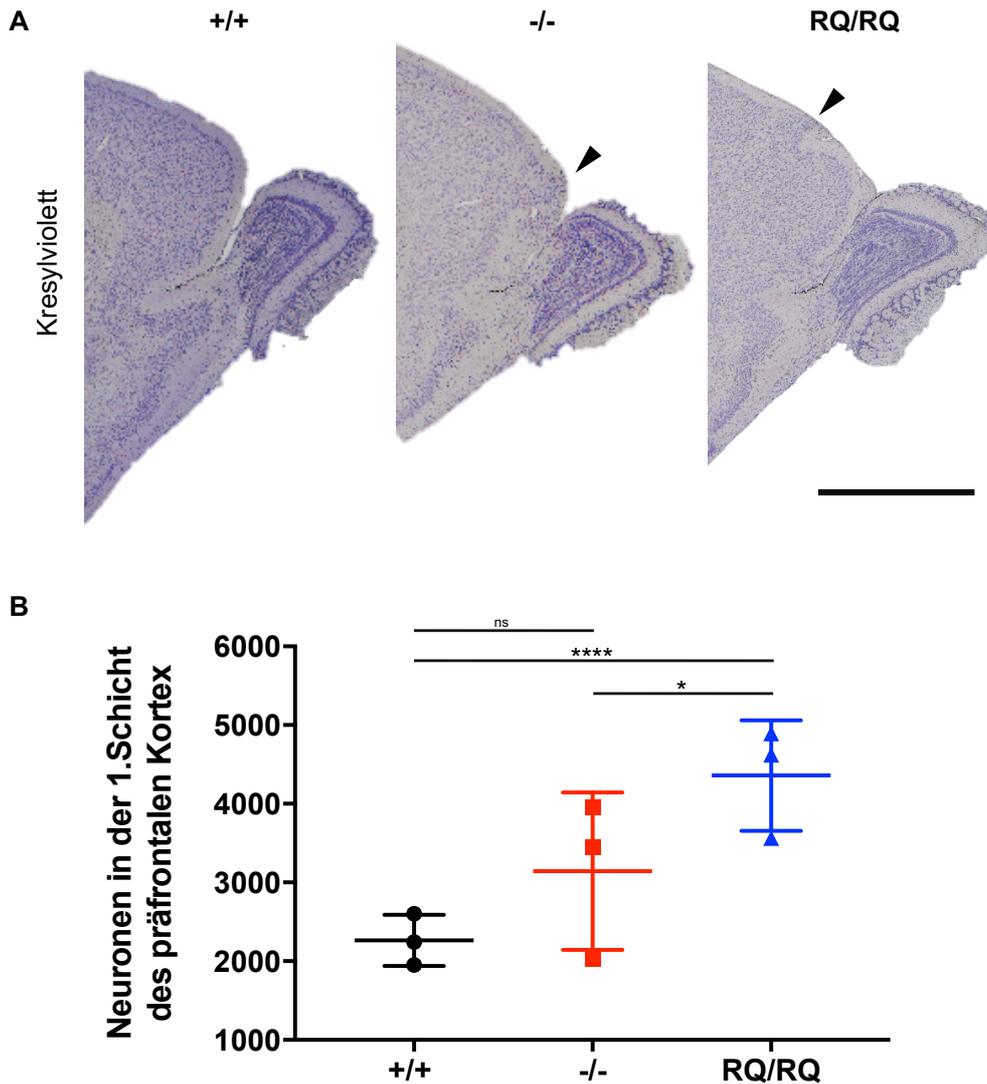


Abbildung 18: (A) Übermigration von Neuronen im präfrontalen Kortex der *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse. Dargestellt sind repräsentative Bilder Kresylviolettfärbter Gehirnschnitte von p35 Mäusen (n=3). Die schwarzen Pfeile markieren Anhäufungen übermigrierter Neuronen. Maßstab = 1 mm. (B) Quantifizierung der Neuronen innerhalb der ersten Schicht des präfrontalen Kortex von A. Die Werte entsprechen der Summe der Neuronen von vier Gewebeschnitten aus vergleichbaren Ebenen. P * < 0,05; **** < 0,0001.

3.2.3. Die neuronale Übermigration beginnt im Embryonalstadium 13,5 (e13,5)

Typischerweise beginnt bei Mausmodellen mit Gyrierungsstörungen die neuronale Übermigration nach e12, weil zu diesem Zeitpunkt die radiale Migration der Neuronen aus den tieferen Schichten in die höheren Schichten stattfindet¹⁵⁰. Im folgenden Experiment wurden serielle Gehirnschnitte von e13,5 Embryonen mittels Kresylviolettfärbung gefärbt (Abbildung 19A). Bei 3 von 5 untersuchten *Atp6v0a2*^{-/-}-Tieren und bei 5 von 5 *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Tieren konnte eine ektopische neuronale Übermigration detektiert werden. Dabei traten diese neuronalen Ansammlungen bei den *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Embryonen häufiger auf und waren ausgedehnter. In den 5 untersuchten Wildtyp-Embryonen konnte keine neuronale Übermigration nachgewiesen werden.

3.2.4. Eine verringerte O-Glykosylierung von α -Dag1 führt zu einer Unterbrechung der Piabasalmembran

Bei Patienten mit Gyrierungsstörungen führt eine gestörte Entwicklung der Piabasalmembran, abhängig von der Größe der Lücken in der Basallamina, zur Bildung zu pflastersteinartig angeordneten Neuronen im Frontallappen. Weil dieses Merkmal mit dem Phänotyp der hier untersuchten Mausmodelle übereinstimmt, wurde der Hauptbestandteil der Piabasalmembran, das Laminin (Lam, rot) mittels Immunfluoreszenz in e13,5 Gehirnen gefärbt (Abbildung 19B). Das Laminin ist deutlich um den Neokortex herum als äußere rote Schicht um die blauen gefärbten Zellkerne herum erkennbar und stellt die Basallamina dar. Außerdem sind Blutgefäße, welche ebenfalls Laminin enthalten, innerhalb des Neokortex erkennbar. Besonders auffällig waren Lücken in der Basalmembran der *Atp6v0a2*^{-/-}- und in den *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Embryonen, welche immer in den Bereichen der ektoptischen neuronalen Anhäufungen erkennbar waren. Größere Defekte in der Basallamina beeinflussten auch die Struktur des lateralen Ventrikels des Neokortex.

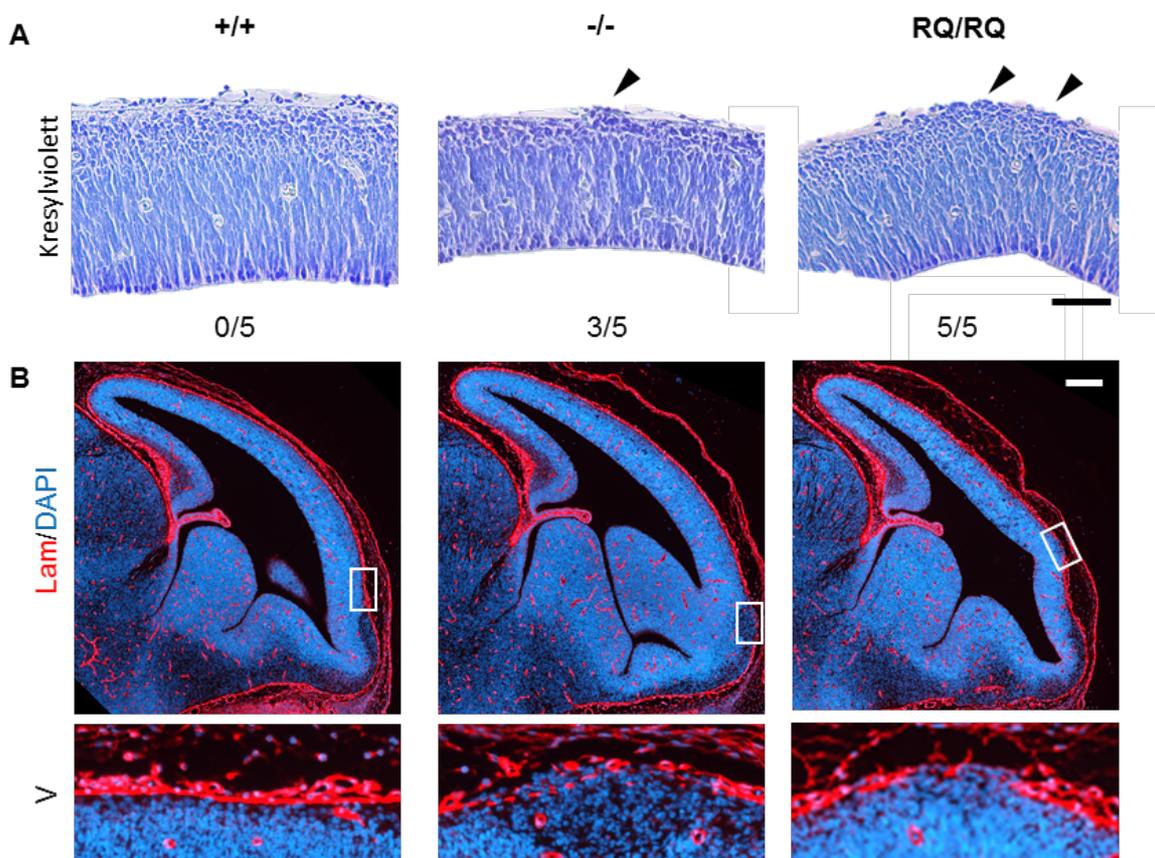


Abbildung 19: Eine gestörte Bildung der Piabasalmembran als mögliche Ursache ektoptischer neuronaler Anhäufungen im zerebralen Kortex. (A) Kresylviolett gefärbte Gehirnschnitte von e13,5 Embryonen. Die schwarzen Pfeile zeigen übermigrierte neuronale Anhäufungen. Maßstab = 50 μ m. (B) Neokortex von e13,5 Embryonen. Gefärbt wurde Laminin (rot) und Zellkerne (blau). Deutlich erkennbar sind die Lücken in der Basallamina, welche durch die weiße Box markiert und unterhalb vergrößert dargestellt sind. Maßstab = 200 μ m.

Bisher wurden in der Literatur zwei grundlegenden Pathomechanismen für eine fehlerhafte Bildung der Basallamina innerhalb der Plasmamembran beschrieben. Sehr wichtig für die Verbindung der extrazellulären Matrix mit der Basallamina ist die O-Glykosylierung des Rezeptors α -Dag1, da das Glyko-Epitop IIH6 die Verbindung zum Laminin herstellt. Zusätzlich sprach für die Testung eines O-Glykosylierungsdefekts der Mausmodelle der Nachweis einer fehlerhaften O-Glykosylierung von Apolipoprotein CIII in Blutseren der ARCL2A-Patienten. Daher wurde die Glykosylierung von α -Dag1 von e13,5 Embryonen (Abbildung 20A, B) überprüft. Sollte die Glykosylierung von α -Dag1 verringert sein, wird eine Verringerung des Molekulargewichtes im Immunoblot erwartet. Allerdings war weder in Gewebehomogenaten ganzer Embryonen, noch aus e13,5 Köpfen eine Verringerung des Molekulargewichts detektierbar. Erklärbar ist dieses Ergebnis, da sich ein Defekt in *Atp6v0a2* nicht primär auf die O-Glykosylierung auswirkt. Somit könnten nur wenige Zelltypen betroffen sein, wodurch ein spezifischer Nachweis erforderlich wurde.

Mefs eignen sich bedingt als Modell für die Gehirnentwicklung, produzieren dennoch eine große Menge extrazellulärer Matrix. Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Glykosylierung von α -Dag1 getestet (Abbildung 20C). Im Immunoblot war eine Verringerung des Molekulargewichtes des Kernproteins von α -Dag1 bei jeweils einer primären Zellkultur der homozygoten *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs erkennbar. Zusätzlich wurde eine Verringerung des IIH6-Signals von den gleichen homozygoten *Atp6v0a2*-Mefs beobachtet. Somit zeigte jeweils eine primäre Zellkultur einen O-Glykosylierungsdefekt. Die anderen vier Zellkulturen waren wahrscheinlich in der Lage, diesen Defekt durch die hohe Konzentration von Zucker im Zellkulturmedium zu kompensieren.

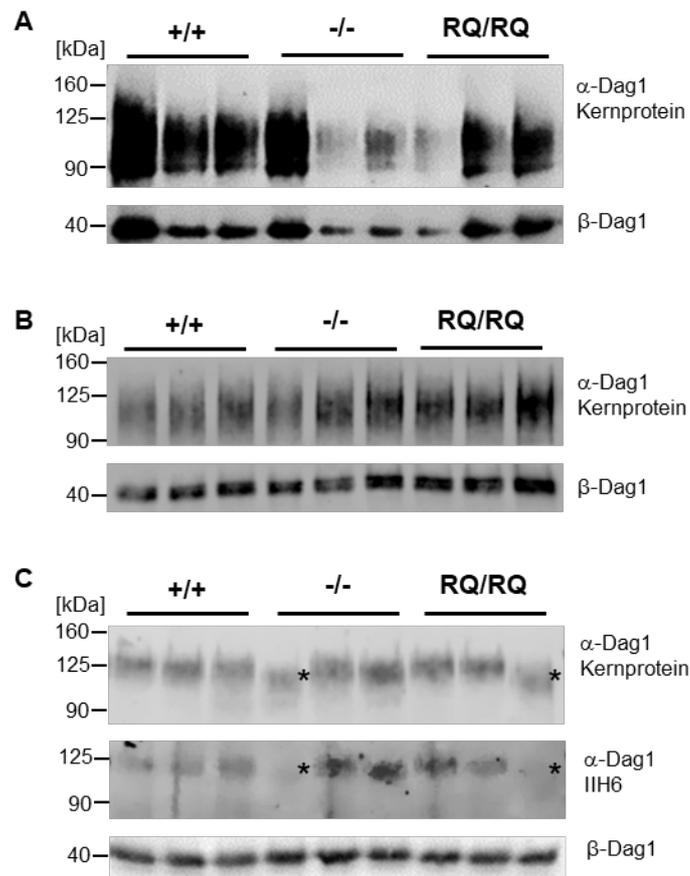


Abbildung 20: Immunoblot des WGA-angereicherten Gewebehomogenats von e13,5 Embryoköpfen (A), kompletten Embryos (B) und Homogenaten von Mefs (C). In A und B sind keine Unterschiede des Molekulargewichts von α -Dag1 erkennbar. C) In einer primären homozygoten *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Zellkultur war eine Verschiebung des Molekulargewichts des Kernproteins α -Dag1 und eine Verringerung der Intensität der IIH6-Glykosylierung erkennbar (*). Als Ladekontrolle wurde für alle Analysen das Protein β -Dag1 verwendet.

Einen spezifischen Nachweis konnte eine Immunfärbung des Glyko-Epitops IIH6 (rot) von α -Dag1 in e13,5 Köpfen liefern, da auf diese Weise direkt die O-Glykosylierung der Basallamina untersucht werden konnte. Als Färbekontrolle wurde β -Dystroglykan (β -Dag1, grün) verwendet, welches über die gleiche mRNA wie α -Dag1 translatiert wird. Das Signal von α -Dag1 und β -Dag1 kolokalisierte innerhalb der Basallamina, sowohl in den *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodellen. In den Bereichen der ektopischen neuronalen Anhäufungen war kein Signal erkennbar. Deshalb wurden die Fluoreszenz-Intensitäten in unbeeinträchtigten Bereichen der Basalmembran von α -Dag1 und β -Dag1 bestimmt (Abbildung 21). Dies ergab für die Kontrollembryos im Mittel ein Verhältnis von 1,45; für die *Atp6v0a2*^{-/-}-Embryos 1,29 und für die *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse den niedrigsten Wert von 1,13. Daraus lässt sich eine globale Verringerung der O-Glykosylierung von α -Dag1 schließen. Zusätzlich zeigte die heterogene Veränderung des α -Dag1 Glykosylierungsstatus in Mefs, dass es in individuellen lokalen

Zellpopulationen zu einem weitgehenden Zusammenbruch der O-Glykosylierung kommen kann, was dann vermutlich in einem umschriebenen Defekt der Piabasallamina resultiert.

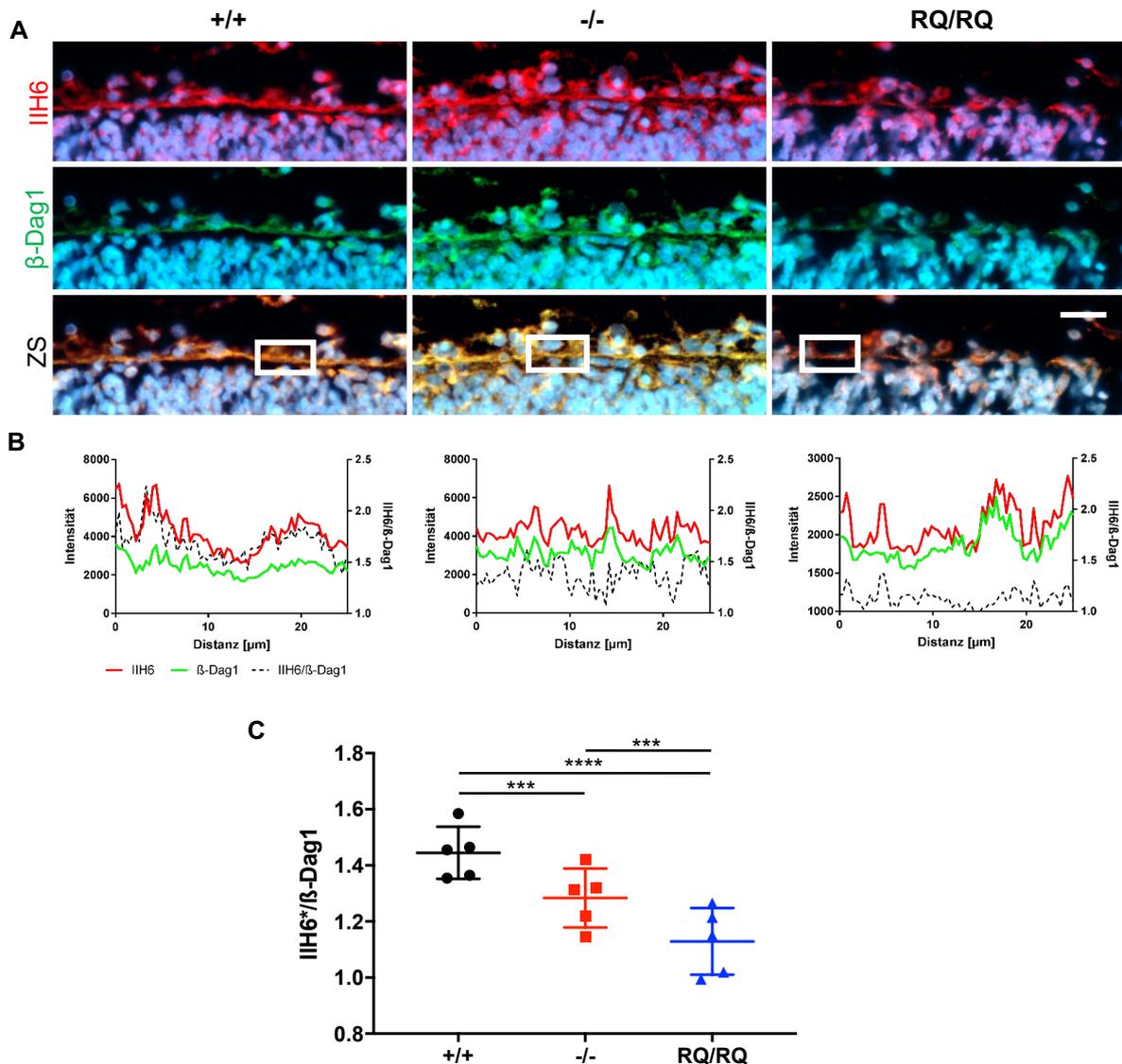


Abbildung 21: Verringerung der O-Glykosylierung IIH6 von α -Dag1 der Piabasalmembran. (A) Immunfärbung von IIH6 (rot), β -Dag1 (grün) und Zellkerne (blau) der Piabasalmembran von e13,5 Embryoköpfen. Die weißen Boxen zeigen repräsentative Bereiche für die Analyse der Fluoreszenz-Intensitäten für B und C. Maßstab = 20 μ m. (B) Exemplarische Messung der Intensität von IIH6 und β -Dag1 der weißen Boxen aus A. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt das Verhältnis der Intensität von IIH6 und β -Dag1. (C) Intensitäts-Verhältnis von IIH6 und β -Dag1 für n=5 Tiere pro Genotyp. P *** < 0,001; **** < 0,0001.

Ein anderer beschriebener Pathomechanismus für die Fehlbildung der Piabasalmembran in Mausmodellen beruht auf einem Defekt des Rezeptors Gpr56, der N-glykosyliert ist, oder dessen Liganden Kollagen Typ 3 (Col3a). Von beiden Proteinen konnten keine veränderten Proteinlevel in adulten Mäusen (Abbildung 22) und e13,5 Embryoköpfen (Daten von Johannes Kopp) detektiert werden, wodurch dieser Defekt ausgeschlossen wurde.

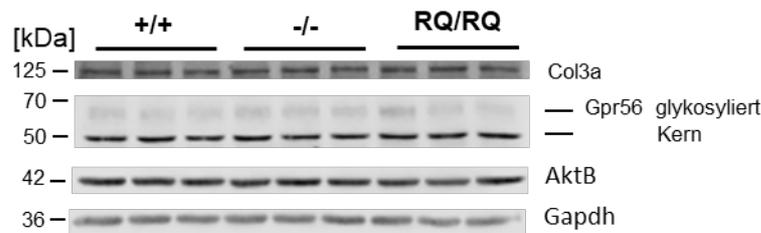


Abbildung 22: Immunoblot von Col3a und Gpr56 aus Gehirnhomogenat von p35 Mäusen.

3.2.5. Übermigrierte Neuronen sind Ctip2⁺ und Veränderung der neuronalen Schichtung

Die Basallamina stellt ein Sortierungssignal im zerebralen Kortex dar, da die Neuronen über die Radiärfaserglia migrieren, welche sich über ihre Endfüßchen an der Basalmembran über die Glia limitans befestigen. Deshalb wurden die e13,5 Gehirne mittels der Marker Ctip2 für kortikale Neuronen und Tbr2 für subventrikuläre Neuronen gefärbt (Abbildung 23). In Wildtyp-Gehirnen waren innerhalb der marginalen Zone nur Zellkerne ohne Färbung erkennbar, wobei es sich um Astrozyten handelt. Darunter befanden sich grün gefärbte Ctip2⁺-Neuronen, welche die kortikale Platte des zerebralen Kortex darstellen. Anschließend folgte ein schmaler Streifen nur blau gefärbter Zellkerne (DAPI). In der nächsten Schicht befanden sich, dicht gepackt, viele Tbr2⁺-Neuronen (rot), welche sich zum Ventrikel ausdünnen. Dies stellte die subventrikuläre Zone dar. Die übermigrierten Neuronen der homozygoten *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse befanden sich in der marginalen Zone und waren Ctip2⁺. Außerdem migrierten innerhalb der neuronalen Ansammlungen Tbr2⁺-Neurone in die kortikale Platte. Weil aus der kortikalen Platte während der Gehirnentwicklung die Schichten II bis V des Isokortex entstehen, führte dies zu einer veränderten neuronalen Schichtung in den adulten Mäusen.

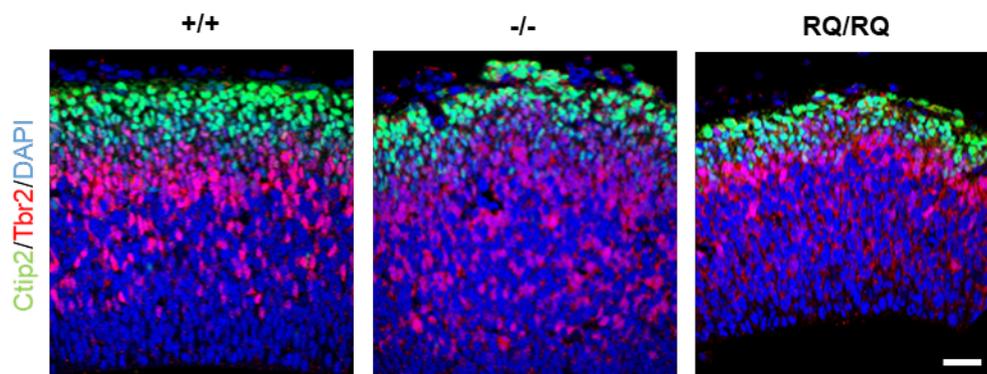


Abbildung 23: Übermigration und Veränderung der neuronalen Schichtung im Neokortex (e13,5 Gehirne). Es wurden die Marker Ctip2 (grün) für kortikale Neuronen und Tbr2 (rot) für subventrikuläre Neuronen gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die übermigrierten Neuronen exprimieren den Marker Ctip2 und stammen damit aus der kortikalen Platte. Außerdem migrieren die subventrikulären Neuronen in die obere Schicht. Maßstab = 100 μ m.

3.2.6. Neurodegeneration und Hinweise auf eine neuronale Speicherkrankheit

Obwohl die Gyrierungsstörung bei ARCL2A angeboren ist, treten Krampfanfälle oft erst im Verlauf auf. Dies ist ein Hinweis auf einen fortschreitenden pathologischen Prozess. Krampfanfälle können ebenfalls die Folge einer Neurodegeneration sein, die oft durch die sukzessive Anhäufung von Stoffwechselprodukten in Neuronen verursacht wird. Ein Charakteristikum von Speichermaterial ist die Reaktion mit dem Perjodsäure-Schiff Reagenz (PAS engl. *periodic acid Schiff reaction*). Diese Färbung zeigte innerhalb des neuronalen Zytoplasmas magentafarbene Aggregate in dem *Atp6v0a2*^{-/-} und im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell. In Abbildung 24 sind repräsentative Bilder dargestellt, in denen sich die fehlmigrierten Neuronen als besonders stark geschwollen darstellen. Die tiefer gelegenen Neurone zeigten ebenfalls eine Anreicherung von Speichermaterial.

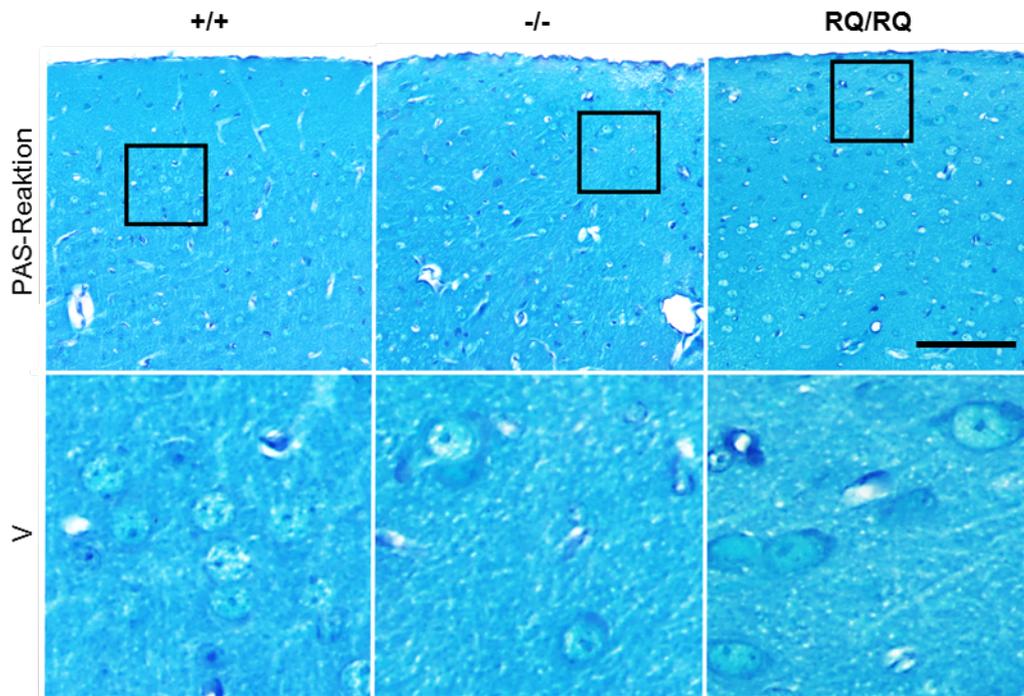


Abbildung 24: Nachweis von intrazellulärem Speichermaterial. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) in p35 Gehirnschnitten. In den *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Neuronen ist das Zytoplasma violett gefärbt. In den Wildtypen sind nur die Zellkerne der Neuronen als hellblaue runde Bereiche erkennbar. Die schwarzen Boxen markieren Bereiche, welche in der unteren Bildreihe (V) vergrößert dargestellt sind. Maßstab = 100 μ m.

Eine Anreicherung von Speichermaterial deutet auf eine Fehlfunktion der Lysosomen hin, weshalb diese mittels des lysosomalen Markers Lamp1 in Gehirnschnitten von p35 Mäusen gefärbt wurden (Abbildung 25). Innerhalb des präfrontalen Kortex der *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse war eine Akkumulation der Lysosomen innerhalb des neuronalen Körpers erkennbar. Zusätzlich wirkten die Lysosomen aufgeschwollen. Da *Atp6v0a2* im Golgi-Apparat lokalisiert, wurde dieser mittels des Markers Gm130 untersucht. Die Zisternen der Golgi-Apparate der homozygoten *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Neuronen waren ebenfalls angeschwollen und fragmentiert. Beides deutet auf Fehlfunktionen dieser Zellorganellen hin.

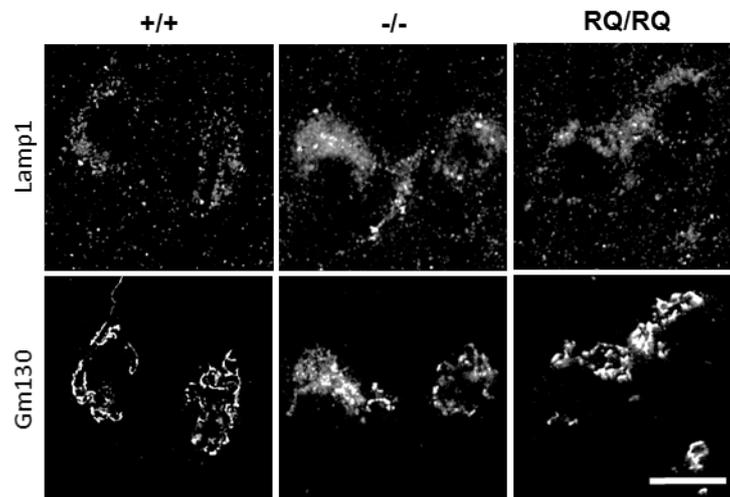


Abbildung 25: Angeschwollene Lysosomen (Lamp1) und Golgi-Apparate (Gm130) innerhalb pyramidalen Neuronen des *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodells. Für diese Immunfärbung wurden Mausgehirnschnitte von p35 Tieren verwendet. Maßstab = 10 μ m.

Die lysosomale Aktivität wurde durch *Immunoblotting* des Enzyms Cathepsin D (CtsD) untersucht (Abbildung 26). CtsD wird als Proform vom ER über den Golgi-Apparat zu den Lysosomen transportiert und dort durch den niedrigen pH in die aktive Form gespalten. Im Immunoblot waren drei verschiedene CtsD Banden erkennbar. Die 50 kDa Bande entspricht der inaktiven Proform des Enzyms, die 40 kDa Bande einer intermediären Form und die 28 kDa Bande der aktiven, reifen Form von CtsD. Sehr auffällig war ein erhöhtes Proteinlevel aller CtsD-Formen innerhalb der *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Gehirne. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Erhöhung der Proform CtsD von 5,7 in den *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Gehirnhomogenaten, während die Proteinmenge der *Atp6v0a2^{-/-}*-Mäuse um 1,8 erhöht war. Dies war nicht signifikant, weil nur die Probe einer Maus erhöhte Werte erreichte. Hingegen ergab die Quantifizierung der aktiven CtsD-Form des *Atp6v0a2^{-/-}*-Mausmodells eine Reduktion auf 0,9 (nicht signifikant) während es bei den *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Mäusen um 1,3 signifikant erhöht war. Dieses Ergebnis kann auf eine Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes hindeuten, wodurch CtsD nicht in die aktive Form gespalten wird, oder auf eine Blockierung des endosomalen Transports, wodurch es beispielsweise in späten Endosomen akkumulierte. Beide Effekte würden dennoch zu einer Verringerung der lysosomalen Aktivität führen, welche im *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Mausmodell stärker beeinträchtigt war.

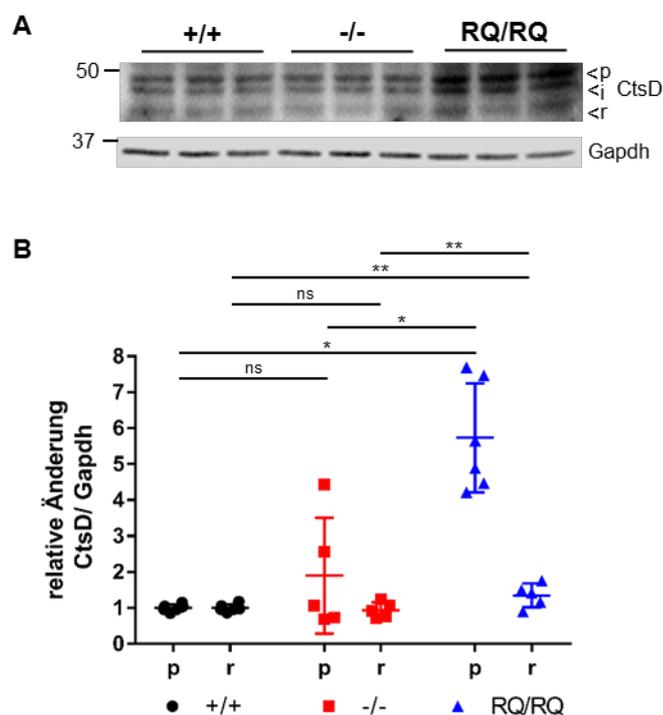


Abbildung 26: Lysosmale Aktivität des Enzyms CtsD: (A) Immunoblot von CtsD in p35 Gehirnhomogenaten des präfrontalen Kortex. Zu erkennen sind die Proform (p), ein Intermediat (i) und die aktive reife Form (r) von CtsD. Als Ladekontrolle wurde Gapdh verwendet. (B) Quantifizierung der CtsD-Bandenintensität von A. Dargestellt ist die relative Änderung der Pro- und reifen Form von CtsD. P * < 0,05; ** < 0,01.

Neuropathologische Veränderungen im Gehirn führen häufig zu reaktiven Astrozyten (Astrogliose). Damit verbunden ist eine erhöhte Expression des sauren Gliafaserproteins (Gfap von engl. *Glial fibrillary acidic protein*). Hierdurch eignete sich Gfap als sensibler Marker für den Nachweis einer Neurodegeneration. Im *Atp6v0a2*^{-/-}- und im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell zeigte sich ein verstärktes Gfap-Signal unterhalb der Pia basalmembran (Abbildung 27). Bei genauerer Betrachtung waren viele reaktive Astrozyten unterhalb dieser Lamina erkennbar. Die Expression von Gfap war in den Astrozyten des *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodells stärker als in den *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäusen. Dies sprach für einen stärkeren neurodegenerativen Verlauf. Zusätzlich waren im präfrontalen Kortex Bereiche erkennbar, in denen deutlich weniger Zellkerne vorhanden waren.

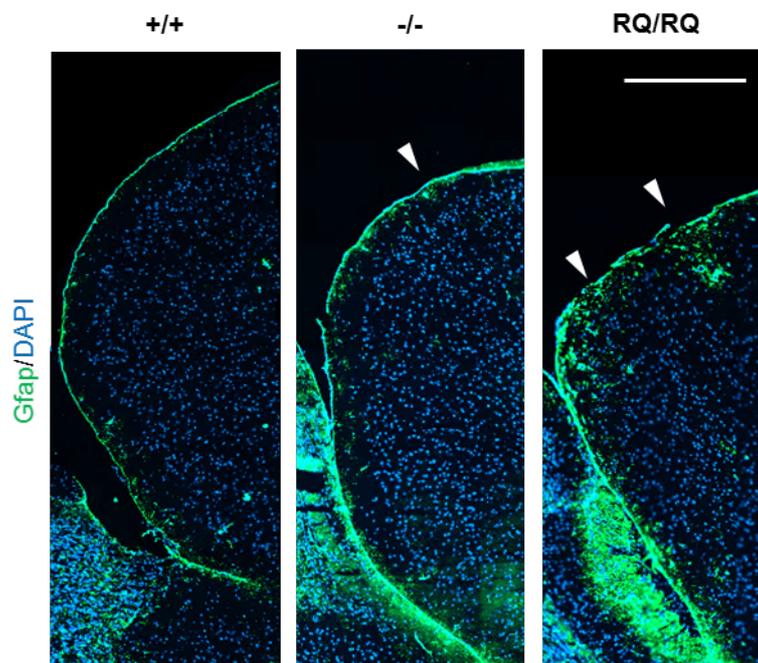


Abbildung 27: Neuropathologische Veränderung im präfrontalen Kortex. Immunfluoreszenz von Gfap (grün) in p35 Gehirnschnitten. Zusätzlich wurden die Zellkerne (blau) gefärbt. Deutlich erkennbar sind reaktive Astrozyten unter der Pia basalmembran (weiße Pfeile) im *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell. Zusätzlich sind in dem *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell Bereiche ohne Zellkerne erkennbar. Maßstab = 500 μ m.

3.2.7. Ultrastrukturelle Analyse des lysosomalen Speichermaterials

Zur Analyse der Ablagerungen in den Neuronen wurde die Ultrastruktur der Gehirne von Frau Dr. Michaela Schweizer vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie des UKE in Hamburg analysiert (Abbildung 28). Die elektronenmikroskopische Analyse offenbarte in den Gehirnen der *Atp6v0a2*-Mausmodelle angeschwollene Neuronen mit vergrößerten Dendriten, welche multilamellare Körperchen, autophagische Vakuolen, vergrößerte Axone mit Speichermaterial (axonale Spherioide) und ein verändertes Zytoskelett aufwiesen. Dies waren alles Anzeichen für eine lysosomale Speicherkrankheit. Besonders auffällig waren die multilamellaren Körperchen, welche auf eine Lipidspeicherung hinweisen und charakteristisch sind für eine Störung des Cholesterin-Transport, wie in der Niemann-Pick Typ C-Krankheit¹⁵¹ oder des Abbaus von Gangliosiden in der Tay-Sachs-Krankheit¹⁵². Zusätzlich waren in den axonalen Spheroiden deutliche Anhäufungen von amorphen Mitochondrien erkennbar. In den Neuronen sahen die Mitochondrien hingegen eher angeschwollen aus. Weiterhin war in den ultrastrukturellen Aufnahmen eine veränderte neuronale Schichtung mit zusätzlichen ektopischen Blutgefäßen, nekrotische Neuronen und vermehrt myelinisierten Axonen erkennbar.

