

Charakterisierung der Pathomechanismen von *ATP6V0A2* abhängiger Cutis laxa in Maus und Mensch

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
Denise Jahn
aus Berlin

Berlin 2019

Angefertigt vom 01.01.2014 bis 21.01.2019 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Kornak am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin und am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in der Gruppe von Prof. Dr. Stefan Mundlos.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Kornak
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sigmar Stricker

Disputation am 08.05.2019

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.

Berlin, den 17.01.2019

Denise Jahn

Zusammenfassung

Cutis laxa Syndrome sind gekennzeichnet durch faltige, inelastische Haut, die zu einem vorgealterten (progeroiden) Aussehen führt. Die autosomal rezessive Cutis laxa Typ 2A (ARCL2A) weist außerdem eine Wachstumsverzögerung, eine neuronale Migrationsstörung und einen Glykosylierungsdefekt auf und wird durch Mutationen im Gen *ATP6V0A2* verursacht. Dieses kodiert für die $\alpha 2$ Untereinheit der V-ATPase, ein Proteinkomplex, welcher ATP-abhängig Protonen über Membranen transportiert und den intraluminalen pH in Endosomen und dem Golgiapparat reguliert. Da Zellen mit defekter $\alpha 2$ Untereinheit einen verlangsamten retrograden Transport im Golgiapparat aufweisen, wurde außerdem über eine Rolle des Proteins in der Vesikelfusion spekuliert. Mittels einer markierten $\alpha 2$ Untereinheit konnte in HeLa-Zellen eine Lokalisation im Trans-Golgiapparat bestätigt werden. Das Ausschalten der endogenen Expression der $\alpha 2$ Untereinheit führte zur Akkumulation von frühen Endosomen, Lysosomen und Cholesterin in der Nähe des Golgiapparates. Ein ähnlicher zellulärer Phänotyp konnte durch eine experimentelle Erhöhung des intraluminalen pH-Wertes erreicht werden. Um die physiologische Funktion der $\alpha 2$ Untereinheit im Organismus zu untersuchen, wurden eine konditionelle *Atp6v0a2* Flox Knock-out und eine *Atp6v0a2* R755Q Knock-in Mauslinie erzeugt, in der durch Einfügen der Punktmutation R755Q der Protonentransport durch die $\alpha 2$ Untereinheit blockiert wurde. Durch eine in der Keimbahn aktive Cre-Rekombinase wurde aus dem konditionellen ein konstitutiver Knock-out (*Atp6v0a2*^{-/-}) erzeugt. Das *Atp6v0a2*^{-/-} Mausmodell zeigte im homozygoten Zustand einen kompletten Verlust des $\alpha 2$ Proteins und eine gute Übereinstimmung mit dem humanen ARCL2A Phänotyp. Die homozygoten Mutanten hatten ein verringertes Gewicht, die Dicke der Dermis war reduziert, die Knochendichte vermindert und der frontale Kortex zeigte Hinweise auf eine neuronale Migrationsstörung. Männliche Mäuse waren aufgrund einer Globozoospermie infertil. Im Gegensatz zur humanen Erkrankung konnte jedoch kein eindeutiger Hinweis auf eine veränderte Glykosylierung gefunden werden. Die Mauslinie *Atp6v0a2* R755Q zeigte trotz eines stabilen mutierten $\alpha 2$ Proteins einen ähnlichen Phänotyp wie das *Atp6v0a2*^{-/-} Modell. Somit wurde die zentrale Funktion der $\alpha 2$ Untereinheit in der Regulation des pH-Werts bekräftigt, neue phänotypische Aspekte der $\alpha 2$ Defizienz aufgezeigt und Mausmodelle zur Erprobung neuer Therapien etabliert.

Abstract

Cutis laxa syndromes are characterized through wrinkled and inelastic skin, causing a prematurely aged (progeroid) appearance. Patients with an autosomal recessive Cutis laxa type 2a (ARCL2A) suffer from growth delay, a neuronal migration defect and a defect of glycosylation. The ARCL2A is caused by mutations in the *ATP6V0A2* gene, which encodes the $\alpha 2$ subunit of the V-ATPase, a protein complex that hydrolyses ATP to trigger the transport of protons through membranes and therefore regulates the intraluminal pH of endosomes and the Golgi apparatus. Furthermore, a role in vesicle fusion was speculated due to the fact that cells with a defect of the $\alpha 2$ subunit show a delayed retrograde trafficking within the Golgi apparatus. The use of a tagged $\alpha 2$ subunit confirmed the localisation within the trans Golgi apparatus in HeLa cells. Turning off the endogenous expression of the $\alpha 2$ subunit led to the accumulation of early endosomes, lysosomes and cholesterol close to the Golgi apparatus. A similar cellular phenotype could be generated through the experimental increase of the intraluminal pH. To identify the physiologic function of the $\alpha 2$ subunit in the organism, a conditional *Atp6v0a2* flox knock-out and an *Atp6v0a2* R755Q knock-in mouse model were generated. In the knock-in model the R755Q mutation leads to a blockage of the proton transport through the $\alpha 2$ subunit. The conditional knock-out turned to a constitutive knock-out (*Atp6v0a2*^{-/-}) by using a germline active cre recombinase. In the homozygous state the *Atp6v0a2*^{-/-} model revealed a complete loss of the $\alpha 2$ protein and a high correspondence with the human ARCL2A phenotype. The homozygous mutants displayed a decreased body weight, a reduced thickness of the dermis, a diminished bone density and in the frontal cortex, aspects of a disrupted neuronal migration were observed. Male mice were infertile due to a globozoospermia. In contrast to the human disease, there was no clear hint towards an altered glycosylation. Although the mutated protein was stable in the *Atp6v0a2* R755Q mouse model, the mice showed a similar phenotype as the *Atp6v0a2*^{-/-} mouse line. In conclusion, the central function of the $\alpha 2$ subunit for the regulation of the pH could be affirmed, new phenotypic aspects of the $\alpha 2$ deficiency were revealed and mouse models were established to test new therapies.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Cutis laxa – mehr als nur faltige Haut	1
1.1.1	Ein Symptom mit vielen Ursachen	1
1.1.2	ARCL2A: Cutis laxa assoziiert mit Hirnfehlbildungen und einem Glykosylierungsdefekt	5
1.2	V-ATPasen: Protonenpumpen regulieren den pH-Wert	9
1.2.1	Aufbau, Funktion und Regulation der V-ATPase	9
1.2.2	Die vielfältigen Funktionen der a Untereinheit	11
1.3	Die komplexen Mechanismen des intrazellulären Transports	14
1.3.1	Das Endo-Lysosomale System	14
1.3.2	Der Golgiapparat als zentrale Schaltstelle des intrazellulären Transports	16
1.3.3	pH-Wert Regulation im intrazellulären Transport.....	17
1.3.4	Cholesterin im intrazellulären Transport.....	18
1.4	Ziel der Arbeit.....	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Geräte.....	22
2.1.2	Chemikalien.....	23
2.1.3	Zellkultur	24
2.1.4	Enzyme	26
2.1.5	Kits.....	26
2.1.6	Antikörper	26
2.1.7	Plasmide.....	27
2.1.8	Bakterien.....	28
2.1.9	Zelllinien.....	28
2.1.10	Oligonukleotide	28
2.1.11	Software	32
2.1.12	Datenbanken	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1	Arbeit mit RNA.....	33
2.2.1.2	Arbeit mit DNA	34
2.2.1.3	Klonierung	43
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	50
2.2.2.1	Erzeugung elektrokompeter Bakterien.....	50
2.2.2.2	Elektroporation von Bakterien	50
2.2.2.3	Rekombination in Bakterien	50

2.2.2.4	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock.....	51
2.2.3	Kultivierung von Zellen.....	51
2.2.3.1	Kultivierung von humanen Zelllinien	51
2.2.3.2	Erzeugung von Fütterzellen	52
2.2.3.3	Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus.....	53
2.2.4	Biochemische Methoden	55
2.2.4.1	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	55
2.2.4.2	Proteinextraktion.....	56
2.2.4.3	Western Blot.....	56
2.2.5	Histologische Methode	57
2.2.5.1	Paraffin-Einbettung	57
2.2.5.2	Paraffinschnitte	57
2.2.5.3	Nissl-Färbung.....	58
2.2.5.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	58
2.2.6	Mikroskopie.....	59
2.2.7	Mikro-Computertomographie.....	59
3.	Ergebnisse	60
3.1	Molekulare Untersuchung der ATP6V0A2 Funktion.....	60
3.1.1	Die $\alpha 2$ Untereinheit befindet sich in HeLa-Zellen am Golgiapparat	60
3.1.2	<i>ATP6V0A2</i> Knock-down verändert die Zellorganellen	62
3.1.2.1	Spezifische siRNAs verringern das <i>ATP6V0A2</i> mRNA- und Proteinlevel	62
3.1.2.2	<i>ATP6V0A2</i> Knock-down beeinflusst die frühen Endosomen	62
3.1.2.3	<i>ATP6V0A2</i> Knock-down führt zu einer Akkumulation von Lysosomen	64
3.1.2.4	<i>ATP6V0A2</i> Knock-down führt zur Akkumulation von Cholesterin	66
3.1.3	Einfluss des intravesikulären pHs auf die Zellorganellen	68
3.2	Analyse der <i>Atp6v0a2</i> Expression in Mäusen	71
3.3	Erzeugung der <i>Atp6v0a2</i> Knock-out und Knock-in Mausmodelle.....	73
3.3.1	Erzeugung der Zielvektoren	73
3.3.2	Erzeugung und Screening transgener embryonaler Mausstammzellen	75
3.3.3	Qualitätsanalyse und Aggregation der Klone	77
3.3.4	Etablierung der Mauslinien.....	80
3.4	Charakterisierung der Expression der <i>Atp6v0a2</i> Flox Linie.....	82
3.5	Charakterisierung der <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Linie.....	84
3.5.1	Expressionsanalyse in <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäusen.....	84
3.5.1.1	Das <i>Atp6v0a2</i> Protein ist in den Knock-out Mäusen deletiert.....	84
3.5.1.2	Der <i>Atp6v0a2</i> Knock-out beeinflusst keine benachbarten Gene..	86

3.5.1.3	Der <i>Atp6v0a2</i> Knock-out hat in Gehirn und Leber keinen Einfluss auf die anderen a Untereinheiten.....	86
3.5.2	<i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse sind leichter.....	87
3.5.3	<i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse haben eine dünnere Dermis	88
3.5.4	<i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse haben eine reduzierte Knochendichte	89
3.5.5	<i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse zeigen Veränderungen des frontalen Kortex.....	90
3.5.6	Männliche <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse sind infertil.....	91
3.5.7	Analyse der Glykanstrukturen	93
3.6	Charakterisierung der Expression der <i>Atp6v0a2</i> R755Q Linie.....	95
4.	Diskussion.....	96
4.1	Zelltypabhängige Lokalisation der a2 Untereinheit.....	96
4.2	pH-Wert abhängige morphologische Veränderungen der Zelle nach siRNA Knock-down von a2.....	99
4.2.1	Fragmentierung des Golgiapparates	99
4.2.2	Akkumulation von frühen Endosomen.....	99
4.2.3	Akkumulation von Lysosomen.....	100
4.2.4	pH-Wert Abhängigkeit der beobachteten Effekte	101
4.2.5	Akkumulation von Cholesterin.....	102
4.2.6	Einfluss auf den intrazellulären Transport.....	104
4.2.7	Modell der zellulären a2 Defizienz.....	106
4.3	Die <i>Atp6v0a2</i> Expression ist relativ stabil in verschiedenen Geweben.	108
4.4	<i>Atp6v0a2</i> Zielvektordesign mit Vor- und Nachteilen.....	110
4.5	Der Phänotyp der <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse ähnelt dem der ARCL2A Patienten.....	113
4.5.1	Veränderungen der Haut bei Maus und Mensch	113
4.5.2	Veränderungen der Knochen bei Maus und Mensch.....	114
4.5.3	Veränderungen des Gehirns bei Maus und Mensch	115
4.5.4	Veränderte Spermien im Mausmodell.....	116
4.5.5	Kein ausgeprägter Glykosylierungsdefekt im Mausmodell	119
4.6	Der Phänotyp von Maus und Mensch durch Verlust der a2 Untereinheit im Kontext anderer Erkrankungen.....	122
4.6.1	Die a2 Defizienz im Vergleich zu anderen Cutis laxa Syndromen	122
4.6.2	Vergleich verschiedener V-ATPase Defizienzen	125
4.7	Die besondere Bedeutung des <i>Atp6v0a2</i> R755Q Modells.....	129
4.8	Ausblick.....	132
4.8.1	Zukünftige Analyse des zellulären Pathomechanismus	132
4.8.2	Nutzung der <i>Atp6v0a2</i> Flox Linie	133
4.8.3	Zukünftige Untersuchungen an <i>Atp6v0a2</i> Mausmodellen.....	133
	Literaturverzeichnis.....	136

Tabellenverzeichnis	152
Abbildungsverzeichnis	154
Abkürzungsverzeichnis	156
Veröffentlichungen	157
Danksagung	158

1. Einleitung

1.1 Cutis laxa – mehr als nur faltige Haut

1.1.1 Ein Symptom mit vielen Ursachen

Faltige Haut mit reduzierter Elastizität kennzeichnet die meisten Menschen im hohen Alter. Sie kann aber auch in jüngeren Jahren auftreten und bildet dann das Leitsymptom der Cutis laxa, was so viel wie „schlaffe Haut“ bedeutet. Bei Erwachsenen kann die Cutis laxa zum Beispiel durch entzündliche Prozesse erworben sein¹. Werden stehende Hautfalten und eine schlaffe Haut jedoch bereits beim Neugeborenen oder im frühen Kindesalter festgestellt, handelt es sich sehr wahrscheinlich um angeborene Gendefekte, die häufig zu schwerwiegenden Veränderungen in weiteren Organen führen. Bisher sind die Therapieoptionen noch nicht ausgereift genug um häufige Folgeschäden zu verhindern. Daher ist es essentiell die Pathomechanismen der verschiedenen Gendefekte zu erforschen um Ansatzpunkte für neue Therapien zu finden.

Die klinischen Merkmale der unterschiedlichen Cutis laxa Formen überschneiden sich zum Teil stark, obwohl ihnen Mutationen in verschiedenen Genen zu Grunde liegen. Daher wird häufig eine Einteilung der verschiedenen Syndrome nach dem Erbgang und dem Gendefekt verwendet. Es gibt sowohl autosomal rezessive, als auch autosomal dominante, als auch X-chromosomal vererbte Formen der Cutis laxa. Mit einer Häufigkeit von rund 1:300 000 Lebendgeburten ist die Cutis laxa eine sehr seltene Erkrankung².

Die X-chromosomal vererbte Form der Cutis laxa wird meist durch Mutationen im *ATP7A*-Gen verursacht und als Okzipitalhorn-Syndrom (MIM#304150) bezeichnet. Der Name beruht auf Exostosen, die vom Hinterhauptbein ausgehen, den sogenannten Okzipitalhörnern. Die bei den Patienten mutierte ATPase ist notwendig, um Kupfer aus den Darmzellen in den Blutkreislauf zu transportieren, sodass die Patienten an einem Kupfermangel leiden^{3,4}. Dies manifestiert sich in der faltigen Haut, der Hypermobilität der Gelenke und verschiedenen Hernien⁵. Schwere Mutationen des *ATP7A*-Gens führen zu Menkes-Syndrom (MIM#309400), welches zusätzlich durch starke neurologische Schäden gekennzeichnet ist⁶.

Die autosomal dominante Cutis laxa zeigt in der Regel einen leichteren Verlauf als die rezessive Form. Neben dem Hautphänotyp zeigen die Patienten häufig auch Hernien, sowie kardiovaskuläre und pulmonale Veränderungen^{7,8}. Lange Zeit waren Mutationen in den extrazellulären Matrixkomponenten Elastin und Fibulin 5 die einzigen bekannten Ursachen der dominanten Cutis laxa (ADCL1 MIM#123700; ADCL2 MIM#614434). Frameshift-Mutationen (Leserasterverschiebungen) im Elastin-Gen wirken sich dominant negativ aus, da die mutierten Elastinproteine eine verstärkte Koazervation aufweisen und unstrukturiert akkumulieren⁷. Fibulin 5 spielt eine wichtige Rolle in der Vernetzung der elastischen Fasern, da es mit Elastin⁹, Fibrillin 1¹⁰ und LOXL1 (*lysyl oxidase like 1*)¹¹ interagiert. Stabile mutierte Fibulin 5 Proteine haben einen dominanten Phänotyp zur Folge, während rezessive Mutationen wahrscheinlich zu einem instabilen Protein führen⁸.

Kürzlich wurden heterozygote Mutationen in der Pyrroline-5-Carboxylatsynthase (P5CS) als weitere Ursache der autosomal dominanten Cutis laxa identifiziert (MIM#616603)¹². Mutationen im kodierenden Gen *ALDH18A1* waren bisher nur bei rezessiver Cutis laxa beschrieben worden^{13,14}. Da der Phänotyp der Patienten stark dem De Barsy Syndrom ähnelt und durch Katarakt oder Hornhauttrübung, intrauterine und postnatale Wachstumsverzögerung, überdehnbare Gelenke und mentale Retardierung gekennzeichnet ist, wurde diese Form als autosomal dominante Cutis laxa mit progeroiden Merkmalen bezeichnet (ADCL3)¹².

Viele verschiedene rezessiv vererbte Syndrome sind mit einer Cutis laxa assoziiert. Basierend auf den klinischen Merkmalen und den genetischen Ursachen wurden die Bezeichnungen autosomal rezessive Cutis laxa Typ 1 bis 3 eingeführt (ARCL1-3) und weitere Syndrome dem Krankheitsspektrum angegliedert.

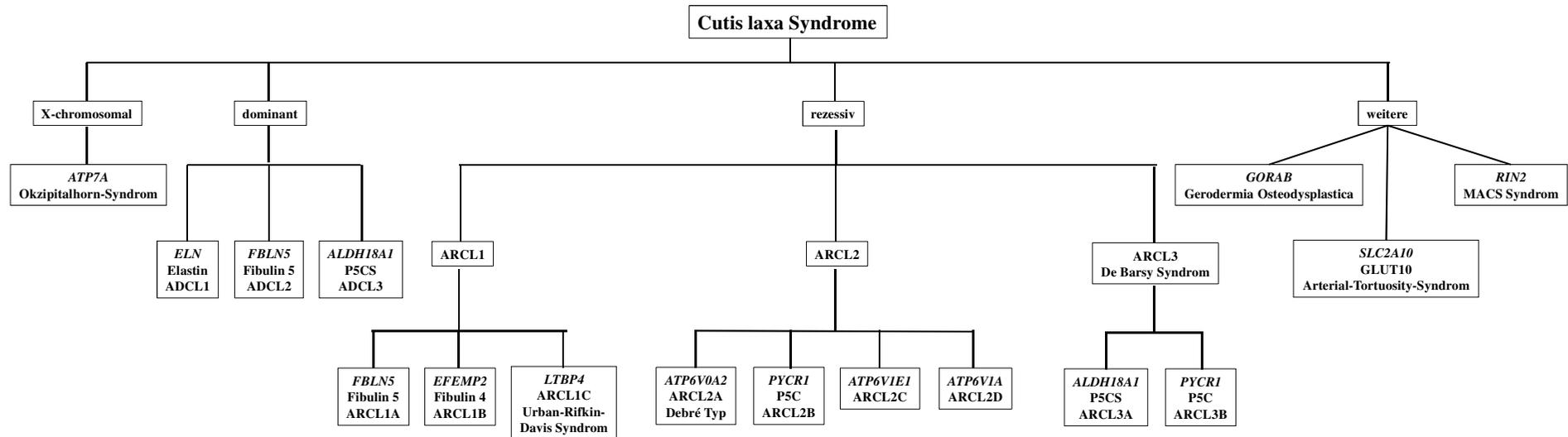


Abbildung 1: Cutis laxa Spektrum

Zahlreiche Erkrankungen sind mit faltiger inelastischer Haut assoziiert. Daher erfolgt die Einteilung der Cutis laxa Syndrome nach ihrem Erbgang in X-chromosomale, dominante und rezessive Formen. Einige Syndrome werden nicht in diese Systematik aufgenommen, sondern der Cutis laxa angegliedert. Mutation im *ATP6V0A2* Gen haben eine autosomal rezessive Cutis laxa Typ 2A zur Folge, welche auch als Debré Typ Cutis laxa bezeichnet wird.

Der Verlauf der ARCL1 (MIM#219100; MIM#614437; MIM#613177) ist meist bereits im Kindesalter lebensbedrohlich. Neben den auffälligen Hautveränderungen bei der Geburt entwickeln die Kinder Lungenemphyse und Gefäßanomalien wie Aneurysmen. Verursacht wird dies durch Mutationen in den Genen, die für LTBP4, Fibulin 4 oder Fibulin 5 kodieren¹⁵⁻¹⁷. Alle drei Proteine sind direkt am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt. Wie auch Fibulin 5 spielt Fibulin 4 durch die Interaktion mit dem Propeptid der Lysyloxidase (LOX) eine wichtige Rolle in der Vernetzung der Elastinfasern¹⁸. LTBP4 (*Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 4*) transportiert TGF- β 1, welches den Aufbau der extrazellulären Matrix reguliert¹⁹.

Die autosomal rezessive Cutis laxa Typ 2 (ARCL2) ist über die typischen Hauterscheinungen hinaus, vor allem durch Skelettveränderungen und eine mentale Retardierung gekennzeichnet, die zum Teil von einer Epilepsie begleitet ist. Milde Formen der ARCL2 überlappen mit der Diagnose Wrinkly Skin Syndrome (WSS, MIM#278250). Bei Patienten, die einen Glykosylierungsdefekt haben, werden häufig Mutationen im *ATP6V0A2*-Gen gefunden. Diese Erkrankung wird als ARCL2A oder Debré-Typ Cutis laxa (MIM#219200) bezeichnet und von der ARCL2B (MIM#614437) abgegrenzt²⁰. ARCL2B wird durch Mutationen im Gen *PYCR1* verursacht, welches für die Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktase 1 (P5C) kodiert²¹. Dieses Enzym ist in den Mitochondrien lokalisiert und in die De-Novo-Synthese von Prolin involviert²². Charakteristisch für die Patienten sind ein dreieckige Gesicht, eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung, Hypotonie und Osteopenie²³.

Kürzlich wurden zwei weitere Formen der autosomal rezessiven Cutis laxa Typ 2 beschrieben bei denen ebenfalls ein Glykosylierungsdefekt auftreten kann. Sie werden durch Mutationen in den Genen *ATP6V1E1* (ARCL2C; MIM#617402) oder *ATP6V1A* (ARCL2D; MIM#617403) verursacht und betreffen, wie auch bei der ARCL2A, Untereinheiten der V-ATPase²⁴. Die ARCL2C und ARCL2D sind beide durch progeroide Gesichtszüge, Hypotonie und angeborene Hüftluxationen gekennzeichnet. Zusätzlich haben die betroffenen Kinder lebensbedrohliche kardiopulmonale Veränderungen, welche diese Erkrankungen von den anderen Formen der ARCL2 abgrenzen.

Der Phänotyp der autosomal rezessiven Cutis laxa Typ 3 (ARCL3) entspricht dem De Barsy Syndrom, sodass die Patienten viele progeroide Merkmale wie eine

Hornhauttrübung aufweisen. Außerdem leiden die Patienten häufig an Bewegungsstörungen. Die bisher bekannten genetischen Ursachen liegen in Genen, die für mitochondriale Komponenten kodieren. Der ARCL3A (MIM#219150) liegen homozygote oder compound heterozygote Mutationen in *ALDH18A1* (P5CS) zugrunde, wobei der Verlauf schwerer ist als bei der dominant vererbten Erkrankung ADCL3^{12,25,26}. Die autosomal rezessive Cutis laxa Typ 3B (MIM#614438) wird durch Mutationen in *PYCR1* verursacht und bildet somit das schwere Erkrankungsspektrum der ARCL2B ab, die durch Mutationen in demselben Gen verursacht wird^{12,23}.

Weitere Syndrome werden dem Spektrum der Cutis laxa zugerechnet. Hierzu gehört die Gerodermia osteodysplastica (MIM#231070), die durch Mutationen in *GORAB* verursacht wird. Dieses Gen kodiert für ein Golgin, ein Protein, das am Golgiapparat lokalisiert ist und coiled-coil Domänen enthält²⁷. Es wirkt als Effektor der kleinen GTPasen RAB6 und ARF5 und ist somit in den intrazellulären Transport involviert²⁸. Die Mutationen führen zu frühkindlicher Osteoporose mit Frakturen, im Unterschied zu anderen Cutis laxa Formen tritt jedoch keine mentale Retardierung auf²⁷.

Das MACS-Syndrom (Makrozephalie, Alopezie, Cutis laxa, Skoliose; MIM#613075) wird durch Mutationen in *RIN2* ausgelöst²⁹. Dieses Protein interagiert mit RAB5 und ist unter anderem am Golgiapparat lokalisiert. Die Patienten weisen zum Teil einen leichten O-Glykosylierungsdefekt auf³⁰.

Auch Patienten mit Arterial-Tortuosity-Syndrom (MIM#208050) haben eine Cutis laxa, Kernmerkmal sind jedoch die geschlängelten Arterien. Die verringerte Elastizität der Gefäße führt zu Aneurysmen, Herzversagen und Ateminsuffizienz, sodass die Erkrankung bereits im Kleinkindalter lebensbedrohlich verlaufen kann³¹. Verursacht wird sie durch rezessiv vererbte Mutationen in *SLC2A10* welches für GLUT10 kodiert. Dieser Vitamin C Transporter befindet sich in den Mitochondrien und scheint am Schutz vor oxidativem Stress beteiligt zu sein³².

1.1.2 ARCL2A: Cutis laxa assoziiert mit Hirnfehlbildungen und einem Glykosylierungsdefekt

Die phänotypische Ausprägung von *ATP6V0A2* Mutationen ist sehr variabel. Bei Patienten mit milden Verläufen wird häufig Wrinkly Skin Syndrome (WSS, MIM#278250) diagnostiziert, da hauptsächlich die faltige, hängende, inelastische Haut

auffällt. Schwere Verläufe führen jedoch meist direkt zur Diagnose Debré-Typ-Cutis laxa (ARCL2A, MIM#219200). Es handelt sich um eine sehr seltene Erkrankung mit nur ungefähr 50 bisher publizierten Fällen³³.

Bereits bei der Geburt weisen die Patienten eine verringerte Elastizität der Haut mit vielen hängenden Hautfalten auf, wobei sich dies meist mit zunehmendem Alter der Patienten verbessert³⁴. Auffällig bei den betroffenen Säuglingen ist außerdem das späte Schließen der anterioren Fontanelle, eine häufige Mikrozephalie und eine ungleichmäßige Verteilung des Unterhautfettgewebes (Abbildung 2A, B). Zusätzlich sind die Gelenke hypermobil, sodass es zu angeborenen Hüftluxationen kommt. Es bilden sich dann im Kleinkindalter typische Gesichtsmerkmale heraus (Abbildung 2B, C), die durch eine abwärtsgeneigte Lidspalte, ein langes Philtrum und eine breite Nasenwurzel gekennzeichnet sind.³⁴⁻³⁷

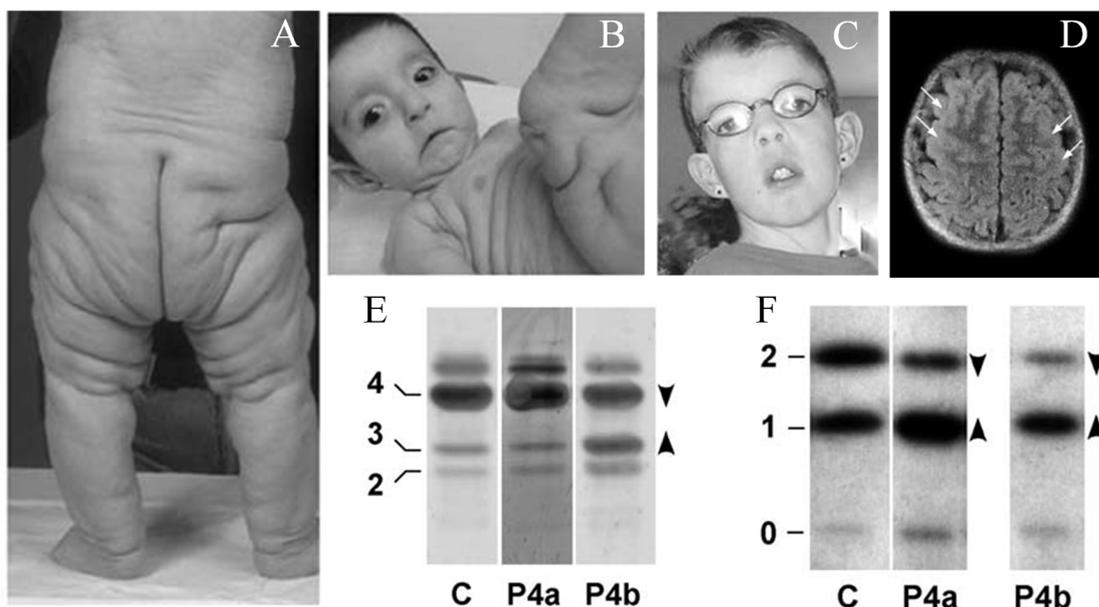


Abbildung 2: Phänotyp der ARCL2A

Abbildung modifiziert nach Van Maldergem *et al.*³⁵ und Huchtagowder *et al.*³⁶ A, B: Bei den Betroffenen fallen ungleichmäßig verteiltes Fettgewebe und hängende Hautfalten am gesamten Körper auf. B, C: Die Patienten haben häufig eine breite Nasenwurzel, abstehende Ohren und abwärtsgerichtete Gesichtszüge. D: Die Pflasterstein-Lissenzephalie tritt häufig besonders ausgeprägt im frontalen oder parietalen Kortex auf (weiße Pfeile). E: Isoelektrische Fokussierung von Transferrin. Im Alter von 2 Monaten zeigte der Patient (P4a) ein ähnliches Muster wie die Kontrolle (C), mit über einem Jahr (P4b) war das Tetrasialotransferrin jedoch deutlich reduziert und das Trisialotransferrin hingegen erhöht. F: Isoelektrische Fokussierung von Apolipoprotein CIII. Bereits mit zwei Monaten war das Disialo-ApoCIII im Patienten deutlich reduziert und das Monosialo-ApoCIII erhöht. Dieser Effekt war im Alter von einem Jahr noch ausgeprägter. Die Veränderungen von Transferrin und Apolipoprotein-CIII weisen auf eine Störung der Glykosylierung im Golgiapparat hin.

Anders als bei Patienten mit *PYCR1* oder *ALDH18A1* Mutationen wird intrauterin meist keine Wachstumsverzögerung beobachtet, teilweise entwickelt sich diese jedoch später^{36,37}. Die mentale Entwicklung ist meist nur mild verzögert. Dies kann sich aber ab dem Ende der ersten Lebensdekade deutlich verschlechtern³⁵. Bei vielen Patienten treten ab diesem Zeitpunkt Krampfanfälle auf, die von einer Neurodegeneration begleitet sein können. In der Computertomographie werden Hirnanomalien beobachtet, wobei meist eine veränderte Gyrierung entlang des frontalen und parietalen Kortex auffällt, die auch als Pflasterstein-Lissenzephalie bezeichnet wird (Abbildung 2D). Zum Teil treten auch Veränderungen in weiteren Bereichen des Gehirns auf, wie beispielsweise Auffälligkeiten des Corpus callosum oder des Cerebellums in Form einer Dandy-Walker-Fehlbildung^{33,35,38-40}.

Patienten mit einer *ATP6V0A2* Mutation können noch weitere Beeinträchtigungen haben, die jedoch mit variabler Häufigkeit beobachtet werden. Dazu zählen: Osteopenie⁴¹, Veränderungen der Augen wie Strabismus oder Myopie^{35,40}, Leberfunktionsstörungen³⁶, Gerinnungsstörungen^{40,42}, Leistenhernien^{33,35,36}, kardiovaskuläre Auffälligkeiten^{33,36} und Hypotonie^{35,38}. Die Untersuchung von Hautbiospien der Patienten zeigt eine reduzierte Anzahl elastischer Fasern, die zusätzlich verkürzt und fragmentiert erscheinen^{35,38,40}. Vereinzelt tritt eine Wundheilungsstörung mit einer Vernarbung der Haut auf, die dem Ehlers-Danlos-Syndrom ähnelt^{33,42}.

Ein Kernmerkmal der ARCL2A, welches diese Form von den meisten anderen Cutis laxa Erkrankungen unterscheidet, ist der angeborene Glykosylierungsdefekt (*congenital disorder of glycosylation*, CDG). Bei den Betroffenen wird ein O-Glykosylierungsdefekt gefunden, der in der isoelektrischen Fokussierung des im Serum enthaltenen Apolipoproteins CIII sichtbar wird. Die Patienten zeigen ein ApoCIII₁-Muster, bei dem die ausgereifte disialo-Form reduziert ist und vermehrt monosialyliertes ApoCIII detektiert wird^{34,35} (Abbildung 2F). Zum Teil erscheint die isoelektrische Fokussierung des eisentransportierenden Serumproteins Transferrin bei Säuglingen noch unauffällig, bei älteren Kindern kann jedoch durch diese Methode auch ein N-Glykosylierungsdefekt nachgewiesen werden³⁶. Während Tetrasialotransferrin die häufigste Form in Gesunden ist, treten bei Patienten mit *ATP6V0A2*-Mutation deutlich reduzierte Mengen dieser Form und stattdessen erhöhte Mengen Trisialo- und Disialotransferrin auf³⁵ (Abbildung 2E). Auch MALDI-TOF-Analysen der N- und

O-glykosylierten Serumproteine der Patienten weisen auf einen Defekt in der Sialylierung und damit auf eine Störung der finalen Schritte der Glykosylierung im Golgiapparat hin³⁴.

Bei den ursächlichen Mutationen im *ATP6V0A2* Gen handelt es sich um *loss of function* Mutationen. Dabei treten sowohl Deletionen, Leseraster-, Spleiß- und Stoppmutationen auf^{34,36,37}. Auch die bisher beschriebenen *missense* Mutationen führen wahrscheinlich zu einem Funktionsverlust des Proteins. Die Verteilung der Mutationen über das Gen ist gleichmäßig und zeigt keine Akkumulation in einem Mutationsschwerpunkt^{36,37}.

Das *ATP6V0A2* Gen kodiert für die $\alpha 2$ Untereinheit der V-ATPase, welche in Fibroblasten am Golgiapparat nachgewiesen wurde. Die Untersuchung von ARCL2A Patientenfibroblasten ergab zahlreiche zelluläre Auffälligkeiten^{34,36,37}: Der Golgiapparat ist geschwollen und fragmentiert, zusätzlich zeigt sich in der Elektronenmikroskopie eine Häufung von Autophagosomen, späten Endosomen und vergrößerten Lysosomen. Des Weiteren verursacht der Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit Störungen des intrazellulären Transports, wie eine deutliche Verzögerung des durch Brefeldin A induzierten retrograden Transports. Analysen der extrazellulären Matrix kultivierter Patientenfibroblasten ergaben keine Auffälligkeiten von Fibrillin 1 und den Lysyloxidasen, jedoch ist das extrazelluläre Elastin vermindert. Dies resultiert aus einer Akkumulation von Tropoelastin innerhalb der Zellen. Zusätzlich zu einer erhöhten Apoptoserate zeigt sich außerdem auch eine verstärkte Aktivität des TGF- β Signalwegs.

Die ARCL2A ähnelt besonders den Krankheitsbildern der ARCL2C und ARCL2D. Sie überlappen in zahlreichen Merkmalen wie dem Glykosylierungsdefekt und der Verzögerung des retrograden Transports. Da es sich hierbei ebenfalls um Untereinheiten der V-ATPase handelt, ist die Funktion dieses Komplexes essentiell für das Verständnis des Pathomechanismus.

1.2 V-ATPasen: Protonenpumpen regulieren den pH-Wert

1.2.1 Aufbau, Funktion und Regulation der V-ATPase

Die Bezeichnung dieses ATPase-Typs leitet sich zwar aus seinem Vorkommen in den Vakuolen von Pilzen und Pflanzen ab, jedoch befindet sich die V-ATPase auch in tierischen Zellen. Dort kann sie in der Plasmamembran und den Membranen zahlreicher intrazellulärer Kompartimente wie Golgiapparat, Endosomen oder Lysosomen detektiert werden⁴³. Sowohl die Struktur als auch die Funktion der verschiedenen Untereinheiten sind evolutionär hoch konserviert^{44,45}.

Die V-ATPase besteht aus zwei Subkomplexen, die als V1 und V0 bezeichnet werden (Abbildung 3). Der V1 Komplex besteht aus den Untereinheiten A bis H. Ein Hexamer aus A und B Untereinheiten bindet und hydrolysiert ATP um Energie zu generieren, die dann an den V0 Komplex weiter gegeben und dort für den Protonentransport genutzt wird^{43,44,46}. Der V0 Komplex bildet sich aus den Untereinheiten a, c, c', d und e, wobei die c und c' Untereinheiten einen Proteolipidring bilden, um Protonen durch eine Membran transportieren zu können. Damit die Kraftübertragung vom V1 Komplex zum V0 Komplex erfolgen kann, sind ein Rotor und zwei Statoren nötig^{43,44,46}. Der Rotor wird aus den Untereinheiten D, F und d geformt und bildet somit die Verbindung zwischen V1 und V0 Komplex. Die Statoren bestehen aus je zwei E und G Untereinheiten und den C und H Untereinheiten des V1 Komplex, die an die a Untereinheit des V0 Komplex gekoppelt sind^{43,44,46}.

Die Funktion der V-ATPase kann auf vielfältige Art reguliert werden. Ein essentieller Prozess ist die Assemblierung des Komplexes, die mit dem Zusammenbau des V0 Subkomplexes im Endoplasmatischen Reticulum (ER) beginnt. Hierbei unterstützen beispielsweise ATP6AP1 (Ac45; Accessory subunit 45), welches in der Hefe auch als c'-Untereinheit bezeichnet wird, ATP6AP2 und VMA21^{47,48}. Der V0 Subkomplex wird anschließend zum Zielorganell transportiert, wo die Assemblierung des Gesamtkomplexes erfolgt. Die Dissoziation in die V0 und V1 Subkomplexe wird in Hefen unter anderem durch Glucosemangel induziert^{49,50}. In Säugetierzellen reguliert Aldolase, ein Enzym der Glykolyse, ebenfalls die Assemblierung der V-ATPase⁵¹⁻⁵³. Auch die Lipidzusammensetzung der Membran beeinflusst die Bindung von V1 an V0^{45,54,55}. So befindet sich der V0 Subkomplex in den Endosomen in floßartigen

Membrandomänen, die reich an Cholesterin und Sphingomyelin sind, welche sich auf die Assemblierung und Aktivität der V-ATPase auswirken^{54,55}.

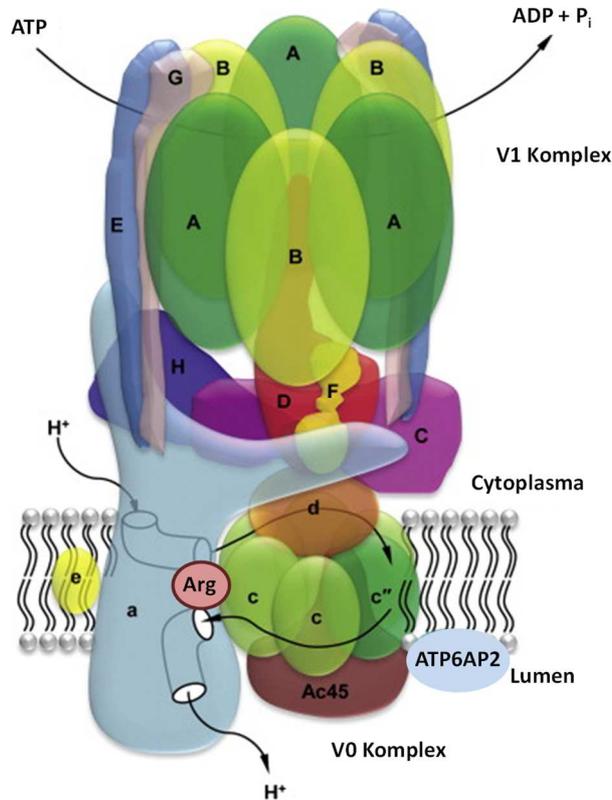


Abbildung 3: Bau der V-ATPase

Abbildung modifiziert nach Qin *et al.*⁵⁶

Die Hydrolyse von ATP durch den V1 Subkomplex ermöglicht die Rotation des Proteolipidrings des V0 Subkomplexes und somit den Transport von Protonen. Während der V0 Komplex in die Membran integriert ist, befindet sich der V1 Komplex im Cytoplasma und kann sich vom V0 Komplex lösen und an andere V0 Komplexe rekrutiert werden. Die a Untereinheit enthält ein für den Protonentransport essentielles Arginin.

Da viele Untereinheiten der ATPase durch mehrere Gene kodiert sind und sie somit in verschiedenen Isoformen vorliegen, ergeben sich zahlreiche Kombinationen die zu einer aktiven ATPase führen. Diese sind zum Teil gewebsspezifisch und können sich sowohl in ihrer Funktion als auch der intrazellulären Lokalisation unterscheiden. Hierbei wird der a Untereinheit ein besonderer Stellenwert beigemessen, da sie sowohl die Lokalisation der V-ATPase als auch deren Kopplungseffizienz zwischen ATP-Hydrolyse und Protonentransport reguliert^{44,57}.

1.2.2 Die vielfältigen Funktionen der a Untereinheit

Die a Untereinheit ist Teil des V0 Komplexes und in Säugetieren durch vier verschiedene Gene kodiert, die zu den Isoformen a1 bis a4 führen. Sie sind im Menschen zu 47-61% auf Proteinebene identisch und haben dabei noch eine 40%ige Ähnlichkeit zu den a Untereinheiten der Hefe⁵⁸. Sie bestehen aus einem hydrophilen N-Terminus, der sich im Cytoplasma befindet und einem C-Terminus aus mehreren Transmembrandomänen mit denen diese Untereinheit in einer Membran verankert wird (Abbildung 4). Die Anzahl der Transmembrandomänen wurde lange diskutiert, neuere Modelle gehen jedoch von 8 Transmembrandomänen aus, sodass sich die C-terminalen Aminosäuren wie auch der N-Terminus im Cytoplasma befinden⁵⁹⁻⁶². Durch den hydrophilen N-Terminus kann die a Untereinheit Kontakt mit der V1 Untereinheit aufnehmen und als Teil der Statoren die beiden Subkomplexe der ATPase miteinander verbinden⁶³, während sie durch den C-terminalen Teil mit den c und c' Untereinheiten in Kontakt steht⁴⁶. Durch diese vielseitige Struktur ergeben sich zahlreiche Funktionen.

Eine zentrale Funktion liegt im Protonentransport. Hierfür befindet sich in der a Untereinheit ein cytoplasmatischer Hemikanal in den das Proton eintritt. Dieser kommt in Kontakt mit einem Glutaminsäurerest der c Untereinheit, an den das Proton bindet. Durch die ATP vermittelte Rotation des Proteolipidrings berührt der protonierte Glutaminsäurerest den luminalen Hemikanal der a Untereinheit, wo der deprotonierte Glutaminsäurerest der c Untereinheit durch ein essentielles Arginin der a Untereinheit (R755 in der murinen und humanen a2 Untereinheit) stabilisiert wird, damit das Proton anschließend ins Lumen entlassen werden kann^{44,59-62}.

Durch den exponierten N-Terminus kann die a Untereinheit mit weiteren Proteinen interagieren und trotzdem ihre Position in der ATPase beibehalten. Dieser Teil bestimmt auch die Rekrutierung der ATPase zu den verschiedenen intrazellulären Membranen. In der Hefe gibt es nur zwei Isoformen der a Untereinheit, wobei Stv1p die ATPase zum Golgiapparat rekrutiert und Vph1p zur Vakuole^{57,64}. Auch die vier Isoformen in den Säugetieren zeigen unterschiedliche intrazelluläre Verteilungen, die sich zum Teil in den Geweben und in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli unterscheiden⁴⁵.

Osteoklasten-ähnlichen-Zellen differenziert wurden. In den undifferenzierten Zellen lokalisierte die $\alpha 3$ Untereinheit hingegen zusammen mit Lamp2 an den Lysosomen^{45,66}. In β -Zellen des Pankreas wiederum wird die $\alpha 3$ -Isoform an insulinhaltigen sekretorischen Vesikeln gefunden^{45,69}. Die $\alpha 4$ Untereinheit befindet sich in Interkalierenden Zellen der Niere an der Plasmamembran und reguliert dort die Ansäuerung des Tubulus^{67,70}. Somit delegieren die verschiedenen α Untereinheiten die V-ATPase zu unterschiedlichen Membranen um diese bedarfsgerecht zu regulieren.

Die Lokalisation der $\alpha 3$ und $\alpha 4$ Untereinheit an der Plasmamembran scheint auch die Invasivität von Tumoren zu unterstützen. Beide Isoformen sind in einigen Tumoren verstärkt exprimiert und rekrutieren somit die ATPase vermehrt an die Plasmamembran⁷¹. Die Ansäuerung der umliegenden extrazellulären Matrix könnte möglicherweise sekretierte Proteasen wie Cathepsine aktivieren und dadurch das Eindringen der Tumore ins Gewebe beschleunigen⁴³.

Die α Untereinheit ist nicht nur essentiell für den Protonentransport, sondern könnte auch als pH Sensor fungieren. Hierbei wird vermutet, dass das Protein in Abhängigkeit vom pH-Wert in einem Vesikel seine Konformation verändert, sodass der N-Terminus sein Bindungsverhalten gegenüber anderen Proteinen ändert^{67,72}. Die Interaktion mit ARNO (Cytohesin 2) beispielsweise scheint pH-Wert abhängig zu sein, da sie durch eine Neutralisation des endosomalen pH-Werts mittels FCCP reduziert werden kann⁶⁷. ARNO bindet an den N-Terminus der α Untereinheit, während Arf6 an die α -Untereinheit der V-ATPase bindet^{67,73,74}. Da ARNO als GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) für ARF6 dessen Bindung an GTP reguliert und ARF6 vielfältige Funktionen im intrazellulären Transport übernimmt^{75,76}, steuert die V-ATPase somit indirekt auch diese Prozesse. Nach diesem Prinzip könnte der N-Terminus der α Untereinheit auch für die Interaktion mit weiteren Proteinen des intrazellulären Transports zur Verfügung stehen.

1.3 Die komplexen Mechanismen des intrazellulären Transports

1.3.1 Das Endo-Lysosomale System

Zellen müssen Nährstoffe und Signale aus der Umgebung aufnehmen, an die entsprechenden Organellen weiterleiten und sie anschließend abbauen. Zusätzlich produzieren Zellen selbst Strukturproteine, Signalstoffe oder Matrixkomponenten, die sie vom Syntheseort zum korrekten Organell oder der Plasmamembran bringen müssen. Hierfür ist ein komplexes System aus Vesikeln notwendig, das auf zahlreichen Wegen die Fracht innerhalb der Zelle transportiert (Abbildung 5).

Die Aufnahme von Substanzen aus der Umgebung wird als Endozytose bezeichnet. Diese kann über verschiedene Wege erfolgen, abhängig davon, wie viel und welche Fracht aufgenommen wird und welche Hüllproteine beteiligt sind. Die stärkste Bedeutung wird der Aufnahme durch Clathrin bedeckte Vesikel beigemessen, während andere Wege, wie zum Beispiel die Calveolin vermittelte Endozytose, eher eine untergeordnete Rolle spielen⁷⁷. In der Plasmamembran kommt es zu Einstülpungen, die von dem Protein Clathrin bedeckt sind und daher als *clathrin coated pits* bezeichnet werden. Durch die Interaktion dieses Proteins mit Frachtrezeptorproteinen, können einige Stoffe gezielt in diesen Einstülpungen akkumuliert werden. Anschließend schnüren sich Vesikel von der Plasmamembran ab, die von einem Käfig aus Clathrin umgeben sind. Nach der Dissoziation dieser Hülle, dem sogenannten *uncoating* reifen die Vesikel auch durch Fusion mit anderen Vesikeln zu den frühen Endosomen⁷⁸.

Die meisten frühen Endosomen sind klein, rund und befinden sich in der Peripherie der Zelle. Einige weisen aber auch tubuläre Strukturen auf^{79,80}. Es gibt jedoch auch zelltypspezifische Unterschiede in Form und Lage der frühen Endosomen. Als Marker für frühe Endosomen wird beispielsweise RAB5 verwendet, welches sich an der Außenseite der Vesikelmembran befindet und durch Interaktion mit Effektorproteinen wie EEA1 die Fusion von Endosomen reguliert⁸¹⁻⁸³. Zwischen 50 und 180% der Zellmembran werden so stündlich internalisiert und werden von den frühen Endosomen durch Abschnürung an Recyclingendosomen abgegeben, die dann wieder mit der Plasmamembran fusionieren⁸⁴. Die Recyclingendosomen sind ein tubuläres Netzwerk, das in einigen Zellen perinukleär gelegen ist und durch das Vorhandensein von Rab11

gekennzeichnet ist^{85,86}. Die Fracht, die innerhalb der Zelle weiter transportiert werden soll, wird in den frühen Endosomen aufkonzentriert. Hierzu dient beispielsweise der leicht saure pH-Wert von pH 6,2-6,3 der die Dissoziation von Fracht und Rezeptoren begünstigt^{87,88}.

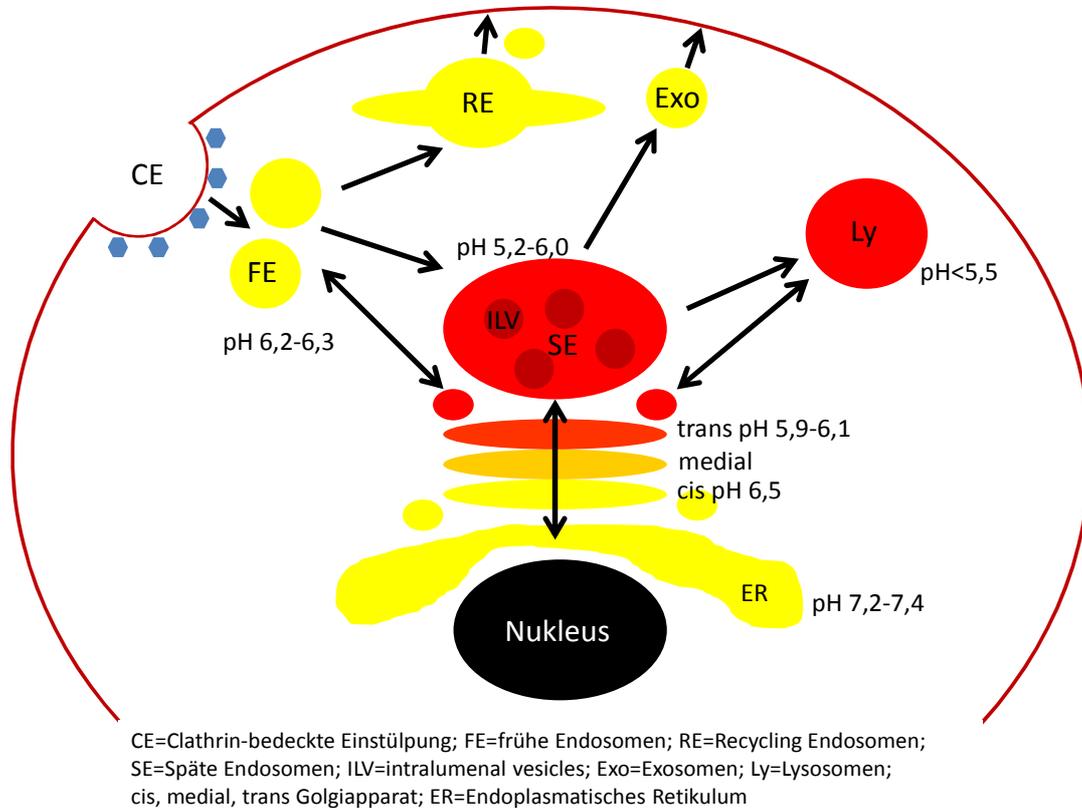


Abbildung 5: Der intrazelluläre Transport

Die zu endozytierende Fracht wird in Clathrin-bedeckten Einstülpungen akkumuliert. Diese schnüren sich ab und reifen zu den frühen Endosomen. Ein Großteil der aufgenommenen Fracht wird über die Recyclingendosomen wieder zur Zellmembran transportiert, während einige Stoffe gezielt aufkonzentriert und in die späten Endosomen transportiert werden. Hier wird durch den Einschluss in ILVs die Fracht weiter selektiert und über Exosomen aus der Zelle transportiert oder zum Abbau in die Lysosomen verbracht. Im Endoplasmatischen Retikulum synthetisierte Proteine gelangen über den Golgiapparat zu ihrem Bestimmungsort. Der Farbverlauf von gelb zu rot symbolisiert den Cholesteringehalt der jeweiligen Kompartimente. Die Abbildung ist stark vereinfacht und spiegelt nicht die Komplexität der beteiligten Komponenten wider, da es zahlreiche Abstufungen zwischen diesen gibt.

Durch Fusion und Fission reifen die frühen Endosomen zu späten Endosomen, den sogenannten *Multivesicular bodies* heran. In ihrem Innern befinden sich kleinere Vesikel, die das Sortieren von Fracht und Enzymen ermöglichen und als *intraluminal vesicles* (ILVs) bezeichnet werden. Für die Ausbildung dieser Vesikel werden die ESCRT-Komplexe (*endosomal sorting complexes required for transport*) benötigt⁸⁹.

Die Proteine, die in die ILVs eingebaut werden sollen, sind ubiquitiniert, sodass sie von Komponenten des ESCRT-Komplexes gebunden werden können und in bestimmten Membranbereichen aufkonzentriert werden können. Diese Teile der Membran stülpen sich dann ein und bilden ein neues Vesikel innerhalb des Endosoms.⁹⁰

Auf dem Weg vom frühen Endosom zum späten Endosom und schließlich zum Lysosom sinkt der pH-Wert kontinuierlich und beträgt in späten Endosomen zwischen 5,2 und 6,0^{87,88}. Die späten Endosomen befinden sich häufig im perinukleären Bereich und werden durch das Markerprotein Rab7 identifiziert⁹¹. Sie weisen durch die *kiss-and-run* Fusion mit Lysosomen bereits viele Ähnlichkeiten mit diesen auf^{92,93}, sodass einige auch als Endolysosomen bezeichnet werden. Endolysosomen zeigen in der Elektronenmikroskopie nur einige elektronendichte Bereiche, während bei Lysosomen das gesamte Lumen elektronendicht erscheint⁹⁴.

Diejenigen Vesikel, die sich im Kontinuum zwischen frühen und späten Endosomen befinden, stehen im Membran- und Frachtaustausch mit dem Trans-Golgiapparat. So können sie Enzyme wie Hydrolasen aufnehmen, die sie schlussendlich zu Lysosomen heran reifen lassen⁹⁵. Der saure pH-Wert der Lysosomen liegt unter pH 5,5 und kann bis auf 4,5 abgesenkt sein, sodass ideale Bedingungen für die Hydrolasen vorliegen um die Fracht zu degradieren^{87,88,96}. Die Membran der Lysosomen muss daher durch eine Glykokalix vor dem Abbau geschützt werden und enthält stark glykosylierte LAMPs (*lysosomal associated membrane proteins*) und schwer degradierbare Lipide⁹⁷.