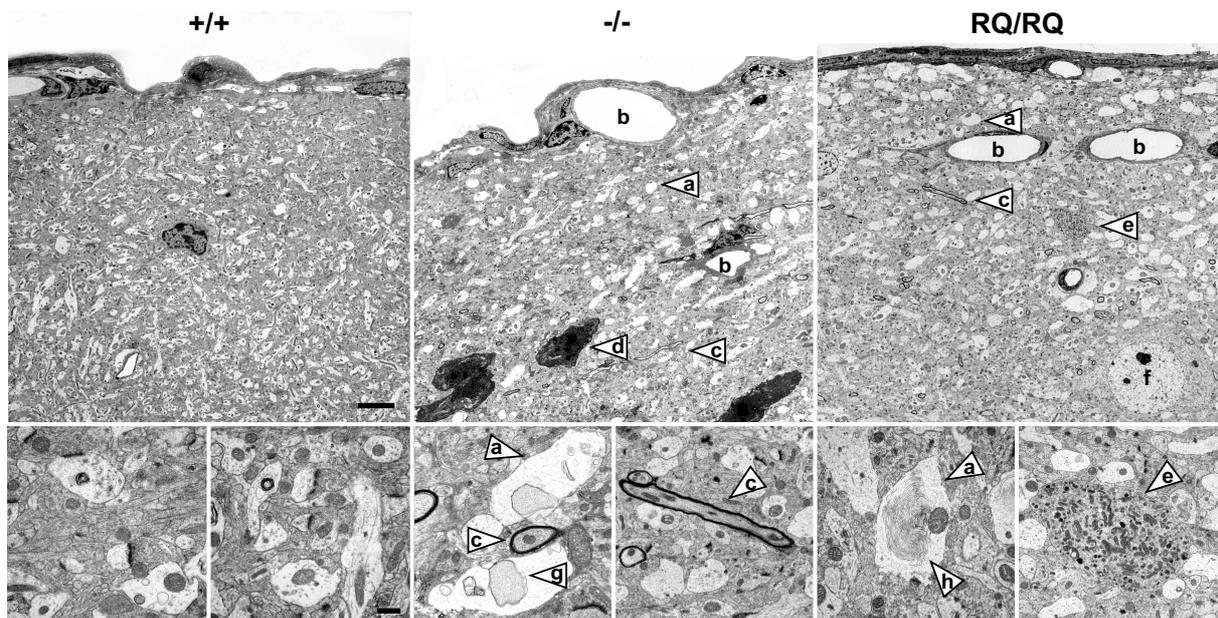


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme des präfrontalen Kortex. (Oben) Für diese Aufnahmen wurde die erste Schicht des präfrontalen Kortex von p35 Mäusen analysiert. Maßstab = 5 μ m. (Unten) Repräsentative Aufnahmen sind vergrößert dargestellt: a) Aufgeschwollene Dendriten, b) Blutgefäße, c) myelinisierte Axone, d) nekrotische Neuronen, e) axonale Spherioide, f) Nukleus, g) autophagische Vakuolen und h) multilamellare Körperchen. Maßstab = 50 μ m.

3.2.8. Akkumulation von Autophagosomen in Neuronen

Die ultrastrukturelle Analyse lieferte Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Autophagie in den Neuronen durch die autophagischen Vakuolen, multilamellaren Körperchen und axonalen Speriode. Deshalb wurden die autophagischen Vesikel mittels des Markers *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) in p35 Gehirnen analysiert. Dieses Ergebnis war nicht eindeutig, weshalb die Gehirne von älteren homozygoten *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Mäusen (p252) auf die gleiche Weise analysiert wurden (Abbildung 29). Entsprechend alte Gehirne des *Atp6v0a2^{-/-}*-Mausmodells standen beim Verfassen dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung. Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass dieses Mausmodell einen ähnlichen Phänotyp zeigt. In den Gehirnen der Wildtyp-Mäuse war im Zellkörper und den Axonen kortikaler Neurone im präfrontalen Kortex eine verstärkte LC3-Immunfärbung erkennbar. Dies weist auf einen hohen autophagischen Flux hin. Trotz der hohen autophagosomalen Aktivität war eine Akkumulation von LC3-Vesikeln um den Nukleus der *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Neuronen erkennbar. Hingegen war das LC3-Signal in den Axonen nur leicht verstärkt. Dafür war erkennbar. Dies die Axone ungeordnet verliefen. Ebenfalls sehr auffällig war der Bereich, der übermigrierten Neuronen. In diesem Bereich waren die Neuronen sehr wahrscheinlich abgestorben, weil diese schon in der PAS-Reaktion von p35 Tieren eine stärkere Akkumulation von Speichermaterial aufwiesen. Auch in tiefer gelegenen Schichten waren Areale mit starkem LC3-Signal vorhanden, welche ebenfalls auf abgestorbene Neurone hindeuten.

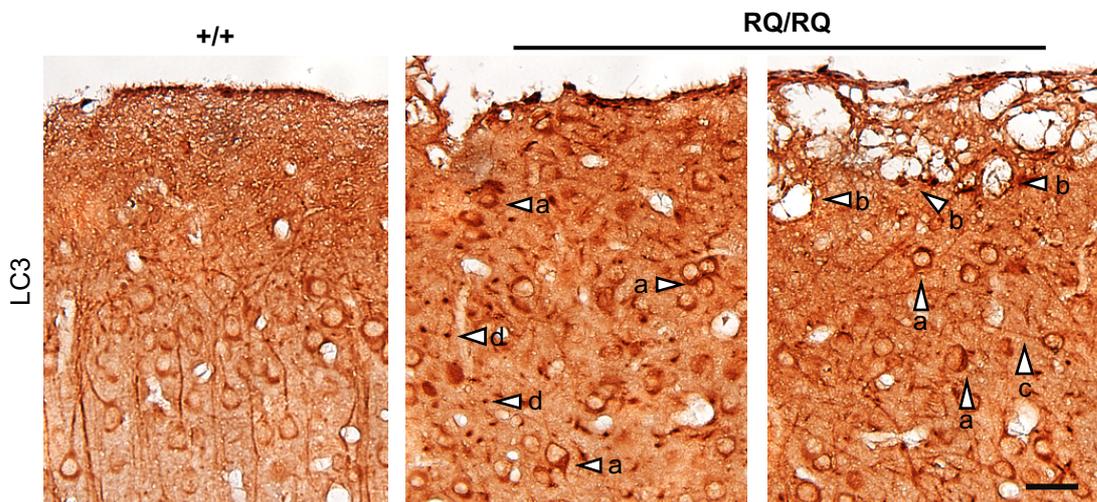


Abbildung 29: Akkumulation von Autophagosomen in *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Neuronen. Immunhistochemische Färbung des präfrontalen Kortex von p252 Mausgehirnen. In *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Neuronen ist eine Anreicherung von LC3 im neuronalen Körper erkennbar (a). Zusätzlich sind Bereiche mit degeneriertem Gewebe (b), ungeordnete Axone (c) und abgestorbene Neuronen (d) sichtbar. Maßstab = 100 µm.

3.2.9. Akkumulation von Sphingolipiden im präfrontalen Kortex

Das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Analyse deutete auf eine Lipid-Speicherkrankheit, wie die Tay-Sachs- oder Niemann-Pick-Krankheit hin. Daher wurde das Lipidom des präfrontalen Kortex von Frau Dr. Brügger von der Universität Heidelberg untersucht (Abbildung 30). Das Ergebnis offenbarte eine Erhöhung von Ceramiden und Sphingomyelin im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell, sowie einer Erhöhung von Sphingomyelin im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell. Ceramide und Sphingomyelin gehören zur Gruppe der Sphingolipide. Auffällig war auch eine Erhöhung von Phosphatidylcholin, welches beim Abbau von Sphingomyelin zu Ceramiden und Phosphatidylcholin entsteht. Zusätzlich war in dem präfrontalen Kortex der *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäuse Palmitinsäure (PA) erhöht. Dieses Lipid ist toxisch in Astrozyten und steht im Zusammenhang mit beeinträchtigter Autophagie¹⁵³. Weiterhin waren Formen von Phosphatidylethanolamine (PE) und Phosphatidylserin (PS) dereguliert, welche Bestandteile biologischer Membranen darstellen. Besonders die Erhöhung von PE sollte im Kontext eines Autophagie-Problems betrachtet werden, da LC3 mit diesem Lipid modifiziert wird¹⁵⁴. Zusammenfassend deutete vor allem die Akkumulation von Sphingomyelin auf eine Überlappung mit der Niemann-Pick-Krankheit hin und sprach für eine Deregulation der Lipid-Homöostase. Obwohl grundsätzlich das *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell einen stärkeren neuronalen Phänotyp aufweist, scheint die Lipidspeicherung im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell etwas stärker zu sein.

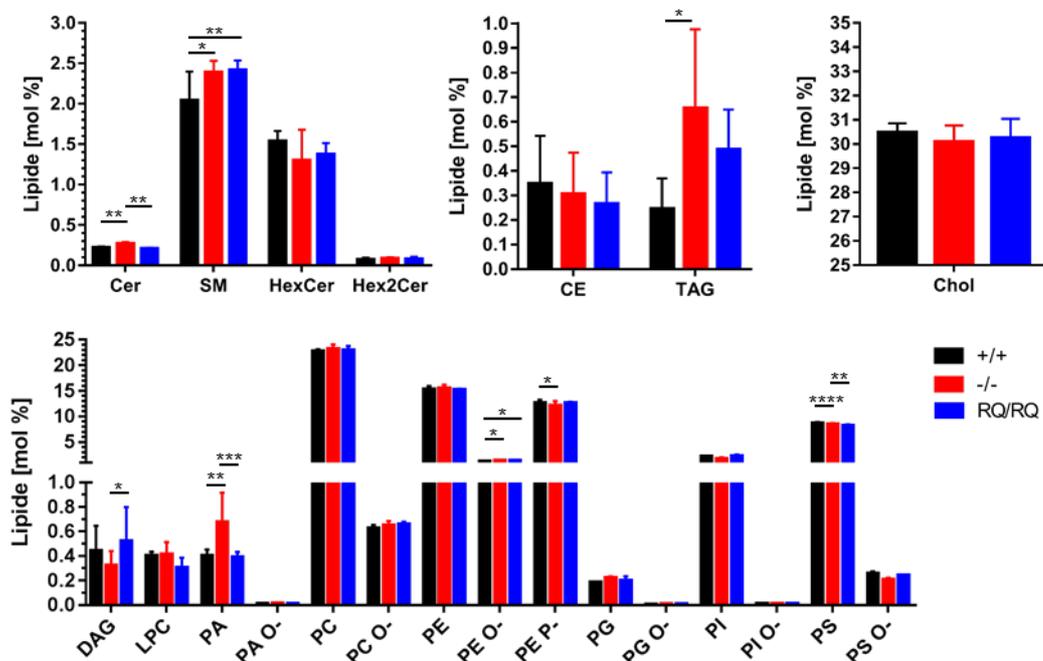


Abbildung 30: Lipidomics Analyse des Kortex von p35 Mäusen. Erkennbar war eine Anreicherung von Ceramiden, Sphingomyelin und weiteren Lipiden. Sphingolipide: Cer = Ceramide, SM = Sphingomyelin, HexCer = Hexosylceramide, Hex2Cer = Dihexosylceramide; Speicherlipide: CE = Cholesterinester; TAG = Triacylglycerole; Chol = Cholesterin; Glycerophospholipide: DAG = Diacylglycerin, LPC = Lysophosphatidylcholin, PA = Phosphatidsäure, PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin, PG = Phosphatidylglycerin, PI = Phosphatidylinositol, PS = Phosphatidylserin. Modifikationen: O- = oxidiert, P- = Plasmalogen. P < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001.

3.2.10. Einfluss der Mutationen auf die Assemblierung der v-ATPase

Da sich der Gehirnphänotyp des *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodells sehr ähnlich waren, ergab sich die Frage, ob die *Atp6v0a2*^{RQ}-V₀-Domaine womöglich einen Defekt der Assemblierung der v-ATPase aufweisen und somit praktisch wie ein Verlust der *Atp6v0a2*-Untereinheit im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell wirken könnte. Um diese Fragestellung zu beantworten wurden *Complexome* aus dem Kortex dieser Mausmodelle von der Arbeitsgruppe von Dr. Ulrich Brandt vom *Nijmegen Centre for Mitochondrial Disorders* angefertigt (Abbildung 31). Für ein *Complexom* wurde Gehirnhomogenat durch ein natives Gel aufgetrennt, sodass die Proteinkomplexe erhalten werden. Dieses Gel wurde in 60 gleichmäßige Streifen geschnitten und von jedem Streifen das Proteom analysiert. Das heißt, werden Proteine eines Protein-Komplexes im gleichen Streifen detektiert, kann davon ausgegangen werden, dass diese einen Komplex bilden, wodurch ihr Molekulargewicht höher wurde als das der einzelnen Untereinheiten. Mittels MALDI-TOF konnte nur die *Atp6v0a1*-Isoform identifiziert werden. Dies bestätigte die Ergebnisse einer neueren Studie, in der die Isoformen *Atp6v0a2* und *Atp6v0a3* in nur sehr geringen Mengen im Gehirn exprimiert werden³⁷. Aus diesem Grund konnten nur indirekte Aussagen zu Assemblierung der *Atp6v0a2*-v-ATPase getroffen werden.

Im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell assemblierten 22 % mehr v-ATPase-Komplexe als in den Wildtyp-Geschwistertieren. Da *Atp6v0a2* in diesem Mausmodell nicht exprimiert wurde⁵³, kann davon ausgegangen werden, dass die V₀-Domaine nur aus *Atp6v0a1* bestand. Dies deutet auf einen kompensatorischen Effekt hin, wodurch der Verlust von *Atp6v0a2* im Golgi-Apparat oder den frühen Endosomen ausgeglichen wurde. Die Gesamtmenge der V₀-Domaine war unverändert. Sehr auffällig war, dass weniger des Proteins *Atp6ap2* in V₀ und [V₁V₀] integrierte. *Atp6ap2* wird pH-abhängig durch Furin im Trans-Golgi-Apparat gespalten^{155,156}. Über diesen Mechanismus wäre eine pH-abhängige Rekrutierung der *Atp6v0a1*-v-ATPase zum Trans-Golgi-Apparat möglich, welche sonst mit gespaltenem *Atp6ap2*-Einheit vorrangig in synaptischen Vesikeln lokalisiert³⁷. Im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Kortex wurde 16 % mehr assemblierte v-ATPase und 16 % weniger V₀-Domaine detektiert als im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte bedeuten, dass die V₀-Domaine mit *Atp6v0a2*^{RQ} stärker mit dem Rotor zur v-ATPase assemblierte. Unterstützt wurde dies dadurch, dass sich 13 % weniger *Atp6v0a1* in der V₀-Domaine befand.

Zusammenfassend erfolgte also im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell eine verstärkte Bildung der v-ATPase, welche nur *Atp6v0a1* als a Untereinheit beinhaltete, wohingegen im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Modell ebenfalls mehr v-ATPase assemblierte, welche dann die mutierte *Atp6v0a2*^{RQ}-Isoform enthielt, welche keine Protonen transportieren konnte. Diese Unterschiede stellen jedoch nur Tendenzen dar, da eine genaue Quantifizierung mittels *Complexome-Profiling* nicht möglich ist.

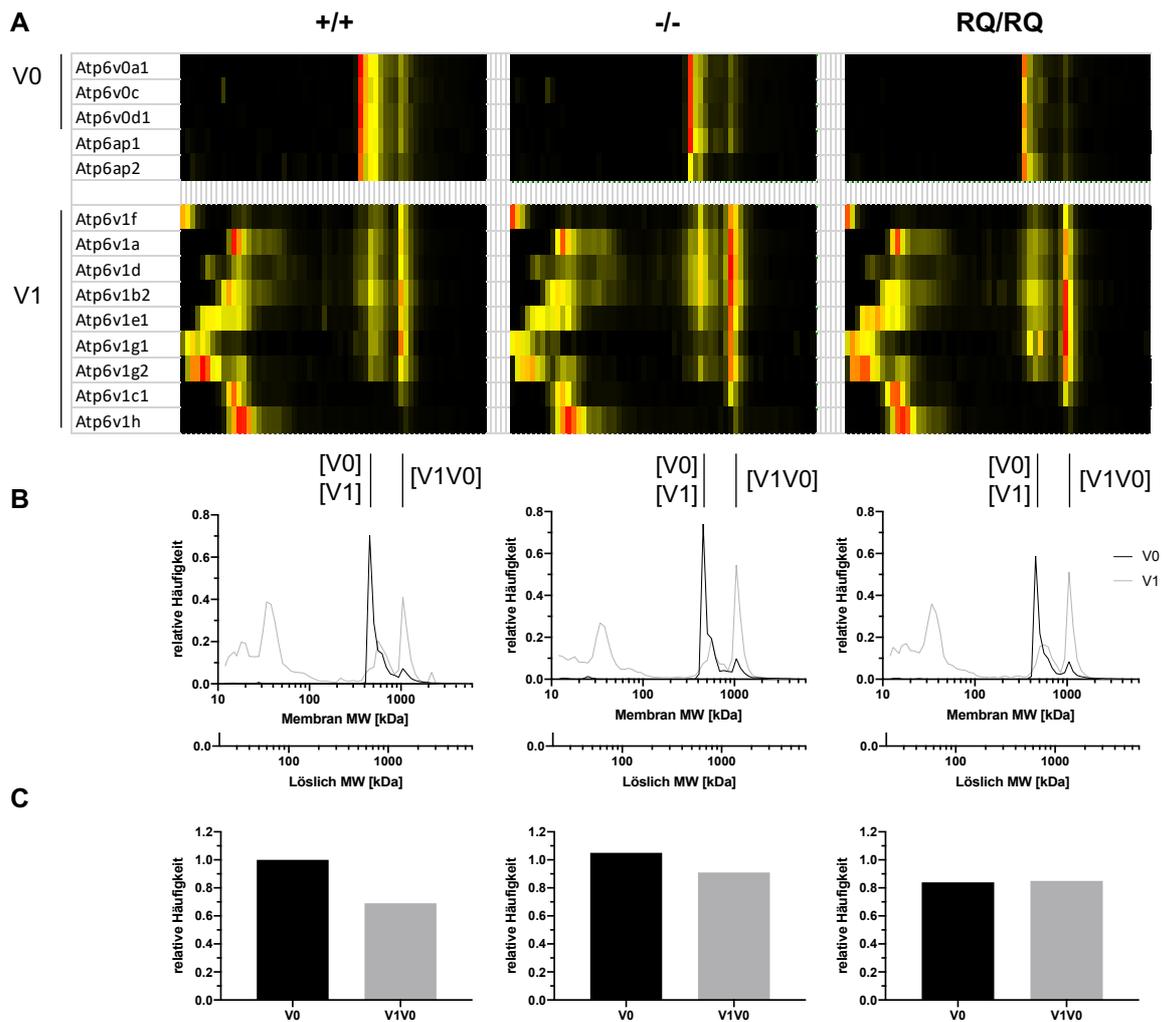


Abbildung 31: Die Assemblierung der v-ATPase im Kortex des Mausgehirns. (A) *Heatmaps* der identifizierten Untereinheiten der v-ATPase, aufgeteilt in V_0 (oben) und V_1 (unten) in einem nativen Polyacrylamidgel (16 bis 4 %). Dargestellt wurden relative Häufigkeiten von 0 (schwarz) bis 1 (rot). (B) Migrationsprofile der V_0 - (schwarz) und V_1 -Domäne (grau) aufgetragen gegen das Molekulargewicht für Membranproteine [V0] und lösliche Proteine [V1V0]. (C) Relative Mengen der V_0 -Domäne und der assemblierten v-ATPase [V1V0]. Durch einen Verlust von *Atp6v0a2* assembliert eine höhere Menge an v-ATPase. Hingegen führt die RQ-Mutation von *Atp6v0a2* zu einer Verringerung der V_0 -Domäne und zu einer erhöhten Assemblierung der v-ATPase. *Atp6v0a2* war nicht identifizierbar und *Atp6v0a3* wurde nur in der Probe einer Maus identifiziert und integrierte nicht in den Komplex, weshalb es nicht in die Analyse einbezogen wurde.

3.2.11. Veränderung der CopI-Assemblierung im Kortex der *Atp6v0a2*-Mausmodelle und *ATP6V0A2* defizienten Patienten-Fibroblasten

Weiterhin wurden die *Complexome*-Daten aus dem präfrontalen Kortex hinsichtlich der Veränderungen des retrograden Transports analysiert. Dabei war eine Verringerung der Rekrutierung des Coatomers zur Membran auffällig (Abbildung 32). Allerdings wurden nur vier von sieben Proteinen des Coatomers identifiziert. Deshalb wurden zusätzlich die *Complexome*-Daten von *ATP6V0A2* defizienten Fibroblasten auf die Assemblierung des COPI-Komplexes analysiert (Anhang 1). Der Vergleich der Daten zeigte deutlich eine verstärkte Assemblierung von COPI-Vesikeln (>800 kDa) in Fibroblasten gegenüber den neuronalen Zellen des Kortex. Dies hängt möglicherweise mit der Funktion der Fibroblasten zusammen. Diese sezernieren große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen, wodurch ein hohes Maß an Recycling der Golgi-Enzyme und -Membranen erforderlich ist. Das Coatomer besitzt ein Molekulargewicht von 160 kDa¹⁵⁷ und wird als gesamter Komplex nach der Aktivierung von Arf1 (21 kDa) zur Membran rekrutiert¹⁵⁸. Trotz gewebespezifischer Unterschiede konnte in beiden Datensätzen das Coatomer bei einem Molekulargewicht von 160 kDa (zytosolisch) identifiziert werden. Des Weiteren konnte ein Komplex identifiziert werden, welcher membrangebunden ein Molekulargewicht von 200 kDa aufwies. Dies stellte das über zwei Arf1 membrangebundene Coatomer dar. In den *Complexome*-Daten der *Atp6v0a2*-Gehirne konnte dieser Komplex durch die Cop-Untereinheiten α , $\beta 1$, $\beta 2$, und δ identifiziert werden. Im Verhältnis zum zytosolischen Coatomer war dieser Komplex deutlich verringert (Abbildung 32C). Dies sprach für eine Verringerung der Aktivierung von Arf1 und einer Reduktion des retrograden Transports in den Zellen des Kortex. Interessanterweise schienen Arfgap1 und Cop δ einen Komplex zu bilden, welcher verstärkt im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Modell auftrat. Die genauere Bedeutung müsste weiter untersucht werden. In den Daten der ARCL2A-Fibroblasten wurde ebenfalls eine Verringerung der Bildung von COPI-Vesikel gegenüber den Kontrollzellen beobachtet.

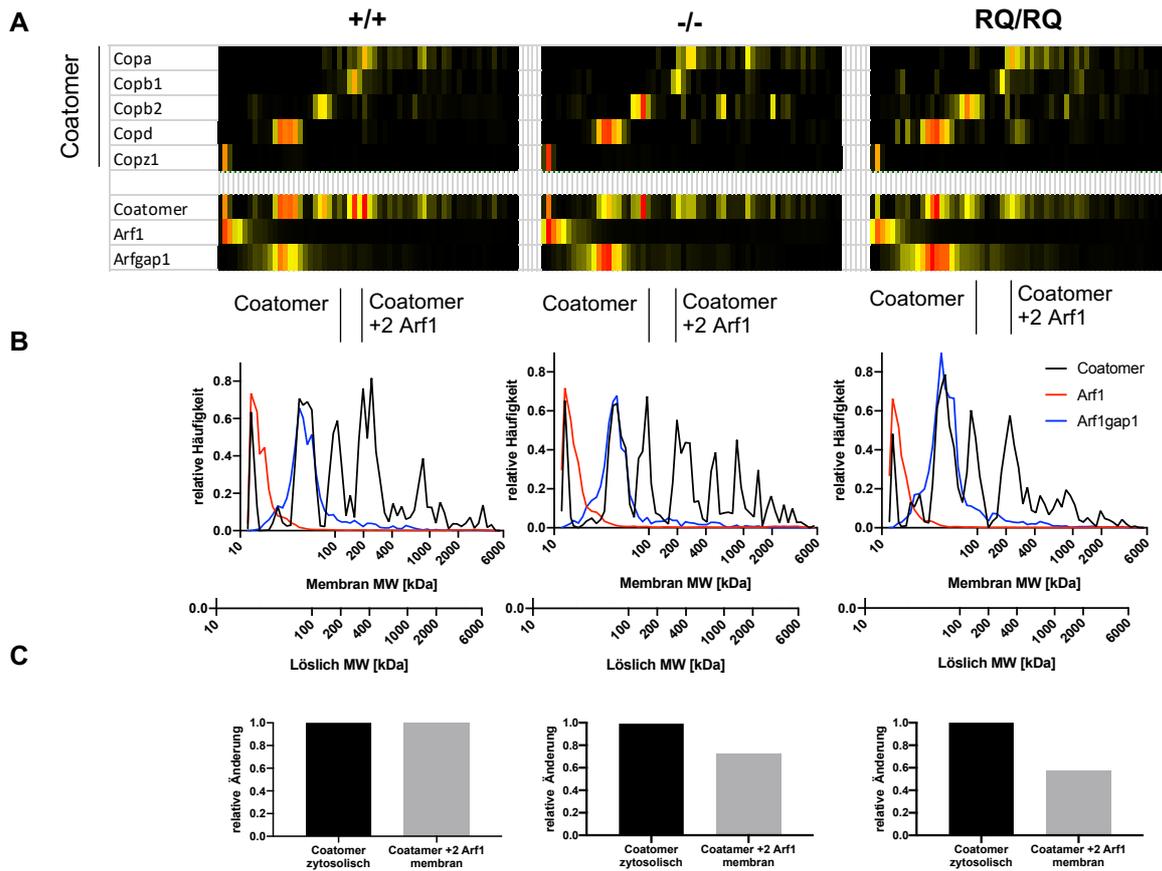


Abbildung 32: Verringerte Rekrutierung des Coatomers zur Membran im CopI-Transport. (A) *Heatmaps* der identifizierten Untereinheiten des Coatomers, Arf1 und Arfgap1 in einem nativen Polyacrylamidgel (16 bis 4 %). Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten von 0 (schwarz) bis 1 (rot). (B) Migrationsprofile des Coatomers (schwarz), Arf1 (rot) und Arf1gap1 (blau) aufgetragen gegen das Molekulargewicht für Membranproteine und zytosolische Proteine. (C) Relative Mengen des zytosolischen Coatomers bei 160 kDa und des über zwei Arf1 an der Membran gebundenen Coatomers bei 200 kDa.

3.2.12. Der Funktionsverlust von *Atp6v0a2* beeinträchtigt nicht die N-Glykosylierung im adulten Mausgehirn

Zur Analyse der N-Glykosylierung wurde der präfrontale Kortex von p35 Tieren sowie e13,5 Gehirnen (Daten von Johannes Kopp) verwendet, da in diesem Bereich die neuronale Übermigration auftrat (Abbildung 33). Als Marker für Glykosylierungsdefekte haben sich die Proteine Tgn38 (Maushomolog von TGN46) und Lamp2 etabliert¹⁵⁹. Das Protein Tgn38 ist stark sialiert (N- und O-glykosyliert) und lokalisiert vorrangig im Trans-Golgi-Apparat¹⁶⁰. Im Immunoblot war hinsichtlich Bandenintensität und Molekulargewicht kein Unterschied zwischen homozygoten Tieren und Kontrollen erkennbar. Das Protein Lamp2 lokalisiert in Lysosomen und ist in der Maus 17-fach N-glykosyliert und einmal O-glykosyliert¹⁶¹. In der Analyse von Lamp2 war ebenfalls kein Unterschied erkennbar. Zusätzlich konnte die Glykosylierung der sekretorischen Proteine Gpr56 und Col3a betrachtet werden (Abbildung 22). Das Protein Gpr56 ist siebenfach N-glykosyliert¹⁶² und Col3a einfach O-glykosyliert¹⁶³. Es war bei diesen Proteinen kein Unterschied im Immunoblot erkennbar. Weiterhin wurde die N-Glykanierung mittels MALDI-TOF (Abbildung 34) und den Lektinen *Sambucus Nigra* (SNA), *Peanut Agglutinin* (PNA) und *Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin* (E-Pha) analysiert (Abbildung 33). Erneut war kein Unterschied messbar. Alle verfügbaren Methoden führten zu dem Ergebnis, dass kein N-Glykosylierungsdefekt im Mausgehirn bestand. Dennoch kann keine Veränderung der N-Glykosylierung ausgeschlossen werden, da die Glykosylierung nur zu den Entwicklungszeitpunkten e13,5 und p35 untersucht wurde. Außerdem könnte durch sensitivere Methoden oder der Untersuchung anderer Proteine ein Defekt detektiert werden.

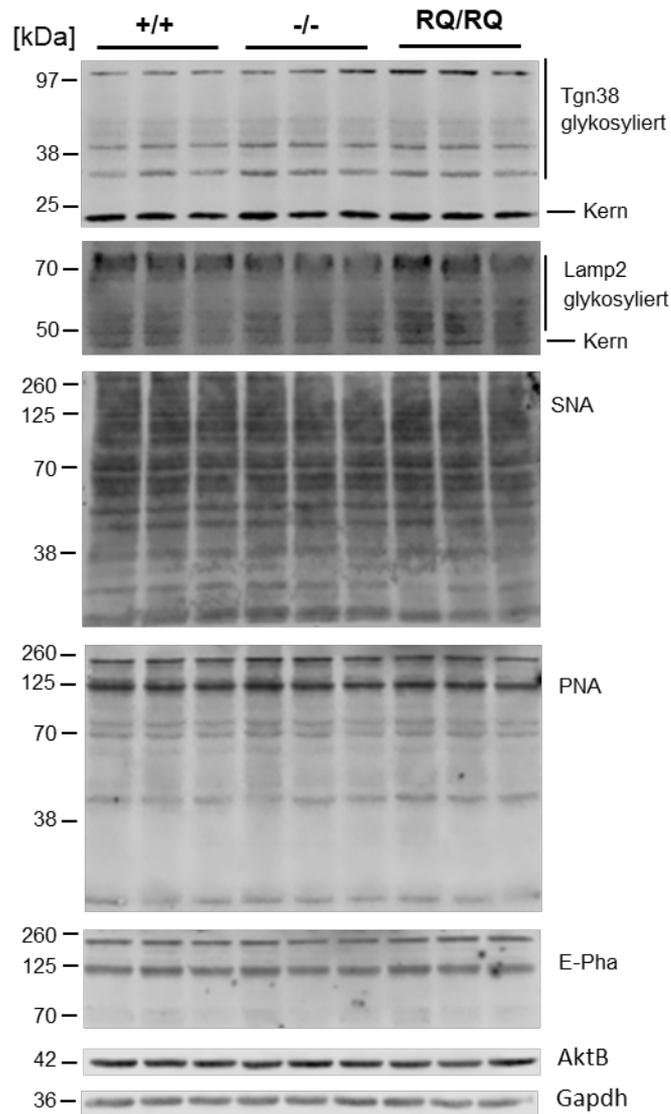


Abbildung 33: Untersuchung der N-Glykosylierung in p35 Mausgehirnen durch Immunoblots von Tgn38, Lamp2, den Lektinen SNA, PNA und E-Pha. Bei Tgn38 handelte es sich um ein Trans-Golgi-Protein und bei Lamp2 um ein lysosomales Protein, welche hochglykosyliert sind. Lektine binden spezifisch an Zuckerketten, wodurch diese gezielt im Immunoblot detektiert werden konnten. In keinem Immunoblot ist ein Unterschied erkennbar. Dies spricht für eine unveränderte Glykosylierung im präfrontalen Kortex der adulten Mäuse.

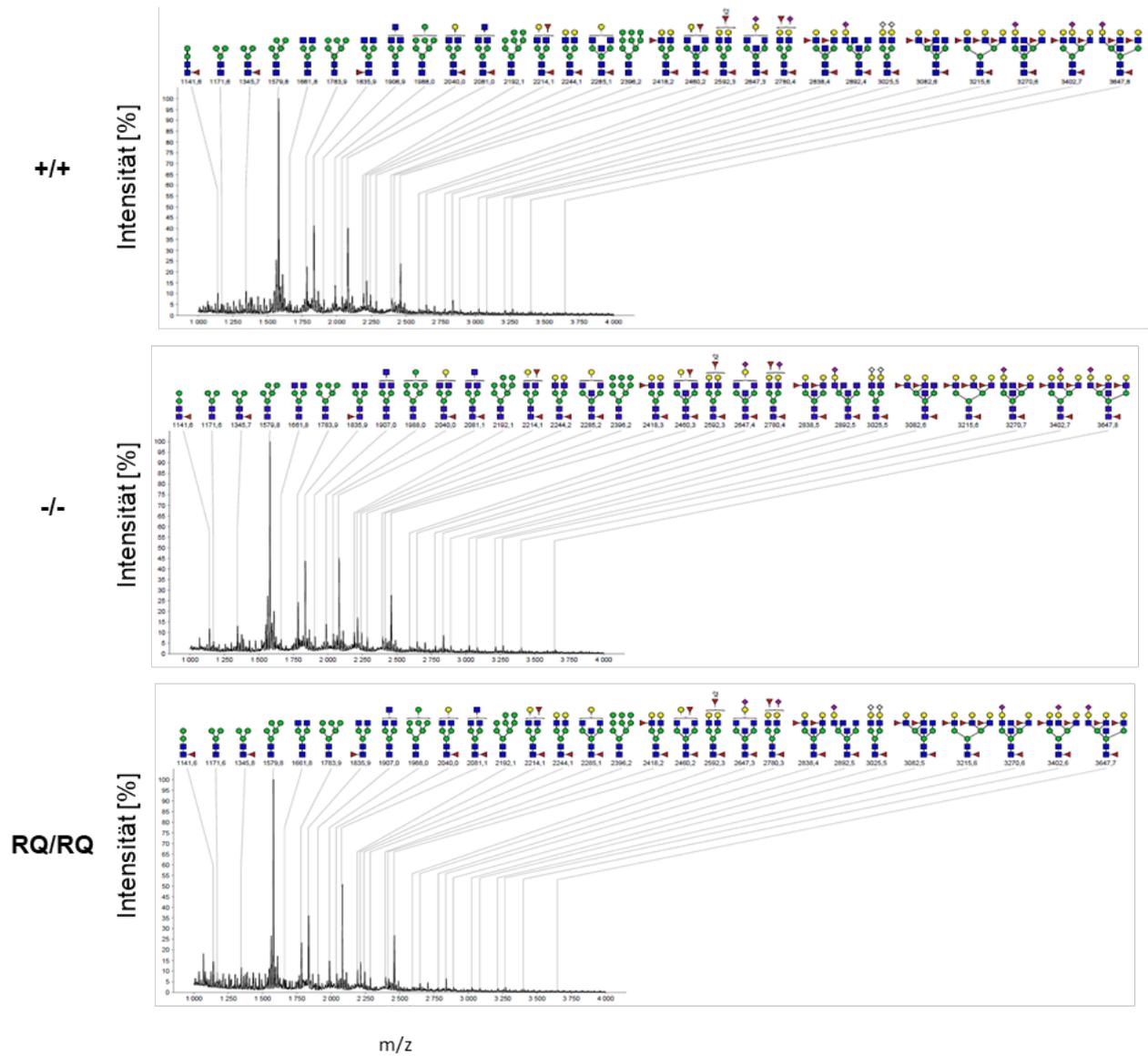


Abbildung 34: N-Glykan-Spektren aus dem frontalem Kortex von p35 Mäusen. Weder im *Atp6v0a2*^{-/-}- noch im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell ist ein Unterschied erkennbar.

3.3. Reduktion der Dermis-Dicke und Verringerung des Elastin-Gehalts in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen

Eines der auffälligsten Merkmale der ARCL2A und WSS ist deren faltige Haut, welche vor allem im Kindesalter stark ausgeprägt ist¹. In einer optischen Begutachtung der *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse war keine faltige Haut erkennbar. Dessen ungeachtet wurden Übersichtsfärbungen angefertigt, da sich der Haut-Aufbau von Mensch und Maus grundlegend unterscheidet.

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde eine Verminderung der Dermis-Schicht unter den Geschwistertieren beobachtet (Abbildung 35A). Da sich die Dicke der Haut und der Dermis als sehr variabel darstellte und unter anderem vom Haarzyklus abhängt¹⁶⁴, wurde die Dermis-Dicke von weiblichen p35 Tiere über mehrere Würfe analysiert (Abbildung 35B). Im Mittel wurde für die Wildtyp-Tiere eine Dicke der Dermis von 220 µm, von den *Atp6v0a2*^{-/-}-Tieren von 142 µm und von *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen eine Dermis-Dicke von ca. 140 µm gemessen. Keines der analysierten homozygoten Tiere wies eine Dicke über 200 µm auf. Bei genauerer Betrachtung der Übersichtsfärbung, wirkte die Dermis der homozygoten Tiere kompakter als die Dermis der Wildtyp-Mäuse, in der die lila-rosa gefärbten Fasern deutlicher erkennbar waren.

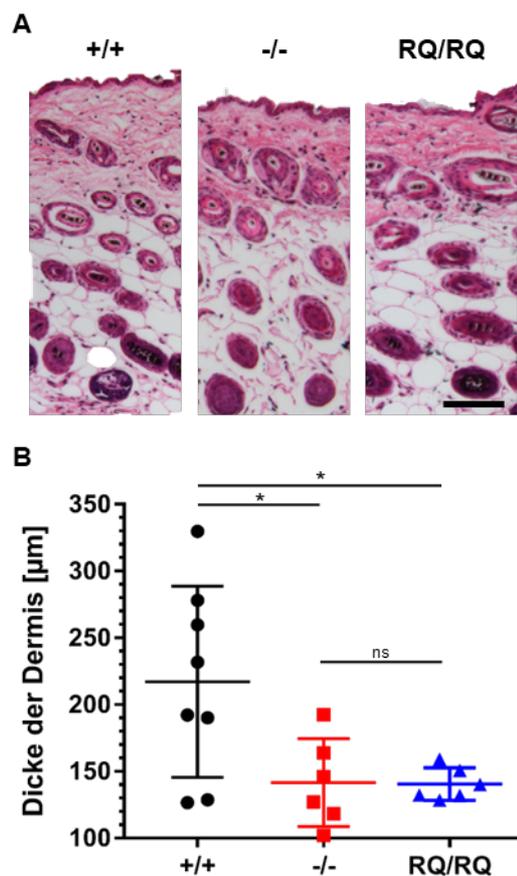


Abbildung 35: Reduktion der Dermis-Dicke. (A) Hämatoxylin-Eosin Färbung der Haut von p35 Tieren. Die Abgrenzung der Dermis ist deutlich anhand der rosa gefärbten Fasern erkennbar. Maßstab = 100 μm . (B) Quantifizierung der Dermis-Dicke von A. $P * < 0,05$.

Weiterhin ist die schlaaffe Haut der ARCL2A-Patienten assoziiert mit einer Reduktion der elastischen Fasern¹. Deshalb wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ingrid Haußer-Siller von der Universität Heidelberg ultrastrukturelle Aufnahmen der *Atp6v0a2*^{-/-}-Haut angefertigt (Abbildung 36A) und zusätzlich die Reduktion der elastischen Fasern über einen Immunoblot validiert (Abbildung 36B, C). Während in den analysierten Wildtyp-Mäusen die elastischen Fasern in normaler Anzahl vorhanden waren, waren diese in der *Atp6v0a2*^{-/-}-Maus nur vereinzelt vorhanden. Dazu waren diese weniger elektronendicht. Dies ließ auf einen verringerten Elastin-Gehalt schließen. Dazu offenbarten sich große extrazelluläre Räume. Ein ähnliches Bild lieferte die Analyse der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Maushaut. Es waren große leere extrazelluläre Räume erkennbar, in denen die wenigen Bündel elastischer Fasern leicht zu identifizieren waren. Außerdem waren in diesem Mausmodell die Kaliber (Dicke) der kollagenen Fasern verringert und unregelmäßig, welches auf ein Problem in der Assemblierung schließen ließ. Die Reduktion der elastischen Fasern aus der ultrastrukturellen Analyse wurde durch *Immunoblotting* für die *Atp6v0a2*^{-/-}-Maushaut auf 63 %, sowie für das *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell auf 42 % bestätigt.

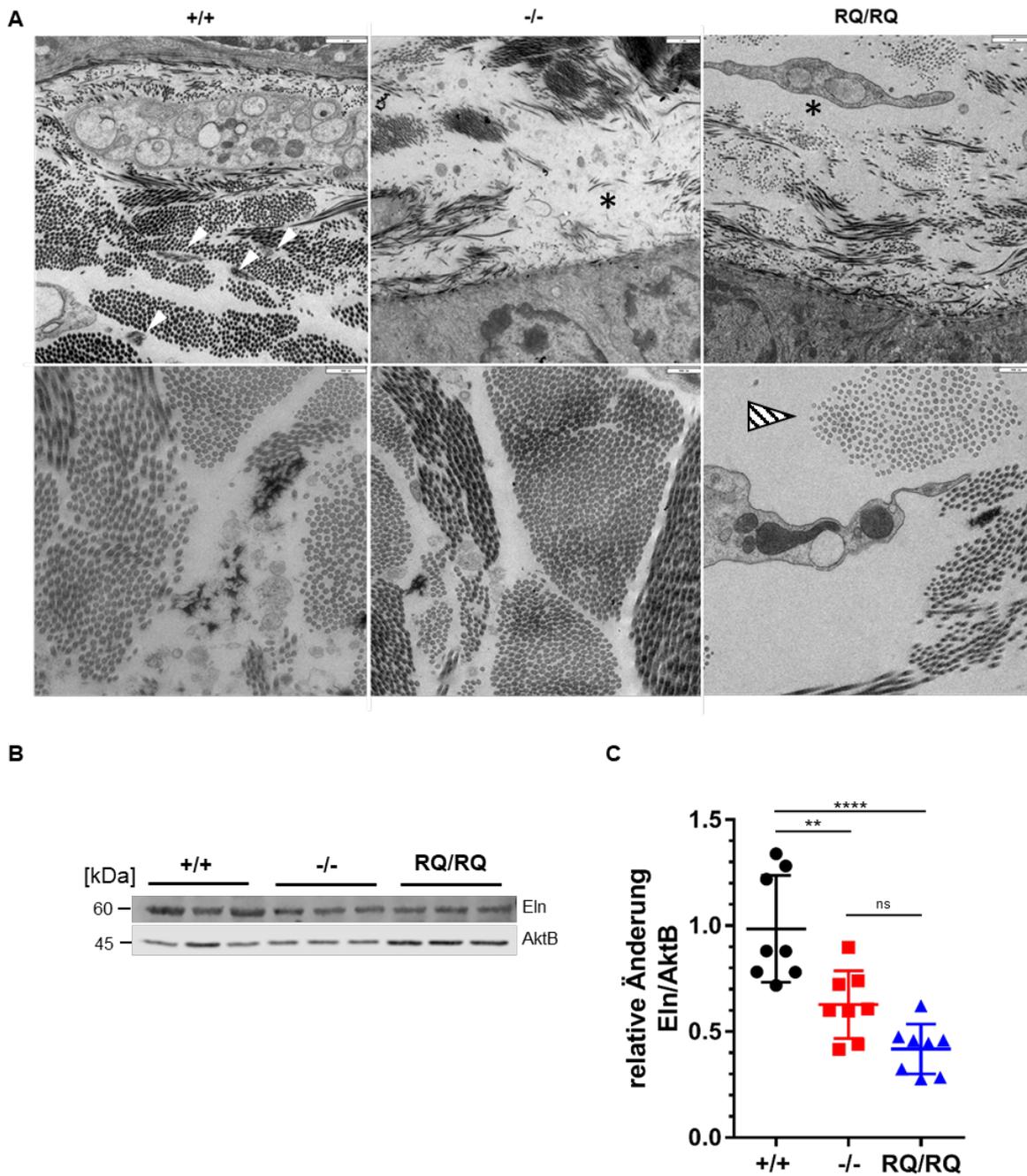


Abbildung 36: Veränderung der extrazellulären Matrix in der Haut. (A) Ultrastrukturelle Aufnahmen der Haut von p35 Tieren. Oben) Übersichtsaufnahmen, erkennbar sind große intrazelluläre Räume (*) und die Reduktion an elastischen Fasern. Die elastischen Fasern sind mit weißen Pfeilen markiert. Maßstab = 1 μ m. Unten) Aufnahme der elastischen Fasern und kollagenen Fasern. In den homozygoten Mäusen sind die wenigen elastischen Fasern gut erkennbar. In der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Haut sind die Kaliber der kollagenen Fasern unregelmäßig und verringert (gestrichelter Pfeil). Maßstab = 500 nm. (B) Immunoblot von Elastin (Eln) aus der Haut von p35 Mäusen. (C) Quantifizierung der Elastinmenge von B. P ** < 0,01; **** < 0,0001.

3.3.1. Stärkere Glykanierung in der Haut und veränderte Sekretion von Dekorin

Sowohl die eventuelle Funktion von *Atp6v0a2* im vesikulären Transport als auch ein veränderter pH-Wert im Trans-Golgi-Apparat können zu einer veränderten Sekretion führen. Als Modellprotein für die Analyse der Sekretion in der Haut eignete sich Dekorin, weil es in die extrazelluläre Matrix sezerniert und außerdem ein Proteoglykan darstellt, welches eine Dermatansulfat-Kette (50 kDa) enthält¹⁶⁵. Außerdem ist es stark N-glykosyliert, wodurch die Analyse des Proteins auch Hinweise zu einer Störung der Glykosylierung liefern kann. Mittels Immunoblot wurden in Wildtyp-Mäusen mehrere Banden detektiert (Abbildung 37A). Eine Bande des Kernproteins bei 40 kDa, eine Bande mit 50 kDa und eine prägnante Bande von ca. 60 bis 90 kDa, welche die am höchsten glykanierte Form darstellt. Diese Bande wurde bei den *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäusen mit einem höheren Molekulargewicht von ca. 70 bis 100 kDa detektiert. Oberhalb dieser Bande waren deutlich zwei weitere Banden bei ca. 110 und 125 kDa erkennbar. Diese höheren Banden sind am plausibelsten durch verlängerte Dermatansulfat-Ketten des Dekorins erklärlich. Beim *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell hingegen erschien das Molekulargewicht des Dekorins gegenüber den Kontrolltieren unverändert, allerdings war die Intensität der glykanierten Banden geringer (Abbildung 37B). Da die Intensität des Kernproteins ebenfalls verringert war, deutete dieses auf eine verringerte Translation oder den erhöhten Abbau von Dekorin hin, aufgrund der veränderten Glykosylierung. Hingegen könnte die Übermodifikation des Dekorins im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell auf eine längere Verweildauer im Golgi-Kompartiment hinweisen, durch die die Glykosylierungsenzyme mehr Zeit hatten, die Glykosaminoglykan-Ketten zu verlängern. Zum besseren Verständnis der Glykosylierung in der *Atp6v0a2*-Maushaut wurde von beiden homozygoten Linien in Zusammenarbeit mit Dr. François Foulquier deren N-Glykane analysiert (Abbildung 37C). Dabei wurden bei der *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Maushaut veränderte Spektren gemessen. Sehr auffällig waren eine erhöhte Spitze bei 3026 m/z mit folgender Reduktion der Intensität des Spektrums ab 3026 m/z. Allein bei der *Atp6v0a2*^{-/-}-Maushaut war eine erhöhte Basislinie des Spektrums von Beginn erkennbar und eine erhöhte Spitze bei 2244 m/z. Diese Daten sprechen für eine schlechtere Modifikation von N-Acetylglucosamin, Galaktose und Sialinsäure in der Haut des *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodells. Hingegen wirkte die Veränderung des Spektrums der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Maushaut weniger stark. Es wäre möglich, dass in diesem Mausmodell nur die Addition der Sialinsäure reduziert war oder die höher molekularen Glykosaminoglykan-Strukturen verringert waren.

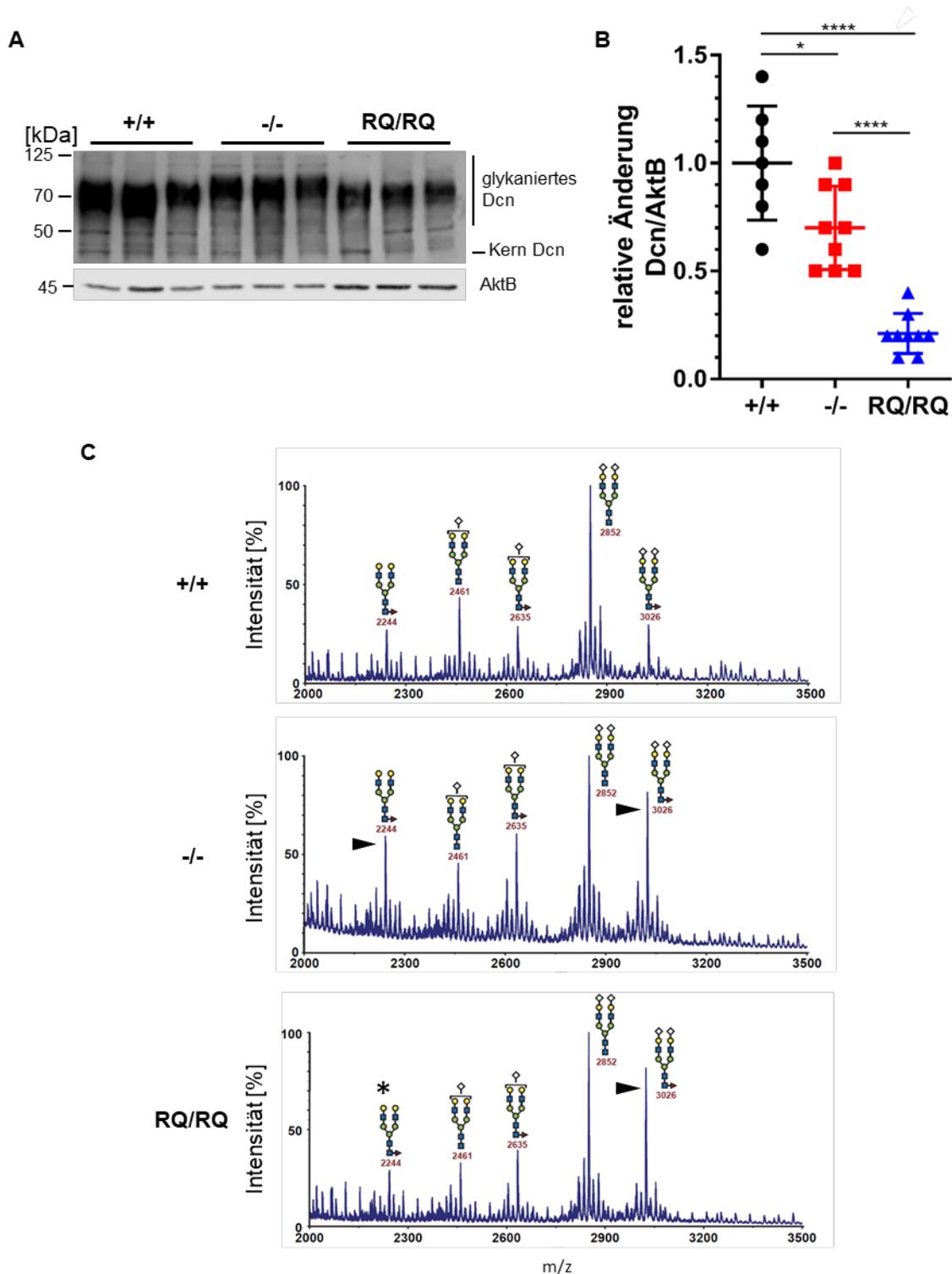


Abbildung 37: (A) Immunoblot von Dekorin (Dcn) aus der Haut von p35 Mäusen. Erkennbar ist eine verstärkte Glykosylierung von Dcn im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell. Hingegen ist die Menge an Dcn in der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Haut reduziert. (B) Quantifizierung von A. $P < 0,05$; **** $< 0,0001$. (C) N-Glykananalyse der Maushaut. Von oben nach unten sind repräsentative N-Glykan-Spektren von drei Wildtyp, drei *Atp6v0a2*^{-/-} und drei *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen dargestellt. Auffällig sind Spitzen bei 2244 und 3026 m/z (schwarze Pfeile). Die Spitze bei 2244 m/z war im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell nicht erhöht (*).

3.3.2. Deregulierter TGF- β Signalweg

Eine Veränderung der extrazellulären Matrix und der Glykanierung von Dekorin in der Maushaut könnte den TGF- β Signalweg beeinflussen. Einfach zu untersuchen war dieser Signalweg über die nachgeschaltete Phosphorylierung von Smad2 (Abbildung 38). Im Immunoblot gab das Verhältnis von Phospho-Smad2 zu Gesamt-Smad2 zwischen dem Wildtyp und dem *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell keinen signifikanten Unterschied. Im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell betrug dieses Verhältnis allerdings nur 0,2. Dies sprach für eine verringerte Aktivierung des TGF- β Signalwegs. Auffällig war dabei, dass sich die Menge an Gesamt-Smad2 deutlich zwischen den Mausmodellen unterschied. In der Haut der *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäuse war eine Verringerung von Gesamt-Smad2 erkennbar, wohingegen das Gesamt-Smad2 im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Modell um die 2,8-fache Menge deutlich erhöht war. Die Menge an Phospho-Smad2 war bei den *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäusen auf die 0,8-fache Menge und bei den *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen auf die 0,6-fache Menge reduziert. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass über die verstärkte Expression von Gesamt-Smad, die verringerte Aktivierung des TGF- β Signalwegs kompensiert werden sollte.

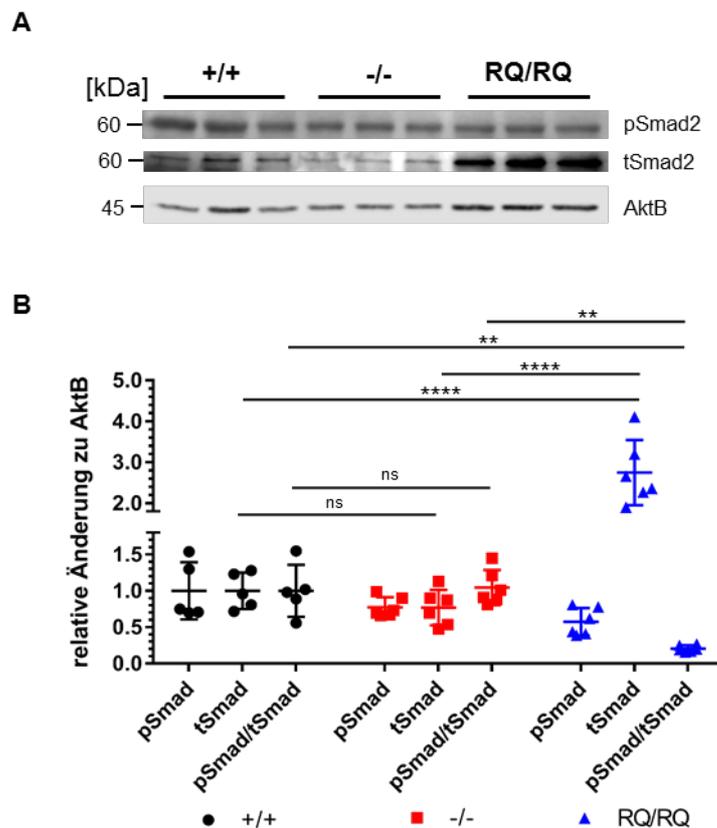


Abbildung 38: Deregulation des TGF- β Signalwegs in der Maushaut. (A) Immunoblot von Phospho-Smad2 (pSmad) und Gesamt-Smad2 (tSmad2). (B) Quantifizierung von A. Im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell ist eine deutliche Deregulation des TGF- β Signalweges erkennbar. pSmad ist nicht signifikant verändert. P ** < 0,01; **** < 0,0001.

3.4. Unfruchtbarkeit und Globozoospermie in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen

Überraschenderweise entstanden bei Verpaarungen homozygoter männlicher *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Tiere mit Wildtyp-Weibchen keine Nachkommen (Tabelle 21). Dies führte zu dem Schluss, dass der Funktionsverlust von *Atp6v0a2* die Fertilität von Spermien beeinträchtigt. Die heterozygoten Tiere beider Mauslinien waren fertil. Die Kreuzung von *Atp6v0a2*^{+/-}- oder *Atp6v0a2*^{+/RQ}-Tieren untereinander, ergab nicht das Mendelsche Verhältnis der F2-Generation, weil die Anzahl an homozygoten Tieren mit 18 % für *Atp6v0a2*^{-/-}-Tiere beziehungsweise 15 % für *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Tiere zu gering ausfiel.

Tabelle 21: Verpaarungen *Atp6v0a2* heterozygoter und *Atp6v0a2* defizienter Mäuse

Genotyp ♂	Genotyp ♀	Anzahl Verpaarungen	Dauer [d]	Nachkommen		
				Würfe	Tiere	hom [%]
-/-	+/+	3	> 56	0	0	-
RQ/RQ	+/+	3	> 56	0	0	-
+/-	+/-	14	> 28	85	564	18
+/RQ	+/RQ	12	> 28	59	405	15

Zur Aufklärung dieser Infertilität wurden Hoden und Nebenhoden dieser Mauslinien analysiert. Die Größe der *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Hoden war um ca. 10 % verringert (Abbildung 39). Dieser Unterschied ließ sich wahrscheinlich mit der verminderten Größe der homozygoten *Atp6v0a2*-Tiere erklären.



Abbildung 39: Aufnahmen der Hoden von p105 Mäusen. Die Hoden-Größe der homozygoten *Atp6v0a2*-Tiere war um 10 % reduziert. Allerdings waren die homozygoten *Atp6v0a2*-Mäuse auch kleiner als die Kontrolltiere. Maßstab = 10 mm.

Die Analyse der Hoden mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung offenbarte in beiden Mauslinien reife Spermien mit einem runden stark kondensierten Nukleus. Dieser Phänotyp entsprach einer Globozoospermie (Abbildung 40). In gesunden Mausspermien ähnelt der Spermienkopf einer Sichel, welche in den Wildtyp-Kontrollen erkennbar war. Die Spermiovorstufen und Sertoli-Zellen waren in beiden homozygoten Mauslinien unauffällig. Der Phänotyp der Globozoospermie war in den Nebenhoden der *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse erkennbar. Die Morphologie der heterozygoten Spermien entsprach in beiden Mauslinien dem Wildtyp (Ergebnisse nicht gezeigt).

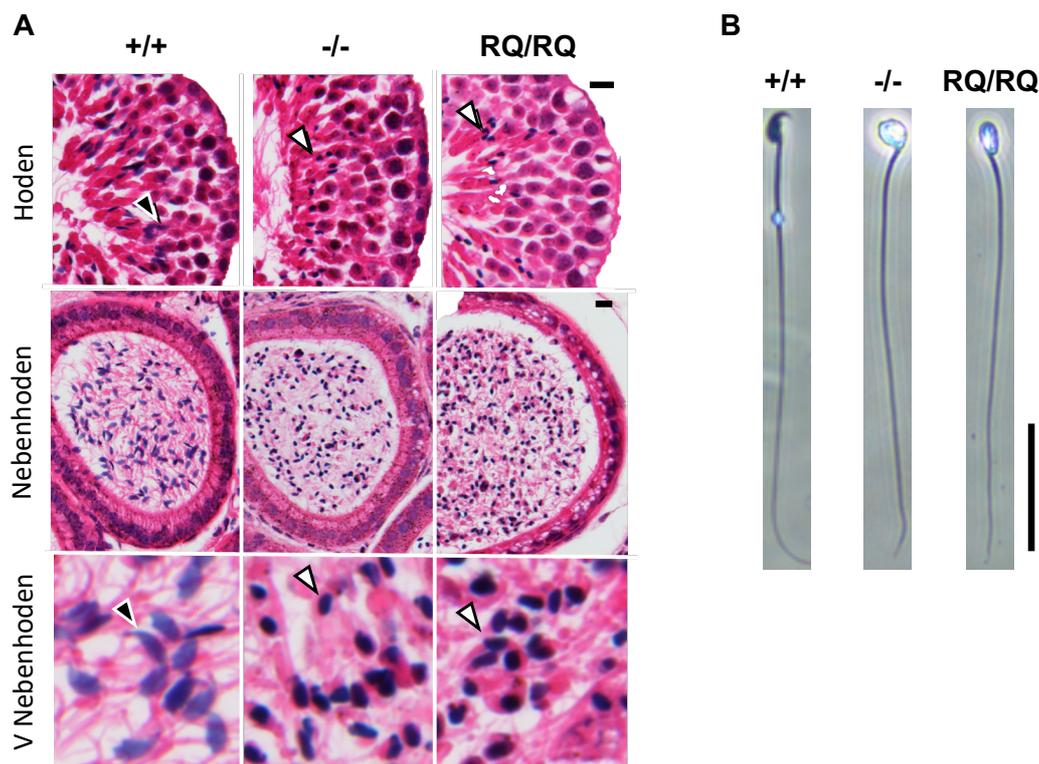


Abbildung 40: Globozoospermie *Atp6v0a2* defizienter Mäuse. (A) Hoden- und Nebenhoden-Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Erkennbar sind in den Hoden und Nebenhoden von *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen die runden Köpfe der Spermien. (Weißer Pfeil zeigt Spermien mit einer Globozoospermie im Hoden.) In den Spermien der Wildtyp-Geschwistertiere ist die für Mausspermien typische Sichelform des Kopfes erkennbar (schwarzer Pfeil). Unten sind die Spermien des Nebenhodens vergrößert dargestellt. Maßstab = 10 µm. (B) Phasenkontrastaufnahme der Spermien aus der Cauda epididymis. Erneut ist in den Kontroll-Mäusen die Sichelform der Spermienköpfe erkennbar. Hingegen ist der Kopf aller Spermien der *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Tiere rund. Maßstab = 100 µm. Die Ergebnisse wurden aus dem Gewebe von p105 Mäusen erzeugt.

Zur weiteren Untersuchung der Morphologie wurden die lebenden Spermien aus dem Nebenhodenschwanz (lat. Cauda epididymidis) mittels Lichtmikroskopie im Phasenkontrast untersucht (Abbildung 40B). Dabei war in den Wildtyp-Spermien deutlich die Sichelform des Kopfes erkennbar und in den homozygoten Männchen erneut die runden Köpfe der Globozoospermie, deren Kopfgröße jedoch variierte. In der Länge des Flagellums war kein Unterschied erkennbar.

3.4.1. Die Spermien sind immotil und deren Anzahl ist reduziert

Die Spermien-Motilität und deren Anzahl stellen wichtige Parameter für die Fertilität dar. Zur Untersuchung der Motilität wurden Spermien ebenfalls aus dem Nebenhodenschwanz verwendet (Abbildung 41). Die Werte der Kontrolltiere von Wildtyp und heterozygoten Mäusen für die Spermien-Motilität betragen im Mittel 55 % für motile, 20 % für progressive und 25 % für immotile Spermien. Bei den *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäusen waren die motilen Spermien auf 8 % und die progressiven Spermien auf 2 % reduziert, wodurch sich die Anzahl der immotilen Spermien auf 90 % erhöhte. Im gleichen Bereich lagen die Motilitätswerte der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäuse bei 11 % motilen, 1 % progressiven und 87 % immotilen Spermien. Die Reduktion der Motilität von *Atp6v0a2*^{-/-}- und der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen war signifikant. Die Anzahl der Spermien betrug in den *Atp6v0a2*^{-/-}-Mäusen $1,5 \cdot 10^6$ Spermien/ μ L und bei den *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen ebenfalls im Mittel $1,5 \cdot 10^6$ Spermien/ μ L. Der mittlere Kontrollwert der Wildtyp und heterozygoten Mäuse wies $5,2 \cdot 10^6$ Spermien/ μ L auf. Somit war die Spermienanzahl um den Faktor 5 reduziert und signifikant.

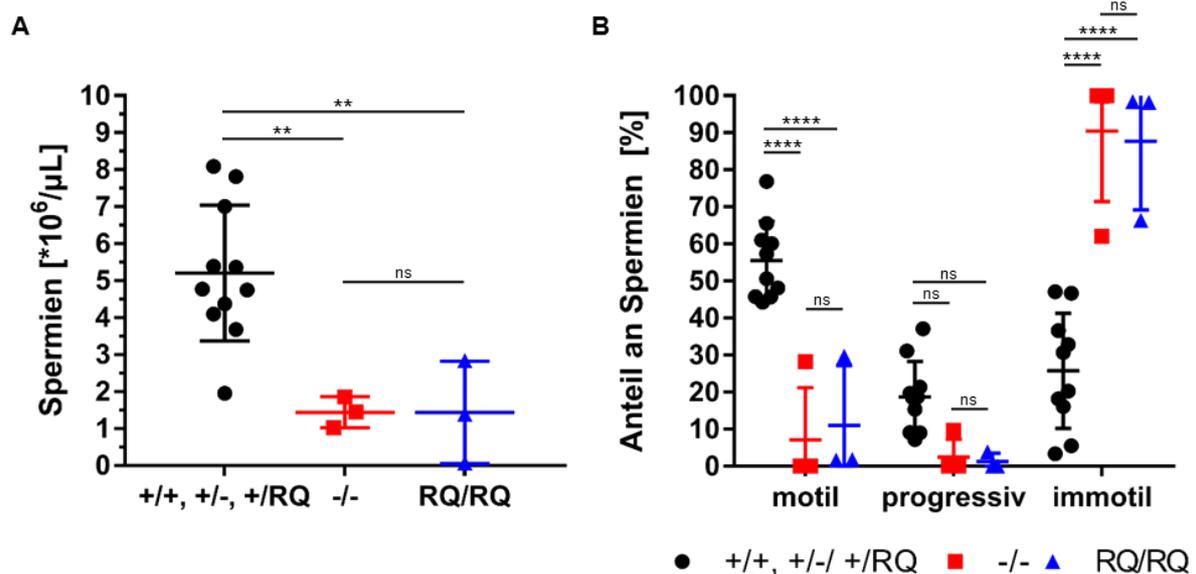


Abbildung 41: Bestimmung der Spermienanzahl (A) und Spermienbeweglichkeit (B). Beide Parameter wurden mittels IVOS Spermien-Analysator mit Spermien aus dem Nebenhodenschwanz von p105 Mäusen ermittelt. P ** < 0,01; **** < 0,0001.

3.4.2. Die Bildung des Akrosoms bricht innerhalb der Golgi-Phase ab

Da die Fehlbildung oder das Fehlen eines wirklichen Akrosoms ein typisches Merkmal einer Globozoospermie darstellt, wurde die Bildung des Akrosoms untersucht. Eine Möglichkeit dieser Untersuchung war die Immunfluoreszenz der Galactosyl-(β -1,3) N-Acetylgalactosamin-Struktur mittels dem Lektin PNA, da in Spermien nur akrosomale Proteine mit dieser Zuckerstruktur modifiziert werden (Abbildung 42).

Während der Akrosombildung werden Vesikel vom Golgi-Apparat zum Zellkern transportiert und fusionieren zu einer runden Zellorganelle. Diese Phase wird als Golgi-Phase bezeichnet. Innerhalb der *Atp6v0a2* defizienten Mausspermien werden diese Vesikel scheinbar vom Golgi-Apparat transportiert, können allerdings nicht zu einer größeren Organelle fusionieren. Dies führt in der Immunfluoreszenz mittels PNA zu kleineren Punkten am Zellkern. Zusätzlich ist erkennbar, dass diese rudimentären proakrosomalen Vesikel weiter entfernt vom Zellkern lokalisieren als das proakrosomale Vesikel der Golgi-Phase in Wildtyp-Spermien.

Um auszuschließen, dass aufgrund eines Glykosylierungsdefektes, das Fehlen der Galactosyl(β -1,3)-N-Acetylgalactosamin-Struktur, zu einer mangelnden Detektion des Akrosoms führt, wurde eine Immunfluoreszenz gegen das akrosomale Markerprotein Sp56 wiederholt. Somit hat der Glykosylierungsstatus der Proteine keinen Einfluss auf die Detektion des Akrosoms. Mit dieser Methode waren die fragmentierten proakrosomalen Vesikel erkennbar und es war ebenfalls kein Akrosom in den reifen Spermien detektierbar (Daten nicht gezeigt).

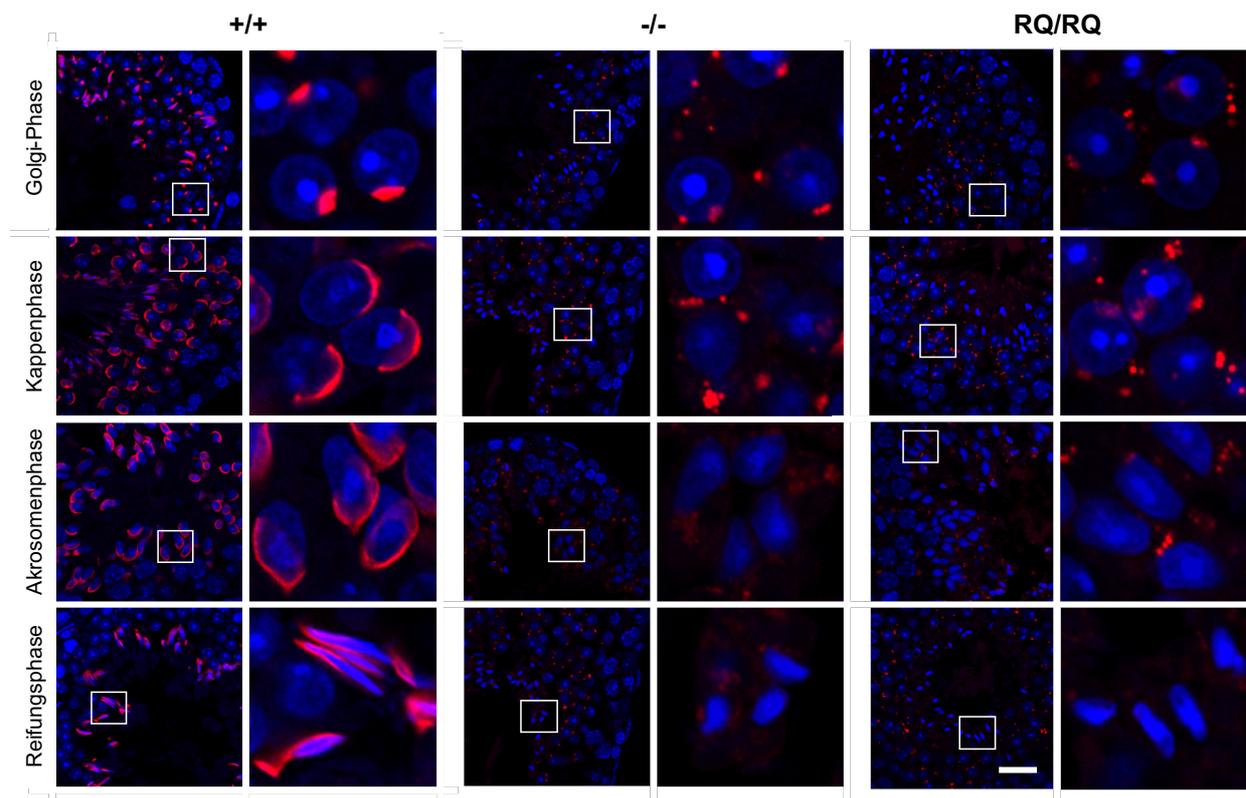


Abbildung 42: Fehlerhafte Akrosombildung homozygoter *Atp6v0a2*-Spermien. Die Akrosomen wurden mittels PNA (rot) und die Zellkerne der Spermien durch DAPI (blau) in p105 Hoden angefärbt. Die weißen Boxen zeigen vergrößerte Aufnahmen der vier Phasen der Akrosomenreifung. Deutlich erkennbar sind innerhalb der *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Hoden die einzelnen akrosomalen Vesikel innerhalb der Golgi-Phase, welche nicht fusionieren. Dies führt zu fragmentierten Akrosomen in der Akrosomenphase, welche in der Reifungsphase nicht detektierbar sind. Maßstab = 20 µm. (Diese Aufnahmen wurden von Nina Stelzer erstellt.)

3.4.3. Ultrastrukturelle Aufnahmen offenbaren einen Vesikelfusionsdefekt des Akrosoms

Zur erweiterten Charakterisierung der morphologischen Defekte wurden die Spermatiden und Spermien zusammen mit Herrn Dr. Meinhardt von der Uni Gießen ultrastrukturell analysiert (Abbildung 43). In der Aufnahme der Wildtyp-Spermatiden bildeten sich innerhalb der Golgi-Phase ein akrosomales Vesikel in der Nähe des Zellkerns. In den reifen Spermien waren deutlich langgestreckte Zellerkerne mit schmalen Akrosom sichtbar. Im Gegensatz dazu waren in den Spermatiden des *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodells in der Nähe des Zellkerns nur leere proakrosomale Vesikel erkennbar. Außerdem befanden sich in den Spermatiden größere Vesikel ohne Inhalt, welche Golgi-Derivate oder Vakuolen darstellten. Diese schienen keinen Anschluss an das proakrosomale Vesikel zu haben. Bei Betrachtung der reifen *Atp6v0a2*^{-/-}-Spermien war eine deutliche Fehlbildung des Kopfes erkennbar, welcher groß, rund und durch zu viel überschüssiges Zytoplasma amorph erschien. Das Akrosom wurde nicht ausgebildet und es sind Golgi-Derivate oder Vakuolen erkennbar. Im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell zeigte sich eine leicht veränderte Morphologie. Die Vesikel als Golgi-Derivate waren kaum vorhanden oder klein als Aufhellung (ohne Inhalt) erkennbar. Außerdem waren die proakrosomalen Vesikel eher als einzelner Saum erkennbar, allerdings weit vom Kern entfernt. In den reifen *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Spermien war ebenfalls eine Fehlbildung des Kopfes erkennbar. Dieser war zu groß, rund und das Spermium enthielt zu viel Zytoplasma. Es waren reife fragmentierte akrosomale Strukturen vorhanden und zusätzliche Aufhellung in der Nähe des Zellkerns. Gemeinsam war in den Spermien der homozygoten *Atp6v0a2*-Mausmodelle eine fehlerhafte Insertion des Schwanzes an der Basalplatte, hinzukommen mehrere Spermischwanz-Bildungen innerhalb des Zytoplasmas. Diese Schwanzfehlbildungen sind sehr wahrscheinlich auf eine Fehlbildung der Mikrotubuli-Manschette zurückzuführen, welche ihre Orientierung über die Verknüpfung mit dem Akrosom erhält.

Zusammenfassend zeigen die Spermien beider homozygoter *Atp6v0a2*-Mausmodelle eine Chromatinkondensationsstörung des Zellkerns, unterschiedliche Grade einer Akrosomenbildungsstörung und Schwanzfehlbildungen, welche in einer Globozoospermie enden. Gerade die Akrosomenbildungsstörung im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell mit den vielen Golgi-Derivaten deuten auf ein Problem während der Vesikelfusion oder den Transport der Vesikel während der Bildung des Akrosoms hin. Dieser Phänotyp ist im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell abgeschwächt.