Die Fracht der späten Endosomen muss nicht zwangsläufig im Lysosom abgebaut werden. Besonders aktuelle Projekte haben Exosomen im Fokus, die ihren Ursprung in den ILVs der späten Endosomen haben. Durch die Verschmelzung der späten Endosomen mit der Plasmamembran werden diese Vesikel in den extrazellulären Raum freigesetzt, können dort lange Zeit überdauern und als Speicher für Proteine und RNA-Moleküle dienen^{98,99}.

1.3.2 Der Golgiapparat als zentrale Schaltstelle des intrazellulären Transports

Obwohl der Golgiapparat neben dem endo-lysosomalen Vesikelsystem zu liegen scheint, steht er mit allen Organellen im ständigen Vesikelaustausch^{95,100}. Der Golgiapparat befindet sich im perinukleären Bereich und kann als polarisierter

Membranstapel betrachtet werden, der verschiedene Reaktionsräume umschließt¹⁰¹. Der kernnahe Bereich wird als cis-, der mittlere Teil als medial- und der periphere Teil als trans-Golgiapparat bezeichnet. Es gibt Modelle, die von einer Reifung der Membranzisternen von cis nach trans ausgehen¹⁰² und andere, die statische Zisternen postulieren, zwischen denen die Fracht durch Vesikel transportiert wird¹⁰³. Die verschiedenen Golgimembranen stehen in beiden Modellen durch anterograden und retrograden Vesikeltransport in ständigem Austausch.

Die zentrale Rolle des Golgiapparates im intrazellulären Transport wird auch dadurch verstärkt, dass er die im Endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisierten Proteine empfängt um sie zu ihrem Bestimmungsort zu dirigieren. Hierbei passieren sie das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC), das durch seine hohe Konzentration an Chaperonen die Faltung der Proteine unterstützt und an deren Qualitätskontrolle beteiligt ist¹⁰⁴. Auf ihrem Weg vom cis zum trans Golgiapparat werden die Proteine dann posttranslational modifiziert, wie beispielsweise glykosyliert. Hierbei werden die Proteine im ER nur kernglykosyliert und dann durch die sequentielle Anordnung von Glykosyltransferasen im Golgiapparat schrittweise mit den verschiedenen Zuckerresten modifiziert^{105,106}.

Der Golgiapparat liegt am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC)¹⁰⁷. Dieses ist essentiell für den intrazellulären Transport, da es den Minus-Pol und somit den Ausgangspunkt der Mikrotubuli bildet, deren Plus-Pole sich in der Zellperipherie befinden. Entlang dieser Strahlen können Vesikel mit Hilfe von Motorproteinen wie Dynein und Kinesin in der Zelle transportiert werden.

1.3.3 pH-Wert Regulation im intrazellulären Transport

Während die frühen Endosomen nur einen leicht sauren pH von 6,2 bis 6,3 haben, nimmt dieser in späten Endosomen stark ab und kann in Lysosomen bis auf 4,5 reduziert sein^{87,88,96}. Das Lumen des ERs ist mit einem pH-Wert von 7,2 bis 7,4 ähnlich neutral wie das Cytoplasma^{108,109}, für den cis Golgiapparat wird dann schon ein leicht saurer pH um 6,5 angenommen^{88,108,110,111}, und der trans Golgiapparat, beziehungsweise das vesikuläre Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) hat einen pH von 5,9 bis 6,1^{112,113}. Die verschiedenen Kompartimente in der Zelle unterscheiden sich also stark in ihrem pH, was durch zahlreiche Mechanismen reguliert wird.

Die unterschiedlichen pH-Werte werden durch die aktive Anreicherung von Protonen in den Vesikeln mittels Protonenpumpen (V-ATPasen) erreicht, was sich auch auf den Transport von anderen Ionen wie Cl^- , Ca^{2+} , Na^+ und K^+ auswirkt. Somit beeinflusst die jeweilige Durchlässigkeit der Vesikelmembran für Protonen und andere Ionen, welche pH-Werte aufrechterhalten werden können. Den größten Effekt hat jedoch die Regulation der V-ATPasen im jeweiligen Kompartiment¹¹¹. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 Aufbau, Funktion und Regulation der V-ATPase beschrieben, kann dies auf zahlreichen verschiedenen Wegen erfolgen. Die Konzentration der V-ATPase an einem bestimmten Vesikel, dem Golgiapparat oder der Plasmamembran kann beispielsweise durch den Einbau der verschiedenen α Isoformen moduliert werden. Die starke Ansäuerung der späten Endosomen kann sowohl in der großen Anzahl der V-ATPasen begründet sein, als auch durch die besondere Lipidzusammensetzung dieser Vesikel erklärt werden⁵⁵. Auch die spezifische Lokalisation von Interaktionspartner kann die Aktivität der ATPase beeinflussen.

Durch den pH-Wert werden zahlreiche Prozesse des intrazellulären Transports reguliert, wie die Abschnürung von Vesikeln oder auch die Inaktivierung von Pathogenen. Veränderungen des pH-Wertes durch eine Hemmung der V-ATPasen mit Bafilomycin A1 inhibieren beispielsweise den Transport von endozytierter Fracht von frühen zu späten Endosomen¹¹⁴. Dies scheint auf eine pH abhängige Rekrutierung von ARF1 und COP Hüllproteinen zurückzuführen zu sein¹¹⁵. Auch die Sortierung der Fracht wird durch die pH-Wert Unterschiede innerhalb des endo-lysosomalen Systems und des Golgiapparates ermöglicht. So kann im Startkompartiment eine Fracht an einen Rezeptor gebunden werden und durch den veränderten pH-Wert im Zielkompartiment wieder entlassen werden. Der pH-Wert reguliert außerdem die Aktivität verschiedener Enzyme. So können Glykosyltransferasen in der richtigen Zisterne innerhalb des Golgiapparates ihre Arbeit verrichten. In den Lysosomen unterstützt der niedrige pH-Wert außerdem die Aktivität der Hydrolasen zum Abbau des Vesikelinhalts⁹⁴.

1.3.4 Cholesterin im intrazellulären Transport

Neben dem pH-Wert reguliert auch die Lipidzusammensetzung der intrazellulären Kompartimente deren Funktion. Sie bestimmt die Flexibilität und Fluidität der begrenzenden Membranen und reguliert die Aktivität verschiedener Proteine. Dabei sind die meisten Membranen nicht gleichmäßig aufgebaut, sondern enthalten floßartige

Mikrodomänen, besetzt mit speziellen Lipiden und Proteinen¹¹⁶. Das Lipid Cholesterin hat einen besonders starken, gut untersuchten Einfluss auf den intrazellulären Transport. Es kann sowohl von der Zelle selbst synthetisiert werden, also auch über Endozytose aufgenommen werden. Im Blut ist es in LDLs (*Low Density Lipoproteinen*) gebunden, die an der Plasmamembran der Zelle mit dem LDL-Rezeptor interagieren. Dieser wird in *clathrin coated pits* angereichert, sodass der Komplex aus LDL und Rezeptor über Clathrin vermittelte Endozytose in die frühen Endosomen aufgenommen wird¹¹⁷. Von dort wird er zu den Recyclingendosomen transportiert, in denen sich die Lipoproteine vom LDL-Rezeptor trennen. Während dieser zurück an die Plasmamembran gebracht wird, gelangen die Lipoproteine in die späten Endosomen und die Lysosomen. Dort werden sie hydrolysiert und das frei gewordene Cholesterin an die Plasmamembran und die intrazellulären Kompartimente verteilt¹¹⁸. Überschüssiges Cholesterin wird verestert und in Lipidtropfen im Cytoplasma gespeichert¹¹⁹.

Der Transport von Cholesterin aus den späten Endosomen beziehungsweise aus den Lysosomen rückte besonders in den Fokus, da die Proteine NPC1 und NPC2 daran beteiligt sind. Mutationen in diesen Proteinen führen zum Niemann-Pick-Syndrom Typ C, einer Lysosomalen Speicherkrankheit, die eine schwere Neurodegeneration zu Folge hat. In den Zellen der Betroffenen sammelt sich das Cholesterin in den Lysosomen, sodass der gesamte intrazelluläre Transport gestört ist¹²⁰⁻¹²⁴.

Die Zelle kann jedoch auch selbst Cholesterin synthetisieren. Dies wird durch spezielle Transkriptionsfaktoren, die SREBPs (*sterol regulatory element-binding proteins*) reguliert. Diese werden direkt nach der Synthese im ER vom SREBP-Escort Protein (SCAP) gebunden, welches als Cholesterinsensor dient, denn wenn viel Cholesterin im ER enthalten ist, bleibt es dort verankert. Bei niedrigem Cholesterinlevel kann es jedoch mit COPII interagieren, sodass die SREBPs in den Golgiapparat transportiert werden. Dort werden diese proteolytisch geschnitten, sodass sie im Zellkern die Transkription der Gene für die Cholesterinsynthese aktivieren können¹²⁵⁻¹²⁷. Das in der Zelle selbst synthetisierte Cholesterin, wird vom ER größtenteils direkt an die Plasmamembran abgegeben, kann aber auch durch den Golgiapparat transportiert werden. Dabei nutzt das Cholesterin sowohl den vesikulären Transport als auch den direkten Transport mittels verschiedener Proteine^{118,128}.

Wie in ihrem pH-Wert unterscheiden sich die Kompartimente des intrazellulären Transports auch stark in ihrem Cholesteringehalt (Abbildung 5). Die Plasmamembran

besteht aus sehr viel Cholesterin und die frühen Endosomen enthalten weniger Cholesterin als die späten. In den späten Endosomen gibt es zudem Unterschiede zwischen der äußeren Membran und den ILVs, die sehr viel Cholesterin umschließen¹²⁹. Das ER wiederum enthält sehr wenig Cholesterin und hat daher eine sehr ungeordnete Membran. Im Golgiapparat nimmt der Cholesteringehalt von den cis zu den trans-Membranen zu¹³⁰.

Der Cholesteringehalt der Endosomen reguliert auch deren Position in der Zelle. ORP1L (*oxysterol-binding protein*) dient als Cholesterinsensor, der dazu führt, dass Vesikel mit hohem Cholesteringehalt über p150^{Glued} mit dem Dynactin-Komplexes verbunden sind und mittels Dynein entlang der Mikrotubuli zu deren Minus-Pol transportiert werden¹³¹. Daher bewegen sich cholesterinreiche Vesikel häufig zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Aufklärung der genetischen Ursache der autosomal rezessiven Cutis laxa Typ 2A im Jahr 2008 hilft den betroffenen Familien bereits dahingehend, dass sie durch die molekulargenetische Untersuchung eine eindeutige Diagnose erhalten können. Somit kann der Verlauf der Erkrankung und das Wiederholungsrisiko besser abgeschätzt werden. Es fehlen jedoch adäquate Behandlungsoptionen um besonders die neuronalen Symptome abzumildern. Desweiteren sind einige Aspekte des Phänotyps bisher möglicherweise übersehen worden. Darüber hinaus gibt es zur molekularen Funktion, der bei den Patienten fehlenden $\alpha 2$ Untereinheit, zahlreiche offene Fragen.

Durch den akuten Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit in HeLa-Zellen, soll ihre Wirkung auf die verschiedenen Kompartimente dargestellt werden. Die Verwendung pH-Wert modulierender Reagenzien soll zusätzlich die Aufdeckung ursächlicher Zusammenhänge ermöglichen.

Die Auswirkungen zellulärer Aspekte auf den Gesamtorganismus können jedoch nur schwer prognostiziert werden. Daher ist sowohl für das Verständnis des Pathomechanismus als auch für die detaillierte Analyse des Phänotyps ein zusammenhängender Organismus notwendig. Die Erzeugung eines Knock-out Mausmodells soll es ermöglichen, den Krankheitsverlauf auf Gewebeebene zu ergründen um in späteren Arbeiten Behandlungsoptionen zu identifizieren und anzuwenden. Durch ein Mausmodell mit gefloxter $\alpha 2$ Untereinheit soll zusätzlich die Möglichkeit eines gewebespezifischen Abschaltens der $\alpha 2$ Untereinheit geschaffen werden.

Als besonders wichtiges Werkzeug, nicht nur für die Erforschung der ARCL2A, sondern auch für das Verständnis der molekularen Funktion der α Untereinheit, soll ein Mausmodell mit einer gezielten Mutation des Protonentransports entwickelt werden. Somit kann diese Funktion getrennt von den weiteren Funktionen der α Untereinheit analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller
ABI 3730, 48 Kapillaren Array	Applied Biosystems (Foster City, USA)
ABIPrism HT 7900 Real-time Cyclers	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Biomek NX	Beckman Coulter (Brea, USA)
BioZyme Cyclers (DNA Engine DYAD)	MJ Research (Waltham, USA)
Chemi-Smart	Vilber Lourmat (Collégien, FR)
FlexCyclers	Analytik Jena (Jena)
Function Line, Labofuge 400R	Heraeus Instruments (Hanau)
Gene Pulser	BioRad (Hercules, USA)
GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cyclers	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Mini-Protean 3 System	BioRad (Hercules, USA)
Nano-Photometer	Implen (München)
Real Time PCR Maschine, Typ 7500	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 2: Geräte im Bakterienlabor

Gerät	Hersteller
Brutschrank, Typ B20	Heraeus instruments (Hanau)
Centromat H (Orbitalinkubator)	B.Braun (Melsungen)
Centromat R (Schüttler)	B.Braun (Melsungen)
Gene Pulser	BioRad (Hercules, USA)
Lambda 2, UV/VIS Spectrophotometer	PerkinElmer (Waltham, USA)

Tabelle 3: Geräte im Zellkulturlabor

Gerät	Hersteller
BDK-S 1500 (Sicherheitswerkbank)	Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl)
Direct Heat CO ₂ – Incubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Forma Series II Water Jacket Incubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
LaminAir HBB2448	Heraeus instruments (Hanau)
Sicherheitswerkbank KS12 Herasafe	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 4: Geräte im Histologielabor

Gerät	Hersteller
Einbettstation EC 350-1&2	Microm (Walldorf)
Microtom HM 355 S	Microm (Walldorf)
TP 1020 Gewebeprozessierung	Leica (Wetzlar)
ULM 400 Wärmeschrank	Memmert (Schwabach)

Tabelle 5: Mikroskope

Gerät	Hersteller
Axiovert 25 (inverses Lichtmikroskop)	Zeiss (Oberkochen)
Laser Modul LSM150, Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Axiovert 200M (Laser Konfokal Mikroskop)	
Inverses Labormikroskop DM IL	Leica (Wetzlar)
Fluoreszenzmikroskop DM RB	Leica (Wetzlar)

2.1.2 Chemikalien

Wenn nicht anders aufgeführt wurden die Chemikalien von den Firmen J.T.Baker (Phillipsburg, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tabelle 6: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
5 x BigDye Terminator Reaktionspuffer v.1.1 und v.3.1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
5x FIREPol Master Mix (12,5 mM MgCl ₂)	Solis Biodyne (Tartu, EST)
5x Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)	Solis Biodyne (Tartu, EST)
6 x Ladepuffer für Agarosegele	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Agentcourt® CleanSEQ®	Beckman Coulter (Brea, USA)
BigDye Terminator Version 3.1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Deckgläschen 24x60mm	Roth (Karlsruhe)
DNase I 1U/μl	Zymo Research (Irvine, USA)
dNTPs	Bioline (London, UK)
Entellan Neu	Merck (Darmstadt)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Phusion DNA-Polymerase (2 U/μl)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Proteinase K	Roche (Basel, CHE)
T4 Ligase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
T4 Polynukleotid Kinase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Taq DNA-Polymerase (5 U/μl)	Stratec (Birkenfeld)
TRIzol	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.1.3 Zellkultur

Kultivierung von humanen Zelllinien

Tabelle 7: Chemikalien für die Kultivierung von humanen Zelllinien

Chemikalie	Hersteller
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Bafilomycin A1 from <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Chloroquin Diphosphatsalz	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
DMEM 4,5 g/l D-Glucose, ohne Pyruvat	GIBCO (Paisley, UK)
DMEM High Glucose 4,5 g/l, ohne Pyruvat	HyClone (Logan, USA)
DPBS (steril, ohne Ca ²⁺ -, Mg ²⁺ -Ionen)	GIBCO (Paisley, UK)
Fetales Kälberserum (FCS) 10270106 Lot:41Q4219K	GIBCO (Paisley, UK)
Fluoromount-G	Biozol Diagnostica (Eching)
Interferin	Polyplus transfection (Illkirch, FR)
Nocodazol	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Optimem	GIBCO (Paisley, UK)
Penicillin-Streptomycin	Lonza (Basel, CHE)
Saponin	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Trypsin-EDTA	GIBCO (Paisley, UK)
Ultraglutamin 1 (200mM in 0,85% NaCl)	Lonza (Basel, CHE)

Tabelle 8: Materialien für die Kultivierung von humanen Zelllinien

Material	Hersteller
0,45µm Cellulosefilter	VWR International (Radnor, USA)
Deckgläser Ø 12 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Tiefe 0,100 mm Fläche 0,0025 mm ²	
Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Platte mit 12 Kalotten	Falcon (Franklin Lakes, USA)
3,8 cm ² Wachstumsfläche	
Platte mit 6 Kalotten	Falcon (Franklin Lakes, USA)
9,6 cm ² Wachstumsfläche	
Serologische Pipetten	Falcon (Franklin Lakes, USA)
T25-Flasche	Falcon (Franklin Lakes, USA)
25 cm ² Wachstumsfläche	
T75-Flasche	Falcon (Franklin Lakes, USA)
75 cm ² Wachstumsfläche	
Zellkulturschale 100x20 mm	Falcon (Franklin Lakes, USA)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)

Kultivierung von embryonalen Mausstammzellen

Tabelle 9: Chemikalien für die Kultivierung von Fütterzellen und Embryonalen Stammzellen

Chemikalie	Hersteller
DMEM 4,5 g/l D-Glucose, ohne Pyruvat	Lonza (Basel, CHE)
DMSO	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Fetales Kälberserum (FCS) für Embryonale Stammzellen 2602-P282905	PAN Biotech (Aidenbach)
Fetales Kälberserum (FCS) für Fütterzellen	Biochrom (Miami, USA)
G418 (Geneticin)	GIBCO (Paisley, UK)
Gelatine	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Glutamin (200mM in 0,85% NaCl)	Lonza (Basel, CHE)
Knockout DMEM 4,5g/l Glucose, mit Pyruvat	GIBCO (Paisley, UK)
Mitomycin C	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Murine Leukemia Inhibitory Factor ESGRO (LIF)	Chemicon (Temecula, USA)
Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	GIBCO (Paisley, UK)
Nukleoside	Chemicon (Temecula, USA)
PBS	Lonza (Basel, CHE)
Penicillin-Streptomycin	Lonza (Basel, CHE)
Trypsin-EDTA	GIBCO (Paisley, UK)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)

Tabelle 10: Materialien für die Kultivierung von Fütterzellen und Embryonalen Stammzellen

Material	Hersteller
Serologische Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
TC-Flasche T75	Sarstedt (Nümbrecht)
TC-Platte 96 Well Standard F	Sarstedt (Nümbrecht)
TC-Platte 96 Well Standard R	Sarstedt (Nümbrecht)
Tubes 15 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, CHE)
Tubes 50 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, CHE)
Zellkulturplatte 6	Techno Plastic Products AG, TPP (Trasadingen, CHE)
Zellkulturschale 100	Techno Plastic Products AG, TPP (Trasadingen, CHE)
Zellkulturschale 60	Techno Plastic Products AG, TPP (Trasadingen, CHE)

2.1.4 Enzyme

Die Restriktionsenzyme wurden bei Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) oder New England BioLabs (Ipswich, USA) erworben. Sofern verfügbar wurden die FastDigest oder High-Fidelity Enzyme verwendet.

2.1.5 Kits

Tabelle 11: Kits

Kit	Hersteller
Agencourt DNAdvance	Beckmann Coulter (Brea, USA)
Direct-Zol RNA MiniPrep	Zymo Research (Irvine, USA)
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Stratec (Birkenfeld)
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Stratec (Birkenfeld)
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel (Düren)
Pierce BCA Protein Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Quick Blunting Kit	New England BioLabs (Ipswich, USA)
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Venlo, NLD)

2.1.6 Antikörper

Tabelle 12: Antikörper

Antikörper	Verdünnung für Immuno- fluoreszenz- färbung	Verdünnung für Western Blot
Maus-anti- EEA1 (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)	1:200	1:1.000
Maus-anti- GAPDH (Ambion, Waltham, USA)		1:20.000
Hase-anti- GIANTIN (Covance, Princeton, USA)	1:1.000	
Maus-anti- GM130 (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)	1:500	
Hase-anti- GORAB (HPA027208; Sigma-Aldrich; St.Louis, USA)	1:400	
Maus-anti- LAMP2 (H4B4, DSHB, Iowa City, USA)	1:200	1:500
Hase-anti- LC3 A/B (Cell Signaling, Cambridge, GB)	1:200	
Schaf-anti- TGN46 (Bio-Rad AbD Serotec, Oxford, GB)	1:1.000	

Antikörper	Verdünnung für Immunfluoreszenz- färbung	Verdünnung für Western Blot
Hase-anti- ATP6V0A2 (ab96803, Abcam, Cambridge, GB)		1:2.000
Maus-anti- V5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	1:800	
Hase-anti- V5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	1:500	
Esel-anti- Hase IgG Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, USA)	1:1.000	
Esel-anti- Maus IgG Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, USA)	1:1.000	
Esel-anti- Hase IgG Alexa 555 (Molecular Probes, Eugene, USA)	1:1.000	
Esel-anti- Maus IgG Alexa 555 (Molecular Probes, Eugene, USA)	1:1.000	
Esel-anti- Schaf IgG Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, USA)	1:1.000	
Ziege-anti- Hase HRP (Molecular Probes, Eugene, USA)		1:1.000
Ziege-anti- Maus HRP (Merck Millipore, Billerica, USA)		1:1.000

2.1.7 Plasmide

Tabelle 13: Plasmide

Plasmid	Hersteller
pDTA Ampicillinresistenz Diphtheriatoxin	Prof. Carmen Birchmeier (MDC, Berlin)
pHW025 FRT-Sequenzen, LoxP-Sequenzen, Neomycin-Resistenzkassette, Ampicillinresistenz	Prof. Carmen Birchmeier (MDC, Berlin)
BAC BMQ-337012 NCBI38/mm10: Chr5 124,711,778 - 124,802,854 Chloramphenicolresistenz	Sanger resources
pDONR attP1, attP2 Rekombinationsstellen, ccdB Selektionsgen, Kanamycinresistenz	Invitrogen (Paisley, GB)
pLXIN attR1, attR2 Rekombinationsstellen, Gene des Murinen Leukämievirus (MoMuLV) und des Murinen Sarcomavirus (MoMuSV) Ampicillinresistenz, Neomycinresistenz, V5-Tag	Clontech Laboratories (California, USA) Modifiziert für das Gateway-System von Johannes Grünhagen und Björn Fischer (AG Kornak)

2.1.8 Bakterien

Tabelle 14: Bakterien

Bakterien	Hersteller
<i>E. coli</i> Top10 F' mcrA Δ (mrr-hdsRMS-mcrBC) Φ80 lacZΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara- leu)7697 galU galK rpsL (StrR) amdA1 nupG	Institutsstock
<i>E. coli</i> DH10B mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU pgl Δ 8 rpsL nupG	Invitrogen (Paisley, GB)
<i>E. coli</i> DY380 DH10B Δ(cI857ind1) Δ(cro- bioA) <> tetRA (TetR) gal490	Prof. Carmen Birchmeier (MDC, Berlin)
<i>E. coli</i> EL250 DY380 (cro-bioA) <> araC-PBAD Flpe	Prof. Carmen Birchmeier (MDC, Berlin)
<i>E. coli</i> EL350 DY380 (cro-bioA) <> araC-PBAD Cre	Prof. Carmen Birchmeier (MDC, Berlin)

2.1.9 Zelllinien

Tabelle 15: Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
HeLa	Institutsstock
Phoenix amphi CRL-3213 Verpackungszellen	ATTC (Manassas, USA)
G4 ES-Zellen, Mausstamm: 129S6/SvEv x C57BL/6N	Andras Nagy, MSHRI (Toronto, USA)

2.1.10 Oligonukleotide

Tabelle 16: Primer für die Erzeugung homologer Regionen für das *Recombineering*

Primerbenennung	Sequenz
Atp6v0a2_A_SalI_F	TTTTGGTTCGACAGTTCCTGCCCCGCTC
Atp6v0a2_A_HindIII_R	AAAAAAGCTTGACTGTCCATGAGAACAGCCAC
Atp6v0a2_B_HindIII_F	GTGGTAAGCTTGAGGCCAGCCTG
Atp6v0a2_B_XbaI_R	TGTCTCTAGAAGCAGCTATCTCTGTGG
Atp6v0a2_C_SalI_F	CTAAAGTCGACAGCTTTCTGTGTTGTGG
Atp6v0a2_C_HindIII_R	GCTAGATCACAGAAAGCTTTGAGCCAC
Atp6v0a2_D_NotI_F	GACGCGGCCGCTGCATCTGGAAAGAGCAATG
Atp6v0a2_D_SacI_R	GGGACAAGAAAGAGCTCTGTGCAGAACC

Tabelle 17: Sequenzierprimer für das murine *Atp6v02* Gen

Primerbenennung	Sequenz
ATPase_e10_F	GTGCTTGTTGTGCTTGACG
ATPase_e10_R2	GACAGGAGGATGACCAGAATG
ATPase_e11_F	TGGCCTTATAGTCCTGTTCTGAG
ATPase_e11_R	AGCAGGACTACCTGAGACCATC
ATPase_e12u13_F	GAGGAAAGGCTGGAATGAGC
ATPase_e12u13_R	AAGGCAATTCACACAAACCTG
ATPase_e14_F	AAGCAGAAGAGACAGGTGTTG
ATPase_e14_R2	ACCTCCACTCGGACTGTGAC
ATPase_e15_F	TGTGTGGTTCTGCACAGTTC
ATPase_e15_R	CCTTCTCATCACAGGCTACG
ATPase_e16_F	GCCATGTCCTGAATGCTATG
ATPase_e16_R	AACAGCACCACTCCTCAAGC
ATPase_e17_F	TTGGAGACAGTTCTCTTGTTCC
ATPase_e17_R	TTCTTCACTGCTCTCTGTGCTC
ATPase_e18_F	CTTCCAGCATGCTCTGCTC
ATPase_e19_F	TTAAGGAGGAAGGCCTGGAG
ATPase_e20_F1	AAGTGTAGAAACAGGGCTGGA
ATPase_e20_F2	AGGAGAGAAGCCAGCTGAAC
ATPase_e20_F3	AAACCAAAAAGGAAGTGTAGAAACA
ATPase_e20_R1	CTGACATCTTCTTGCGATGG
ATPase_e20_R2	CCAGTAGAAGCAGTCTCTGTGG

Tabelle 18: Primer für die Sequenzierung des Zielvektors

Primerbenennung	Sequenz
ATP6V0A2_i17_F	GAAGAAGAACCAAGGTCCTGTAG
ATP6V0A2_i17_R	CTGGAAGCTACAGCAGATCC
loxP1_seq_F	CAAAGCTTGCCAATTTCTCC
loxP1_seq_R	TTGGCTTGAATACATGTCTGG
loxP2_seq_F	CGATCCTCATCCTGTCTCTTG
pHW025_neo_F	GGGTTCCCTCCGGTATTGTC
pHW025_Neo_F2	GCAGCTGCATCTATCTAATGCTC
pHW025_neo_seq_R2	ATCGCCTTCTTGACGAGTTC
pHW025_neo_seq_R3	CCTCGGCCTCTGAGCTATTC
pHW025_neoR1	CTAGAGCAGTGGGTCACCTCG
R755Q_seq_Nde1_F	AGCTGGCTCAGTGGGTAAAG
R755Q_seq_Nde1_R	CATCACACGCATTGCATTTAG

Tabelle 19: R755Q Mutageneseprimer Maus

Primerbenennung	Sequenz
R755Q_MUT_F	TCCTACCTGCAGCTCTGGGCAC
R755Q_MUT_R	GTGCCCAGAGCTGCAGGTAGGA
R755Q_RsrII_F	GCCAACGCTATGTCCTGATAG
R755Q_NdeI_R	GCACAAGCATATGTGTGGATAAAC

Tabelle 20: qPCR Primer für genomische DNA der Maus

Primerbenennung	Sequenz
qm_Albumin_F	CTGCAATCCTGAACCGTGT
qm_Albumin_R	TTCCACCAGGGATCCACTAC
qm_chr8_ank1_F	ATCAGCCAGAGCCACTCAAG
qm_chr8_ank1_R	TGCATGCAAACCTCCAAAGTC
qm_ATP6V0A2_i14_F	CAGAGGCTGCTCTCAG CA
qm_ATP6V0A2_i14_R	TGTATAGGGCTGTGCACTCG
qm_ATP6V0A2_i17_F	AGAAGAACCAAGGTCCTGTAGTC
qm_ATP6V0A2_i17_R	CCATGTGGTTAGTGGTCTCAG
qm_chr8_kars_F	TCTGCCTCACAAAGTCGTTC
qm_chr8_kars_R	CCTCCTCCTGTAGCCATCAC

Tabelle 21: qPCR Primer cDNA Maus

Primerbenennung	Sequenz
Aktin_F	TTGCTGACAGGATGCAGAAG
Aktin_R	GTACTIONGCGCTCAGGAGGAG
Gapdh_F	GGGAAGCCCATCACCATCTT
Gapdh_R	CGGCCTCACCCCATTTG
Gm24854_mi_B_F	GAGATTATCAGGATCCCTGAGCAAGG
Gm24854_mi_C_F	TGAAACCATACAGAGATTATCAGGATCCCT
m_atp6a1_F	TCCATCCAGTTTGCCTACTACG
m_atp6a1_R	TTATATGTTCGGCGGTGTCTG
m_atp6a4_F	TTACAGCTGGCTTCCAGAAC
m_atp6a4_R	CAAACATCACAGCGAACAGG
miQPCR_RNU6B_F	GGATGACACGCAAATTCGT
miQPCR_univ_R	CTAGGGTTATCGGCGTGTTCG
qm_atp6v0a2_e10_R	TGTTTCTTTTCGTAGGGATTGTG
qm_atp6v0a2_e15_F	GAGCATCCTGATCGAGTTCAT
qm_atp6v0a2_e16_R	AGCCACCAACACTCTCTGG
qm_Atp6v0a2_e19F	CCTTCTGGTCATGGAGGGTC
qm_Atp6v0a2_e20R	TGCCTGCACCAACGTAGAAT
qm_atp6v0a2_e3F	CCCGCACCACCTCTTAAACA
qm_atp6v0a2_e4R	CACCAGCTCCAACAGGTTCT
qm_atp6v0a2_e9_F	GCCTCATAGCTGAGGTCTGG
qm_atp6v0a3_F (Tc1rg1)	CCACACACAAGTGCCTCATC
qm_atp6v0a3_R (Tc1rg1)	CAGCACTCACTCCTTCCTCAC
qm_Ccdc92_e4_F	AGAACCTGCTCTTCTCCAG
qm_Ccdc92_e4u5_R	ATGTTAGATCTGTGCAGTGCT
qm_dnah10_e48_F	CGAGACCTCTCCAGGGTTTT
qm_dnah10_e49_R	GCACTCATTCTCCACACCC
qm_dnah10_e65_F	GGCTGAAAAACATCATGGACA
qm_dnah10_e66_R	CCCCTCTGCCTGCTCTATCT
qm_gtf2h3_e10F	AAGGTGCCTCAGATGCCTTC
qm_gtf2h3_e11R	GGAGGATTAGCTGAGACCGC
qm_Tctn2_e5F	CTTTGAAGCCCATTTGCACT
qm_Tctn2_e6R	GCACTGCCAGCTAGAGACA

Tabelle 22: Vektorsequenzierprimer

Primerbenennung	Sequenz
pDONR_seq_F	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
pDONR_seq_R	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
pDTA_seq_F	TGAAAACCCACACTGCTCGAC
pDTA_seq_R	AAAGGGAACAAAAGCTGGAG
pHW025_seq_CE_F	GTAAAACGACGGCCAGTGAG
pHW025_seq_CE_R	CCGGGGAAGTTCCTATTCC
pHW025_seq_DF_F	CCGTTCGTACGAGAATGGAT
pHW025_seq_DF_R	TGTGGAATTGTGAGCGGATA
pLXIN_seq_F	TCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTA

Tabelle 23: Genotypisierungsprimer

Primerbenennung	Sequenz
CMV-Flpe-F	CTAATGTTGTGGGAAATTGAAGC
CMV-Flpe-R	CTCCAGGATAACTTGTTTATTGC
Hprt-Cre-F	TGCTGTTTCACTGGTTGTGCGGCG
Hprt-Cre-R	TGCCTTCTCTACACCTGCGGTGCT
R755Q_genotype_R	CAGTCAATGGCTGTCACCTC

Tabelle 24: Primer für die Southern Blot Sonden

Primerbenennung	Sequenz
5prime_sonde1_F	GACGAATTCGAAGACAAGCTGGTGTGGTG
5prime_sonde1_R	CTTACCGAGAATTCCTCCAGTGC
Atp6v0a2_3-P_EcoR1_F	GGTGTAAATGGAATTCAGGCCCACTG
Atp6v0a2_3-P_EcoR1_R	GGCAAGACTGAATTCAGCCATCAGG
NeoSonde_1_F	GGGTTCTTCCGGAATTCTCTCCTTCC
NeoSonde_1_R	GTCGAATTCATCAGGATGATCTGGACGAAGA

Tabelle 25: Primer für Gateway-Klonierung

Primerbenennung	Sequenz
Adapter attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
Adapter attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
ATP6V0A2_R755Q_muta_F	CAACACCGCCTCCTACCTGCAGCTCTGGGCGCTTAG CCTG
ATP6V0A2_R755Q_muta_R	CAGGCTAAGCGCCCAGAGCTGCAGGTAGGAGGCGG TGTTG
hATP6V0A2_GateF	AAAAAGCAGGCTTCGCCACCATGGGGTCCCTGTTCC GGAGC
hATP6V0A2_GateR	AGAAAGCTGGGTGTGCCACACTGTCGTCGTTAT
hATP6V0A2_GateR_Nterm	AGAAAGCTGGGTGATTGACTTCTCTGTAGCTTCCG

Tabelle 26: siRNA Oligonukleotide

siRNA Benennung	Sequenz
Kontrolle: Silencer Negative Control No.1 siRNA; #AM4636	
a2#1: ATP6V0A2 Ambion Silencer 20328, #AM16708; Exon 15; Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	GGAAGAAGUUCAACAUUUAtt
a2#2: ATP6V0A2 Ambion Silencer select s24054, # 4390824; Exon 2 und 3; Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	GAGCGAAUAUUGGUGUAUUtt
a2#3: ATP6V0A2 SMARTpool ON- TARGETplus, L-019950-01-0005, Dharmacon (Lafayette, USA)	GUGUGAAGAGCUAGAGCGA CAUCAAGUUCAAUAACGA GAAGAUAAUUGCGGACAU AAGUAAUGCCAAACGUUA

2.1.11 Software

Tabelle 27: Verwendete Software

Software	Hersteller
7500 System Sequence Detection Software	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Chemi-Capt 5000	Vilber Lourmat (Collégien, FR)
Image J	National Institutes of Health (USA)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, USA)
Seq Man 2	DNASTAR (Madison, USA)
Sequencing Analysis Software	Applied Biosystems (Foster City, USA)
SDS Q-PCR Software	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Word Formatvorlage	Chris Wolf (ollewolf.de)

2.1.12 Datenbanken

Tabelle 28: Verwendete Datenbanken

Datenbank	Adresse
Ensembl genome browser	www.ensembl.org
Expression Altas	www.ebi.ac.uk/gxa
National Center for Biotechnology Information (ncbi)	www.ncbi.nlm.nih.gov
Online Mendelian Inheritance in Man (Oimim)	www.omim.org
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Arbeit mit RNA

2.2.1.1.1 RNA Isolation

RNA Isolation aus Zellen

Die Zellen, aus denen RNA isoliert werden sollte, wurden in einer angemessenen Menge TRIzol aufgenommen. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellreste pelletiert und das Lysat mit dem Direct-Zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) nach Herstellerprotokoll weiterverarbeitet. Die RNA wurde in DEPC-Wasser eluiert und Konzentration und Qualität photometrisch bestimmt.

RNA Isolation aus Gewebe

Die Isolation von RNA aus Geweben erfolgte nach einem Protokoll von Martin Franke (MPI für Molekulare Genetik). Hierbei wurden die Gewebe sofort nach der Präparation in 500µl TRIzol aufgenommen und mit einem Homogenisator im TRIzol zerkleinert. Nach Zugabe von 100µl Chloroform und anschließendem Vortexen wurde der klare Überstand abgenommen. Die Nukleinsäuren in diesem Überstand wurden durch Zugabe desselben Volumens 70% Ethanol gefällt und anschließend mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll aufbereitet. Nach der Elution mit Wasser wurden Qualität und Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.1.1.2 DNase-Verdau

Um später bei der qPCR nur aus cDNA und nicht aus genomischer DNA zu amplifizieren, wurden die Primer meist exonüberlappend designt. War dies nicht möglich, wurden die Primer so gelegt, dass ein mehrere Kilobasen großes Intron zwischen den Primern die Amplifikation aus DNA verhinderte. Daher wurde in der Regel kein DNase-Verdau durchgeführt.

Für die transgenen HeLa-Zellen (Kapitel 3.1.1 Die $\alpha 2$ Untereinheit befindet sich in HeLa-Zellen am Golgiapparat) wurde die cDNA-Sequenz des *ATP6V0A2*-Gens in das Genom integriert. Um zu verhindern, dass bei der qPCR auch aus diesem DNA-Fragment amplifiziert wird und nicht nur aus der cDNA, wurden diese Proben mit 1µl DNase (Zymo Research) verdaut. Dazu wurde noch 1µl Ribonuklease Inhibitor

(Fermentas) hinzugefügt und alles für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNase für 10 Minuten bei 70°C denaturiert.

2.2.1.1.3 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese aus RNA erfolgte mit Hilfe des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas nach dem modifizierten Herstellerprotokoll. Hierfür wurde 1µg RNA in 11µl Wasser verdünnt und mit 1µl Random Hexamer versetzt. Nach der Denaturierung bei 70°C für 5 Minuten wurde folgender Mix hinzugegeben:

Tabelle 29: Ansatz cDNA Synthese

5x Puffer	4µl
10 mM dNTP	2µl
Ribonuklease Inhibitor	1µl
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase	1µl

Nach einer Stunde reverser Transkription bei 42°C erfolgte eine Denaturierung des Enzyms bei 70°C für 10 Minuten.

2.2.1.2 Arbeit mit DNA

2.2.1.2.1 DNA Isolation aus embryonalen Stammzellen der Maus

DNA Isolation aus 6-Well Platten

Die embryonalen Stammzellen wurden ohne Fütterzellen mehrere Tage in Platten mit 6 Vertiefungen angezogen. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und in 2ml Lysepuffer (10mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,2% SDS, 100mM NaCl, frisch zugesetzt 0,2mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55°C inkubiert. Mit 200µl 8M LiCl und 2ml Isopropanol wurde die DNA mittels Zentrifugation bei 10.000rpm für 20 Minuten bei 4°C pelletiert. Anschließend wurde sie mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100µl Wasser gelöst. Konzentration und Qualität wurden photometrisch bestimmt.

DNA Isolation aus 96-Well Platten

Um möglichst viele Klone gleichzeitig untersuchen zu können, wurden sie in Platten mit 96 Vertiefungen ohne Fütterzellen angezogen. Die DNA Isolation erfolgte mithilfe des Agencourt DNAdvance Kit (Beckmann Coulter) nach Herstellerprotokoll. Die

Zellen wurden in 100µl Lysepuffer (im Kit) mit 125mM DTT und 35mM Proteinase K für 90 Minuten bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA nach Herstellerprotokoll mit dem Roboter Biomek NX (Beckmann Coulter) aufgereinigt und in Wasser eluiert. Die Konzentration und Qualität wurde photometrisch bestimmt.

2.2.1.2.2 DNA Isolation zur Mausgenotypisierung

Die Mäuse wurden im Alter von drei Wochen nach Geschlecht getrennt und mit einer Ohrmarke versehen. Zusätzlich wurde ein kleiner Teil des Schwanzes abgetrennt um die Mäuse zu genotypisieren oder die Ohrstanzen verwendet. Die Gewebe wurden in 50µl Lysepuffer (25 mM NaOH, 0,2mM EDTA) gegeben. Dies wurde für mindestens 30 Minuten bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt, danach auf Eis abgekühlt und mit 50µl Neutralisationspuffer (40mM TrisHCl) versehen. Nach gründlichem Durchmischen und Pelletieren der Zellreste, konnte je 1µl der DNA-Lösung für eine PCR-Reaktion verwendet werden.

2.2.1.2.3 Plasmidisolation aus Bakterien

Isolation kleiner Plasmide

Für Plasmide unter 10kb wurde das Kit Invisorb Spin Plasmid Mini Two (Stratec) nach Herstellerprotokoll verwendet.

Isolation großer Plasmide

Große Plasmide, wie man sie zur Erzeugung des Zielvektors benötigt, werden leicht beschädigt, sodass eine besonders schonende Isolationsmethode nötig ist. Zur Isolation großer Plasmide wurden zwei Milliliter LB mit den plasmidtragenden Bakterien angeimpft und über Nacht schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 13.000rpm pelletiert und durch Zugabe von 200µl GTE-Puffer (1% Glucose, 25mM Tris pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 200µl Lysepuffer (aus NucleoBond Xtra Midi Kit von Macherey-Nagel) für 5 Minuten lysiert und dies dann mit 200µl des entsprechenden Puffers neutralisiert (ebenfalls aus NucleoBond Xtra Midi Kit). Durch Zentrifugation bei 13.000rpm für 6 Minuten konnte das Lysat geklärt werden und der Überstand in ein neues Eppi überführt werden. Durch Zugabe von 1,4ml frischem eiskalten Ethanol wurde das Plasmid für 15 Minuten auf Eis gefällt. Anschließend wurde es mittels

Zentrifugation für 30 Sekunden pelletiert und mit 70% Ethanol zweimal gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde das Pellet in 30µl Wasser gelöst.

2.2.1.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCRs für die Klonierung mit Korrekturlesefunktion

Für die Klonierung wurde die Phusion DNA Polymerase (Finnzymes) verwendet, die über eine Korrekturlesefunktion verfügt. Diese wurde in folgendem Ansatz (Tabelle 30) mit dem Temperaturprogramm „MS-Long“ (Tabelle 31) eingesetzt.

Tabelle 30: PCR Ansatz Phusion Polymerase

Phusion Polymerase	0,5µl
Primer F (10µM)	0,5µl
Primer R (10µM)	0,5µl
dNTPs	0,5µl
5x Phusion Puffer HF	4µl
H ₂ O	13µl
DNA	1µl

Tabelle 31: Temperaturprogramm MS-Long

Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Wiederholungen
95	3:00	
95	0:30	
61	0:45	x3
72	1:30	
95	0:30	
59	0:45	x3
72	1:30	
95	0:30	
57	0:45	x3
72	1:30	
95	0:30	
55	0:45	x33
72	1:30	
72	10:00	
4	∞	

PCRs ohne Korrekturlesefunktion

Für PCRs bei denen keine Korrekturlesefunktion der Polymerase benötigt wird, zum Beispiel bei Genotypisierungen, wurden folgende Ansätze verwendet, je nachdem mit

zwei oder drei Primern amplifiziert wurde (Tabelle 32, Tabelle 33). Als Temperaturprogramm diente „MS-Long“ (Tabelle 31).

Tabelle 32: PCR-Ansatz mit 2 Primern

Fire Pol Mix	4 μ l
Primer F (10 μ M)	0,4 μ l
Primer R (10 μ M)	0,4 μ l
H2O	14,2 μ l
DNA	1 μ l

Tabelle 33: PCR-Ansatz mit 3 Primern

Fire Pol Mix	4 μ l
Primer F (10 μ M)	0,4 μ l
Primer R (10 μ M)	0,4 μ l
Primer R2 (10 μ M)	0,4 μ l
H2O	13,8 μ l
DNA	1 μ l

Genotypisierung der Atp6v0a2 Flox Linie

Bei der Genotypisierung dieser Linie mussten zu Beginn drei Allele mit den Primern qm_ATP6V0A2_i17_F und qm_ATP6V0A2_i17_R unterschieden werden. Zum einen das transgene Allel mit der Neomycinkassette (2,2kb), das Allel bei dem die Kassette durch Flipase entfernt wurde (318bp) und das Wildtypallel (149bp) (Abbildung 6). Aufgrund der Größe des PCR-Produkts des kompletten transgenen Allels konnte dieses zusätzlich mit dem Genotypisierungsansatz für die *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse nachgewiesen werden. Der Nachweis des Flipase-Gens erfolgte mit den entsprechenden Primern.

Genotypisierung der Atp6v0a2 Knock-out Linie

Um das Wildtyp-, das gefloxtete und das Knock-out Allel voneinander zu unterscheiden zu können, wurden die Primer qm_ATP6V0A2_i14_F, loxP1_seq_R und ATP6V0A2_i17_R verwendet. Hierbei ergibt sich im Wildtyp durch die Primer qm_ATP6V0A2_i14_F und loxP1_seq_R ein Produkt von 482bp. Das gefloxtete Allel mit der Neomycinkassette bringt durch diese beiden Primer ein Produkt von 374bp. Durch den Knock-out fällt die Sequenz für den Primer loxP1_seq_R weg, sodass durch die anderen beiden Primer ein Produkt von 265bp entsteht. Das *Cre*-Gen wurde mit den entsprechenden Primern genotypisiert.

Genotypisierung der Atp6v0a2 R755Q Linie

Die Region um die Mutation wurde mit dem Primern ATPase_e18_F und R755Q_genotype_R amplifiziert (506bp). Bei der Erzeugung der Mutation wurde eine PstI-Schnittstelle eingefügt. Nach einem Restriktionsverdau von 10µl PCR-Ansatz mittels 0,75µl PstI (Thermo Fisher Scientific), 1,5µl 10xOrangebuffer und 2,75µl H₂O bei 37°C für drei Stunden wurde das mutierte Allel in zwei Stücke (179bp und 327bp) geschnitten. Das Wildtypallel blieb intakt. Auch hier wurde das *Flipase*-Gen mit den entsprechenden Primern nachgewiesen.

2.2.1.2.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR dient dazu, die Menge einer bestimmten RNA oder einer DNA Region zu ermitteln. Hierfür wird ein Farbstoff verwendet, der fluoresziert, sobald er an doppelsträngige DNA bindet. Die untersuchte Region wird also mittels PCR vervielfacht und die entstehende Fluoreszenz bildet die Menge des gebildeten PCR Produkts und somit der untersuchten Region ab. Die Verwendung von speziellen qPCR Geräten ermöglichte es parallel zum Temperaturprogramm der PCR die Fluoreszenz des Farbstoffes zu messen.

Es wurde immer die relative Menge bestimmt, also die Menge einer RNA oder DNA im Verhältnis zu einer anderen. Die Auswertung erfolgte immer nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode¹³². Jede Probe wurde dreimal pipettiert und aus den jeweiligen CT Werten ein Mittelwert gebildet.

Die Identität des entstandenen PCR Produkts wurde durch anschließende Dissoziation über einen Temperaturgradienten überprüft.

Bestimmung von relativen cDNA- Mengen

Um die Expression verschiedener Gene zu untersuchen, wurde RNA isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels PCR Teile verschiedener Transkripte amplifiziert. Somit war die Menge des gebildeten PCR Produkts proportional zur vorhandenen RNA.

Um eine Amplifikation aus genomischer DNA zu verhindern, wurden die Primer in der Regel exonüberlappend designt. War dies nicht möglich, so wurden die Primer in Exons positioniert, zwischen denen so große Introns liegen, dass eine genomische Amplifikation nicht möglich ist.

Um die Expression von *Atp6v0a2* in verschiedenen Geweben von Wildtypmäusen zu bestimmen (Kapitel 3.2 Analyse der *Atp6v0a2* Expression in Mäusen), wurde sowohl auf die *Gapdh* als auch auf die *Aktin* Expression normalisiert. Bei beiden handelt es sich um etablierte, häufig verwendete endogene Kontrollen^{133,134}. Für alle weiteren qPCRs auf cDNA wurde nur *Gapdh/GAPDH* als Kontrolle verwendet.

Für die qPCR zur Bestimmung von relativen cDNA Mengen wurde folgender Mix und folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Tabelle 34: qPCR Ansatz für cDNA

5x Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix	4µl
Primer F und R (je 2,5µM)	2µl
H ₂ O	4µl
cDNA	10µl (≈10ng)

Tabelle 35: qPCR Temperaturprogramm

Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Wiederholungen
95	10:00	
95	00:15	40x
60	01:00	

Es wurde die Real Time PCR Maschine 7500 von Applied Biosystems genutzt. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der 7500 System Sequence Detection Software nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode.

Bestimmung der Menge von gDNA Abschnitten

Die Methode der quantitativen PCR wurde sowohl verwendet um eine Rekombination in den ES-Zellen nachzuweisen als auch um eine Trisomie des Chromosoms 8 zu untersuchen. Normalisiert wurde auf die Menge der *Albumin*-DNA. Es wurde der ABIPrism HT 7900 Real-time Cycler von Applied Biosystems genutzt und die Daten mit der SDS 2.1 Software analysiert. Als fluoreszierender Mix wurde hierbei SYBR-Green nach folgendem Ansatz mit dem qPCR Temperaturprogramm (Tabelle 35) verwendet:

Tabelle 36: qPCR Ansatz für gDNA

SYBR-Green	6µl
Primer F und R (je 2,5µM)	1µl
DNA	7µl (8ng)

Lage der qPCR-Primer für den Nachweis der Rekombination des Zielvektors in ES-Zellen

Um die Rekombination des Zielvektors in das Genom der Maus-ES-Zellen zu prüfen, wurde die Menge bestimmter DNA Abschnitte bestimmt. Die Primer wurden so designt, dass sie in der WT-DNA binden. Für die Detektion der Rekombination der loxP-Sequenz zwischen Exon 14 und 15 wurden die Primer qm_ATP6V0A2_i14_F und qm_ATP6V0A2_i14_R und für die Detektion der Neomycinkassette und der zweiten loxP-Sequenz die Primer qm_ATP6V0A2_i17_F und qm_ATP6V0A2_i17_R verwendet.

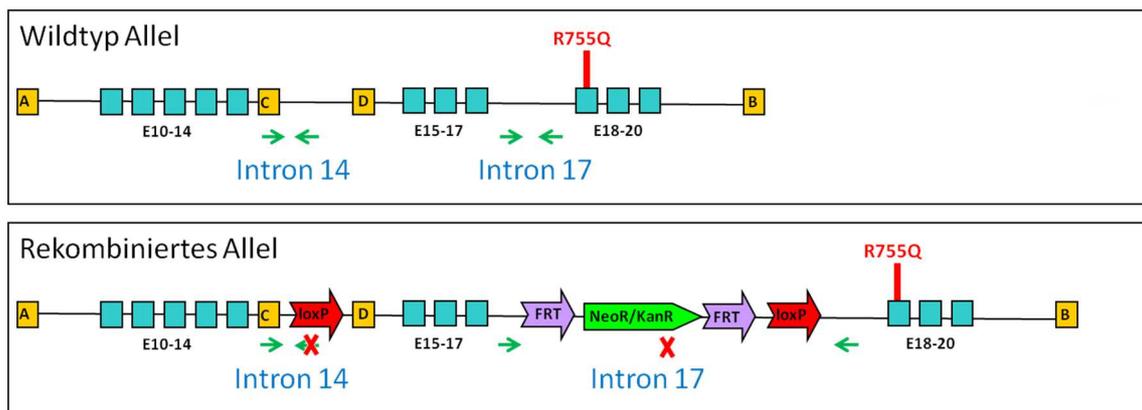


Abbildung 6: Lage der Primer zur Detektion der Rekombination des Zielvektors

A, B, C, D: Sequenzen für homologe Rekombination zur Erzeugung des Zielvektors; NeoR/KanR: Neomycin-Resistenzkassette

Durch die Integration der LoxP Sequenz im Exon 14 im Zielvektor wird einen Wegfall der Sequenz des Rückwärtsprimers verursacht, sodass kein PCR Produkt gebildet werden kann (Abbildung 6). Auch im Intron 17 kann durch Integration der Neomycinkassette aufgrund der Größe des Bereiches von über 2kb und der kurzen Elongationszeit bei der qPCR keine Amplifikation stattfinden. Das heißt, bei DNA aus WT-Zellen wird von beiden Chromosomen amplifiziert, während bei Zellen, in denen eine homologe Rekombination mit dem Zielvektor stattgefunden hat, nur noch von einem Allel amplifiziert werden kann. Positive Klone können also durch die Reduktion des PCR Produkts um 50% identifiziert werden.

Lage der qPCR-Primer zur Bestimmung der Menge an Chromosom 8

Eine Primerkombination wurde im Gen *Ankl*, welches im 5' Bereich des langen Arms von Chromosom 8 liegt, gewählt, eine weitere Kombination wurde in das Gen *Kars* gelegt. Dieses befindet sich am 3' Ende des Chromosoms. Durch Verwendung des Knock-out-Klons 115 konnte auf den normalen Chromosomensatz kalibriert werden. Klone mit einer Trisomie 8 weisen eine erhöhte Produktmenge auf.

2.2.1.2.6 Sanger Sequenzierung

Um die Nukleotidsequenzen der einklonierten DNA-Abschnitte zu überprüfen, wurden diese mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert¹³⁵. Hierfür wurde folgender Ansatz, der fluoreszenzmarkierte Abbruchnukleotide enthält, mit dem Temperaturprogramm „BigDye“ verwendet:

Tabelle 37: BigDye Ansatz

BigDye Terminator	0,5µl
Sequenzierprimer	0,25µl
5x BigDye Terminator Reaktionspuffer	2µl
DNA	≈200ng
H ₂ O	auf 10µl auffüllen

Tabelle 38: BigDye Temperaturprogramm

Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Wiederholungen
96	3:00	
96	0:30	
55	0:15	x36
60	4:00	
60	8:00	
4	∞	

Anschließend wurde die Reaktion mit dem Biomek NX-Roboter von Beckman Coulter aufgereinigt. Hierfür wurde die DNA mit Ethanol gefällt und mit magnetischen Kugeln (Agencourt Cleanseq, Beckmann Coulter), die an die DNA binden, aufgereinigt und anschließend in Wasser eluiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit dem Kapillaren Sequenzierer detektiert und die Sequenzen mit der Sequencing Analysis Software und Seq Man 2 ausgewertet.

2.2.1.2.7 Southern Blot

Die benötigten DNA-Sonden wurden zuerst mittels PCR (Tabelle 30) mit den notwendigen Primern (Tabelle 24) amplifiziert und die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und mit dem Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Stratec, Birkenfeld) daraus aufgereinigt. Anschließend wurden diese mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit #11636090910 von Roche (Basel, CHE) nach Herstellerprotokoll mit Digoxigenin markiert. Dies wurde erneut auf ein Agarosegel aufgetragen und die fertigen Sonden daraus aufgereinigt.