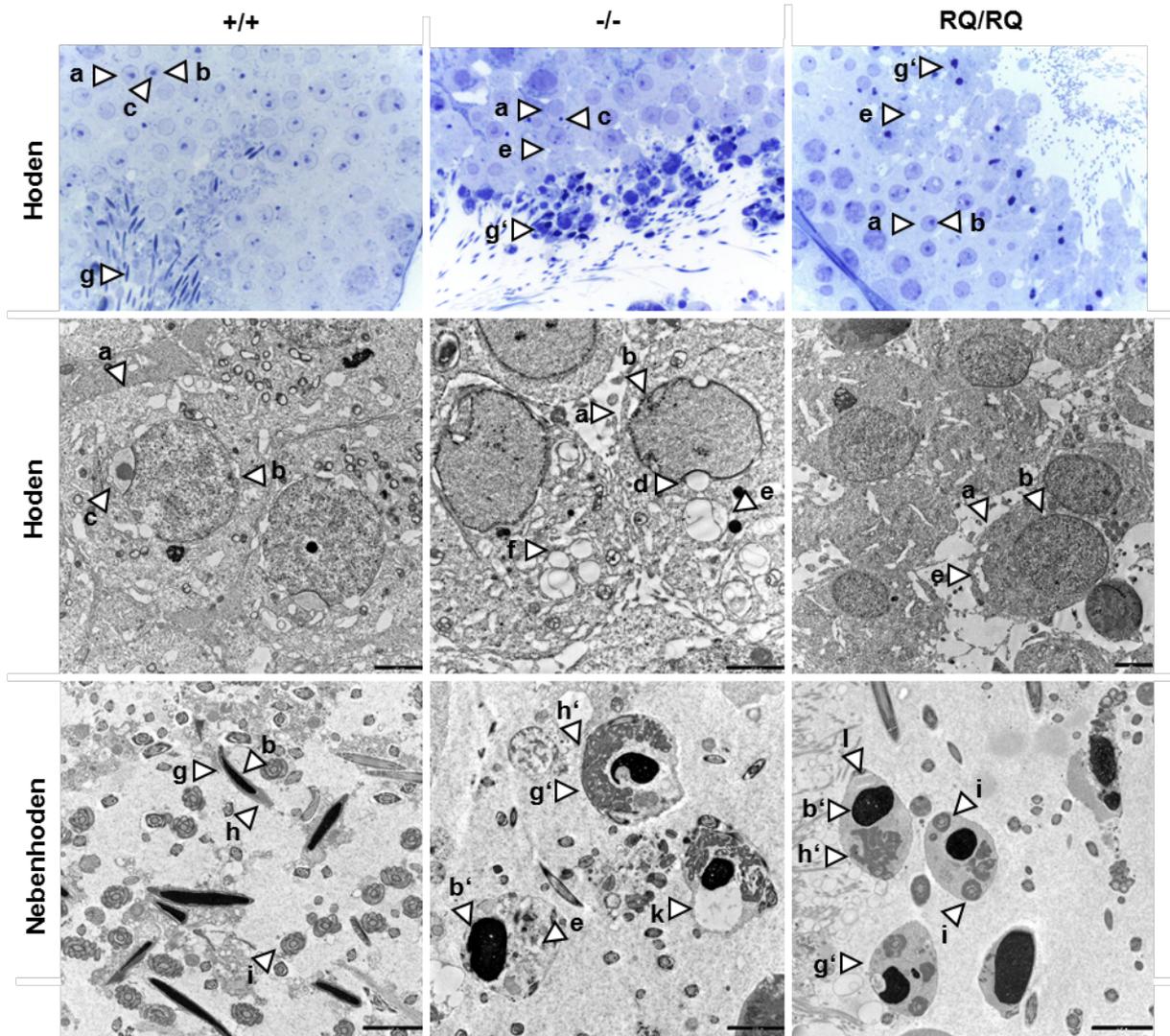


Abbildung 43: Ultrastrukturelle Analyse von Spermatiden und Spermien. (Oben) Toluidinblau-Färbung der Hoden: Im Wildtyp-Hoden sind Spermatiden (a) mit Zellkern (b) proakrosomalen Vesikeln (c) und Spermien (g) erkennbar. Hingegen sind in den *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Hoden eine Hypospermatogenese mit Vakuolen (e) und Globozoospermien (g') identifizierbar. (Mitte) Spermatiden im Hoden: Im Wildtyp-Hoden sind Spermatiden in der Golgi-Phase dargestellt. Klar erkennbar ist das proakrosomale Vesikel am Zellkern. In *Atp6v0a2*^{-/-}-Hoden sind Spermatiden mit leerem proakrosomalem Vesikeln (d), Vakuolen und fragmentiertem Golgi-Apparat (f) vorhanden. Im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Hoden sind diese Vesikel kleiner und weiter entfernt vom Kern. (Unten) Reife Spermien im Nebenhoden: Im Wildtyp sind schmale kondensierte Zellkerne und Akrosomen (h) vorhanden. Weiterhin sind viele quer angeschnitten Schwänze (i) sichtbar. In den homozygoten *Atp6v0a2*^{-/-}-Spermien sind runde Zellkerne (b') mit fragmentiertem Akrosom (h') erkennbar, welche viel überschüssiges Zytoplasma (k) enthalten. Die Bildung von Vakuolen ist in den *Atp6v0a2*^{-/-}-Spermien verstärkt. Hingegen ist in den *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Spermien eine leichte Aufhellung im Bereich des Golgi-Apparats (l) erkennbar. Maßstab = 2500 nm.

3.4.5. Erhöhte Expression von Gopc im Hoden

Zur weiteren Untersuchung der abnormalen Akrosom-Entwicklung in den *Atp6v0a2* defizienten Spermien wurde die Proteinexpression der Proteine *Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein* (Gopc) und *Protein Interacting with C Kinase-1* (Pick1) mittels Immunoblotting untersucht (Abbildung 44). Beide Proteine sind am akrosomalen Vesikeltransport beteiligt und zusätzlich führt ein Defekt dieser Proteine zu einer Globozoospermie. Diese Analyse ergab eine erhöhte Proteinexpression von Gopc in beiden Mausmodellen, welche sich beim *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell als signifikant erwies (Abbildung 44). Pick1 war unverändert.

3.4.6. Reduktion von Galactosyl-(β -1,3) N-acetylgalactosamin-Glykane im Hoden

Zum Ausschluss eines Glykosylierungsdefekts im Hoden, wurde diese posttranslationale Modifikation mittels der Lektine SNA und PNA mittels Immunoblot untersucht (Abbildung 44). Unerwarteterweise war in den homozygoten *Atp6v0a2*-Hoden eine Veränderung des PNA Bandenmusters erkennbar. Es fehlten die Proteinbanden über 125 kDa, zwei prägnante Banden von ca. 80 bis 90 kDa und ein unscharfes Proteinsignal von 80 bis 38 kDa. Bei genauerer Betrachtung war ebenfalls eine erhöhte Intensität einer SNA markierten Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 70 kDa im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell erkennbar. Dieses Ergebnis wies auf eine O-Glykosylierungsstörung oder Veränderung der Proteintranslation im Maushoden hin.

3.4.7. Normale Expression von *Atp6v0a2*^{RQ} im Hoden

Da die Spermien-Analyse nur geringe Unterschiede zwischen *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ} aufwies, wurde untersucht, ob das Protein *Atp6v0a2*^{RQ} stabil vorhanden war (Abbildung 44). Das Proteinlevel von *Atp6v0a2*^{RQ} wies im Immunoblot keinen Unterschied zum Wildtyp-Protein auf. Wie zu erwartet, war im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell kein Protein nachweisbar.

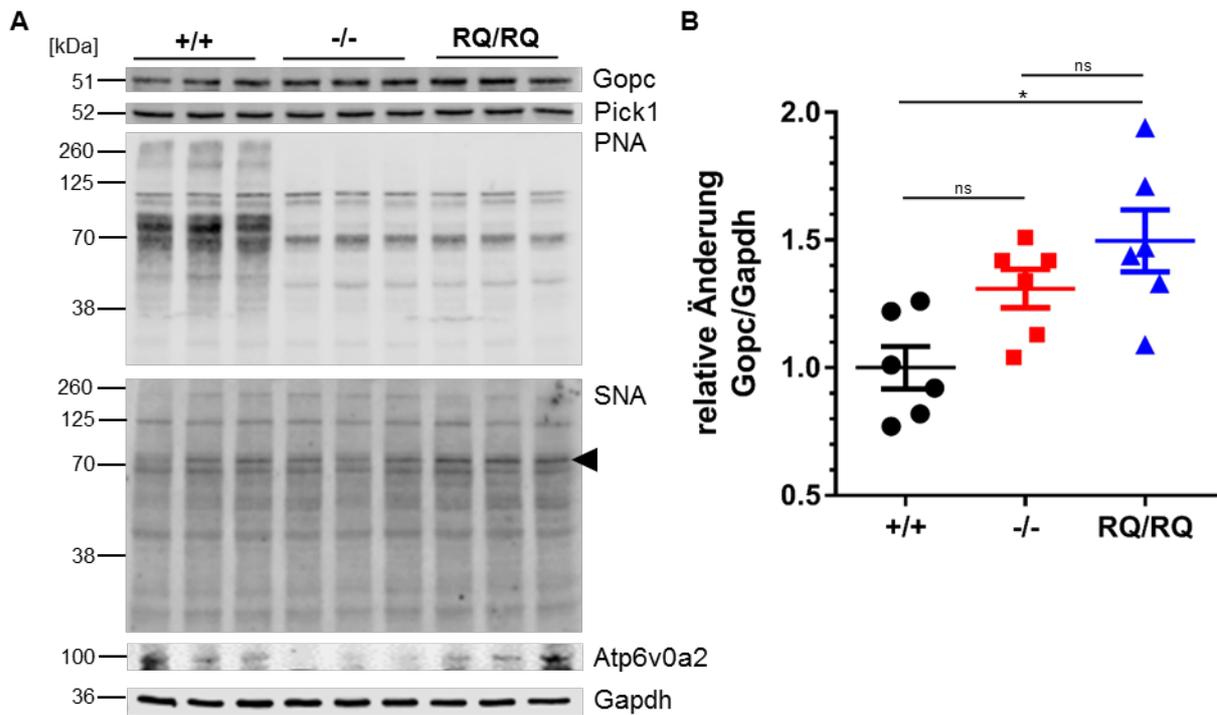


Abbildung 44: Immunoblot von Hodenhomogenaten. (A) Dargestellt sind die Immunoblots der Proteine Gopc, Pick1, Atp6v0a2 und der Lektine PNA und SNA von p105 Hoden. Gapdh fungierte als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der Intensität der Gopc-Bande aus A. $P < 0,05$.

3.5. Molekulare Charakterisierung *Atp6v0a2* defizienter Mefs

3.5.1. Erhöhung des pH-Wertes im Golgi-Apparat durch Funktionsverlust von *Atp6v0a2*

Durch Überexpression von *ATP6V0A2* war es Denise Jahn (AG Kornak) möglich dessen Lokalisation im Trans-Golgi-Apparat von Hela-Zellen zu bestimmen⁵³. Daher sollte eine Fehlfunktion von *Atp6v0a2* den pH-Wert des Golgi-Apparats beeinflussen. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert in Mefs untersucht (Abbildung 45). Diese Analyse wurde über das Quenchen von Fluorescein (FITC) durchgeführt, welches durch die Kopplung an Cholera toxin nach Endozytose im Golgi-Apparat lokalisiert. Die Fluoreszenz wurde durch die Erhöhung des pH-Wertes verstärkt. Über eine Standardkurve wurde der pH-Wert errechnet. Innerhalb der *Atp6v0a2*^{-/-}-Mefs wurde ein pH-Wert des Golgi-Apparats von 6,8 und bei den *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs ein pH-Wert von 6,95 gemessen. Bei den Kontroll-Mefs lag der pH-Wert bei 6,7. Beide Messungen waren signifikant unterschiedlich. Zusätzlich wurden Wildtyp-Mefs über Nacht mit Chloroquin (CQ), Bafilomycin a1 (Baf) und Ammoniumchlorid (NH₄Cl) behandelt. Die schwachen Basen CQ und NH₄Cl diffundierten in den Golgi-Apparat und erhöhten den pH-Wert auf 7,2 und 7,0. Baf stellt einen Inhibitor für alle v-ATPasen dar und führte zu einer starken pH-Veränderung von 7,8.

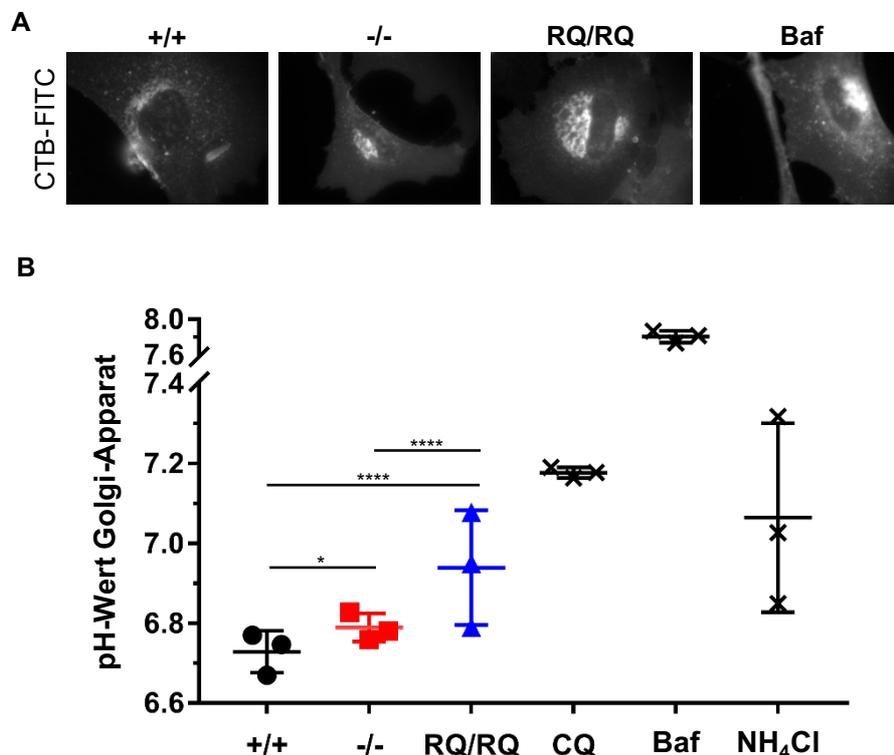


Abbildung 45: Messung des pH-Wertes im Golgi-Apparat von Mefs. (A) E13,5 Mefs wurden mit Cholera toxin-FITC (CTB-FITC) behandelt und die Fluoreszenz im Golgi-Apparat bei 480 nm bestimmt. Über die Fluoreszenz-Intensität wurde der pH-Wert im Golgi-Apparat analysiert. Deutlich erkennbar ist die stärkere Intensität im Golgi-Apparat der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs und den mit Bafilomycin (Baf) behandelten Wildtyp-Mefs. (B) Analyse des pH-Wertes im Golgi-Apparat. Als Kontrollen wurden Wildtyp-Mefs mit Chloroquin (CQ), Bafilomycin (Baf) und Ammoniumchlorid (NH₄Cl) behandelt. P * < 0,05; **** < 0,0001.

3.5.2. Reduzierter retrograder Transport im Golgi-Apparat

Eine einfache Möglichkeit die Auswirkungen des Funktionsverlustes von *Atp6v0a2* und die resultierende pH-Wert-Veränderung auf den Vesikeltransport zu analysieren, ist die Analyse des retrograden Golgi-Transports mittels BFA. BFA bindet an GEFs, die normalerweise Arf1 aktivieren. Dies führt einerseits zum sofortigen Verlust der COPI-Hülle, andererseits aber auch zur Ausstülpung von Membrantubuli von den Golgi-Zisternen, die zur Fusion von Golgi- und ER-Kompartimenten führen¹⁶⁶. Es handelt sich somit um einen pathologischen retrograden Transport. Die Morphologie der Golgi-Apparate wurde nach Zugabe von BFA durch Immunfluoreszenz des Marker-Proteins Giantin untersucht. Deutlich erkennbar war der schnelle Zerfall der Golgi-Apparate von Wildtyp-Mefs nach 8 min BFA Inkubation. Nur noch 18 % der Golgi-Apparate waren intakt. Hingegen waren zu diesem Zeitpunkt noch 80 % der Golgi-Apparate der *Atp6v0a2*^{-/-}-Mefs unbeeinträchtigt. Überraschender Weise waren 50 % der Golgi-Apparate der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs nicht kollabiert. Dies stellt einen Hinweis von *Atp6v0a2* in der Vesikelfusion dar.

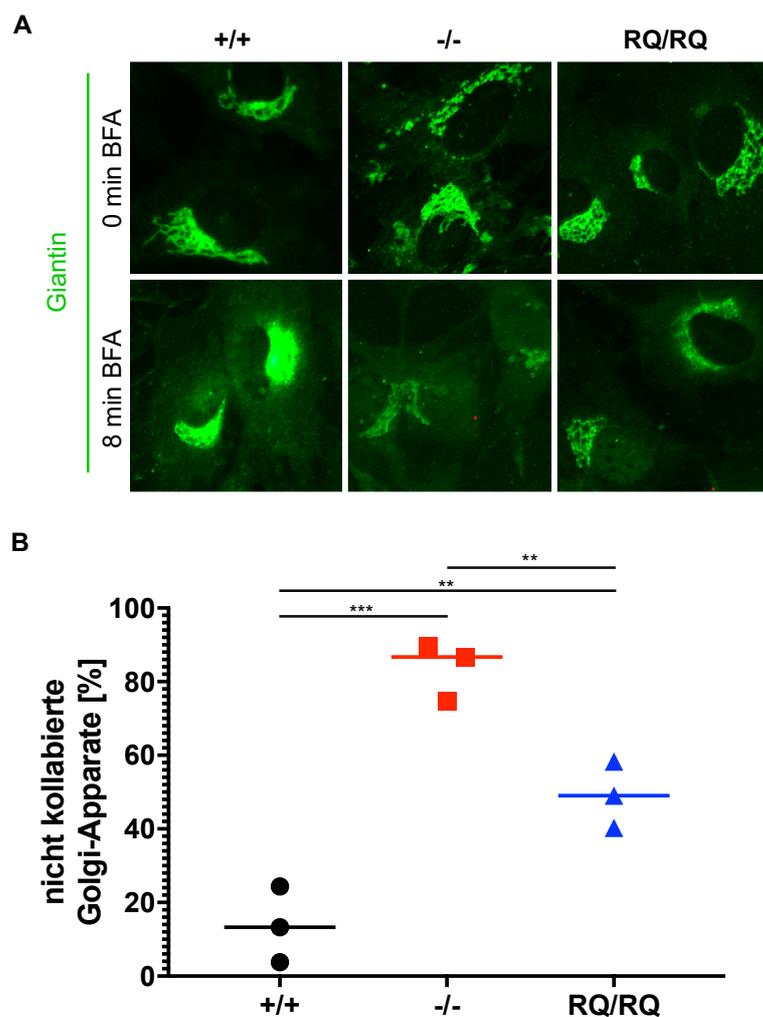


Abbildung 46: BFA-Analyse zur Untersuchung des retrograden Transports. (A) E13,5 Mefs wurden 8 min mit BFA behandelt und anschließend die Morphologie des Golgi-Apparats anhand des Markers Giantin untersucht. (B) Quantifizierung der intakten nicht kollabierten Golgi-Apparate von A. Der Golgi-Apparat ist innerhalb der Wildtyp-Mefs zerfallen. Dieser Prozess verläuft in den *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs langsamer ab. P ** < 0,01; *** < 0,001.

3.5.3. Beeinträchtigung der Sialylierung

Eine Standard-Methode zur Detektion eines CDG besteht in der Analyse der Sialylierung von Transferrin und Apolipoprotein CIII im Serum der Patienten durch die Isoelektrische Fokussierung. Diese zeigten bei ARCL2A-Patienten einen N- und O-Glykosylierungsdefekt. Sowohl die Isoelektrische Fokussierung von Transferrin war unauffällig in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen⁵³, als auch die Analyse von Tgn38 und Lamp2 im Gehirn (Abbildung 33).

Aus diesem Grund sollte die Sialylierung *in-vitro* untersucht werden, auch um die Effekte des pH-Wertes im Golgi-Apparat und das Fehlen von *Atp6v0a2* direkt analysieren zu können. Sichtbar machen und messen ließ sich die Sialylierung über die metabolische Markierung von N-Azidoacetyl-Mannosamin-tetraacyliert (ManNAz). Dieser Zucker ist zellpermeabel, wird innerhalb der Zellen zu einem Sialinsäure-Analogon verstoffwechselt und im Golgi-Apparat auf das Ende der Zuckerketten von Proteinen und Lipiden transferiert¹⁶⁷. Über die Azidoacetyl-Gruppe kann ein Fluorophor gekoppelt und die Zuckerketten visualisiert werden. Anschließend wurde über die Intensität des Golgi-Apparats die Effizienz der Sialylierung bestimmt (Abbildung 47). Innerhalb der *Atp6v0a2*^{-/-}- und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs war eine Reduktion der Fluoreszenz im Golgi-Apparat messbar und deutete auf eine verringerte Effizienz der Sialylierung hin. Genauer wurden im Mittel der Wildtyp-Mefs eine Intensität von 3111, in *Atp6v0a2*^{-/-}-Mefs 2381 und in *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs 2724 gemessen. Als Kontrollen wurden Tunicamycin (TNM) und CQ verwendet. TNM inhibiert den Transfer von N-Acetylglucosamin und CQ erhöht den pH-Wert im Golgi-Apparat, wodurch die Glykosylierung beeinträchtigt wird.

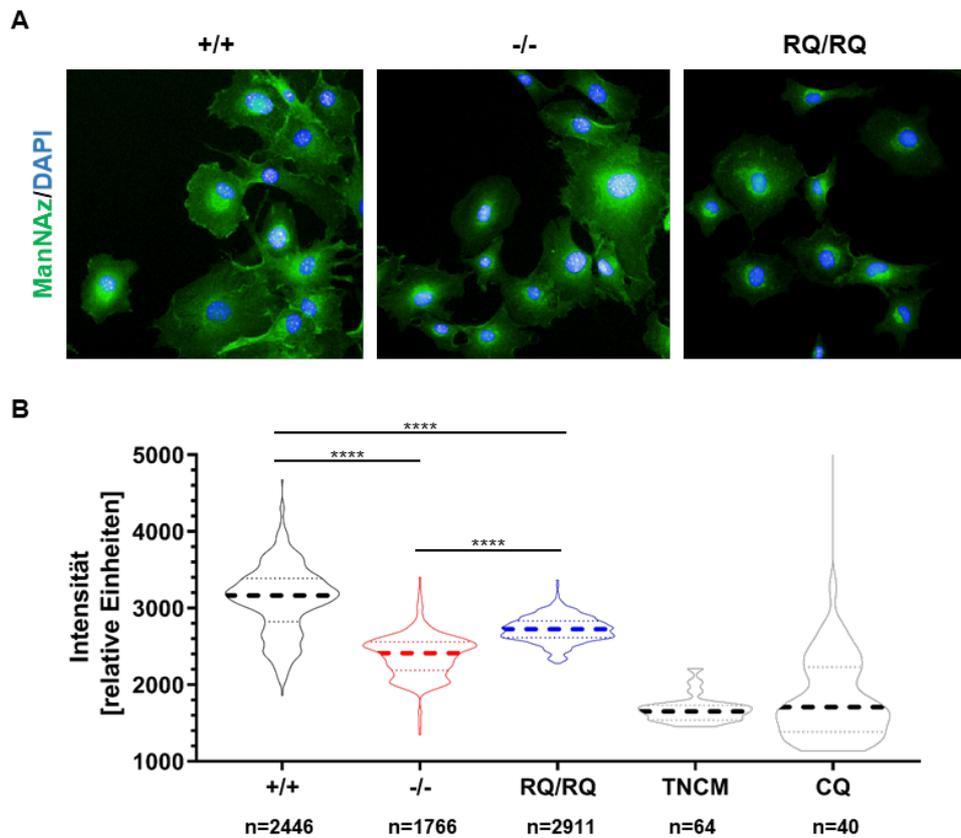


Abbildung 47: Beeinträchtigung der Sialylierung. (A) Mefs wurden 6 h mit ManNAz (grün) gelabelt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. (B) Dargestellt sind der Median der ManNAz-Intensitäten der Golgi-Apparate aus drei primären Zellkulturen pro Genotyp als Violine-Plot. Erkennbar ist ein reduzierter Transfer von Sialinsäure im Golgi-Apparat der *Atp6v0a2*^{-/-} und *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs. P ****< 0,0001.

3.5.5. Störung des intrazellulären Transports und eine Erhöhung der Cholesterin-Synthese aus der Proteom-Analyse

Die Defekte der v-ATPase verursachten eine Erhöhung des pH-Wertes im Golgi-Apparat, eine Veränderung des Vesikeltransports und eine Reduktion der Sialylierung. Um die Auswirkung dieser Effekte auf der molekularen Ebene der Mausmodelle besser zu verstehen, wurde das Proteom der *Atp6v0a2*-Mefs durch Dr. David Meierhofer vom MPI für molekulare Genetik analysiert. Die Auswertung ergab eine Vielzahl deregulierter Proteine (Anhang 3). Einblicke in die Daten zeigten eine erhöhte Expression der Proteine im endosomalen Transportweg (Abbildung 49). Dabei waren Arf6 und Pip5k1a, welche die CCE initiieren und Rab5, welches die Reifung der Endosomen über den CORVET- und HOPS-Komplex steuert, besonders stark exprimiert. Dieser Effekt war von Pip5k1a und Rab5b im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell mit Verlust der *Atp6v0a2*-v-ATPase am stärksten. Im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell könnte dieser Effekt auf die fehlende Ansäuerung des Golgi-Apparats zurückgeführt werden.

Besonders die Proteine des CORVET- und HOPS-Komplexes wurden erhöht exprimiert. Wahrscheinlich wurde über die erhöhte Expression dieser Proteine versucht die verringerte Aktivierung von Rab5 und Rab7 zu kompensieren. Dies hätte eine verringerte Assemblierung dieser Komplexe und eine Störung des endosomalen Transportweges zur Folge. Diese Theorie wurde in den *Complexome*-Daten überprüft. In den Daten der ATP6V0A2 defizienten Fibroblasten konnte eine verringerte Assemblierung des HOPS-Komplexes (Anhang 2) nachgewiesen werden. Da sich CORVET- und HOPS-Komplex die Protein VPS11, VPS16, VPS18 und VPS33 teilen, kann ebenfalls von einer verringerten Assemblierung des CORVET-Komplexes ausgegangen werden.

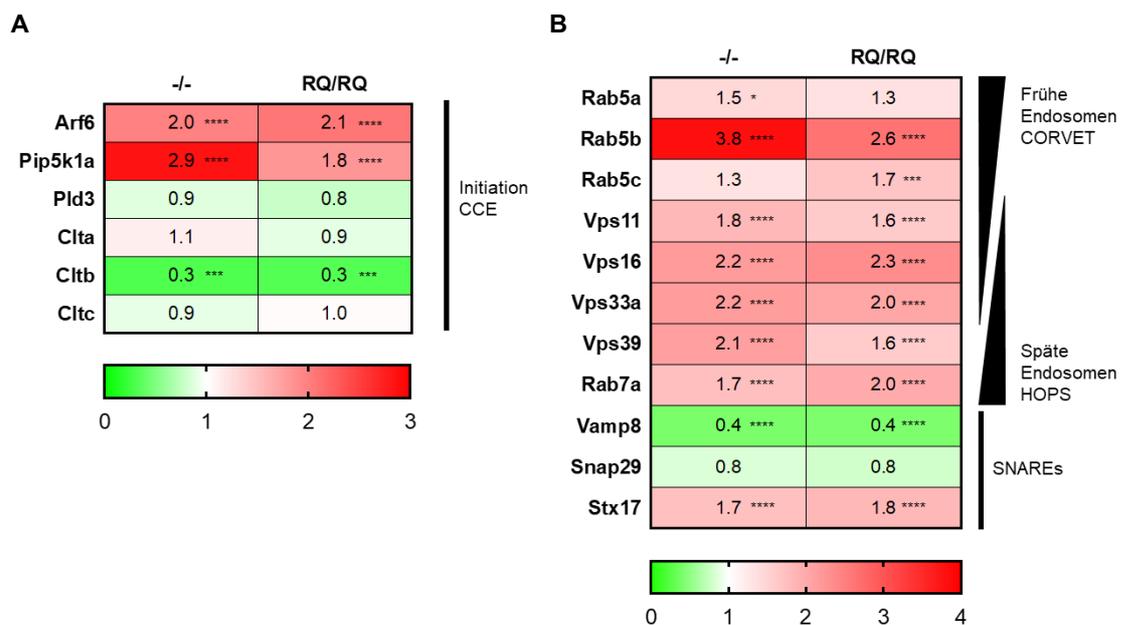


Abbildung 49: Deregulation der Endozytose durch die Initiation der CCE (A) und des endosomalen Transports (B) von Mefs. Diese *Heatmaps* zeigen die relative Änderung der Intensität einer Label freien Quantifizierung (LFQ) von identifizierten Peptiden (grün = 0; weiß = 1; rot = 3 und 4). P * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001

Diese Deregulation des endosomalen Transportweges könnte außerdem ein verringertes Proteinlevel von CtsB, CtsZ, Npc2 und Gm2a erklären (Anhang 4), in dem diese beispielsweise sezerniert werden. Für Npc2 wurde ein ähnlicher Mechanismus bei einem defekten Recycling des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors beschrieben¹⁶⁸.

Weiterhin auffällig war eine erhöhte Expression des Proteins mTOR und einer Herunterregulation anderer Proteine in der Autophagie (Abbildung 50A). Zusammen mit Raptor fungiert mTOR im mTORC1-Komplex, welcher die Autophagie inhibiert¹⁶⁹. Diese Deregulation müsste allerdings über die Phosphorylierung der Ribosomalen S6 Kinase (S6K) und der Umwandlung von LC3-I zu LC3-II untersucht werden. Wiederum könnte die Deregulation des mTORC1-Komplexes auf eine veränderte Expression der Proteine Pik3 und Pten zurückgeführt werden (Abbildung 50C). Pik3 und Pten könnten wiederum für eine Deregulation des PI3K/Akt-Signalwegs verantwortlich sein.

Des Weiteren waren einige Proteine der Cholesterin-Synthese hochreguliert (Abbildung 50C). Dies könnte auf den gestörten retrograden Transport zurückgeführt werden. Eine Störung des COPI-abhängigen retrograden Transports führte zu einer Spaltung und Aktivierung der *Sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) und letztendlich zur Hochregulation der Cholesterin-Synthese¹⁷⁰.

Außerdem war das Protein Cog8 in den homozygoten Mefs nicht nachweisbar, während die anderen Einheiten des Cog-Komplexes hochreguliert waren (Abbildung 50D). Cog8 stellt ein zentrales Element des Cog-Komplexes dar, welches die Domänen A und B verbindet¹⁷¹. Ein Verlust von Cog8 führte zu einer Störung des retrograden Transports, einer Fehllokalisierung von Glykosylierungsenzymen und somit zu einem Glykosylierungsdefekt¹⁷².

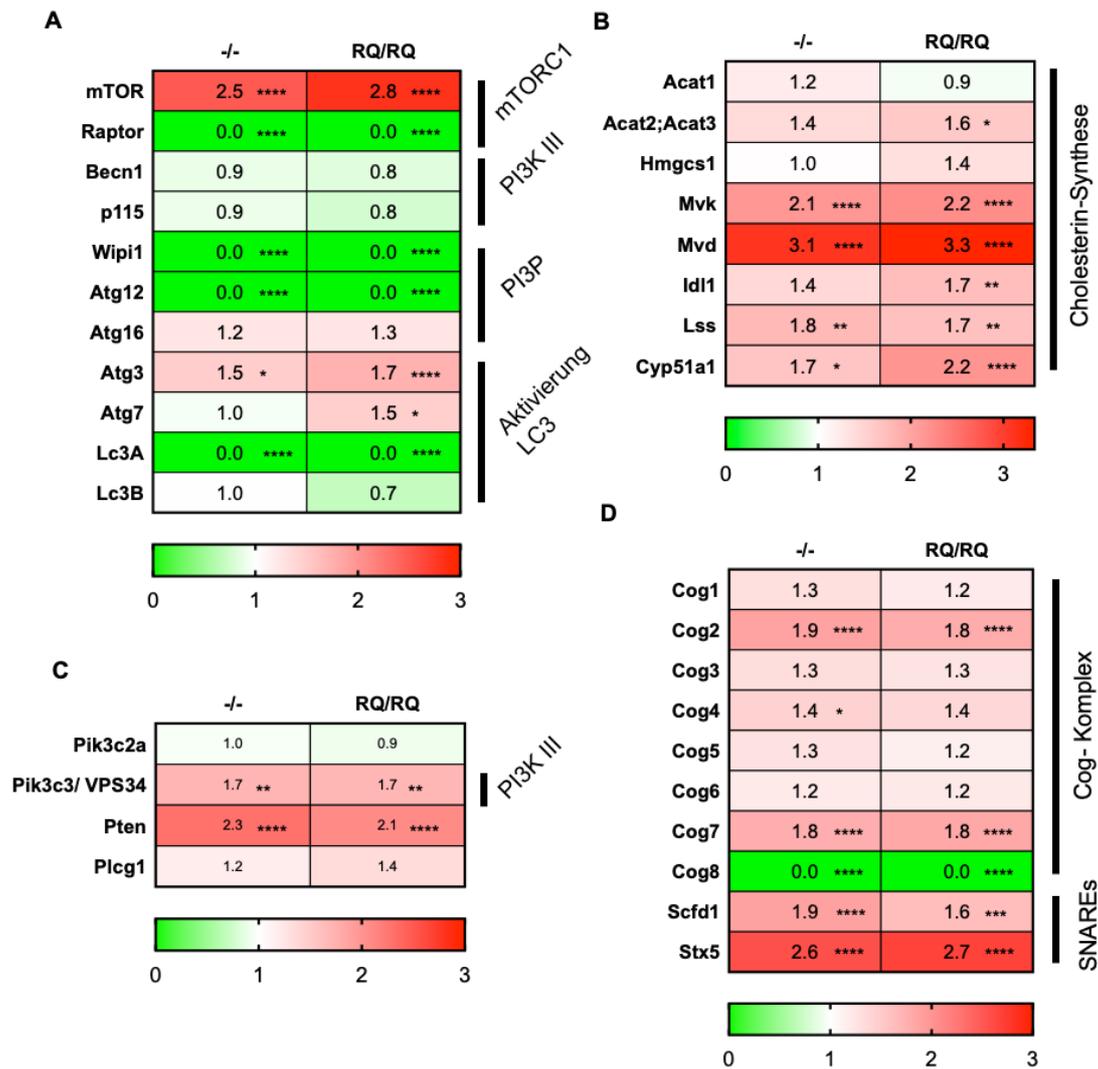


Abbildung 50: Deregulation der Autophagie (A), erhöhte Cholesterin-Synthese (B), Veränderung Phosphatidylinositol Signalweg (C) und Cog-Komplex (D) von Mefs. Diese Heatmaps zeigen die relative Änderung der Intensität einer Label freien Quantifizierung (LFQ) von identifizierten Peptiden (grün = 0; weiß = 1; rot = 3). P * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001.

3.5.6. Veränderungen der Sekretion und Assemblierung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix

Im Zusammenhang mit der veränderten extrazellulären Matrix bei ARCL2A-Patienten wurde oft über eine veränderte Sekretion spekuliert. Passend zu dieser Hypothese wurden bei den *Atp6v0a2*-Mausmodellen Defekte in der extrazellulären Matrix im Gehirn- und in der Haut gefunden. Zum besseren Verständnis dieser Phänotypen wurde zusätzlich zum Proteom, das Sekretom von e13,5 Mefs analysiert (Abbildung 51). Aufgrund der Probenvorbereitung sind im Proteom alle intrazellulären Proteine enthalten, sowie die Proteine der extrazellulären Matrix, welche über drei Tage gebildet wurden. Daher sollte der größte Teil der nachgewiesenen Matrixproteine in dieser integriert sein. Im Sekretom befinden sich alle Proteine, welche über 24 h sekretiert wurden.

Im Sekretom waren nur weniger extrazelluläre Matrixproteine signifikant dereguliert. Dies spricht gegen einen allgemeinen Defekt in der Sekretion. Trotzdem der

unbeeinträchtigt. Die Sezernierung von Col1a bis Col4a wurden in der extrazellulären Matrix integriert. Dies könnte auf eine verringerte Expression von Lox und Plod2 zurückgeführt werden, welche für die Assemblierung und Vernetzung der Kollagene verantwortlich sind^{173,174}.

Die Ursache für die Veränderung der extrazellulären Matrix der Mefs war wahrscheinlich eine Deregulation des TGF- β -Signalwegs, ähnlich dem Hautphänotyp im Atp6v0a2^{RQ/RQ}-Mausmodell. Die war erkennbar an der hohen Expression von Smad2. Ähnlich dem Hautphänotyp müsste diese Theorie anhand der Phosphorylierung von Smad2 überprüft werden.

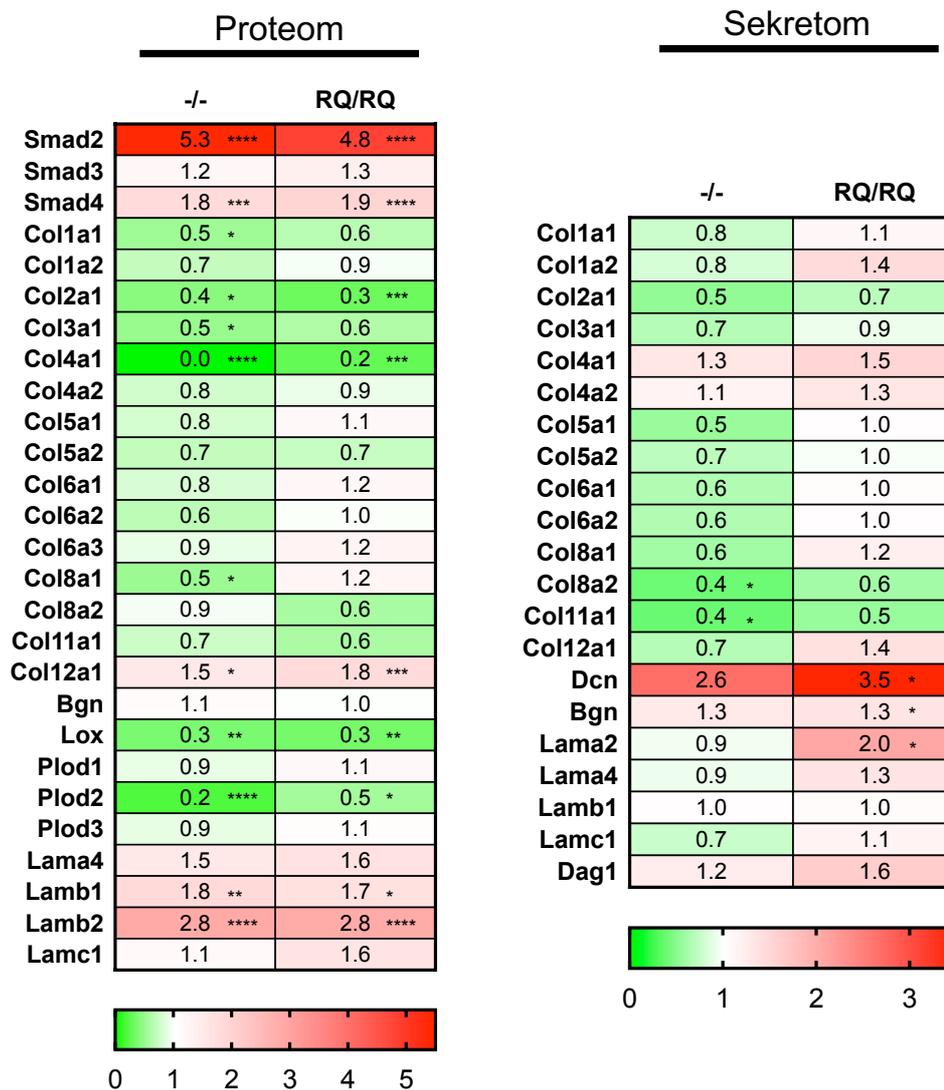


Abbildung 51: Veränderung von Smad-Proteinen und Vergleich extrazellulärer Matrix-Proteine aus der Analyse des Proteoms (links) und sekretierten Proteinen (rechts) von Mefs. Diese Heatmaps zeigen die relative Änderung der Intensität einer Label freien Quantifizierung (LFQ) von identifizierten Peptiden (grün = 0; weiß = 1; rot = 5,3 und 3,5). P * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001.

4. Diskussion

4.1. Die *Atp6v0a2*-Mausmodelle rekapitulieren den Phänotyp von WSS und ARCL2A

Transgene Mausmodelle von seltenen genetischen Erkrankungen werden generiert, um mehr über die Pathogenese dieser Krankheit zu erfahren. Dies beruht auf der Prämisse, dass keine Speziesunterschiede in der Genfunktion vorliegen.

Die *Atp6v0a2*-Mausmodelle basieren auf den Erbkrankheiten WSS und ARCL2A, von denen ca. 50 Patienten publiziert wurden²⁴. Beide Krankheiten weisen *loss of function*-Mutationen von *ATP6V0A2* auf, unterscheiden sich allerdings im Schweregrad der Ausprägung. Denise Jahn konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass die Deletion der Exons 15 bis 17 zu einer starken Reduktion der mRNA und am Ende zu einem kompletten Verlust des Proteins *Atp6v0a2* im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell führt⁵³. Auf Genomebene handelt es sich somit bei dem *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell um das patientennahe Modell. Hingegen wurde im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell eine Punktmutation vorgenommen, wodurch die Aminosäure Arginin 755 zu Glutamin getauscht wurde. In Hefen wurde durch den analogen Aminosäureaustausch (Arginin 735 zu Glutamin) die Interaktion mit den c'-Untereinheiten der v-ATPase unterbrochen, wodurch der H⁺-Transport nicht mehr stattfinden konnte⁶⁰.

Durch den Vergleich dieser Mausmodelle sollten die Rollen der diskutierten Funktionen der v-ATPase, der Protonentransport³⁸ gegen Vesikelfusion und Vesikeltransport⁴⁷, auf den Pathomechanismus untersucht werden. Dafür müssen zwei Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Zum ersten müssen diese Mausmodelle ähnliche Phänotypen wie die ARCL2A-Patienten zeigen. Zum zweiten sollten die Mausmodelle Unterschiede aufweisen, hinsichtlich der betroffenen Gewebe oder des Grades der Phänotyp-Ausprägung. Bis auf speziesbedingte Unterschiede rekapitulierten das *Knockout*, sowie das *Knockin*-Mausmodell die Phänotypen der ARCL2A-Patienten:

1. Eine Pflasterstein-Lissenzephalie durch eine Übermigration der kortikalen Neuronen.
2. Epilepsie durch Krampfanfälle, möglicherweise ausgelöst durch eine neuronale Speicherkrankheit, die beim Menschen noch nicht beschrieben wurde.
3. Faltige Haut durch eine verringerte Dermis-Dicke und Veränderungen der extrazellulären Matrix.

Zusätzlich wurde in den Mausmodellen eine Globozoospermie entdeckt, welche von den Patienten nicht bekannt war.

Da sowohl das *Atp6v0a2*^{-/-}- und das *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell ähnliche Phänotypen mit unterschiedlicher Ausprägung in den gleichen Geweben zeigen, führt dies zu dem Schluss, dass der H⁺-Transport (pH-Wert des Golgi-Apparats oder den frühen Endosomen) entweder funktionell im Vordergrund steht oder die Beeinflussung des Vesikeltransports vom Protonentransport abhängig ist. Diese These wird gestützt durch die molekulare Charakterisierung der *Atp6v0a2* defizienten Mefs. Zusätzlich verdeutlicht es, dass die volle Funktion der *Atp6v0a2*-v-ATPase für die Physiologie der betroffenen Gewebe unabdingbar ist.

4.2. Die *Atp6v0a2*-Mausmodelle als Verbindung zwischen pflastersteinartigen Kortex und einer Speichererkrankung in Neuronen

4.2.1. Ein Defekt in der Piabasalmembran als Ursache einer Pflasterstein-Lissenzephalie

ARCL2A-Patienten sind am stärksten durch ihren Gehirnphänotyp beeinträchtigt, welcher zu einer Entwicklungsverzögerung und früher oder später im Verlauf zu epileptischen Anfällen führt. Mittels MRT konnte in ARCL2A-Patienten eine verschlechterte Gyrierung und unebene Oberflächenstruktur des Gehirns beobachtet werden, welche aus einer Übermigration der Neuronen resultiert und damit als Pflasterstein-Lissenzephalien diagnostiziert wurde^{22,23}. Ein vergleichbarer Phänotyp konnte in p35 Mäusen nachgewiesen werden. Beobachtet wurden übermigierte Neuronen im präfrontalen Kortex der Mäuse. Dieser Phänotyp konnte als identisch angesehen werden, weil das Mausgehirn einen einfacheren Aufbau besitzt¹⁷⁵. Diese Hypothese wurde gestützt durch Dystroglykanopathie-Mausmodelle, welche mit einer Pflasterstein-Lissenzephalie im Menschen assoziiert sind^{28,176,177}. Innerhalb dieser Mausmodelle führte ein O-Glykosylierungsdefekt zu Löchern in der Piabasalmembran des zerebralen Kortex. Diese Basalmembran wird während der embryonalen Entwicklung gebildet und grenzt die extrazelluläre Matrix vom Gehirngewebe ab. Unter anderem enthält die Piabasalmembran die Basallamina und Glia limitans, wodurch die Piabasalmembran eine Begrenzung während der radialen neuronalen Migration darstellt¹⁷⁸. In Mäusen beginnt die radiale neuronale Migration an e12¹⁵⁰. Aus diesem Grund sind in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen während der embryonalen Entwicklung (e13,5) sogenannte ektopische neuronale Ansammlungen detektierbar, welche wiederum auf einen Defekt der Basallamina hindeuten. Dieser Defekt ließ sich durch eine Immunfärbung von Laminin nachweisen. Die Ergebnisse des Migrationsdefekts sind im patientennahen *Knockout*-Mausmodell heterogen verteilt, weil in drei von fünf der untersuchten Embryonen die neuronale Übermigration detektiert werden konnte. Diese Beobachtung stimmt wiederum mit den Patienten überein. Beide Krankheiten, WSS und ARCL2A resultieren aus Gendefekten von *ATP6V0A2*, unterscheiden sich dennoch in ihrer Ausprägung. Dies führt zu dem Schluss, dass weitere Faktoren die Bildung der Piabasalmembran beeinflussen können. Einen Hinweis dazu bietet die Analyse der neuronalen Migration des *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodells. Innerhalb dieses Mausmodells ist die neuronale Fehlmigration in p35 Tieren verstärkt und in fünf von fünf untersuchten Embryonen wurden ektopische neuronale Anhäufungen detektiert. Wahrscheinlich blockiert im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell das defekte Protein die anderen v-ATPase-Einheiten. Dadurch kann die Isoform *Atp6v0a1*, welche ebenfalls im Trans-Golgi-Apparat lokalisieren kann⁴⁸ und den pH-Wert reguliert, das Fehlen von *Atp6v0a2* nicht kompensieren. Aus diesem Grund könnte die Expression von *Atp6v0a1* ein wichtiger Kofaktor im Krankheitsbild von WSS-Patienten sein und sollte untersucht werden.

Grundlegend ist durch *Knockout*-Mausmodelle von *Gpr56* und *Col3a1* ein weiterer Pathomechanismus bekannt, welcher ebenfalls zu einer Übermigration der Neuronen im zerebralen Kortex führt^{179,180}. Deshalb wurden Immunoblots von *Gpr56* und *Col3a* angefertigt, welche in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen unauffällig waren. Weiterhin resultieren Mutationen von *GPR56* in einer bilaterale frontoparietale Polymikrogyrien (BFPP) in den betroffenen Patienten¹⁸¹. Bei BFPP ist im Gegensatz zu den Dystroglykanopathien die Gyrierung und die Faltung der Basalmembran im zerebralen Kortex verstärkt, wodurch sich ein überlappender molekularer Mechanismus als unwahrscheinlich darstellt.

4.2.2. Die Löcher in der Piabasalmembran resultieren aus einem O-Glykosylierungsdefekt von α -Dag1

In Patienten mit ARCL2A wurde bereits ein O-Glykosylierungsdefekt über die isoelektrische Fokussierung von Apolipoprotein CIII diagnostiziert^{4,20}. Dieser Nachweis kann für Mausmodelle nicht angewendet werden, da dieses Protein in Mäusen nicht O-glykosyliert wird¹⁸². Zum anderen handelt es sich bei der Apolipoprotein CIII-O-Glykosylierungsform um den Mucin-Typ, welcher nicht mit der O-Glykosylierungsform von α -DAG1 übereinstimmt. Aus diesen Gründen hat sich für die Untersuchung der O-Glykosylierung von Mausmodellen mit Dystroglykanopathien ein Immunoblot für α -Dag1 etabliert²⁹. Deshalb wurde diese Methode für die Untersuchung von α -Dag1 für die *Atp6v0a2*-Mausmodelle in e13,5-Köpfen, e13,5 Embryonen und Mefs angewandt. Das Ergebnis ist unauffällig, da keine Veränderung des Molekulargewichtes vom stark glykosylierten α -Dag1 während der SDS-Page aus dem Embryo-Gewebe detektiert werden konnte. Hingegen ist in je einem der drei *Atp6v0a2* homozygoten Mefs eine Reduktion des Glykoepitops IIH6 nachweisbar und stellt somit einen Hinweis für einen O-Glykosylierungsdefekt dar. Sehr wahrscheinlich sind die anderen primären Zellkulturen in der Lage diesen Effekt zu kompensieren. Dies ist nicht ungewöhnlich durch die hohe Zugabe von Zuckern während *in-vitro* Versuchen¹⁸³.

Ein anderer Kompensationsgrund könnte darin liegen, dass sich ein Verlust von *Atp6v0a2* nicht primär auf die O-Glykosylierung auswirkt. Das heißt, der Defekt von *Atp6v0a2* könnte den pH-Wert im Trans-Golgi-Apparat oder den Vesikeltransport im Golgi-Apparat beeinflussen, dies sollte wiederum die Aktivität der O-Glykosylierungsenzyme herabsetzen. Entgegen führt beispielsweise ein Defekt von *Pomt1*, welches Man direkt auf α -Dag1 transferiert, zu einer deutlichen Verringerung des Molekulargewichts im Immunoblot, weil die O-Glykosylierung vor der Addition des ersten Zuckers abbricht. Ein Defekt im Protein *Large* am Ende der Synthese von der M3-Struktur führt zu einem geringeren Unterschied des Molekulargewichts von α -Dag1^{184,185}. Zusätzlich war der Defekt von *Pomt1* und *Large* in mehreren Geweben detektierbar, betraf also mehrere Zelltypen. Hingegen könnte ein Defekt von *Atp6v0a2* nur Zelltypen betreffen, die eine erhöhte Expression der *Atp6v0a2*-Isoform

besitzen. Auf diesem Weg könnten nur Astrozyten im Gehirn betroffen sein, welche die Basallamina aus der Piabasalmembran im Neokortex bilden¹⁸⁶.

Deshalb wurde die Glykosylierung des Epitops IIH6 von α -Dag1 direkt mit einem spezifischen Antikörper auf e13,5 Embryo-Schnitten untersucht. Als Kontrolle wurde β -Dag1 verwendet, weil es über die gleiche mRNA wie α -Dag1 translatiert wurde. Das Verhältnis dieser Fluoreszenz-Intensitäten war deutlich reduziert und konnte somit eine Reduktion der Glykosylierung von α -Dag1 zeigen und damit den O-Glykosylierungsdefekt beweisen. Die Immunfluoreszenz ist somit sensitiver und spezifischer als der Immunoblot, weil nur α -Dag1 innerhalb der Piabasalmembran detektiert wird. Ein Immunoblot ist in dieser Hinsicht limitiert, da Dag1 des kompletten Embryokopfes oder Embryonen analysiert wird. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen, sowie in den ARCL2A-Patienten ein O-Glykosylierungsdefekt, damit eine sekundäre Dystroglykanopathie zur neuronalen Übermigration und einer Pflasterstein-Lissenzephalie führt.

Zusätzlich korreliert die Stärke und Häufigkeit der neuronalen Übermigration mit dem erhöhten pH-Wert, welcher wahrscheinlich zur Beeinträchtigung des CopI-Transports in den Mausgehirnen führt. Damit ist dieser Defekt konform mit weiteren sekundären Dystroglykanopathien, bei dem Defekte des Vesikeltransport im Golgi-Apparat zu einem O-Glykosylierungsdefekt führen. Zu sekundären Dystroglykanopathien werden Defekte in *COG8*, *TRAPPC11* und *GOSR2* gezählt^{172,187}. *COG8* ist ein Bestandteil des Cog-Komplexes, welcher die Vesikelfusion im retrograden Transport erleichtert¹⁸⁸. Defekte von *TRAPPC11* und *GOSR2* führen zu einem Defekt primär im anterograden Transport^{189,190}. *In-vitro* Analysen der *Atp6v0a2*-Mausmodelle unterstützen diese These, weil ein BFA-abhängiger retrograder Transport-Defekt nachgewiesen wurde. Zusätzlich konnte in ARCL2A-Patienten eine reduzierte Bildung des COG und COPI-Komplexes gezeigt werden.

4.2.3. Entwicklung von Krampfanfällen und Astrogliose

Ein Krampfanfall ist eine abnormale hypersynchrone Entladung einer kortikalen Neuronen-Population¹⁹¹. Diese hypersynchrone Entladung entsteht aus einem Ungleichgewicht aus Erregung und Hemmung von Neuronen. Derartige Krampfanfälle der *Atp6v0a2*-Mausmodelle wurden wie bei den ARCL2A-Patienten im Erwachsenenalter beobachtet und traten bei den *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mäusen häufiger auf, welches mit dem stärkeren Gehirnphänotyp einherging. Dieses späte Auftreten von Krampfanfällen macht es unwahrscheinlich, dass allein die übermigrierten neuronalen Anhäufungen und damit eine Fehlverteilung der Neurone für die Krampfanfälle verantwortlich ist, weil diese Übermigration schon ab der Geburt der Tiere vorhanden war. Passend zu dieser These entwickeln Patienten mit mild verlaufenden O-Glykosylierungsstörungen erst in der frühkindlichen Entwicklung Krampfanfälle. Zu diesen Krankheiten zählen die Muskeldystrophie vom Typ Fukuyama (FCMD) und die Muskel-Auge-Gehirn-Krankheit (MEB), welche die gleichnamigen Organe betrifft^{192,193}. Einen ähnlichen Verlauf zeigen Patienten mit BFPP (Mutation in *GPR56*). Diese entwickeln ebenfalls eine mentale Retardierung und epileptische Anfälle in der frühen und späten kindlichen Entwicklung¹⁹⁴. Bei den Krampfanfällen der ARCL2A-Patienten und den *Atp6v0a2*-Mausmodellen muss es sich also um ein Phänomen handeln, dass sich langsam in der postnatalen Entwicklung verstärkt. Hierzu würde die Akkumulation von Abbauprodukten im Rahmen einer lysosomalen Speicherkrankheit sehr gut passen. Beispielsweise entwickeln Patienten mit der Niemann-Pick-Krankheit Typ C, welche ebenfalls eine Akkumulation von Sphingolipiden aufweisen, divergent Krampfanfälle bis ins Erwachsenenalter¹⁹⁵. Deshalb wurden die *Atp6v0a2*-Mausmodelle auf neuropathologische Veränderungen des Gehirns untersucht und eine Astrogliose in der ersten Schicht des präfrontalen Kortex detektiert, welche einen empfindlichen und frühen Marker für eine Neurodegeneration darstellt¹⁹⁶. Die Ursache für die Reaktivierung der Astrozyten lag wahrscheinlich in der Schädigung der Neuronen durch die Anreicherung von Stoffwechselprodukten. Dieser Verdacht bestätigte sich bei der Analyse von älteren Tieren, in deren Gehirnen die übermigrierten Neuronen abgestorben waren.

Der Mechanismus zwischen neuronalen Speicherkrankheiten und deren Krampfanfällen ist bisher schlecht verstanden. Interessanterweise scheint aber die Akkumulation von Cholesterin und anderen Lipiden in den *Npc*-Mausmodellen zu einer Überaktivierung des mTOR-Signalwegs zu führen¹⁹⁷. Eine Überaktivierung von mTOR durch Defekte in den Genen *TSC1* oder *TSC2* führt zum tuberöse Sklerosekomplex mit generalisierten Krampfanfällen in Patienten und deren Mausmodellen¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Außerdem zeigt das *Tsc2* Mausmodell eine veränderte neuronalen Schichtung und postnatal eine Megalenzephalie durch die Veränderung der kortikalen Lamininschicht²⁰¹. Aus diesem Gründen könnte eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen zu den Krampfanfällen führen, weshalb vergleichende Analyse mit diesen Mausmodellen erfolgen sollten.

4.2.4. Anreicherung von Lipiden

Lysosomen sind innerhalb der Zelle für den Abbau und das Recycling von Stoffwechselprodukten verantwortlich. Deshalb bestätigten die angeschwollenen Lysosomen zusammen mit der positiven PAS-Reaktion, welche besonders stark in den ektopischen Anhäufungen der Neuronen auftritt, den anfänglichen Verdacht der neuronalen Speicherkrankheit. Über die Ergebnisse der ultrastrukturellen Analyse kann anhand der myelinisierten Axone, vergrößerten Dendriten, autophagischen Vakuolen und vergrößerten Axone mit Spheroiden ein Bezug zu neuronalen Speicherkrankheiten hergestellt werden. Besonders die charakteristischen multilamellaren Körperchen weisen die gleiche Morphologie auf, wie die Ablagerungen der Niemann-Pick- oder Tay-Sachs-Krankheit¹⁵². Bei beiden Krankheiten handelt es sich um Lipidosen, bei der eine Anreicherung von Lipiden innerhalb der Neuronen stattfindet. Die Analyse der Lipide in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen zeigt einen Anstieg von Ceramiden und Sphingomyelin. Dies bestätigt die Hypothese mit der Überlappung der Niemann-Pick-Krankheit Typ C. Es existieren drei Varianten der Niemann-Pick-Krankheit. Bei der Niemann-Pick-Krankheit Typ A und B handelt es sich um einen Defekt der sauren Sphingomyelinase^{202,203}. Beim Typ C ist durch einen Defekt von *NPC1* und *NPC2* der Cholesterintransport gestört²⁰⁴⁻²⁰⁶. In Gehirnen der Niemann-Pick-Patienten Typ C führt der Defekt des Cholesterintransport zu einem Mangel an Cholesterin in der Membran, dies zu einem veränderten vesikulären Transport und am Ende ebenfalls zur Akkumulation von Sphingomyelin^{207,208}. Eine diagnostische Methode zur Differenzierung der verschiedenen Typen besteht in der Färbung der Fibroblasten durch Filipin, welches freies Cholesterin bindet²⁰⁹. Diese Färbung war positiv für die *Atp6v0a2*-Mefs beider Mauslinien. Daher führte dies zur Schlussfolgerung, dass sich der Gehirnphänotyp der *Atp6v0a2*-Mäuse mit dem Phänotyp der Niemann-Pick-Krankheit Typ C überschneidet. Eine Erklärung für die geringe Erhöhung von Ceramiden und Sphingomyelin bestand darin, dass bei dem Untersuchungszeitpunkt p35 nur der vordere Teil des frontalen Kortex der p35 *Atp6v0a2*-Mäuse eine starke Akkumulation in der PAS-Reaktion zeigt. Zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt sollte dieser Effekt stärker ausfallen. In *Npc*-Mausmodellen konnte ein stärkerer Defekt beobachten werden, weil der gesamte Kortex und zusätzlich das Kleinhirn betroffen waren²¹⁰.

4.2.5. Die Beeinträchtigung der lysosomalen Aktivität von CtsD gab einen Hinweis auf eine Störung des endosomalen Transportweges

CtsD ist die Protease in Lysosomen, welche die höchste Aktivität beim niedrigsten lysosomalen pH-Wert besitzt und stellt deshalb einen hervorragenden Marker für die lysosomale Aktivität dar. CtsD wird innerhalb der Endosomen zu einem Intermediat gespalten, welches durch eine weitere Spaltung im Lysosomen durch den sauren pH-Wert aktiviert wird^{211,212}. Die Proform von CtsD war im präfrontalen Kortex der *Atp6v0a2*-Mausmodelle verstärkt aggregiert. Dies war am stärksten und deutlichsten im *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Mausmodell detektierbar. Im *Atp6v0a2^{-/-}*-Mausmodell war ebenfalls die Spaltung zur reifen Form reduziert. Die naheliegendste Erklärung ist ein erhöhter pH-Wert in den Lysosomen. Gegen einen veränderten lysosomalen pH-Wert sprechen mehrere Punkte. Normalerweise lokalisiert die Isoform *Atp6v0a3* in den Lysosomen²¹³. Hingegen wurde die Lokalisation von *Atp6v0a2* in frühen Endosomen und im Trans-Golgi-Apparat nachgewiesen^{20,47,48}. Bei aktueller Datenlage schien es wahrscheinlich, dass durch den deregulierten endosomalen Transportweg die CtsD-Proform innerhalb der Endosomen zum Intermediat gespalten wurde, allerdings die Reifung der späten Endosomen und deren Fusion mit den Lysosomen nicht stattfinden konnte. Dies hätte ebenfalls den Effekt, dass das CtsD-Intermediat verzögert in die Lysosomen gelangt. Der gleiche Phänotyp konnte bei einem Defekt von *Npc1* im Mausgehirn beobachtet werden^{151,214}. Dort führt die Akkumulation von Cholesterin zu einem gestörten endosomalen Transport, wodurch die CtsD-Proform in den Endosomen akkumulierte. Zusätzlich stützt diese Theorie eine CtsD-Aggregation eines Mausmodells für Mukopolidose Typ II²¹⁵. Bei diesem Mausmodell wird durch einen *Knockin* von *Gnptab* eine Reduktion von Mannose-6-Phosphat-Resten erzeugt, dem Zielsignal für den Transport der Proenzyme zu den Lysosomen. Hierdurch entstehen ebenfalls ein Defekt im endosomalen Transport der lysosomalen Enzyme, autophagischen Vakuolen und eine Akkumulation von Gangliosiden in multilamellaren Körperchen. Dass ein Funktionsverlust von *Npc1* oder *Gnptab* zu einer Veränderung des lysosomalen pH-Wertes führt, ist unwahrscheinlich.

4.2.6. Veränderungen in der Autophagie

Die Autophagie ist eine Form der lysosomalen Degradation und erforderlich für die Degradation von „erschöpften“ Organellen und ubiquitinierten Proteinen. Typische Merkmale für eine erhöhte und deregulierte Autophagie sind in der ultrastrukturellen Analyse der *Atp6v0a2*-Gehirne durch die autophagischen Vakuolen erkennbar. Dass es sich um autophagische Vesikel handelt, bestätigt eine Akkumulation von LC3 im präfrontalen Kortex des *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodells (Abbildung 29). Ähnliche LC3⁺-Aggregate sind in den Neuronen der Autophagie-Mausmodelle mit einem *Knockout* von *Atg5* und *Atg7* erkennbar^{216,217}. In den *Atg5* und *Atg7*-Modellen führt die Aggregation von ubiquitinierten Proteinen zu einer Neurodegeneration. Mausmodelle für Ceroid-Lipofuszinosen mit Defekten in *CtsD* und *CtsB*, sowie für multiplen Sulfatase-Mangel und Mukopolysaccharidose typ IIIA belegen eine Verbindung zwischen lysosomalen Speicherkrankheiten und einer Deregulation der Autophagie^{218,219}. Zusätzlich sind die artifiziellen Mitochondrien und die axonalen Spheroiden in den ultrastrukturellen Aufnahmen der *Atp6v0a2*-Gehirne ein deutlicher Hinweis auf eine Defekte Qualitätskontrolle von Proteinen und Organellen.

Mutationen im Rotor der v-ATPase führen ebenfalls zu einer Akkumulation von Autophagosomen⁵. Da *loss of function*-Mutationen dieser Gene scheinbar letal verlaufen und nur Missens-Mutationen von *ATP6V1A* und *ATP6V1E1* gefunden wurden, führen die Mutationen im Rotor sehr wahrscheinlich zu einer ineffizienten v-ATPase oder Deregulation des mTORC1-Signalweges und damit zu einem höheren Bedarf an ATP. Weiterhin führt der Verlust von *Atp6ap2* im Mausmodell zu einer starken Neurodegeneration im Kortex mit deregulierter Autophagie und der Akkumulation von autophagischen Vesikeln²²⁰. *Atp6ap2* scheint die H⁺-Translokation in der V₀-Domäne zu erleichtern, wodurch hier ebenfalls von einem erhöhten Energiebedarf der v-ATPase ausgegangen werden kann. Für die Funktion der v-ATPase ist ATP erforderlich, daher ist es zellbiologisch sinnvoll, dass die v-ATPase mit dem zellulären Energielevel über AMPK verknüpft ist²²¹. Zusätzlich kann von der v-ATPase über einen katabolen Mechanismus - der Autophagie - über die Inhibition des mTORC1-Komplexes, zusätzlich Energie generiert werden. Deshalb führt mit allerhöchster Wahrscheinlichkeit die Fehlfunktion der v-ATPase im Rotor und ein Defekt von *ATP6AP2* zu einem erhöhten Energieverbrauch und hierdurch einer erhöhten Autophagie.

Zusätzlich zeigen *in-vitro* Daten aus dem Proteom der *Atp6v0a2*-Mefs durch eine erhöhte Expression des Proteins mTOR und der reduzierten Bildung des HOPS-Komplexes des *ATP6V0A2* Patienten, (auch *ATP6V1A* und *ATP6VE1* Patienten, Daten nicht gezeigt) zu dem Schluss, dass die Fusion der autophagischen Vesikel mit den Lysosomen gestört ist (Mechanismus siehe Punkt 4.2.7.1.). Dieser Mechanismus würde die Aggregation von autophagischen Vakuolen in den *Atp6v0a2* defizienten Neuronen erklären.

4.2.7. Ein Einblick in den Pathomechanismus der neuronalen Speicherkrankheit

Die angeschwollenen Lysosomen und die Akkumulation von Autophagosomen sind zusammen mit der Anreicherung von verschiedenen Speicherprodukten ein sicheres Indiz für eine neuronale Speicherkrankheit (beschrieben von 4.2.4 bis 4.2.6). Dies führte zu der Frage: Wie kann ein Defekt der Atp6v0a2-v-ATPase oder ein erhöhter pH-Wert des Golgi-Apparats auf molekularer Ebene zu diesem autophago-lysosomalen Phänotyp führen? Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zwei Pathomechanismen, welche ineinandergreifend diesen molekularen Phänotyp hervorrufen und werden in den folgenden beiden Abschnitten beschrieben:

4.2.7.1. Ein gestörter endosomaler Transport führt zu einer Akkumulation von Cholesterin

Die Proteom-Daten der *Atp6v0a2*-Mefs deuteten auf einen gestörten endosomalen Transport und gestörte Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen durch eine erhöhte Expression der Hauptregulatoren Rab5 und Rab7 hin, welche die Reifung/Fusion der Vesikel über den CORVET- und HOPS-Komplex steuern¹³². Die Proteine dieser Komplexe (Vps11, Vps16, Vps33a, Vps39) sind zusätzlich stark hochreguliert. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde die Bildung des CORVET- und HOPS-Komplexes anhand von *Complexome Profiling*-Daten von Patienten mit verschiedenen Mutationen der v-ATPase aus Van Damme, T et al. (2017)⁵ hinsichtlich dieses Punktes analysiert. Diese Daten zeigen deutlich, dass die Bildung von CORVET/HOPS in Patienten-Fibroblasten mit Mutationen in *ATP6V0A2*, *ATP6V1A1* und *ATP6V1E1* beeinträchtigt ist. Genauer wurde der Einbau von RAB7 in den Komplex verringert. Zusätzlich ist Vps41 im HOPS-Komplex nicht nachweisbar. VPS41 ist notwendig für die lysosomale Fusion und ein *Knock-down* dieses Proteins führt zu einer reduzierten Degradation von *Epidermal growth factor receptor* (EGFR)²²². Da die Bildung von CORVET/HOPS zusätzlich in *ATP6V1A1* und *ATP6V1E1* defizienten Fibroblasten (Defekt im Rotor der v-ATPase) reduziert ist, offenbarte sich eine Abhängigkeit dieser Komplexbildung von der v-ATPase und möglicherweise des Golgi-pH-Werts.

Die Verbindung von der Atp6v0a2-v-ATPase zum Vesikeltransport der frühen Endosomen könnte über das Protein ARNO erfolgen. Es wurde gezeigt, dass ATP6V0A2 den Vesikeltransport pH-abhängig über eine Interaktion mit ARNO⁴⁷ steuert. Dieser Mechanismus ist für die Ansäuerung von frühen Endosomen beschrieben, müsste aber auf die Lokalisation der Atp6v0a2-v-ATPase für den pH-Wert des Golgi-Apparats übertragen werden. Auch eine Lokalisationsverschiebung der Atp6v0a2-v-ATPase zu den frühen Endosomen im Gehirn wäre denkbar, weil die frühen Endosomen im direkten Austausch mit dem Trans-Golgi-Apparat stehen. Das heißt, ist der pH-Wert im Golgi-Apparat oder den frühen Endosomen erhöht, wird weniger ARNO rekrutiert und somit weniger GDP zu GTP von Rab5 umgesetzt. Dies würde die Reifung der frühen Endosomen beeinträchtigen und führt zu einer Deregulation der Endozytose. Im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell würde dies bedeuten, dass ARNO von Atp6v0a2

durch dessen Verlust nicht rekrutiert werden könnte und deshalb der Vesikeltransport der frühen Endosomen dereguliert wurde. Im *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Modell wird ARNO aufgrund des erhöhten pH-Wertes nicht rekrutiert. Über diesen Mechanismus könnte der pH-Wert des Golgi-Apparats die Aktivierung anderer Rab-Proteine beeinflussen.

Zusätzlich ist eine Interaktion von RAB7 mit ATP6V0A2- und der lysosomalen ATP6V0A3-v-ATPase nachgewiesen²²³. Damit könnte der Verlust von *Atp6v0a2* direkt über einen unbekanntes GEF die Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen durch die Aktivierung von RAB7 und den MON1-CCZ1-Komplex beeinflussen. Außerdem benötigt die Aktivierung dieses Komplexes wiederum die Aktivierung von RAB5^{224,225}. Damit stehen verschiedene Möglichkeit zur Fehlregulation zur Verfügung, wodurch eine Blockierung des endosomalen Transportweges den Transport der lysosomalen Enzymen und das Recycling von Lipiden beeinträchtigt. Beispielsweise wird Cholesterin über die Proteine Npc1 und Npc2 über die späten Endosomen/Lysosomen recycelt und zum Golgi-Apparat transportiert. Das Cholesterin akkumuliert durch den defekten endosomalen Transport in den Endosomen. Außerdem ist eine Aktivierung von RAB7 für den Transport von Cholesterin-haltigen späten Endosomen zum Lysosomen über den Cholesterin-Sensor *Oxysterol-binding protein homologue (ORP1L)* mitverantwortlich²²⁶. Ein Defekt von *ORP1L* führt zu einer Deregulation der Cholesterin-Homöostase, wodurch die Endosomen am Golgi-Apparat akkumulieren. Gezeigt wurde dieser molekulare Phänotyp durch einen siRNA Knock-down von *ATP6V0A2* in Hela Zellen⁵³ und in den *Atp6v0a2* defizienten Mefs (Johannes Kopp, AG Kornak).

4.2.7.2. Die Fehlverteilung von Cholesterin und ein gestörter retrograder Transport sind die Ursache einer Deregulation des Lipidmetabolismus

Cholesterin ist ein Bestandteil der Zellmembran und trägt zur dessen Stabilisierung bei^{227,228}. Die Fehlverteilung von Cholesterin würde zu einer Reduktion von Cholesterin in der Golgi-Membran führen und dessen Membranfluidität verändern. Zusätzlich müsste ein veränderter pH-Wert im Golgi-Apparat über Arf6⁴⁷ zu einem verminderten Membran-Recycling führen²²⁹. Dadurch würde sich die Cholesterin-Homöostase der *Atp6v0a2*-Mausmodelle verändern. In den Neuronen von Niemann-Pick Typ C-Patienten führt ein Defekt im Recycling von Cholesterin zu einer Akkumulation von Sphingolipiden²³⁰. Dies wurde auch in den Neuronen der *Atp6v0a2*-Mausmodelle beobachtet (Abbildung 28, Abbildung 30). Die Akkumulation dieser Sphingolipide könnte den Defekt der v-ATPase im Gehirn noch verstärken, weil diese die Assemblierung der V₁-Domäne regulieren²³¹. Zusammenfassend wird dieser molekulare Mechanismus in Abbildung 52 dargestellt.

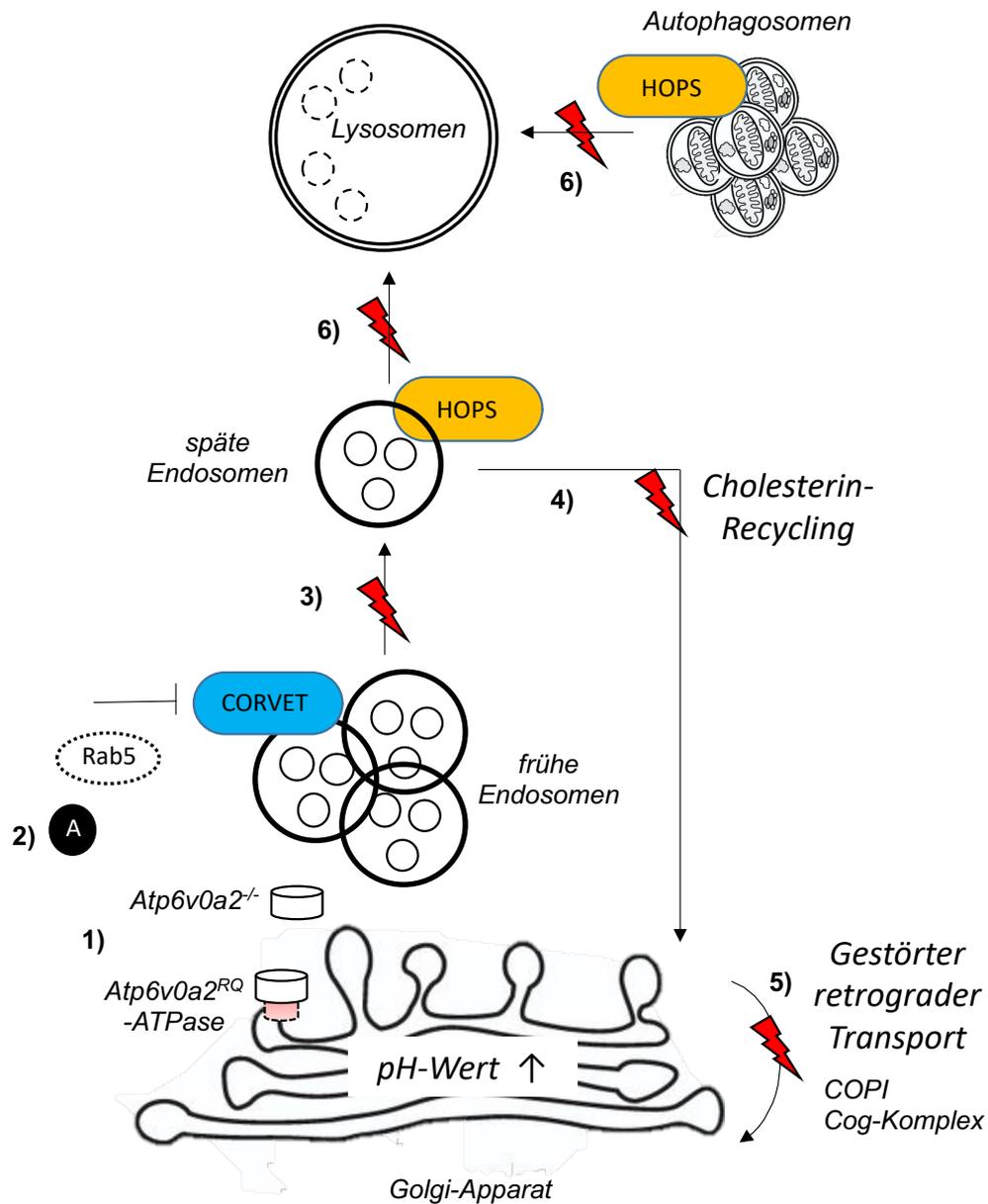


Abbildung 52: Molekularer Pathomechanismus der neuronalen Speicherkrankheit. 1) Durch den Verlust von *Atp6v0a2* oder dem erhöhten pH-Wert im Golgi-Apparat/ frühen Endosomen wird ARNO (A) nicht durch die v-ATPase rekrutiert. 2) Hierdurch kann ARNO nicht Rab5 aktivieren. 3) Die endosomale Reifung kann nicht über den CORVET-Komplex initiiert werden. 4) Dadurch akkumuliert Cholesterin im endosomalen Weg. Dies führt zu einer Deregulation der Cholesterin-Homöostase und zu einer Verringerung von Cholesterin in der Golgi-Membran. 5) Die veränderte Fluidität und der erhöhte pH-Wert im Golgi-Apparat beeinträchtigen über verschiedene Mechanismen, wie die Assemblierung des CopI- oder Cog-Komplexes den retrograden Transport. 7) Zusätzlich führt die Blockierung des endosomalen Transportweges (Inaktivierung Rab5/ Blockierung CORVET) zu einer fehlenden Aktivierung des HOPS-Komplexes (Rab7), wodurch die Fusion der späten Endosomen und Autophagosomen mit den Lysosomen blockiert ist.