Für den Southern Blot wurden Reagenzien aus dem DIG Luminescent Detection Kit, #11363514910 von Roche (Basel, CHE) und folgende Puffer verwendet:

Tabelle 39: Puffer für Southern Blot

10xDIG	1M Maleinsäure; 1,5M NaCl (pH7,5)
1M NaPi	1M Na ₂ HPO ₄ (pH7,2)
20xSSC	3M NaCl; 300mM C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ (pH7,0)
Church-Hybridisierungspuffer	0,5M NaPi; 7% SDS; 1mM EDTA
Church-Waschpuffer	40mM NaPi; 1% SDS
Denaturierungspuffer	0,5M NaOH; 1,5M NaCl
DIG1	10% 10xDIG
DIG2	10% 10xDIG; 1% Blocking Powder (Roche DIG Luminescent Detection Kit)
DIG3	0,1M Tris (pH9,5); 0,1M NaCl
Neutralisationspuffer	0,5M Tris-HCl (pH7,5); 1,5M NaCl

Es wurden 10µg der DNA der ES-Zellen mit je 2µl der Restriktionsenzyme über Nacht verdaut. Die Fragmente wurden durch ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, wobei der mit Digoxigenin markierte DNA Molecular Weight Marker VII (#11669940910) von Roche (Basel, CHE) als Referenz aufgetragen wurde. Das Gel wurde nach dem Lauf für 30 Minuten mit Denaturierungspuffer behandelt, welcher dann zweimal für 20 Minuten mit dem entsprechenden Puffer neutralisiert wurde. Nun wurde die DNA über Nacht auf eine Nylonmembran (GE healthcare, RPN203B) übertragen, indem ein nasser Blot mit 10xSSC aufgebaut wurde.

Die Membran wurde am Folgetag 5 Minuten in 50mM NaPi inkubiert und die DNA für zwei Stunden bei 80°C auf der Membran fixiert. Nun wurde die Membran in einer Flasche für 30 Minuten bei 65°C mit Church-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Parallel wurden 12µl der markierten Sonde in 25ml Church-Hybridisierungspuffer für

10 Minuten bei 100°C gekocht und anschließend auf die Membran gegeben. Die Sonde wurde über Nacht bei 65°C mit der Membran inkubiert.

Am Folgetag wurde die Membran mit Church-Waschpuffer erst für 10 Minuten bei 65°C und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Ein weiterer Waschschrift erfolgte für 5 Minuten in DIG1 mit 0,3% Tween. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen für den Detektionsantikörper auf der Membran in einem Beutel mit DIG2 für 30 Minuten blockiert. Der Digoxigenin-spezifische Antikörper (Roche DIG Luminescent Detection Kit, #11363514910) wurde 1:20.000 in DIG2 verdünnt und 30 Minuten mit der Membran inkubiert. Diese wurde dann zweimal für 20 Minuten mit DIG1 und 0,3% Tween gewaschen und 5 Minuten in DIG3 inkubiert. Nun wurde die Sonde mit dem im Kit enthaltenen CSPD detektiert.

2.2.1.3 Klonierung

2.2.1.3.1 Klassische Klonierung mit Restriktionsenzymen

Die gewünschte Sequenz wurde mit der Phusion-Polymerase amplifiziert (Tabelle 30). Das Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, daraus mit dem Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Stratec, Birkenfeld) aufgereinigt und in 30µl H₂O eluiert. Der Restriktionsverdau des PCR-Produkts und des Zielvektors erfolgte für 3 Stunden bei 37°C nachfolgendem Ansatz:

Tabelle 40: Restriktionsverdau eines PCR-Produkts

1µl	Restriktionsenzym 1
1µl	Restriktionsenzym 2
4µl	10x Puffer
4µl	Wasser
30µl	Aufgereinigtes PCR-Produkt

Tabelle 41: Restriktionsverdau eines Vektors

1µl	Restriktionsenzym 1
1µl	Restriktionsenzym 2
1µl	10x Puffer
2µg	Vektor
auf 10µl auffüllen	Wasser

Das verdaute PCR-Produkt wurde erneut mit dem Kit aufgereinigt. Der verdaute Vektor wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, die gewünschte Bande ausgeschnitten und aus dem Gel aufgereinigt.

Für die Ligation wurden 200µg verdauter Vektor eingesetzt und die optimale Menge des verdauten PCR-Produkts berechnet. Es wurden fünfmal so viele offene Insert-Enden wie Vektor-Enden eingesetzt, da dies laut „Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics“ von C. Mülhardt als optimal beschrieben wurde. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Länge des PCR-Produkts (in kb)} / \text{Länge des Vektors (in kb)} \times \text{ng Vektor} \times 5 = \text{ng PCR-Produkt für ein 1:5 Verhältnis}$$

Nun erfolgte die Ligation mit 1µl T4-Ligase und 4µl 5x Ligationspuffer (50% 10x T4-Ligasepuffer von Fermentas und 50% Polyethylenglykol) in 20µl Endvolumen. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und in *E. coli* Top10 mittels Hitzeschock transformiert (Kapitel 2.2.2.4).

2.2.1.3.2 Gateway-Klonierung

Das Gateway System basiert auf homologer Rekombination zur Erzeugung eines Vektors, sodass kein Restriktionsverdau und keine Ligation notwendig sind. Dies soll die Effektivität erhöhen. Zusätzlich können durch universelle Überhänge und ein breites Angebot an Gateway-Vektoren verschiedene Sequenzen mit derselben Strategie inkloniert werden ohne beispielsweise Rücksicht auf Restriktionsschnittstellen nehmen zu müssen. Die gewünschte Sequenz wird zuerst in den Vektor pDONR gebracht, von dem aus die Sequenz über homologe Rekombination in zahlreiche Vektoren übertragen werden kann. Die Gateway-Klonierung erfolgte nach dem Protokoll und mit den Klonasen von Invitrogen (Paisley, GB).

Mit dieser Methode wurde die *ATP6V0A2*-cDNA Sequenz in den Vektor pLXIN kloniert und folgende Vektoren erzeugt:

Tabelle 42: Plasmide Gateway-Klonierung

Plasmidname	Beschreibung
BF0112	pDONR201 + <i>ATP6V0A2</i> N-Terminus (Aminosäure 1-395) cDNA
BF0121	pDONR201 + <i>ATP6V0A2</i> cDNA
BF0122	pLXIN + <i>ATP6V0A2</i> cDNA
BF0123	pLXIN + <i>ATP6V0A2</i> N-Terminus (Aminosäure 1-395) cDNA
BF0132	pDONR201 + <i>ATP6V0A2</i> cDNA mit R755Q Mutation
BF0133 (kloniert von Anne Hoffmann)	pLXIN + <i>ATP6V0A2</i> cDNA mit R755Q Mutation

Die *ATP6V0A2*-cDNA Sequenz wurde aus einem Vektor von Thatjana Gardeitchik (St. Radboudg Universität, Nijmegen, NLD) mit Primern amplifiziert, die spezifisch für die cDNA Sequenz sind und bestimmte Überhänge (attB) besitzen (Tabelle 25). Hierzu wurde die Phusion Polymerase (Finnzymes, Espoo, FIN) verwendet (Kapitel 2.2.1.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)). Anschließend wurde das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit dem Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Stratec, Birkenfeld) aufgereinigt. Danach wurde mit diesem DNA-Fragment eine weitere PCR mit Phusion Polymerase und den Gateway-attB-Adapter-Primern durchgeführt, die an die Überhänge binden. So wurden homologe Regionen geschaffen, die sich auch im Vektor pDONR befinden (attP).

Es wurden 100fmol PCR-Produkt, 100fmol pDONR und 2µl BP-Klonase 2 zusammengegeben und der Mix auf 10µl mit Wasser aufgefüllt. Dieser wurde dann für 3,5 Stunden bei 25°C inkubiert, sodass die homologe Rekombination erfolgte. Anschließend wurde die Klonase mit 1µl Proteinase K für 10 Minuten bei 37°C abgebaut und der Mix dann in *E. coli* Top 10 transformiert (Kapitel 2.2.2.4). Der pDONR und auch der pLXIN Vektor enthalten das *ccdB* Gen, welches eine Selektion der Bakterien auf diejenigen ermöglicht, bei denen die Rekombination stattgefunden hat. Bakterien ohne rekombinierten Vektor sterben ab.

Der rekombinierte Vektor wurde aus den Bakterien isoliert und als „Entry clone“ bezeichnet, der nun attL-Sequenzen enthält. Diese können mit den attR-Regionen des Zielvektors, in diesem Fall pLXIN, rekombinieren. Hierfür wurden 300ng des Vektors BF0121 mit 300ng pLXIN und 2,5µl LR-Klonase 2 vermischt und das Volumen mit Wasser auf 10µl aufgefüllt. Die Rekombination erfolgte bei 25°C für 4 Stunden. Die Klonase wurde mit 2µl Proteinase K abgebaut und dann der Mix in *E. coli* Top10 transformiert (Kapitel 2.2.2.4). Nun wurde das fertige Konstrukt aus den Bakterien isoliert und weiterverwendet.

Um ein Konstrukt zu erhalten, das nur den N-Terminus der *ATP6V0A2* cDNA enthält (BF0112), wurde der Rückwärtsprimer hATP6V0A2_GateR_Nterm verwendet. Um einen Entry-Vektor mit der R755Q Mutation zu erhalten (BF0132), wurde der Phusion High-Fidelity PCR Master Mix von New England BioLabs verwendet und 50ng vom Vektor BF0122 mit den Primern ATP6V0A2_R755Q_muta_F und ATP6V0A2_R755Q_muta_R mit dem Temperaturprogramm „Quickchange“ amplifiziert (Tabelle 43). Der Vektor BF0122, der als Vorlage genutzt wurde, wurde

mit 1µl DpnI für eine Stunde bei 37°C verdaut und der neu erzeugte Vektor in *E. coli* Top10 transformiert.

Tabelle 43: Temperaturprogramm Quickchange

Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Wiederholungen
98	1:00	
98	0:20	
60	1:00	x20
72	4:00	
72	10:00	
4	∞	

2.2.1.3.3 Erzeugung des Zielvektors des Knock-out Modells

Die Sequenz des murinen *Atp6v0a2* Gens sollte so modifiziert werden, dass sich das Gen abschalten lässt. Hierfür müssen loxP Sequenzen eingefügt werden, die dann durch das Cre-Enzym erkannt und geschnitten werden. Zusätzlich müssen verschiedene Selektionsmarker auf dem Vektor vorhanden sein. Die Erzeugung des Zielvektors erfolgte größtenteils mittels *Recombineering* (*recombination-mediated genetic engineering*), einer Methode, bei der mehrfache Rekombination in Bakterien genutzt wird um einen großen Vektor zu erzeugen¹³⁶. Dies umgeht Probleme, die häufig auftreten, wenn große Fragmente mittels PCR amplifiziert und anschließend ligiert werden müssten.

Erzeugung des Genomischen Subklons

Um eine homologe Rekombination des Zielvektors mit der DNA in Mausstammzellen möglich zu machen, sind lange homologe Regionen nötig. Daher wurde als erstes die gesamte Region des *Atp6v0a2* Gens zwischen Intron 9 und Intron 20 (NCBI38: Chr.5 124,711,748-124,723,441) aus dem Bacmid BMQ-337012 (Sanger resources) in den Vektor pDTA übertragen. Dieser trägt das Diphtheria-Toxin, sodass diejenigen Maus-ES-Zellen absterben, in denen zwar der Zielvektor enthalten ist, aber keine Rekombination mit der *Atp6v0a2* DNA stattgefunden hat.

Zuerst wurden über klassische Klonierung mittels Restriktionsenzymen (Kapitel 2.2.1.3.1) ein kleiner Bereich des Intron 9 (Abbildung 7, Abschnitt A) und des Intron 20 (Abbildung 7, Abschnitt B) in den Vektor pDTA ligiert. Dazu wurden diese Bereiche aus DNA von murinen ES-Zellen per PCR amplifiziert, mit Restriktionsenzymen

verdaut und in den verdauten pDTA ligiert. Dieser Vektor wurde als pDTA-A-B bezeichnet.

Anschließend wurden *E. coli* DY380 Bakterien verwendet, die elektrokompent gemacht und mit dem Bacmid BMQ-337O12 elektroporiert wurden (Kapitel 2.2.2.2). Dieses Bacmid enthält die Sequenz des *Atp6v0a2*-Gens ab Intron 9 und nachfolgende Gene (NCBI38/mm10: Chr5 124,711,778 - 124,802,854). Nach erfolgreicher Selektion mit Chloramphenicol und Tetracyclin wurden die transformierten Zellen bei 42°C inkubiert um eine Expression der Rekombinationsgene zu ermöglichen (Kapitel 2.2.2.3). Anschließend wurden sie erneut elektrokompent gemacht. Parallel wurde der pDTA-A-B Vektor mit HindIII linearisiert und anschließend in die Bakterien elektroporiert. Nach einer 3 stündigen Inkubation bei 32°C, während der die Rekombination erfolgte, wurden die Bakterien auf Platten mit Tetracyclin und Ampicillin angezogen um auf diejenigen zu selektieren, die die *Atp6v0a2* Sequenz im Vektor pDTA enthalten. Dies wird als Genomischer Subklon bezeichnet.

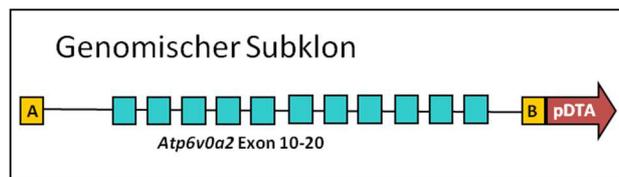


Abbildung 7: Genomischer Subklon

Der Genomische Subklon enthält die Region von Exon 10 bis 20 des *Atp6v0a2* Gens im Vektor pDTA.

Einführung der ersten loxP Sequenz

Um das Gen ausschalten zu können, mussten loxP Sequenzen eingefügt werden. Diese wurden aus dem Vektor pHW025 durch Rekombination eingefügt. In einem ersten Schritt wurden hierfür zwei kurze Sequenz aus dem Intron 14 (Abbildung 8, Abschnitt C und D) in den Vektor pHW025 durch klassische Klonierung eingefügt. Sie flankierten somit einen Bereich aus loxP Sequenz, FRT-Sequenz, Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette, FRT-Sequenz und loxP Sequenz. Nun wurde dieser Teil des Vektors durch SalI und SacI ausgeschnitten und in die DY380 Bakterien mit dem Genomischen Subklon transformiert, in denen vorher die Rekombinationsgene aktiviert wurden. Durch Selektion mit Kanamycin und Tetracyclin wurden diejenigen DY380 Bakterien ermittelt, in denen eine Rekombination stattgefunden hatte.

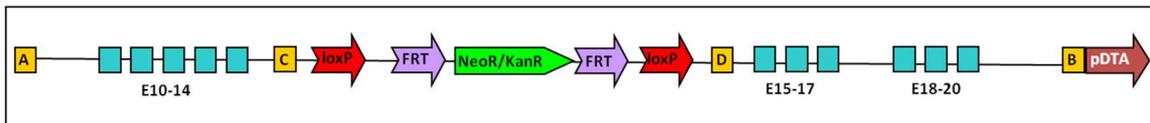


Abbildung 8: Erster Schritt zur Einföhrung der ersten loxP Sequenz in den Genomischen Subklon

Nur eine der eingeföhrten loxP Sequenzen sollte im Intron 14 enthalten bleiben. Daher sollten die anderen eingeföhrten Regionen mittels Cre wieder entfernt werden. Hierfür wurde der Vektor aus den Bakterien isoliert und in *E. coli* EL350 über Elektroporation transformiert. Diese Bakterien exprimieren induzierbar durch Arabinose das Cre-Enzym. Hierfür wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 32°C angezogen. Nun wurde 0,1% L(+)Arabinose (Sigma-Aldrich) dazu gegeben und die Kultur für eine Stunde bei 32°C geschüttelt. Anschließend wurde eine kleine Menge der Kultur auf Ampicillin-Agar ausplattiert. Somit enthielt der entstandene Vektor nun eine loxP Sequenz im Intron 14 der *Atp6v0a2*-Sequenz (Abbildung 9). Die entsprechenden Klone konnten durch eine fehlende Kanamycinresistenz identifiziert werden.

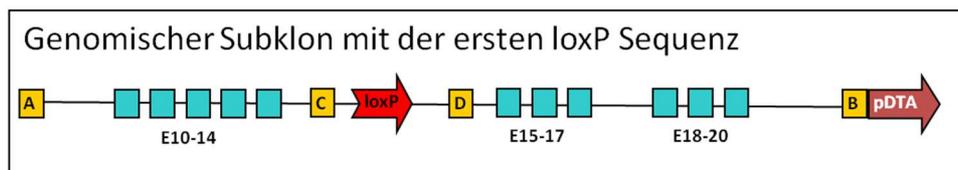


Abbildung 9: Der Genomische Subklon enthält nun die erste loxP Sequenz

Einföhrung der Neomycinkassette und der zweiten loxP Sequenz

Zusätzlich zu der zweiten loxP Sequenz sollte der Zielvektor auch eine Neomycinresistenz erhalten. Diese ermöglicht die Selektion auf diejenigen ES-Zellen, die durch homologe Rekombination die veränderte *Atp6v0a2* Sequenz aufgenommen haben. Dies sollte auch durch *Recombineering* erfolgen, scheiterte jedoch mehrfach. Daher wurde dieser Abschnitt klassisch einkloniert. Hierfür wurde der genomische Subklon mit der ersten loxP Sequenz aus den Bakterien aufgereinigt und mit EcoRV, welches im Intron 17 schneidet, verdaut. Der Vektor pHW025 wurde mit EcoRI und AleI verdaut und das Fragment aufgereinigt, welches die FRT Sequenz, die Neomycinkassette, die FRT Sequenz und die loxP Sequenz enthält. Die Überhänge der Restriktion wurden mit dem Quick Blunting Kit (New England BioLabs) nach Herstellerprotokoll aufgefüllt. Nun konnte das Fragment in den Genomischen Subklon

mit der ersten loxP-Sequenz ligiert werden. Der Zielvektor für das Knock-out Konstrukt war somit vollständig (Abbildung 19).

2.2.1.3.4 Erzeugung des Zielvektors für das Knock-in Konstrukt (R755Q)

Das Knock-in Mausmodell sollte im Exon 18 des *Atp6v0a2*-Gens an Aminosäureposition 755 anstatt des Arginins ein Glutamin tragen. Für die Erzeugung des Zielvektors wurde der Zielvektor für das Knock-out Modell verwendet, denn er verfügt bereits über die homologen Regionen und die nötigen Selektionsmarker. Die loxP Sequenzen stören nicht und könnten verwendet werden um bei Knock-in Mäusen zum Beispiel zusätzlich einen gewebespezifischen Knock-out zu erzeugen.

Der Zielvektor des Knock-out Modells wurde in der Neomycin-Resistenzkassette mit RsrII und im Intron 18 mit NdeI geschnitten. Das große Stück des Vektors wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt. Parallel wurde auf dem Knock-out Zielvektor eine Überlappungs-PCR dieses Abschnitts mit Primern durchgeführt, die die Sequenz des Codons 755 von AGG zu CAG verändert (Abbildung 10). Das mutierte PCR Produkt wurde mit RsrII und NdeI verdaut, aufgereinigt, mithilfe von ATP und der T4 Polynukleotid-Kinase phosphoryliert und in den geschnittenen Vektor ligiert. Dies ergab den Zielvektor für das Knock-in Mausmodell (Abbildung 10).

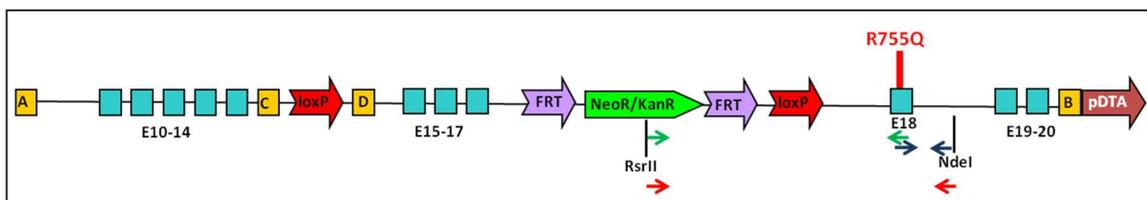


Abbildung 10: Erzeugung des Knock-in Zielvektors

Durch zwei PCRs wurden mutierte PCR Produkte erzeugt (grüne Primer und blaue Primer). Mit den äußeren Primern (rot) und den beiden PCR Produkten wurde dann in einer Überlappungs-PCR ein großes mutiertes PCR Produkt erzeugt, dass in den Zielvektor des Knock-out Modells inkloniert werden konnte.

Durch die Mutagenese wurde eine PstI-Schnittstelle geschaffen (Erkennungssequenz: CTGCAG). So kann die R755Q Mutation beispielsweise bei der Genotypisierung der Mäuse einfach nachgewiesen werden.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Erzeugung elektrokompenter Bakterien

Die *E. coli* DY380 wurden über Nacht bei 32°C und mit 12,5µg/ml Tetracyclin kultiviert. Das garantiert, dass das λ -Plasmid enthalten bleibt, das die Bakterien zur Rekombination befähigt. Die enthaltenen Gene werden jedoch bei 32°C nicht transkribiert. Nun wurde eine 50 ml Kultur angeimpft und bei 32°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Aliquotiert zu je 10ml wurden die Bakterien für 10 Minuten auf Eis inkubiert und bei 4.000rpm 10 Minuten bei 4°C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 1ml kaltem H₂O resuspendiert und bei 7.000rpm 30 Sekunden erneut pelletiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt um eine osmotische Kompetenz der Bakterien zu erzeugen. Das gewaschene Bakterienpellet wurde in 40µl Wasser resuspendiert und in der Regel sofort für die Elektroporation verwendet.

2.2.2.2 Elektroporation von Bakterien

Die unter 2.2.2.1 erzeugten elektrokompenten Bakterien wurden je Aliquot mit 0ng, 50ng, 100ng oder 200ng frisch präpariertem Bacmid oder Plasmid versetzt und in die Elektroporationsküvette gegeben. Das Gerät wurde auf folgende Parameter eingestellt: 1,8kV, 25µF, 200Ohm. Die Küvetten hatten einen Spalt von 1 mm. Bei einer erfolgreichen Elektroporation betrug die Zeitkonstante 4-5ms. Nach dem Puls wurden die Bakterien in 1 ml Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 32°C geschüttelt. Anschließend wurden sie auf Agarplatten mit geeigneten Selektionsantibiotika ausplattiert und über Nacht bei 32°C bebrütet.

2.2.2.3 Rekombination in Bakterien

Die verwendeten *E. coli* DY380 verfügen über einen defekten λ -Prophagen mit den Genen *exo*, *bet* und *gam*. Diese werden vom Repressor *cl857* kontrolliert, sodass eine Expression der Rekombinationsgene erst bei 42°C möglich ist. Hierfür wurden die Bakterien erst einmal bei 32°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Dann wurden sie in einem vorgewärmten Kolben bei 42°C für 12 Minuten geschüttelt. Nun konnten sie erneut kompetent gemacht und mit der zu rekombinierenden Sequenz elektroporiert werden.

Eine modifizierte Form der DY380 Bakterien bilden die *E. coli* EL350. In ihnen kann Arabinose-abhängig die Expression von *cre* aktiviert werden. Hierzu werden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 32°C angezogen. Anschließend werden die

Bakterien mit 0,1% L(+)-Arabinose (Sigma-Aldrich) für eine Stunde bei 32°C geschüttelt, sodass die Cre-vermittelte Rekombination stattfindet, und anschließend ausplattiert.

2.2.2.4 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

Der gesamte Ligationsansatz oder 200ng zu transformierendes Konstrukt wurden auf 75µl kompetente *E. coli* Top10 gegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C durchgeführt und 250µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM Glucose, pH=7) dazu gegeben. Nach 45 Minuten Schütteln bei 37°C wurden die transformierten Bakterien ausplattiert.

2.2.3 Kultivierung von Zellen

2.2.3.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Das Medium für immortalisierte humane Zelllinien besteht aus DMEM 4,5g/l D-Glucose mit 5% FCS, 1% Ultraglutamin und 1% Penicillin-Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. HeLa, A549 und HEK-Zellen (Phoenix-Zellen) wurden bis zu einer Konfluenz von 75% gehalten und dann umgesetzt. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA für 10 Minuten bei 37°C von der Wachstumsfläche gelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch die Zugabe von Medium abgestoppt, die Zellen mit einer Zählkammer gezählt und die gewünschte Zellzahl ausgesät.

2.2.3.1.1 *SiRNA-Transfektion*

Die Zellen wurden in einer Kulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät. Das Medium wurde morgens gegen 1 ml frisches Medium ausgetauscht und einen Mix aus 90µl Optimem, 2µl Interferin und 10µl 2µM siRNA-Oligo dazu gegeben. Nach 8 Stunden wurde dieser Vorgang wiederholt und die Zellen für 64 weitere Stunden mit dem Transfektionsmix inkubiert. Dann wurden sie für weitere Untersuchungen lysiert oder fixiert.

2.2.3.1.2 *Erzeugung stabiler Zelllinien mittels Retroviren*

Für die virale Überexpression der $\alpha 2$ Untereinheit wurde der Vektor BF0122 (Tabelle 42) verwendet. Dieser enthält die mit V5 (GKPIPPLLGLDST) markierte *ATP6V0A2* cDNA Sequenz im Vektor pLXIN. Dieser Vektor enthält Gene des Murinen

Leukämievirus (MoMuLV) und des Murinen Sarcomavirus (MoMuSV). Da es sich hierbei um Retroviren handelt, wurde das komplette Experiment im S2 Labor durchgeführt.

Zuerst wurden die Verpackungszellen Phoenix ampho mit dem Vektor BF0122 transfiziert. Hierfür wurden die Zellen auf einer 10 cm Schale bis zu einer Konfluenz von ca. 80% angezogen. Dann wurde zuerst 30µl JetPei mit 220µl Optimem gemischt und parallel 15µg des Vektors in einem Volumen von 250µl Optimem verdünnt. Beides wurde vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium auf den Zellen wurde gegen Medium ohne Penicillin-Streptomycin ausgetauscht, der Mix dazu gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen frisches mit Penicillin-Streptomycin ausgetauscht und die Zellen noch zwei weitere Tage mit diesem kultiviert. Dann wurde das Medium gesammelt, welches nun die Viruspartikel enthielt.

Der Virusüberstand wurde mit einem 0,45µm Filter von Zellen befreit und 1:5 in frischem Medium verdünnt. Bei langsam wachsenden Zielzellen wie Fibroblasten, für die ein hoher Virustiter benötigt wird, kann auch das Retro X Concentrator Kit (Clontech Laboratories, California, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet werden. Zu dem Virusüberstand wurde Polybren in einer Verdünnung von 1:1000 gegeben und auf HeLa-Zellen gegeben, die in einer Platte mit 6 Vertiefungen mit einer Konfluenz von ca. 80% wuchsen. Somit wurden die HeLa-Zellen mit dem Virus infiziert, der nun die *ATP6V0A2-V5* cDNA-Sequenz und eine Neomycin/G418-Resistenz in das Genom der HeLa-Zellen integrierte. Am nächsten Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt. Nach zwei Tagen wurden die HeLa-Zellen in eine kleine Flasche überführt und mit 0,6 mg/ml G418 selektiert. Nach ungefähr einer Woche waren fast alle nicht infizierten Zellen gestorben, sodass die Expression des Transgens nun analysiert werden konnte.

2.2.3.2 Erzeugung von Fütterzellen

Um embryonale Stammzellen kultivieren zu können, benötigt man Fütterzellen. Diese ermöglichen eine erleichterte Anheftung der embryonalen Stammzellen auf der Kulturfläche und verhindern so eine Anoikis der Stammzellen. Zusätzlich verhindern sie eine Differenzierung der Stammzellen¹³⁷. Die Fütterzellen sollten resistent gegenüber Geneticin (G418) sein und wurden daher aus heterozygoten *PYCR1*-transgenen oder *DR4*-transgenen Mäusen gewonnen, die eine entsprechende

Neomycinresistenz im Genom tragen. Hierfür wurden zuerst Kulturen von Fibroblasten aus Mausembryonen (MEF) angelegt. Dazu wurden p13,5 oder p14,5 Embryonen aus dem Uterus entnommen und der Kopf und die inneren Organe entfernt. Nach einem kurzen Waschschrift in 70% Alkohol wurden die Embryonen in PBS zerkleinert. Anschließend wurden sie in Trypsin für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, auf- und ab pipettiert und gevortext um die Zellen zu vereinzeln. Dieser Schritt wurde wiederholt bevor sie in Medium aufgenommen und in die Kulturflaschen gesät wurden. Die Kultivierung der MEFs und Fütterzellen erfolgte in einem Medium aus DMEM (4,5g/l Glucose, Lonza) mit 10% FCS (Biochrom), 1% Glutamin (200mM, Lonza) und 1% Penicillin-Streptomycin (Lonza).

Die MEFs wurden noch einige Male auf mehrere Flaschen verteilt, nachdem sie Konfluenz erreicht hatten. Anschließend wurde ihr Zellzyklus mit 0,01mg/ml Mitomycin C (Sigma-Aldrich) für drei Stunden bei 37°C gestoppt um sie teilungsinaktiv und somit zu Fütterzellen zu machen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Aliquots eingefroren.

2.2.3.3 Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus

Um die Anheftung der embryonalen Stammzellen auf der Kulturfläche zu verbessern, wurden die Flaschen oder Wells für einige Minuten mit 0,1% Gelatine inkubiert. Anschließend wurden Fütterzellen ausgesät, sodass diese am nächsten Tag konfluent die gesamte Wachstumsfläche bedeckten. Die Fütterzellen sind notwendig um eine Anoikis oder Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu verhindern.

Zur Kultivierung wurde ein Medium aus Knockout-DMEM (GIBCO) mit 15% FCS (2602-P282905, PAN Biotech), 1% Glutamin (Lonza), 1% Penicillin-Streptomycin (Lonza), 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (GIBCO), 1% 10mM β -Mercaptoethanol (Sigma) und 1% Nukleoside (Chemicon) verwendet. Dieses wurde gefroren gelagert und nach dem Auftauen 0,1% frisches LIF (Chemicon) zugefügt, welches die Differenzierung der Zellen verhindert.

Die Zellen wurden bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert.

Das Medium wurde täglich gewechselt und mindestens 2 Stunden vor jedem Splitten ausgetauscht. Damit die Kolonien nicht zu groß wurden, wurden die Zellen alle 2-3

Tage gesplittet, wobei die Zellen trypsinisiert (37°C, max. 7 Minuten) und immer gut vereinzelt wurden.

2.2.3.2.1 Einfrieren von ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden trypsinisiert, vereinzelt, pelletiert (wenn in Röhrcchen eingefroren werden sollte) und in ES-Zellmedium aufgenommen, dessen FCS-Anteil auf 20% erhöht wurde. Anschließend wurde dasselbe Volumen ES-Einfriermedium dazu gegeben. Dieses bestand aus Knockout-DMEM (GIBCO) mit 20% FCS (2602-P282905, PAN Biotech) und 20% DMSO (Sigma-Aldrich).

Die Röhrcchen wurden in eine Einfrierbox mit Isopropanol gestellt und bei -80°C eingefroren. Nach einer Lagerung von mindestens einer Nacht, wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Wenn die Zellen in der 98-Well-Platte eingefroren wurden, wurden diese mit Parafilm verschlossen und in einer Styroporbox, gefüllt mit Papiertüchern, bei -80°C eingefroren.

2.2.3.2.2 Elektroporation von ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden trypsinisiert, mit Medium abgestoppt, gezählt und eine Menge von $9 \cdot 10^6$ Zellen pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10ml PBS gewaschen und erneut pelletiert. Nun wurden sie in 0,8ml PBS resuspendiert und 30µg des linearisierten Zielvektors dazu pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde die Mischung in eine Elektroporationsküvette (BioRad) gegeben. Der Puls erfolgte bei 240V und 500µF. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und auf vier 6cm-Schalen mit Fütterzellen ausplattiert.

2.2.3.2.3 ES Zell Aggregation

Die Aggregation der Klone wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in der Abteilung Entwicklungsgenetik unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann in Absprache mit Dr. Lars Wittler durchgeführt. Spendermorulae wurden mit den modifizierten G4-ES-Zellklonen aggregiert und die entstehenden Blastozysten in Ammen implantiert¹³⁸. Es wurden jeweils 12 bis 25 Blastozysten in 3 bis 5 Ammen eingesetzt. Die Spendermäuse (CD1) hatten eine weiße Fellfarbe, sodass Jungtiere, die überwiegend weißes Fell besaßen auf diese Zellen zurückzuführen waren. Da die G4 ES-Zellen aus F1-Mäusen der Kreuzung 129S6/SvEv x C57BL/6N stammen, waren Chimäre, die zu einem Großteil aus den modifizierten embryonalen Stammzellen bestanden, hauptsächlich agouti-farben.

2.2.3.2.4 Vorbereitung von ES-Zellen für die Karyotypisierung

Die ES-Zellen wurden auf Fütterzellen angezogen bis die Kolonien eine gute Größe erreicht hatten. Dann wurden die Zellen mit 0,2µg/ml Colcemid im Medium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dies arretiert die Zellen in der Metaphase. Die Zellen wurden nun trypsiniert, mit Medium abgestoppt und pelletiert. Anschließend wurde das Medium bis auf 0,5ml abgesaugt und die Zellen darin gut resuspendiert. Nun wurde die Hypotone Lösung (75mM KCl) langsam dazu getropft bis ein Volumen von 10 ml erreicht war. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen erneut durchmischt und 3ml Fixativ (3 Teile Methanol + 1 Teil Essigsäure) an der Wand entlang in die Lösung getropft. Nach erneutem Pelletieren der Zellen wurde die Flüssigkeit bis auf 1,5ml abgesaugt und die Zellen gut resuspendiert. Dann wurden erneut 13ml Fixativ dazu gegeben, die Zellen für 30 Minuten bei -20°C gelagert und anschließend erneut pelletiert. Diese Fixierung wurde zweimal wiederholt.

Die Karyotypisierung erfolgte durch die Abteilung der Tumorzytogenetik (Labor Berlin) unter der Leitung von Seval Türkmen.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Um die Lokalisation bestimmter Proteine in Zellen detektieren zu können, wurden die Zellen auf Glasplättchen kultiviert. Dort wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C mit 4% PFA in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten mit 0,1% Saponin in 3% BSA in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Dann wurden die primären Antikörper in 3% BSA in PBS verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die sekundären Antikörper in 3% BSA in PBS verdünnt und mit den Zellen für eine Stunde inkubiert. Danach wurde 1µg/ml DAPI in PBS für 5 Minuten auf die Zellen gegeben und diese im Anschluss noch zweimal mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden nun mit Fluoromount-G auf einem Objektträger befestigt und mikroskopiert.

Für die Färbung mit Filipin wurde das Protokoll wie oben verwendet, aber anstatt DAPI 0,5mg/ml Filipin in PBS auf die Zellen gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen und Eindeckeln wurden die Objektträger bei 4°C gelagert.

2.2.4.2 Proteinextraktion

Proteinextraktion aus Zellen

Die Zellen wurden in PBS gewaschen und dann in RIPA-Puffer (150mM NaCl, 50mM Tris, 5mM EDTA, 1% TritonX-100, 0,25% Desoxycholat, 0,1% SDS) lysiert. Dabei wurden sie mit einem Zellschaber von der Wachstumsoberfläche abgelöst. Für Zellen in eine Vertiefung einer 6-Well Platte wurden 80µl RIPA-Puffer verwendet.

Proteinextraktion aus Gewebe

Die Gewebe wurden sofort nach der Präparation in RIPA-Puffer mit einem Homogenisator zerkleinert.

Sowohl die Lysate aus Zellen als auch die aus Gewebe wurden anschließend mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Die Gesamt-Proteinmenge im Lysat wurde dann mit dem Pierce BCA Protein Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

2.2.4.3 Western Blot

Von allen Lysaten wurden gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Gel geladen. Hierzu wurde das Mini-Protean 3 System von BioRad und folgende Lösungen verwendet:

Tabelle 44: Lösungen für Western Blot

10xTBS	1,37M NaCl; 27mM KCl; 250mM Tris (pH 7,4)
Blockierlösung (Milch)	5% Magermilch; 0,2% NP40 in 1xTBS
Laufpuffer	25mM Tris; 0,2M Glycin; 0,1% SDS
Precision Plus Protein All Blue Standards #161-0373	BioRad (Hercules, USA)
Probenpuffer	250mM Tris; 20% Glycerol; 10% SDS; 2% 2-Mercaptoethanol; 0,25% Bromphenolblau
Sammelgel-Puffer	0,5M Tris; 0,4% SDS (pH 6,8)
Transferpuffer	25mM Tris; 0,2M Glycin; 20% Methanol
Trenngel-Puffer	1,5M Tris; 0,4% SDS (pH 8,8)
Waschpuffer	0,1% NP40 in 1xTBS

Nachdem die SDS-Gele über die gewünschte Strecke gelaufen waren, wurden die Proteine mit dem PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter (peqlab, Wilmington, USA) bei 150mA pro Gel für 1,5 Stunden auf eine Nitrozellulosemembran (0,2µm, BioRad) transferiert. Auf dieser wurden die unspezifischen Antikörperbindungsstellen anschließend für eine Stunde mit 5% Magermilch blockiert. Der primäre Antikörper

wurde dann in Magermilch verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde am Folgetag dreimal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran wurden die Western Lightning Plus ECL Lösungen (PerkinElmer, Waltham, USA) gemischt, auf die Membran gegeben und die Proteine mit dem Chemi-Smart System von Vilber Lourmat (Collégien, FR) detektiert.

2.2.5 Histologische Methode

2.2.5.1 Paraffin-Einbettung

Die Gewebe wurden nach der Präparation in 4% PFA in 1xPBS überführt und dort über Nacht bei 4°C fixiert. Dann wurden die Gewebe zweimal mit 1xPBS gewaschen und für eine halbe Stunde in 50% Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe für mindestens eine Stunde in 70% Ethanol gelegt und in den TP 1020 (Leica, Wetzlar) überführt, welcher die Entwässerung automatisiert nach folgendem Ablauf (Tabelle 45) vollzieht:

Tabelle 45: Programm TP 1020 Gewebedehydratation

Zeit	Lösung
2 Stunden	90% Ethanol
2 Stunden	95% Ethanol
2 Stunden	100% Ethanol
2 Stunden	100% Ethanol
2 Stunden	100% Ethanol
15 Minuten	Ultraclear
15 Minuten	Ultraclear
30 Minuten	Ultraclear
3 Stunden	Ultraclear:Paraffin 1:1
3 Stunden	Paraffin

Für die Paraffin-Einbettung der Gewebe wurde die Einbettstation EC 350 (Microm, Walldorf) verwendet. Die zwischen den Hirnhälften halbierten Gehirne wurden mit der Schnittkannte nach unten in Paraffin eingebettet.

2.2.5.2 Paraffinschnitte

Für die Schnitte von Gehirn, Hoden-, Nebenhoden- und Hautproben wurde eine Klinge von Leica (114043597) verwendet. Die Schnitte hatten eine Dicke von 5µm und wurden

in einem Wasserbad bei 40°C gestreckt bevor sie auf Objektträger von Marienfeld übertragen wurden und auf diesen bei 47°C getrocknet wurden. Von jeder Region wurden ca. 20 Feinschnitte gemacht und auf Objektträger übertragen und dann nach ungefähr 10 Trimmschnitten zu je 10µm eine neue Gehirnregion untersucht.

2.2.5.3 Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung macht die sogenannten Nissl-Schollen, also das raue Endoplasmatische Retikulum von Neuronen und deren Kerne sichtbar und färbt somit hauptsächlich deren Zellkörper jedoch nicht die Axone. Für die Färbung wurden die Objektträger mit den Schnitten in Glasküvetten mit verschiedenen Lösungen inkubiert. Die getrockneten Schnitte wurden für zweimal 10 Minuten mit Xylol entparaffiniert und anschließend für zweimal 5 Minuten in Ethanol gegeben. Darauf folgte eine absteigende Ethanolreihe mit 2 Minuten 70% Ethanol, 2 Minuten 50% Ethanol und ca. 15 Minuten Aqua bidest. Die Färbung erfolgte dann für ungefähr 5 Minuten mit Kresylviolett (0,4% Kresylviolett acetat, #61123 von Fluka, Sigma-Aldrich). War die Intensität zufriedenstellend, wurden die Schnitte kurz in Aqua bidest gespült und zweimal kurz mit 96% Ethanol differenziert. Anschließend wurden die Schnitte mit zweimal 2 Minuten 100% Ethanol dehydriert und mit zweimal 5 Minuten Xylol für das Eindeckeln mit Entellan vorbereitet.

2.2.5.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient als Übersichtsfärbung für verschiedene Gewebe. Hämatoxylin bindet an basophile Strukturen wie die DNA und färbt somit vor allem den Zellkern und das raue endoplasmatische Retikulum (ER). Eosin färbt acidophile Strukturen wie Cytoplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte ER und extrazelluläre Proteine. Nach dem Entparaffinieren und der absteigenden Ethanolreihe (wie unter Punkt 2.2.5.3 beschrieben), wurden die Schnitte für 7 Minuten in 50% Hämatoxylin (1.09249.0500 von Merck) inkubiert. Nach dreimaligem Differenzieren in destilliertem Wasser und einer Lösung aus 70% Ethanol und 0,25% HCl wurden die Schnitte für ca. 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden sie für 2 Minuten in 0,2% Eosin mit etwas Essigsäure (2C140, Chroma/Waldeck) gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit 100% Ethanol entwässert und nach der Behandlung mit Xylol mit Entellan eingedeckelt.

2.2.6 Mikroskopie

Die Morphologie der Zellen während der Kultivierung wurde mit inversen Lichtmikroskopen von Zeiss überwacht.

Die Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen wurden mit einem Laser-Konfokal-Mikroskop von Zeiss dokumentiert. Dieses wird mit der Software „Zeiss LSM Image Browser“ gesteuert.

Gehirnschnitte der Mäuse wurden mit dem Mikroskop DM RB von Leica mit automatisiertem Tisch fotografiert und mit der Software „AxioVision Release 4.8.2“ analysiert.

2.2.7 Mikro-Computertomographie

Die Scans wurden mit dem SKYSCAN 1172 (Bruker, Billerica, USA) bei 80kV, 124 μ A und einem 0,5mm Alufilter durchgeführt. Die Schnittdicke betrug 5 μ m. Hierfür wurden die Knochen in 70% Ethanol in einem Revolver fixiert. Nach dem Scan wurden die Bilder mit dem Programm NRecon (SkyScan, Bruker) rekonstruiert.

Die Auswertung des trabekulären Knochens der Tibia wurde 60 Schnitte = 300 μ m über der Wachstumsfuge gestartet. Dazu wurde der trabekuläre Knochen in den folgenden 100 Schnitten = 500 μ m als interessante Region (*Region of interest* = ROI) markiert. Hierfür wurde das Programm CT Analyser (SkyScan, Bruker) genutzt. Die Analyse von nur 50 Schnitten = 300-550 μ m über der Wachstumsfuge ergab dasselbe Ergebnis. Nun wurden die ROIs in Bezug auf Knochenvolumen zu Totalvolumen (BV/TV), Trabekelgröße und Trabekelanzahl untersucht.

Um den kortikalen Knochen der Tibia zu beurteilen, wurde 360 Schnitte = 1800 μ m über der Wachstumsfuge mit der Auswertung gestartet. Hier wurde der Knochen als interessante Region (ROI) markiert und das Knochenvolumen in den nächsten 100 Schnitten = 500 μ m mit dem CT Analyser (SkyScan, Bruker) bestimmt.

Der 5. und 6. Lendenwirbel wurde untersucht indem der gesamte trabekuläre Teil des Knochenkörpers markiert wurde und das Knochenvolumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen (BV/TV) berechnet wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Molekulare Untersuchung der ATP6V0A2 Funktion

3.1.1 Die a2 Untereinheit befindet sich in HeLa-Zellen am Golgiapparat

Die Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle kann wichtige Hinweise auf dessen Funktion liefern. Daher sollte die Lokalisation der a2 Untereinheit in HeLa-Zellen untersucht werden. Diese humane Zelllinie kann leicht kultiviert und modifiziert werden. Unserer Arbeitsgruppe liegt bisher kein Antikörper vor, der spezifisch die a2 Untereinheit von den anderen Isoformen unterscheiden kann und für die Immunfluoreszenzfärbung geeignet ist. Daher sollte das Protein mit einem V5-tag markiert in HeLa-Zellen überexprimiert werden. Hierbei sollte eine moderate Überexpression erreicht werden, indem die humane cDNA Sequenz des *ATP6V0A2*-Gens mittels Retroviren in das Genom der HeLa-Zellen integriert wurde.

Die *ATP6V0A2*-Expression in der resultierenden stabilen Zelllinie wurde mittels qPCR überprüft. Hierzu wurde die RNA aus den Zellen isoliert und ein DNase Verdau durchgeführt um später nicht aus dem eingeführten Transgen zu amplifizieren. Dies ergab eine circa 18-fache Überexpression der a2 Untereinheit im Vergleich zu einer parallel erzeugten stabilen HeLa-Zelllinie mit einem anderen Transgen. Dies konnte durch Anne Hoffmann (AG Kornak) in weiteren Experimenten bestätigt werden, sodass von einer moderaten Überexpression auszugehen ist.

Die a2 Untereinheit war in den HeLa-Zellen in der Nähe des Zellkerns lokalisiert. Sehr schwach wurde das Protein auch im Cytoplasma detektiert, war dort aber sehr fein verteilt und schien nicht an Vesikeln zu liegen. Es lag keine Kolo-kalisation mit Endosomen oder Lysosomen vor (Abbildung 11A). Stattdessen schien sich die a2-Untereinheit im Golgiapparat zu befinden. Um die Lokalisation dort näher zu untersuchen, wurden verschiedene Golgi-Marker verwendet und die HeLa-Zellen mit Nocodazol behandelt (Abbildung 11B). Dieses führt zu einer Fragmentierung des Golgiapparates in sogenannte *Ministacks*, in denen die Lokalisation besser zu differenzieren ist. Dies ergab, dass die a2-Untereinheit im Trans-Golgiapparat zu finden ist und dort am besten mit dem Marker TGN46 kolo-kalisiert. Dort befindet sich auch das GORAB Protein, dessen Verlust ebenfalls eine Cutis laxa zur Folge hat.

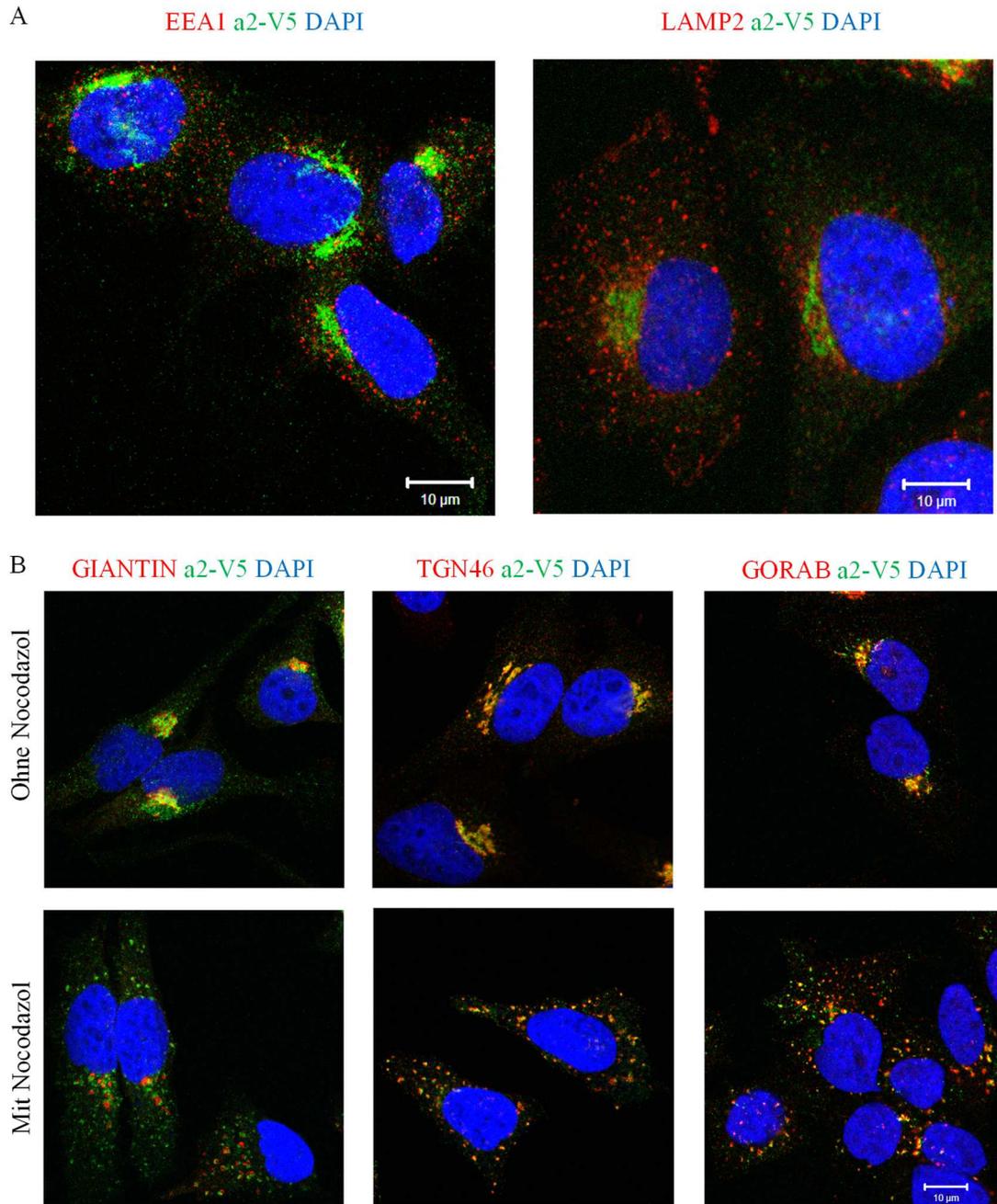


Abbildung 11: Die α 2-Untereinheit befindet sich in HeLa-Zellen im Trans-Golgiapparat
 Durch Expression der V5-markierten α 2-Untereinheit konnte ihre Lokalisation in HeLa-Zellen untersucht werden. A: Weder Endosomen (EEA1)¹³⁹ noch Lysosomen (LAMP2)¹⁴⁰ kolokalisieren mit der α 2-Untereinheit, da sich diese nicht an Vesikeln befindet. B: Die V5-markierte α 2-Untereinheit ist im Golgi lokalisiert. Die Kolokalisation mit dem cis-Golgiapparat (GIANTIN)¹⁴¹ ist nicht so stark wie mit dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN46)¹⁴². Auch GORAB befindet sich im Trans-Golgiapparat und kolokalisiert somit ebenfalls mit der α 2-Untereinheit. Eine starke Kolokalisation ist an der Überlagerung von grünem und rotem Signal und somit oranger Färbung zu erkennen. Da dies im intakten Golgiapparat schwer zu beurteilen ist, wurde der Golgiapparat durch Zugabe von 33 μ M Nocodazol für 3 Stunden fragmentiert.

3.1.2 *ATP6V0A2* Knock-down verändert die Zellorganellen

Die zellulären Auswirkungen eines $\alpha 2$ Verlusts können simuliert werden, indem man die Expression des Gens mit spezifischen siRNAs hemmt. Um unspezifische Nebeneffekte ausschließen zu können, wurden drei verschiedene siRNAs verwendet. Als Kontrolle diente ein Gemisch aus nicht zielgerichteten siRNAs. HeLa-Zellen wurden erneut als humane Modellzelllinie gewählt und 72 Stunden mit den siRNAs inkubiert.

3.1.2.1 Spezifische siRNAs verringern das *ATP6V0A2* mRNA- und Proteinlevel

Um zu prüfen, ob die verwendeten siRNAs die Expression des *ATP6V0A2*-Gens effektiv hemmen, wurden RNAs und Proteine isoliert und die Expression untersucht.

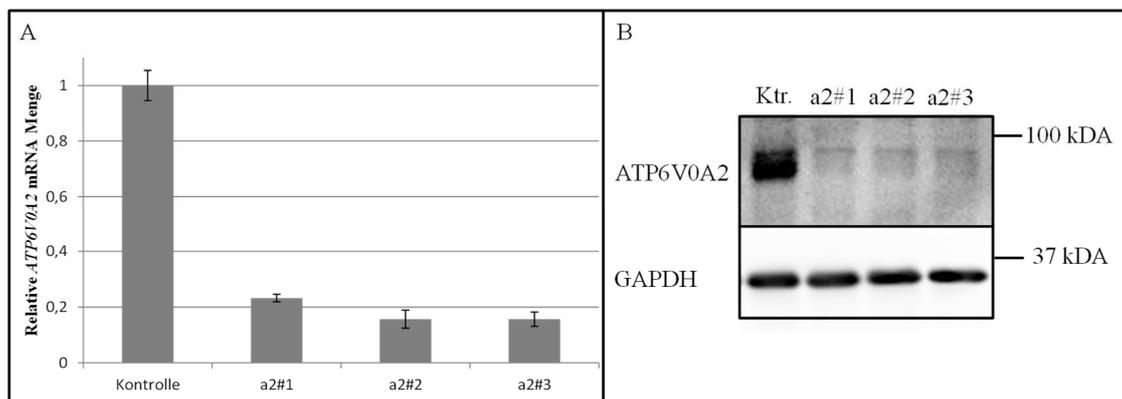


Abbildung 12: Spezifische siRNAs reduzieren das *ATP6V0A2* mRNA- und Proteinlevel

HeLa Zellen wurden für 72 Stunden mit drei verschiedenen siRNAs inkubiert, die spezifisch für die *ATP6V0A2* mRNA sind (a2 #1-3). Bei a2#3 handelt es sich um einen Pool aus 4 spezifischen siRNAs. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem Gemisch aus unspezifischen siRNAs behandelt wurden. A: Die behandelten Zellen wurden in TRIzol lysiert und RNA wurde extrahiert. Mittels qPCR wurde die Menge an *ATP6V0A2* mRNA im Verhältnis zur *GAPDH* mRNA als endogene Kontrolle bestimmt. Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten B: Die behandelten Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und mittels Western Blot das *ATP6V0A2* Protein detektiert. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Die verwendeten siRNAs reduzierten die *ATP6V0A2* mRNA auf 20% oder weniger (Abbildung 12A). Das Protein wurde nach dem Knock-down im Western Blot kaum noch detektiert (Abbildung 12B). Somit war der siRNA vermittelte *ATP6V0A2* Knock-down in HeLa-Zellen sehr effizient.