4.2.8. Die Astrozyten als mögliche Verbindung zwischen dem neuronalen Migrationsdefekt, Krampfanfällen und der neuronalen Speicherung

Die Astrozyten sekretieren während der neuronalen Entwicklung den größten Anteil an Laminin und Dystroglykan der Pialbasallamina^{232,233}. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Astrozyten der *Atp6v0a2*-Mausmodelle für die verringerte O-Glykosylierung von α -Dag1 verantwortlich sind und ursächlich für die Übermigration der Neuronen. Das allein defekte Astrozyten Krampfanfälle auslösen können, wurde in einem Mausmodell für Tuberösen Sklerosekomplex mit einem *Tsc2 Knockout* spezifisch in Vorläufern für radiale Gliazellen gezeigt²⁰¹. Weiterhin unterstützen die Astrozyten die Neuronen durch den Austausch von metabolischen Substraten²³⁴, wodurch der neuronale Speicherdefekt in den fehllokalisierten Neuronen durch die fehlende Unterstützung der Astrozyten entstehen könnte. Dies stützt die verstärkte Ablagerung des Speichermaterials in den übermigrierten Neuronen der *Atp6v0a2*-Mausmodelle. Außerdem könnte eine Deregulation des Cholesterinmetabolismus der Astrozyten für die Anhäufung von Speichermaterial ursächlich sein. Passend zu dieser Theorie kann im *Npc1*^{-/-}-Mausmodell eine astrozytenspezifische Überexpression von *Npc1* den Speicherphänotyp abschwächen und somit die Lebenserwartung der Mäuse verlängern²³⁵. Zusätzlich führt ein astrozytenspezifischer *Knockout* des *Sulfatase modifying factor 1* in Mäusen zu einer Neurodegeneration und einem Speicherphänotyp mit autophagischen Aggregaten in Astrozyten und kortikalen Neuronen²³⁶. Diese verschiedenen Ansätze verdeutlichen wie ein Defekt der Astrozyten in den *Atp6v0a2*-Mausmodelle zu den beschriebenen neuronalen Phänotypen führen kann und müsste durch einen astrozytenspezifischen *Knockout* des *Atp6v0a2*-Mausmodells untersucht werden.

Gegen einen alleinigen Defekt der Astrozyten für die neuronale Speicherkrankheit spricht wiederum, dass in beiden *Atp6v0a2*-Mausmodellen die akrosomale Fehlbildung in den Spermien durch einen defekten endosomal ähnlichen Transportweg entstehen könnte (siehe Punkt 4.4.2.). Ebenfalls sind in den Proteom-Daten der *Atp6v0a2*-Mefs und *Complexome*-Daten von Fibroblasten Hinweise auf eine deregulierte Endozytose und Autophagie erkennbar.

4.3. Die *Atp6v0a2*-Mausmodelle rekapitulieren den Hautphänotyp der WSS- und ARCL2A-Patienten

4.3.1. Veränderung der Haut und Reduktion der elastischen Fasern

Das markanteste Merkmal von Cutis laxa-Patienten ist deren faltige unelastische Haut^{237,238}. Dieses Merkmal ist deutlich bei Patienten mit WSS- und ARCL2A zu beobachten^{1,21}. Allerdings zeigen Cutis laxa assoziierte Mausmodelle äußerlich keine Unterschiede, weil sich der Hautaufbau zwischen Mensch und Maus unterscheidet. Stattdessen ist in den Cutis laxa-Mausmodellen mit Mutationen in *Ltbp4*²³⁹ und *Pycr1*²⁴⁰ die Dicke der Dermis reduziert. Diesen Phänotyp zeigen auch die *Atp6v0a2*-Mausmodelle. Wie die WSS- und ARCL2A-Patienten weisen diese auch eine Reduktion der elastischen Fasern auf²¹ (Abbildung 36). Als Ursache für die Reduktion der elastischen Fasern wurde bisher häufig über einen Defekt in der Sekretion spekuliert. In ARCL2A-Patienten Fibroblasten wurde eine Reduktion der ELN-Sekretion nach einem Kultivierungszeitraum von 10 Tagen und eine Aggregation von ELN im Golgi-Apparat gezeigt²⁰. Diese Problematik in der Sekretion konnte in der Bestimmung des Sekretoms nicht bestätigt werden, weil ELN mittels Massenspektrometrie nicht detektierbar war. Die Konzentration verschiedener Kollagene und Lysyl oxidase (LOX) war im Sekretom und Proteom erniedrigt. Dies spricht somit für Änderungen auf regulatorischer Ebene dieser Proteine und könnte den geringen Gehalt an elastischen Fasern erklären. Die Sekretion von Lamininen war hingegen erhöht im Sekretom der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mefs. In der Summe sprechen die erzeugten in-vitro Daten der *Atp6v0a2*-Mefs gegen einen allgemeinen Defekt in der Sekretion.

4.3.2. Ein Glykosylierungsdefekt als Ursache für Reduktion der elastischen Fasern?

Die Haut der *Atp6v0a2*-Mausmodelle weist eine reduzierte Sialierung auf. Dieser Effekt konnte im hautgewebe nahem *in-vitro* Zellmodell, den *Atp6v0a2*-Mefs rekapituliert werden. Überraschenderweise wird dieser Effekt in der Haut des *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodells bei dem sekretorischen stark glykosylierten Protein Dekorin kompensiert, wodurch es ein höheres Molekulargewicht besitzt. Sehr wahrscheinlich war dies auf eine verlängerte Verweildauer von Dekorin im Golgi-Apparat zurückzuführen. Hierdurch könnte Dekorin stärker mit Dermatansulfat modifiziert werden. Dieser Mechanismus ist in einem Mausmodell für Gerodermia osteodysplastica beschrieben²⁴¹. Bei diesem Mausmodell führt der Verlust des Proteins Gorab zu einer Veränderung des CopI abhängigen Recyclings von Proteinen und damit zu einer längeren Verweildauer von Dekorin im Golgi-Apparat²⁴². Allerdings wird die Glykosylierung der extrazellulären Matrixproteine im Gegensatz zum *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell nicht gerettet. Dies führt bei dem Gerodermia osteodysplastica-Mausmodell zu einer reduzierten Modifikation von Dekorin und zur Fragmentierung der kollagenen Fasern. Die längere Verweildauer im Golgi-Apparat der extrazellulären Matrixproteine im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell ist somit für die normalen kollagenen Fasern verantwortlich, welche sich in der ultrastrukturellen Analyse als unauffällig darstellen. Denkbar wäre auch, dass die fehlerhafte Glykosylierung einiger sekretierter Proteine zu einem Defekt in der Assemblierung der elastischen Fasern führt. Ein ist nicht glykosyliert, wird allerdings mit Mikrofibrillen quer vernetzt. Die Proform der Mikrofibrillen Fbn-1 und wichtige Proteine für die Vernetzung Ltbp4, Fbn4 und Fbn5 sind hingegen hoch glykosyliert. Beispielsweise führte eine Deglykosylierung von Ltbp4 zu einer stärkeren Affinität dieses Proteins zu Fibulin 4 und 5²³⁹. Somit könnte eine Fehlglykosylierung von Ltbp4 zu einer Fragmentierung von elastischen Fasern im *Atp6v0a2*-Mausmodell führen.

Im *Knockin*-Mausmodell von *Atp6v0a2* konnte zusätzlich zu den fragmentierten elastischen Fasern eine Veränderung der kollagenen Fasern beobachtet werden. Weil Dekorin etwa ein gleiches Molekulargewicht aufweist, kann bei diesem Mausmodell nicht von einer höheren Verweildauer der sekretorischen Proteine im Golgi-Apparat ausgegangen werden. Zusätzlich war die Protein-Menge von Dekorin reduziert, wodurch eine Beeinträchtigung der kollagenen Fasern über den TGF- β Signalweg mit dem Hautphänotyp des *Gorab*-Mausmodells übereinstimmt.

4.3.3. Deregulierter TGF- β Signalweg

Neben ihrer Fähigkeit der Haut Elastizität zu verleihen, regeln die elastischen Fasern die Verfügbarkeit und Aktivität von TGF- β ^{243,244}. Essentiell für die Aktivierung des TGF- β Signalweges, ist dabei die Integration von TGF- β in den TGF- β -Lap-Ltbp-Komplex, welcher in die elastischen Fasern integriert wird. Anschließend wird durch die Interaktion des TGF- β -Lap-Ltbp-Komplexes über Zelloberflächen-Integrine latent TGF- β freigesetzt.

Somit führt wahrscheinlich eine Verringerung der elastischen Fasern zu einer verringerten TGF- β Integration in die extrazelluläre Matrix der *Atp6v0a2*-Mausmodelle. Dies hatte wiederum eine verringerte Aktivierung des TGF- β Signalwegs zur Folge und erklärte die reduzierte Phosphorylierung von Smad2. Dies wird besonders im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell deutlich und korreliert mit dem Elastin-Gehalt der Haut. Dieser Pathomechanismus überschneidet sich mit dem des *Ltbp4*^{-/-}-Mausmodells²⁴⁵. In dem *Ltbp4*^{-/-}-Mäusen führt dessen Verlust zu einer Fragmentierung der elastischen Fasern in der Lunge und Darm, welches am Ende zu einer reduzierten Aktivierung des TGF- β -Signalwegs führt.

Kontrovers hingegen stand dieser Theorie die erhöhte Sekretion von TGF- β von *ATP6V0A2* defizienten Fibroblasten mit einer erhöhten Phosphorylierung von Smad2 gegenüber²⁷. Ebenso zeigten Marfan-Mausmodelle mit Verlust von *Fbn-1* oder *Smad3* eine gesteigerte Aktivierung des TGF- β Signalwegs aufgrund fragmentierter elastischer Fasern^{246,247}. Wahrscheinlich ist dies auf einen kompensatorischen Effekt zurückzuführen, um die TGF- β -Homöostase wiederherzustellen²⁴⁴. Die Aktivität des TGF- β -Signalweges ist wiederum verantwortlich für die Sekretion von Kollagenen und könnte die Reduktion der Dermis-Dicke der *Atp6v0a2*-Mausmodelle erklären.

4.4. Ein unerwarteter Spermienphänotyp und seine Interpretation hinsichtlich des Pathomechanismus

Unerwartet führt der Funktionsverlust von *Atp6v0a2* im Mausmodell zu einer Globozoospermie mit akrosomaler Fehlbildung. Das Akrosom enthält die lytischen Enzyme, welche dafür verantwortlich sind, dass Spermien die Zona Pellucida der Oozyte auflösen und in diese eindringen können²⁴⁸. Der Verlust des Akrosoms zusammen mit der Fehlentwicklung und verringerten Motilität führte somit zu einer Unfruchtbarkeit der männlichen Mäuse. Dieser Phänotyp ist bisher für die männlichen ARCL2A-Patienten nicht beschrieben worden, weil es sich bei den meisten Fällen um Kinder handelte und weil aufgrund des klinischen Verlaufs vermutlich ein Kinderwunsch bei Erwachsenen nicht im Vordergrund stand. Das *Atp6v0a2*^{-/-}- sowie das *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell weisen histologisch, immunhistochemisch, sowie bei der Spermienanzahl und Motilität einen identischen Phänotyp auf. Erst während der ultrastrukturellen Analyse werden qualitative Unterschiede in der akrosomalen Entwicklung erkennbar.

Viele Erkenntnisse der Spermienentwicklung wurden anhand von Mausmodellen mit spezifischen Gendefekten gewonnen, da keine *in-vitro* Modelle zur Analyse dieses Zelltyps zur Verfügung stehen¹³⁵. Bei einer Vielzahl von Mausmodellen führt ein akrosomaler Defekt zu einer Globozoospermie, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die Kondensationsstörung des Zellkerns, die Fehlbildung des Mittelstückes und die damit einhergehende verringerte Motilität, sowie die reduzierte Anzahl der Spermien eine sekundäre Konsequenz sind. Daher soll die akrosomale Fehlbildung von den *Atp6v0a2*-Mausmodellen mit weiteren Globozoospermie-Mausmodellen anhand deren überschneidende molekulare Funktion für die Rolle von *Atp6v0a2* während der Spermatogenese folgend diskutiert werden (Abbildung 53). Gleichzeitig handelt es sich bei dem Spermienphänotyp um eine großartige Möglichkeit die Funktion von *Atp6v0a2* unabhängig von den anderen Isoformen zu untersuchen, da ausschließlich *Atp6v0a2* im Akrosom der Spermien lokalisiert⁵⁴.

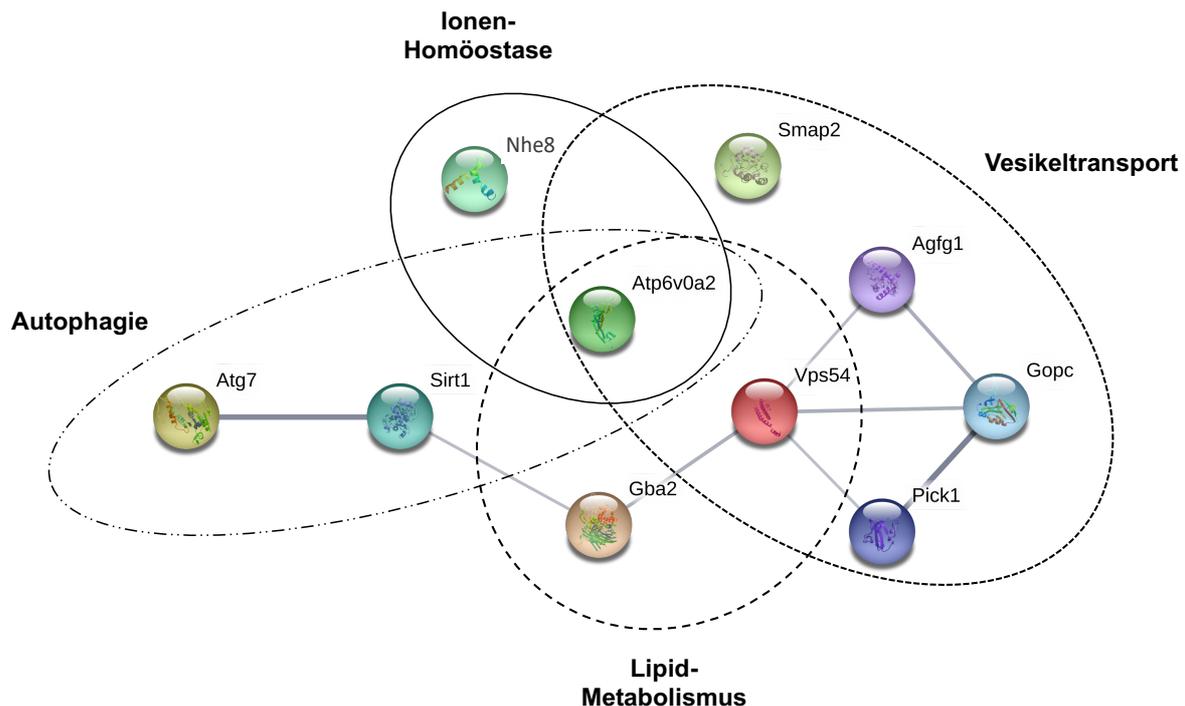


Abbildung 53: String Netzwerk für mögliche Interaktionen von Proteinen, dessen Verlust eine Globozoospermie verursachen. Die Dicke der Linien zeigt die höchste *Confidence* von 0,85 für Pick1 und Gopc bis zur niedrigsten *Confidence* 0,45 für Pick1 und Vps54. Zusätzlich ist die Überschneidung der Funktion dieser Proteine mit Atp6v0a2 im Vesikeltransport, Lipid-Metabolismus, Autophagie und Ionen-Homöostase dargestellt.

4.4.1. Eine gestörte Akrosomenbiogenese weist auf eine Vesikelfusionsfunktion der v-ATPase hin

Das Akrosom wird in Spermatisiden durch die Fusion von Golgi-assoziierten Vesikeln gebildet, welche zum Zellkern transportiert werden.

In dem *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell offenbart die ultrastrukturelle Analyse einen Defekt in der Fusion der proakrosomalen Vesikel, weil große unfusionierte Vesikel in den Spermatisiden erkennbar sind. Abgeschwächt ist dies im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell erkennbar, weil das Akrosom zwar fragmentiert, allerdings in den reifen Spermien besser assembliert wird. Dies verdeutlicht die Funktion von Atp6v0a2 während des vesikulären Transports, weil die *Atp6v0a2*^{RQ}-Untereinheit noch mit Interaktionspartnern Wechselwirkungen eingehen kann, wohingegen dies beim *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell nicht möglich ist.

Einen ähnlichen Phänotyp weisen die Globozoospermien mit einem Defekt in *Gopc*¹⁴³ und *Pick1*¹⁴⁴ auf. *Gopc* lokalisiert im Trans-Golgi-Apparat und interagiert mit *Pick1*¹⁴⁴. Beide Proteine erleichtern den Transport vom Trans-Golgi-Apparat zum Akrosom und recyceln scheinbar die Komponenten der Vesikel. Ein Verlust von *Gopc* und *Pick1* führt somit zu einem frühen Abbruch des Vesikel-Transports. Das Recycling der Vesikeltransport-Komponenten in Spermatisiden ist überaus wichtig, da während der Spermatogenese nur wenige Proteine synthetisiert werden. Innerhalb der *Gopc* und *Pick1* defizienten Spermatisiden ist das Akrosom klein aber nicht fragmentiert. Diese Fakten deuteten auf einen Abbruch des Transports der Vesikel zum Zellkern hin und sprechen somit gegen einen überlappenden Mechanismus mit

Atp6v0a2, da im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell die Vesikel zum Zellkern transportiert werden, diese jedoch nicht fusionierten. Allerdings ist *Gopc* in den *Atp6v0a2* defizienten Spermatischen hochreguliert (Abbildung 44). Dies deutet auf einen kompensatorischen Effekt hin.

4.4.2. Deregulation des endosomalen Vesikeltransports

Ebenso zeigen Mausmodelle mit Defekten in *Agfg1* (Hrb)¹⁴¹ und *Smcp2*²⁴⁹, welche im endosomalen Transport fungieren, dass ein Defekt der Vesikelfusion zu einer Globozoospermie führen kann. *Agfg1* enthält eine Arf-GAP-Domäne und erleichtert die Endozytose über eine Interaktion mit Clathrin²⁵⁰ und die Fusion der frühen proakrosomalen Vesikel in Spermatischen²⁴⁹. *Smcp2* ist ein Arf-GTPase aktivierendes Protein, welches ebenfalls mit Clathrin interagiert²⁵¹. Interessanterweise lokalisiert *Smcp2*, wie *Atp6v0a2*, im Trans-Golgi-Apparat. Die ultrastrukturelle Morphologie des Akrosoms von *Agfg1* und *Smcp2* defizienten Spermatischen zeigt, wie die Spermatischen der *Atp6v0a2*-Mausmodelle, vergrößerte unfusionierte proakrosomale Vesikel nahe am Zellkern. Zusätzlich führen diese Ergebnisse zu dem Schluss, dass *Agfg1* und *Smcp2* potenzielle Interaktionspartner der v-ATPase darstellen könnten.

Dass Autophagie-assoziierte Proteine die Bildung des Akrosoms beeinflussen zeigen Defekte in *Atg7*²⁵² und *Sirt1*²⁵³. Der Funktionsverlust von *Atg7* und *Sirt1* verringert die Rekrutierung von LC3 an die proakrosomalen Vesikel im Trans-Golgi-Apparat von Spermatischen und führen zur Inhibition der Vesikelfusion im Akrosom. Diese Ergebnisse führen zusätzlich zu dem Schluss, dass das Akrosom ebenfalls Eigenschaften eines Autophagolysosoms besitzt. Außerdem bestätigen die Ergebnisse, dass es sich bei dem Akrosom um eine dem Lysosom verwandte Organelle handelt und somit in den Spermatischen über einen endosomalen und autophagozytose ähnlichen Transportweg gebildet wird. Deshalb wäre in den *Atp6v0a2* defizienten Spermatischen eine Inhibition der Vesikelfusion durch den HOPS-Komplex denkbar, da Rab7 im Proakrosom lokalisiert²⁵⁴. Dies spricht für eine Überschneidung des molekularen Pathomechanismus der Spermatischen und dem Gehirnphänotyp, durch eine verringerte Aktivierung von Rab7. Da im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell keine v-ATPase gebildet werden kann, würde diese den schweren Vesikelfusionsdefekt erklären. Hingegen könnte im *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell die H⁺-Transport-unfähige v-ATPase Rab5 und Rab7 teilweise aktiveren, wodurch die Vesikelfusion verbessert wird.

Diese Deregulation des endosomalen Transports könnte zusätzlich zu einer veränderten Lipidzusammensetzung der Spermatischen führen. Dies wird anhand einer Missens-Mutation von *Vps54* deutlich, welche ebenfalls zu einer Globozoospermie in Mäusen führt¹⁴². *Vps54* ist Teil des GARP-Komplexes, welcher die Vesikelfusion der Endosomen zum Trans-Golgi-Apparat unterstützt. *In-vitro* Experimente zeigen, dass eine Inaktivierung des GARP-Komplexes zu einem verringerten Recycling des Kationen-unabhängigen M6P-Rezeptors führt, wodurch sich die Konzentration von NPC2 in Endosomen/Lysosomen verringert und am Ende zu einer

Beeinträchtigung des Cholesterin-Recyclings führt¹⁶⁸. Wie wichtig das Lipid-Gleichgewicht der Membranen in Spermatischen ist, zeigte ein anderes Mausmodell mit einem *Knockout* der Glucosylceramidase *Gba2*. Dieser Defekt führt in den Sertoli-Zellen der Spermien zu einer Akkumulation von Glucosylceramiden, wodurch die reifen Globozoospermien ein fragmentiertes Akrosom entwickelten mit zusätzlichen vakuolären Strukturen^{255,256}. Vakuolen, welche dem der Spermien des *Gba2*-Mausmodells morphologisch sehr ähnlich sind, sind in den reifen Spermien des *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodells erkennbar, wodurch eine Deregulation der Lipidzusammensetzung in den Mausmodellen denkbar wäre und weiter analysiert werden sollte.

4.4.3. Welche Rolle spielt der pH-Wert im Golgi-Apparat und den proakrosomalen Vesikeln für die Bildung des Akrosoms?

Die Regulation des pH-Wertes stellt die primäre Aufgabe der v-ATPase dar, welche durch *Atp6v0a2* im Trans-Golgi-Apparat und im Akrosom der Spermatischen und Spermien lokalisiert⁵⁴. Da *Atp6v0a2* als einzige *Atp6v0a*-Isoform in den Spermien exprimiert wird und außerdem den Protonenkanal bereitstellt, sollte der pH-Wert sowohl im Trans-Golgi-Apparat, den vom Golgi-Apparat abgeschnürten Vesikeln als auch im Akrosom erhöht sein. Dies bedeutet wiederum, dass anders als in den *Atp6v0a2* defizienten Mefs, der pH-Wert im Golgi-Apparat in beiden *Atp6v0a2*-Mausmodellen im gleichen Ausmaß erhöht ist, da die anderen Isoformen den H⁺-Transport im *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodell nicht kompensieren konnten. Weil *Atp6v0a2*^{RQ} im anderen Mausmodell zur Verfügung stand, schien der pH-Wert ebenfalls die Fusion der proakrosomalen Vesikel zu beeinflussen.

Einen zusätzlichen Hinweis, dass ein deregulierter pH-Wert die Fusion der proakrosomalen Vesikel beeinflusst, liefert ein Globozoospermie-Mausmodell mit einem Defekt im Na⁺/H⁺-Austauscher *Nhe8*²⁵⁷. Ein Verlust von *Nhe8* führt wahrscheinlich zu einer Veränderung des pH-Wertes oder Ionen-Konzentration, welches ebenfalls die Fusion der proakrosomalen Vesikel verhinderte. Ultrastrukturell ähneln die fragmentierten *Nhe8* defizienten Akrosomen eher dem Erscheinungsbild der *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Spermatischen. Weiterhin führte die Injektion der schwachen Basen NH₄Cl und CQ in den Maushoden ebenfalls zu einer Globozoospermie²⁵². Besonders die Injektion von NH₄Cl führte ultrastrukturell zu großen Golgi-Derivaten, welche nicht mit dem proakrosomalen Vesikeln fusionierten. Dies kam dem Phänotyp der Spermatischen des *Atp6v0a2*^{-/-}-Mausmodells am nächsten. All diese Argumente führen zu der These, dass ein saurer pH-Wert im Golgi-Apparat oder in abgeschnürten proakrosomalen Vesikeln deren Fusion beeinflusst.

4.4.4. Veränderte Glykosylierung im *Atp6v0a2* defizienten Maushoden

Erneut ist aus Mangel an *in-vitro* Modellen für die Spermatogenese wenig über die Glykosylierung im Maushoden bekannt. In den *Atp6v0a2*-Mausmodellen konnte ich nachweisen, dass die Veränderung des pH-Wertes im Golgi-Apparat zu einer Veränderung der Glykanstruktur Galactosyl-(β -1,3)-N-Acetylgalactosamin (Epitop des Lektins PNA) im Hoden führt. Auffällig ist, dass das Akrosom mit PNA sehr spezifisch detektiert werden kann. Daher könnte darüber spekuliert werden, dass während der Spermatogenese diese Zuckerstruktur als Markierung für die akrosomalen Proteine fungieren könnte, ähnlich Mannose-6-Phosphat für die lysosomalen Proteine. Es kann ausgeschlossen werden, dass der Verlust von Galactosyl-(β -1,3)-N-Acetylgalaktosamin zur verringerten Detektion des Proakrosoms in den Spermatisden führt, da mittels Antikörper gegen das akrosomale Protein Sp56, unabhängig von der Glykosylierung, die gleiche Morphologie des Akrosomens detektiert wird. Dass eine veränderte Protein-Expression in den Globozoospermien zum veränderten Bandenmuster des Lektins PNA führt ist unwahrscheinlich, weil das *Gba2*-Globozoospermie-Modell auf gleiche Weise mittels Lektin-*Immunoblotting* untersucht wurde und keine Unterschiede erkennbar sind²⁵⁵. Zusammenfassend zeigen die Spermien der *Atp6v0a2*-Mausmodelle einen Glykosylierungsdefekt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Glykosylierungsdefekt für die Fehlentwicklung verantwortlich ist und sollte daher stärker in den Fokus der Charakterisierung von Globozoospermien rücken.

4.5. Der Einfluss der *Atp6v0a2*-Defekte auf den pH-Wert des Golgi-Apparats, dessen Vesikelfusion und die Glykosylierung

Die Hauptaufgabe der v-ATPase ist der H⁺-Transport in das Lumen von Organellen. Deshalb wird bei allen Cutis laxa Erkrankungen mit einem Defekt der v-ATPase eine pH-Werterhöhung im Golgi-Apparat geschlussfolgert. In dieser Arbeit konnte dieses zum ersten Mal bewiesen werden. Durch den *Knockout* und *Knockin* von *Atp6v0a2* wurden zwei Mausmodelle generiert, bei dem der pH-Wert des Golgi-Apparats minimal (*Atp6v0a2*^{-/-}) und stark erhöht (*Atp6v0a2*^{RQ/RQ}) ist. Dieser Unterschied ist vermutlich auf einen kompensatorischen Effekt der *Atp6v0a1*-Isoform zurückzuführen, sowie auf eine Blockierung des v-ATPase Rotors durch die *Atp6v0a2*^{RQ}-V₀-Einheit. Durch einen Vergleich dieser Mausmodelle ist es möglich den Einfluss des pH-Werts auf den Vesikeltransport und Glykosylierung zu untersuchen.

4.5.1. Gestörter retrograder Transport über den CopI- und Cog- Komplex und Vesikelfusion

Die *Atp6v0a2*-Mausmodellen weisen ein BFA-abhängiger Defekt des retrograden Transports auf. Gleiche Ergebnisse zeigen die ARCL2A-Patientenfibroblasten und Patientenfibroblasten mit Mutationen des v-ATPase-Rotors (*ATP6V1A*, *ATP6V1E1*)^{5,27}. Dies deutet auf eine Unabhängigkeit dieses Effektes von der *Atp6v0a2*-V₀-Domäne hin. Damit liegt die Ursache sehr wahrscheinlich in der Erhöhung des pH-Werts im Golgi-Apparat. Auch eine herabgesetzte Durchmischung der Membranbestandteile durch die Herabsetzung der v-ATPase-Aktivität wäre denkbar.

Für einen pH-abhängigen Defekt spricht zusätzlich die Reduktion des retrograden Transports des *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Modells, da die V₀-Einheit für Proteininteraktionen zur Verfügung stand. Dennoch führte der komplette Verlust von *Atp6v0a2* zu einem stärkeren Defekt, welches wiederum auf einen Einfluss der V₀-Einheit im Golgi-Transport hindeutete. Eine Erklärung zum Mechanismus liefern erneut eine Kombination der Proteom-Daten der *Atp6v0a2*-Mefs und die *Complexome*-Daten der ARCL2A-Patienten. Innerhalb der Proteom-Daten war eine Deregulation der Expression des CopI- und Cog-Komplexes erkennbar, welche im *Complexome* eine verringerte Assemblierung aufweisen. Der COPI-Komplex umhüllt die Fracht und die Fusion der Vesikel wird erleichtert vom COG-Komplex (*tethering*). Dabei interagieren diese Komplexe über beta-COP und Cog3²⁵⁸. Bisher ist keine Interaktion dieser Komplexe mit der *Atp6v0a2*-v-ATPase nachgewiesen, allerdings könnte auch die Aktivierung von Rab6 abhängig vom pH-Wert des Golgi-Apparats sein. Die pH-Abhängigkeit dieser Komplexbildung würde auch erklären, warum in der Vergangenheit die V₀-Einheit der v-ATPase immer wieder fälschlicherweise als SNARE-Molekül beschrieben und diskutiert wurde. Diese Theorie beruht allein auf Fusionsversuchen von Hefevakuolen, in denen nicht der Verlust der V₀-Einheit hinsichtlich pH-Wert oder Bildung anderer Fusionskomplexe untersucht wurde²⁵⁹⁻²⁶¹.

4.5.2. Fehlerhafte Glykosylierung

Ein Funktionsverlust von *ATP6V0A2* induziert N- und O-Glykosylierungsdefizienzen²⁶². Da es sich bei der N-Glykosylierung um einen pH sensitiven Prozess handelt, wird dieser Defekt auf eine Aktivitätsminderung der Glykosylierungsenzyme durch eine pH-Werterhöhung im Golgi-Apparat zurückgeführt. Zusätzlich konnte in humanen Fibroblasten gezeigt werden, dass eine pH-Werterhöhung von 0,2 eine reduzierte Sialierung durch eine Fehllokalisation der $\alpha(2,3)$ -Sialyltransferase verursacht²⁶³. Dennoch ist es erstaunlich, dass kein N-Glykosylierungsdefekt im Mausgehirn nachweisbar war. Dies könnte bedeuten, dass vorrangig die Vesikelfusionsproblematik für die Gehirnphänotypen verantwortlich ist und vorrangig die O-Glykosylierung beeinträchtigt. Dass die O-Glykosylierung sensitiv auf eine Fehllokalisation der Enzyme im Gehirn reagiert, zeigt sich bei Defekten von *COG8*, *TRAPP11* und *GOSR2* (Diskutiert unter Punkt 4.2.2.).

Dennoch ist in der Haut der *Atp6v0a2*-Mäuse ein N-Glykosylierungsdefekt nachweisbar. Passend zu diesen Beobachtungen führt der Funktionsverlust von *Atp6v0a2* in dem Hautgewebe nahem Modell *Mefs* zu einer Reduktion der Sialierung. Der komplette Verlust von *Atp6v0a2* erzeugt dabei eine stärkere Reduktion der Sialierung als im *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Modell. Dies führt zu dem Schluss, dass der retrograde Transport und die Fehllokalisation der Sialyltransferase in den *Atp6v0a2^{-/-}*-*Mefs* die N-Glykosylierung stärker beeinträchtigt als der höhere pH-Wert in den *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-*Mefs*. Im ersten Moment stellt dieses Ergebnis einen Kontrast zum O-Glykosylierungsdefekt der Mausgehirne dar, weil sich dieser Phänotyp vorrangig pH-abhängig darstellt. Dennoch führt wahrscheinlich die höhere pH-Wert-Änderung im Gehirn zu einer stärkeren Reduktion des CopI-Transportes, welches ein Indiz darstellt, dass der Vesikeltransport im *Atp6v0a2^{RQ/RQ}*-Gehirn stärker reduziert ist als im *Atp6v0a2^{-/-}*-Gehirn. Damit geht dies wieder mit der Veränderung im Vesikeltransport einher und kann auf zellspezifische Unterschiede zurückgeführt werden. Zum anderen fungieren verschiedene Enzyme in N- und O-Glykosylierung, wodurch sich pH-Wert-Veränderung und Vesikeltransportdefekte unterschiedlich stark auf diese posttranslationalen Modifikationen auswirken können.

4.6. Wie und warum überschneiden sich die Phänotypen und die Pathomechanismen von ARCL2 und ARCL3?

In den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit habe ich bereits über die molekularbiologischen Erkenntnisse der *Atp6v0a2*-Mausmodelle Bezüge zwischen den ARCL2A-Patienten und anderen Krankheiten hergestellt. Mit diesem Punkt möchte ich den Erkenntnisgewinn dieser Dissertation mit den anderen Formen von ARCL2 und ARCL3 diskutieren.

Zusätzlich zu den Patienten mit Mutationen in *ATP6V0A2* besitzen andere ARCL2-Patienten Mutationen in den Genen *ATP6V1A* und *ATP6V1E1*, welche den Rotor der v-ATPase beeinträchtigen. - Die eingeschränkte Funktion der v-ATPase ist damit unabhängig von deren molekularer Lokalisation. Wohingegen Defekte der *ATP6V0A*-Isoformen den H⁺-Transport nur lokalisationsabhängig beeinträchtigen. -

Dies bedeutet wiederum, dass der pH-Wert im Golgi-Apparat, den Vesikeln des endosomalen Transportweges einschließlich Lysosomen und Autophagosomen erhöht sein sollte und geht mit den stärkeren Phänotypen der ARCL2C und ARCL2D-Patienten einher, welche nur Missens-Mutationen in *ATP6V1A* und *ATP6V1E1* aufweisen. Durch diese Missens-Mutationen entsteht ein Protein mit Restfunktion. Patienten mit Mutationen in *ATP6V1A* entwickeln Krampfanfälle, welche ebenfalls auf eine neuronale Speicherkrankheit oder Deregulation des mTORC1-Signalwegs zurückgeführt werden könnten. Zusätzlich wurde in einem *ATP6V1A*-Patienten eine Polymikrogyrie entdeckt, welche ebenfalls auf einer Migrationsstörung von kortikalen Neuronen zurückzuführen ist⁵. Daher ist eine Überschneidung des Mechanismus von *GPR56* oder *COL3A* wahrscheinlicher, weil Patienten mit einem Defekt in diesem Gen ebenfalls eine Polymikrogyrie zeigen. Dennoch wäre ein O-Glykosylierungsdefekt eines anderen sekretorischen Proteins oder Lipids denkbar, zumal ein O-Glykosylierungsdefekt von Apolipoprotein CIII nachweisbar war.

Weiterhin sind die Patienten mit Mutationen in *ATP6V1A* und *ATP6V1E1* von einer schweren generalisierten Muskelhypotonie betroffen⁵. Diese wurde bei den ARCL2A-Patienten nicht diagnostiziert und die *Atp6v0a2*-Mausmodelle weisen ebenfalls keine Auffälligkeiten auf. Zum einen wäre dieser Unterschied durch die Expressionsunterschiede der verschiedenen v-ATPase-Einheiten und -Isoformen denkbar. Sehr wahrscheinlich spielt auch der Energie-Metabolismus eine Rolle. Neuere Publikationen zeigen, dass die v-ATPase über AMPK den ATP-Level der Zelle mit der Autophagie verknüpft^{46,221,264}. Ich konnte zudem in Patienten-Fibroblasten mit einer compound heterozygoten *ATP6V1A*-Mutationen zeigen, dass die Phosphorylierung von AMPK an Thr172 verstärkt stattfand, welches auf eine Veränderung des Energiemetabolismus hindeutet (unveröffentlichte Daten). Dies erscheint physiologisch sinnvoll, da die v-ATPasen für die Protonentranslokation eine hohe Menge ATP benötigen. Außerdem könnte es erklären, warum eine ineffizient funktionierende v-ATPase durch einen Rotor-Defekt zu einer Muskelhypotonie führt, da diese Gewebe einen hohen Bedarf an Energie

besitzen. Durch diesen ATP-Mangel könnte im Muskelgewebe eine Erhöhung des Golgi-pH-Wertes stattfinden, welcher zu einem O-Glykosylierungsdefekt von α -Dag1 führt. Denkbar wäre auch ein Mechanismus ähnlich dem Gehirnphänotyp der *Atp6v0a2*-Mausmodelle, da diese Patienten eine positive PAS-Reaktion in der Muskelbiopsie zeigten (noch unveröffentlichte Daten), welches einen Hinweis auf eine Speicherkrankheit darstellt.

Der Energie-Metabolismus könnte auch Phänotyp-Überschneidung von Patienten mit Mutationen in den mitochondrialen Genen *PYCR1* und *ALDH18A1* erklären. Ein Defekt innerhalb der Mitochondrien führt sehr wahrscheinlich zu einer Verringerung des ATP-Levels innerhalb der Zelle, wodurch die v-ATPasen weniger Protonen in das Lumen von Organellen transportieren. Damit wären ähnlich einem Defekt im Rotor der v-ATPase, generalisiert die Funktion aller v-ATPasen betroffen. Dies würde die stark überlappenden Phänotypen von ARCL2 und ARCL3 erklären.