3.1.2.2 *ATP6V0A2* Knock-down beeinflusst die frühen Endosomen

Um Rückschlüsse auf die Funktion der $\alpha 2$ Untereinheit in HeLa-Zellen ziehen zu können, wurden diese nach dem *ATP6V0A2* Knock-down auf morphologische

Veränderungen untersucht. Da sich die $\alpha 2$ Untereinheit in HeLa-Zellen hauptsächlich im Golgiapparat befindet, wurde dieser nach dem siRNA vermittelten Knock-down mit verschiedenen Markern angefärbt. Hierbei zeigte sich eine Verminderung des Trans-Golgi-Netzwerk Proteins TGN46 (Abbildung 14). Andere Marker, die wie GM130 und GIANTIN im cis- oder medialen Golgiapparat lokalisiert sind^{141,143}, zeigten keine deutlichen Auffälligkeiten in der laboreigenen HeLa-Zelllinie. In HeLa-Zellen einer anderen Arbeitsgruppe war der Golgiapparat hingegen nach *ATP6V0A2* Knock-down mit denselben siRNAs massiv fragmentiert.

Nicht nur der Golgiapparat, sondern auch die Endosomen spielen eine zentrale Rolle im intrazellulären Transport. Sie enthalten die endozytierte Fracht und transportieren sie zu ihrem Bestimmungsort wie dem Golgiapparat oder den Lysosomen. Die frühen Endosomen können mit dem Marker EEA1 untersucht werden¹³⁹.

Die Analyse der *EEA1* mRNA ergab eine unterschiedlich starke Reduktion bei den verschiedenen *ATP6V0A2* siRNA Oligos (Abbildung 13A). Dies korrelierte mit einer Verminderung des Proteins nach 72 Stunden siRNA Behandlung (Abbildung 13B). Auch in A549 Zellen konnte diese Reduktion nach *ATP6V0A2* Knock-down nachgewiesen werden (Dimitrios Wagner, AG Kornak). Spezifisch für die HeLa-Zellen war eine starke Akkumulation der frühen Endosomen in der Nähe des Golgiapparates. Dieser zelluläre Phänotyp schien mit der beobachteten Reduktion des EEA1 Proteins zu korrelieren und unterschiedlich stark bei den verschiedenen Oligos ausgeprägt zu sein (Abbildung 13C).

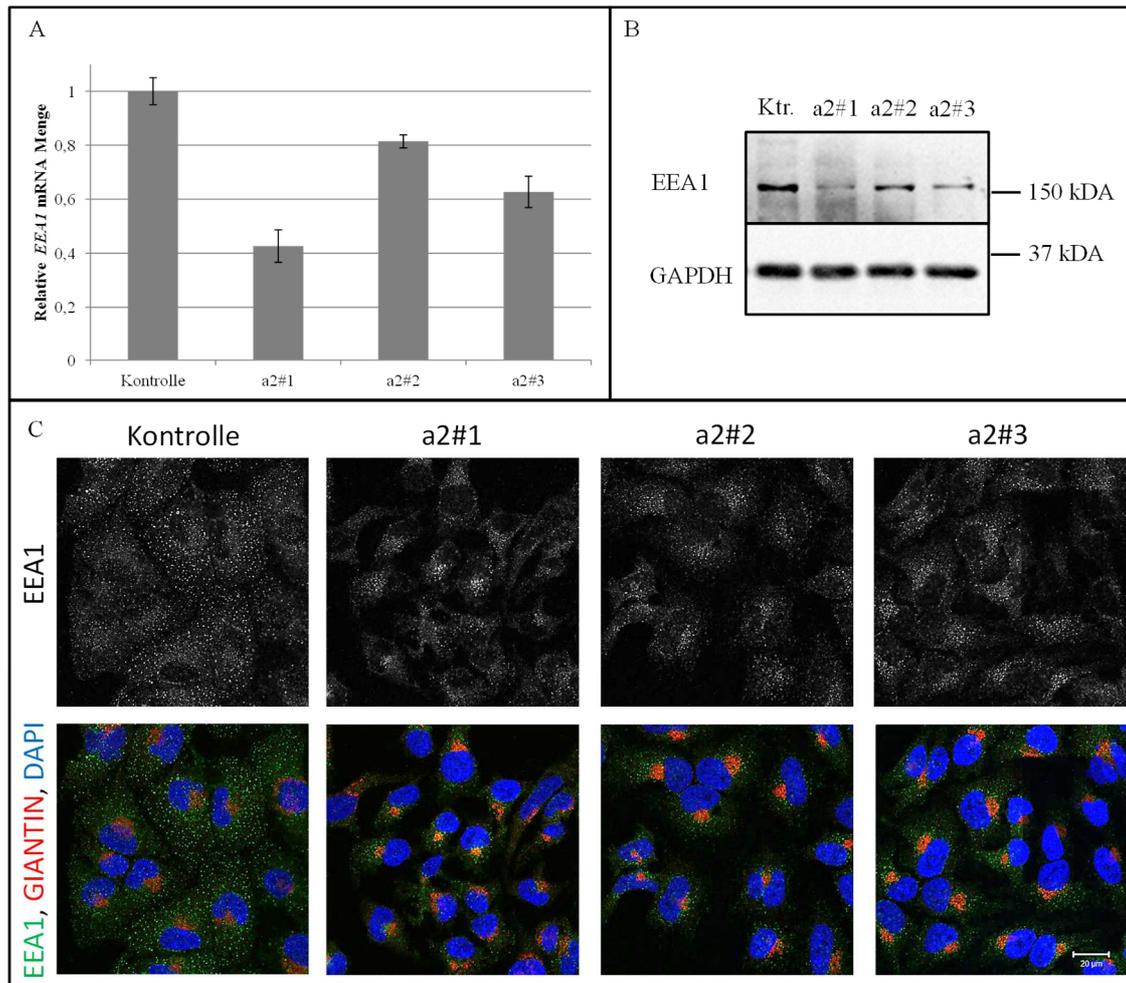


Abbildung 13: Veränderung der frühen Endosomen nach *ATP6V0A2* siRNA Knock-down
 HeLa-Zellen wurden mit drei verschiedenen *ATP6V0A2* siRNA Oligos (a2#1-3) für 72 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem Gemisch aus unspezifischen siRNAs behandelt wurden. A: Die *EEA1* mRNA wurde im Verhältnis zur *GAPDH* mRNA gemessen. Die verschiedenen siRNA Oligos reduzierten die *EEA1* mRNA unterschiedlich stark, wobei mit dem Oligo #1 eine Reduktion auf 40% beobachtet werden konnte. B: Auch die *EEA1* Proteinmenge war in Abhängigkeit vom verwendeten siRNA Oligo verringert. Als Ladekontrolle diente *GAPDH*. C: Der Knock-down der $\alpha 2$ Untereinheit führte in HeLa-Zellen zu einer Akkumulation der frühen Endosomen (*EEA1*) in der Nähe des Golgiapparates (*GIANTIN*). Dieser Phänotyp war beim Oligo #1 besonders stark ausgeprägt.

3.1.2.3 *ATP6V0A2* Knock-down führt zu einer Akkumulation von Lysosomen

Ein weiterer wichtiger Baustein des intrazellulären Transports sind die Lysosomen. Diese ermöglichen durch den Abbau von Fetten, Proteinen und Nukleinsäuren unter anderem die Freisetzung von Zellbausteinen.

Nach siRNA vermitteltem Knock-down von *ATP6V0A2* zeigte sich im Western Blot eine deutliche Zunahme des lysosomalen Proteins LAMP2 (Abbildung 14A). Zusätzlich zeigte die Bande eine geringere Masse an. Dies deutet auf eine veränderte Glykosylierung des Proteins durch das Fehlen der $\alpha 2$ -Untereinheit hin.

Während die Lysosomen in Kontroll-HeLa-Zellen relativ gleichmäßig verteilt sind, akkumulieren diese in den Knock-down Zellen in Kernnähe, in der Region des Trans-Golgi-Netzwerkes, welches durch TGN46 angefärbt werden kann (Abbildung 14B).

Die Veränderungen von LAMP2 waren bei allen siRNA Oligos gleich stark und konnten auch nach siRNA Knock-down in A549-Zellen bestätigt werden (Dimitrios Wagner, AG Kornak).

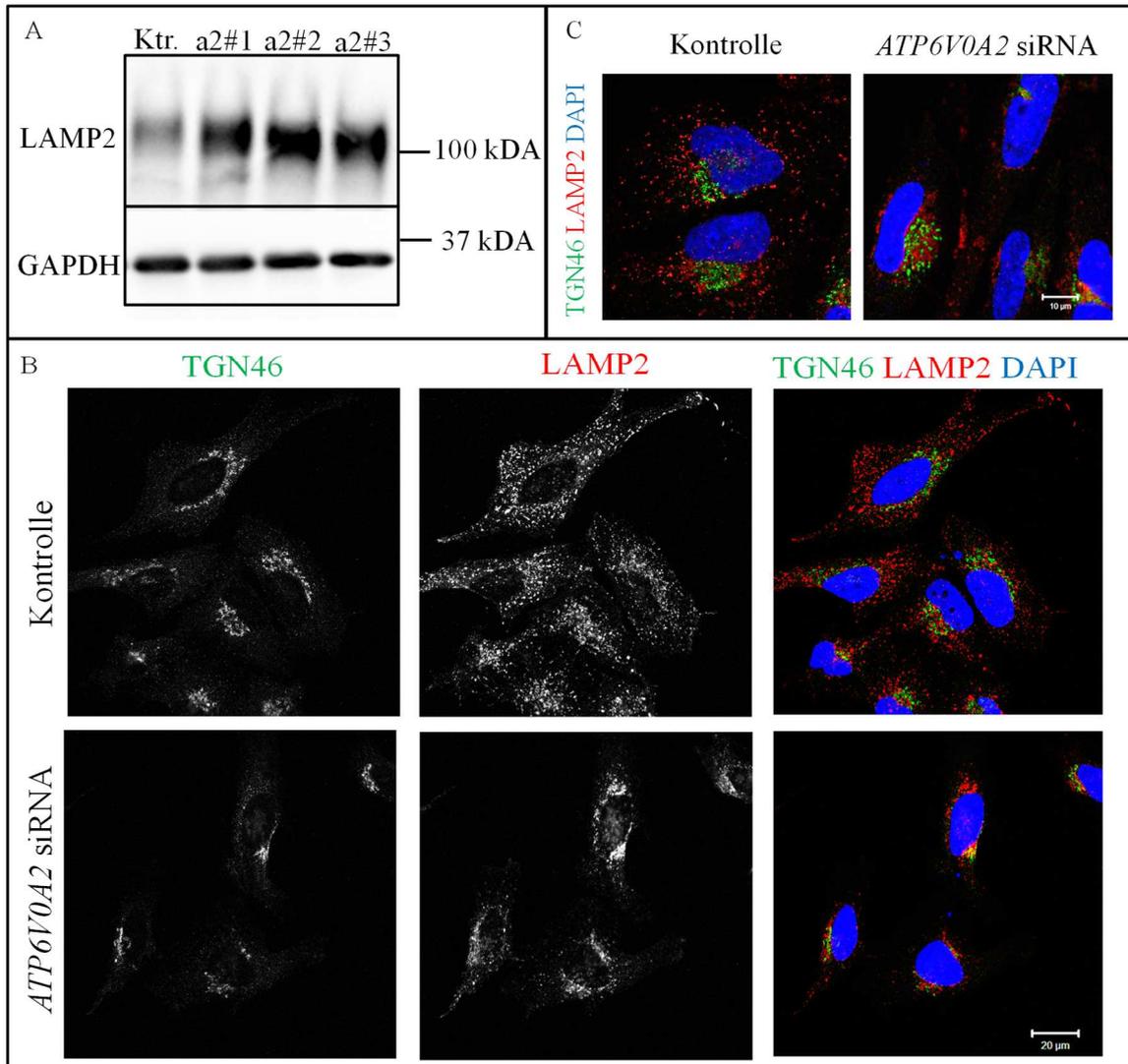


Abbildung 14: siRNA Knock-down der $\alpha 2$ Untereinheit führt zu LAMP2 Veränderungen

HeLa-Zellen wurden mit siRNA Oligos spezifisch für $ATP6V0A2$ (a2#1-3) für 72 Stunden behandelt. Als Kontrolle dienten nicht spezifische siRNAs. A: Das LAMP2 Protein wurde im Lysat detektiert. Die LAMP2 Menge ist nach dem $\alpha 2$ Knock-down deutlich erhöht. Zusätzlich hat das Glykoprotein eine geringere Masse. B und C: Die Lysosomen (LAMP2) sind im Bereich des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN46) akkumuliert.

3.1.2.4 *ATP6V0A2* Knock-down führt zur Akkumulation von Cholesterin

Die beobachtete Akkumulation von Endosomen und Lysosomen nach einem *ATP6V0A2* Knock-down ähnelt stark dem zellulären Phänotyp des Niemann-Pick Syndroms Typ C. Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung, bei der Cholesterin die Lysosomen nicht verlassen kann¹²⁰. Daher wurde Cholesterin in den Knock-down Zellen mittels Filipin angefärbt und dessen Verteilung innerhalb der Zelle untersucht (Abbildung 15).

In den Kontrollzellen ist Cholesterin an der Plasmamembran zu finden und liegt im Golgiapparat und den Lysosomen vor. Das Abschalten der $\alpha 2$ Untereinheit hatte eine massive Akkumulation von Cholesterin in Golginähe zur Folge, sodass es in dem Bereich gehäuft vorlag, in dem sich auch die Endosomen und Lysosomen sammeln.

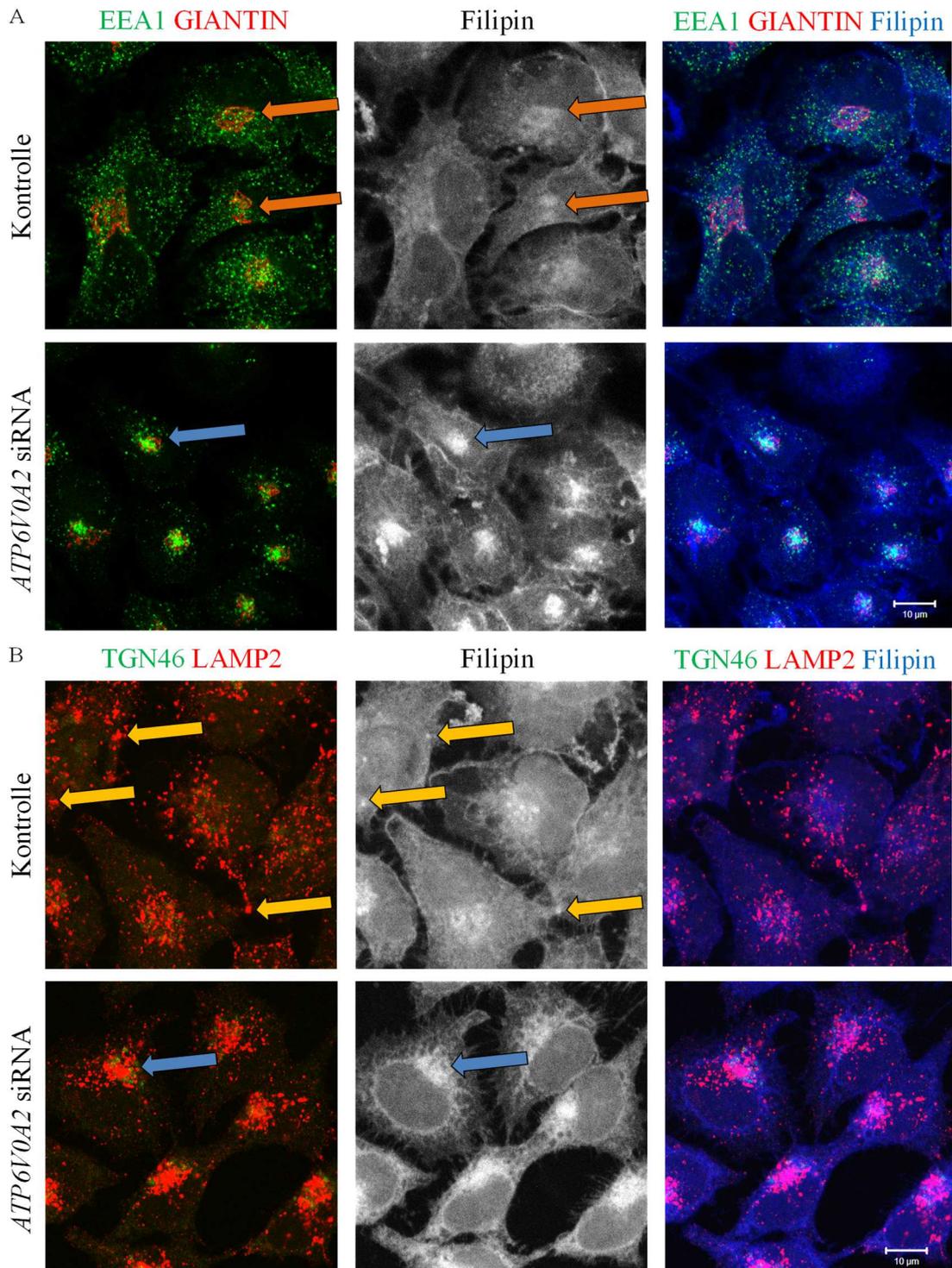


Abbildung 15: Cholesterinakkumulation nach siRNA vermitteltem *ATP6V0A2* Knock-Down

Nach siRNA vermitteltem Knock-down von *ATP6V0A2* wurden verschiedene Zellkompartimente angefärbt und die Cholesterinverteilung mittels Filipin untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit nicht spezifischen siRNAs behandelt wurden. A: orange Pfeile: In den Kontrollzellen befindet sich das Cholesterin angereichert im Golgiapparat (GIANTIN). Nach dem Knock-down ist die Intensität in dieser Region deutlich erhöht, wobei dort auch die frühen Endosomen (EEA1) akkumulieren (blaue Pfeile). B: In Kontrollzellen befindet sich Cholesterin auch in den Lysosomen (LAMP2) (gelbe Pfeile). Diese sind durch den Knock-down in der Nähe des Golgiapparates (TGN46) akkumuliert, sodass es dort zu einem stark erhöhten Cholesteringehalt kommt.

3.1.3 Einfluss des intravesikulären pHs auf die Zellorganellen

Durch den siRNA vermittelten Knock-down der $\alpha 2$ Untereinheit in HeLa-Zellen kommt es zu einer Akkumulation von Cholesterin, den frühen Endosomen und den Lysosomen. Um festzustellen, ob dieser zelluläre Phänotyp durch Veränderungen im pH-Wert ausgelöst wird, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Reagenzien behandelt. Bafilomycin A1 hemmt V-Typ-ATPasen, sodass diese den pH-Wert in den Zellorganellen nicht regulieren können¹⁴⁴. Chloroquin dringt in saure Zellkompartimente wie Endosomen und Lysosomen ein, wird dort protoniert und kann die Vesikel nicht mehr verlassen. Dadurch erhöht es dort den pH-Wert¹⁴⁵.

200mM Bafilomycin A1 oder 50 μ M Chloroquin wurden in das Medium der HeLa-Zellen gegeben und diese nach 24 Stunden untersucht. Da das Bafilomycin A1 in DMSO gelöst war, wurden die Kontrollzellen mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt.

Die frühen Endosomen waren nach Bafilomycin A1 und Chloroquingabe deutlich akkumuliert und ähnelten dem *ATP6V0A2* siRNA Knock-down mit dem Oligo $\alpha 2\#1$ (Abbildung 16).

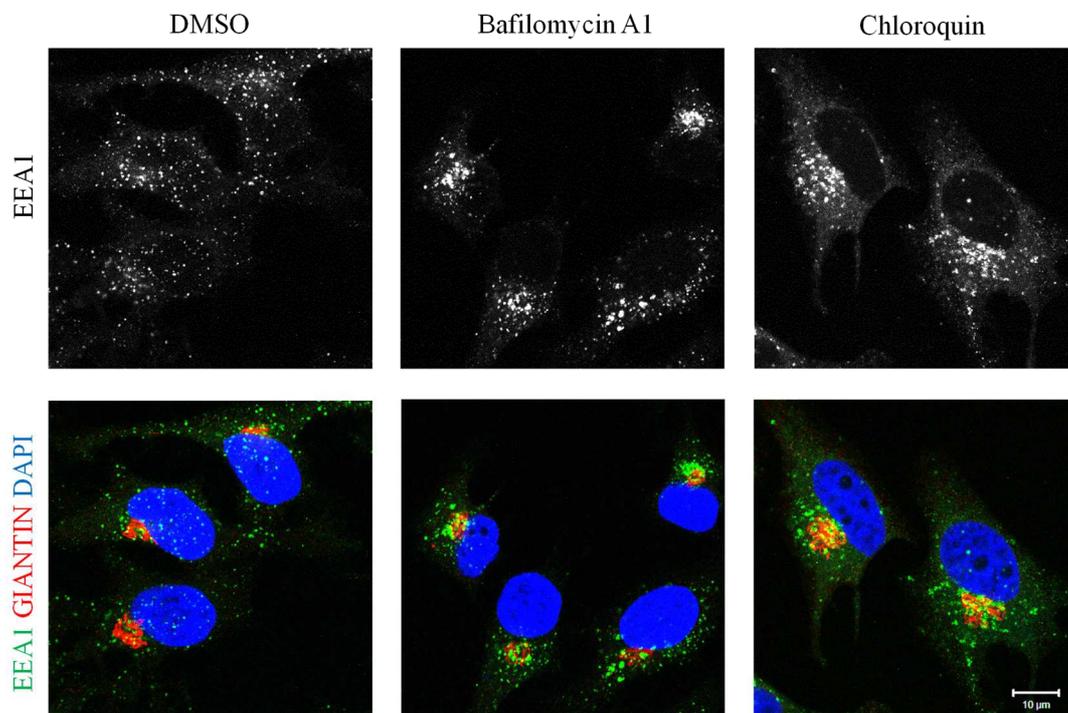


Abbildung 16: Akkumulation der Endosomen durch Bafilomycin A1 oder Chloroquin
Durch die Behandlung von HeLa-Zellen mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin akkumulieren die frühen Endosomen (EEA1) in der Nähe des Golgiapparates (GIANTIN).

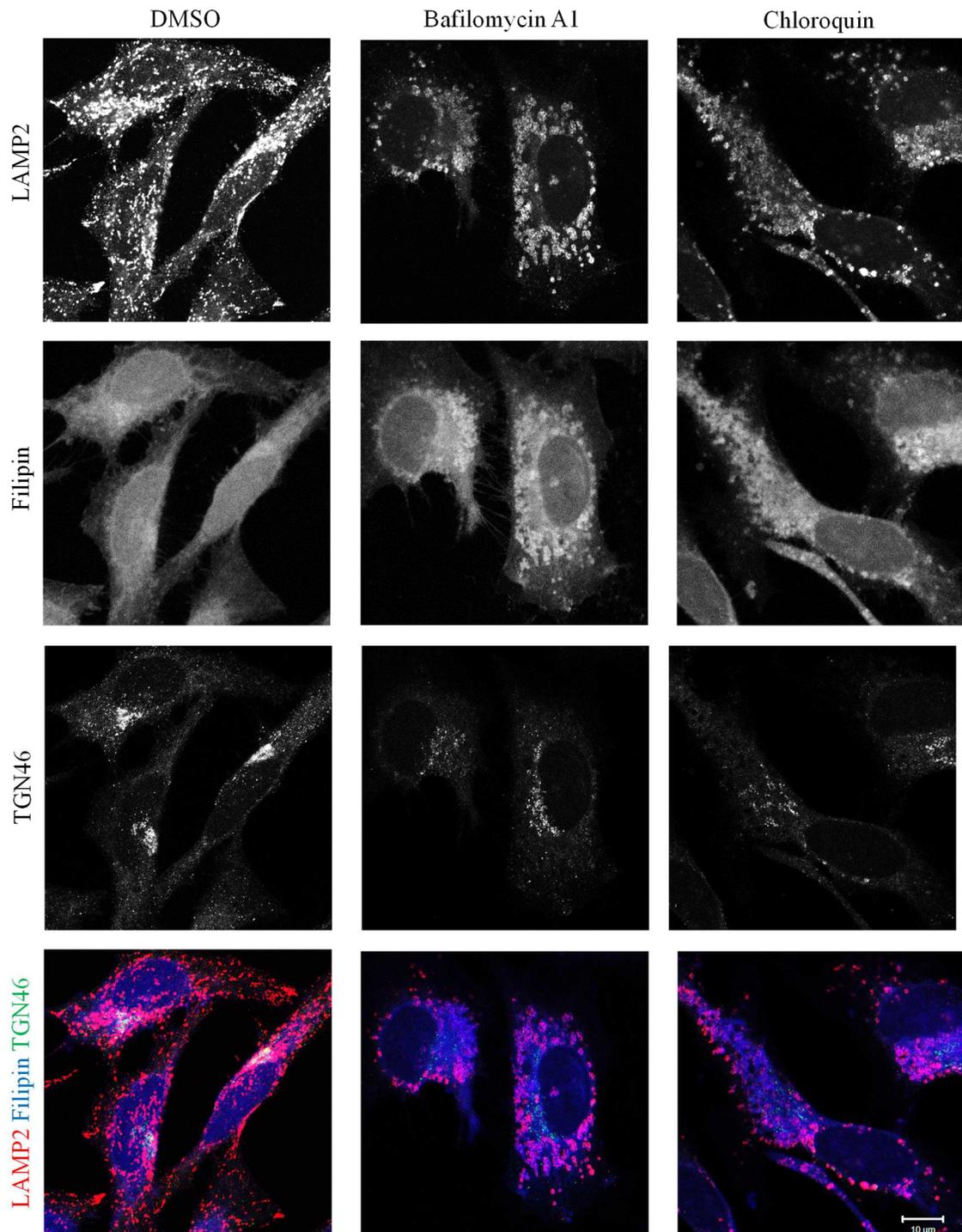


Abbildung 17: Akkumulation der Lysosomen nach Behandlung mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin
 Die Behandlung von HeLa-Zellen mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin hatte eine Akkumulation von cholesteringefüllten Lysosomen (Filipin, LAMP2) in Kernnähe zur Folge. Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN46) befindet sich ebenfalls in dieser Region und war durch die Behandlung stark fragmentiert.

Die Lysosomen wurden sowohl durch Bafilomycin A1 als auch Chloroquin akkumuliert und die LAMP2-positiven Vesikel schienen deutlich vergrößert zu sein. Eine Färbung mit Filipin zeigte, dass diese Vesikel sehr viel Cholesterin enthielten (Abbildung 17).

Auch eine Beeinträchtigung des Trans-Golgi-Netzwerks trat nach Behandlung mit beiden Reagenzien auf (Abbildung 17) und kopierte somit ebenfalls den zellulären Phänotyp nach *ATP6V0A2* Knock-down.

Somit simulierten Bafilomycin A1 und Chloroquin den zellulären Phänotyp, der durch den Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit auftritt. Die Effekte waren jedoch noch ausgeprägter, da diese Reagenzien eine stärkere pH-Wertveränderung in zahlreichen intrazellulären Kompartimenten verursachen.

3.2 Analyse der *Atp6v0a2* Expression in Mäusen

Die Erforschung des Pathomechanismus der *ATP6V0A2* abhängigen Cutis laxa sollte mittels verschiedener Mausmodelle erfolgen, die entweder einen kompletten Verlust des *Atp6v0a2* Proteins oder eine mutierte Form des Proteins aufweisen. Um einschätzen zu können, in welchen Geweben und Entwicklungsstadien ein Phänotyp in diesen Modellen zu erwarten ist, wurde untersucht, wie die *Atp6v0a2* mRNA in Wildtypmäusen exprimiert wird.

Hierfür wurde eine laboreigene Bibliothek aus Maus-C57BL/6-cDNAs verwendet. Die Gewebe von je 3 Mäusen eines bestimmten Alters wurden hierfür gemischt, RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qPCR wurde dann die relative Menge der *Atp6v0a2* mRNA und der endogenen Kontrollen *Gapdh* und *Aktin* bestimmt. Es wurden jeweils Gewebe von Mäusen im Alter von 17 Tagen nach der Befruchtung, dem Tag der Geburt oder 5 Monaten verwendet.

Eine Normalisierung der *Atp6v0a2* mRNA auf die beiden Kontrollen *Gapdh* und *Aktin* ergab eine relativ gleichmäßige Expression der *Atp6v0a2* mRNA in allen untersuchten Organen zu den gemessenen Zeitpunkten, die höchstens um das 5,6-fache variierte (Abbildung 18).

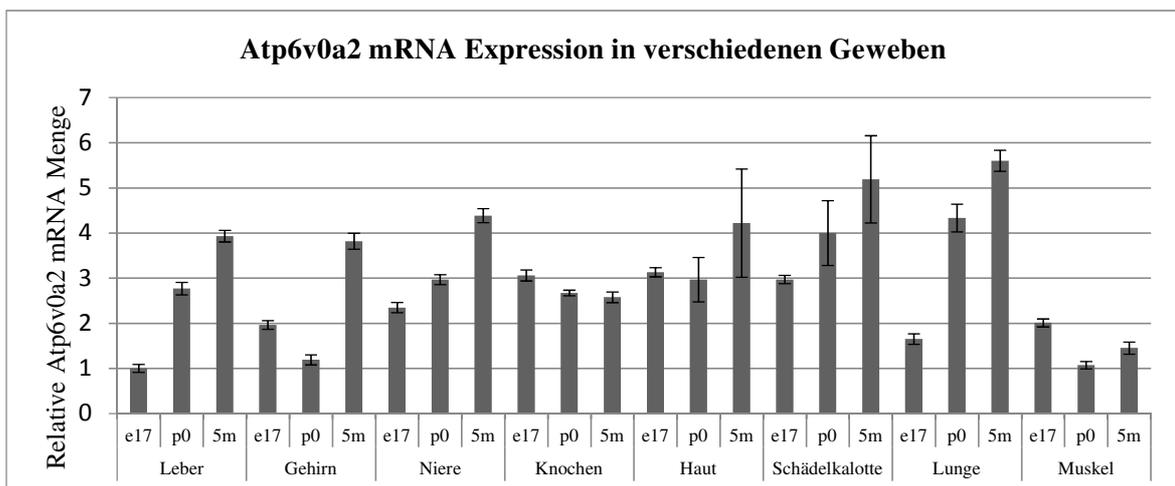


Abbildung 18: Expression von *Atp6v0a2* in verschiedenen Geweben bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien

Durch eine quantitative PCR wurde die Menge der *Gapdh*, *Aktin* und *Atp6v0a2* cDNA bestimmt. Die *Atp6v0a2* Expression wurde auf die beiden endogenen Kontrollen *Gapdh* und *Aktin* normalisiert. Als Kalibrator wurde die Leberprobe von Tieren 17 Tage nach der Befruchtung verwendet. e17: 17 Tage nach Befruchtung, p0: Tag der Geburt, 5m: 5 Monate

Daher kann von einer ubiquitären Expression und somit von einer allgemeinen Funktion innerhalb der Zelle ausgegangen werden, die mit einem Phänotyp in mehreren verschiedenen Organen verbunden sein dürfte. Dies wird auch durch den syndromalen Phänotyp der *ATP6V0A2* abhängigen Cutis laxa im Menschen bestätigt.

3.3 Erzeugung der *Atp6v0a2* Knock-out und Knock-in Mausmodelle

3.3.1 Erzeugung der Zielvektoren

Ziel der Arbeit war es, ein Knock-out Mausmodell zu erzeugen, in welchem das *Atp6v0a2* Gen nicht mehr exprimiert wird und ein Knock-in Modell in dem eine mutierte Form des Gens gebildet wird. Die transgenen Mauslinien sollten durch homologe Rekombination von Zielvektoren in embryonale Mausstammzellen erzeugt werden. Um eine effiziente homologe Rekombination zu ermöglichen, sollten diese Vektoren sehr lange homologe Arme aufweisen. Hierbei empfiehlt es sich, diese nicht mittels PCR zu amplifizieren und einzuklonieren, sondern die Zielvektoren ebenfalls über homologe Rekombination aus einem Bacmid zu generieren.

Nach einem unter Punkt 2.2.1.3.3 Erzeugung des Zielvektors des Knock-out Modells detailliert aufgeführten Protokoll, wurde die Sequenz der Exons 10 bis 20 des murinen *Atp6v0a2* Locus aus einem Bacmid in den pDTA-Vektor übertragen. Durch homologe Rekombination, Cre-Exzision und Restriktionsverdau wurden LoxP-Sequenzen, FRT-Sequenzen und eine Neomycinkassette in die *Atp6v0a2* Sequenz eingefügt (Abbildung 19).

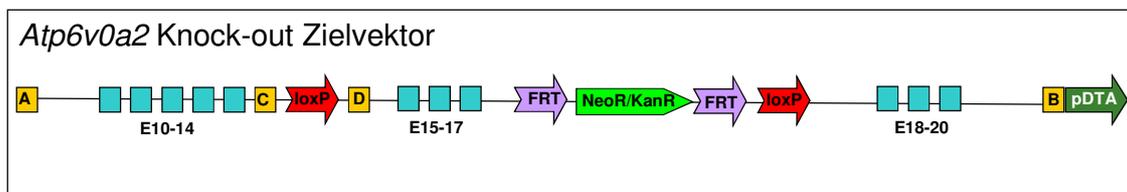


Abbildung 19: Zielvektor für das Knock-out Modell

Der entstandene Zielvektor besteht aus dem Vektor pDTA und der *Atp6v0a2* Sequenz. In diese wurde zwischen Exon 14 und 15 eine LoxP-Sequenz eingefügt. Zusätzlich gibt es eine von FRT-Sequenzen umgebene Neomycinkassette zwischen den Exons 17 und 18. Der Neomycinkassette folgt eine LoxP-Sequenz. A, B, C, D: Sequenzen für homologe Rekombination zur Erzeugung des Zielvektors; NeoR/KanR: Neomycin-Resistenzkassette

Der Zielvektor für das Knock-out Mausmodell enthält zahlreiche Funktionen: Auf dem pDTA Vektor befindet sich die Sequenz für das Diphtheria-Toxin. Dadurch wird sichergestellt, dass die embryonalen Stammzellen nicht überleben, wenn der Vektor komplett enthalten ist, ohne ins Genom rekombiniert zu sein. Dies wird als negative Selektion bezeichnet. Gleichzeitig ermöglicht die Resistenz-Kassette, dass nur diejenigen ES-Zellen eine positive Selektion mit Geneticin (G418) überleben, bei denen

eine homologe Rekombination mit der veränderten *Atp6v0a2* Sequenz erfolgt ist. Die FRT-Sequenzen ermöglichen es mittels Flipase die Neomycinkassette später zu entfernen um störende Nebeneffekte auf die Expression der *Atp6v0a2* mRNA zu vermeiden. Durch die LoxP-Sequenzen kann das Enzym Cre verwendet werden um die Exons 15 bis 17 des *Atp6v0a2* Gens auszuschneiden und somit eine Funktion des Proteins zu verhindern. Somit handelt es sich hierbei um ein konditionelles Knock-out Modell. Dieses bietet den Vorteil, dass durch Verpaarung mit gewebespezifischen Cre-Mauslinien, das *Atp6v0a2* Gen in einzelnen Organen oder Zelltypen abgeschaltet werden kann und so der Effekt sehr genau untersucht werden kann. Zusätzlich könnte man durch die Schwere der humanen Erkrankung befürchten, dass ein kompletter Verlust des *Atp6v0a2*-Gens in der Maus nicht mit dem Leben vereinbar ist.

Um den Zielvektor für das Knock-in Mausmodell zu erzeugen, sollte das Arginin an Position 755 des *Atp6v0a2*-Proteins durch Glutamin (R755Q) ausgetauscht werden (siehe Kapitel 1.2.2 Die vielfältigen Funktionen der a Untereinheit). Diese Mutation sollte eine a2 Untereinheit erzeugen, die unfähig zum Protonentransport ist. Eine mutierte Version des betroffenen Exons 18 wurde durch eine Überlappungs-PCR erzeugt und dann durch Restriktionsverdau in den Zielvektor für das Knock-out Modell inkloniert. Daher verfügt auch der Zielvektor für das Knock-in Modell über LoxP-Sequenzen, die jedoch in diesem Modell vorerst nicht verwendet werden (Abbildung 20). Der pDTA-Vektor, die FRT-Sequenzen und die Neomycinkassette erfüllen denselben Zweck wie im Knock-out Modell. Essentiell ist aber die eingeführte R755Q Mutation.

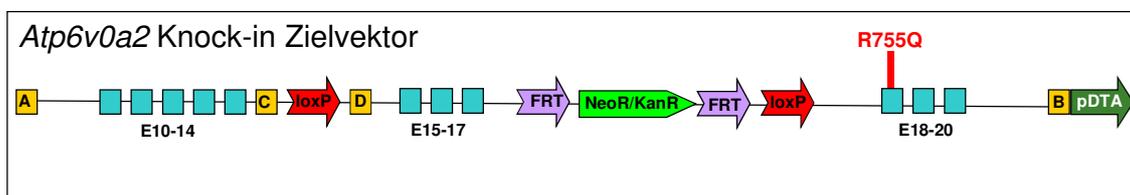


Abbildung 20: Zielvektor für das Knock-in Modell

Die Besonderheit des Knock-in Zielvektors besteht in der Mutation des Arginins an Position 755 zu Glutamin (R755Q). A, B, C, D: Sequenzen für homologe Rekombination zur Erzeugung des Zielvektors; NeoR/KanR: Neomycin-Resistenzkassette

3.3.2 Erzeugung und Screening transgener embryonaler Mausstammzellen

Mittels homologer Rekombination sollten embryonale Mausstammzellen nun durch die Zielvektoren so verändert werden, dass sie die modifizierte *Atp6v0a2* Sequenz übernehmen. Hierfür wurden die durch einen SallI-Verdau linearisierten Zielvektoren mittels Elektroporation in G4 ES-Zellen gebracht. Nach einem Tag Selektion mit 200µg/ml Geneticin (G418) wurde die Konzentration für 5 Tage auf 250µg/ml erhöht und die entstandenen klonalen Kolonien einzeln in eine neue Kulturplatte mit 96 Vertiefungen gegeben. Anschließend wurde überprüft, welche Klone die gewünschte *Atp6v0a2* Sequenz übernommen haben.

Hierzu wurde DNA aus den Zellen isoliert und zuerst eine quantitative PCR durchgeführt. Eine Primerkombination diente dem Nachweis der Integration der LoxP-Sequenz im Intron 14 und eine zweite dem Nachweis der Integration der Neomycin-Resistenzkassette mit den umliegenden Sequenzen im Intron 17 (Kapitel 2.2.1.2.5). Die Primer waren hierbei so konstruiert, dass ein PCR-Produkt nur bei der Wildtypsequenz entstehen konnte. Eine erfolgreiche Integration der gewünschten Sequenzen auf einem Allel führte daher zu einer fünfzigprozentigen Reduktion des PCR-Produkts (Abbildung 21). Für das Knock-out Konstrukt wurden mit dieser Methode 40 Klone und für das Knock-in Konstrukt 78 Klone untersucht.

Die Voruntersuchung der ES-Zellklone mittels quantitativer PCR ergab für das Knock-out Konstrukt 9 Klone (22,5%), die eine Rekombination der gesamten gewünschten Zielvektorsequenz aufwiesen und für das Knock-in Konstrukt 11 Klone (14%). Die Integration der LoxP Sequenz im Intron 14 und das Vorhandensein der R755Q Mutation wurden zusätzlich über klassische PCR mit den Primern überprüft, die später auch für die Genotypisierung der Mäuse genutzt wurden (Kapitel 2.2.1.2.4). Diese PCRs bestätigten alle bis dahin positiven Klone.

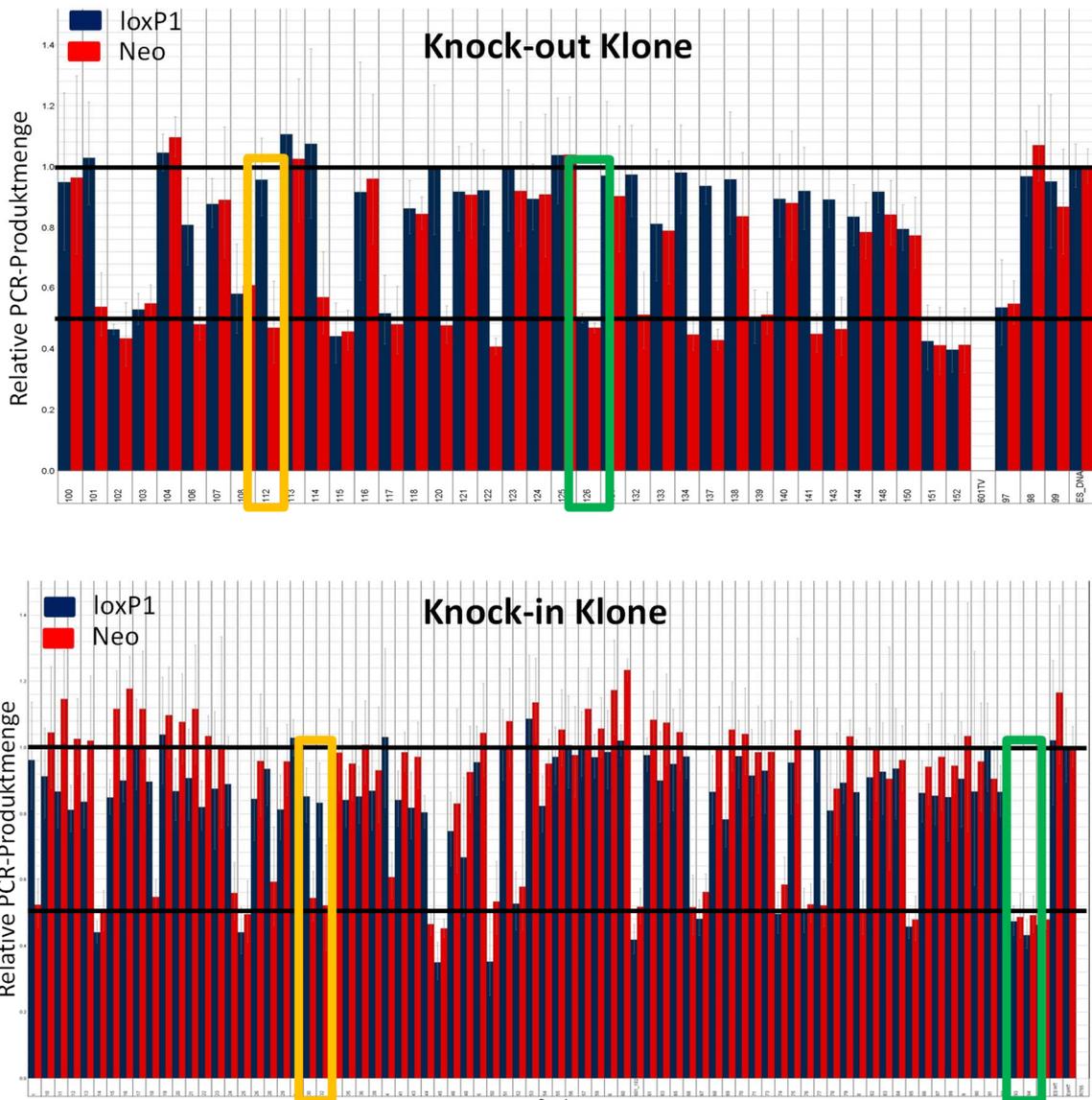


Abbildung 21: Voruntersuchung der ES-Zellklone mittels quantitativer PCR

Die Integration der *LoxP*-Sequenzen in die ES-Zellen wurde über quantitative PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde die Menge eines Abschnitts des Albumingens verwendet. Kalibriert wurde die PCR-Produktmenge auf die von Wildtyp ES-Zellen. Aus der veränderten *Atp6v0a2* Sequenz in den Zielvektoren lassen sich keine PCR Produkte generieren (601tv/R755Qtv). Eine Reduktion beider untersuchter PCR-Produkte weist auf die erfolgreiche Rekombination der modifizierten *Atp6v0a2* Sequenz hin (grüne Box). Ist nur eines der PCR-Produkte reduziert, wurde nicht die komplette modifizierte Sequenz rekombiniert, sondern nur die Neomycinkassette eingebaut (gelbe Box). Blau: Primerkombination zum Nachweis der ersten *LoxP* Sequenz; rot: Primerkombination zum Nachweis der Neomycinkassette

Zusätzlich wurden alle positiven Klone aus der qPCR mittels Southern Blot untersucht (Abbildung 22). In allen Klone konnte das Wildtypallel und das rekombinierte Allel nachgewiesen werden. Somit erwies sich die qPCR als sehr effektive Methode um diejenigen Maus ES-Zellklone zu finden, in denen eine Rekombination des *Atp6v0a2*-Lokus stattgefunden hatte. Beim Knock-out Klone 152 wurden mit einer Sonde für die

Neomycinkassette mehrere Banden detektiert, was auf weitere Integrationsstellen der Neomycinkassette im Genom hinweisen könnte. Alle anderen Klone konnten für eine Aggregation verwendet werden.

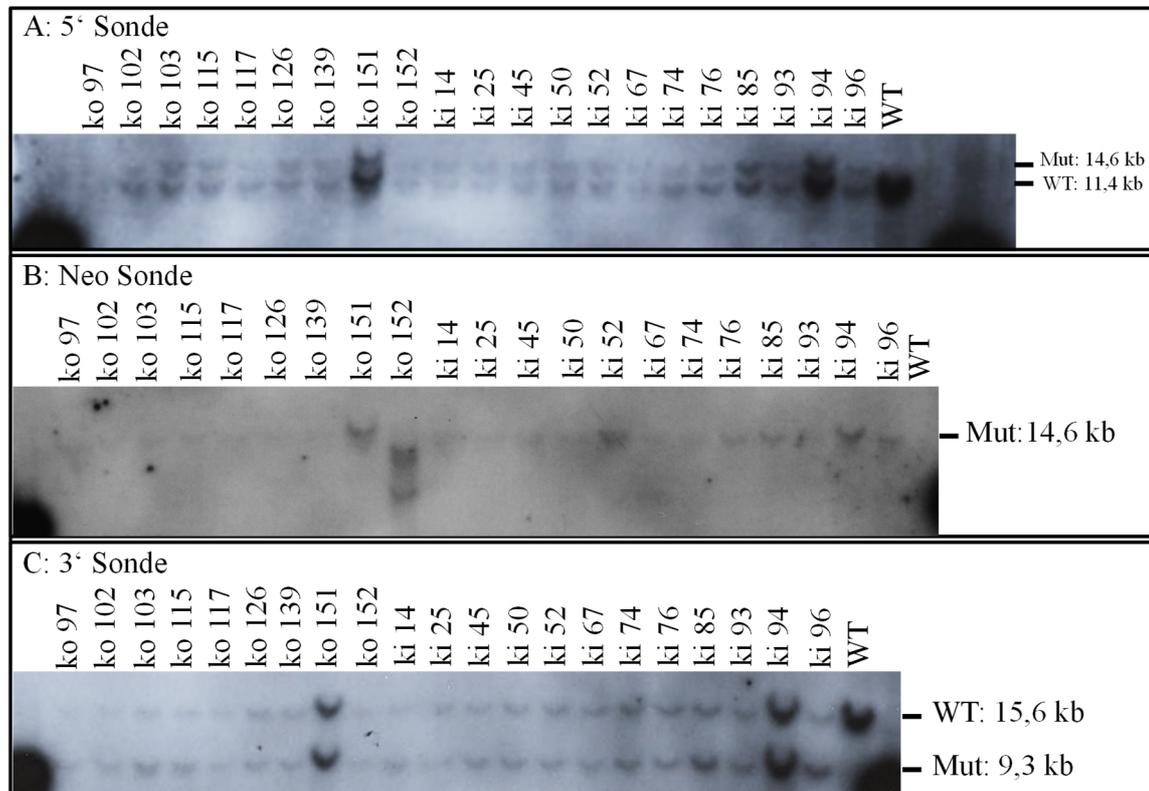


Abbildung 22: Southern Blot der ES-Zellklone

Um die Rekombination des *Atp6v0a2*-Lokus zu überprüfen wurde die DNA mit Restriktionsenzymen verdaut und die jeweiligen Fragmente über Digoxigenin markierte Sonden nachgewiesen. Eine Sonde detektierte das 5' Ende des untersuchten Bereichs (A), eine befand sich in der Neomycin-Resistenzkassette (B) und eine weitere im 3' Bereich des *Atp6v0a2*-Gens (C). A+B: Für die 5' und die Neo-Sonde wurde die DNA mit EcoRV und ApaI verdaut. Durch die Integration der Neomycinkassette fällt auf dem rekombinierten Allel eine EcoRV-Schnittstelle weg, sodass mit 14,6 kb ein größeres Fragment entsteht als beim Wildtyp mit 11,4 kb. C: Für die 3'Sonde wurde ein XbaI-Verdau genutzt. Die FRT-Sequenzen enthalten XbaI Schnittstellen, sodass statt wie beim Wildtyp mit 15,6kb bei dem rekombinierten Allel ein 9,3kb Fragment entsteht. ko: Klone für das Knock-out Modell, ki: Klone für das Knock-in Modell mit der R755Q Mutation.

3.3.3 Qualitätsanalyse und Aggregation der Klone

Um transgene Mäuse zu erzeugen, sollten die positiven ES-Zellklone mit Spendermorulae aggregiert werden und anschließend in Ammen eingesetzt werden¹³⁸. Dies erfolgte durch den Transgen-Service des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik. Nachdem zwei Knock-out Klone und drei Knock-in Klone unter Einsatz von je

durchschnittlich 18 Morulae und 4 Ammen vergeblich aggregiert wurden (Tabelle 46), schien ein Qualitätsmangel der ES-Zellen vorzuliegen.

Häufig weisen Embryonale Stammzellen nach längerer Passagierung einen rasanten Anstieg an Trisomie 8 auf^{146,147}. Diese Chromosomenmutation ist letal, sodass aus den betroffenen Zellen keine Mäuse entstehen können, gleichzeitig ist die Proliferationsrate dieser Zellen deutlich gesteigert, weswegen sie die nicht mutierten Zellen schnell überwachsen. Um diesen Defekt in den Klonen zu untersuchen, wurden einige Klone karyotypisiert und die Chromosomen 8, 11, X und Y mit FISH-Sonden markiert. Dies wurde durch die Abteilung Zytogenetik unter der Leitung von Seval Türkmen durchgeführt. Für zwei Klone (ko 126 und ki 45), die keine chimären Mäuse erbracht hatten, konnte so eine Trisomie 8 in 100% beziehungsweise 87% der Zellen nachgewiesen werden. Zwei weitere Klone (ko 139 und ki 52) zeigten ebenfalls den veränderten Chromosomensatz und wurden daher nicht aggregiert. Die FISH-Analyse des Knock-out Klons 115 ergab kein zusätzliches Chromosom 8, sodass dieser Klon aggregiert wurde und tatsächlich 10 Chimären erbrachte.

Klon	Karyotypisierung (FISH Metaphasen)	Aggregation	Trisomie 8 qPCR
ko 103	Nein	ja, keine Chimären	nein
ko 115	Ok	ja, 10 Chimären	ok
ko 126	Trisomie 8 (30/30)	ja, keine Chimären	Trisomie 8
ko 139	Trisomie 8 (29/30)	nein	nein
ki 14	Nein	ja, keine Chimären	nein
ki 45	Trisomie 8 (26/30)	ja, keine Chimären	Trisomie 8
ki 50	Nein	ja, keine Chimären	nein
ki 52	Trisomie 8 (25/30)	nein	Trisomie 8
ki 74	Nein	nein	Trisomie 8
ki 76	Nein	nein	Trisomie 8
ki 85	Nein	nein	Trisomie 8
ki 93	Nein	nein	Trisomie 8
ki 94	leichte Trisomie (10/35)*	ja, 11 Chimäre	leicht erhöht
ki 96	Nein	nein	Trisomie 8

Tabelle 46: Karyotypisierung der ES-Zell Klone

Bei fünf Klonen wurde in der Karyotypisierung eine Trisomie 8 festgestellt. Hierbei wurde das Chromosom 8 über FISH-Sonden markiert und in 30 Metaphasen gezählt. Von 7 aggregierten Klonen erbrachten nur zwei Chimäre. Durch gezielte qPCR konnten weitere Klone mit Trisomie 8 aussortiert werden. ko: Klone für das Knock-out Modell; ki: Klone für das Knock-in Modell mit der R755Q Mutation, *für ki94 wurde keine FISH-Analyse durchgeführt, sondern die Chromosomen in 35 Metaphasen gezählt, von denen 10 eine Aneuploidie mit 41 Chromosomen zeigten

Um weitere unnötige Aggregationen für das Knock-in Modell zu verhindern, sollten die Klone mit einer einfachen Methode auf eine Trisomie des Chromosoms 8 voruntersucht werden. Hierfür bot sich eine qPCR an, wobei zwei Primerkombinationen auf dem Chromosom 8 in den Genen *Ank1* und *Kars* lokalisiert waren. Aus der relativen Produktmenge ließ sich die Chromosomenanzahl ermitteln (Abbildung 23). Somit wurden 5 weitere Klone mit einer Trisomie 8 identifiziert und der Klon 94 für eine Aggregation ausgewählt. In der qPCR zeigte dieser Klon eine leicht erhöhte Produktmenge und in der anschließenden Karyotypisierung wurde bei 29% der Metaphasen eine Aneuploidie festgestellt. Da jedoch ein Großteil der Zellen einen korrekten Chromosomensatz aufwies, gelang die Aggregation des Klons 94 und ergab 11 Chimäre.

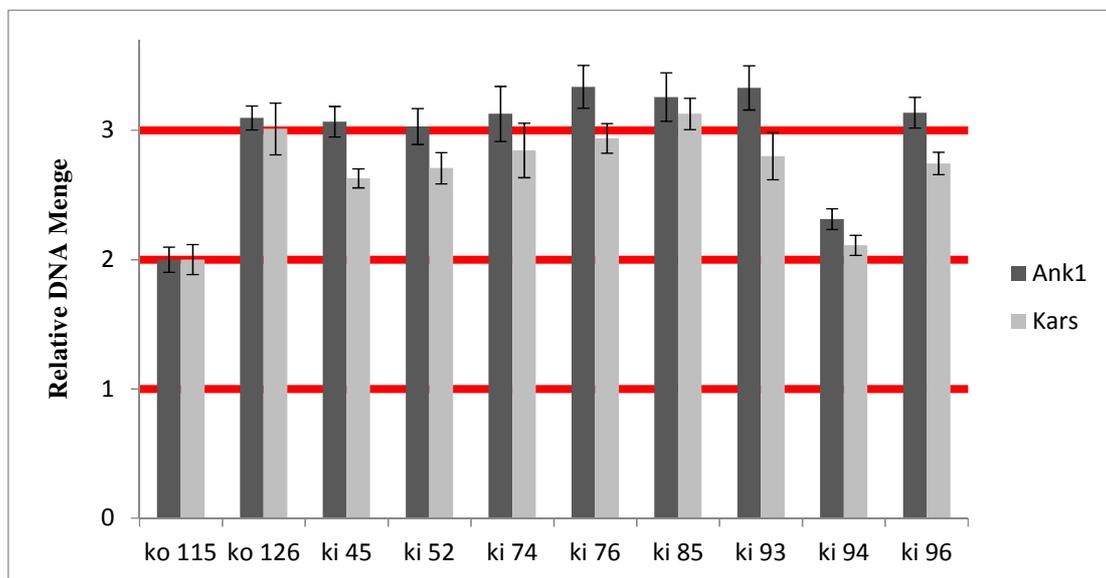


Abbildung 23: Analyse von Chromosom 8 mittels quantitativer PCR

Um die Menge des Chromosoms 8 zu ermitteln, wurden zwei Primerkombinationen auf diesem Chromosom gewählt, eine im Gen *Ank1* und eine im Gen *Kars*. Normalisiert wurde auf die Menge des Albumingens auf Chromosom 5. Als Kalibrator diente der Knock-out Klon 115, welcher in der Karyotypisierung zwei Chromosomen 8 zeigte. Die Klone ko126, ki45 und ki52 wiesen in der Karyotypisierung in mehr als 83% der Zellen eine Trisomie 8 auf. Daher lag die Produktmenge in der qPCR ungefähr bei 3. Somit konnte auch für die Klone ki74, ki76, ki85, ki93 und ki96 eine Trisomie 8 angenommen werden. Der einzige Klon der nur leicht erhöhte PCR-Produktmengen aufwies war der Knock-in Klon 94. Für diesen wurden in der Karyotypisierung bei 29% der Metaphasen eine Aneuploidie ermittelt. ko: Klone für das Knock-out Modell; ki: Klone für das Knock-in Modell mit der R755Q Mutation

3.3.4 Etablierung der Mauslinien

Die chimären Mäuse entwickelten sich zum Großteil aus den ES-Zellen der Klone und nur zu geringem Teil aus den Spendermorulae. Dies war an der braunen Fellfarbe zu erkennen. Einige Tiere mit der R755Q-Mutation hatten auch helle Haare. Dies war wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der verwendete Klon durch den Anteil an Trisomie 8 nicht ideal war. Durch Genotypisierung konnten die gewünschten Veränderungen jedoch in allen hochchimären Tieren nachgewiesen werden.