Auf der anderen Seite führen Mutation von *ATP6V0A2*, *ATP6V1A* und *ATP6V1E1* zu einem verzögerten retrograden Transport^{5,27} und damit wahrscheinlich zu einer Störung der Cholesterin-Homöostase und des Lipid-Stoffwechsels. Eine kürzlich veröffentlichte Cutis laxa-Variante mit einer Missens-Mutation in der Phosphatidylinositol 4-Kinase Typ II α (*PI4K2A*) unterstützt diesen Zusammenhang. Die Mutation in *PI4K2A* führt zu einer Reduktion der PIP4-Synthese mit den typischen Cutis laxa-Merkmalen und neurologischem Phänotyp²⁶⁵. Diese zellbiologischen Verbindungen zum Golgi-Apparats verdeutlichen besonders die Analysen von Golgi Phosphoprotein 3 (GOLPH3). GOLPH3 wird durch PIP4 zum Golgi-Apparat rekrutiert und verbindet diesem mit dem Zytoskelett der Zelle²⁶⁶. Dadurch beeinflusst GOLPH3 die Morphologie des Golgi-Apparats, das COPI-abhängige Recycling der α -2,6-Sialyltransferase 1 und die mitochondriale Lipid Biosynthese²⁶⁷⁻²⁶⁹. Das zwischen der Funktion der v-ATPase, der Lipid-Homöostase und der Morphologie der Mitochondrien ein Zusammenhang besteht, zeigt auch die ultrastrukturelle Analyse der *Atp6v0a2*-Gehirne.

5. Ausblick

5.1. Weitere Charakterisierung des Gehirnpheotyps und Therapie-Ansatz

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein *Knockout* und *Knockin* von *Atp6v0a2* in Mäusen während der embryonalen Entwicklung zu einem Pflasterstein-Lissenzephalie ähnlichen Phänotyp führt, wie bei den ARCL2A-Patienten. Dieser Phänotyp beruht auf einer sekundären Dystroglykanopathie und wird sehr wahrscheinlich durch eine Defekte O-Glykosylierung von Astrozyten verursacht. Weiterhin wurde in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen eine neuronale Speicherkrankheit beobachtet, welche wahrscheinlich die Ursache der Krampfanfälle von Mensch und Maus nach einem Verlust von *ATP6V0A2* darstellt. Durch weitere Untersuchungen sollten diese Krampfanfälle charakterisiert werden. Anhand von Elektroenzephalografie (EEG) sollte zuerst die Art der Anfallskrankheit bestimmt werden. Anschließend könnten Analysen des mTORC1-Signalwegs durch *Immunoblotting* erfolgen.

Die nächsten Schritte in der Erforschung von ARCL2A sollten differenzieren, wodurch die Speicherkrankheit verursacht wird. Ist ein Defekt des endosomalen Transports in Neuronen ursächlich für die Aggregation des Speichermaterials oder ist die Fehllokalisierung der Neuronen durch die Pflasterstein-Lissenzephalie dafür verantwortlich? Diese Fragestellung könnte durch die Erzeugung von konditionellen Mauslinien beantwortet werden, in dem *Atp6v0a2* spezifisch in Neuronen oder Astrozyten ausgeschaltet wird. Da der konventionelle *Knockout* von *Atp6v0a2* aus einer Flox-Mauslinie hervorging, sind konditionellen Modelle durch die Verpaarung mit zellspezifischen Cre-Mauslinien einfach erzeugbar.

Zusätzlich könnten Versuche mit *in-vitro* kultivierten Neuronen und Astrozyten die Ergebnisse aus den Mausmodellen unterstützen. Auf der einen Seite könnte die O-Glykosylierung von α -Dag1 durch Astrozytenkulturen mittels *Immunoblotting* untersucht werden. Auf der anderen Seite könnten Versuche mit Neuronen weitere Rückschlüsse auf den endosomalen Transportdefekt oder die Akkumulation von Lipiden zeigen. Während des Verfassens dieser Arbeit war es Johannes Kopp (AG Kornak) möglich eine Akkumulation von frühen Endosomen in der Region des Golgi-Apparats von Mefs nachzuweisen. Dies unterstützt die These des endosomalen Transportdefekts durch die Deregulation der Cholesterin-Homöostase.

Zum besseren Verständnis des Pathomechanismus wäre es wichtig die molekulare Lokalisation von *Atp6v0a2* in Neuronen und Astrozyten zu bestimmen. Da kein spezifischer Antikörper für dieses Protein für die Immunfluoreszenz verfügbar ist, müsste dieses Protein mit einem *Protein-Tag* versehen und in den entsprechenden Zelltypen überexprimiert werden. Weiterhin sollte der pH-Wert in den betroffenen Zellorganellen ermittelt werden. Zusätzlich

wäre die Bestimmung des endosomalen pH-Werts der *Atp6v0a2*-Mefs nötig, um den Effekt des pH-Werts auf die endosomale Reifung zu untersuchen.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit Entwicklungsansätze für eine Therapie der ARCL2A-Patienten. Wahrscheinlich könnte durch die hohe Verabreichung von Zuckern während der embryonalen Entwicklung des Kindes die sekundären Dystroglykanopathie und somit die Pflasterstein-Lissenzephalie behandelt werden. Allerdings wird im Regelfall diese Gehirnfehlbildung der Kinder erst nach der Geburt diagnostiziert, weil die Prädisposition der Eltern vorher nicht bekannt war. Damit ist dieser Ansatz für ARCL2A-Patienten nicht umsetzbar. Vielversprechender stellt sich die Therapie der neuronalen Speicherkrankheit dar. Beispielsweise werden für die Niemann-Pick-Krankheit Typ C mehrere Medikamente in klinischen Studien getestet. Ein interessantes Medikament könnte Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin darstellen, welches den Cholesterintransport im endosomalen System erhöht und dadurch wiederum die Cholesterin-Akkumulation erniedrigt. Sollte dieser Effekt durch *in vitro* Versuche mit *Atp6v0a2* defizienten Mefs oder Mausneuronen durch *Rescue*-Experimente bestätigt werden, können Experimente in den *Atp6v0a2*-Mausmodellen folgen.

5.2. Aufklärung des Hautphänotyps

Die *Atp6v0a2*-Mausmodelle weisen einen Cutis laxa-Phänotyp durch eine Reduktion der Dermis-Dicke und elastischen Fasern auf. Bisher ist die Ursache der Reduktion der elastischen Fasern in den Mausmodellen und ARCL2A-Patienten nicht aufgeklärt. Phänotypische Überschneidungen mit dem *Ltbp4*-Mausmodell und eine verringerte Aktivierung des TGF- β -Signalwegs lassen auf eine Störung des TGF- β -Lap-Ltbp-Komplexes schließen, da diese Integration von TGF- β notwendig für dessen spätere Aktivierung ist. Somit sollte dieser Komplex in der Haut von verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht werden. Wiederum ist *LTBP4* der aussichtsreichste Kandidat, da ein Verlust dieses Proteins ebenfalls zu einer Cutis laxa führt.

5.3. Globozoospermie und die Funktion von *Atp6v0a2*

Männliche *Atp6v0a2* defiziente Mäuse sind infertil durch eine Globozoospermie. Dies offenbart weitere Einblicke in die Entwicklung des Akrosoms. Weil dieser Phänotypen von den ARCL2A-Patienten nicht bekannt war, sollten Spermien der Patienten untersucht werden.

Des Weiteren scheint der Funktionsverlust von *Atp6v0a2* durch eine Störung des endosomalen Transportwegs für die Entwicklungsstörung des Akrosoms verantwortlich zu sein. Deshalb könnte die akrosomale Entwicklung eine Möglichkeit darstellen, die molekulare Funktion von *Atp6v0a2* im endosomalen Transportweg in-vivo zu untersuchen. Somit könnten über Immunpräzipitation oder Kolo-kalisation-Studien weitere Interaktionspartner von *Atp6v0a2* identifiziert werden. Der Vergleich mit dem *Atp6v0a2*^{RQ/RQ}-Mausmodell könnte die Abhängigkeit der Protein-Interaktionen vom pH-Wert im Golgi-Apparat und dem Akrosom zeigen. Die Erkenntnisse des Spermien-Phänotyps könnten somit helfen, die Entwicklung der neuronalen Speichkrankheit im Gehirn besser zu verstehen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Morava, E., Guillard, M., Lefeber, D. J. & Wevers, R. A. Autosomal recessive cutis laxa syndrome revisited. *Eur J Hum Genet* **17**, 1099-1110, doi:10.1038/ejhg.2009.22 (2009).
- 2 Huchtagowder, V. *et al.* Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *Am J Hum Genet* **78**, 1075-1080, doi:10.1086/504304 (2006).
- 3 Loeys, B. *et al.* Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa. *Hum Mol Genet* **11**, 2113-2118, doi:10.1093/hmg/11.18.2113 (2002).
- 4 Kornak, U. *et al.* Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nat Genet* **40**, 32-34, doi:10.1038/ng.2007.45 (2008).
- 5 Van Damme, T. *et al.* Mutations in ATP6V1E1 or ATP6V1A Cause Autosomal-Recessive Cutis Laxa. *Am J Hum Genet* **100**, 216-227, doi:10.1016/j.ajhg.2016.12.010 (2017).
- 6 Dimopoulou, A. *et al.* Genotype-phenotype spectrum of PYCR1-related autosomal recessive cutis laxa. *Mol Genet Metab* **110**, 352-361, doi:10.1016/j.ymgme.2013.08.009 (2013).
- 7 Reversade, B. *et al.* Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features. *Nat Genet* **41**, 1016-1021, doi:10.1038/ng.413 (2009).
- 8 Rujano, M. A. *et al.* Mutations in the X-linked ATP6AP2 cause a glycosylation disorder with autophagic defects. *J Exp Med* **214**, 3707-3729, doi:10.1084/jem.20170453 (2017).
- 9 Kaler, S. G. in *GeneReviews((R))* (eds M. P. Adam *et al.*) (1993).
- 10 Horvath, R. *et al.* Congenital cataract, muscular hypotonia, developmental delay and sensorineural hearing loss associated with a defect in copper metabolism. *J Inher Metab Dis* **28**, 479-492, doi:10.1007/s10545-005-0479-x (2005).
- 11 Skjorringe, T. *et al.* Characterization of ATP7A missense mutants suggests a correlation between intracellular trafficking and severity of Menkes disease. *Sci Rep* **7**, 757, doi:10.1038/s41598-017-00618-6 (2017).
- 12 Fischer-Zirnsak, B. *et al.* Recurrent De Novo Mutations Affecting Residue Arg138 of Pyrroline-5-Carboxylate Synthase Cause a Progeroid Form of Autosomal-Dominant Cutis Laxa. *Am J Hum Genet* **97**, 483-492, doi:10.1016/j.ajhg.2015.08.001 (2015).
- 13 Callewaert, B. *et al.* New insights into the pathogenesis of autosomal-dominant cutis laxa with report of five ELN mutations. *Hum Mutat* **32**, 445-455, doi:10.1002/humu.21462 (2011).
- 14 Markova, D. *et al.* Genetic heterogeneity of cutis laxa: a heterozygous tandem duplication within the fibulin-5 (FBLN5) gene. *Am J Hum Genet* **72**, 998-1004, doi:10.1086/373940 (2003).
- 15 Kariminejad, A. *et al.* Discriminative Features in Three Autosomal Recessive Cutis Laxa Syndromes: Cutis Laxa IIA, Cutis Laxa IIB, and Geroderma Osteoplastica. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18030635 (2017).
- 16 Basel-Vanagaite, L. *et al.* RIN2 deficiency results in macrocephaly, alopecia, cutis laxa, and scoliosis: MACS syndrome. *Am J Hum Genet* **85**, 254-263, doi:10.1016/j.ajhg.2009.07.001 (2009).
- 17 Hennies, H. C. *et al.* Geroderma osteodysplastica is caused by mutations in SCYL1BP1, a Rab-6 interacting golgin. *Nat Genet* **40**, 1410-1412, doi:10.1038/ng.252 (2008).
- 18 Egerer, J. *et al.* GORAB Missense Mutations Disrupt RAB6 and ARF5 Binding and Golgi Targeting. *J Invest Dermatol* **135**, 2368-2376, doi:10.1038/jid.2015.192 (2015).
- 19 Albrecht, B. *et al.* MACS syndrome: A combined collagen and elastin disorder due to abnormal Golgi trafficking. *Am J Med Genet A* **152A**, 2916-2918, doi:10.1002/ajmg.a.33712 (2010).
- 20 Huchtagowder, V. *et al.* Loss-of-function mutations in ATP6V0A2 impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival. *Hum Mol Genet* **18**, 2149-2165, doi:10.1093/hmg/ddp148 (2009).
- 21 Beyens, A. *et al.* ATP6V0A2-related cutis laxa in 10 novel patients: Focus on clinical variability and expansion of the phenotype. *Exp Dermatol* **28**, 1142-1145, doi:10.1111/exd.13723 (2019).
- 22 Bahena-Bahena, D. *et al.* ATP6V0A2 mutations present in two Mexican Mestizo children with an autosomal recessive cutis laxa syndrome type IIA. *Mol Genet Metab Rep* **1**, 203-212, doi:10.1016/j.ymgmr.2014.04.003 (2014).

- 23 Van Maldergem, L. *et al.* Cobblestone-like brain dysgenesis and altered glycosylation in congenital cutis laxa, Debre type. *Neurology* **71**, 1602-1608, doi:10.1212/01.wnl.0000327822.52212.c7 (2008).
- 24 Greally, M. T. *et al.* Autosomal recessive cutis laxa type 2A (ARCL2A) mimicking Ehlers-Danlos syndrome by its dermatological manifestations: report of three affected patients. *Am J Med Genet A* **164A**, 1245-1253, doi:10.1002/ajmg.a.36411 (2014).
- 25 Cohen, R. *et al.* Polymicrogyria and myoclonic epilepsy in autosomal recessive cutis laxa type 2A. *Neurogenetics* **17**, 251-257, doi:10.1007/s10048-016-0491-3 (2016).
- 26 Karacan, I. *et al.* A Novel ATP6V0A2 Mutation Causing Recessive Cutis Laxa with Unusual Manifestations of Bleeding Diathesis and Defective Wound Healing. *Turk J Haematol* **36**, 29-36, doi:10.4274/tjh.galenos.2018.2018.0325 (2019).
- 27 Fischer, B. *et al.* Further characterization of ATP6V0A2-related autosomal recessive cutis laxa. *Hum Genet* **131**, 1761-1773, doi:10.1007/s00439-012-1197-8 (2012).
- 28 Moore, S. A. *et al.* Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* **418**, 422-425, doi:10.1038/nature00838 (2002).
- 29 Michele, D. E. *et al.* Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* **418**, 417-422, doi:10.1038/nature00837 (2002).
- 30 Saito, Y. *et al.* Altered glycosylation of alpha-dystroglycan in neurons of Fukuyama congenital muscular dystrophy brains. *Brain Res* **1075**, 223-228, doi:10.1016/j.brainres.2005.12.108 (2006).
- 31 Endo, T. Glycobiology of alpha-dystroglycan and muscular dystrophy. *J Biochem* **157**, 1-12, doi:10.1093/jb/mvu066 (2015).
- 32 Nickolls, A. R. & Bonnemann, C. G. The roles of dystroglycan in the nervous system: insights from animal models of muscular dystrophy. *Dis Model Mech* **11**, doi:10.1242/dmm.035931 (2018).
- 33 A., L. J. a. B. in *Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections* Ch. Neuronal Migration Disorders, (Elsevier Inc., 2013).
- 34 Myshra, T. D. *et al.* Dystroglycan on radial glia end feet is required for pial basement membrane integrity and columnar organization of the developing cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 1047-1063, doi:10.1097/NEN.0b013e318274a128 (2012).
- 35 Elias, L. A., Wang, D. D. & Kriegstein, A. R. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* **448**, 901-907, doi:10.1038/nature06063 (2007).
- 36 van Reeuwijk, J. *et al.* POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* **42**, 907-912, doi:10.1136/jmg.2005.031963 (2005).
- 37 Abbas, Y. M., Wu, D., Bueler, S. A., Robinson, C. V. & Rubinstein, J. L. Structure of V-ATPase from the mammalian brain. *Science* **367**, 1240-1246, doi:10.1126/science.aaz2924 (2020).
- 38 Forgac, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 917-929, doi:10.1038/nrm2272 (2007).
- 39 Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. & Forgac, M. Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12397-12402, doi:10.1073/pnas.221291798 (2001).
- 40 Imamura, H. *et al.* Evidence for rotation of V1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2312-2315, doi:10.1073/pnas.0436796100 (2003).
- 41 Hayek, S. R., Rane, H. S. & Parra, K. J. Reciprocal Regulation of V-ATPase and Glycolytic Pathway Elements in Health and Disease. *Front Physiol* **10**, 127, doi:10.3389/fphys.2019.00127 (2019).
- 42 Lu, M., Sautin, Y. Y., Holliday, L. S. & Gluck, S. L. The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H⁺-ATPase. *J Biol Chem* **279**, 8732-8739, doi:10.1074/jbc.M303871200 (2004).
- 43 Zhang, C. S. *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature* **548**, 112-116, doi:10.1038/nature23275 (2017).
- 44 Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J. & van der Goot, F. G. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One* **3**, e2758, doi:10.1371/journal.pone.0002758 (2008).

- 45 Stransky, L. A. & Forgac, M. Amino Acid Availability Modulates Vacuolar H⁺-ATPase Assembly. *J Biol Chem* **290**, 27360-27369, doi:10.1074/jbc.M115.659128 (2015).
- 46 Zhang, C. S. *et al.* The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism. *Cell Metab* **20**, 526-540, doi:10.1016/j.cmet.2014.06.014 (2014).
- 47 Hurtado-Lorenzo, A. *et al.* V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* **8**, 124-136, doi:10.1038/ncb1348 (2006).
- 48 Marshansky, V. & Futai, M. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 415-426, doi:10.1016/j.ceb.2008.03.015 (2008).
- 49 Moriyama, Y. & Nelson, N. H⁺-translocating ATPase in Golgi apparatus. Characterization as vacuolar H⁺-ATPase and its subunit structures. *J Biol Chem* **264**, 18445-18450 (1989).
- 50 Peng, S. B., Crider, B. P., Xie, X. S. & Stone, D. K. Alternative mRNA splicing generates tissue-specific isoforms of 116-kDa polypeptide of vacuolar proton pump. *J Biol Chem* **269**, 17262-17266 (1994).
- 51 Wagner, C. A. *et al.* Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev* **84**, 1263-1314, doi:10.1152/physrev.00045.2003 (2004).
- 52 Morel, N., Dedieu, J. C. & Philippe, J. M. Specific sorting of the a1 isoform of the V-H⁺-ATPase a subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane. *J Cell Sci* **116**, 4751-4762, doi:10.1242/jcs.00791 (2003).
- 53 Jahn, D. *Charakterisierung der Pathomechanismen von ATP6VOA2 abhängiger Cutis laxa in Maus und Mensch*, Freie Universität Berlin, (2019).
- 54 Sun-Wada, G. H. *et al.* A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J Biol Chem* **277**, 18098-18105, doi:10.1074/jbc.M111567200 (2002).
- 55 Toyomura, T. *et al.* From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺-ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* **278**, 22023-22030, doi:10.1074/jbc.M302436200 (2003).
- 56 Oka, T. *et al.* a4, a unique kidney-specific isoform of mouse vacuolar H⁺-ATPase subunit a. *J Biol Chem* **276**, 40050-40054, doi:10.1074/jbc.M106488200 (2001).
- 57 Manolson, M. F. *et al.* STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase subunit Vph1p. *J Biol Chem* **269**, 14064-14074 (1994).
- 58 Schep, D. G., Zhao, J. & Rubinstein, J. L. Models for the a subunits of the *Thermus thermophilus* V/A-ATPase and *Saccharomyces cerevisiae* V-ATPase enzymes by cryo-EM and evolutionary covariance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 3245-3250, doi:10.1073/pnas.1521990113 (2016).
- 59 Nakanishi, A., Kishikawa, J. I., Tamakoshi, M., Mitsuoka, K. & Yokoyama, K. Cryo EM structure of intact rotary H⁽⁺⁾-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. *Nat Commun* **9**, 89, doi:10.1038/s41467-017-02553-6 (2018).
- 60 Kartner, N., Yao, Y., Bhargava, A. & Manolson, M. F. Topology, glycosylation and conformational changes in the membrane domain of the vacuolar H⁺-ATPase a subunit. *J Cell Biochem* **114**, 1474-1487, doi:10.1002/jcb.24489 (2013).
- 61 Glick, B. S. & Luini, A. Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a005215, doi:10.1101/cshperspect.a005215 (2011).
- 62 Patterson, G. H. *et al.* Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* **133**, 1055-1067, doi:10.1016/j.cell.2008.04.044 (2008).
- 63 Nakano, A. & Luini, A. Passage through the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 471-478, doi:10.1016/j.ceb.2010.05.003 (2010).
- 64 Barlowe, C. *et al.* COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907, doi:10.1016/0092-8674(94)90138-4 (1994).
- 65 Bannykh, S. I., Rowe, T. & Balch, W. E. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol* **135**, 19-35, doi:10.1083/jcb.135.1.19 (1996).
- 66 Lippincott-Schwartz, J. Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* **3**, 81-88, doi:10.1016/0962-8924(93)90078-f (1993).

- 67 Lorente-Rodriguez, A. & Barlowe, C. Entry and exit mechanisms at the cis-face of the Golgi complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, doi:10.1101/cshperspect.a005207 (2011).
- 68 Glick, B. S. & Nakano, A. Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 113-132, doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175421 (2009).
- 69 Wieland, F. T., Gleason, M. L., Serafini, T. A. & Rothman, J. E. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* **50**, 289-300, doi:10.1016/0092-8674(87)90224-8 (1987).
- 70 Pelham, H. R. Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J* **7**, 913-918 (1988).
- 71 Bielli, A. *et al.* Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J Cell Biol* **171**, 919-924, doi:10.1083/jcb.200509095 (2005).
- 72 Bi, X., Corpina, R. A. & Goldberg, J. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* **419**, 271-277, doi:10.1038/nature01040 (2002).
- 73 Yoshihisa, T., Barlowe, C. & Schekman, R. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* **259**, 1466-1468, doi:10.1126/science.8451644 (1993).
- 74 Miller, E. A. *et al.* Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* **114**, 497-509, doi:10.1016/s0092-8674(03)00609-3 (2003).
- 75 Copic, A., Latham, C. F., Horlbeck, M. A., D'Arcangelo, J. G. & Miller, E. A. ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p. *Science* **335**, 1359-1362, doi:10.1126/science.1215909 (2012).
- 76 Lord, C. *et al.* Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* **473**, 181-186, doi:10.1038/nature09969 (2011).
- 77 Peyroche, A., Paris, S. & Jackson, C. L. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* **384**, 479-481, doi:10.1038/384479a0 (1996).
- 78 Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**, 4675-4684, doi:10.1021/bi962252b (1997).
- 79 Goldberg, J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-248, doi:10.1016/s0092-8674(00)81754-7 (1998).
- 80 Hara-Kuge, S. *et al.* En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J Cell Biol* **124**, 883-892, doi:10.1083/jcb.124.6.883 (1994).
- 81 Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. & Duden, R. The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell* **15**, 1011-1023, doi:10.1091/mbc.e03-10-0724 (2004).
- 82 Beck, R. *et al.* Coatamer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *J Cell Biol* **194**, 765-777, doi:10.1083/jcb.201011027 (2011).
- 83 Presley, J. F. *et al.* Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature* **417**, 187-193, doi:10.1038/417187a (2002).
- 84 Arakel, E. C. & Schwappach, B. Formation of COPI-coated vesicles at a glance. *J Cell Sci* **131**, doi:10.1242/jcs.209890 (2018).
- 85 Willett, R. *et al.* COG lobe B sub-complex engages v-SNARE GS15 and functions via regulated interaction with lobe A sub-complex. *Sci Rep* **6**, 29139, doi:10.1038/srep29139 (2016).
- 86 Wang, T., Li, L. & Hong, W. SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic* **18**, 767-775, doi:10.1111/tra.12524 (2017).
- 87 Brandizzi, F. & Barlowe, C. Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 382-392, doi:10.1038/nrm3588 (2013).
- 88 Kim, J. H. *et al.* Dynamic measurement of the pH of the Golgi complex in living cells using retrograde transport of the verotoxin receptor. *J Cell Biol* **134**, 1387-1399, doi:10.1083/jcb.134.6.1387 (1996).

- 89 Seksek, O., Biwersi, J. & Verkman, A. S. Direct measurement of trans-Golgi pH in living cells and regulation by second messengers. *J Biol Chem* **270**, 4967-4970, doi:10.1074/jbc.270.10.4967 (1995).
- 90 Paroutis, P., Touret, N. & Grinstein, S. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)* **19**, 207-215, doi:10.1152/physiol.00005.2004 (2004).
- 91 Kellokumpu, S. Golgi pH, Ion and Redox Homeostasis: How Much Do They Really Matter? *Front Cell Dev Biol* **7**, 93, doi:10.3389/fcell.2019.00093 (2019).
- 92 Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y. & Kinoshita, T. GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat Cell Biol* **10**, 1135-1145, doi:10.1038/ncb1773 (2008).
- 93 Gentzsch, M. *et al.* The PDZ-binding chloride channel ClC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *J Biol Chem* **278**, 6440-6449, doi:10.1074/jbc.M211050200 (2003).
- 94 Schapiro, F. B. & Grinstein, S. Determinants of the pH of the Golgi complex. *J Biol Chem* **275**, 21025-21032, doi:10.1074/jbc.M002386200 (2000).
- 95 Numata, M. & Orłowski, J. Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem* **276**, 17387-17394, doi:10.1074/jbc.M101319200 (2001).
- 96 Foulquier, F. *et al.* TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet* **91**, 15-26, doi:10.1016/j.ajhg.2012.05.002 (2012).
- 97 Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B. & Novak, J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* **15**, 346-366, doi:10.1038/s41581-019-0129-4 (2019).
- 98 Orlean, P. Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 5796-5805, doi:10.1128/mcb.10.11.5796 (1990).
- 99 Helenius, J. *et al.* Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* **415**, 447-450, doi:10.1038/415447a (2002).
- 100 Burda, P. & Aebi, M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 239-257, doi:10.1016/s0304-4165(98)00127-5 (1999).
- 101 Silberstein, S. & Gilmore, R. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J* **10**, 849-858 (1996).
- 102 Gavel, Y. & von Heijne, G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**, 433-442, doi:10.1093/protein/3.5.433 (1990).
- 103 Kornfeld, R. & Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-664, doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.003215 (1985).
- 104 Li, Y. & Chen, X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**, 887-905, doi:10.1007/s00253-012-4040-1 (2012).
- 105 Hennet, T. The galactosyltransferase family. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1081-1095, doi:10.1007/s00018-002-8489-4 (2002).
- 106 Wopereis, S., Lefeber, D. J., Morava, E. & Wevers, R. A. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clin Chem* **52**, 574-600, doi:10.1373/clinchem.2005.063040 (2006).
- 107 Manya, H. *et al.* Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 500-505, doi:10.1073/pnas.0307228101 (2004).
- 108 Stalnaker, S. H. *et al.* Glycomic analyses of mouse models of congenital muscular dystrophy. *J Biol Chem* **286**, 21180-21190, doi:10.1074/jbc.M110.203281 (2011).
- 109 Inamori, K. *et al.* N-Acetylglucosaminyltransferase IX acts on the GlcNAc beta 1,2-Man alpha 1-Ser/Thr moiety, forming a 2,6-branched structure in brain O-mannosyl glycan. *J Biol Chem* **279**, 2337-2340, doi:10.1074/jbc.C300480200 (2004).

- 110 Halmo, S. M. *et al.* Protein O-Linked Mannose beta-1,4-N-Acetylglucosaminyl-transferase 2 (POMGNT2) Is a Gatekeeper Enzyme for Functional Glycosylation of alpha-Dystroglycan. *J Biol Chem* **292**, 2101-2109, doi:10.1074/jbc.M116.764712 (2017).
- 111 Stevens, E. *et al.* Mutations in B3GALNT2 cause congenital muscular dystrophy and hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* **92**, 354-365, doi:10.1016/j.ajhg.2013.01.016 (2013).
- 112 Yoshida-Moriguchi, T. *et al.* SGK196 is a glycosylation-specific O-mannose kinase required for dystroglycan function. *Science* **341**, 896-899, doi:10.1126/science.1239951 (2013).
- 113 Gerin, I. *et al.* ISPD produces CDP-ribitol used by FKTN and FKRK to transfer ribitol phosphate onto alpha-dystroglycan. *Nat Commun* **7**, 11534, doi:10.1038/ncomms11534 (2016).
- 114 Manya, H. *et al.* The Muscular Dystrophy Gene TMEM5 Encodes a Ribitol beta1,4-Xylosyltransferase Required for the Functional Glycosylation of Dystroglycan. *J Biol Chem* **291**, 24618-24627, doi:10.1074/jbc.M116.751917 (2016).
- 115 Praissman, J. L. *et al.* B4GAT1 is the priming enzyme for the LARGE-dependent functional glycosylation of alpha-dystroglycan. *Elife* **3**, doi:10.7554/eLife.03943 (2014).
- 116 Inamori, K. *et al.* Xylosyl- and glucuronyltransferase functions of LARGE in alpha-dystroglycan modification are conserved in LARGE2. *Glycobiology* **23**, 295-302, doi:10.1093/glycob/cws152 (2013).
- 117 Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481-3500, doi:10.1038/emboj.2011.286 (2011).
- 118 Bitsikas, V., Correa, I. R., Jr. & Nichols, B. J. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *Elife* **3**, e03970, doi:10.7554/eLife.03970 (2014).
- 119 Kaksonen, M. & Roux, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 313-326, doi:10.1038/nrm.2017.132 (2018).
- 120 Schmid, E. M. & McMahon, H. T. Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* **448**, 883-888, doi:10.1038/nature06031 (2007).
- 121 Mettlen, M., Loerke, D., Yasar, D., Danuser, G. & Schmid, S. L. Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **188**, 919-933, doi:10.1083/jcb.200908078 (2010).
- 122 Kelly, B. T. *et al.* Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* **345**, 459-463, doi:10.1126/science.1254836 (2014).
- 123 Lamaze, C., Fujimoto, L. M., Yin, H. L. & Schmid, S. L. The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem* **272**, 20332-20335, doi:10.1074/jbc.272.33.20332 (1997).
- 124 Antonny, B. *et al.* Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J* **35**, 2270-2284, doi:10.15252/emboj.201694613 (2016).
- 125 Grassart, A. *et al.* Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **205**, 721-735, doi:10.1083/jcb.201403041 (2014).
- 126 Rubino, M., Miaczynska, M., Lippe, R. & Zerial, M. Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem* **275**, 3745-3748, doi:10.1074/jbc.275.6.3745 (2000).
- 127 Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. & Zerial, M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625, doi:10.1038/17618 (1999).
- 128 Murray, J. T., Panaretou, C., Stenmark, H., Miaczynska, M. & Backer, J. M. Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic* **3**, 416-427, doi:10.1034/j.1600-0854.2002.30605.x (2002).
- 129 Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749, doi:10.1016/j.cell.2005.06.043 (2005).
- 130 Ostrowicz, C. W. *et al.* Defined subunit arrangement and rab interactions are required for functionality of the HOPS tethering complex. *Traffic* **11**, 1334-1346, doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01097.x (2010).

- 131 Peplowska, K., Markgraf, D. F., Ostrowicz, C. W., Bange, G. & Ungermann, C. The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Dev Cell* **12**, 739-750, doi:10.1016/j.devcel.2007.03.006 (2007).
- 132 Balderhaar, H. J. & Ungermann, C. CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci* **126**, 1307-1316, doi:10.1242/jcs.107805 (2013).
- 133 Yamashiro, D. J. & Maxfield, F. R. Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* **105**, 2723-2733, doi:10.1083/jcb.105.6.2723 (1987).
- 134 Coffey, J. W. & De Duve, C. Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J Biol Chem* **243**, 3255-3263 (1968).
- 135 Cooke, H. J. & Saunders, P. T. Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* **3**, 790-801, doi:10.1038/nrg911 (2002).
- 136 Jan, S. Z. *et al.* Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1838-1850, doi:10.1016/j.bbadis.2012.02.008 (2012).
- 137 Balhorn, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* **8**, 227, doi:10.1186/gb-2007-8-9-227 (2007).
- 138 Wade, D. (2020).
- 139 Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E. & Tres, L. L. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* **14**, 4628-4640, doi:10.1091/mbc.e03-04-0226 (2003).
- 140 Khawar, M. B., Gao, H. & Li, W. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Front Cell Dev Biol* **7**, 195, doi:10.3389/fcell.2019.00195 (2019).
- 141 Chaîneau, M., Danglot, L., Proux-Gillardeaux, V. & Galli, T. Role of HRB in clathrin-dependent endocytosis. *J Biol Chem* **283**, 34365-34373, doi:10.1074/jbc.M804587200 (2008).
- 142 Paiardi, C., Pasini, M. E., Gioria, M. & Berruti, G. Failure of acrosome formation and globozoospermia in the wobbler mouse, a Vps54 spontaneous recessive mutant. *Spermatogenesis* **1**, 52-62, doi:10.4161/spmg.1.1.14698 (2011).
- 143 Yao, R. *et al.* Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11211-11216, doi:10.1073/pnas.162027899 (2002).
- 144 Xiao, N. *et al.* PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest* **119**, 802-812, doi:10.1172/JCI36230 (2009).
- 145 Ozbalci, C., Sachsenheimer, T. & Brugger, B. Quantitative analysis of cellular lipids by nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **1033**, 3-20, doi:10.1007/978-1-62703-487-6_1 (2013).
- 146 Heide, H. *et al.* Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. *Cell Metab* **16**, 538-549, doi:10.1016/j.cmet.2012.08.009 (2012).
- 147 Morelle, W. & Michalski, J. C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat Protoc* **2**, 1585-1602, doi:10.1038/nprot.2007.227 (2007).
- 148 Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N. & Mann, M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods* **11**, 319-324, doi:10.1038/nmeth.2834 (2014).
- 149 Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367-1372, doi:10.1038/nbt.1511 (2008).
- 150 Halfter, W., Dong, S., Yip, Y. P., Willem, M. & Mayer, U. A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *J Neurosci* **22**, 6029-6040, doi:20026580 (2002).
- 151 Liao, G. *et al.* Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction and autophagic stress in Npc1 ^{-/-} mouse brain. *Am J Pathol* **171**, 962-975, doi:10.2353/ajpath.2007.070052 (2007).
- 152 Ferreira, C. R. & Gahl, W. A. Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis* **2**, 1-71, doi:10.3233/TRD-160005 (2017).

- 153 Ortiz-Rodriguez, A., Acaz-Fonseca, E., Boya, P., Arevalo, M. A. & Garcia-Segura, L. M. Lipotoxic Effects of Palmitic Acid on Astrocytes Are Associated with Autophagy Impairment. *Mol Neurobiol* **56**, 1665-1680, doi:10.1007/s12035-018-1183-9 (2019).
- 154 Thukral, L. *et al.* The Molecular Mechanism Underlying Recruitment and Insertion of Lipid-Anchored LC3 Protein into Membranes. *Biophys J* **109**, 2067-2078, doi:10.1016/j.bpj.2015.09.022 (2015).
- 155 Feliciangeli, S. F. *et al.* Identification of a pH sensor in the furin propeptide that regulates enzyme activation. *J Biol Chem* **281**, 16108-16116, doi:10.1074/jbc.M600760200 (2006).
- 156 Cousin, C. *et al.* Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma. *Hypertension* **53**, 1077-1082, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.127258 (2009).
- 157 Waters, M. G., Serafini, T. & Rothman, J. E. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**, 248-251, doi:10.1038/349248a0 (1991).
- 158 Weiss, O., Holden, J., Rulka, C. & Kahn, R. A. Nucleotide binding and cofactor activities of purified bovine brain and bacterially expressed ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem* **264**, 21066-21072 (1989).
- 159 Potelle, S. *et al.* Glycosylation abnormalities in Gdt1p/TMEM165 deficient cells result from a defect in Golgi manganese homeostasis. *Hum Mol Genet* **25**, 1489-1500, doi:10.1093/hmg/ddw026 (2016).
- 160 Luzio, J. P. *et al.* Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). *Biochem J* **270**, 97-102, doi:10.1042/bj2700097 (1990).
- 161 Granger, B. L. *et al.* Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J Biol Chem* **265**, 12036-12043 (1990).
- 162 Jin, Z. *et al.* Disease-associated mutations affect GPR56 protein trafficking and cell surface expression. *Hum Mol Genet* **16**, 1972-1985, doi:10.1093/hmg/ddm144 (2007).
- 163 The_UniProt._Consortium. *P08121* (*CO3A1_MOUSE*), <<https://www.uniprot.org/uniprot/P08121>> (zuletzt geprüft am 10.04.2020).
- 164 Hansen, L. S., Coggle, J. E., Wells, J. & Charles, M. W. The influence of the hair cycle on the thickness of mouse skin. *Anat Rec* **210**, 569-573, doi:10.1002/ar.1092100404 (1984).
- 165 Eggen, K. H., Malmstrom, A. & Kolset, S. O. Decorin and a large dermatan sulfate proteoglycan in bovine striated muscle. *Biochim Biophys Acta* **1204**, 287-297, doi:10.1016/0167-4838(94)90020-5 (1994).
- 166 Dinter, A. & Berger, E. G. Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* **109**, 571-590, doi:10.1007/s004180050256 (1998).
- 167 Gilormini, P. A. *et al.* Chemical glycomics enrichment: imaging the recycling of sialic acid in living cells. *J Inherit Metab Dis* **41**, 515-523, doi:10.1007/s10545-017-0118-3 (2018).
- 168 Wei, J. *et al.* The GARP Complex Is Involved in Intracellular Cholesterol Transport via Targeting NPC2 to Lysosomes. *Cell Rep* **19**, 2823-2835, doi:10.1016/j.celrep.2017.06.012 (2017).
- 169 Kim, D. H. *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163-175, doi:10.1016/s0092-8674(02)00808-5 (2002).
- 170 Takashima, K. *et al.* COPI-mediated retrieval of SCAP is crucial for regulating lipogenesis under basal and sterol-deficient conditions. *J Cell Sci* **128**, 2805-2815, doi:10.1242/jcs.164137 (2015).
- 171 Ungar, D., Oka, T., Krieger, M. & Hughson, F. M. Retrograde transport on the COG railway. *Trends Cell Biol* **16**, 113-120, doi:10.1016/j.tcb.2005.12.004 (2006).
- 172 Foulquier, F. *et al.* A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. *Hum Mol Genet* **16**, 717-730, doi:10.1093/hmg/ddl476 (2007).
- 173 Sato, F. *et al.* Lysyl Oxidase Enhances the Deposition of Tropoelastin through the Catalysis of Tropoelastin Molecules on the Cell Surface. *Biol Pharm Bull* **40**, 1646-1653, doi:10.1248/bpb.b17-00027 (2017).

- 174 Knipper, J. A. *et al.* Interleukin-4 Receptor alpha Signaling in Myeloid Cells Controls Collagen Fibril Assembly in Skin Repair. *Immunity* **43**, 803-816, doi:10.1016/j.immuni.2015.09.005 (2015).
- 175 Pillay, P. & Manger, P. R. Order-specific quantitative patterns of cortical gyration. *Eur J Neurosci* **25**, 2705-2712, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05524.x (2007).
- 176 Ackroyd, M. R. *et al.* Reduced expression of fukutin related protein in mice results in a model for fukutin related protein associated muscular dystrophies. *Brain* **132**, 439-451, doi:10.1093/brain/awn335 (2009).
- 177 Sudo, A. *et al.* Temporal requirement of dystroglycan glycosylation during brain development and rescue of severe cortical dysplasia via gene delivery in the fetal stage. *Hum Mol Genet* **27**, 1174-1185, doi:10.1093/hmg/ddy032 (2018).
- 178 Hu, H., Yang, Y., Eade, A., Xiong, Y. & Qi, Y. Breaches of the pial basement membrane and disappearance of the glia limitans during development underlie the cortical lamination defect in the mouse model of muscle-eye-brain disease. *J Comp Neurol* **502**, 168-183 (2007).
- 179 Jeong, S. J., Li, S., Luo, R., Strokes, N. & Piao, X. Loss of Col3a1, the gene for Ehlers-Danlos syndrome type IV, results in neocortical dyslamination. *PLoS One* **7**, e29767, doi:10.1371/journal.pone.0029767 (2012).
- 180 Li, S. *et al.* GPR56 regulates pial basement membrane integrity and cortical lamination. *J Neurosci* **28**, 5817-5826, doi:10.1523/JNEUROSCI.0853-08.2008 (2008).
- 181 Piao, X. *et al.* Genotype-phenotype analysis of human frontoparietal polymicrogyria syndromes. *Ann Neurol* **58**, 680-687, doi:10.1002/ana.20616 (2005).
- 182 Januzzi, J. L., Azrolan, N., O'Connell, A., Aalto-Setälä, K. & Breslow, J. L. Characterization of the mouse apolipoprotein ApoA-1/Apoc-3 gene locus: genomic, mRNA, and protein sequences with comparisons to other species. *Genomics* **14**, 1081-1088, doi:10.1016/s0888-7543(05)80133-8 (1992).
- 183 Morelle, W. *et al.* Galactose Supplementation in Patients With TMEM165-CDG Rescues the Glycosylation Defects. *J Clin Endocrinol Metab* **102**, 1375-1386, doi:10.1210/jc.2016-3443 (2017).
- 184 Grewal, P. K., Holzfeind, P. J., Bittner, R. E. & Hewitt, J. E. Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of alpha-dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nat Genet* **28**, 151-154, doi:10.1038/88865 (2001).
- 185 Longman, C. *et al.* Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet* **12**, 2853-2861, doi:10.1093/hmg/ddg307 (2003).
- 186 Kusaka, H., Hirano, A., Bornstein, M. B. & Raine, C. S. Basal lamina formation by astrocytes in organotypic cultures of mouse spinal cord tissue. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**, 295-303, doi:10.1097/00005072-198505000-00007 (1985).
- 187 Larson, A. A. *et al.* TRAPPC11 and GOSR2 mutations associate with hypoglycosylation of alpha-dystroglycan and muscular dystrophy. *Skelet Muscle* **8**, 17, doi:10.1186/s13395-018-0163-0 (2018).
- 188 Laufman, O., Freeze, H. H., Hong, W. & Lev, S. Deficiency of the Cog8 subunit in normal and CDG-derived cells impairs the assembly of the COG and Golgi SNARE complexes. *Traffic* **14**, 1065-1077, doi:10.1111/tra.12093 (2013).
- 189 Matalonga, L. *et al.* Mutations in TRAPPC11 are associated with a congenital disorder of glycosylation. *Hum Mutat* **38**, 148-151, doi:10.1002/humu.23145 (2017).
- 190 Fusella, A., Micaroni, M., Di Giandomenico, D., Mironov, A. A. & Beznoussenko, G. V. Segregation of the Qb-SNAREs GS27 and GS28 into Golgi vesicles regulates intra-Golgi transport. *Traffic* **14**, 568-584, doi:10.1111/tra.12055 (2013).
- 191 in *An Introduction to Epilepsy* (eds E. B. Bromfield, J. E. Cavazos, & J. I. Sirven) (2006).
- 192 van Reeuwijk, J., Brunner, H. G. & van Bokhoven, H. Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet* **67**, 281-289, doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00368.x (2005).
- 193 Falsaperla, R. *et al.* Congenital muscular dystrophy: from muscle to brain. *Ital J Pediatr* **42**, 78, doi:10.1186/s13052-016-0289-9 (2016).

- 194 Piao, X. *et al.* G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* **303**, 2033-2036, doi:10.1126/science.1092780 (2004).
- 195 Munoz, T. a. R., Julian A.J. Epilepsy and Niemann Pick C Disease. *Journal of Pediatric Epilepsy* **3**, 229-234, doi:10.3233/PEP-14094 (2014).
- 196 McKeon, A. & Benarroch, E. E. Glial fibrillary acid protein: Functions and involvement in disease. *Neurology* **90**, 925-930, doi:10.1212/WNL.0000000000005534 (2018).
- 197 Castellano, B. M. *et al.* Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 signaling complex. *Science* **355**, 1306-1311, doi:10.1126/science.aag1417 (2017).
- 198 Wong, M. The role of glia in epilepsy, intellectual disability, and other neurodevelopmental disorders in tuberous sclerosis complex. *J Neurodev Disord* **11**, 30, doi:10.1186/s11689-019-9289-6 (2019).
- 199 Meikle, L. *et al.* A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. *J Neurosci* **27**, 5546-5558, doi:10.1523/JNEUROSCI.5540-06.2007 (2007).
- 200 Zeng, L. H. *et al.* Tsc2 gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than Tsc1 inactivation in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Hum Mol Genet* **20**, 445-454, doi:10.1093/hmg/ddq491 (2011).
- 201 Way, S. W. *et al.* Loss of Tsc2 in radial glia models the brain pathology of tuberous sclerosis complex in the mouse. *Hum Mol Genet* **18**, 1252-1265, doi:10.1093/hmg/ddp025 (2009).
- 202 Schuchman, E. H. & Desnick, R. J. Types A and B Niemann-Pick disease. *Mol Genet Metab* **120**, 27-33, doi:10.1016/j.ymgme.2016.12.008 (2017).
- 203 Horinouchi, K. *et al.* Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet* **10**, 288-293, doi:10.1038/ng0795-288 (1995).
- 204 Carstea, E. D. *et al.* Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* **277**, 228-231, doi:10.1126/science.277.5323.228 (1997).
- 205 Naureckiene, S. *et al.* Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* **290**, 2298-2301, doi:10.1126/science.290.5500.2298 (2000).
- 206 Lloyd-Evans, E. *et al.* Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* **14**, 1247-1255, doi:10.1038/nm.1876 (2008).
- 207 Fan, M. *et al.* Identification of Niemann-Pick C1 disease biomarkers through sphingolipid profiling. *J Lipid Res* **54**, 2800-2814, doi:10.1194/jlr.M040618 (2013).
- 208 Wanikawa, M., Nakamura, H., Emori, S., Hashimoto, N. & Murayama, T. Accumulation of sphingomyelin in Niemann-Pick disease type C cells disrupts Rab9-dependent vesicular trafficking of cholesterol. *J Cell Physiol* **235**, 2300-2309, doi:10.1002/jcp.29137 (2020).
- 209 Vanier, M. T. & Latour, P. Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: the filipin staining test. *Methods Cell Biol* **126**, 357-375, doi:10.1016/bs.mcb.2014.10.028 (2015).
- 210 Zervas, M., Dobrenis, K. & Walkley, S. U. Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 49-64, doi:10.1093/jnen/60.1.49 (2001).
- 211 Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. & Von Figura, K. Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* **97**, 1-5, doi:10.1083/jcb.97.1.1 (1983).
- 212 Gieselmann, V., Hasilik, A. & von Figura, K. Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J Biol Chem* **260**, 3215-3220 (1985).
- 213 Sun-Wada, G. H., Tabata, H., Kawamura, N., Aoyama, M. & Wada, Y. Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci* **122**, 2504-2513, doi:10.1242/jcs.050443 (2009).
- 214 Amritraj, A. *et al.* Increased activity and altered subcellular distribution of lysosomal enzymes determine neuronal vulnerability in Niemann-Pick type C1-deficient mice. *Am J Pathol* **175**, 2540-2556, doi:10.2353/ajpath.2009.081096 (2009).
- 215 Kollmann, K. *et al.* Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucopolipidosis II 'knock-in' mice. *Brain* **135**, 2661-2675, doi:10.1093/brain/aws209 (2012).
- 216 Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884, doi:10.1038/nature04723 (2006).

- 217 Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889, doi:10.1038/nature04724 (2006).
- 218 Koike, M. *et al.* Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* **167**, 1713-1728, doi:10.1016/S0002-9440(10)61253-9 (2005).
- 219 Settembre, C. *et al.* A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* **17**, 119-129, doi:10.1093/hmg/ddm289 (2008).
- 220 Hirose, T. *et al.* ATP6AP2 variant impairs CNS development and neuronal survival to cause fulminant neurodegeneration. *J Clin Invest* **129**, 2145-2162, doi:10.1172/JCI79990 (2019).
- 221 Zhang, C. S., Li, M., Zong, Y. & Lin, S. C. Determining AMPK Activation via the Lysosomal v-ATPase-Ragulator-AXIN/LKB1 Axis. *Methods Mol Biol* **1732**, 393-411, doi:10.1007/978-1-4939-7598-3_25 (2018).
- 222 Cabrera, M. *et al.* Vps41 phosphorylation and the Rab Ypt7 control the targeting of the HOPS complex to endosome-vacuole fusion sites. *Mol Biol Cell* **20**, 1937-1948, doi:10.1091/mbc.E08-09-0943 (2009).
- 223 Matsumoto, N. *et al.* Essential Role of the $\alpha 3$ Isoform of V-ATPase in Secretory Lysosome Trafficking via Rab7 Recruitment. *Sci Rep* **8**, 6701, doi:10.1038/s41598-018-24918-7 (2018).
- 224 Bohdanowicz, M. & Grinstein, S. Vesicular traffic: a Rab SANDwich. *Curr Biol* **20**, R311-314, doi:10.1016/j.cub.2010.02.030 (2010).
- 225 Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497-508, doi:10.1016/j.cell.2010.03.011 (2010).
- 226 Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpaa, K., Cover, T. L. & Olkkonen, V. M. The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* **16**, 5480-5492, doi:10.1091/mbc.e05-03-0189 (2005).
- 227 Cooper, R. A. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct* **8**, 413-430, doi:10.1002/jss.400080404 (1978).
- 228 Hac-Wydro, K. & Wydro, P. The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. *Chem Phys Lipids* **150**, 66-81, doi:10.1016/j.chemphyslip.2007.06.213 (2007).
- 229 Prigent, M. *et al.* ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J Cell Biol* **163**, 1111-1121, doi:10.1083/jcb.200305029 (2003).
- 230 Vanier, M. T. & Millat, G. Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet* **64**, 269-281, doi:10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x (2003).
- 231 Chung, J. H., Lester, R. L. & Dickson, R. C. Sphingolipid requirement for generation of a functional v1 component of the vacuolar ATPase. *J Biol Chem* **278**, 28872-28881, doi:10.1074/jbc.M300943200 (2003).
- 232 Bernstein, J. J., Getz, R., Jefferson, M. & Kelemen, M. Astrocytes secrete basal lamina after hemisection of rat spinal cord. *Brain Res* **327**, 135-141, doi:10.1016/0006-8993(85)91507-0 (1985).
- 233 Crocker, S. J., Frausto, R. F., Whitton, J. L. & Milner, R. A novel method to establish microglia-free astrocyte cultures: comparison of matrix metalloproteinase expression profiles in pure cultures of astrocytes and microglia. *Glia* **56**, 1187-1198, doi:10.1002/glia.20689 (2008).
- 234 Belanger, M., Allaman, I. & Magistretti, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* **14**, 724-738, doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016 (2011).
- 235 Zhang, M. *et al.* Astrocyte-only Npc1 reduces neuronal cholesterol and triples life span of Npc1^{-/-} mice. *J Neurosci Res* **86**, 2848-2856, doi:10.1002/jnr.21730 (2008).
- 236 Di Malta, C., Fryer, J. D., Settembre, C. & Ballabio, A. Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2334-2342, doi:10.1073/pnas.1209577109 (2012).
- 237 Mohamed, M., Voet, M., Gardeitchik, T. & Morava, E. Cutis Laxa. *Adv Exp Med Biol* **802**, 161-184, doi:10.1007/978-94-007-7893-1_11 (2014).

- 238 Kozel, B. A. *et al.* Biomechanical properties of the skin in cutis laxa. *J Invest Dermatol* **134**, 2836-2838, doi:10.1038/jid.2014.224 (2014).
- 239 Bultmann-Mellin, I. *et al.* Modeling autosomal recessive cutis laxa type 1C in mice reveals distinct functions for Ltbp-4 isoforms. *Dis Model Mech* **8**, 403-415, doi:10.1242/dmm.018960 (2015).
- 240 Sprenger, S. *The Role of Pycr1 in the Pathomechanism of Autosomal Recessive Cutis Laxa* Dr.-Ing. thesis, Technischen Universität Berlin, (2014).
- 241 Chan, W. L. *et al.* Impaired proteoglycan glycosylation, elevated TGF-beta signaling, and abnormal osteoblast differentiation as the basis for bone fragility in a mouse model for geroderma osteodysplastica. *PLoS Genet* **14**, e1007242, doi:10.1371/journal.pgen.1007242 (2018).
- 242 Witkos, T. M. *et al.* GORAB scaffolds COPI at the trans-Golgi for efficient enzyme recycling and correct protein glycosylation. *Nat Commun* **10**, 127, doi:10.1038/s41467-018-08044-6 (2019).
- 243 Kielty, C. M., Sherratt, M. J. & Shuttleworth, C. A. Elastic fibres. *J Cell Sci* **115**, 2817-2828 (2002).
- 244 Rifkin, D. B., Rifkin, W. J. & Zilberberg, L. LTBP in biology and medicine: LTBP diseases. *Matrix Biol* **71-72**, 90-99, doi:10.1016/j.matbio.2017.11.014 (2018).
- 245 Sterner-Kock, A. *et al.* Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev* **16**, 2264-2273, doi:10.1101/gad.229102 (2002).
- 246 Neptune, E. R. *et al.* Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* **33**, 407-411, doi:10.1038/ng1116 (2003).
- 247 Zanninelli, G. *et al.* Smad3 knock-out mice as a useful model to study intestinal fibrogenesis. *World J Gastroenterol* **12**, 1211-1218, doi:10.3748/wjg.v12.i8.1211 (2006).
- 248 Kim, E. *et al.* Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol* **52**, 677-682, doi:10.1387/ijdb.072528ek (2008).
- 249 Funaki, T. *et al.* The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the trans-Golgi network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis. *Mol Biol Cell* **24**, 2633-2644, doi:10.1091/mbc.E13-05-0234 (2013).
- 250 Schmid, E. M. *et al.* Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* **4**, e262, doi:10.1371/journal.pbio.0040262 (2006).
- 251 Natsume, W. *et al.* SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* **17**, 2592-2603, doi:10.1091/mbc.e05-10-0909 (2006).
- 252 Wang, H. *et al.* Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell Res* **24**, 852-869, doi:10.1038/cr.2014.70 (2014).
- 253 Liu, C. *et al.* Sirt1 regulates acrosome biogenesis by modulating autophagic flux during spermiogenesis in mice. *Development* **144**, 441-451, doi:10.1242/dev.147074 (2017).
- 254 Ramalho-Santos, J. & Moreno, R. D. Targeting and fusion proteins during mammalian spermiogenesis. *Biol Res* **34**, 147-152, doi:10.4067/s0716-97602001000200021 (2001).
- 255 Yildiz, Y. *et al.* Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J Clin Invest* **116**, 2985-2994, doi:10.1172/JCI29224 (2006).
- 256 Walden, C. M. *et al.* Accumulation of glucosylceramide in murine testis, caused by inhibition of beta-glucosidase 2: implications for spermatogenesis. *J Biol Chem* **282**, 32655-32664, doi:10.1074/jbc.M702387200 (2007).
- 257 Oberheide, K., Puchkov, D. & Jentsch, T. J. Loss of the Na(+)/H(+) exchanger NHE8 causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Biol Chem* **292**, 10845-10854, doi:10.1074/jbc.M117.784108 (2017).
- 258 Zolov, S. N. & Lupashin, V. V. Cog3p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells. *J Cell Biol* **168**, 747-759, doi:10.1083/jcb.200412003 (2005).
- 259 Bayer, M. J., Reese, C., Buhler, S., Peters, C. & Mayer, A. Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel. *J Cell Biol* **162**, 211-222, doi:10.1083/jcb.200212004 (2003).

- 260 Baars, T. L., Petri, S., Peters, C. & Mayer, A. Role of the V-ATPase in regulation of the vacuolar fission-fusion equilibrium. *Mol Biol Cell* **18**, 3873-3882, doi:10.1091/mbc.e07-03-0205 (2007).
- 261 Strasser, B., Iwaszkiewicz, J., Michielin, O. & Mayer, A. The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles. *EMBO J* **30**, 4126-4141, doi:10.1038/emboj.2011.335 (2011).
- 262 Morava, E. *et al.* Defective protein glycosylation in patients with cutis laxa syndrome. *Eur J Hum Genet* **13**, 414-421, doi:10.1038/sj.ejhg.5201361 (2005).
- 263 Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A. & Kellokumpu, S. Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J Cell Physiol* **220**, 144-154, doi:10.1002/jcp.21744 (2009).
- 264 McGuire, C. M. & Forgac, M. Glucose starvation increases V-ATPase assembly and activity in mammalian cells through AMP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase/Akt signaling. *J Biol Chem* **293**, 9113-9123, doi:10.1074/jbc.RA117.001327 (2018).
- 265 Mohamed, M. *et al.* Novel defect in phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha (PI4K2A) at the membrane-enzyme interface is associated with metabolic cutis laxa. *J Inherit Metab Dis*, doi:10.1002/jimd.12255 (2020).
- 266 Dippold, H. C. *et al.* GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* **139**, 337-351, doi:10.1016/j.cell.2009.07.052 (2009).
- 267 Ng, M. M., Dippold, H. C., Buschman, M. D., Noakes, C. J. & Field, S. J. GOLPH3L antagonizes GOLPH3 to determine Golgi morphology. *Mol Biol Cell* **24**, 796-808, doi:10.1091/mbc.E12-07-0525 (2013).
- 268 Eckert, E. S. *et al.* Golgi phosphoprotein 3 triggers signal-mediated incorporation of glycosyltransferases into coatomer-coated (COPI) vesicles. *J Biol Chem* **289**, 31319-31329, doi:10.1074/jbc.M114.608182 (2014).
- 269 Nakashima-Kamimura, N. *et al.* MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *J Cell Sci* **118**, 5357-5367, doi:10.1242/jcs.02645 (2005).

7. Abkürzungsverzeichnis

ARCL	Autosomal rezessive Cutis laxa
GO	Gerodermia osteodysplastica
MACS	Makrozephalie Alopezie-Cutis laxa-Skoliose
RAB	<i>Ras-related in brain</i>
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>
RIN	<i>Ras and rab interactor</i>
BFA	Brefeldin A
ER	Endoplasmatisches Retikulum
v-ATPase	vakuolären ATPase
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
ARNO	<i>ADP-ribosylation factor nucleotide site opener</i>
COP	<i>Coat protein complex</i>
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
SNAREs	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors</i>
COG	<i>Conserved oligomeric Golgi complex</i>
NHE	<i>Na⁺/H⁺-exchanger</i>
α-Dag1	α-Dystroglycan
β-Dag1	β-Dystroglykan
LARGE	<i>Like-Acetylglucosaminyltransferase</i>
POMT	Protein-O-Mannosyltransferase
CCE	Clathrin vermittelte Endozytose
VPS	<i>Vacuolar protein sorting protein</i>
PI	Phosphoinositide
HOPS	<i>homotypic fusion and protein sorting</i>
CORVET	<i>Core vacuole/ endosome tethering</i>
<i>Atp6v0a2^{-/-}</i>	<i>Atp6v0a2 Knockout</i>
<i>Atp6v0a2^{RQ/RQ}</i>	<i>Atp6v0a2 R775Q Knockin</i>
PAS	Perjodsäure-Schiff Reagenz-Reaktion
e13,5	Embryonalstadium 13,5
p35	postnatal 35 Tage
p105	postnatal 105 Tage
p252	postnatal 252 Tage
CtsD	Cathepsin D
Gfap	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
SNA	Lektin <i>Sambucus Nigra</i>
PNA	Lektin <i>Peanut Agglutinin</i>
E-Pha	Lektin <i>Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin</i>
Mefs	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
CQ	Chloroquin
Baf	Bafilomycin a1
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
CTB-FITC	Choleratoxin-Fluorescein#
ManNAz	N-Azidoacetyl-Mannosamin-tetraacyliert
BFPP	bilaterale frontoparietalen Polymikrogyrien

8. Danksagung

Ich möchte mich bei Uwe Kornak für die Überlassung dieses überaus interessanten Dissertationsthemas und die Freiräume während der Bearbeitung bedanken. Ich fand es sehr bewundernswert mit welchem Ideenreichtum und fachlicher Kompetenz er die Betreuung gestaltete. Bei Sigmar Stricker möchte ich mich bedanken, dass er die Zweitbetreuung dieses Dissertationsthemas übernommen hat.

Ich möchte mich bei der AG Kornak für die letzten 5 Jahre bedanken: Denise Jahn hat durch die Generierung der *Atp6v0a2*-Mausmodelle eine hervorragende Vorarbeit geleistet und mich sehr gut ins Thema eingearbeitet. Sie stand im gesamten Zeitraum immer für Diskussionen rund um a2 parat.

Dankenswerterweise war ich einer von den Doktoranden, die 2015 in dem Labor der AG Kornak begonnen hat. Es hat mir sehr viel Freude bereitet mit euch zusammenzuarbeiten. Die gemeinsamen Mittagessen und Kaffeepausen waren immer eine willkommene Abwechslung. Besonders Michael Thelen war überaus hilfsbereit und ein ausdauernder Organisator. Zudem sorgte er immer für gute Stimmung. Uta Rössler war ebenfalls an Hilfsbereitschaft kaum zu überbieten und gerade am Ende der Dissertation eine wichtige Stütze. Eine Freude war es mir auch Nina Stelzer mit ihrer unermüdlich fröhlichen Art während ihrer Bachelorarbeit zu betreuen und zu sehen, wie sie sich jeden Tag weiterentwickelte. Sie brachte das a2-Projekt durch die Untersuchung des anterograden Transports ein weiteres Stück voran.

Einen großen Dank an unsere technischen Assistenten Carola Dietrich und Anja Lekaj. Carola hat mich am Anfang der Dissertation in der Histologie und im *Immunoblotting* unterstützt. Anja Lekaj hat allein für das *Atp6v0a2*-Projekt viele hunderte Mäuse genotypisiert.

Björn Fischer-Zirnsak möchte ich für die vielen Ideen und Tipps für die zellbiologischen Untersuchungen danken. Die Diskussionen nach einem kurzen Blick durchs Mikroskop waren immer sehr lehrreich und wertvoll.

Ich bin sehr froh, dass mit Johannes Kopp ein motivierter Doktorand das a2-Projekt übernimmt. Ich hoffe sehr, dass er es schafft den Pathomechanismus im Gehirn aufzuschlüsseln und am Ende einen Ansatz für eine Therapie der ARCL2A-Patienten zu entdecken.

Vielen Dank auch an Hardy Chan, Miguel Rodriguez, Floriane Hennig, Daniela Keller, Naji El Choubassi, Lukas Altinbas, Alexej Knaus, Namrata Saha, Claire Schlack, Gabriele Hildebrand, und Susanne Rothe für die fachliche Zusammenarbeit im Institut für Genetik und Humangenetik der Charité.

Der AG Mundlos vom MPI für molekulare Genetik möchte ich für die Gastwissenschaft und vielen Liter an Paraformaldehyd danken, die ich über die Jahre verbrauchen durfte, ohne dass sich jemand ernsthaft beschwerte.

Weiterhin unterstützten mich sehr René Buschow und Beatrix Fauler aus der Mikroskopie Facility. Vielen Dank euch beiden für die großartige Einarbeitung und den vielen Tipps zur Erzeugung von wunderschönen Aufnahmen. David Meierhof möchte ich für die Messung der Mef-Proteome und für die Unterstützung während der Auswertung danken. Ebenfalls möchte ich den Tierpflegern Anne Heß und Corinna Schwichtenberger für die Betreuung der *Atp6v0a2*-Mäuse danken.

Auch einen großen Dank den Glykosylierungs-Experten des EURO CDG-Konsortiums (nun EURO-*Glycomics*) für die wissenschaftliche Unterstützung. Gefühlt habe ich 3 Jahre (!) nach einem Glykosylierungsdefekt gesucht und viele Immunoblots später war auf diesem Weg immer noch kein Unterschied in Tgn38 und Lamp2 detektierbar. Deshalb möchte ich auch François Foulquier besonders hervorheben. Die metabolische Markierung von Sialinsäure war ein Lichtblick dieser Dissertation. In diesem Zuge möchte ich auch Willy Morelle für die Glykan-Analysen der Mausgewebe bedanken.

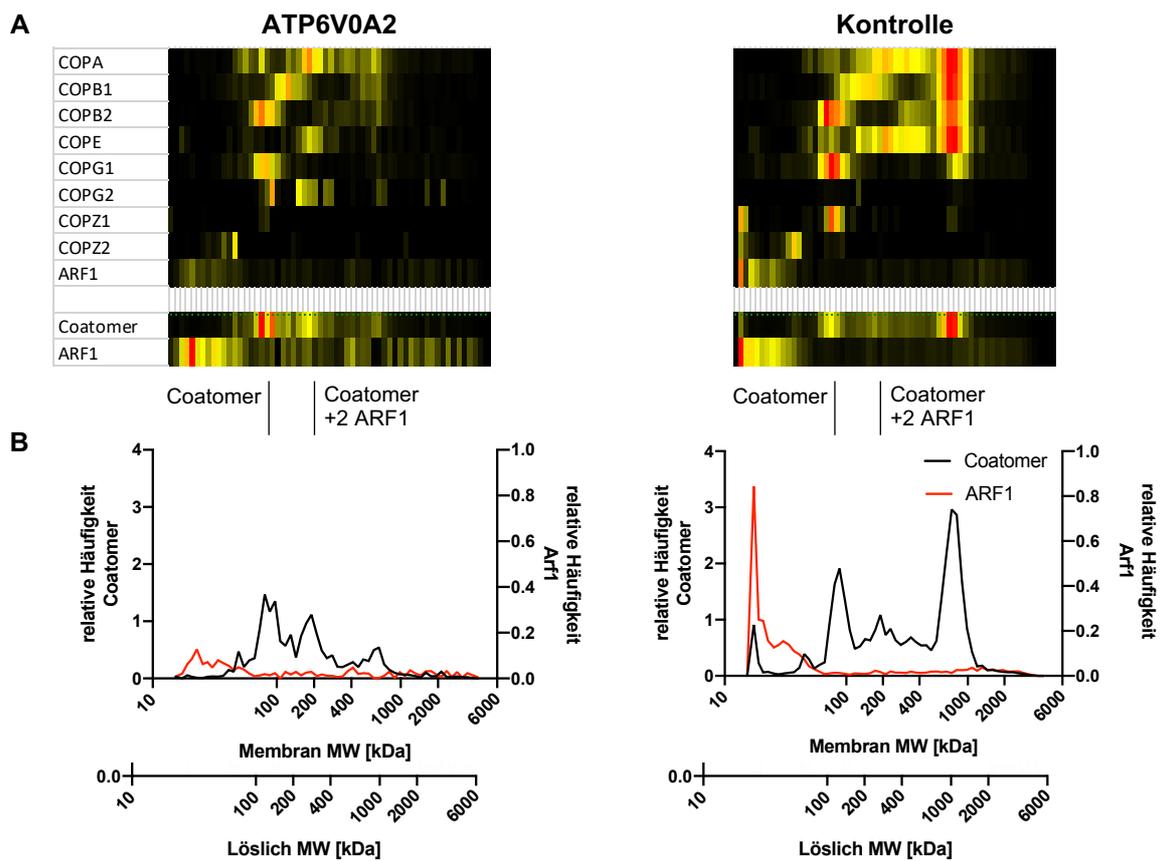
Auch einen großen Dank an Ingrid Haußer-Siller, Michaela Schweizer und Andreas Meinhardt für die ultrastrukturellen Analyse der Gewebe. Die Ergebnisse von Michaela Schweizer gaben dem Projekt nochmal eine neue Richtung. Ich möchte auch bei dem Labor von Ulrich Brandt für die Erstellung der *Complexome*-Daten des frontalen Kortex danken.

Zum Abschluss möchte ich mich bei Anne Kersten für das Verständnis bedanken, wenn es in den vergangenen Jahren im Labor „mal wieder später wurde“ und weil sie mich während dieser Zeit immer unterstützte.

9. Anhang

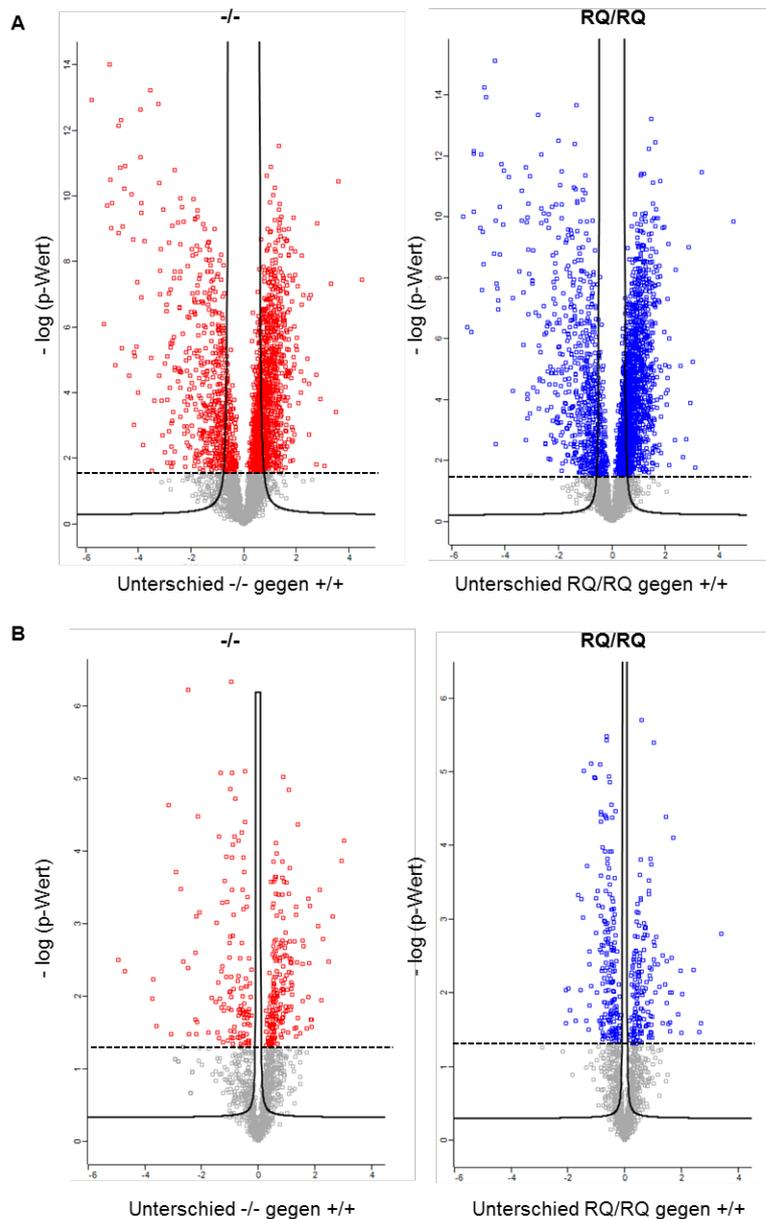
9.1. Auszug *Complexome*-Profiling eines ATP6V0A2-Patienten

Freundlicherweise wurden mir diese Daten aus der Publikation Van Damme, T. et al. (2017)⁵ von Dr. Ulrich Brand zur Verfügung gestellt. Diese Daten wurden hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit ausgewertet (Abbildungen Z1 und Z2).

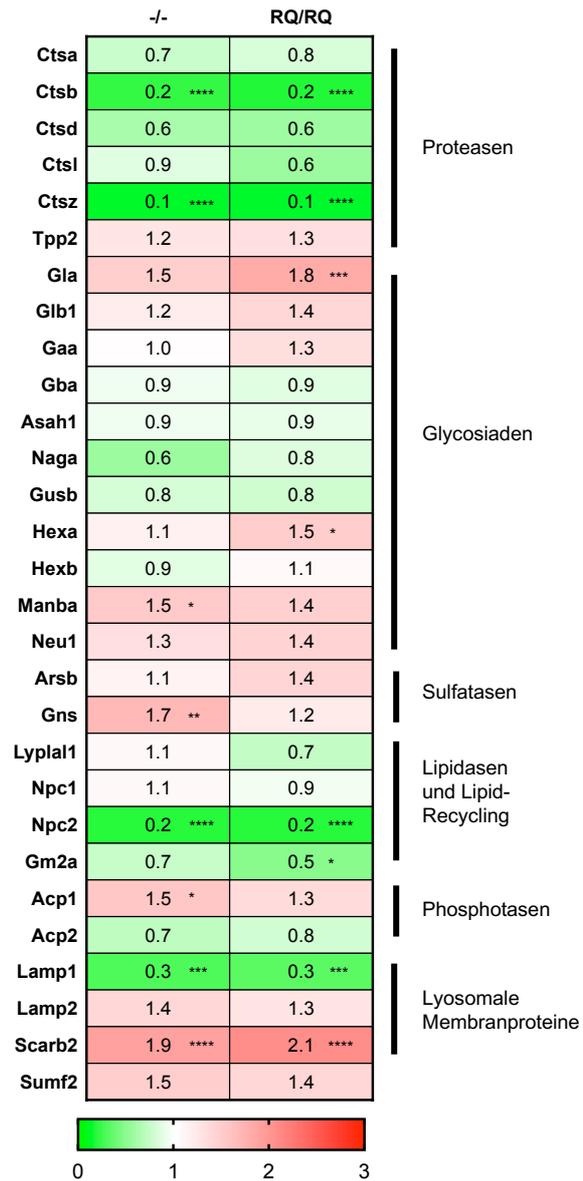


Anhang 1: Die Assemblierung des COPI-Komplexes in Fibroblasten eines ATP6V0A2 Patienten. (A) *Heatmaps* der identifizierten Untereinheiten des Coatomers und ARF1 in einem nativen Polyacrylamidgel (16 bis 4 %). Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten von 0 (schwarz) bis 1 (rot). (B) Migrationsprofile des Coatomers (schwarz), Arf1 (rot) aufgetragen gegen das Molekulargewicht für Membranproteine und zytosolische Proteine.

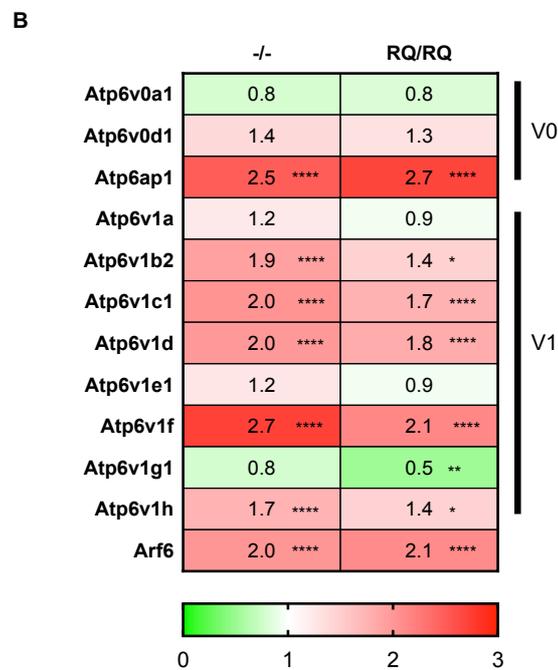
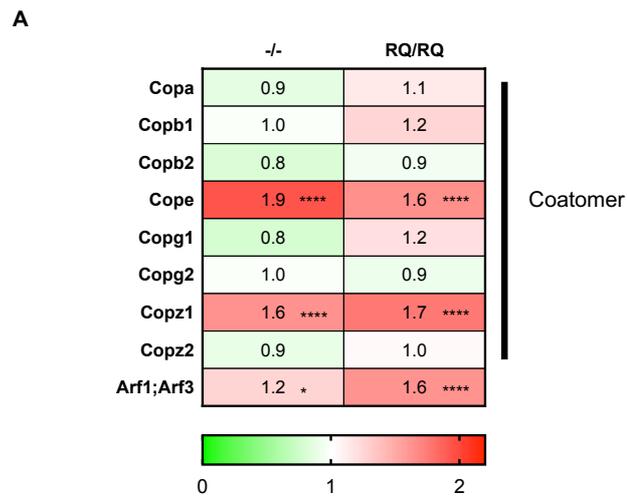
9.2. Proteom- und Sekretom-Daten von Mefs der *Atp6v0a2*-Mausmodelle



Anhang 3: Vulkan-Plot der Proteom- (A) und Sekretom-Analyse (B) der *Atp6v0a2*-Mefs. Erkennbar sind viele deregulierte Proteine in beiden homozygoten primären Zelllinien. Dargestellt ist der negative Logarithmus des p-Wertes gegen die Differenz. Die Grundlage der Analyse war eine Labelfreie Quantifikation von Proteinen durch Massenspektrometrie (LFQ). Die durchgehende Linie stellte die Falsch-Erkennungsrate nach dem Benjamini Hochberg-Verfahren und die gestrichelte Linie einen p-Wert von 0,05 dar.



Anhang 4: Deregulation lysosomaler Enzyme und Proteine in *Atp6v0a2* defizienten Mefs. Diese *Heatmaps* zeigen die relative Änderung der Intensität einer Label freien Quantifizierung (LFQ) von identifizierten Peptiden (grün = 0; weiß = 1; rot = 3). P * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001.



Anhang 5: Deregulation der Proteine des CopI-Komplex (A) und der v-ATPase (B) in *Atp6v0a2* defizienten Mefs. Diese *Heatmaps* zeigen die relative Änderung der Intensität einer Label freien Quantifizierung (LFQ) von identifizierten Peptiden (grün = 0; weiß = 1; rot = 2 und 3). P * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001