Vier Knock-out Chimäre und zwei Knock-in Chimäre wurden mit C57BL/6J Weibchen verpaart. Zum Aufbau verschiedener Mauslinien wurden einige Nachkommen der Linie des Knock-out Konstrukts mit FLP-Deleter-Mäusen verpaart. Diese exprimieren Flipase gesteuert durch einen CMV Promotor, für den eine ubiquitäre Expression angenommen werden kann. Somit konnte eine Mauslinie erzeugt werden, in der die durch FRT-Sequenzen flankierte Neomycinkassette entfernt wurde und die Expression des *Atp6v0a2*-Gens nicht beeinträchtigt sein sollte (Abbildung 24). Sie verfügt über die LoxP-Sequenzen im Gen um bei Bedarf auch gewebespezifisch das *Atp6v0a2*-Gen beschädigen zu können. Diese Linie wird als *Atp6v0a2* Flox Linie (B6-*Atp6v0a2-loxP^{ex15-17}*) bezeichnet.

Parallel dazu wurden Nachkommen der Chimären des Knock-out Konstrukts mit Hprt-Cre-Mäusen gekreuzt. Diese exprimieren das Enzym Cre unter der Regulation des ubiquitär exprimierenden Promotors des *Hprt*-Gens. Somit wurde die *Atp6v0a2* Knock-out Linie (B6-*Atp6v0a2^{-/-}*) erzeugt, denn hier wurden die Exons 15 bis 17 des Gens durch Schnitte an den LoxP-Sequenzen entfernt (Abbildung 24).

Die Chimären mit der R755Q-Mutation wurden ebenfalls mit den Flp-Deleter Mäusen verpaart um die Neomycinkassette und mögliche störende Effekte zu entfernen. Diese Linie wurde als *Atp6v0a2* R755Q (B6-*Atp6v0a2^{tmR755Q-loxP^{ex15-17}}*) bezeichnet (Abbildung 24).

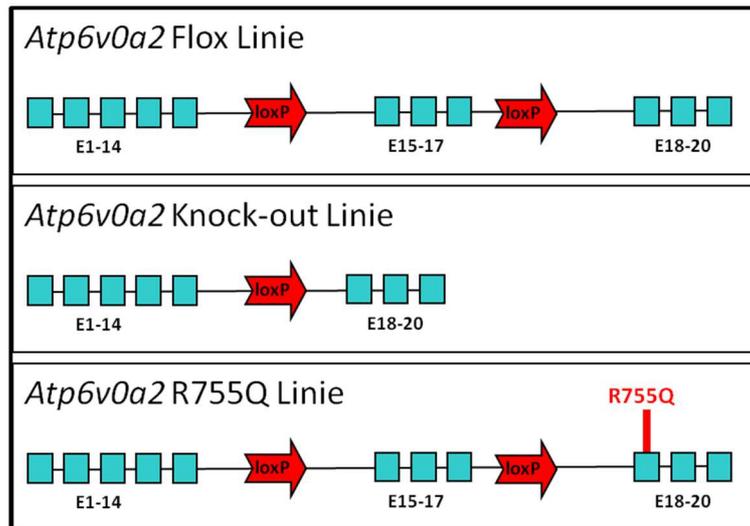


Abbildung 24: Gezüchtete Mauslinien

Die *Atp6v0a2* Flox Linie enthält LoxP Sequenzen um die Exons 15 bis 17 bei Bedarf gewebespezifisch deletieren zu können. Durch Expression des Cre-Enzyms in der Keimbahn konnte die Knock-out Linie erzeugt werden. Die *Atp6v0a2* R755Q Linie trägt die entsprechende Mutation im Exon 18 und LoxP Sequenzen um zusätzlich einen gewebespezifischen Knock-out zu ermöglichen.

3.4 Charakterisierung der Expression der *Atp6v0a2* Flox Linie

In der *Atp6v0a2* Flox Linie werden die Exons 15 bis 17 durch loxP-Sequenzen flankiert. Diese Sequenzen sind sehr klein und die intronischen Sequenzen blieben größtenteils erhalten. Daher sollte die *Atp6v0a2*-Expression in diesen Mäusen nicht beeinträchtigt sein. Um dies zu überprüfen, wurde die mRNA Expression im Gehirn und der Leber der Tiere untersucht.

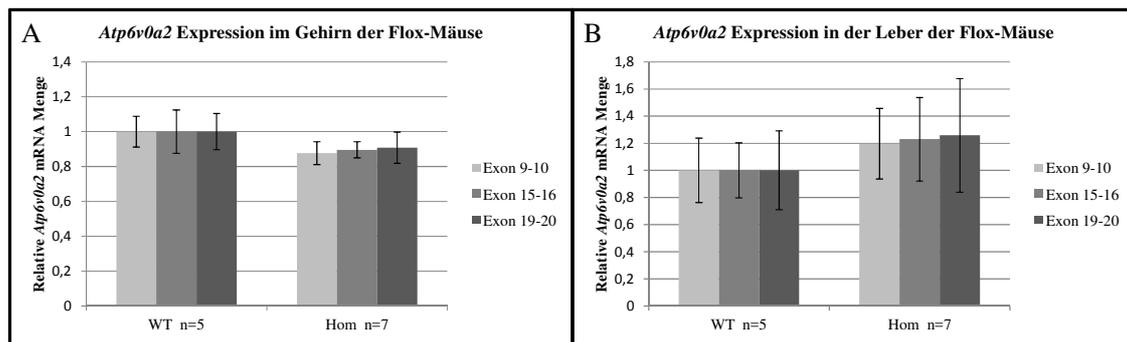


Abbildung 25: Die *Atp6v0a2* mRNA Expression in Flox-Mäusen ist nicht beeinträchtigt

Es wurden drei Primerkombinationen verwendet um die *Atp6v0a2* Expression zu untersuchen, jeweils eine vor, in oder nach der gefloxten Region. Es ergab sich keine signifikante Abweichung der mRNA-Menge in den Flox-Mäusen.

Die *Atp6v0a2* mRNA Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen Wildtyptieren und homozygoten Tieren mit dem Flox-Allel (Abbildung 25). Um zu überprüfen ob auch die Expression der benachbarten Gene bei den Flox-Tieren normal ist, wurde RNA aus Gehirnen der Flox-Mäuse isoliert und die Expression der benachbarten Gene untersucht. Die Expression von *Ccdc97*, *Gtf2h3* und *Tctn2* unterschied sich nicht signifikant in Wildtyptieren und Mäusen, die homozygot für das Flox-Allel sind (Abbildung 26). Es wurde keine Expression des Nachbargens *Dnah10* im Gehirn von Wildtyptieren oder homozygoten Tieren detektiert. Auf dem Gegenstrang des Exon 20 des *Atp6v0a2*-Gens befindet sich das bisher nicht bestätigte Transkript *AK161424*. Da diese Region nicht verändert wurde, wurde dessen Expression nicht überprüft. Desweiteren zeigen die Flox-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp.

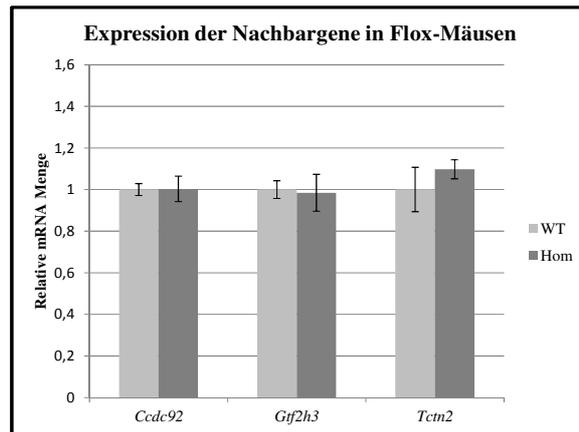


Abbildung 26: Die LoxP-Sequenzen verändern nicht die Expression benachbarter Gene
Die mRNA Expression der benachbarten Gene im Gehirn von Wildtyp und Flox-Mäusen (n=3) wurde durch qPCR bestimmt.

Somit verändern die LoxP-Sequenzen nicht die Expression in den Flox-Mäusen. Daher kann das *Atp6v0a2*-Gen in diesen Mäusen gezielt durch eine spezifische Cre-Expression abgeschaltet werden, während in den anderen Geweben eine normale Genexpression bestehen bleibt.

3.5 Charakterisierung der *Atp6v0a2* Knock-out Linie

3.5.1 Expressionsanalyse in *Atp6v0a2* Knock-out Mäusen

3.5.1.1 Das *Atp6v0a2* Protein ist in den Knock-out Mäusen deletiert

In den *Atp6v0a2* Knock-out Mäusen wurden die Exons 15 bis 17 des *Atp6v0a2*-Gens entfernt. Dies führt zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einem verfrühten Stoppcodon 7 Aminosäuren nach Exon 14 und zum anderen werden mindestens drei Transmembrandomänen deletiert. Inwiefern dies die Expression des *Atp6v0a2*-Gens beeinflusst, wurde mittels qPCR untersucht.

Hierzu wurde RNA aus Gehirn und Leber isoliert und analysiert (Abbildung 27 A und B). Erwartungsgemäß wurde mit den Primern in den Exons 15 und 16 in homozygoten Knock-out Mäusen kein Produkt amplifiziert, da diese DNA-Abschnitte deletiert sind. Die anderen Primer zeigten eine Reduktion der *Atp6v0a2*-mRNA auf circa 21% im Gehirn und 13% in der Leber an. Dies weist auf einen *nonsense mediated mRNA decay* hin, also auf einen Abbau der mRNA aufgrund des verfrühten Stoppcodons¹⁴⁸. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass auch in den heterozygoten Tieren nur noch eine mRNA Menge von ungefähr 60% im Gehirn und 67% in der Leber gemessen wurde. Somit schien nur die mRNA vom Wildtyp parallel stabil zu sein, während die des mutierten Allels stark reduziert war.

Wie aus der mRNA Menge bereits abzuleiten ist, war auch die *Atp6v0a2* Proteinmenge im Gehirn in den heterozygoten Tieren stark reduziert (Abbildung 27C). Eine Quantifizierung der Proteinbande mit ImageJ ergab eine Verminderung auf ca. 54% im Vergleich zum Wildtyp. In den homozygoten Mutanten wurde kein Protein mehr auf der Höhe des Wildtypproteins (ca. 90kDa) oder in Höhe eines verkürzten Proteins (67kDa) detektiert. Somit handelt es sich bei diesem Mausmodell um ein Knock-out Modell mit vollständigem Verlust des *Atp6v0a2*-Proteins.

Da bei ensembl.org auch Transkripte angegeben werden, die nur für den N-Terminus des Proteins kodieren, wurde die Expression der Exons 3 und 4 gesondert untersucht (Abbildung 28). Hierbei zeigte sich sowohl in Gehirn als auch in Leber, dass die mRNA der vorderen Exons ungefähr gleich stark reduziert ist, wie die der Exons 9-10 und 19-20. Somit scheint es kein Transkript zu geben, das nur die vorderen Exons beinhaltet und nicht von dem Knock-out betroffen ist.

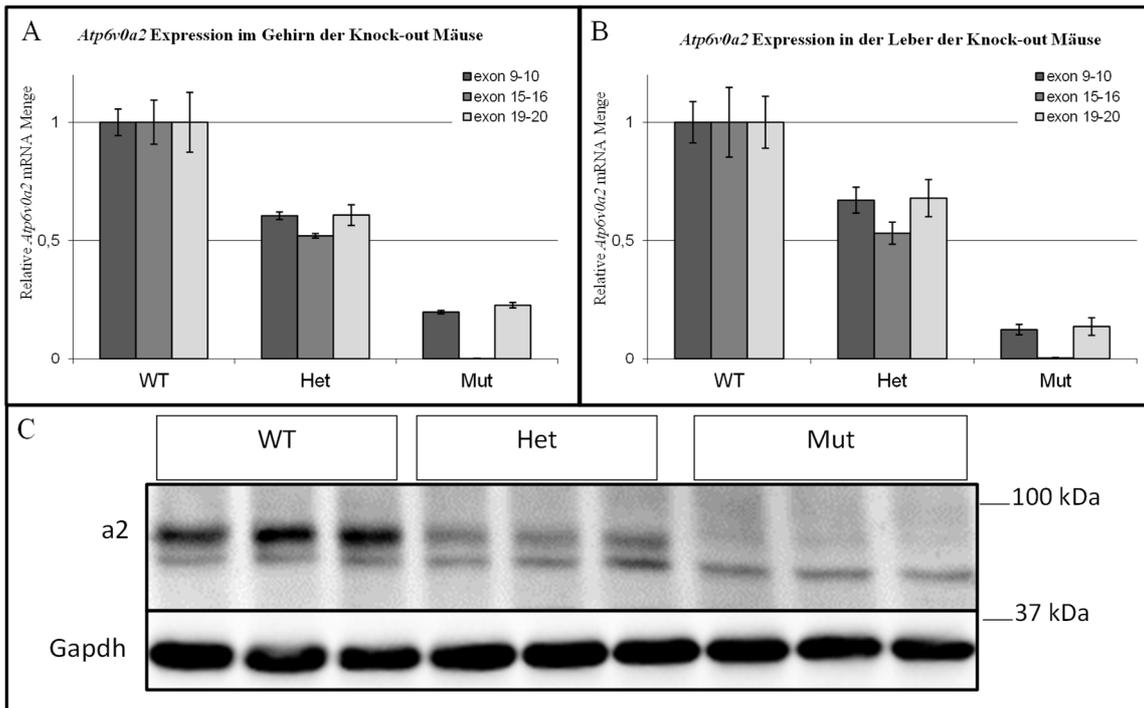


Abbildung 27: Der *Atp6v0a2* Knock-out reduziert die mRNA und deletiert das Protein
 A+B: qPCR auf cDNA aus Gehirn (A) oder Leber (B) von Tieren der Knock-out Linie, n=3. Es wurde je eine Primerkombination vor (Exon 9-10), in (Exon 15-16) oder hinter (Exon 19-20) den deletierten Bereich des *Atp6v0a2*-Gens gelegt. Die *Atp6v0a2*-mRNA war in heterozygoten Knock-out Tieren auf fast die Hälfte reduziert. In den homozygoten Knock-out Mäusen lag das mRNA Level bei 13-21%, während die deletierten Exons fehlten. C: Western Blot mit Proteinlysat gewonnen aus dem Gehirn von Tieren der Knock-out Linie. Detektion mit dem *Atp6v0a2*-Antikörper von Abcam. Die a2 Untereinheit wurde bei ca. 90kDa detektiert. Sie war deutlich reduziert in heterozygoten Tieren und fehlte komplett in homozygoten Mutanten. Die untere Bande zeigte eine unspezifische Antikörperbindung an ein anderes Protein an, das nicht vom Knock-out beeinflusst war. Gapdh wurde als unabhängige Ladekontrolle verwendet.

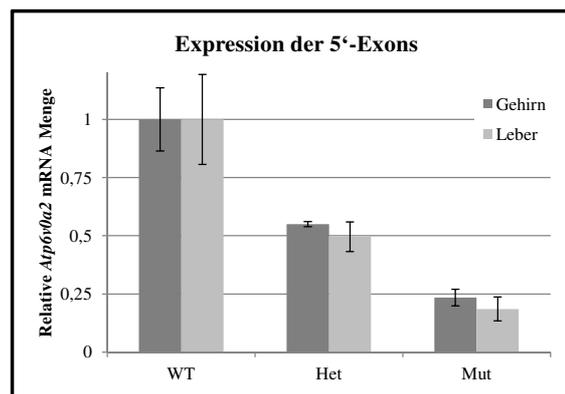


Abbildung 28: Von dem Knock-out sind auch die 5'-Exons des *Atp6v0a2*-Gens betroffen
 Die *Atpv0a2* mRNA Menge im 5'-Bereich wurde mit Primern im Exon 3 und 4 untersucht. Hierbei wurden sowohl Gehirn als auch Leber von Tieren der *Atp6v0a2* Knock-out Linie analysiert (n=3). Die Reduktion ist ähnlich stark wie bei den weiter 3' gelegenen Exons.

3.5.1.2 Der *Atp6v0a2* Knock-out beeinflusst keine benachbarten Gene

Die Deletion der Exons 15 bis 17 des *Atp6v0a2*-Gens könnte andere Gene beeinflussen und besonders benachbarte Gene fehlregulieren. Daher wurde deren Expression in Leber und Gehirn der Mäuse untersucht. Für *Tctn2* und *Gtf2h3* zeigte sich sowohl in der Leber als auch im Gehirn kein Unterschied in der Expression zwischen Kontrollen und Mutanten (Abbildung 29). *Ccdc92* war nur im Gehirn exprimiert und unterschied sich dort ebenfalls nicht zwischen Kontrollen und Mutanten. Für *Dnah10* konnte in beiden Organen keine Expression nachgewiesen werden.

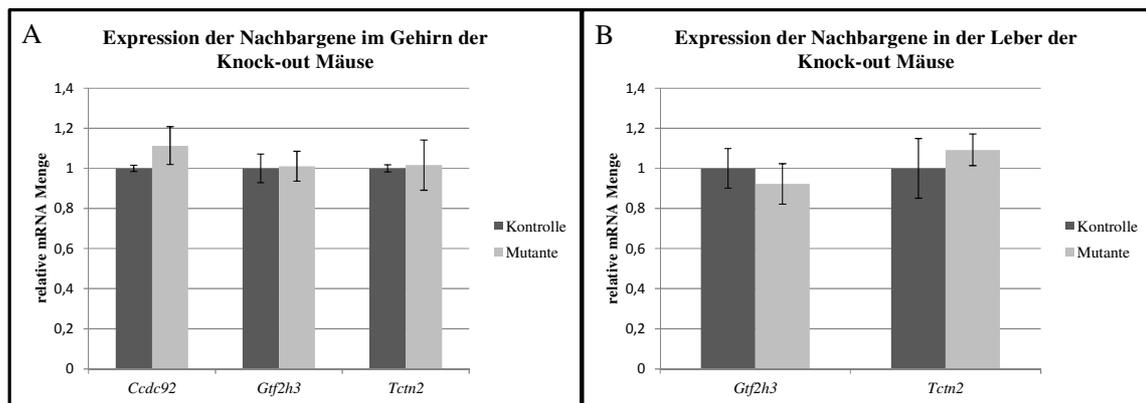


Abbildung 29: Die Nachbargene von *Atp6v0a2* werden auch in Mutanten normal exprimiert. Die mRNA Expression der Nachbargene wurde mittels qPCR in Gehirn (A) und Leber (B) untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Kontrollen und Mutanten (n=3).

Im Intron 15 des *Atp6v0a2* Gens befindet sich das mögliche U6 snRNA Pseudogen *Gm24854*. Für die Expressionsanalyse wurde das miScript II RT Kit (Qiagen, Venlo, NLD) genutzt, welches speziell für die Amplifikation nicht kodierender RNAs entwickelt wurde. Die Amplifikation der Kontroll cDNA *Rnu6b* war erfolgreich. Jedoch konnte trotz einer möglichen Expression im Cerebellum (Expression atlas), keine Expression von *Gm24854* im Gehirn von Wildtypmäusen detektiert werden.

3.5.1.3 Der *Atp6v0a2* Knock-out hat in Gehirn und Leber keinen Einfluss auf die anderen a Untereinheiten

Es gibt vier Isoformen der a Untereinheit, die durch verschiedene Gene kodiert werden. Es wäre möglich, dass der Verlust der a2 Untereinheit zu einer kompensatorischen Regulation der anderen Isoformen führt. Um dies zu überprüfen, wurde deren Expression in Gehirn und Leber getestet.

Die a1 Isoform (*Atp6v0a1*) war im Gehirn sehr stark exprimiert ($Ct \approx 21$). In der Leber zeigte diese Isoform genauso wie die a3-Isoform (*Tcirg1*) eine mittlere Expression

(Ct \approx 26). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von a1 und a3 im Gehirn und der Leber bei Wildtyp und homozygoten Knock-out Mäuse (Abbildung 30). Die a4 Isoform (*Atp6v0a4*) war in beiden Geweben so gering exprimiert (Ct $>$ 30), dass keine verlässlichen Werte gemessen werden konnten. Somit werden zumindest in Gehirn und Leber die anderen Untereinheiten nicht stärker exprimiert um den Verlust der a2 Untereinheit auszugleichen.

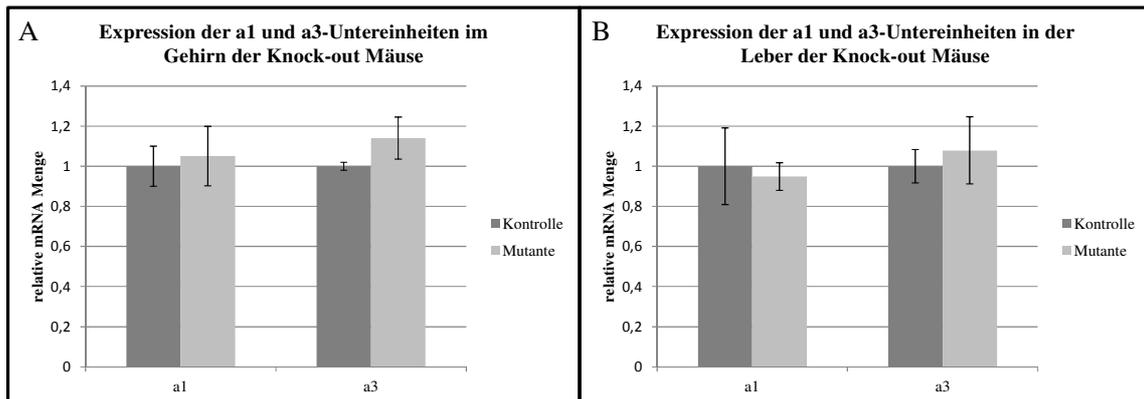


Abbildung 30: Es gibt keine Anpassung der a1 und a3 Expression an den Verlust der a2 Untereinheit. Die mRNA Menge der a1 und a3 Untereinheit in Gehirn (A) und Leber (B) wurde durch qPCR bestimmt. Beide zeigten keinen Expressionsunterschied in Kontrollen und homozygoten *Atp6v0a2* Knock-out Tieren (n=3). Die a4 Isoform war zu schwach exprimiert um verlässliche Werte zu erhalten.

3.5.2 *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse sind leichter

Bereits im Alter von wenigen Tagen fiel auf, dass die homozygoten *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse deutlich kleiner waren als ihre Geschwister. Der Unterschied im Gewicht betrug ungefähr 20% und blieb von Geburt an bis ins hohe Alter bestehen (Abbildung 31). Die Gewichts Differenz war bei männlichen und weiblichen Tieren ungefähr gleich groß. Die Knock-out Mäuse erschienen auch wesentlich schmäler mit weniger Fetteinlagerungen. Somit können die homozygoten Mäuse meist ohne Genotypisierung von ihren heterozygoten oder Wildtypgeschwistern unterschieden werden.

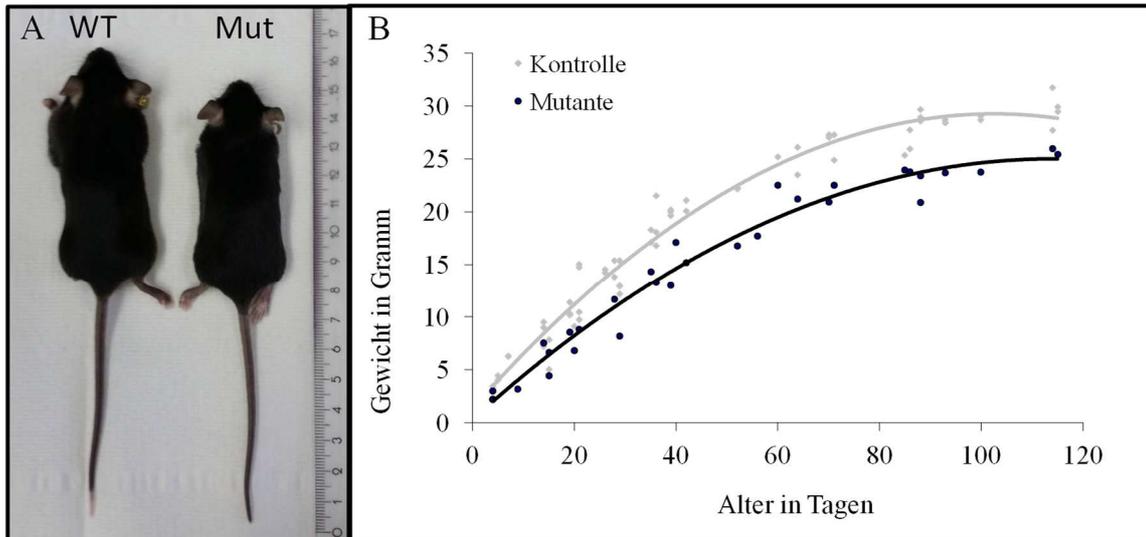


Abbildung 31: *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse sind kleiner und leichter als ihre Geschwister. Die Abbildung zeigt den Größen- (A) und Gewichtsunterschied (B) männlicher Mäuse. Für die Weibchen besteht derselbe Unterschied zwischen homozygoten Tieren und Kontrolltieren.

3.5.3 *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse haben eine dünnere Dermis

Das auffälligste Merkmal der Cutis laxa Patienten ist ihre schlaffe, faltige Haut. Mäuse haben, wie die meisten Tiere, eine Muskelschicht innerhalb der Haut (*panniculus carnosus*), die beim Menschen stark reduziert ist¹⁴⁹. Daher zeigen die meisten Mausmodelle für Cutis laxa keine stehenden Hautfalten, jedoch weisen sie häufig Veränderungen in der Struktur der Haut auf¹⁵⁰⁻¹⁵². Auch die *Atp6v0a2*^{-/-} Mäuse haben keine offensichtliche Veränderung der Haut. Da sie schlanker sind als ihre Geschwister, erschien ihre Haut subjektiv etwas lockerer. Die Nackenhaut der Tiere wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und die Dicke der Dermis an 100 bis 250 Stellen gemessen. Dies ergab eine signifikant dünnere Dermis in *Atp6v0a2*^{-/-} Mäusen (Abbildung 32).

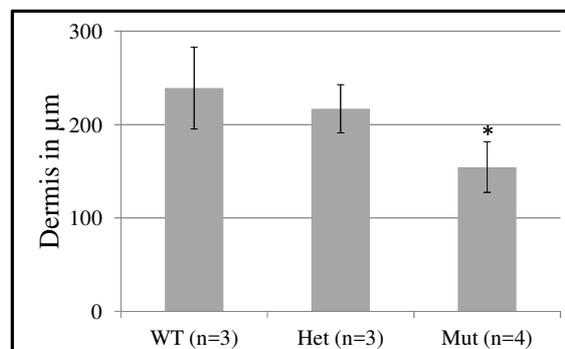


Abbildung 32: *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse haben eine dünnere Dermis. Während Wildtypmäuse eine Dermisdicke von ca. 240µm haben, ist diese im Mittel auf 154µm in den Knock-out Mäusen reduziert. * T-Test $p < 0,05$

3.5.4 *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse haben eine reduzierte Knochendichte

Die *ATP6V0A2*-Defizienz beim Menschen ist auch durch Knochenveränderungen, wie eine Osteopenie, eine vergrößerte anteriore Fontanelle und Skoliose gekennzeichnet. Daher sollte die Knochendichte im Knock-out Modell mittels Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) untersucht werden. Hierbei wurde in der Tibia der trabekuläre Knochen auf seine Dichte untersucht und das Volumen des kortikalen Knochens bestimmt. Außerdem wurden die Lendenwirbel 5 und 6 auf ihre Dichte untersucht.

Die Untersuchung des trabekulären Knochens der Tibia (Abbildung 33A) zeigte ein reduziertes Knochenvolumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen (BV/TV) auf ungefähr 58% bei fünf Wochen alten Tieren. Dies war auf eine verminderte Dicke (87%) und Anzahl (66%) der Trabekel zurückzuführen. In 12 Wochen alten Tieren schien sich dies weitgehend zu normalisieren. Hier zeigten die homozygoten Knock-out Tiere nur noch eine Reduktion der Knochendichte (BV/TV) auf 83%, wobei die Dicke der Trabekel gleich blieb, deren Anzahl aber auf den Wert der Wildtypgeschwister anstieg.

Das Volumen des kortikalen Knochens der Tibia war bei den Mutanten auf ungefähr 67% reduziert (Abbildung 33B). Da kleinere Tiere auch kleinere Knochen haben, wurde das Knochenvolumen auf das Gewicht des jeweiligen Tieres normalisiert. Somit ergab sich bei den 5 Wochen alten Tieren weiterhin ein geringeres Knochenvolumen (88%), während die 12 Wochen alten Knock-out Mäusen pro Gramm Körpergewicht ein normales kortikales Knochenvolumen (102%) aufwies.

Die Werte der Knochendichte in den Lendenwirbeln der Mäuse schwankten stark. Die Dichte (BV/TV) des 6. Lendenwirbels war sowohl in 5 als auch 12 Wochen alten Mäusen auf ungefähr 85% im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abbildung 33C). Diese Verminderung war jedoch nicht signifikant. Für den 5. Lendenwirbel ergab sich bei den 5 Wochen alten Tieren eine auf 74% verminderte Knochendichte (BV/TV) während sich dieser Wirbel bei 12 Wochen alten Tieren nicht von dem der Wildtypiere unterschied.

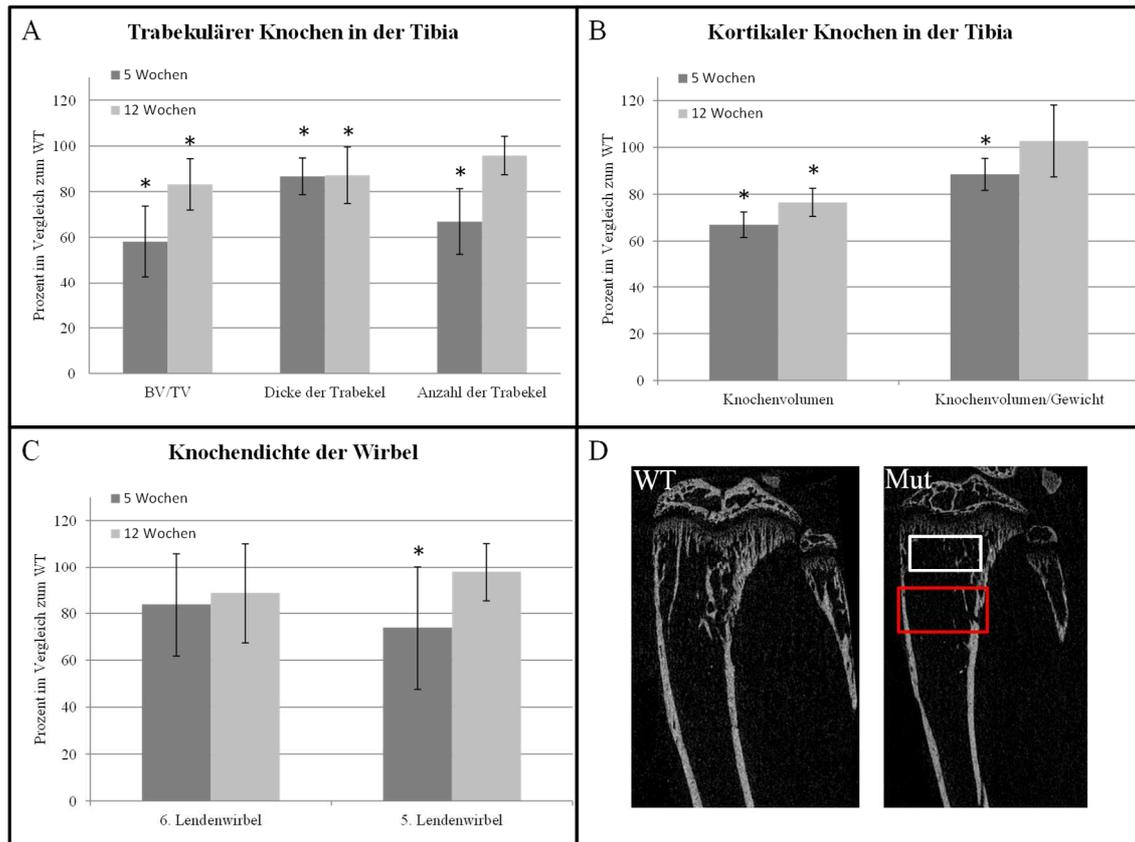


Abbildung 33: Die Knochendichte in *Atp6v0a2* Knock-out Mäusen ist reduziert. Knochenparameter der *Atp6v0a2*^{-/-} Mäuse. Die Werte der homozygoten Mutanten wurden auf die Werte der Kontrollgeschwister desselben Geschlechts normalisiert. Mittels Mikro-Computertomographie wurden der trabekuläre (A, D weißer Kasten) und der kortikale (B, D roter Kasten) Teil der Tibia von *Atp6v0a2*^{-/-} Mäusen untersucht (n=4-8). Der Wirbelkörper des 5. und 6. Lendenwirbels wurde ebenfalls auf seine Dichte (BV/TV) untersucht (n=4-7) (C). * Einstichproben-T-Test p<0,05

3.5.5 *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse zeigen Veränderungen des frontalen Kortex

Die Patienten mit Mutationen im *ATP6V0A2*-Gen leiden besonders unter den Hirnveränderungen und Krampfanfällen, die zu starken Einschränkungen im Alltag oder sogar zu einer Neurodegeneration führen. Auch bei mehreren *Atp6v0a2*^{-/-} Mäusen wurden wiederkehrende Krampfanfälle beobachtet, die besonders durch repetitives Verhalten gekennzeichnet waren. Daher wurden die Gehirne von Mäusen mit Nissl gefärbt und somit die Zellkörper der Neuronen sichtbar gemacht.

Es zeigten sich in 5 Wochen alten Mäusen bei 6 von 8 homozygoten Knock-out Tieren deutliche Veränderungen des frontalen Kortex. Die *Lamina molecularis* war dort nicht klar umgrenzt und wie sonst zellarm, sondern enthielt zahlreiche Neuronenzellkörper. In keinem von 5 Heterozygoten und 4 Wildtypen wurde solch eine Veränderung

beobachtet. Auch in den drei untersuchten 12 Wochen alten Mutanten war die Veränderung im frontalen Kortex sichtbar, jedoch nicht in gleichaltrigen Kontrollen (Abbildung 34).

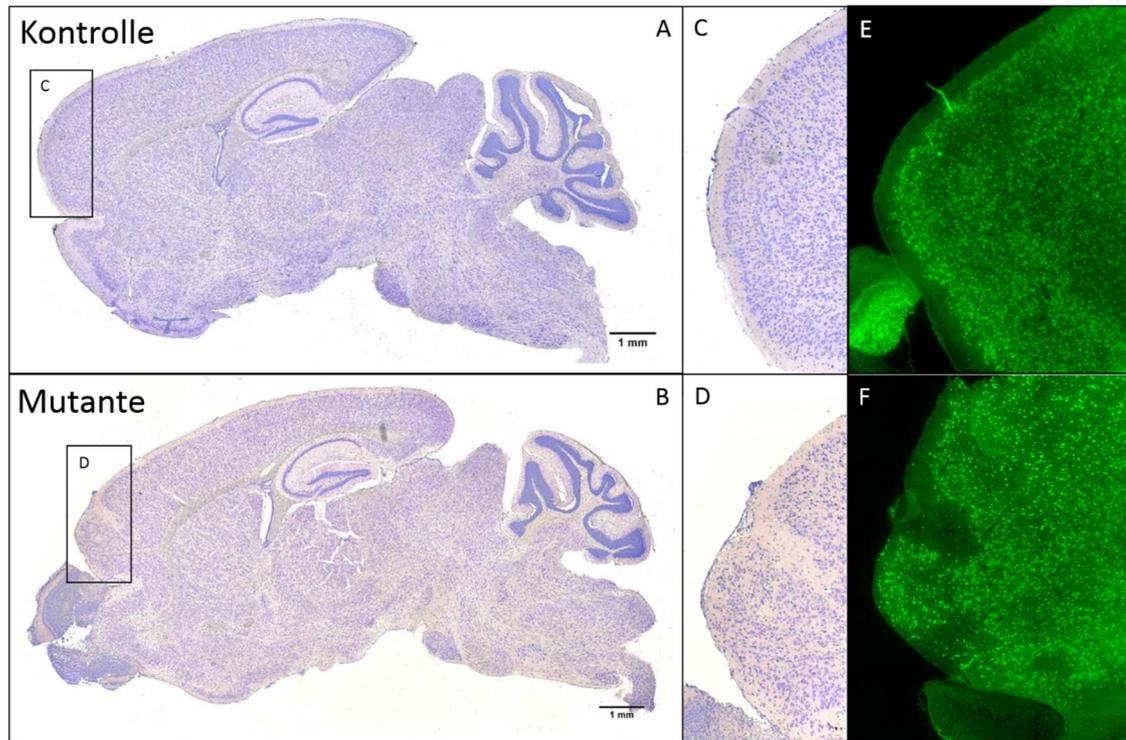


Abbildung 34: Fehlerhafte Schichtung des frontalen Kortex von *Atp6v0a2* Knock-out Mäusen

Die Gehirne von Kontrolltieren (A, C, E) und *Atp6v0a2*^{-/-} Mäusen (B, D, F) wurden mit Nissl (A-D) oder mit einem NeuN-Antikörper gefärbt (E-F). Es zeigten sich bei den homozygoten Mutanten Auffälligkeiten des frontalen und parietalen Kortex. Hierbei war die äußere Kortexschicht nicht klar abgegrenzt, sondern von fehlmigrierten Neuronen durchzogen. Die Abbildung zeigt 12 Wochen alte Tiere, bei 5 Wochen alten Tieren wurde derselbe Phänotyp beobachtet.

Die ektopischen Zellkörper in der *Lamina molecularis* waren auch positiv für NeuN (Till Scheuer, AG Endesfelder, Neonatologie Charité), einem Protein das spezifisch in den meisten reifen Neuronen exprimiert wird (Abbildung 34E, F). Die auffälligen Neuronen bildeten bei den verschiedenen Tieren sehr unterschiedlich große Regionen und waren auch unterschiedlich weit nasal gelegen.

3.5.6 Männliche *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse sind infertil

Die Fertilität der weiblichen *Atp6v0a2*^{-/-} Tiere war nicht eingeschränkt. Die Würfe hatten eine normale Größe und die Jungtiere entwickelten sich normal. Nachdem jedoch drei verschiedene *Atp6v0a2*^{-/-} Männchen keine Jungtiere zeugten, wurden die Spermien aus dem Nebenhoden extrahiert. Die Zahl der Spermien war reduziert und sie waren

größtenteils bewegungsunfähig. HE-Färbungen des Hodens der Knock-out Mäuse zeigten einen Defekt bei der Ausbildung des Akrosoms, was zu kugelförmigen Spermien und somit zu Globozoospermie führt (Abbildung 35, Guido Vogt, AG Kornak).

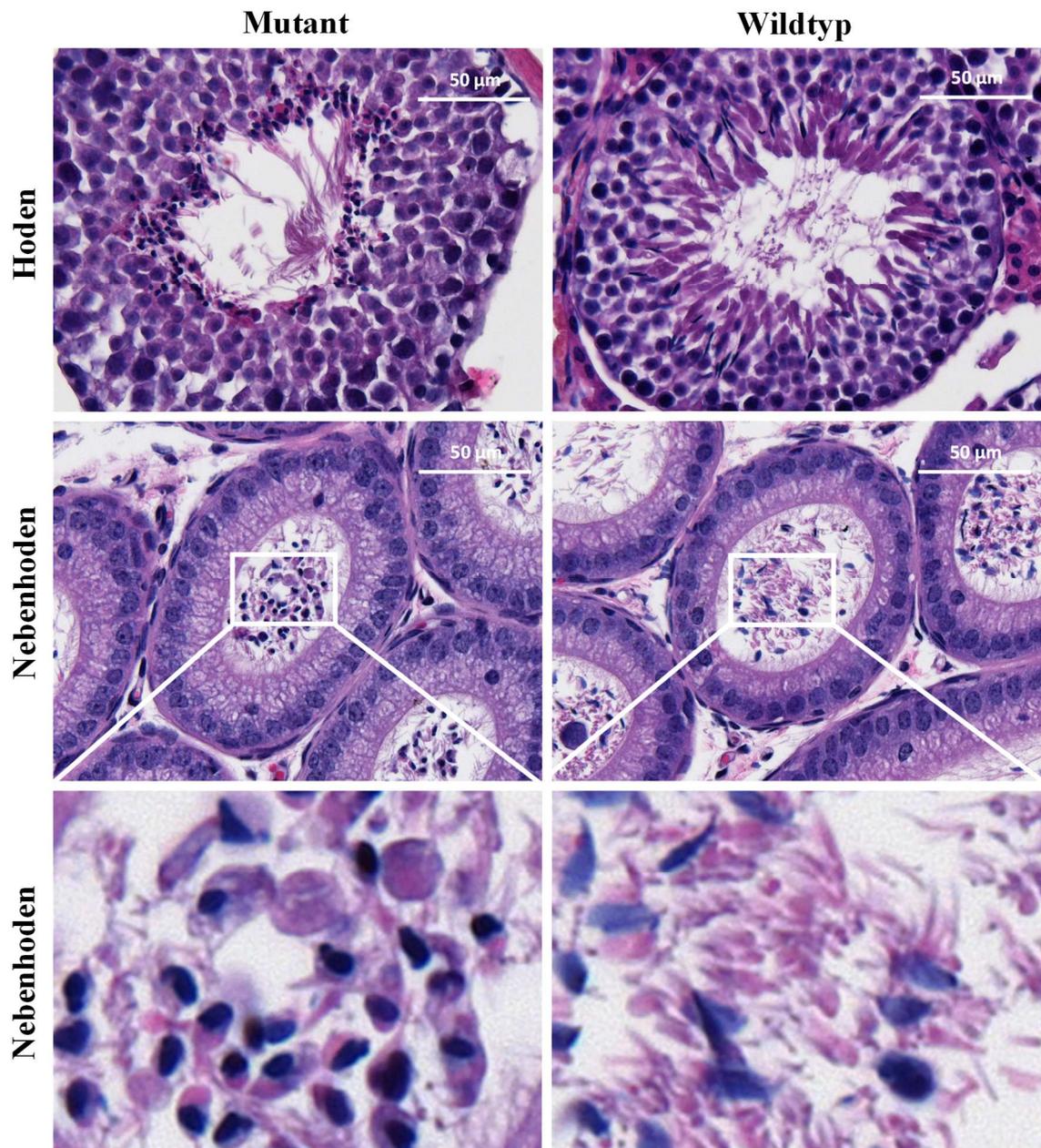


Abbildung 35: *Atp6v0a2*^{-/-} Mäuse haben eine Globozoospermie

Im Hoden der homozygoten Männchen befanden sich zahlreiche Spermien, die jedoch einen kugelförmigen Kopf aufwiesen und nicht die typische langgezogene Form, wie sie im Wildtyp zu erkennen ist.

3.5.7 Analyse der Glykanstrukturen

Die Cutis laxa Typ 2a wird auch als *ATP6V0A2*-CDG bezeichnet, da der kongenitale Glykosylierungsdefekt (CDG) diese Form der Cutis laxa von anderen abgrenzt. Als klassisches diagnostisches Verfahren wird eine isoelektrische Fokussierung (IEF) des Serum-Transferrins angewandt um die Erkrankung zu identifizieren, wobei eine reduzierte Sialylierung sichtbar wird. Daher wurde auch das Serum der Knock-out Mäuse auf Glykosylierungsdefekte untersucht. Hierbei ergab die Transferrin IEF keine Auffälligkeiten (Abbildung 36B), genauso wie die meisten untersuchten Lektine. Bei RCA1 (*Ricinus communis* Agglutinin) handelt es sich um ein Lektin des Wunderbaums, das spezifisch an endständige β -D-Galactose bindet¹⁵³. Im Serum der *Atp6v0a2*^{-/-} Mäuse bindet dieses Lektin ein zusätzliches Protein (Abbildung 36A, roter Pfeil), dessen Glykosylierung von den Kontrollgeschwistern abweicht.

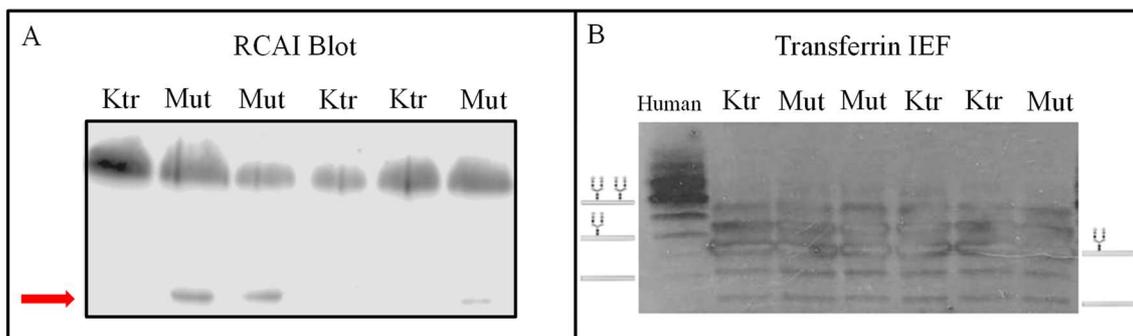


Abbildung 36: Glykosylierung von Serumproteinen der *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse

Serum von 5 Wochen alten *Atp6v0a2*^{-/-} Mäusen und deren Kontrollgeschwistern wurde von Bianca Dimitrov (AG Christian Thiel) vom Universitätsklinikum Heidelberg auf einen Glykosylierungsdefekt untersucht. A: Der RCA1 Blot ergab eine zusätzliche Bande bei den mutierten Tieren (roter Pfeil). B: Die Isoelektrische Fokussierung des Transferrins ergab keine Unterschiede zu Kontrollgeschwistern.

Besonderes Interesse galt der Fragestellung, ob die Veränderungen in den Organen der Patienten und Mäuse durch eine Fehlglykosylierung der Proteine in diesen Organen verursacht wird. Daher wurden Gehirne und Hautproben der *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse an der Université des Sciences et Technologies de Lille von François Foulquier massenpektrometrisch auf Glykosylierungsdefekte untersucht. Die Proben der mutierten Tiere zeigten keine auffälligen Glykanstrukturen (Abbildung 37).

3. Ergebnisse

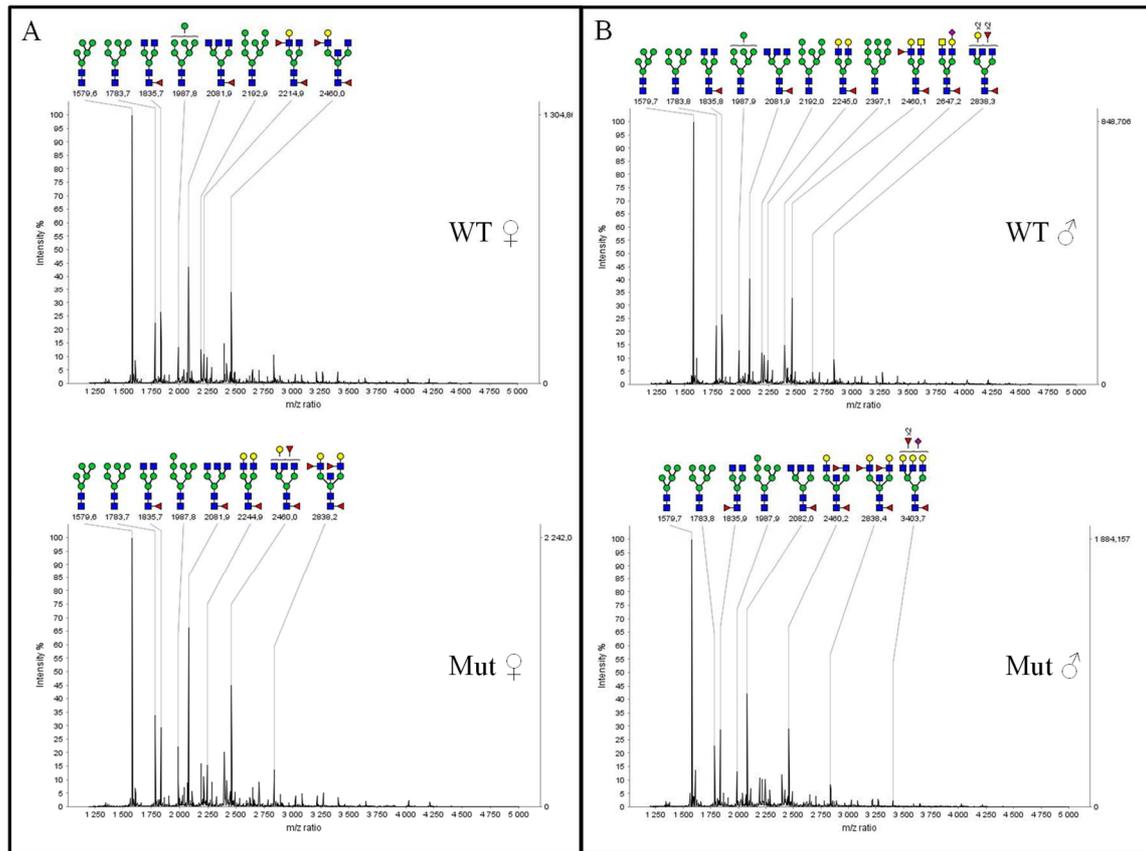


Abbildung 37: Normale N-Glykosylierung der Proteine im Gehirn von *Atp6v0a2*-Knock-out Tieren
 Die massenspektrometrische Analyse der Glykanstrukturen von Proteinen im Gehirn von *Atp6v0a2*^{-/-} Tieren ergab keine Abweichungen. Es wurden sowohl Weibchen (A) als auch Männchen (B) analysiert.
 blaues Quadrat: N-Acetylglucosamin (GlcNAc); grüner Kreis: Mannose, rotes Dreieck: Fucose, gelber Kreis: Galactose, pinkes Quadrat: Sialinsäure

3.6 Charakterisierung der Expression der *Atp6v0a2* R755Q Linie

Ziel des *Atp6v0a2* R755Q Modells war es, eine stabile $\alpha 2$ Untereinheit zu erzeugen, der die Fähigkeit zum Protonentransport fehlt. Hierbei sind wie bei der Flox-Linie die Exons 15 bis 17 von loxP-Sequenzen flankiert. Die R755Q-Mutation befindet sich im Exon 18. Die mRNA des mutierten Gens war sowohl im Gehirn als auch in der Leber stabil (Abbildung 38A und B). Im Western Blot zeigte sich eine leichte Reduktion des Proteins (Abbildung 38C). Die Quantifizierung mit ImageJ ergab bei heterozygoten Tieren eine Verminderung auf 90% und bei homozygoten Tieren auf 73% im Vergleich zum Wildtyp. Erste Analysen ergaben für die *Atp6v0a2* R755Q Mutanten denselben Phänotyp wie für die Knock-out Tiere. Die homozygoten Tiere zeigen eine ähnliche Wachstumsreduktion wie die *Atp6v0a2*^{-/-} Mäuse, eine dünnere Dermis, eine Migrationsstörung innerhalb des frontalen Kortex und eine Globozoospermie (Guido Vogt, AG Kornak).

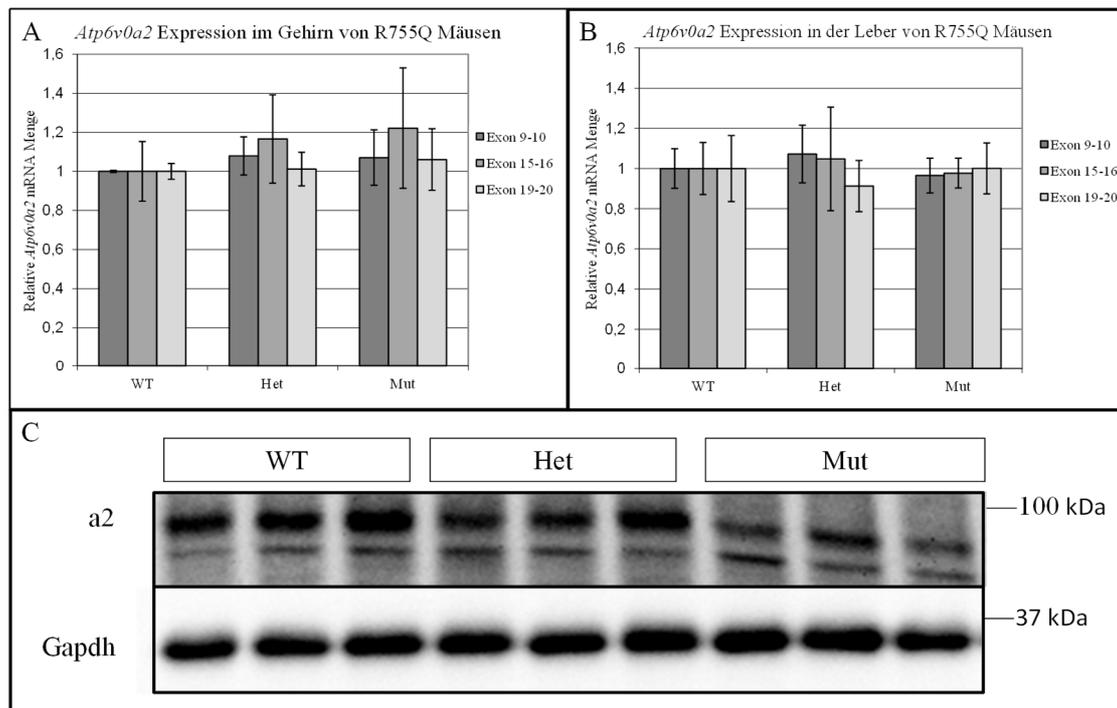


Abbildung 38: Das mutierte *Atp6v0a2* Protein wird in den Knock-in Mäusen exprimiert
 A+B: qPCR auf cDNA aus Gehirn (A) oder Leber (B) von Tieren der R755Q Knock-in Linie, n=3. Es wurde je eine Primerkombination vor (Exon 9-10), in (Exon 15-16) oder hinter (Exon 19-20) den von loxP-Sequenzen umgebenen Bereich des *Atp6v0a2*-Gens gelegt. Die Expression war in Knock-in Mäusen nicht verändert. C: Western Blot aus Gehirnllysaten von Knock-in Mäusen. Die $\alpha 2$ Untereinheit wurde bei ca. 90kDa detektiert. Wie bereits im Blot der Knock-out Mäuse, zeigt die untere Bande eine unspezifische Antikörperbindung an. Die $\alpha 2$ -Untereinheit ist in zwei heterozygoten Tieren leicht reduziert und in den homozygoten Mutanten etwas stärker reduziert. Als Ladekontrolle wurde Gapdh verwendet.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte die Lokalisation der $\alpha 2$ Untereinheit am Golgiapparat in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Der akute Verlust des Proteins führte zu einem komplexen zellulären Phänotyp, der mit Veränderungen des Cholesteringehalts assoziiert war und durch Erhöhung des pH-Werts in den intrazellulären Vesikeln simuliert werden konnte. Es konnten drei Mauslinien erzeugt werden, die die Untersuchung der Funktion der $\alpha 2$ Untereinheit auf zahlreichen Wegen ermöglichen. Mit der *Atp6v0a2* Flox Linie kann die $\alpha 2$ Untereinheit in spezifischen Geweben zu definierten Zeitpunkten deletiert werden. Der komplette Verlust im Knock-out Modell führt zu einem Phänotyp, der durch Veränderungen von Haut, Knochen und Gehirn, dem humanen Phänotyp ARCL2A sehr ähnelt. Zusätzlich zeigt das Mausmodell auch eine Globozoospermie und beleuchtet somit bisher unbekannte Aspekte der Erkrankung. Die Mauslinie mit der R755Q Mutation ermöglicht überdies die verschiedenen Funktionen der $\alpha 2$ Untereinheit unabhängig voneinander zu analysieren.

4.1 Zelltypabhängige Lokalisation der $\alpha 2$ Untereinheit

Da kein geeigneter Antikörper vorlag um die Lokalisation von $\alpha 2$ in Zellen zu untersuchen, wurde das Protein mit einem V5-tag markiert und in HeLa-Zellen viral überexprimiert. Dies erbrachte eine milde, circa 18-fache Überexpression des Proteins, welches klar am Trans-Golgiapparat lokalisierte (Abbildung 11). Dabei wurden keine Artefakte wie ER-Stress, unübliche Frachtvesikel oder vermehrte Apoptose beobachtet, wie sie bei einer Überexpression mittels Plasmiden häufig auftreten. Wie bereits gezeigt wurde, behindern C-terminale Markierungen nicht die Funktion und Stabilität der α Untereinheit¹⁵⁴.

Es wurde eine leichte Färbung im Cytoplasma beobachtet, die spezifisch für die Zellen mit einer Überexpression war, aber mit keinem der untersuchten Marker kolokalisierte. Hierbei könnte es sich um ER-exit sites handeln, da der V0 Komplex inklusive der α Untereinheit im ER assembliert wird und anschließend zum Zielorganell transportiert wird⁴⁴.

Die Lokalisation am Golgiapparat und speziell am Trans-Golgiapparat wurde bereits in verschiedenen Zellen wie Fibroblasten³⁷, Osteoklasten^{45,66} und Epithelzellen des Nebenhodens¹⁵⁵ gezeigt. In Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere hingegen, wurde die a2 Untereinheit in frühen Endosomen und nicht im Golgiapparat detektiert⁶⁷. Die Qualität der verwendeten Antikörper reichte bei den meisten Publikationen jedoch nicht aus, um eine Lokalisation in frühen Endosomen auch in anderen Zelltypen ausschließen zu können. Eine Zelltyp-abhängige Lokalisation des Proteins wäre jedoch möglich, da dies bereits für die anderen a Untereinheiten beschrieben wurde. Die a1 Untereinheit befindet sich in Osteoklasten am Golgiapparat⁶⁶ und in Neuronen in synaptischen Vesikeln und der Plasmamembran⁶⁵. Für die a3 Untereinheit wurde gezeigt, dass sie sich in undifferenzierten RAW264.7 Zellen an den Lysosomen befindet und durch die Differenzierung zu Osteoklasten-ähnlichen-Zellen hauptsächlich an deren Plasmamembran zu finden ist⁶⁶. Sie kann aber auch wie die a1 Untereinheit in sekretorischen Vesikeln gefunden werden⁶⁹. Dies lässt vermuten, dass die verschiedenen a Isoformen überlappende Funktionen haben, die sich aber in den verschiedenen Zelltypen unterscheiden. Möglicherweise werden bestimmte intrazelluläre Kompartimente in den jeweiligen Zellen stark beansprucht oder müssen besonders reguliert werden, sodass der Einsatz mehrere oder einer speziell steuerbaren Untereinheit dort notwendig wird.

Die Kolokalisation der a2 Untereinheit mit dem Trans-Golginetzwerkprotein TGN46 beziehungsweise dessen Maushomolog Tgn38 wurde bereits in Epididymiszellen gezeigt¹⁵⁵. TGN46/Tgn38 befindet sich nicht nur im Trans-Golgiapparat sondern zirkuliert zwischen diesem und der Plasmamembran^{156,157}. Von der Plasmamembran gelangt es durch mit Clathrin bedeckte Einstülpungen in frühe Endosomen und Recycling-Endosomen. Von dort wird ein Teil der Tgn38 Proteine zurück zur Plasmamembran und der andere Teil zum Trans-Golginetzwerk transportiert. In welchem Umfang sich Tgn38 an der Plasmamembran befindet, hängt sowohl vom Zelltyp als auch vom Zellzyklus ab und kann zwischen 1% und 10% schwanken¹⁵⁶. Da die a2 Untereinheit mit TGN46 kolokalisiert, zirkuliert sie möglicherweise in geringem Maße zusammen mit diesem Protein. So könnte ein kleiner Teil der a2 Proteine auch an die Plasmamembran und in die Endosomen gelangen.

In der vorliegenden Arbeit konnte in HeLa-Zellen eine Kolokalisation der a2 Untereinheit mit dem GORAB Protein am Trans-Golgiapparat beobachtet werden. Der

Verlust dieses Proteins führt zu Gerodermia osteodysplastica, einer Erkrankung ähnlich der durch *ATP6VOA2* Mutationen verursachten Cutis laxa (*ARCL2A*). Eine Interaktion beider Proteine konnten wir bisher nicht zeigen, jedoch könnten beide an denselben Prozessen im intrazellulären Transport und der Integrität des Trans-Golgiapparates beteiligt sein.

4.2 pH-Wert abhängige morphologische Veränderungen der Zelle nach siRNA Knock-down von a2

4.2.1 Fragmentierung des Golgiapparates

Der Verlust der a2 Untereinheit wurde in HeLa-Zellen durch den Einsatz von drei verschiedenen siRNAs erzeugt. Alle erbrachten eine Reduktion der mRNA auf 20% oder weniger, sodass das Protein im Western Blot nicht mehr zu detektieren war (Abbildung 12). Trotz der Lokalisation im Golgiapparat war die Morphologie des Golgiapparates in den untersuchten HeLa-Zellen nach Knock-down kaum verändert. Es zeigte sich nur eine Reduktion der TGN46-Färbung (Abbildung 14) was für eine verringerte Stabilität des Trans-Golginetzwerkes sprechen könnte. Die Behandlung von HeLa-Zellen einer anderen Charge mit denselben siRNAs unter Verwendung desselben Protokolls ergab eine deutliche Fragmentierung des Golgiapparates in *Ministacks* (Dimitrios Wagner und Björn Fischer³⁶, AG Kornak). Auch bei Verlust der a2 Untereinheit in Brustepithelzellen von Mäusen war die Struktur des Golgiapparates stark beeinträchtigt¹⁵⁸. In Patientenfibroblasten^{36,37} und ersten Analysen der Fibroblasten der Knock-out Mäuse wurde ein fragmentierter und geschwollener Golgiapparat beobachtet. Somit könnten sowohl der Zelltyp als auch Faktoren wie Seneszenz die Beeinträchtigung des Golgiapparates durch den Verlust der a2 Untereinheit beeinflussen. Dass die a2 Untereinheit in engem Zusammenhang mit Seneszenz steht, konnte in TIG-1 Fibroblasten gezeigt werden¹⁵⁹. Senescente TIG-1 Zellen exprimieren signifikant weniger *ATP6V0A2* als junge Zellen und haben einen geschwollenen Golgiapparat. Der Knock-down von *ATP6V0A2* in jungen TIG-1 Zellen hat dementsprechend ebenfalls eine Fragmentierung des Golgiapparates und zwar speziell des Trans-Golginetzwerkes zur Folge und führt zu gesteigerte Expression von Seneszenzmarkern.

4.2.2 Akkumulation von frühen Endosomen

Die frühen Endosomen akkumulierten durch den siRNA Knock-down von a2 in der Nähe des Golgiapparates (Abbildung 13). Dieser Effekt war jedoch nicht bei allen verwendeten siRNA-Oligonukleotiden gleich stark und korrelierte mit einer Reduktion der *EEA1* RNA und des EEA1 Proteins. Da alle siRNAs einen ähnlich starken

ATP6V0A2 Knock-down nach 72 Stunden vermittelten, könnte die Ursache in einer unterschiedlichen zeitlichen Wirkung der siRNAs liegen, die das Protein beispielsweise früher depletiert oder durch zusätzliche *off-target* Effekte bewirkt werden. Die Verminderung von *EEA1* in RNA und Protein konnte abgeschwächt auch in A549-Zellen beobachtet werden, wobei jedoch die Akkumulation am Golgiapparat nicht eindeutig bestätigt werden konnte (Dimitrios Wagner, AG Kornak). Auch in Milchdrüsen von Mäusen mit einem $\alpha 2$ Knock-out wurde weniger *EEA1* beobachtet, genauso wie in mit $\alpha 2$ siRNA behandelten Brustepithelzellen¹⁶⁰. Somit könnte auch die Schwere dieses zellulären Effekts zelltypabhängig sein.

Eine mögliche Erklärung für die Akkumulation der frühen Endosomen wäre ein Defekt in der Vesikelfusion. Möglicherweise können die frühen Endosomen nicht zu späten Endosomen reifen und somit ihre Fracht nicht abgeben. Für den V0 Subkomplex wird angenommen, dass er die Fusion verschiedener Membranen unterstützt. Dabei wird der α Untereinheit eine besonders große Rolle beigemessen, da sie sowohl in der Membran integriert ist, als auch durch den großen cytoplasmatischen N-Terminus mit anderen Proteinen interagieren kann. Eine genauere Diskussion dieser Funktion findet sich unter Punkt 4.7 Die besondere Bedeutung des *Atp6v0a2* R755Q Modells. Die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Rab5 führt zu einer übermäßigen Fusion der frühen Endosomen. Diese großen Vesikel akkumulieren zwar ebenfalls in Kernnähe⁸³, ähneln morphologisch aber nicht den akkumulierten Endosomen nach $\alpha 2$ Verlust (Abbildung 13).

4.2.3 Akkumulation von Lysosomen

Der siRNA vermittelte Knock-down der $\alpha 2$ Untereinheit führte in HeLa-Zellen zu einer Akkumulation der Lysosomen in der Nähe des Golgiapparates (Abbildung 14). Dieser Effekt war bei allen verwendeten Oligos vergleichbar und auch in A549 Zellen reproduzierbar (Dimitrios Wagner, AG Kornak). Auch in *ATP6V0A2*-Patientenfibroblasten wurde eine vermehrte Zahl von späten Endosomen, Lysosomen und Autophagosomen beobachtet, die akkumulierte Fracht enthielten^{33,36}. Durch den Knock-down von *ATP6V0A2* in HeLa-Zellen wurde auch im Western Blot eine erhöhte Menge des lysosomalen Markerproteins LAMP2 detektiert (Abbildung 14). Zum einen wäre eine gesteigerte mRNA Expression von *LAMP2* möglich als Reaktion auf vermehrte Fracht in den Lysosomen, zum anderen eine erhöhte Stabilität

des Proteins. Veränderungen des pH-Wertes könnten die Aktivität der Hydrolasen in den Lysosomen verringern, sodass die LAMPs eine längere Halbwertszeit haben. Zusätzlich lief die LAMP2 Bande schneller im SDS-Gel (Abbildung 14), was auf eine geringere Größe hindeuten würde. Die LAMPs sind sehr stark glykosyliert¹⁶¹, sodass das veränderte Laufverhalten mit verminderter Glykosylierung erklärt werden könnte. Sowohl die erhöhte LAMP2-Proteinmenge als auch die verschobene Bande im Western Blot können auf den erhöhten Cholesteringehalt der Lysosomen zurückgeführt werden, denn ähnliche Beobachtungen wurden in Fibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick Syndrom Typ C gemacht, welches mit erhöhten Cholesterinmengen in den Lysosomen einhergeht¹⁶². Auch die durch U18666A induzierte Cholesterinakkumulation führt zu einer stärkeren, leicht verschobenen Bande von LAMP2 im Western Blot¹⁶³. Es bleibt dabei offen, ob der Cholesteringehalt die Glykosylierung von LAMP2 direkt beeinflusst oder ob der Abbauprozess im Lysosom verlängert ist, wodurch einige Proteine nur noch teilweise glykosyliert sind.

4.2.4 pH-Wert Abhängigkeit der beobachteten Effekte

Um zu ergründen, ob die Veränderungen nach siRNA-Knock-down von *ATP6V0A2* durch Veränderungen im pH-Wert zu erklären sind, wurden HeLa-Zellen mit Bafilomycin A1 und Chloroquin behandelt. Bafilomycin A1 bindet die c Untereinheit der V-ATPase und verhindert die Rotation des Proteolipidrings. Durch die Inhibierung des Protonentransports aller V-ATPasen steigt der pH-Wert in den Vesikeln an¹⁴⁴. Die schwache Base Chloroquin wird in sauren Vesikeln protoniert, sodass sie diese nicht wieder verlassen kann. Daher erhöht sie ebenfalls den pH-Wert in verschiedenen Zellkompartimenten¹⁴⁵. Sowohl nach Bafilomycin A1 also auch nach Chloroquin Behandlung ähnelten die zellulären Veränderungen denen, die nach dem Knock-down der $\alpha 2$ Untereinheit beobachtet werden konnten. Die Färbung von TGN46 war reduziert, Endosomen, Lysosomen und Cholesterin waren in der Nähe des Golgiapparates akkumuliert (Abbildung 16 und Abbildung 17). Die Effekte waren jedoch ausgeprägter, da durch Bafilomycin A1 alle V-ATPasen der Zelle gehemmt werden, beziehungsweise durch Chloroquin der pH-Wert aller sauren Kompartimente erhöht wird.

Möglicherweise handelt es sich bei den vergrößerten akkumulierten Vesikeln, die durch Bafilomycin A1, Chloroquin oder $\alpha 2$ Knock-down auftreten, um Autophagosomen. Sowohl nach Bafilomycin A1 als auch nach Chloroquinbehandlung waren diese Vesikel

positiv für den Autophagosomenmarker LC3 (unpublizierte Daten, AG Kornak). Dies könnte zum einen darauf hinweisen, dass es zu vermehrter Autophagie kommt, wahrscheinlicher ist jedoch, dass durch den veränderten pH-Wert der Abbau in den Lysosomen und Autophagosomen gehemmt ist und es daher zu einer Akkumulation dieser Vesikel kommt. Die Bildung solcher großen Autophagosomen wurde bereits bei *Drosophila* nach siRNA Knock-down und Knock-out verschiedener Untereinheiten der V-ATPase beschrieben^{164,165}. Dabei konnte gezeigt werden, dass dies nicht auf eine verminderte Fusion oder Fission dieser Vesikel zurückzuführen ist, sondern auf den erhöhten pH-Wert in den betroffenen Vesikeln. Dadurch kann die Fracht in diesen Vesikeln nicht abgebaut werden, sodass sie stark anschwellen und akkumulieren¹⁶⁴.

4.2.5 Akkumulation von Cholesterin

Durch Bafilomycin und Chloroquin zeigte sich wie nach dem a2 Knock-down eine Akkumulation von Cholesterin in der Nähe des Golgiapparates (Abbildung 17). Die großen cholesteringefüllten Vesikel ähneln sehr stark dem zellulären Phänotyp von Patienten mit Niemann-Pick Syndrom Typ C^{120,123,124}. Bei dieser Erkrankung kann Cholesterin die späten Endosomen und Lysosomen nicht verlassen und akkumuliert dort. Diese abnormen Vesikel befinden sich dann ebenfalls in der Nähe des Golgiapparates, da sich dort das Mikrotubuli-organisierende Zentrum befindet¹⁶⁶. Diese Beobachtung wurde nicht nur für Patientenzellen mit Niemann-Pick Syndrom Typ C, sondern auch für andere Speichererkrankungen wie Morbus Fabry gemacht^{131,167}. Ursache ist die Abhängigkeit der Position der Vesikel von ihrem Cholesteringehalt. Der Cholesterinsensor ORP1L reguliert den Dynein abhängigen Transport von Vesikeln, sodass cholesterinreiche Vesikel immer zum Minus Ende der Mikrotubuli, also dem Mikrotubuli-Organisations-Zentrum in der Nähe des Golgiapparates wandern¹³¹.

Die Cholesterinakkumulation nach a2 Knock-down könnte durch einen verminderten pH-Wert in den betroffenen Vesikeln verursacht werden. Jedoch ist die a2 Untereinheit in HeLa-Zellen nicht in diesen Vesikeln lokalisiert. In Photorezeptorzellen von a1 Knock-out *Drosophila* wurde ebenfalls die Akkumulation von vergrößerten späten Endosomen und Autophagosomen beschrieben^{165,168}. Auch dort war der pH-Wert in diesen Vesikeln erhöht, obwohl die a1 Untereinheit in diesen Vesikeln kaum exprimiert war, sondern hauptsächlich in frühen Endosomen lokalisiert war¹⁶⁵. Möglicherweise ist der pH-Wert durch den Verlust der a2 Untereinheit im Trans-Golgiapparat erhöht und

beeinflusst den pH-Wert der mit ihm in Kontakt stehenden Vesikel. Eine Erhöhung des pH-Werts durch V-ATPase Inhibitoren oder mittels eines Knock-downs der c-Untereinheit führt überdies zu einem verminderten Efflux von Cholesterin aus der Zelle¹⁶⁹. Auch ein fehlregulierter Interaktionspartner der $\alpha 2$ Untereinheit wie beispielweise ARNO und somit ARF6, welches essentiell für den intrazellulären Transport ist, könnte für die Ansammlung von Cholesterin in den Vesikeln verantwortlich sein. Durch den veränderten Cholesteringehalt der Vesikel wird umgekehrt auch deren pH-Wert beeinflusst, denn dieser reguliert die Assemblierung der V-ATPase⁵⁵. Somit sind der Cholesteringehalt und die pH-Wert Regulation eng miteinander verbunden.

Eine weitere Hypothese für die Cholesterinakkumulation wäre die übermäßige Produktion dieses Lipids. Diese könnte durch einen Defekt im retrograden Transport verursacht sein. Dass der retrograde Transport in Patientenfibroblasten mit einer *ATP6V0A2* Mutation verzögert ist, zeigt sich durch die Behandlung mit Brefeldin A^{34,37}. Dieses hemmt verschiedene GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) für ARF1¹⁷⁰. Dadurch werden zahlreiche Proteine vom Golgiapparat zurück ins ER transportiert¹⁷¹. Ein Grund für die Inhibierung dieses retrograden Transports in den ARCL2 Patienten könnte ein erhöhter pH-Wert im Golgiapparat sein. Eine andere Ursache wäre das Fehlen des Proteins selbst und die fehlenden Proteininteraktionen, zum Beispiel mit ARNO. Auch ARNO ist ein GEF für ARF1, wird aber nicht durch Brefeldin A gehemmt¹⁷². Durch die fehlende $\alpha 2$ Untereinheit in den Patientenzellen könnte mehr freies ARNO im Cytoplasma der Zelle vorliegen, welches dann die Hemmung anderer ARF1 GEFs kompensieren kann. Vereinfacht würde das bedeuten, dass wenn die $\alpha 2$ Untereinheit am Trans-Golgiapparat fehlt, sie ARNO dort nicht bindet. ARNO interagiert daher verstärkt mit ARF1 an anderen Orten. Da ARNO nicht durch Brefeldin A gehemmt wird, hat dieses nur einen schwachen Effekt auf Zellen ohne $\alpha 2$.

Die Inhibierung des retrograden Transports führt zu einer vermehrten Produktion von Cholesterin. Dies konnte bereits durch den siRNA vermittelten Knock-down von β -COP gezeigt werden und beruht auf der Regulation der *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs)^{173,174}. Sie werden nach der Synthese im ER an das *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP) gebunden. Bei geringem Cholesteringehalt im ER werden beide über COPII-Vesikel in den Golgiapparat transportiert, dort werden die SREBPs proteolytisch aktiviert und ermöglichen im Zellkern die Transkription wichtiger Gene

für die Cholesterinproduktion¹²⁵⁻¹²⁷. Neuere Studien zeigen, dass ein Teil der SREBP-SCAP Komplexe unabhängig vom Cholesteringehalt des ERs immer zwischen ER und Golgiapparat zirkulieren. Dabei nutzen sie für den retrograden Transport COPI-Vesikel. Werden diese gehemmt, kommt es zu einer übermäßigen Prozessierung von SREBPs im Golgiapparat und somit zu einer vermehrten Transkription Cholesterin produzierender Gene¹⁷³. Eine Hemmung des retrograden Transports hat also eine vermehrte Produktion von Cholesterin zur Folge und könnte den zellulären Phänotyp nach *ATP6V0A2* Knock-down erklären.

4.2.6 Einfluss auf den intrazellulären Transport

Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass nicht nur die Zellmorphologie durch den Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit beeinflusst wird, sondern auch die Funktion des intrazellulären Transports stark eingeschränkt ist. So ist beispielsweise in HeLa-Zellen nach siRNA Knock-down von *ATP6V0A2* die Endozytose von Transferrin stark eingeschränkt. Transferrin wird zwar in die Zelle aufgenommen, verbleibt jedoch unter der Plasmamembran, da es nicht weiter transportiert wird und keine Kollokalisierung mit EEA1 in den frühen Endosomen beobachtet werden kann¹⁷⁵. Auch der Knock-down anderer Untereinheiten der V-ATPase hemmt die Abschnürung von Clathrin bedeckten Einstülpungen (*Clathrin coated pits*) von der Plasmamembran, sodass diese dort akkumulieren¹⁷⁶. Dieser Effekt wurde auch nach Langzeitbehandlung von HeLa-Zellen mit Bafilomycin A1 beobachtet und könnte auf den verringerten Cholesteringehalt der Plasmamembran zurückzuführen sein. Dadurch, dass das Cholesterin innerhalb der Zelle akkumuliert und an der Plasmamembran fehlt, wäre für die Abschnürung der mit Clathrin bedeckten Einstülpungen zu viel Energie nötig. In diesem Fall behob die Zugabe von Cholesterin den Phänotyp teilweise¹⁷⁶. Eine Reduktion von Cholesterin könnte folglich einen nachteiligen Effekt auf die Endozytose haben. Die Notwendigkeit der $\alpha 2$ Untereinheit für die Endozytose von IGF und Albumin wurde ebenfalls bereits beschrieben^{67,175}.

Nicht nur die Aufnahme von Proteinen in die Zelle, sondern auch deren weiterer Transport innerhalb des Endo-Lysosomalen System ist pH-Wert abhängig. So wird der Transport von frühen zu späten Endosomen durch Bafilomycin A1 inhibiert^{114,115,177}. Bei diesem Prozess wird möglicherweise ARF1 in Abhängigkeit vom pH-Wert an die Vesikel gebunden und steuert so die Rekrutierung von COP-Proteinen, welche für die

Sortierung der Fracht in die ILVs notwendig sind¹¹⁵. ARNO wiederum reguliert die ARF1 Aktivität, sodass hier auch die Proteininteraktion mit der α Untereinheit und ihre Funktion als pH-Sensor eine Rolle spielen könnten. Bei korrektem pH-Wert könnte ARNO an die $\alpha 2$ Untereinheit binden und so die Bildung der ILVs ermöglichen, während bei erhöhtem pH-Wert die Konformation des $\alpha 2$ Proteins so verändert sein könnte, dass sie nicht mehr mit ARNO interagiert und somit keine ILVs abgeschnürt werden.

Besonders interessant im Kontext des Phänotyps der ARCL2A Patienten ist ein möglicher Defekt in der Exozytose, denn das könnte zu den beobachteten Veränderungen in der extrazellulären Matrix führen. So führte der siRNA vermittelte Knock-down von *ATP6V0A2* zu einer verminderten Sekretion von IL-8¹⁵⁹ und Patientenfibroblasten konnten Tropoelastin nicht normal ausschleusen, sondern häuften dieses in intrazellulären Vesikeln an³⁶.

Einige Aspekte des zellulären Phänotyps nach $\alpha 2$ siRNA Knock-down zeigen sich auch in Patientenfibroblasten. Dazu gehört der fragmentierte Golgiapparat und die Verzögerung im retrograden Transport^{36,37}. Andere Beobachtungen, wie eine Akkumulation von Endosomen und Lysosomen, sind in Patientenfibroblasten weniger ausgeprägt und können nur in der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden³⁶. Eine Fehlverteilung von Cholesterin konnte bisher in Patientenzellen nicht bestätigt werden. Hierfür kann es verschiedene Ursachen geben. Zum einen führt die siRNA Behandlung zu einem akuten Verlust des Proteins, während Patientenfibroblasten diesen durch die Regulation anderer Proteine teilweise kompensieren können. Zum anderen sind Fibroblasten nur einer der Zelltypen, die bei der ARCL2A pathologische Veränderungen zeigen. Sie sind in ihren Kultivierungsbedingungen recht anspruchslos und unempfindlich. Möglicherweise sind andere Zelltypen wesentlich anfälliger für eine Fehlverteilung von Cholesterin, so dass beispielsweise die Analyse von Neuronen des Knock-out Modells hier weitere Anhaltspunkte liefern könnte.

4.2.7 Modell der zellulären $\alpha 2$ Defizienz

Fasst man die Beobachtungen dieser Arbeit mit den bisher beschriebenen Effekten zusammen, kann man ein Modell für die zellulären Veränderungen durch Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit erstellen. Dieses soll hier anhand der Abbildung 39 vereinfacht dargestellt werden: Durch das Fehlen der $\alpha 2$ Untereinheit am Trans-Golgiapparat könnte der pH-Wert dort erhöht sein und der Golgiapparat fragmentiert (Abbildung 39 (1)). Dies führt zu einem ebenfalls leicht erhöhten pH-Wert in den Endosomen, da diese im ständigen Austausch mit dem Trans-Golgiapparat stehen (Abbildung 39 (2)). Dadurch ist die Interaktion, der sich an den Endosomen befindlichen α Untereinheiten mit ARNO reduziert. Dies vermindert die Rekrutierung von ARF1 und somit von COP-Proteinen und schließlich die Bildung von späten Endosomen. Somit könnte Fracht in den frühen Endosomen akkumulieren (Abbildung 39 (2)). Parallel ist möglicherweise der pH-Wert in den Lysosomen und Autophagosomen erhöht, sodass die enthaltene Fracht nicht abgebaut werden kann und die Vesikel deutlich vergrößert sind (Abbildung 39 (3)). Die Inhibierung des retrograden Transports nach $\alpha 2$ Verlust könnte ebenfalls über die Interaktion mit ARNO und ARF1 erklärt werden und führt zu einer vermehrten Produktion von Cholesterin, welches sich in den Endosomen anhäuft. Da der intrazelluläre Transport inhibiert ist, kann das Cholesterin nicht zur Plasmamembran transportiert werden. Dessen Fehlen dort führt zu einer Inhibierung der Endozytose (Abbildung 39 (4)). Die Cholesterin gefüllten Vesikel akkumulieren aufgrund der Interaktion mit dem Cholesterinsensor ORP1L in der Nähe des Golgiapparates am Mikrotubuli-Organisationszentrum (Abbildung 39 (5)). Die Beeinträchtigung des intrazellulären Transports führt schlussendlich auch zu einer verminderten Exozytose. Da Cholesterin ein Schlüsselement in diesem Zellphänotyp ist, könnte eine Reduktion des zellulären Cholesterins wie bei Niemann-Pick Syndrom Typ C^{178,179} zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufs der ARCL2A Patienten führen.

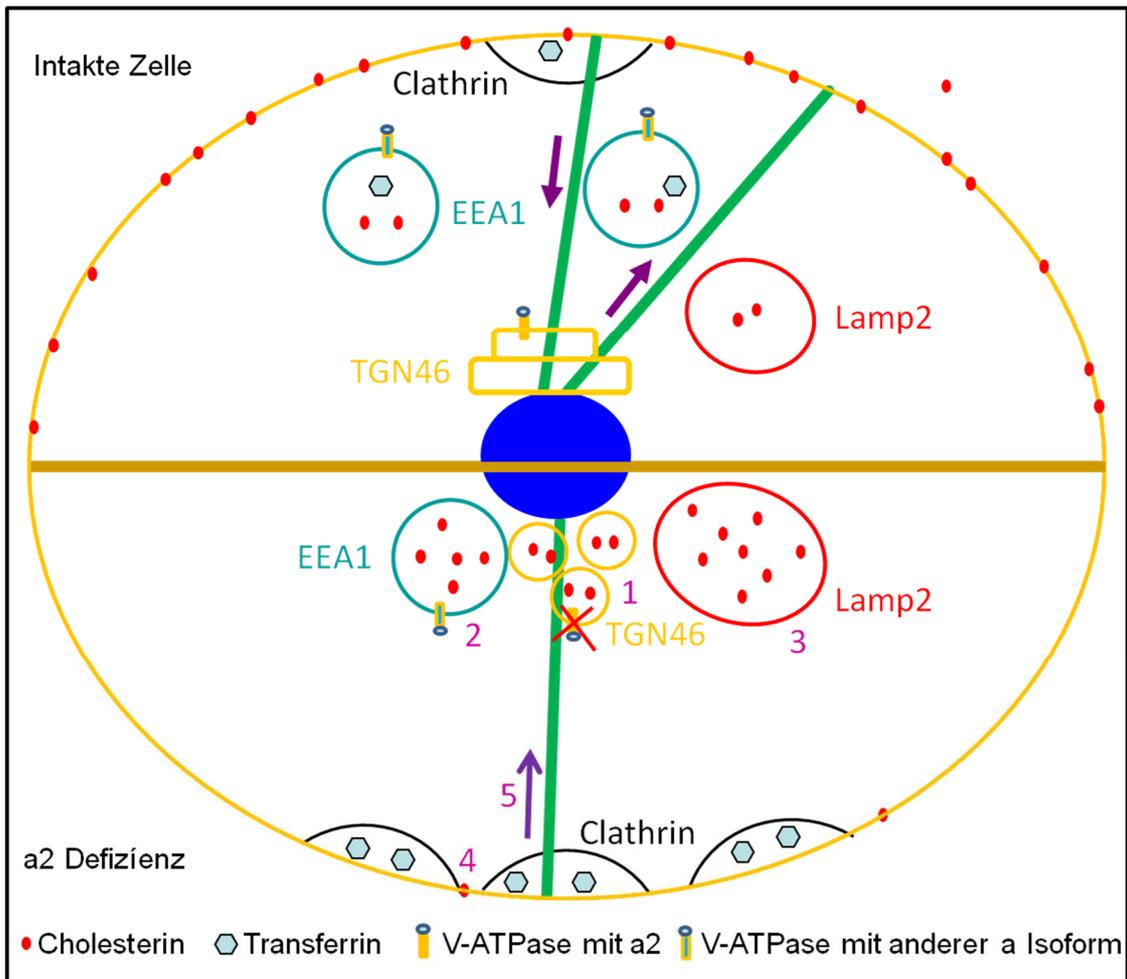


Abbildung 39: Der Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit führt zu einem Cholesterin assoziierten zellulären Phänotyp

In der intakten Zelle befindet sich die $\alpha 2$ Untereinheit am Trans-Golgiapparat. Durch ihren Verlust fragmentiert der Golgiapparat (1). In den Endosomen (2) und Lysosomen (3) sammelt sich Cholesterin, sodass sich diese Vesikel nicht wie in der intakten Zelle entlang der Mikrotubuli in beide Richtungen bewegen können, sondern am Mikrotubuli-Organisationszentrum akkumulieren (5). Der Cholesterinmangel an der Plasmamembran führt zur Ansammlung von *clathrin coated pits* und somit zur Inhibierung der Endozytose (4).

4.3 Die *Atp6v0a2* Expression ist relativ stabil in verschiedenen Geweben

Die Untersuchung der *Atp6v0a2* mRNA Expression in Geweben von Mäusen verschiedenen Alters ergab einen bis zu 24-fachen Unterschied bei Normalisierung auf die *Gapdh* mRNA Menge beziehungsweise bis zu 9-fach, wenn auf *Aktin* normalisiert wurde (unpublizierte Daten, AG Kornak). Dass diese beiden endogenen Kontrollen in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden, konnte bereits für mehrere Organismen gezeigt werden^{133,180}. Eine solche Schwankung während verschiedener Entwicklungszeitpunkte eines Organs erscheint ebenfalls plausibel. In Abbildung 18 scheint die *Atp6v0a2* Expression im Alter von 5 Monaten in den meisten Geweben erhöht zu sein. Dies konnte jedoch bei genauerer Analyse auf eine verminderte *Aktin* Expression zu diesem Zeitpunkt zurückgeführt werden. Die Schwankung der *Atp6v0a2* mRNA-Menge zwischen verschiedenen Geweben zu verschiedenen Entwicklungsstadien ist ungefähr genauso groß wie die der endogenen Kontrollen, denn *Aktin* schwankte ungefähr um das 30-fache, wenn es auf *Gapdh* normalisiert wurde (unpublizierte Daten, AG Kornak). Dies lässt darauf schließen, dass die a2 Untereinheit recht stabil exprimiert wird und somit eine ubiquitäre Funktion innerhalb der Zelle hat. Bestätigt wird dies durch den syndromalen Phänotyp der ARCL2A Patienten, bei denen verschiedene Organe wie Gehirn, Knochen, Leber, Fettgewebe und Haut betroffen sind. Zum Teil sind auch weitere Organe wie die Augen in Mitleidenschaft gezogen. In den betroffenen Organen ist die a2 Untereinheit sowohl für deren Entwicklung als auch für deren Funktionalität im adulten Organismus notwendig. Wenn die a2 Untereinheit in allen Zellen exprimiert wird, warum ist ihr Verlust dann nicht letal? Eine Erklärung ist die große Ähnlichkeit der vier verschiedenen a Untereinheiten untereinander¹⁸¹. Da sie überlappend in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert sind, könnten die anderen Isoformen den Verlust der a2 Untereinheit teilweise kompensieren. So führt der Verlust der a4 Untereinheit nur zu einer auf den distalen Tubulus beschränkten renalen Azidose, weil im proximalen Tubulus die anderen Isoformen die gleichen Aufgaben wie die a4 Untereinheit übernehmen⁷⁰. In *oc/oc* Mäusen, in denen die a3 Untereinheit deaktiviert ist, wurde eine kompensatorische gesteigerte Expression der a2 Untereinheit im Pankreas beobachtet⁶⁹. In den embryonalen Fibroblasten der *oc/oc* Mäuse hingegen war die a1 Untereinheit verstärkt exprimiert¹⁸². In Hautfibroblasten von zwei ARCL2A Patienten konnte eine

erhöhte Expression der a3 Untereinheit nachgewiesen werden (Diplomarbeit Björn Fischer-Zirnsak, AG Kornak). In Brustdrüsen von Mäusen mit einem spezifischen Verlust der a2 Untereinheit, wurde eine leicht erhöhte aber nicht signifikant veränderte Expression der a1 Untereinheit beobachtet¹⁶⁰. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar in Gehirn und Leber keine kompensatorische Expression der anderen Untereinheit nachgewiesen (Abbildung 30), jedoch ist sie dadurch nicht für alle Gewebe auszuschließen.

4.4 *Atp6v0a2* Zielvektordesign mit Vor- und Nachteilen

Für die Erzeugung der verschiedenen *Atp6v0a2* Mausmodelle wurden Zielvektoren mit dem *Recombineering* Verfahren erzeugt. Für diese Technik müssen mehrere Vektoren durch klassische Klonierung erzeugt werden, die anschließend durch mehrere homologe Rekombinationen miteinander kombiniert werden. Nach jedem Schritt muss der erzeugte Vektor überprüft werden und zum Teil in einen anderen Bakterienstamm transformiert werden. Daher benötigte die Erzeugung des Zielvektors mehrere Monate. Zurzeit wird die CRISPR-Cas9-Technik vermehrt zur Erzeugung transgener Mäuse genutzt¹⁸³. Der Klonierungsaufwand ist äußerst gering, da nur eine kleine ca. 20bp große Guide RNA erzeugt werden muss, um Cas9 an die gewünschte Stelle der DNA zu bringen, die anschließend geschnitten und modifiziert werden kann. Im Anschluss an die Klonierung ist der Zeitaufwand für die Erzeugung der gewünschten Mutationen in den embryonalen Stammzellen vergleichbar bei beiden Methoden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zielvektoren enthalten zwei Flox-Sequenzen. Das *Atp6v0a2* Gen wird in den Flox-Tieren normal exprimiert (Abbildung 25), kann jedoch nach Wunsch durch Verpaarung mit entsprechenden Cre-Linien in speziellen Geweben oder Entwicklungsstadien ausgeschaltet werden kann. Dies bringt den Vorteil mit sich, dass der Einfluss einzelner Zelltypen auf den Gesamtphänotyp besser untersucht werden kann. Bisher ist die Insertion dieser Flox-Sequenzen mittels CRISPR-Cas9 noch nicht so etabliert wie das direkte Erzeugen von Mutationen. Das komplette Abschalten eines Gens bringt jedoch das Risiko mit sich, dass die modifizierten Zellen oder Mäuse nicht lebensfähig sind. Durch die ubiquitäre Expression von *Atp6v0a2* und den syndromalen Phänotyp der Patienten war die Verwendung des Flox-Systems daher notwendig.

Für das Knock-out Modell wurde eine Deletion von Exon 15 bis 17 des *Atp6v0a2* Gens erzeugt, die zu einer Verschiebung des Leserasters und einem verfrühten Stoppcodon kurz nach Exon 14 führt. Die Deletion wurde recht weit am 3'-Ende des Gens erzeugt, weil nur ein Bacmid mit diesem Sequenzbereich für die Klonierung zur Verfügung stand. Die mRNA Menge konnte durch *nonsense mediated mRNA decay* auf 21% im Gehirn und 13% in der Leber reduziert werden und führte zu einem Verlust des *Atp6v0a2* Proteins (Abbildung 27). Es wurde keine mRNA und kein Protein detektiert, welches aus einem Teil des Gens erzeugt wird, das sich vor der Deletion befindet

(Abbildung 28). Somit wurde das Ziel erreicht einen kompletten Knock-out ohne Restfunktion zu erzeugen.

Auch in den heterozygoten Tieren führte die Mutation des einen Allels zu einer starken Reduktion der gesamt *Atp6v0a2* mRNA Menge auf ca. 60% und zu einer verminderten Proteinmenge von ungefähr 54%. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch die heterozygoten Tiere einen schwachen Phänotyp zeigen. Sowohl in der Größe, als auch im Gehirnaufbau und der Fertilität unterschieden sie sich nicht signifikant von den Wildtypgeschwistern. In weiteren Analysen sollten jedoch milde Defekte in Betracht gezogen werden.

Durch die erzeugte Deletion im *Atp6v0a2*-Gen könnte auch die Expression weiterer Gene beeinträchtigt werden. Da regulatorische Sequenzen sich auch auf weit entfernte Regionen auswirken können, kann dies nicht ausgeschlossen werden. Die Analyse der Expression der umliegenden Gene zeigte jedoch keine Auffälligkeiten in den untersuchten Geweben (Abbildung 29). Die Erzeugung einer Punktmutation durch den R755Q Kock-in Vektor verringert das Risiko unerwünschter Effekte auf andere Gene. Da das Knock-out und das Knock-in Mausmodell in ersten Analysen einen sehr ähnlichen Phänotyp zeigen, ist es unwahrscheinlich, dass die Deletion einen maßgeblichen Effekt auf weitere Gene hat. Ein negativer Effekt durch die Flox-Sequenzen kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die *Atp6v0a2* Flox-Mäuse keinen Phänotyp zeigen.

Durch das Design der Zielvektoren konnten die ES-Zellklone mit Geneticin selektiert werden, sodass von den überlebenden Klonen 22,5% eine Rekombination mit dem Knock-out Vektor beziehungsweise 14% eine Rekombination mit dem Knock-in Vektor zeigten. Hierbei erwies sich die Evaluation der Klone mittels quantitativer PCR als zeitsparend und effizient, denn die so ausgewählten Klone konnten mit allen weiteren Methoden, wie Southern Blot, klassische PCR und Sequenzierung bestätigt werden. Auch für die Detektion einer möglichen Trisomie 8 in den embryonalen Stammzellen war die qPCR effizient, zeitsparend und kostengünstig. Da Trisomie 8 den Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft, sodass sie besonders große gut strukturierte Klone bilden, handelt es sich um ein häufiges Problem bei der Erzeugung von transgenen Mäusen¹⁴⁶. So war die Aggregation von fünf Kock-out und Knock-in Klonen erfolglos, weil, wie für einige von diesen gezeigt, Trisomie 8 ein Überleben der transgenen Embryonen

verhinderte (Tabelle 46). Mit der hier verwendeten qPCR Methode, können Klone schnell und günstig überprüft und für die Selektion ausgewählt werden.

4.5 Der Phänotyp der *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse ähnelt dem der ARCL2A Patienten

Mutationen im *ATP6V0A2* Gen führen beim Menschen zum Phänotyp der autosomal rezessiven Cutis laxa Typ 2a (ARCL2A). Die homozygoten Knock-out Mäuse unterscheiden sich von ihren Wildtypgeschwistern durch die verringerte Körpergröße und vermindertes Gewicht, das bereits ab der Geburt festgestellt werden kann. Bei ARCL2A Patienten wird in der Regel keine intrauterine Wachstumsreduktion beobachtet, jedoch tritt diese zum Teil nach der Geburt auf^{36,37}.

4.5.1 Veränderungen der Haut bei Maus und Mensch

Das Kernmerkmal, welches bereits kurz nach der Geburt der betroffenen Kinder zur Diagnose Cutis laxa führt, ist deren inelastische Haut. Dies kann bei dem *Atp6v0a2* Knock-out Modell nicht beobachtet werden. Betrachtet man andere Mausmodelle für Cutis laxa, so haben Mäuse mit Fibulin 5 Mutation große, hängende Hautfalten¹⁸⁴. Dieses Protein ist direkt an der Vernetzung der elastischen Fasern beteiligt⁸. Die Mausmodelle für andere Formen der Cutis laxa sind entweder sehr früh letal oder zeigen keine auffallende Faltung der Haut. So sterben auch *Gorab* Knock-out Mäuse kurz nach der Geburt. Ihre Haut ist geschwollen und die Entwicklung der Haarfollikel gestört¹⁵¹. Bei Mäusen mit *Pycr1* oder *Ltbp4* Verlust ist die Haut äußerlich nicht verändert, jedoch ist die Dicke der Dermis reduziert^{150,152}. Auch bei den *Atp6v0a2* Knock-out Mäusen war die Dermis reduziert (Abbildung 32), möglicherweise weil sich dort der Hauptteil der elastischen Fasern befindet. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Hautfalten bei Mäusen ist das *panniculus carnosus*, eine Muskelschicht welche im Menschen stark reduziert ist und der murinen Haut eventuell mehr Stabilität beziehungsweise Flexibilität verleiht¹⁴⁹.

Die Fibroblasten der Dermis produzieren lösliches Tropoelastin, das nach Passage des Golgiapparates aus der Zelle transportiert wird. Dabei führt der niedrige pH-Wert in den sekretorischen Vesikeln dazu, dass Tropoelastin gelöst bleibt. Außerhalb der Zelle erfolgt die Koazervation, wobei sich zuerst mehrere Tropoelastinmoleküle zusammenlegen und diese anschließend durch Lysyloxidasen an den Mikrofibrillen vernetzt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Patientenfibroblasten eine verminderte Sekretion von Tropoelastin aufweisen, da dieses intrazellulär zu

akkumulieren scheint³⁶. Eine mögliche Erklärung ist ein erhöhter pH-Wert im Trans-Golgiapparat und den sekretorischen Vesikeln, sodass Tropoelastin bereits in der Zelle unlösliche Aggregate bildet¹⁸⁵. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass ein erhöhter pH-Wert in intrazellulären Vesikeln, verursacht durch Bafilomycin A1, Chloroquin oder Ammoniumchlorid, ebenfalls zu einer Akkumulation von Tropoelastin in der Zelle führt¹⁸⁶. Das extrazelluläre Elastin von ARCL2 Patientenfibroblasten war hauptsächlich globulär und weniger fibrillär angeordnet³⁶.

Auch bei Neuraminidase Knock-out Mäusen wurden veränderte Elastinfasern beschrieben¹⁸⁷, wobei dies auf einen Defekt bei der Sekretion zurückzuführen sein könnte. Neuraminidase entfernt Sialinsäuren von Glykoproteinen und rückt somit auch die Glykosylierung von Proteinen der extrazellulären Matrix in den Fokus. Dass die O-Glykosylierung einen großen Einfluss auf die extrazelluläre Matrix haben kann, wurde bereits gezeigt¹⁸⁸. Im Gegensatz zu Elastin sind Kollagen und Decorin stark glykosyliert. Bei Verlust des *Gorab* Proteins konnte eine Fehlglykosylierung von Decorin nachgewiesen werden, die den Aufbau der Kollagenfibrillen in Haut und Knochen beeinträchtigte¹⁸⁹. Auch der Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit scheint einen Einfluss auf die Kollagenstruktur zu haben. Bei Mäusen mit einem *Atp6v0a2* Verlust in den Brustepithelzellen war der Kollagengehalt des Gewebes reduziert, sodass es weicher wurde¹⁵⁸. Dadurch waren Tumore, die in diese Brustgewebe implantiert wurden, weniger stabil, bildeten jedoch mehr Metastasen.

Somit ist die verminderte Dicke der Dermis ein häufig beobachteter Phänotyp bei *Cutis laxa* Mausmodellen und könnte bei den *Atp6v0a2* Mäusen auf den Defekt im intrazellulären Transport und somit auf die verminderte Sekretion von Elastin und weiteren Proteinen der extrazellulären Matrix zurückgeführt werden.

4.5.2 Veränderungen der Knochen bei Maus und Mensch

Fünf Wochen alte *Atp6v0a2* Knock-out Mäuse zeigen eine Verminderung des trabekulären und des kortikalen Knochens (Abbildung 33). Bei 12 Wochen alten Mäusen ist diese Reduktion weniger stark ausgeprägt, sodass von einer Verbesserung des Knochenphänotyps ausgegangen werden kann. Ähnliches wurde bei *Pycr1* Knock-out Mäusen beobachtet und könnte mit einem verzögerten Knochenaufbau im Rahmen des Wachstums erklärt werden¹⁵². In den Wirbeln der *Atp6v0a2* Knock-out

Mäuse waren kaum Unterschiede zu Wildtyptieren zu beobachten und es gab keine Anzeichen für Knochenbrüche bei den homozygoten Tieren. Auch die ARCL2A Patienten haben eine verminderte Knochendichte in Form einer Osteopenie, die jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie bei anderen Erkrankungen des Cutis laxa Spektrums^{41,190}. Die Ursache könnte auch hier im defekten intrazellulären Transport und dadurch gestörter Sekretion von Matrixproteinen liegen und muss tiefergehend histologisch untersucht werden.

4.5.3 Veränderungen des Gehirns bei Maus und Mensch

Da die Patienten auffällige Hirnfehlbildungen zeigen, wurde dies auch beim *Atp6v0a2* Knock-out Modell untersucht. Bei den Patienten ist die Gyrierung des frontalen und parietalen Kortex reduziert, sodass eine Pflasterstein-Lissenzephalie diagnostiziert werden kann³⁵. Im Rahmen der Evolution der Wirbeltiere kam es zu einer Gyriifikation des Großhirns, wodurch dessen Oberfläche sehr stark vergrößert wurde^{191,192}. Das Großhirn von Mäusen ist jedoch nicht gyriert, sodass nicht exakt derselbe Phänotyp wie beim Menschen beobachtet werden kann. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass in den *Atp6v0a*^{-/-} Mäusen die Neuronen nicht dem üblichen Aufbau des Kortex folgen (Abbildung 34). Die sonst gut abgrenzbare äußere Kortexschicht *Lamina molecularis* war nicht wie in Wildtyptieren zellarm, sondern stellenweise mit NeuN positiven Neuronen gefüllt. Diese Veränderungen lagen besonders häufig im frontalen Kortex, waren zum Teil jedoch leicht parietal gelegen. Es könnte sich um eine Migrationsstörung der Neuronen handeln, die sich beim Menschen in einer verminderten Gyrierung zeigt. Veränderungen des Cerebellums, wie sie auch bei Patienten gelegentlich auftreten, konnten nicht beobachtet werden, müssen jedoch zukünftig noch gezielter untersucht werden. Am Ende der ersten Lebensdekade bekommen die betroffenen Kinder häufig schwer medikamentierbare Krampfanfälle, die zum Teil zu einer mentalen Retardierung führen können oder auch den Tod der Patienten zu Folge haben können³⁵. Sowohl bei einigen *Atp6v0a2* Knock-out Tieren als auch bei einigen Knock-in Mäusen treten diese Krampfanfälle ebenfalls auf.

Eine mögliche Ursache für die neuronalen Schäden könnte eine veränderte Cholesterinverteilung sein. Das Gehirn ist besonders reich an Cholesterin wobei dieses hauptsächlich im Myelin enthalten ist¹⁹³. Daher sind Erkrankungen wie die Alzheimer- und die Parkinson-Krankheit mit veränderten Cholesterinverteilungen im Gehirn

assoziiert. Auch Lysosomale Speichererkrankungen wie Niemann-Pick Syndrom Typ C, bei dem es zu einer Akkumulation von Cholesterin in Neuronen kommt, sind häufig von einer Neurodegeneration begleitet¹⁹⁴. Nicht nur für die Homöostase des Gehirns, sondern auch für die Entstehung der neuronalen Schichten in der Embryonalentwicklung ist Cholesterin wichtig. Reelin ist essentiell für die Migration und Reifung von Neuronen, so dass in Reelin Knock-out Mäusen (Reeler-Mäusen) die Schichtung des Hippocampus und des Neokortex gestört ist^{195,196}. Die wichtigsten neuronalen Rezeptoren für Reelin sind die Lipoproteinrezeptoren Apoer2 und Vldlr, deren Knock-out ebenfalls zu Migrationsstörungen führt¹⁹⁷. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass Reelin verschiedene Lipide im Gehirn reguliert¹⁹⁸, so dass Lipidkomposition und Schichtung des Gehirns miteinander gekoppelt zu sein scheinen.

Da es sich bei den Krampfanfällen um das schwerste Symptom der ARCL2A handelt, ist hier weitere Forschung dringend notwendig. Zum einen könnten die hier erzeugten Modelle die Genese der Hirnfehlbildung aufklären, zum anderen bieten sie die Möglichkeit Behandlungsmethoden vor der Anwendung am Patienten im Mausmodell mit derselben Krankheitsursache zu testen.

4.5.4 Veränderte Spermien im Mausmodell

Überraschenderweise sind männliche *Atp6v0a2*^{-/-} Mäuse infertil. Ihre Spermien haben runde Köpfe im Sinne einer Globozoospermie und bewegen sich kaum (Abbildung 35). Spermien werden vom Hoden, dem Ort ihrer Bildung, in die Nebenhoden transportiert und dort gelagert. Um die Spermien im Nebenhoden in der sogenannten „Säurestarre“ zu halten, muss dort ein niedriger pH-Wert herrschen. Dieser wird durch die V-ATPasen erzeugt, die Protonen ins Lumen sezernieren. Während viele Untereinheiten der V-ATPase in den Zellen des Nebenhodens an der Plasmamembran gefunden wurden, konnte die $\alpha 2$ Untereinheit in der Nähe des Trans-Golgiapparates nachgewiesen werden¹⁵⁵. Es ist also eher unwahrscheinlich, dass die Spermiendefekte, die in den Knock-out Mäusen beobachtet werden, durch einen veränderten pH-Wert im Nebenhoden auftreten. Wie die Färbungen des Hodens zeigen (Abbildung 35), ist die Morphologie der Spermien bereits dort verändert.

Da die $\alpha 2$ Untereinheit in vielen Zellen am Trans-Golgiapparat detektiert wurde, könnte dies auch auf die runden Spermatozoen zutreffen. Das Akrosom wird durch die

Abschnürung von Vesikeln vom Golgiapparat gebildet^{199,200}. Daher könnte ein Defekt in der Vesikelfusion oder der Integrität des Golgiapparates zu kugelhköpfigen Spermien führen. Ähnliches wurde bei *Pick1* Knock-out Mäusen beschrieben. Dieses Protein reguliert die Bindung verschiedener Interaktionspartner an Membranen und sorgt somit beispielsweise für die Beladung von Vesikeln²⁰¹. Es befindet sich in runden Spermatischen unter anderem am Golgiapparat, sodass sein Verlust zu einem Verbleib der Spermatischen in der Golgiphase führt²⁰². Während gesunde Spermatischen in der Golgiphase Material zum Akrosom transportieren, dieses sich dann in der *cap phase* als Kappe auf den Kern legt und während der Akrosomenphase in die Länge zieht, bleiben bei den *Pick1*^{-/-} Mäusen proakrosomale Vesikel bestehen. *Pick1* interagiert außerdem mit *Gopc*, welches ebenfalls in den runden Spermatischen am Trans-Golgiapparat zu finden ist²⁰². Es scheint wie *Pick1* am Transport vom Golgiapparat zum Akrosom beteiligt zu sein, sodass man bei den Knock-out Mäusen einen ähnlichen Phänotyp mit zahlreichen proakrosomalen Vesikeln findet, die nicht verschmelzen²⁰³. Auch der Verlust von *Hrb*, welches an der Fusion der proakrosomalen Vesikel beteiligt ist, führt zu Globozoospermie²⁰⁴. Das kugelhköpfige Spermien auch bei Verlust von *Atg7* beobachtet werden können, deutet zusätzlich auf eine Interaktion von proakrosomalen Vesikeln mit Autolysosomen hin. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass auch eine Erhöhung des pH-Werts in den intrazellulären Vesikeln der Spermien durch Ammoniumchlorid und Chloroquin zu runden Spermienköpfen führt²⁰⁵. Folglich scheint auch die pH-Wert Regulation essentiell für die Ausbildung des Akrosoms zu sein.

Somit entsteht durch den Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit eine Globozoospermie, die der durch *Pick1* oder *Gopc* Verlust ähnelt und auf eine Funktion im Transport vom Golgiapparat zum Akrosom zurückzuführen sein könnte.

Tatsächlich befindet sich die $\alpha 2$ Untereinheit sowohl in den elongierten Spermatischen des Hodens als auch in den Spermien des Nebenhodens am Akrosom²⁰⁶. Sie könnte während der Bildung des Akrosoms vom Golgiapparat dorthin transportiert worden sein. Das Akrosom weist viele Parallelen zu Lysosomen auf, denn es hat einen sauren pH-Wert von ca. 5,3, der für die Prozessierung von Hydrolasen notwendig ist, die bei der Akrosomreaktion freigesetzt werden und die *Zona pellucida* abbauen²⁰⁷. Dieser pH-Wert wird durch V-ATPasen aufgebaut und kann durch Bafilomycin A1 Behandlung neutralisiert werden²⁰⁶. Da die $\alpha 2$ Untereinheit die einzige Isoform der

a Untereinheit ist, die am Akrosom nachgewiesen wurde, ist sie sehr wahrscheinlich essentiell für dessen Ansäuerung.

Der Einfluss der $\alpha 2$ Untereinheit auf die Spermatogenese von Mäusen wurde bereits durch die intraperitoneale Injektion eines anti- $\alpha 2$ -Antikörpers über 10 Tage untersucht^{208,209}. Nach dieser Behandlung fanden sich weniger postmeiotische Zellen im Hoden der Mäuse, also sowohl weniger runde und elongierte Spermatiden als auch weniger reife Spermien. Diese waren zudem weniger mobil. Trotzdem wurde eine normale Fertilisationsrate beobachtet, wobei aber durch die verminderte Implantation der Embryos keine Nachkommen von behandelten männlichen Mäusen erzeugt wurden²⁰⁸. Durch die erhebliche Einschränkung der Mobilität der Spermien, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, ist eine normale Fertilisationsrate dieser Spermien jedoch eher unwahrscheinlich.

Die Gruppe um Kenneth D. Beaman postuliert ein Peptid $\alpha 2N$, welches vom N-Terminus der $\alpha 2$ Untereinheit abgespalten werden kann, von den Zellen sezerniert wird und immunologisch aktiv ist. Die Injektion eines anti- $\alpha 2$ -Antikörpers könnte ein sezerniertes $\alpha 2N$ Peptid binden, während sie das intrazelluläre $\alpha 2$ Protein wahrscheinlich nicht beeinflusst. Durch das Fehlen dieses postulierten Peptids $\alpha 2N$ waren M2 Makrophagen und verschiedene Immunmarker im Hoden reduziert²⁰⁸, außerdem war die Apoptose in den Hoden der mit dem $\alpha 2$ Antikörper behandelten Mäuse verringert²⁰⁹. Während unseren *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnten wir solch ein Peptid aus dem *Atp6v0a2* Gen bisher nicht detektieren. Ein N-terminales humanes Peptid aus den Aminosäuren 1-395 war nicht stabil (Anne Hoffmann, AG Kornak) und auch andere N-terminale Peptide verschiedener Länge erwiesen sich als nicht wasserlöslich²¹⁰.

Ob auch männliche ARCL2A Patienten infertil sind, wurde bisher nicht berichtet, da die meisten Patienten im Kindesalter beschrieben wurden und häufig die mentale Retardierung im Vordergrund stand. Eine Studie von Ota *et al.* zeigte jedoch, dass die Spermien infertiler Männer eine deutlich reduzierte $\alpha 2$ mRNA und Proteinmenge hatten²¹¹. Außerdem wird das von ihnen detektierte N-terminale Peptid der $\alpha 2$ Untereinheit bei gesunden Männern stärker in die Samenflüssigkeit sezerniert als bei infertilen Männern. Verglichen sie motile mit immotilen Spermien von gesunden Männern, so konnten sie zeigen, dass die motilen deutlich mehr ATP6V0A2 Protein enthielten. Leider weist diese Studie einige Schwächen auf, da sie Männer als infertil

einstuft, wenn entweder das Ejakulatvolumen, die Spermienkonzentration oder Spermienbeweglichkeit reduziert ist ohne diese Gruppen voneinander getrennt zu untersuchen. Dadurch wurden in der infertilen Gruppe bei Ejakulatvolumen und Spermienkonzentration im Mittel Werte erreicht, die von der WHO als normal einzuschätzen sind²¹². Sollte es sich jedoch tatsächlich um ein umfassendes Phänomen bei Infertilität des Mannes handeln, wären die hier erzeugten Mausmodelle von enormem Nutzen um sowohl Ursachen als auch Therapiemöglichkeiten zu prüfen. Es gibt zahlreiche Publikationen, die von einer deutlichen Verminderung der Spermienqualität im letzten Jahrhundert ausgehen²¹³⁻²¹⁵. Ein Fortschreiten dieses Trends könnte die vermehrte Anwendung der In-vitro-Fertilisation nötig machen. Jedoch ist auch diese häufig nicht erfolgreich, wobei die ursächlichen Parameter nur wenig bekannt sind²¹⁶. Sollte der $\alpha 2$ Untereinheit hier tatsächlich eine Schlüsselrolle zukommen, hätte weitere Forschung in dieser Richtung einen hohen sozio-ökonomischen Stellenwert.

Es gibt zahlreiche Publikationen der Beaman-Gruppe, die die $\alpha 2$ Untereinheit mit der Implantation und Entwicklung von Embryonen assoziieren. So scheint eine Verminderung der $\alpha 2$ Untereinheit in der Maus mit Aborten korreliert zu sein^{217,218}, wobei dies durch eine mögliche immunmodulatorische Funktion der $\alpha 2$ Untereinheit begründet wird. Es wurde außerdem gezeigt, dass weibliche Mäuse mit einem $\alpha 2$ Knock-out spezifisch in den Milchdrüsen, eine reduzierte Ausbildung der Milchgänge zeigen und weniger Milch produzieren. Daher waren deren Jungtiere leichter als bei Wildtypverpaarungen¹⁶⁰. Bei der Verpaarung von *Atp6v0a2*^{-/-} Weibchen mit Wildtypmännchen stellten wir normale Wurfgrößen fest, eine detaillierte Analyse wäre jedoch nötig um diese Aspekte in unseren Tiermodellen zu evaluieren.

4.5.5 Kein ausgeprägter Glykosylierungsdefekt im Mausmodell

Ein Merkmal welches die *ATP6V0A2* Cutis laxa von anderen Erkrankungen unterscheidet, ist ein angeborener Glykosylierungsdefekt. Bei den Knock-out Mäusen war jedoch sowohl die Isoelektrische Fokussierung von Transferrin, als auch die Untersuchung des Serums mit verschiedenen Lektinen (Abbildung 36) unauffällig. Nur beim RCA1 Blot zeigte sich eine zusätzliche Bande bei den *Atp6v0a2*^{-/-} Mäusen, die auf ein fehlglykosyliertes Protein hinweisen könnte. Die Massenspektrometrische Untersuchung der Gewebe der Knock-out Mäuse ergab keine Auffälligkeiten der

N-Glykosylierungen (Abbildung 37). Hierbei sind aber die Peaks der komplexen Formen so klein, dass ein spezifischer Defekt in der Sialylierung möglicherweise übersehen wird.

Bei den Patienten kann zwar teilweise erst nur ein O-Glykosylierungsdefekt nachgewiesen werden, später bildet jedoch die Kombination aus O- und N-Glykosylierungsdefekt ein eindeutiges diagnostisches Kriterium. Dabei zeigte sich in der Massenspektrometrie, dass der Defekt vor allem in den letzten Schritten der Glykosylierung liegt, speziell in der Sialylierung³⁴. Nach siRNA vermitteltem Knock-down von $\alpha 2$ in HeLa-Zellen war die Bande des LAMP2 Proteins im Western Blot leicht verschoben (Abbildung 14), was auf eine verringerte Glykosylierung hinweisen könnte und den humanen Glykosylierungsdefekt auch auf zellulärer Ebene bestätigen würde.

Die Sialylierung erfolgt hauptsächlich in den Zisternen des Trans-Golgiapparates^{105,106,219}, wo auch die $\alpha 2$ Untereinheit detektiert wurde (Abbildung 11). Das Fehlen der $\alpha 2$ Untereinheit führt möglicherweise zu einer leichten Fragmentierung dieses Organells, wie durch die verminderte TGN46 Färbung erkennbar wurde (Abbildung 14). Diese Fragmentierung könnte eine reduzierte Sialylierung zur Folge haben. Dass die Integrität des Golgiapparates und des intrazellulären Transports essentiell für die Glykosylierung sind, zeigt sich auch bei humanen Erkrankungen wie dem MACS Syndrom oder dem *COG7-CDG*^{30,220}.

Auch pH-Wert Änderungen im Golgiapparat können die Glykosylierung auf verschiedenen Wegen beeinflussen. Zum einen ist die Aktivität der Glykosyltransferasen pH-Wert abhängig, sodass ein erhöhter pH-Wert im Trans-Golgiapparat zu einer verringerten Aktivität der Sialyltransferase führen könnte. Zum anderen hängt auch die Lokalisation der Glykosyltransferasen vom pH-Wert ab und frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die Neutralisation des pH-Werts im Golgiapparat zu einer Fehlverteilung der Glykosyltransferasen führt, wodurch deren Funktion ebenfalls eingeschränkt sein könnte²²¹. Dimitrios Wagner (AG Kornak) untersuchte nach siRNA Knock-down der $\alpha 2$ Untereinheit in HeLa-Zellen die Lokalisation von GFP markierten Glykosyltransferasen. Er konnte zeigen, dass der Golgiapparat stark fragmentiert war und sowohl die untersuchte Galaktosyltransferase als auch die Sialyltransferase dadurch in kleinen Vesikeln lokalisiert waren, sodass eine schrittweise Glykosylierung von Proteinen nicht mehr möglich schien. Bei spezifischem

Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit in den Brustepithelzellen von Mäusen wurde ebenfalls eine Fehlverteilung von Glykosyltransferasen und eine stark verminderte Glykosylierung verschiedener Proteine gezeigt¹⁵⁸. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden aus TIG-1 Fibroblasten, in denen eine gesteigerte Glykosylierung beobachtet wurde¹⁵⁹. In beiden Fällen entsprachen die beobachteten Glykosylierungsmuster nicht den Veränderungen, die bei Patienten im Serum detektiert wurden³⁴. Möglich wäre hier also eine gewebeabhängige Ausprägung des Glykosylierungsdefektes. Die $\alpha 2$ Untereinheit beeinflusst nicht nur möglicherweise die Glykosylierung, sie enthält auch selbst zwei glykosylierte Asparaginreste an Position 484 und 505²²². Alle α Isoformen der Säugetiere tragen Glykosylierungen, die für die VMA21 unterstützte Assemblierung des V0 Komplexes im Endoplasmatischen Reticulum notwendig sind. Ohne diese Glykosylierungen sind die Proteine instabil und werden über das Proteasom abgebaut.

Für Erkrankungen mit Glykosylierungsdefekten wird häufig angenommen, dass die fehlerhafte Glykosylierung von Proteinen zu den beobachteten Organveränderungen führen, weil die betroffenen Proteine dadurch ihre Funktion nicht wie üblich ausüben können. So treten Glykosylierungsstörungen bei mehreren Erkrankungen mit O-Glykosylierungsdefekt wie Walker-Warburg Syndrom, Muskel-Auge-Gehirn-Krankheit und Muskeldystrophie Typ Fukuyama auf³⁵. Möglicherweise ist bei diesen Erkrankungen der GPR56-Rezeptor fehlglykosyliert. Mutationen in diesem Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptor haben ebenfalls eine Glykosylierungsstörung zur Folge, die häufig als ähnlich der Pflasterstein-Lissenzephalie von ARCL2A Patienten beschrieben wird und auf eine fehlerhafte Migration von Neuronen zurückzuführen ist^{35,223}. Die Veränderungen des Kortex des Knock-out Mausmodells für diese Erkrankung²²³ ähneln sehr stark den in dieser Arbeit beschriebenen Auffälligkeiten bei *Atp6v0a2*^{-/-} Mäusen (Abbildung 34). Da der Glykosylierungsdefekt bei den *Atp6v0a2*^{-/-} Mäusen jedoch so schwach ausgeprägt zu sein scheint, liegt hier sehr wahrscheinlich nicht die Ursache für die anderen Symptome wie die Hirnfehlbildungen. Der GPR56-Rezeptor interagiert mit Collagen Typ 3, dessen homozygoter Verlust ebenfalls zu einer Pflasterstein-Lissenzephalie führt^{224,225}. Somit scheint auch der Aufbau der extrazellulären Matrix maßgeblich für diesen Signalweg zu sein. Möglicherweise ist der CDG bei der ARCL2A nur ein Begleitsymptom, das durch die Veränderungen im intrazellulären Transport auftritt, im Menschen gut diagnostiziert werden kann, jedoch nicht den Grund für die Fehlbildungen liefert.

4.6 Der Phänotyp von Maus und Mensch durch Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit im Kontext anderer Erkrankungen

4.6.1 Die $\alpha 2$ Defizienz im Vergleich zu anderen Cutis laxa Syndromen

Alle Formen der Cutis laxa ähneln sich durch die inelastische Haut, welche unter anderem durch Defekte der elastischen Fasern entsteht. Das Krankheitsbild der *ATP6V0A2* Cutis laxa unterscheidet sich von der ADCL1, ADCL2 und den verschiedenen Formen der ARCL1, da nur sehr selten kardiovaskuläre Beeinträchtigungen auftreten. Diese sind die Kernmerkmale der anderen Erkrankungen, die durch Mutationen in Proteinen der extrazellulären Matrix wie Elastin, Fibulin 4 und Fibulin 5 verursacht werden. Die elastischen Fasern übernehmen außer in der Haut besonders in den Gefäßen wichtige Funktionen, sodass sie bei direkten Mutationen vermutlich stärker eingeschränkt sind, als durch Mutation von Proteinen, die nur peripher in deren Bildung eingreifen. Aus diesem Grund unterscheiden sich auch die Mausmodelle dieser Erkrankungen vom *Atp6v0a2* Knock-out Mausmodell, da sie entweder große, hängende Hautfalten aufweisen oder aufgrund von Lungenemphysemen und Aneurismen früh letal sind.

Auch das bei der ARCL1C mutierte *LTBP4* wirkt durch die Regulation von TGF- β sehr direkt auf die Bildung der extrazellulären Matrix ein. TGF- β wird in der extrazellulären Matrix gebunden und bei mechanischer Beanspruchung oder Defekten frei gesetzt um die Expression von Matrixkomponenten zu stimulieren²²⁶. Da bei den Erkrankungen des Cutis laxa Spektrums die extrazelluläre Matrix pathogen verändert ist, kommt es zu überaktivem TGF- β Signaling^{15,189,227}. Auch in kultivierten Fibroblasten von *ATP6V0A2* Patienten konnte dies bereits nachgewiesen werden³⁷. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass auch im murinen Modell, durch *Atp6v0a2* Verlust der TGF- β Signalweg überaktiv ist¹⁶⁰. Diese erhöhte Menge von aktivem TGF- β ist eine Gemeinsamkeit zahlreicher Bindegewebserkrankungen. Die wohl bekannteste ist das Marfan-Syndrom, eine Erkrankung, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:5000 weit häufiger auftritt als die *ATP6V0A2*-abhängige Cutis laxa. Fibrillin-1 Mutationen haben hier eine Schwächung des Bindegewebes mit unter anderem kardiovaskulären Symptomen und überdehnbaren Gelenken zur Folge²²⁸. Um den auch hier überaktiven Signalweg des TGF- β zu hemmen, werden verschiedene Medikamente wie Losartan eingesetzt^{229,230}. Der Einsatz dieser Medikamente bei Cutis laxa Patienten könnte besonders die kardiovaskulären

Symptome abschwächen. Ob dies jedoch auch für *ATP6V0A2* Patienten hilfreich sein könnte, bleibt fraglich, da bisher kein Zusammenhang zwischen den Gehirnveränderungen und dem erhöhten TGF- β Signaling hergestellt wurde.

Besonders groß ist die Ähnlichkeit des humanen ARCL2A Phänotyps mit der durch *PYCR1* Mutationen verursachten Cutis laxa oder der durch *GORAB* Mutationen ausgelösten Gerodermia osteodysplastica^{2,231,232}. Während alle drei Erkrankungen neben der faltigen Haut auch progeroide Merkmale, überdehnbare Gelenke und Hypotonie aufweisen, gibt es auch einige Unterscheidungsmerkmale. Geschulte Personen können bei ausgeprägten Gesichtsmarkmalen bereits einschätzen um welche Erkrankung es sich wahrscheinlich handeln könnte. Innerhalb der Gruppe dieser drei Erkrankungen weisen nur ARCL2A Patienten einen Glykosylierungsdefekt der Serumproteine auf, sodass die Isoelektrische Fokussierung von Transferrin hier eine eindeutige Unterscheidung ermöglicht. *PYCR1* Mutationen können einen der ARCL2A sehr ähnlichen Phänotyp hervorrufen (ARCL2B) oder einen schwereren Verlauf zur Folge haben, der die Patienten deutlich progeroider erscheinen lässt (ARCL3B). Diese Patienten haben neben Augenveränderungen auch eine Lipodystrophie. Außerdem ist die Haut bei *PYCR1* Patienten besonders an Händen und Füßen sehr faltig. Patienten mit Gerodermia osteodysplastica hingegen haben meist einen normalen Intellekt und eine so stark verringerte Knochendichte, dass es zu Frakturen kommt²³¹.

Auch die Mausmodelle dieser drei Gendefekte überlappen in ihren Phänotypen. Der Verlust von *Gorab* führt zu Veränderungen der Haut¹⁵¹, einer reduzierten Knochendichte und in einigen Geweben konnte eine veränderte Glykosylierung von Proteinen beobachtet werden¹⁸⁹. Die *Gorab* Knock-out Mäuse sterben jedoch bereits direkt nach der Geburt durch Veränderungen der Lunge, weshalb häufig Modelle mit gewebespezifischem Knock-out untersucht werden. Das *Pycr1* Knock-out Modell ähnelt dem *Atp6v0a2* Modell ebenfalls stark, da auch hier die Dicke der Dermis und die Knochendichte reduziert ist¹⁵².

Die Ähnlichkeit im Phänotyp könnte auch auf eine funktionelle Überlappung dieser drei Proteine hinweisen. Wie die $\alpha 2$ Untereinheit befindet sich auch GORAB am Trans-Golgiapparat, sodass beide, wie hier gezeigt, dort kolokalisieren (Abbildung 11). GORAB reguliert durch seine Interaktion mit den kleinen GTPasen ARF5 und RAB6

den intrazellulären Transport²⁸, weshalb Defekte in Endo- oder Exozytose gemeinsame Ursache der *GORAB* und der *ATP6V0A2* Cutis laxa sein könnten.

Das durch *PYCR1* kodierte Enzym Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktase 1 (P5C) befindet sich in den Mitochondrien. Worin ein möglicher funktioneller Zusammenhang mit der $\alpha 2$ Untereinheit bestehen könnte, ist bisher nicht geklärt. So wie der Verlust von *PYCR1* führt auch der Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit zu DNA-Doppelstrangbrüchen und einer erhöhten Apoptoserate, was in der TUNEL-Färbung von Patientenfibroblasten sichtbar wird^{36,233}. Eine hohe Sensibilität gegenüber diesem Effekt könnte bei beiden Erkrankungen dieselben Zelltypen betreffen. Ein weiterer Zusammenhang könnte in der gestörten Funktion der Mitochondrien liegen. Diese könnten auch durch den Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit beeinträchtigt sein, da es Hinweise darauf gibt, dass die intrazelluläre Cholesterinverteilung die Aktivität von Mitochondrien maßgeblich verändern kann^{193,234}. So kommt es auch bei Niemann-Pick Syndrom Typ C zu einer Anreicherung von Cholesterin in den Mitochondrien, was zu deren Fehlfunktion und einer erhöhten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies führt²³⁵. Denkbar wäre auch, dass durch den Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit die posttranslationale Modifikation von mitochondrialen Proteinen verändert ist, sodass die Funktion dieses Kompartiments eingeschränkt wird. Bisher ergaben sich hierfür jedoch keine klaren Hinweise.

Im Spektrum der Cutis laxa Erkrankungen ähneln der ARCL2A auch die Krankheitsmerkmale der ARCL2C (*ATP6V1E1*) und ARCL2D (*ATP6V1A*), da sie ebenfalls durch progeroide Gesichtszüge, angeborene Hüftluxationen und Hypotonie gekennzeichnet sind²⁴. Ähnlich wie bei der ARCL2A treten außerdem Veränderungen des Unterhautfetts und auch Hernien auf. Beide werden ebenfalls durch Mutationen in Untereinheiten der V-ATPase ausgelöst, sie betreffen jedoch den V1 Komplex. Sowohl die A als auch die E1 Untereinheit sind ubiquitär exprimiert und können nicht durch andere Untereinheiten ersetzt werden, sodass sie essentiell für die Funktion der V-ATPase sind. Die bisher beschriebenen Mutationen sind *missense* Mutationen, welche die Stabilität des V-ATPase Komplexes verringern, aber wahrscheinlich eine Restfunktion der Proteine ermöglichen. Die Patienten leiden, anders als bei ARCL2A, unter kardiopulmonalen Veränderungen wie Aortenwurzeldilatation, Kardiomyopathie oder Herzfehlbildungen, sodass ein kompletter Verlust der Proteine sehr wahrscheinlich zum Tod des Embryos führen würde. Kürzlich wurden auch dominante *missense*

Mutationen in *ATP6VIA* beschrieben, die zu schwerer mentaler Retardierung mit epileptischen Krampfanfällen führen²³⁶.

Sowohl bei der ARCL2C als auch bei der ARCL2D zeigen die Patientenfibroblasten einen leicht fragmentierten Golgiapparat, verzögerten Brefeldin A induzierten retrograden Transport und große Lysosomen und Autophagosomen²⁴. Eine weitere Gemeinsamkeit mit der ARCL2A ist bei beiden Erkrankungen der Glykosylierungsdefekt, der jedoch deutlich schwächer ausgeprägt ist. Nur bei *ATP6VIA* Mutationen treten Krampfanfälle auf und nur bei rezessiven Veränderungen wurden bisher auch Veränderungen des Kortex in Form einer Polymicrogyrie beschrieben. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Gyrierungsstörung bei Mutationen in V-ATPase Untereinheiten nicht zwingend durch den Glykosylierungsdefekt verursacht sein müssen, denn beides tritt nicht zwangsläufig zusammen auf.

4.6.2 Vergleich verschiedener V-ATPase Defizienzen

Mutationen in den verschiedenen Untereinheiten der V-ATPase haben sehr unterschiedliche Erkrankungen zur Folge. Wie bei der a Untereinheit, gibt es auch von anderen Untereinheiten verschiedene Isoformen, die sich zwar teilweise gegenseitig kompensieren können, durch spezifische Aufgaben in bestimmten Geweben aber zu sehr unterschiedlichen Phänotypen führen. Mutationen in *ATP6VIB1* führen zu rezessiv vererbter distaler renal-tubulärer Azidose mit Hörverlust (MIM#267300)²³⁷. Dominant wirken sich hingegen *ATP6VIB2* Mutationen aus, die Taubheit und hypoplastische Nägel (DDOD, MIM#124480) oder Zimmermann-Laband Syndrom (MIM#616455) zur Folge haben, das zusätzlich durch eine Zahnfleisch-Fibromatose, hypoplastische Endphalangen und weitere Fehlbildungen gekennzeichnet ist^{238,239}.

Aus dem Verlust der vier verschiedenen Isoformen der a Untereinheit ergeben sich ebenfalls sehr heterogene Krankheitsbilder, denn das Expressionsniveau der verschiedenen Isoformen unterscheidet sich stark in den unterschiedlichen Organen. Die a1 Isoform ist besonders stark im Gehirn exprimiert und hat in anderen Geweben eine mittelstarke Expression. Die a3 Untereinheit ist zwar ubiquitär exprimiert, hat jedoch in aktiven Osteoklasten eine 100-fach stärkere Expression als in anderen Geweben und die a4 Untereinheit wird in vielen Geweben kaum exprimiert, ist für die Funktion der Niere jedoch essentiell^{70,237,240}.

Mutationen in der a1 Isoform sind noch nicht mit einer monogenen Erkrankung in Verbindung gebracht worden. Jedoch ist eine Variante in der 3'UTR des Gens mit Bluthochdruck assoziiert. Diese Variante scheint zu einer verminderten Expression des *ATP6V0A1*-Gens zu führen. Dadurch ist möglicherweise der pH-Wert in einigen Vesikeln erhöht, sodass weniger Chromogranin A prozessiert und ausgeschüttet wird²⁴¹. Die damit verbundene Verminderung korreliert mit Bluthochdruck.

Mutationen in der Isoform a3 führen zu autosomal rezessiver Osteopetrose (MIM#259700), bei der es durch die verminderte Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten zu einer erhöhten Knochendichte kommt²⁴². Im Verlauf der Erkrankung verengen sich die Markräume, wodurch die Blutbildung inhibiert wird. Außerdem werden Hirnnerven durch den Überwuchs der Schädelknochen komprimiert. Im *oc/oc* und *Tcirg1* Knock-out Mausmodell, in denen Teile des für die a3 Untereinheit kodierenden Gens deletiert sind, findet man einen ähnlichen Phänotyp. Die Mäuse leiden ebenfalls an der verminderten Knochenresorption und der damit verbundenen Immundefizienz, sodass sie ungefähr im Alter von drei bis fünf Wochen versterben²⁴³⁻²⁴⁵.

Mutationen der a4 Untereinheit hingegen bewirken eine Distale Renal-tubuläre Azidose (MIM#602722), da diese Untereinheit essentiell für die Funktion der Niere ist. Zusätzlich kann auch ein Hörverlust auftreten, denn auch in der Cochlea scheint die a4 Untereinheit eine besondere Rolle zu übernehmen²³⁷. Auch bei dieser Erkrankung zeigt das Mausmodell einen sehr ähnlichen Phänotyp zum Menschen. Die Knock-out Mäuse haben eine Azidose, einen stark eingeschränkten Hör- und Geruchssinn und versterben innerhalb der ersten 3-5 Wochen^{246,247}. In Zellen des proximalen Tubulus dieser Mäuse konnten vergrößerte Lysosomen und ein Defekt in der Endozytose gezeigt werden, sodass sich funktionelle Überlappungen mit dem Verlust der a2 Untereinheit ergeben²⁴⁷.

Somit führen Mutationen in den anderen Isoformen der a Untereinheit zu sehr unterschiedlichen Phänotypen. Die Knock-out Mausmodelle für die jeweiligen Erkrankungen bilden, genauso wie bei Mutationen der a2 Isoform, den humanen Phänotyp sehr gut ab.

Mutationen in den E1 und A Untereinheiten, wie sie bei der ARCL2C und ARCL2D auftreten, können nicht durch andere Isoformen kompensiert werden und schwächen somit alle ATPase Komplexe des Organismus. Trotzdem vereinigen diese Krankheitsbilder nicht alle Symptome auf sich, die durch den Verlust anderer

Untereinheiten verursacht werden. So haben die Patienten keine Osteopetrose oder renale Azidose. Dies könnte auf einen Kompensationsmechanismus zurückzuführen sein, der die globale Reduktion der V-ATPase Aktivität partiell ausgleichen kann, jedoch beim Fehlen spezifischer Untereinheiten nicht greift.

Proteine, die bei der Assemblierung des V0 Komplexes im Endoplasmatischen Retikulum assistieren, sind VMA21, ATP6AP1 und ATP6AP2. *VMA21* Mutationen haben eine X-chromosomale Myopathie mit exzessiver Autophagie (MIM#310440) zur Folge⁴⁸. Hier zeigt sich die Unverzichtbarkeit der V-ATPase für die Funktion von Lysosomen und Autophagosomen. Auch Mutationen in *ATP6AP2* stören die Autophagie und haben einen sehr komplexen Phänotyp zur Folge, der wie bei *ATP6V0A2* Mutationen durch Cutis laxa und einen Glykosylierungsdefekt gekennzeichnet ist. Des Weiteren leiden die Patienten an einer Hepatopathie und Immundefizienz⁴⁷. Somit hat diese Erkrankung zahlreiche Überlappungen mit Phänotypen, die durch Mutationen in anderen akzessorischen Proteinen der V-ATPase ausgelöst werden. Auch *ATP6AP1* Mutationen, sowie *TMEM199* (*Vma12*) und *CCDC115* (*Vma22*) Mutationen haben Hepatopathien zur Folge²⁴⁸⁻²⁵¹. Alle drei Erkrankungen führen außerdem ebenfalls zu einem Glykosylierungsdefekt, der möglicherweise sekundär zur Hepatopathie ist. Somit ist die V-ATPase auch für die Homöostase des Golgiapparates und die dort stattfindende Glykosylierung essentiell. Phänotypisch ähneln *CCDC115* Mutationen, auch durch die Neurodegeneration, stark verschiedenen Speichererkrankungen wie dem Niemann-Pick Syndrom Typ C. Unter anderem ist die *CCDC115*-Defizienz auch von Hypercholesterinämie begleitet, die somit erneut das Cholesterin mit der V-ATPase in Zusammenhang bringt. Beim Niemann-Pick Syndrom Typ C wird zurzeit eine Behandlung mit Cyclodextrin in klinischen Studien eingesetzt um den Cholesteringehalt der Zellen zu senken^{178,179}. Im späteren Verlauf des Niemann-Pick Syndroms treten wie auch bei der *ARCL2A* Krampfanfälle und eine Neurodegeneration auf und es bestehen zahlreiche zellbiologische Parallelen. Jedoch gibt es auch einige Unterschiede, da beispielsweise beim Niemann-Pick Syndrom Typ C die Endozytose nicht beeinträchtigt ist und eine Reduktion von Cholesterin diese eher behindern könnte. Trotzdem sollte man bei V-ATPase Defizienzen mit Cholesterinakkumulationen ebenfalls präklinische Studien mit Cyclodextrin in Erwägung ziehen.

Fasst man also die zellulären Merkmale von V-ATPase Defizienzen zusammen, so begegnet man immer wieder vergrößerten Lysosomen und Autophagosomen mit Cholesterinspeicherung und reduzierter Integrität des Golgiapparates verbunden mit Glykosylierungsdefekten. Unter diesem Aspekt soll noch eine weitere Gruppe von Erkrankungen mit der ARCL2A Cutis laxa verglichen werden. Der *Conserved Oligomeric Golgi* (COG) Komplex spielt eine wichtige Rolle im retrograden Transport innerhalb des Golgiapparates. Mutationen in seinen Untereinheiten führen zu verschiedenen erblichen Glykosylierungsdefekten (CDGs), da die Glykosyltransferasen nicht innerhalb des Golgiapparates zurück zu den cis Membranen transportiert werden können²⁵². Besonders interessant ist der *GOG7*-CDG (MIM#608779), denn es gibt viele Ähnlichkeiten mit dem *ATP6V0A2*-CDG. Beide sind begleitet von faltiger Haut, Hypotonie, epileptischen Anfällen und einem verzögerten retrograden Transport nach Brefeldin A Behandlung^{220,253,254}. Peanne *et al.* konnten in HeLa-Zellen, welche fluoreszierende Glykosyltransferasen exprimieren, nach *COG7* siRNA Knock-down denselben zellulären Phänotyp beobachten²⁵⁵ wie wir in diesen Zellen nach *ATP6V0A2* Knock-down (Dimitrios Wagner, AG Kornak). Zusätzlich konnte in *Drosophila Cog7* Knock-out Mutanten ein Defekt bei der Akrosombildung gezeigt werden, sodass auch diese Tiere infertil sind²⁵⁶. Damit unterstreicht dieses Krankheitsbild die Notwendigkeit eines intakten Golgitransports zum einen für die Glykosylierung und zum anderen für die Akrosombildung.

4.7 Die besondere Bedeutung des *Atp6v0a2* R755Q Modells

Es wird angenommen, dass der V0 Subkomplex noch zusätzliche Funktionen hat außer dem Protonentransport innerhalb der assemblierten V-ATPase. Möglicherweise ist er überdies essentiell für die Fusion verschiedener Membranen. Die V0 Komplexe zweier Vakuolen könnten in Hefe einen hydrophilen Kanal bilden und somit die Verschmelzung der Membranen unterstützen²⁵⁷. Besonders die a Untereinheit wurde unter diesem Gesichtspunkt untersucht, denn durch den hydrophilen N-Terminus könnte sie den Kontakt zweier V0 Komplexe ermöglichen. Für die a1 Untereinheit konnte gezeigt werden, dass sie mit den SNARE-Proteinen Syntaxin 1A und 7 interagiert, die bei der Fusion von Membranen assistieren^{165,168}. In Zebrafisch-Mikrogliazellen wird die Fusion von Phagosomen und Lysosomen während der Phagozytose durch das Fehlen der a1 Untereinheit gehemmt. Der pH-Wert in diesen Kompartimenten ist jedoch nicht verändert, sodass die a1 Untereinheit deren Fusion auf andere Weise regulieren könnte²⁵⁸. Gegenteiliges beobachteten Williamson *et al.* in Photorezeptoren von *Drosophila melanogaster*. Hier akkumulierten durch den Verlust der a1 Untereinheit Lysosomen und Autophagosomen. Deren pH-Wert war erhöht, obwohl die a1 Untereinheit dort auch in Wildtypzellen nicht lokalisiert ist. Das a1 Protein schien zusätzlich eine weitere Funktion in der Regulation der Fusion von frühen Endosomen zu haben, die unabhängig vom pH-Wert ist¹⁶⁵. Bereits diese Arbeitsgruppe machte sich den Einsatz einer gezielten Mutation zunutze, die eine stabile a Untereinheit hervorbringt, die keinen Protonentransport zulässt. Nur so lassen sich die verschiedenen Funktionen dieser Untereinheit voneinander getrennt untersuchen.

In der a Untereinheit befindet sich ein essentielles Arginin, das wahrscheinlich die Abgabe der von den c Untereinheiten gebundenen Protonen in das Vesikellumen ermöglicht^{59,62}. Dieses Arginin befindet sich in einer Region, die in allen a Isoformen von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert ist¹⁶⁵. In Hefe handelt es sich um R735, dessen verschiedene Mutationen bereits auf Stabilität und Funktionalität untersucht wurden. So ermöglichen die Mutationen zu Asparagin (N), Glutaminsäure (E) oder zu Glutamin (Q) eine stabile a Untereinheit, die in den V-ATPase Komplex assembliert werden kann, jedoch den Transport von Protonen inhibiert²⁵⁹. Coonrod *et al.* mutierten diesen Rest (R735Q) und zeigten, dass dieses Protein die Fusion von Hefevakuolen nicht normalisieren konnte, weil dafür eine Ansäuerung dieser Kompartimente notwendig ist²⁶⁰. Mit der Mutation des homologen Restes in der

$\alpha 1$ Untereinheit von *Drosophila melanogaster* R755A konnten Williamson *et al.* bereits einige pH-Wert abhängige und pH-Wert unabhängige Funktionen dieser Untereinheit unterscheiden¹⁶⁵.

Wir mutierten daher den homologen Rest Arginin 755 in der $\alpha 2$ Untereinheit der Maus zu Glutamin (R755Q) um in folgenden zellulären Analysen, die Funktion für den Protonentransport von weiteren Aufgaben in der Interaktion mit Proteinen des intrazellulären Transports abtrennen zu können. Die mRNA Expression des Gens ist durch die Mutation nicht verringert, jedoch ist das Protein möglicherweise leicht in seiner Stabilität beeinträchtigt. So zeigte sich bei heterozygoten Tieren im Western Blot eine leichte Reduktion des Proteins auf 90%, sowie bei den homozygoten R755Q Tieren eine etwas stärkere Reduktion auf ungefähr 73% (Abbildung 38). Die Überexpression eines humanen $\alpha 2$ Proteins mit der R755Q Mutation in HeLa-Zellen ergab eine Lokalisation des mutierten Proteins am Golgiapparat wie beim Wildtypprotein. Jedoch wurde das mutierte Protein auch schwach an weiteren Orten innerhalb der Zelle detektiert, wobei es sich möglicherweise um das ER handeln könnte (Anne Hoffmann, AG Kornak). Dies könnte auf eine in geringem Maße erfolgende fehlerhafte Faltung des Proteins hindeuten. Da der Hauptteil der R755Q mutierten Proteine jedoch stabil und korrekt gefaltet richtig in der Zelle lokalisiert, ist davon auszugehen, dass das mutierte Protein den Platz des Wildtypproteins in den Zellen einnimmt.

Bei der $\alpha 3$ Untereinheit bewirkte die Mutation des homologen Restes R740S in der Maus eine Entkopplung des Protonentransports von der ATP-Hydrolyse, sodass die Osteoklasten keine Protonen mehr in die Resorptionslakunen sezernieren konnten²⁶¹. Dabei zeigte die R740S Mutation einen dominant negativen Effekt. Die heterozygoten Tiere hatten zwar eine normale Lebenserwartung, jedoch eine deutlich gesteigerte Knochendichte. Im Gegensatz dazu wurde bei Knock-out Mäusen mit einem Verlust der $\alpha 3$ Untereinheit bei heterozygoten Tieren bisher kein Phänotyp beschrieben. Der dominante Effekt der R740S Mutation könnte sich dadurch erklären, dass in einem Knock-out Modell die fehlende α Untereinheit durch andere Isoformen teilweise ersetzt werden kann. Im Falle des stabilen mutierten Proteins ist dies nicht möglich, da dieses den V-ATPase Komplex bindet und dessen Protonentransport inhibiert. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass Mäuse, die homozygot für die R740S Mutation sind, möglicherweise einen stärker ausgeprägten Phänotyp zeigen als die Knock-out Mäuse. Obwohl sie bei der Geburt noch nicht auffällig sind, schreitet die Osteopetrose so

schnell voran, dass die Tiere schon im Alter von 14 Tagen versterben²⁶². Auch die Veränderungen der Zähne der Mäuse sind im Mausmodell mit der R740S Mutation eventuell ausgeprägter²⁶³. Es konnten außerdem vergrößerte intrazelluläre Vesikel und eine Störung der Autophagie detektiert werden²⁶². Die Osteoklasten der Tiere mit der *missense* Mutation waren auch dadurch auffällig, dass die Ansäuerung der Lysosomen beeinträchtigt war. Dieser Mechanismus scheint bei Fehlen der $\alpha 3$ Untereinheit in den entsprechenden Knock-out Mausmodellen kompensiert zu werden.

Die erste Analyse der *Atp6v0a2* R755Q Linie ergab bisher keinen dominanten Effekt, jedoch könnte sich dieser auf bestimmte Aspekte des Phänotyps beschränken. Bisher zeigen die homozygoten R755Q Tiere einen ähnlichen Phänotyp wie die *Atp6v0a2* Knock-out Tiere, möglicherweise mit stärkerer Ausprägung (Guido Vogt, AG Kornak).

Somit war es uns durch die R755Q Mutation möglich, eine Mauslinie zu erzeugen, in der die ATP-Hydrolyse vom Protonentransport abgekoppelt wurde. Zusätzlich steht die mutierte $\alpha 2$ Untereinheit weiterhin für die Interaktion mit anderen Proteinen des intrazellulären Transports, wie zum Beispiel ARNO zur Verfügung. Die detaillierte Analyse des Phänotyps soll Aufschluss darüber bringen, welche Aspekte der Erkrankung auf die Funktion der α Untereinheit im Protonentransport und welche auf andere Proteinfunktionen zurückzuführen sind. Dass diese Frage bisher noch nicht hinreichend beantwortet ist, zeigt sich in anhaltenden Diskussionen zu diesem Thema^{43,164,260}.

4.8 Ausblick

4.8.1 Zukünftige Analyse des zellulären Pathomechanismus

In der vorliegenden Arbeit wurde nach dem siRNA vermittelten Knock-down von *ATP6V0A2* ein zellulärer Phänotyp mit einer Akkumulation von Endosomen, Lysosomen und Cholesterin beobachtet. Da ein ähnlicher Phänotyp durch eine experimentelle Erhöhung des pH-Werts mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin gezeigt werden konnte, scheint der veränderte pH-Wert nach *ATP6V0A2* Verlust die Ursache der morphologischen Veränderungen sein. Um dies zu belegen, sind pH-Wert Messungen im Golgiapparat, den Endosomen und den Lysosomen notwendig.

Die Akkumulation von Cholesterin könnte dadurch verursacht sein, dass dieses nicht aus den Vesikeln abtransportiert werden kann oder durch eine übermäßige Produktion hervorgerufen werden. Hier würde die Untersuchung der *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) weitere Hinweise liefern. Diese werden möglicherweise vermehrt im Golgiapparat prozessiert und dann in den Kern transportiert. Die vermehrte Prozessierung könnte mittels Western-Blot dargestellt werden. Nach einer Fraktionierung von Kern und Zytoplasma könnte ebenfalls durch einen Western-Blot die vermehrte Lokalisation der SREBPs im Kern nachgewiesen werden. Dies wäre durch die Wahl eines geeigneten Antikörpers auch mittels Immunfluoreszenz möglich. Außerdem könnte eine qPCR die erhöhte Expression von Zielgenen der SREBPs für die Steigerung der Cholesterinproduktion zeigen.

Die Untersuchung der Auswirkungen des gestörten intrazellulären Transports auf die Sekretion kann einen Rückschluss auf den Pathomechanismus der ARCL2A ermöglichen. Daher muss die Sekretionsleistung der Zellen nach Verlust der $\alpha 2$ Untereinheit genauer untersucht werden.

Die offensichtlichen zellulären Veränderungen in HeLa-Zellen nach siRNA vermitteltem Knock-down von *ATP6V0A2* sind bisher in ARCL2A Patientenzellen zum Teil nur in der Elektronenmikroskopie sichtbar. In ersten Untersuchungen an embryonalen Fibroblasten der Knock-out Mäuse zeigte sich keine offensichtliche Akkumulation von Endosomen oder Lysosomen. Es ist daher notwendig einen Zelltyp zu identifizieren, der eine stärkere Ausprägung des Phänotyps zeigt. Dies könnte eventuell bei Neuronen möglich sein. Eventuell wird durch die optimalen Bedingungen

in der Zellkultur ein Phänotyp verdeckt, so dass ein Hungern der Zellen durch Serumentzug eine stärkere Ausprägung ermöglichen könnte.

Die Untersuchung von Zellen der R755Q Knock-in Tiere kann wichtige Hinweise auf den Mechanismus hinter dem zellulären Phänotyp geben. Zuerst muss überprüft werden, ob das mutierte Protein in den V0 Komplex assembliert wird. Ist dies der Fall und werden die Veränderungen auch in diesen Zellen beobachtet, liegt die primäre Ursache im erhöhten pH-Wert. Sollten die Zellen jedoch nicht beeinträchtigt sein, so kann das Protein die Funktion in der Vesikelfusion und der Interaktion mit anderen Proteinen weiter ausüben und diese Mechanismen können als Ursache identifiziert werden.

4.8.2 Nutzung der *Atp6v0a2* Flox Linie

Die *Atp6v0a2* Knock-out Linie repräsentiert den kompletten Verlust der a2 Untereinheit im gesamten Organismus. Für einige Fragestellungen ist es jedoch notwendig zu analysieren, welcher Zelltyp für den Phänotyp verantwortlich ist. Zudem ist es auch interessant, zu welchem Entwicklungszeitpunkt der Verlust der a2 Untereinheit zu einer bestimmten Fehlbildung führt. Daher wurde die *Atp6v0a2* Flox Linie erzeugt, in der die Exons 15 bis 17 von loxP Sequenzen flankiert sind. Diese Sequenzen beeinflussen die Expression des Gens selbst und der Nachbargene nicht. Durch Verpaarung dieser Mäuse mit verschiedenen Cre-Linien kann ein gewebe- oder entwicklungspezifischer Knock-out des *Atp6v0a2* Gens verursacht werden. Dies kann auch für Experimente an Zellen verwendet werden, die aus diesen Mäusen isoliert werden. Denn die Cre Exzision lässt sich auch bei kultivierten Zellen durchführen oder kann nach Verpaarung mit induzierbaren Cre-Linien durch gut applizierbare Reagenzien erzeugt werden. Somit kann in der Zellkultur der akute Verlust des a2 Proteins simuliert werden, der häufig zu besonders starken Effekten führt.

4.8.3 Zukünftige Untersuchungen an *Atp6v0a2* Mausmodellen

In den Knock-out Mäusen wurde eine dünnere Dermis beobachtet. Hier könnte eine genauere strukturelle Analyse von elastischen Fasern und Kollagenen nähere Anhaltspunkte für die Entstehung der Hautveränderungen erbringen. Auch eine Analyse

der Haarzyklen könnte besonders im Vergleich zu *Gorab* Knock-out Mäusen weitere Informationen liefern.

Die Knochendichte bei fünf Wochen alten Knock-out Mäusen war reduziert, während sie sich in zwölf Wochen alten Tieren weitgehend normalisierte. Hier kann eine Analyse auf zellulärer Ebene durch Untersuchung von Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und Chondrozyten in der Histologie und in der Genexpression genauere Anhaltspunkte für die Entstehung der Osteopenie liefern. Die Untersuchung älterer Knock-out Tiere könnte zeigen, ob die verminderte Knochendichte der jungen Mäuse im Alter zu einem erhöhten Risiko für Osteoporose führt.

Die Analyse der Glykanstrukturen der Knock-out Mäuse ergab bisher keinen klaren Hinweis auf einen Glykosylierungsdefekt. Die Ausweitung dieser Untersuchung mit weiteren Lektinen und eine Überprüfung der O-Glykosylierung sind hier dringend notwendig um zu klären, ob es sich bei dem Glykosylierungsdefekt der ARCL2A Patienten um die Ursache der Organveränderungen handelt oder ob es sich um ein Begleitsymptom handelt, dass in der Maus für die Ausprägung des Phänotyps nicht notwendig ist.

Da die männlichen *Atp6v0a2*^{-/-} Mäuse infertil sind, wurde die Rolle der $\alpha 2$ Untereinheit für die Ausbildung von Spermien aufgezeigt. Nun ist es notwendig die einzelnen Phasen der Spermatogenese und Spermiogenese detailliert zu untersuchen um die Entstehung des Defekts aufzuklären. Da Untersuchungen beim ARCL2A Patienten fehlen, würde hier die Analyse von humanen Proben bisher unbekannte Aspekte des Krankheitsbildes aufdecken. Einige Patienten sind geistig nicht eingeschränkt, so dass diese Information und eine mögliche Therapie für die Betroffenen sehr wichtig wäre. Da, wie in Kapitel 4.5.4 Veränderte Spermien im Mausmodell erläutert, die $\alpha 2$ Untereinheit auch ein Marker für die Fruchtbarkeit gesunder Männer sein könnte, ergeben sich hier auch Implikationen für die breite Bevölkerung.

Die Aspekte der Erkrankung, die die ARCL2A Patienten am schwersten beeinträchtigen, sind die Pflasterstein-Lissenzephalie, die schwer medikamentierbaren Krampfanfälle und die mögliche Neurodegeneration. Hier besteht der größte Forschungsbedarf um den Patienten langfristig eine Therapie zu ermöglichen. Das *Atp6v0a2* Knock-out Mausmodell bietet durch die Ausprägung eines ähnlichen Phänotyps die Möglichkeit die Entstehung in der Embryonalentwicklung näher zu

verfolgen. Außerdem kann die Analyse von Neuronen dieser Tiere Veränderungen im intrazellulären Transport, dem Cholesteringehalt und dem Migrationsverhalten aufdecken. Sollten sich bei der Cholesterinverteilung ähnliche Befunde wie beim Niemann-Pick Syndrom Typ C zeigen, könnte eine Therapie beispielsweise mit Cyclodextrin bei den Mäusen erprobt werden. Eine weitere therapeutische Möglichkeit läge in der Stimulation der V-ATPase durch eine gesteigerte Aktivität anderer kompensatorisch wirkender α Untereinheiten. Für die Erprobung einer Behandlung ist es jedoch notwendig einen Verlaufparameter bei den Mäusen zu definieren, der therapiert werden kann. Da die *Atp6v0a2*^{-/-} Mäuse vereinzelt epileptische Anfälle zeigten, könnte es sinnvoll sein, die Reizschwelle hierfür besser zu definieren. Dazu könnten verschiedene Verfahren wie beispielsweise eine Rüttelplatte und die gezielte Beobachtung des Einzeltieres notwendig werden. Bisher wurde nicht untersucht, ob bei den Mäusen möglicherweise auch Verhaltensauffälligkeiten zu beobachten sind, die mit standardisierten Tests wie dem *open field* detektiert werden könnten.

Essentiell für die Aufklärung des Pathomechanismus der ARCL2A bleibt die Analyse der R755Q Knock-in Mäuse. Bisherige Untersuchungen ergaben einen ähnlichen Phänotyp wie bei den Knock-out Mäusen (Guido Vogt, AG Kornak), was die zentrale Funktion der $\alpha 2$ Untereinheit für den Protonentransport unterstützt. Feine Unterschiede im Phänotyp der Knock-out und Knock-in Mäuse könnten jedoch Aspekte der Erkrankung aufdecken, die durch andere Funktionen der $\alpha 2$ Untereinheit, zum Beispiel in der Vesikelfusion, verursacht werden.

Somit wurden durch diese Arbeit die nötigen Modelle entwickelt und charakterisiert um den Pathomechanismus der ARCL2A zukünftig so gut zu erforschen, dass Therapien daraus abgeleitet werden können.

Literaturverzeichnis

- 1 Mitra, S., Agarwal, A. A., Das, J. K. & Gangopadhyay, A. Cutis laxa: a report of two interesting cases. *Indian J Dermatol* **58**, 328, doi:10.4103/0019-5154.113986 (2013).
- 2 Gardeitchik, T. *et al.* Clinical and biochemical features guiding the diagnostics in neurometabolic cutis laxa. *Eur J Hum Genet* **22**, 888-895, doi:10.1038/ejhg.2013.154 (2014).
- 3 Lutsenko, S., Gupta, A., Burkhead, J. L. & Zuzel, V. Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch Biochem Biophys* **476**, 22-32, doi:10.1016/j.abb.2008.05.005 (2008).
- 4 Tümer, Z. *et al.* A 37-years-old Menkes disease patient - Residual ATP7A activity and early copper administration as key factors in beneficial treatment. *Clin Genet*, doi:10.1111/cge.13083 (2017).
- 5 Tsukahara, M., Imaizumi, K., Kawai, S. & Kajii, T. Occipital horn syndrome: report of a patient and review of the literature. *Clin Genet* **45**, 32-35 (1994).
- 6 Skjørringe, 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).
- 7 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).
- 8 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).
- 9 Yanagisawa, H. *et al.* Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* **415**, 168-171, doi:10.1038/415168a (2002).
- 10 Freeman, L. J. *et al.* Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils. *Biochem J* **388**, 1-5, doi:10.1042/BJ20050368 (2005).
- 11 Liu, X. *et al.* Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* **36**, 178-182, doi:10.1038/ng1297 (2004).
- 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 Zampatti, S. *et al.* De Barsy Syndrome: a genetically heterogeneous autosomal recessive cutis laxa syndrome related to P5CS and PYCR1 dysfunction. *Am J Med Genet A* **158A**, 927-931, doi:10.1002/ajmg.a.35231 (2012).
- 14 Skidmore, D. L. *et al.* Further expansion of the phenotypic spectrum associated with mutations in ALDH18A1, encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS). *Am J Med Genet A* **155A**, 1848-1856, doi:10.1002/ajmg.a.34057 (2011).
- 15 Urban, Z. *et al.* Mutations in LTBP4 cause a syndrome of impaired pulmonary, gastrointestinal, genitourinary, musculoskeletal, and dermal development. *Am J Hum Genet* **85**, 593-605, doi:10.1016/j.ajhg.2009.09.013 (2009).

- 16 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).
- 17 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 (2002).
- 18 Horiguchi, M. *et al.* Fibulin-4 conducts proper elastogenesis via interaction with
cross-linking enzyme lysyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19029-
19034, doi:10.1073/pnas.0908268106 (2009).
- 19 Saharinen, J. & Keski-Oja, J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-
beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for
binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell* **11**, 2691-2704 (2000).
- 20 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).
- 21 Reversade, B. *et al.* Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid
features. *Nat Genet* **41**, 1016-1021, doi:10.1038/ng.413 (2009).
- 22 Adams, E. & Frank, L. Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annu
Rev Biochem* **49**, 1005-1061, doi:10.1146/annurev.bi.49.070180.005041 (1980).
- 23 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).
- 24 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).
- 25 Fischer, B. *et al.* Severe congenital cutis laxa with cardiovascular manifestations
due to homozygous deletions in ALDH18A1. *Mol Genet Metab* **112**, 310-316,
doi:10.1016/j.ymgme.2014.05.003 (2014).
- 26 Wolthuis, D. F. *et al.* Cutis laxa, fat pads and retinopathy due to ALDH18A1
mutation and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol* **18**, 511-515,
doi:10.1016/j.ejpn.2014.01.003 (2014).
- 27 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).
- 28 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).
- 29 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).
- 30 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).
- 31 Coucke, P. J. *et al.* Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT10
alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat Genet* **38**, 452-
457, doi:10.1038/ng1764 (2006).
- 32 Lee, Y. C., Huang, H. Y., Chang, C. J., Cheng, C. H. & Chen, Y. T.
Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects
cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity
syndrome. *Hum Mol Genet* **19**, 3721-3733, doi:10.1093/hmg/ddq286 (2010).
- 33 Grealley, 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).
- 34 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).
- 35 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).
- 36 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).
- 37 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).
- 38 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).
- 39 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).
- 40 Beyens, A. *et al.* ATP6V0A2-related cutis laxa in 10 novel patients: Focus on clinical variability and expansion of the phenotype. *Exp Dermatol*, doi:10.1111/exd.13723 (2018).
- 41 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).
- 42 Karacan, İ. *et al.* A novel ATP6V0A2 mutation causing recessive cutis laxa with unusual manifestations of bleeding diathesis and defective wound healing. *Turk J Haematol*, doi:10.4274/tjh.2018.0325 (2018).
- 43 Cotter, K., Stransky, L., McGuire, C. & Forgac, M. Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. *Trends Biochem Sci* **40**, 611-622, doi:10.1016/j.tibs.2015.08.005 (2015).
- 44 Forgac, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 917-929, doi:10.1038/nrm2272 (2007).
- 45 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).
- 46 Nishi, T. & Forgac, M. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 94-103, doi:10.1038/nrm729 (2002).
- 47 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).
- 48 Ramachandran, N. *et al.* VMA21 deficiency prevents vacuolar ATPase assembly and causes autophagic vacuolar myopathy. *Acta Neuropathol* **125**, 439-457, doi:10.1007/s00401-012-1073-6 (2013).
- 49 Kane, P. M. Targeting reversible disassembly as a mechanism of controlling V-ATPase activity. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 117-123 (2012).
- 50 Kane, P. M. Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase in vivo. *J Biol Chem* **270**, 17025-17032 (1995).
- 51 Lu, M., Holliday, L. S., Zhang, L., Dunn, W. A. & Gluck, S. L. Interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase: evidence for direct coupling of

- glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump. *J Biol Chem* **276**, 30407-30413, doi:10.1074/jbc.M008768200 (2001).
- 52 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).
- 53 Lu, M., Ammar, D., Ives, H., Albrecht, F. & Gluck, S. L. Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J Biol Chem* **282**, 24495-24503, doi:10.1074/jbc.M702598200 (2007).
- 54 Chen, S. H. *et al.* Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. *J Biol Chem* **279**, 7988-7998, doi:10.1074/jbc.M305351200 (2004).
- 55 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).
- 56 Qin, A. *et al.* V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1422-1435, doi:10.1016/j.biocel.2012.05.014 (2012).
- 57 Kawasaki-Nishi, S., Bowers, K., Nishi, T., Forgac, M. & Stevens, T. H. The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J Biol Chem* **276**, 47411-47420, doi:10.1074/jbc.M108310200 (2001).
- 58 Wagner, C. A. *et al.* Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev* **84**, 1263-1314, doi:10.1152/physrev.00045.2003 (2004).
- 59 Toei, M., Toei, S. & Forgac, M. Definition of membrane topology and identification of residues important for transport in subunit a of the vacuolar ATPase. *J Biol Chem* **286**, 35176-35186, doi:10.1074/jbc.M111.273409 (2011).
- 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 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).
- 62 Mazhab-Jafari, M. T. *et al.* Atomic model for the membrane-embedded VO motor of a eukaryotic V-ATPase. *Nature* **539**, 118-122, doi:10.1038/nature19828 (2016).
- 63 Landolt-Marticorena, C., Williams, K. M., Correa, J., Chen, W. & Manolson, M. F. Evidence that the NH₂ terminus of vph1p, an integral subunit of the V₀ sector of the yeast V-ATPase, interacts directly with the Vma1p and Vma13p subunits of the V₁ sector. *J Biol Chem* **275**, 15449-15457, doi:10.1074/jbc.M000207200 (2000).
- 64 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).
- 65 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).
- 66 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).
- 67 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).
- 68 Toyomura, T., Oka, T., Yamaguchi, C., Wada, Y. & Futai, M. Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. Preferential expression of the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* **275**, 8760-8765 (2000).
- 69 Sun-Wada, G. H. *et al.* The a3 isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* **119**, 4531-4540, doi:10.1242/jcs.03234 (2006).
- 70 Schulz, N., Dave, M. H., Stehberger, P. A., Chau, T. & Wagner, C. A. Differential localization of vacuolar H⁺-ATPases containing a1, a2, a3, or a4 (ATP6V0A1-4) subunit isoforms along the nephron. *Cell Physiol Biochem* **20**, 109-120, doi:10.1159/000104159 (2007).
- 71 Capecci, J. & Forgac, M. The function of vacuolar ATPase (V-ATPase) a subunit isoforms in invasiveness of MCF10a and MCF10CA1a human breast cancer cells. *J Biol Chem* **288**, 32731-32741, doi:10.1074/jbc.M113.503771 (2013).
- 72 Poëa-Guyon, S. *et al.* The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery. *J Cell Biol* **203**, 283-298, doi:10.1083/jcb.201303104 (2013).
- 73 Hosokawa, H. *et al.* The N termini of a-subunit isoforms are involved in signaling between vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) and cytohesin-2. *J Biol Chem* **288**, 5896-5913, doi:10.1074/jbc.M112.409169 (2013).
- 74 Merkulova, M., Bakulina, A., Thaker, Y. R., Grüber, G. & Marshansky, V. Specific motifs of the V-ATPase a2-subunit isoform interact with catalytic and regulatory domains of ARNO. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 1398-1409, doi:10.1016/j.bbabi.2010.02.009 (2010).
- 75 Donaldson, J. G. Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-41576, doi:10.1074/jbc.R300026200 (2003).
- 76 Grossmann, A. H. *et al.* The small GTPase ARF6 regulates protein trafficking to control cellular function during development and in disease. *Small GTPases*, 1-12, doi:10.1080/21541248.2016.1259710 (2016).
- 77 Bitsikas, V., Corrêa, I. R. & Nichols, B. J. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *Elife* **3**, e03970, doi:10.7554/eLife.03970 (2014).
- 78 Mousavi, S. A., Malerød, L., Berg, T. & Kjeken, R. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* **377**, 1-16, doi:10.1042/BJ20031000 (2004).
- 79 Mesaki, K., Tanabe, K., Obayashi, M., Oe, N. & Takei, K. Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS One* **6**, e19764, doi:10.1371/journal.pone.0019764 (2011).
- 80 Cullen, P. J. Phosphoinositides and the regulation of tubular-based endosomal sorting. *Biochem Soc Trans* **39**, 839-850, doi:10.1042/BST0390839 (2011).
- 81 Simonsen, A. *et al.* EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498, doi:10.1038/28879 (1998).

- 82 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).
- 83 Wegner, C. S. *et al.* Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5. *Histochem Cell Biol* **133**, 41-55, doi:10.1007/s00418-009-0643-8 (2010).
- 84 Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A. & Cohn, Z. A. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* **96**, 1-27 (1983).
- 85 Yamashiro, D. J., Tycko, B., Fluss, S. R. & Maxfield, F. R. Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* **37**, 789-800 (1984).
- 86 Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M. & Parton, R. G. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* **135**, 913-924 (1996).
- 87 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 (1987).
- 88 Shen, J. *et al.* Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol Plant* **6**, 1419-1437, doi:10.1093/mp/sst079 (2013).
- 89 Hurley, J. H. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 463-487, doi:10.3109/10409238.2010.502516 (2010).
- 90 Katzmann, D. J., Babst, M. & Emr, S. D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-155 (2001).
- 91 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).
- 92 Bright, N. A., Gratian, M. J. & Luzio, J. P. Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol* **15**, 360-365, doi:10.1016/j.cub.2005.01.049 (2005).
- 93 Luzio, J. P., Pryor, P. R. & Bright, N. A. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 622-632, doi:10.1038/nrm2217 (2007).
- 94 Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481-3500, doi:10.1038/emboj.2011.286 (2011).
- 95 Kametaka, S. & Waguri, S. Visualization of TGN-endosome trafficking in mammalian and Drosophila cells. *Methods Enzymol* **504**, 255-271, doi:10.1016/B978-0-12-391857-4.00013-6 (2012).
- 96 Ohkuma, S. & Poole, B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3327-3331 (1978).
- 97 Schwake, M., Schröder, B. & Saftig, P. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic* **14**, 739-748, doi:10.1111/tra.12056 (2013).
- 98 Sun, B. *et al.* Applications of stem cell-derived exosomes in tissue engineering and neurological diseases. *Rev Neurosci*, doi:10.1515/revneuro-2017-0059 (2017).
- 99 Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2**, 569-579, doi:10.1038/nri855 (2002).
- 100 Pfeffer, S. R. Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS Lett* **583**, 3811-3816, doi:10.1016/j.febslet.2009.10.075 (2009).

- 101 Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**,
347-358 (1975).
- 102 Allan, B. B. & Balch, W. E. Protein sorting by directed maturation of Golgi
compartments. *Science* **285**, 63-66 (1999).
- 103 Rothman, J. E. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63,
doi:10.1038/372055a0 (1994).
- 104 Appenzeller-Herzog, C. & Hauri, H. P. The ER-Golgi intermediate compartment
(ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* **119**, 2173-2183,
doi:10.1242/jcs.03019 (2006).
- 105 Tu, L. & Banfield, D. K. Localization of Golgi-resident glycosyltransferases.
Cell Mol Life Sci **67**, 29-41, doi:10.1007/s00018-009-0126-z (2010).
- 106 Fisher, P. & Ungar, D. Bridging the Gap between Glycosylation and Vesicle
Traffic. *Front Cell Dev Biol* **4**, 15, doi:10.3389/fcell.2016.00015 (2016).
- 107 Kreis, T. E. Role of microtubules in the organisation of the Golgi apparatus. *Cell
Motil Cytoskeleton* **15**, 67-70, doi:10.1002/cm.970150202 (1990).
- 108 Wu, M. M. *et al.* Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory
pathway. *J Biol Chem* **276**, 33027-33035, doi:10.1074/jbc.M103917200 (2001).
- 109 Kim, J. H. *et al.* Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic
reticulum at rest and during calcium release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2997-
3002 (1998).
- 110 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 (1996).
- 111 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).
- 112 Demaurex, N., Furuya, W., D'Souza, S., Bonifacino, J. S. & Grinstein, S.
Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ
measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J
Biol Chem* **273**, 2044-2051 (1998).
- 113 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 (1995).
- 114 Clague, M. J., Urbé, S., Aniento, F. & Gruenberg, J. Vacuolar ATPase activity is
required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* **269**, 21-24
(1994).
- 115 Gu, F. & Gruenberg, J. ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the
early endocytic pathway. *J Biol Chem* **275**, 8154-8160 (2000).
- 116 Maxfield, F. R. & Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease.
Nature **438**, 612-621, doi:10.1038/nature04399 (2005).
- 117 Chen, W. J., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. NPXY, a sequence often found in
cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low
density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* **265**, 3116-3123 (1990).
- 118 Soccio, R. E. & Breslow, J. L. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler
Thromb Vasc Biol* **24**, 1150-1160, doi:10.1161/01.ATV.0000131264.66417.d5
(2004).
- 119 Brown, M. S., Ho, Y. K. & Goldstein, J. L. The cholesteryl ester cycle in
macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of
cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem* **255**, 9344-9352 (1980).

- 120 Sokol, J. *et al.* Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. *J Biol Chem* **263**, 3411-3417 (1988).
- 121 Xu, Z., Farver, W., Kodukula, S. & Storch, J. Regulation of sterol transport between membranes and NPC2. *Biochemistry* **47**, 11134-11143, doi:10.1021/bi801328u (2008).
- 122 Kwon, H. J. *et al.* Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* **137**, 1213-1224, doi:10.1016/j.cell.2009.03.049 (2009).
- 123 Xu, M. *et al.* δ -Tocopherol reduces lipid accumulation in Niemann-Pick type C1 and Wolman cholesterol storage disorders. *J Biol Chem* **287**, 39349-39360, doi:10.1074/jbc.M112.357707 (2012).
- 124 Kwiatkowska, K. *et al.* Visualization of cholesterol deposits in lysosomes of Niemann-Pick type C fibroblasts using recombinant perfringolysin O. *Orphanet J Rare Dis* **9**, 64, doi:10.1186/1750-1172-9-64 (2014).
- 125 Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331-340 (1997).
- 126 Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Espenshade, P. J. Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* **102**, 315-323 (2000).
- 127 Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H. J., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6511-6518, doi:10.1073/pnas.0700899104 (2007).
- 128 Strauss, J. F., Kishida, T., Christenson, L. K., Fujimoto, T. & Hiroi, H. START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Mol Cell Endocrinol* **202**, 59-65 (2003).
- 129 Möbius, W. *et al.* Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* **4**, 222-231 (2003).
- 130 Orci, L. *et al.* Heterogeneous distribution of filipin--cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 293-297 (1981).
- 131 Rocha, N. *et al.* Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* **185**, 1209-1225, doi:10.1083/jcb.200811005 (2009).
- 132 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 133 Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A. & Clark, B. J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* **21**, 389-395, doi:10.1152/physiolgenomics.00025.2005 (2005).
- 134 Chapman, J. R. & Waldenström, J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One* **10**, e0141853, doi:10.1371/journal.pone.0141853 (2015).
- 135 Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467 (1977).
- 136 Ralf, K. & Frieder, S. Vol. 209 159-185 (Methods Mol Biol, 2003).

- 137 Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. & Behringer, R. Preparing Feeder Cell Layers from STO or Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Cells: Treatment with Mitomycin C. *CSH Protoc* **2006**, doi:10.1101/pdb.prot4399 (2006).
- 138 Eakin, G. S. & Hadjantonakis, A. K. Production of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. *Nat Protoc* **1**, 1145-1153, doi:10.1038/nprot.2006.173 (2006).
- 139 Mu, F. T. *et al.* EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* **270**, 13503-13511 (1995).
- 140 Williams, M. A. & Fukuda, M. Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **111**, 955-966 (1990).
- 141 Linstedt, A. D. *et al.* A C-terminally-anchored Golgi protein is inserted into the endoplasmic reticulum and then transported to the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5102-5105 (1995).
- 142 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 (1990).
- 143 Nakamura, N. *et al.* Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* **131**, 1715-1726 (1995).
- 144 Bowman, E. J., Graham, L. A., Stevens, T. H. & Bowman, B. J. The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 33131-33138, doi:10.1074/jbc.M404638200 (2004).
- 145 Poole, B. & Ohkuma, S. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* **90**, 665-669 (1981).
- 146 Liu, X. *et al.* Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn* **209**, 85-91, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199705)209:1<85::AID-AJA8>3.0.CO;2-T (1997).
- 147 Kim, Y. M., Lee, J. Y., Xia, L., Mulvihill, J. J. & Li, S. Trisomy 8: a common finding in mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Mol Cytogenet* **6**, 3, doi:10.1186/1755-8166-6-3 (2013).
- 148 Schweingruber, C., Rufener, S. C., Zünd, D., Yamashita, A. & Mühlemann, O. Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 612-623, doi:10.1016/j.bbagr.2013.02.005 (2013).
- 149 Naldaiz-Gastesi, N. *et al.* Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells. *Stem Cell Reports* **7**, 411-424, doi:10.1016/j.stemcr.2016.08.002 (2016).
- 150 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).
- 151 Liu, Y. *et al.* Gorab Is Required for Dermal Condensate Cells to Respond to Hedgehog Signals during Hair Follicle Morphogenesis. *J Invest Dermatol* **136**, 378-386, doi:10.1016/j.jid.2015.10.067 (2016).
- 152 Sprenger, S. *The role of Pycr1 in the pathomechanism of autosomal recessive cutis laxa* Doctoral Thesis thesis, Technische Universität Berlin, (2014).
- 153 Lin, T. T. & Li, S. L. Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*. *Eur J Biochem* **105**, 453-459 (1980).

- 154 Esmail, S. *et al.* Molecular mechanisms of cutis laxa and distal renal tubular acidosis-causing mutations in V-ATPase a subunits, ATP6V0A2 and ATP6V0A4. *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M117.818872 (2018).
- 155 Pietrement, C. *et al.* Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol Reprod* **74**, 185-194, doi:10.1095/biolreprod.105.043752 (2006).
- 156 Banting, G. & Ponnambalam, S. TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology. *Biochim Biophys Acta* **1355**, 209-217 (1997).
- 157 Tortorella, L. L. *et al.* Efficiency of immunotoxin cytotoxicity is modulated by the intracellular itinerary. *PLoS One* **7**, e47320, doi:10.1371/journal.pone.0047320 (2012).
- 158 Katara, G. K. *et al.* Mammary epithelium-specific inactivation of V-ATPase reduces stiffness of extracellular matrix and enhances metastasis of breast cancer. *Mol Oncol* **12**, 208-223, doi:10.1002/1878-0261.12159 (2018).
- 159 Udono, M. *et al.* Impaired ATP6V0A2 expression contributes to Golgi dispersion and glycosylation changes in senescent cells. *Sci Rep* **5**, 17342, doi:10.1038/srep17342 (2015).
- 160 Pamarthy, S. *et al.* The V-ATPase a2 isoform controls mammary gland development through Notch and TGF- β signaling. *Cell Death Dis* **7**, e2443, doi:10.1038/cddis.2016.347 (2016).
- 161 Wilke, S., Krausze, J. & Büssow, K. Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycocalyx. *BMC Biol* **10**, 62, doi:10.1186/1741-7007-10-62 (2012).
- 162 Appelqvist, H. *et al.* Sensitivity to lysosome-dependent cell death is directly regulated by lysosomal cholesterol content. *PLoS One* **7**, e50262, doi:10.1371/journal.pone.0050262 (2012).
- 163 Appelqvist, H. *et al.* Attenuation of the lysosomal death pathway by lysosomal cholesterol accumulation. *Am J Pathol* **178**, 629-639, doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.030 (2011).
- 164 Mauvezin, C., Nagy, P., Juhász, G. & Neufeld, T. P. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat Commun* **6**, 7007, doi:10.1038/ncomms8007 (2015).
- 165 Williamson, W. R., Wang, D., Haberman, A. S. & Hiesinger, P. R. A dual function of V0-ATPase a1 provides an endolysosomal degradation mechanism in *Drosophila melanogaster* photoreceptors. *J Cell Biol* **189**, 885-899, doi:10.1083/jcb.201003062 (2010).
- 166 Mukherjee, S. & Maxfield, F. R. Lipid and cholesterol trafficking in NPC. *Biochim Biophys Acta* **1685**, 28-37, doi:10.1016/j.bbalip.2004.08.009 (2004).
- 167 Neufeld, E. B. *et al.* The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem* **279**, 15571-15578, doi:10.1074/jbc.M314160200 (2004).
- 168 Hiesinger, P. R. *et al.* The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* **121**, 607-620, doi:10.1016/j.cell.2005.03.012 (2005).
- 169 Lorkowski, S. W., Brubaker, G., Gulshan, K. & Smith, J. D. V-ATPase (Vacuolar ATPase) Activity Required for ABCA1 (ATP-Binding Cassette Protein A1)-Mediated Cholesterol Efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, 2615-2625, doi:10.1161/ATVBAHA.118.311814 (2018).

- 170 Shin, H. W. & Nakayama, K. Guanine nucleotide-exchange factors for arf
GTPases: their diverse functions in membrane traffic. *J Biochem* **136**, 761-767,
doi:10.1093/jb/mvh185 (2004).
- 171 Sciaky, N. *et al.* Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in
living cells. *J Cell Biol* **139**, 1137-1155 (1997).
- 172 Chardin, P. *et al.* A human exchange factor for ARF contains Sec7- and
pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-484, doi:10.1038/384481a0
(1996).
- 173 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).
- 174 Takashima, K. *et al.* GBF1-Arf-COPI-ArfGAP-mediated Golgi-to-ER transport
involved in regulation of lipid homeostasis. *Cell Struct Funct* **36**, 223-235
(2011).
- 175 Jost, D. *Impairment of receptor-mediated endocytosis in ATP6V0A2 related
cutis laxa*, Freie Universität, Berlin, (2011).
- 176 Kozik, P. *et al.* A human genome-wide screen for regulators of clathrin-coated
vesicle formation reveals an unexpected role for the V-ATPase. *Nat Cell Biol*
15, 50-60, doi:10.1038/ncb2652 (2013).
- 177 Baravalle, G. *et al.* Transferrin recycling and dextran transport to lysosomes is
differentially affected by bafilomycin, nocodazole, and low temperature. *Cell
Tissue Res* **320**, 99-113, doi:10.1007/s00441-004-1060-x (2005).
- 178 Davidson, C. D. *et al.* Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick
C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and
disease progression. *PLoS One* **4**, e6951, doi:10.1371/journal.pone.0006951
(2009).
- 179 Liu, B. Therapeutic potential of cyclodextrins in the treatment of Niemann-Pick
type C disease. *Clin Lipidol* **7**, 289-301, doi:10.2217/clp.12.31 (2012).
- 180 Kouadjo, K. E., Nishida, Y., Cadrin-Girard, J. F., Yoshioka, M. & St-Amand, J.
Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics* **8**,
127, doi:10.1186/1471-2164-8-127 (2007).
- 181 Toei, M., Saum, R. & Forgac, M. Regulation and isoform function of the V-
ATPases. *Biochemistry* **49**, 4715-4723, doi:10.1021/bi100397s (2010).
- 182 Kissing, S. *et al.* Vacuolar ATPase in phagosome-lysosome fusion. *J Biol Chem*
290, 14166-14180, doi:10.1074/jbc.M114.628891 (2015).
- 183 Kraft, K. *et al.* Deletions, Inversions, Duplications: Engineering of Structural
Variants using CRISPR/Cas in Mice. *Cell Rep*, doi:10.1016/j.celrep.2015.01.016
(2015).
- 184 Nakamura, T. *et al.* Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo.
Nature **415**, 171-175, doi:10.1038/415171a (2002).
- 185 Vrhovski, B., Jensen, S. & Weiss, A. S. Coacervation characteristics of
recombinant human tropoelastin. *Eur J Biochem* **250**, 92-98 (1997).
- 186 Davis, E. C. & Mecham, R. P. Intracellular trafficking of tropoelastin. *Matrix
Biol* **17**, 245-254 (1998).
- 187 Starcher, B. *et al.* Neuraminidase-1 is required for the normal assembly of
elastic fibers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L637-647,
doi:10.1152/ajplung.90346.2008 (2008).
- 188 Tian, E., Hoffman, M. P. & Ten Hagen, K. G. O-glycosylation modulates
integrin and FGF signalling by influencing the secretion of basement membrane
components. *Nat Commun* **3**, 869, doi:10.1038/ncomms1874 (2012).

- 189 Chan, W. L. *et al.* Impaired proteoglycan glycosylation, elevated TGF- β
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).
- 190 Rajab, A. *et al.* Geroderma osteodysplasticum hereditaria and wrinkly skin
syndrome in 22 patients from Oman. *Am J Med Genet A* **146A**, 965-976,
doi:10.1002/ajmg.a.32143 (2008).
- 191 Zilles, K., Palomero-Gallagher, N. & Amunts, K. Development of cortical
folding during evolution and ontogeny. *Trends Neurosci* **36**, 275-284,
doi:10.1016/j.tins.2013.01.006 (2013).
- 192 Fernández, V., Llinares-Benadero, C. & Borrell, V. Cerebral cortex expansion
and folding: what have we learned? *EMBO J* **35**, 1021-1044,
doi:10.15252/embj.201593701 (2016).
- 193 Arenas, F., Garcia-Ruiz, C. & Fernandez-Checa, J. C. Intracellular Cholesterol
Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci* **10**, 382,
doi:10.3389/fnmol.2017.00382 (2017).
- 194 Onyenwoke, R. U. & Brenman, J. E. Lysosomal Storage Diseases-Regulating
Neurodegeneration. *J Exp Neurosci* **9**, 81-91, doi:10.4137/JEN.S25475 (2015).
- 195 FALCONER, D. S. Two new mutants, 'trembler' and 'reeler', with neurological
actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *J Genet* **50**, 192-201 (1951).
- 196 Niu, S., Yabut, O. & D'Arcangelo, G. The Reelin signaling pathway promotes
dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci* **28**, 10339-
10348, doi:10.1523/JNEUROSCI.1917-08.2008 (2008).
- 197 Gebhardt, C. *et al.* Abnormal positioning of granule cells alters afferent fiber
distribution in the mouse fascia dentata: morphologic evidence from reeler,
apolipoprotein E receptor 2-, and very low density lipoprotein receptor knockout
mice. *J Comp Neurol* **445**, 278-292, doi:10.1002/cne.10172 (2002).
- 198 Mizukami, T. *et al.* Reelin deficiency leads to aberrant lipid composition in
mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* **505**, 81-86,
doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.089 (2018).
- 199 Abou-Haila, A. & Tulsiani, D. R. Mammalian sperm acrosome: formation,
contents, and function. *Arch Biochem Biophys* **379**, 173-182,
doi:10.1006/abbi.2000.1880 (2000).
- 200 Moreno, R. D. & Alvarado, C. P. The mammalian acrosome as a secretory
lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev* **73**, 1430-1434,
doi:10.1002/mrd.20581 (2006).
- 201 Xu, J. & Xia, J. Structure and function of PICK1. *Neurosignals* **15**, 190-201,
doi:10.1159/000098482 (2006).
- 202 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).
- 203 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).
- 204 Kang-Decker, N., Mantchev, G. T., Juneja, S. C., McNiven, M. A. & van
Deursen, J. M. Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* **294**,
1531-1533, doi:10.1126/science.1063665 (2001).
- 205 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).
- 206 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).

- 207 Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K. & Okabe, M. Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Dev Biol* **237**, 222-231, doi:10.1006/dbio.2001.0353 (2001).
- 208 Jaiswal, M. K. *et al.* Vacuolar-ATPase isoform a2 regulates macrophages and cytokine profile necessary for normal spermatogenesis in testis. *J Leukoc Biol* **96**, 337-347, doi:10.1189/jlb.3A1113-593RR (2014).
- 209 Jaiswal, M. K. *et al.* Male fertility and apoptosis in normal spermatogenesis are regulated by vacuolar-ATPase isoform a2. *J Reprod Immunol* **112**, 38-45, doi:10.1016/j.jri.2015.07.003 (2015).
- 210 Merkulova, M., McKee, M., Dip, P. V., Grüber, G. & Marshansky, V. N-terminal domain of the V-ATPase a2-subunit displays integral membrane protein properties. *Protein Sci* **19**, 1850-1862, doi:10.1002/pro.470 (2010).
- 211 Ota, K. *et al.* Expression of a2 vacuolar ATPase in spermatozoa is associated with semen quality and chemokine-cytokine profiles in infertile men. *PLoS One* **8**, e70470, doi:10.1371/journal.pone.0070470 (2013).
- 212 Cooper, T. G. *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* **16**, 231-245, doi:10.1093/humupd/dmp048 (2010).
- 213 Jørgensen, N. *et al.* Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open* **2**, doi:10.1136/bmjopen-2012-000990 (2012).
- 214 Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305**, 609-613 (1992).
- 215 Swan, S. H., Elkin, E. P. & Fenster, L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* **108**, 961-966 (2000).
- 216 Jones, H. W., Oehninger, S., Bocca, S., Stadtmauer, L. & Mayer, J. Reproductive efficiency of human oocytes fertilized in vitro. *Facts Views Vis Obgyn* **2**, 169-171 (2010).
- 217 Jaiswal, M. K., Gilman-Sachs, A., Chaouat, G. & Beaman, K. D. Placental ATPase expression is a link between multiple causes of spontaneous abortion in mice. *Biol Reprod* **85**, 626-634, doi:10.1095/biolreprod.111.092494 (2011).
- 218 Jaiswal, M. K. *et al.* Regulation of apoptosis and innate immune stimuli in inflammation-induced preterm labor. *J Immunol* **191**, 5702-5713, doi:10.4049/jimmunol.1301604 (2013).
- 219 Roth, J., Taatjes, D. J., Lucocq, J. M., Weinstein, J. & Paulson, J. C. Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell* **43**, 287-295 (1985).
- 220 Wu, X. *et al.* Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat Med* **10**, 518-523, doi:10.1038/nm1041 (2004).
- 221 Axelsson, M. A. *et al.* Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology* **11**, 633-644 (2001).
- 222 Esmail, S. *et al.* N-linked glycosylation of a subunit isoforms is critical for vertebrate vacuolar H. *J Cell Biochem* **119**, 861-875, doi:10.1002/jcb.26250 (2018).
- 223 Jeong, S. J. *et al.* GPR56 functions together with $\alpha 3\beta 1$ integrin in regulating cerebral cortical development. *PLoS One* **8**, e68781, doi:10.1371/journal.pone.0068781 (2013).

- 224 Luo, R. *et al.* G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12925-12930, doi:10.1073/pnas.1104821108 (2011).
- 225 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).
- 226 Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J. & Hinz, B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **179**, 1311-1323, doi:10.1083/jcb.200704042 (2007).
- 227 Urban, Z. & Davis, E. C. Cutis laxa: intersection of elastic fiber biogenesis, TGFβ signaling, the secretory pathway and metabolism. *Matrix Biol* **33**, 16-22, doi:10.1016/j.matbio.2013.07.006 (2014).
- 228 von Kodolitsch, Y. & Robinson, P. N. Marfan syndrome: an update of genetics, medical and surgical management. *Heart* **93**, 755-760, doi:10.1136/hrt.2006.098798 (2007).
- 229 Habashi, J. P. *et al.* Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* **312**, 117-121, doi:10.1126/science.1124287 (2006).
- 230 Benke, K. *et al.* The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Cardiol J* **20**, 227-234, doi:10.5603/CJ.2013.0066 (2013).
- 231 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).
- 232 Goyal, M., Singh, A., Kornak, U. & Kapoor, S. The Diagnostic Dilemma of Cutis Laxa: A Report of Two Cases with Genotypic Dissimilarity. *Indian J Dermatol* **60**, 521, doi:10.4103/0019-5154.164434 (2015).
- 233 Sprenger, S. *The role of Pycr1 in the pathomechanism of autosomal recessive cutis laxa* Doctoral thesis, Technische Universität Berlin, (2014).
- 234 Desai, R. *et al.* ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism. *Brain* **140**, 1595-1610, doi:10.1093/brain/awx094 (2017).
- 235 Torres, S. *et al.* Lysosomal and Mitochondrial Liaisons in Niemann-Pick Disease. *Front Physiol* **8**, 982, doi:10.3389/fphys.2017.00982 (2017).
- 236 Fassio, A. *et al.* De novo mutations of the ATP6V1A gene cause developmental encephalopathy with epilepsy. *Brain*, doi:10.1093/brain/awy092 (2018).
- 237 Stover, E. H. *et al.* Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *J Med Genet* **39**, 796-803 (2002).
- 238 Yuan, Y. *et al.* De novo mutation in ATP6V1B2 impairs lysosome acidification and causes dominant deafness-onychodystrophy syndrome. *Cell Res* **24**, 1370-1373, doi:10.1038/cr.2014.77 (2014).
- 239 Kortüm, F. *et al.* Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nat Genet* **47**, 661-667, doi:10.1038/ng.3282 (2015).
- 240 Manolson, M. F. *et al.* The α3 isoform of the 100-kDa V-ATPase subunit is highly but differentially expressed in large (>or=10 nuclei) and small (<or= nuclei) osteoclasts. *J Biol Chem* **278**, 49271-49278, doi:10.1074/jbc.M309914200 (2003).
- 241 Wei, Z. *et al.* A common genetic variant in the 3'-UTR of vacuolar H⁺-ATPase ATP6V0A1 creates a micro-RNA motif to alter chromogranin A processing and hypertension risk. *Circ Cardiovasc Genet* **4**, 381-389, doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.959767 (2011).

- 242 Kornak, U. *et al.* Mutations in the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause
infantile malignant osteopetrosis. *Hum Mol Genet* **9**, 2059-2063 (2000).
- 243 Blin-Wakkach, C., Wakkach, A., Sexton, P. M., Rochet, N. & Carle, G. F.
Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant
osteopetrosis. *Leukemia* **18**, 1505-1511, doi:10.1038/sj.leu.2403449 (2004).
- 244 Scimeca, J. C. *et al.* The gene encoding the mouse homologue of the human
osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic
(oc/oc) mutants. *Bone* **26**, 207-213 (2000).
- 245 Li, Y. P., Chen, W., Liang, Y., Li, E. & Stashenko, P. Atp6i-deficient mice
exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular
acidification. *Nat Genet* **23**, 447-451, doi:10.1038/70563 (1999).
- 246 Norgett, E. E. *et al.* Atp6v0a4 knockout mouse is a model of distal renal tubular
acidosis with hearing loss, with additional extrarenal phenotype. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **109**, 13775-13780, doi:10.1073/pnas.1204257109 (2012).
- 247 Hennings, J. C. *et al.* A mouse model for distal renal tubular acidosis reveals a
previously unrecognized role of the V-ATPase $\alpha 4$ subunit in the proximal
tubule. *EMBO Mol Med* **4**, 1057-1071, doi:10.1002/emmm.201201527 (2012).
- 248 Jansen, E. J. *et al.* ATP6AP1 deficiency causes an immunodeficiency with
hepatopathy, cognitive impairment and abnormal protein glycosylation. *Nat
Commun* **7**, 11600, doi:10.1038/ncomms11600 (2016).
- 249 Jansen, J. C. *et al.* CCDC115 Deficiency Causes a Disorder of Golgi
Homeostasis with Abnormal Protein Glycosylation. *Am J Hum Genet* **98**, 310-
321, doi:10.1016/j.ajhg.2015.12.010 (2016).
- 250 Jansen, J. C. *et al.* TMEM199 Deficiency Is a Disorder of Golgi Homeostasis
Characterized by Elevated Aminotransferases, Alkaline Phosphatase, and
Cholesterol and Abnormal Glycosylation. *Am J Hum Genet* **98**, 322-330,
doi:10.1016/j.ajhg.2015.12.011 (2016).
- 251 Jansen, J. C. *et al.* NAFLD Phenotype in Patients With V-ATPase Proton Pump
Assembly Defects. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **5**, 415-417.e411,
doi:10.1016/j.jcmgh.2017.12.011 (2018).
- 252 Smith, R. D. & Lupashin, V. V. Role of the conserved oligomeric Golgi (COG)
complex in protein glycosylation. *Carbohydr Res* **343**, 2024-2031,
doi:10.1016/j.carres.2008.01.034 (2008).
- 253 Zeevaert, R. *et al.* A new mutation in COG7 extends the spectrum of COG
subunit deficiencies. *Eur J Med Genet* **52**, 303-305,
doi:10.1016/j.ejmg.2009.06.006 (2009).
- 254 Steet, R. & Kornfeld, S. COG-7-deficient Human Fibroblasts Exhibit Altered
Recycling of Golgi Proteins. *Mol Biol Cell* **17**, 2312-2321,
doi:10.1091/mbc.E05-08-0822 (2006).
- 255 Peanne, R. *et al.* Differential effects of lobe A and lobe B of the Conserved
Oligomeric Golgi complex on the stability of β 1,4-galactosyltransferase 1
and α 2,6-sialyltransferase 1. *Glycobiology* **21**, 864-876,
doi:10.1093/glycob/cwq176 (2011).
- 256 Belloni, G. *et al.* Mutations in Cog7 affect Golgi structure, meiotic cytokinesis
and sperm development during Drosophila spermatogenesis. *J Cell Sci* **125**,
5441-5452, doi:10.1242/jcs.108878 (2012).
- 257 Peters, C. *et al.* Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal
phase of membrane fusion. *Nature* **409**, 581-588, doi:10.1038/35054500 (2001).
- 258 Peri, F. & Nüsslein-Volhard, C. Live imaging of neuronal degradation by
microglia reveals a role for v0-ATPase $\alpha 1$ in phagosomal fusion in vivo. *Cell*
133, 916-927, doi:10.1016/j.cell.2008.04.037 (2008).

- 259 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).
- 260 Coonrod, E. M. *et al.* Homotypic vacuole fusion in yeast requires organelle acidification and not the V-ATPase membrane domain. *Dev Cell* **27**, 462-468, doi:10.1016/j.devcel.2013.10.014 (2013).
- 261 Ochotny, N. *et al.* The V-ATPase a3 subunit mutation R740S is dominant negative and results in osteopetrosis in mice. *J Bone Miner Res* **26**, 1484-1493, doi:10.1002/jbmr.355 (2011).
- 262 Ochotny, N., Voronov, I., Owen, C., Aubin, J. E. & Manolson, M. F. The R740S mutation in the V-ATPase a3 subunit results in osteoclast apoptosis and defective early-stage autophagy. *J Cell Biochem* **114**, 2823-2833, doi:10.1002/jcb.24630 (2013).
- 263 Johnson, L. *et al.* V-ATPases Containing a3 Subunit Play a Direct Role in Enamel Development in Mice. *J Cell Biochem* **118**, 3328-3340, doi:10.1002/jcb.25986 (2017).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Geräte.....	22
Tabelle 2: Geräte im Bakterienlabor	22
Tabelle 3: Geräte im Zellkulturlabor	22
Tabelle 4: Geräte im Histologielabor	23
Tabelle 5: Mikroskope.....	23
Tabelle 6: Allgemeine Chemikalien.....	23
Tabelle 7: Chemikalien für die Kultivierung von humanen Zelllinien	24
Tabelle 8: Materialien für die Kultivierung von humanen Zelllinien	24
Tabelle 9: Chemikalien für die Kultivierung von Fütterzellen und Embryonalen Stammzellen.....	25
Tabelle 10: Materialien für die Kultivierung von Fütterzellen und Embryonalen Stammzellen.....	25
Tabelle 11: Kits	26
Tabelle 12: Antikörper.....	26
Tabelle 13: Plasmide	27
Tabelle 14: Bakterien.....	28
Tabelle 15: Zelllinien.....	28
Tabelle 16: Primer für die Erzeugung homologer Regionen für das <i>Recombineering</i> ..	28
Tabelle 17: Sequenzierprimer für das murine <i>Atp6v02</i> Gen	29
Tabelle 18: Primer für die Sequenzierung des Zielvektors	29
Tabelle 19: R755Q Mutageneseprimer Maus.....	29
Tabelle 20: qPCR Primer für genomische DNA der Maus	30
Tabelle 21: qPCR Primer cDNA Maus	30
Tabelle 22: Vektorsequenzierprimer	31
Tabelle 23: Genotypisierungsprimer	31
Tabelle 24: Primer für die Southern Blot Sonden	31
Tabelle 25: Primer für Gateway-Klonierung.....	31
Tabelle 26: siRNA Oligonukleotide.....	32
Tabelle 27: Verwendete Software	32
Tabelle 28: Verwendete Datenbanken.....	32
Tabelle 29: Ansatz cDNA Synthese	34
Tabelle 30: PCR Ansatz Phusion Polymerase.....	36
Tabelle 31: Temperaturprogramm MS-Long	36
Tabelle 32: PCR-Ansatz mit 2 Primern.....	37
Tabelle 33: PCR-Ansatz mit 3 Primern.....	37
Tabelle 34: qPCR Ansatz für cDNA	39
Tabelle 35: qPCR Temperaturprogramm	39
Tabelle 36: qPCR Ansatz für gDNA	40
Tabelle 37: BigDye Ansatz.....	41

Tabelle 38: BigDye Temperaturprogramm	41
Tabelle 39: Puffer für Southern Blot	42
Tabelle 40: Restriktionsverdau eines PCR-Produkts	43
Tabelle 41: Restriktionsverdau eines Vektors	43
Tabelle 42: Plasmide Gateway-Klonierung.....	44
Tabelle 43: Temperaturprogramm Quickchange.....	46
Tabelle 44: Lösungen für Western Blot	56
Tabelle 45: Programm TP 1020 Gewebedehydratation	57
Tabelle 46: Karyotypisierung der ES-Zell Klone.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cutis laxa Spektrum	3
Abbildung 2: Phänotyp der ARCL2A	6
Abbildung 3: Bau der V-ATPase	10
Abbildung 4: Modell der α Untereinheit in Hefe.....	12
Abbildung 5: Der intrazelluläre Transport	15
Abbildung 6: Lage der Primer zur Detektion der Rekombination des Zielvektors.....	40
Abbildung 7: Genomischer Subklon	47
Abbildung 8: Erster Schritt zur Einführung der ersten loxP Sequenz in den Genomischen Subklon	48
Abbildung 9: Der Genomischer Subklon enthält nun die erste loxP Sequenz	48
Abbildung 10: Erzeugung des Knock-in Zielvektors	49
Abbildung 11: Die $\alpha 2$ -Untereinheit befindet sich in HeLa-Zellen im Trans-Golgiapparat	61
Abbildung 12: Spezifische siRNAs reduzieren das ATP6V0A2 mRNA- und Proteinlevel	62
Abbildung 13: Veränderung der frühen Endosomen nach <i>ATP6V0A2</i> siRNA Knock- down.....	64
Abbildung 14: siRNA Knock-down der $\alpha 2$ Untereinheit führt zu LAMP2 Veränderungen	65
Abbildung 15: Cholesterinakkumulation nach siRNA vermitteltem <i>ATP6V0A2</i> Knock- Down.....	67
Abbildung 16: Akkumulation der Endosomen durch Bafilomycin A1 oder Chloroquin...	68
Abbildung 17: Akkumulation der Lysosomen nach Behandlung mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin	69
Abbildung 18: Expression von <i>Atp6v0a2</i> in verschiedenen Geweben bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien	71
Abbildung 19: Zielvektor für das Knock-out Modell.....	73
Abbildung 20: Zielvektor für das Knock-in Modell.....	74
Abbildung 21: Voruntersuchung der ES-Zellklone mittels quantitativer PCR.....	76
Abbildung 22: Southern Blot der ES-Zellklone	77
Abbildung 23: Analyse von Chromosom 8 mittels quantitativer PCR	79
Abbildung 24: Gezüchtete Mauslinien	81
Abbildung 25: Die <i>Atp6v0a2</i> mRNA Expression in Flox-Mäusen ist nicht beeinträchtigt	82
Abbildung 26: Die LoxP-Sequenzen verändern nicht die Expression benachbarter Gene	83
Abbildung 27: Der <i>Atp6v0a2</i> Knock-out reduziert die mRNA und deletiert das Protein	85

Abbildung 28: Von dem Knock-out sind auch die 5'-Exons des <i>Atp6v0a2</i> -Gens betroffen	85
Abbildung 29: Die Nachbargene von <i>Atp6v0a2</i> werden auch in Mutanten normal exprimiert	86
Abbildung 30: Es gibt keine Anpassung der a1 und a3 Expression an den Verlust der a2 Untereinheit.....	87
Abbildung 31: <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse sind kleiner und leichter als ihre Geschwister	88
Abbildung 32: <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse haben eine dünnere Dermis	88
Abbildung 33: Die Knochendichte in <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäusen ist reduziert.....	90
Abbildung 34: Fehlerhafte Schichtung des frontalen Kortex von <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäusen	91
Abbildung 35: <i>Atp6v0a2</i> ^{-/-} Mäuse haben eine Globozoospermie	92
Abbildung 36: Glykosylierung von Serumproteinen der <i>Atp6v0a2</i> Knock-out Mäuse .	93
Abbildung 37: Normale N-Glykosylierung der Proteine im Gehirn von <i>Atp6v0a2</i> -Knock-out Tieren	94
Abbildung 38: Das mutierte <i>Atp6v0a2</i> Protein wird in den Knock-in Mäusen exprimiert	95
Abbildung 39: Der Verlust der a2 Untereinheit führt zu einem Cholesterin assoziierten zellulären Phänotyp.....	107

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Coding DNA / Copy DNA
CMV	Cytomegalievirus
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl) phenyl phosphate
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	early endosome antigen 1
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth / Luria Broth / Nährmedium für Bakterien
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
siRNA	Short interfering RNA
TGN46	Trans-Golgi-Netzwerk Protein 46
Well	Vertiefung
WT	Wildtyp

Veröffentlichungen

GORAB Missense Mutations Disrupt RAB6 and ARF5 Binding and Golgi Targeting
Egerer J and **Emmerich D**, Fischer-Zirnsak B, Chan WL, Meierhofer D, Tuysuz B,
Marschner K, Sauer S, Barr FA, Mundlos S, Kornak U.
J Invest Dermatol. 2015 Oct;135(10):2368-76015
PMID:26000619

Molecular mechanism of CHRDL1-mediated X-linked megalocornea in humans and in
Xenopus model
Pfirrmann T and **Emmerich D**, Ruokonen P, Quandt D, Buchen R, Fischer-Zirnsak
B, Hecht J, Krawitz P, Meyer P, Klopocki E, Stricker S, Lausch E, Seliger B,
Holleman T, Reinhard T, Auw-Haedrich C, Zabel B, Hoffmann K, Villavicencio Lorini P.
Hum Mol Genet. 2015 Jun 1;24(11):3119-32
PMID:25712132

Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation events in cutaneous neurofibromas of a
single NF1 patient
Emmerich D, Zemojtel T, Hecht J, Krawitz P, Spielmann M, Kühnisch J, Kobus K,
Osswald M, Heinrich V, Berlien P, Müller U, Mautner VF, Wimmer K, Robinson PN,
Vingron M, Tinschert S, Mundlos S, Kolanczyk M.
Eur J Hum Genet. 2015 Jun;23(6):870-3
PMID:25293717

Missense variant in CCDC22 causes X-linked recessive intellectual disability with features of
Ritscher-Schinzel/3C syndrome
Kolanczyk M, Krawitz P, Hecht J, Hupalowska A, Miaczynska M, Marschner K,
Schlack C, **Emmerich D**, Kobus K, Kornak U, Robinson PN, Plecko B, Grangl G,
Uhrig S, Mundlos S, Horn D.
Eur J Hum Genet. 2015 May;23(5):720
PMID:25880334

Double NF1 inactivation affects adrenocortical function in NF1Prx1 mice and a
human patient
Kobus K, Hartl D, Ott CE, Osswald M, Huebner A, von der Hagen M, **Emmerich D**,
Kühnisch J, Morreau H, Hes FJ, Mautner VF, Harder A, Tinschert S, Mundlos S,
Kolanczyk M.
PLoS One. 2015 Mar 16;10(3):e0119030
PMID:25775093

Multiscale, converging defects of macro-porosity, microstructure and matrix mineralization
impact long bone fragility in NF1
Kühnisch J, Seto J, Lange C, Schrof S, Stumpp S, Kobus K, Grohmann J, Kossler N,
Varga P, Osswald M, **Emmerich D**, Tinschert S, Thielemann F, Duda G, Seifert W,
El Khassawna T, Stevenson DA, Elefteriou F, Kornak U, Raum K, Fratzl P, Mundlos S,
Kolanczyk M.
PLoS One. 2014 Jan 21;9(1):e86115
PMID:24465906

Danksagung

Ich möchte mich bei Uwe Kornak für ein Jahrzehnt bedanken, das ich größtenteils in seiner Arbeitsgruppe verbringen durfte. Die Freiheit neue Ideen zu entwickeln und die angenehme Arbeitsatmosphäre haben es mir immer leicht gemacht morgens aufzustehen und voller Vorfreude auf die nächsten Ergebnisse zur Arbeit zu gehen. Außerdem möchte ich mich auch bei Sigmar Stricker bedanken, dass er diese Doktorarbeit betreut hat und bei organisatorischen Fragen immer schnell geholfen hat.

Seit ich 2008 das erste Mal ein richtiges Forschungslabor betreten habe, hatte ich das Glück mit zahlreichen tollen Menschen zusammen arbeiten zu dürfen. Ich konnte von ihnen viel lernen und habe jede Menge Unterstützung erfahren. Mit Vielen verbindet mich immer noch eine enge Freundschaft, so dass ich die Chance nutzen möchte, mich bei allen zu bedanken, die mich bis zum Abschluss meiner Promotion begleitet haben. Ja richtig - das wird jetzt etwas länger.

Wenn ich daran denke wie ich Uwe Kornak beim ersten Gespräch begegnet bin, mit knallroten Schuhen, Basecap und Wasserstoff-blonden Haaren, muss ich noch ein bisschen schmunzeln. Aber er hat sich davon nicht abschrecken lassen und ich durfte in seinem Labor meine Studienjahresarbeit anfertigen. Wir waren eine kleine Gruppe mit Björn Fischer (damals noch nicht Zirnsak), Katerina Dimopoulou, Claire Schlack, Johannes Grünhagen, Rici Ott, Sabine Stumpp, Jirko Kühnisch... Alle haben mir in den folgenden Jahren sehr viel beigebracht. Vor allem Björn, den ich auch jetzt immer noch gerne um Rat frage, da er fast alles weiß oder zumindest jemanden kennt, der es weiß. Johannes Grünhagen, mein Platznachbar für viele Jahre, hat nicht nur einen sehr schwarzen Humor, sondern hat als richtiger Wissenschaftler im Labor schon fast alles einmal probiert: Wie schmeckt eigentlich Medium? Wie fühlt es sich an, den Kopf in den Trockeneisbehälter zu hängen? Fragen die Johannes aus erster Hand beantworten kann. Mit Claire habe ich mich zuerst gar nicht verstanden, aber schon bald wurden wir ein super Team und enge Freunde. Mit ihrem großen Ehrgeiz und beeindruckenden Methodenspektrum war sie für alle im Labor immer eine große Hilfe.

Für meine Diplomarbeit durfte ich dann auch noch in der Genetik bleiben. Johannes Egerer wurde mein Betreuer und weckte mein immer noch großes Interesse am intrazellulären Transport. Neben seinem Fachwissen hat mich aber vor allem seine gesellschaftspolitische

Bildung beeindruckt. Von ihm habe ich lebenswichtige Grundregeln gelernt, die ich noch immer befolge: „Dein Schreibtisch muss immer unordentlich sein, dann sieht es aus, als hättest du viel zu tun und keine Zeit zum Aufräumen.“ Und „Wer als erster kommt, den sieht keiner, aber denjenigen der als erster geht, den sehen alle.“ Bei sämtlichen arbeitspolitischen Fragen bleibt Johannes mein erster Ansprechpartner. Zu dieser Zeit kam auch Hardy Chan in unsere Gruppe. Das hat mein Englisch sehr verbessert. Bei histologischen Fragen und Knochenthemen gehe ich sehr gerne bei ihm vorbei oder schreibe eine kleine Nachricht, auf die ich immer hilfreiche Antworten bekomme. Natürlich hat Sabine Stumpp nach wie vor die besten Histo-Tipps und teilt sie auch hilfsbereit und mit viel Geduld. Zum Glück ist Rici Ott der Genetik bis heute erhalten geblieben, so dass ich mit sämtlichen qPCR und miRNA Fragen jederzeit bei ihm vorbeikommen kann.

Wir waren eine tolle Truppe damals im Forschungshaus und hatten nicht nur auf der Arbeit, sondern auch in der Freizeit sehr viel Spaß zusammen. Es gab „epische“ Singstar-Abende, Nächte im Aufsturz und lustige Bootsfahrten.

Nach meiner Diplomarbeit durfte ich neben meiner Tätigkeit für Uwe auch für Pablo Villavicencio Lorini arbeiten. Mich beeindruckt immer noch das mir entgegengebrachte Vertrauen. Leider verpassten wir den großen Durchbruch ganz knapp und bis heute betrachte ich alle NGS-Daten mit größter Vorsicht. Das Megalocornea-Projekt ist bis heute mit Abstand dasjenige, in das ich, auch dank Pablo, am meisten Herzblut gesteckt habe.

Der normale finanzielle Wechsel in der Wissenschaft brachte mich zum Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik zu Mateusz Kolanczyk, der in der Forschungsgruppe von Stefan Mundlos arbeitete. Seine Art Projekte zu bearbeiten war faszinierend und das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, stärkte meine Selbstständigkeit. Außerdem lernte ich, je simpler ein Projekt aufgebaut ist, desto mehr lieben es die Leute. Zusammen konnten wir einige gern zitierte Publikation veröffentlichen.

Das Team von Prof. Mundlos war jung, multikulturell und hoch motiviert. Wir hatten sehr viel Spaß zusammen und haben uns gemeinsam über einige Rückschläge hinweggeholfen. Für die Zusammenarbeit und/oder Freundschaft in dieser Zeit möchte ich mich bei Sinje Geuer, Anja Will, Carola Dietrich, Karolina Kobus, Martin Franke, Saniye Yumlu, Johann Hüttner, Monika Osswald, Nicole Rössner, Norbert Brieske, Asita Stiege, Daniel Ibrahim und Malte Spielmann bedanken.

Dann konnte es erst am MPI und dann wieder am Virchow mit meiner Doktorarbeit weitergehen. In der Zwischenzeit waren auch schon einige neuere Kollegen in die Kornak Gruppe gekommen, mit denen ich genauso gerne zusammengearbeitet habe. Dazu gehören unter anderem Björt Kragestein, Magdalena Steiner und Anja Lekaj, die mich bei qPCR, Micro-CT oder Genotypisierung unterstützt haben.

Zum Glück hatte ich genug Zeit für die fast tägliche Mittagspause und konnte mit Phillippe Schröter und Patrick Sauer in der Herzmensa immer wieder neue Kraft tanken. Danke, dass ihr mich mitgenommen habt. Patrick hat außerdem für mich ein paar sehr schöne Zeichnungen von verschiedenen Organen gemacht und sollte mit diesem Talent wirklich Geld verdienen.

Neben meinen lieben Kollegen, die mich schon viele Jahre begleiten, konnte ich auch mit super motivierten Studenten zusammenarbeiten. Wir konnten zusammen das A2 Projekt bearbeiten, Ideen austauschen, Philosophieren und Freunde werden. Die Arbeit mit euch, hat mir besonders viel Freude gemacht. Dimitrios Wagner hatte tolle Ideen und ich bin mir sicher, dass eine großartige Karriere vor ihm liegt. Ich wünsche mir, dass er sein liebes, fröhliches Wesen auch behält, wenn er später irgendwo auf der Welt ein großes Institut leitet. Bei Anne Hoffmann konnte ich mich immer drauf verlassen, dass sie alles ordentlich und richtig durchgeführt hat und sie ließ sich auch vom 100ten Western-Blot nicht entmutigen. Anne etabliert jetzt innovative Methoden und besorgt mir vielleicht später mal einen gut bezahlten Job in der Industrie ;-). Martin Kraft musste mich fast während der kompletten Schwangerschaft ertragen und bewies trotzdem extrem hohe Motivation und Aufopferungsbereitschaft. Er ist immer für eine Überraschung gut und wird bestimmt mal mit einem total verrückten Forschungsprojekt in der Presse landen. Ich möchte mich bei euch ganz doll bedanken, denn selbst wenn ich die Forschung mal verlasse, dann habe ich doch durch das, was ich euch beigebracht habe, einen winzigen Anteil an der Zukunft.

Da Uwe mir immer die Möglichkeit gegeben hat selbstständig zu arbeiten und mein Mausmodell und meine Zellen nach meinen Vorstellungen zu untersuchen, hatte ich sehr viel Spaß bei meiner Arbeit. Dafür und für seine langjährige Unterstützung möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei ihm bedanken.

Nun arbeite ich in einer neuen Arbeitsgruppe mit vielen lieben Kollegen. Zusammen sind wir ein richtig gutes Team und haben uns viel aufgebaut. In euch habe ich viele neue Freunde gefunden und kann mir bei euch ständig Rat holen sei es in medizinischen, histologischen,

englischen, adipösen... Fragestellungen. Vielen Dank meine lieben neuen Mitstreiter: Stefanie Menzel, Ellen Otto, Paul Köhli, Dilara Kaya, Serafeim Tsitsilonis, Jessika Appelt, Melanie Fuchs und Sophia Lunetto. Diese neue Aufgabe habe ich natürlich meinem Chef Johannes Keller zu verdanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, auch mit Kind in der Forschung zu bleiben.

Meine Arbeit am A2 Projekt wird während dessen von Guido Vogt weitergeführt. Sein Ideenreichtum, besonders was neue Methoden betrifft, ist beeindruckend. Es macht sehr viel Spaß sich mit jemandem zu unterhalten, dessen Herz genauso an A2 hängt wie mein eigenes.

Für die hilfreichen Anmerkungen beim nie enden wollenden Verfassen der Monographie möchte ich mich bei Guido Vogt, Björn Fischer-Zirnsak, Jessika Appelt und Uwe Kornak bedanken. Vielen Dank, dass ihr euch die Mühe gemacht habt, einzelne Teile oder sogar die ganze Arbeit durchzulesen und über Verbesserungen nachgedacht habt.

Es gibt aber noch andere Menschen, die am Gelingen dieser Arbeit und an sehr vielen wissenschaftlichen Projekten großen Anteil haben und bei denen man sich doch viel zu selten bedankt. Das sind die Tierpfleger. Ich hatte für die Zucht meiner A2 Mäuse die Unterstützung von Katharina Hansen-Kant, Anne Heß und Judith Fiedler. Außerdem danke ich auch allen Kooperationspartnern, deren Arbeit hier ebenfalls eingeflossen ist und Carola für ihre Assistenz während der letzten Monate.

Obwohl ich es manchmal schon fast vergessen hatte, gibt es noch ein Leben außerhalb der Arbeit. Da ist meine Familie, die mich immer unterstützt hat. Zum einen mein Mann, der in all den Jahren auch die schwierigen Zeiten des Forscherlebens mit mir durchgestanden hat. Zum anderen mein kleiner süßer Sohn, der auch versteht, wenn Mama arbeiten muss. Er arbeitet zurzeit in meinem bisher größten Forschungsprojekt, in dem es darum geht, wie sich kleine Erziehungsfehler auf die Gesamtentwicklung auswirken – man darf gespannt sein. Ich möchte mich aber auch bei meiner ganzen großen Familie und Schwiegerfamilie dafür bedanken, dass sie mir den Freiraum ermöglicht haben, die Doktorarbeit zu vollenden und auch mal ein bisschen länger zu arbeiten.