



**SPRED2 (Sprouty-related EVH1 domain
containing 2) regulates autophagy
in cardiomyocytes**

**SPRED2 (Sprouty-related EVH1 domain
containing 2) reguliert die Autophagie
in Kardiomyozyten**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Benjamin Aßmus

aus Bensheim

Würzburg, 2017



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Manfred Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. Kai Schuh

2. Betreuer: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

3. Betreuer: Dr. Petra Eder-Negrin

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „SPRED2 (Sprouty-related EVH1 domain containing 2) regulates autophagic turnover in cardiomyocytes“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „SPRED2 (Sprouty-related EVH1 domain containing 2) reguliert die Autophagie-Rate in Kardiomyozyten“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Für Angelina, Elena und Cody

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	SPRED Proteine	1
1.1.1	SPRED2 Domänenstruktur	1
1.1.2	EVH1-Domänen	1
1.1.3	c-Kit bindende Domäne (KBD)	2
1.1.4	SPR-Domäne	3
1.2	Inhibitorische Funktion von SPRED Proteinen <i>downstream</i> von Ras und Raf	4
1.3	SPRED2 Gene Trap KO	4
1.4	Phänotyp von SPRED2-defizienten <i>Mus musculus</i>	6
1.5	Der MAP-Kinase Signalweg	6
1.6	Rasopathien	10
1.7	Autophagie	11
1.8	Förster Resonanzenergietransfer	22
1.9	Maus als Tierversuchssystem	24
2	Zielsetzung	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Chemikalien	27
3.2	Geräte	28
3.3	Antikörper	28
3.4	Versuchstiere der SPRED2-KO Mauslinie	29
3.5	Haltung der Versuchstiere	29
3.6	Organentnahme und Herstellung der Gewebshomogenate	30
3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	30
3.8	Immunoblot (Western Blot)	31
3.8.1	Herstellung von 10%, 12.5% und 15% SDS-Polyacrylamidgelen	31
3.8.2	SDS-Gelelektrophorese	32
3.8.3	Blocking und Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern	33
3.8.4	Relative Quantifizierung der Proteinmengen	33
3.9	Polymerasekettenreaktionen (PCR und <i>colony</i> PCR)	34
3.9.1	Primer Design	34
3.9.2	PCR	34
3.9.3	1% Tris-Acetat-EDTA Gelelektrophorese	35
3.10	Relative Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in SPRED2-KO Herzlysaten	35
3.11	Vesikelpräparation aus SPRED2-KO Gehirnhomogenaten	37
3.12	Motor Assays	39
3.12.1	Kinesin Motor Protein Assay	39
3.12.1.1	Microtubuli	39
3.12.1.2	Kinesin Motor Control Protein	39
3.12.1.3	CytoPhos Reagent und Phosphatstandard	40
3.12.1.4	ATP-Stocks	40
3.12.1.5	Microtubuli-aktivierte ATPase-Reaktion	40
3.12.2	Dynein Motor Protein Assay	42
3.12.2.1	Rekonstitution des Cytoplasmic Dynein Motor Proteins (DN01)	42

3.12.2.2	Microtubuli zu 2.0 mg/ml in PEM	42
3.12.2.3	Motor Mix	43
3.12.2.4	Microtubuli-aktivierter Dynein ATPase-Reaktion	43
3.13	Plasmide	45
3.13.1	pmVenus-SQSTM1, pcDNA3-1-mycHis A (-) _5'NotI-SPRED2-HindIII'3 und pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1	45
3.13.2	Hitzeschock-Transformation chemisch kompetenter DH5a	47
3.13.3	Plasmidpräparationen (Mini/Midi/Maxi)	48
3.14	Zellkultur	48
3.14.1	Rekonstitution von HEK293-Frostkulturen	48
3.14.2	Splitten der HEK293-Zellkulturen	49
3.14.3	Transfektion von HEK293-Zellkulturen mit den Plasmiden pmVenus-SQSTM1-N18 und pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1 für FRET Analysen	49
3.15	FRET	50
3.16	Software und Statistik	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Der kardiale SPRED2 knockout Phänotyp	51
4.2	Im Herzen von SPRED2-defizienten Mäusen sind Schlüsselproteine der Autophagie herunterreguliert	53
4.3	Die Autophagie-Rate im SPRED2-KO Mausmodell ist verringert	55
4.4	Erhöhte Apoptose im Herzen SPRED2-defizienter Mäuse	56
4.5	Der MAP-Kinase Inhibitor SPRED2 beeinflusst die Aktivität der Dynein-ATPase positiv	57
4.6	Auswirkung einer SPRED2-Defizienz auf die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	60
4.7	Das Auftreten von vakuolären Strukturen in Cardiomyocyten wird begleitet von SQSTM1- und CathepsinD positiven Vesikeln	61
4.8	SPRED2 interagiert im pull-down mit SQSTM1 und NBR1 und VTI1b ist im SPRED2-KO erhöht	64
4.9	FRET-Analysen von SPRED2-eCFP und pmVenus-SQSTM1-N18	66
5	Diskussion	67
6	Zusammenfassung und Ausblick	80
7	Literaturverzeichnis	83
8	Danksagung	87
9	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 SPRED2-mRNA	1
Abbildung 2 Die SPRED-Proteinfamilie	4
Abbildung 3 SPRED2 Gene Trap KO Konstrukt	5
Abbildung 4 Der MAP-Kinase Signalweg	9
Abbildung 5 Microautophagie, CMA und Macroautophagie	13
Abbildung 6 Die gemeinsamen Domänen der Cargo-Rezeptoren SQSTM1 und NBR1	18
Abbildung 7 Die Macroautophagie von der Initiation bis hin zur Bildung des Autolysosoms	20
Abbildung 8. Prinzip des Förster Resonanzenergietransfers	24
Abbildung 9 H ₂ O ₂ -Standard für den In-Vitro ROS-Assay	37
Abbildung 10 Das Plasmid pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1	46
Abbildung 11 Das Plasmid pcDNA3-1-mycHis A (-) _5'NotI-SPRED2-HindIII'3	47
Abbildung 12 Der SPRED2-Phänotyp in Cardiomyocyten	52
Abbildung 13 Quantitative Immunoblot-Analysen von Schlüsselproteinen in der Autophagie	54
Abbildung 14 Quantitative Immunoblot-Analyse von MAPLC3	56
Abbildung 15 Aktivierte Cas-3 als Marker für Apoptose	57
Abbildung 16 Motor Protein Assays zur Messung des Umsatzes von ATP	59
Abbildung 17 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Herzlysaten	61
Abbildung 18 Analyse der Aspartyl-Protease CathepsinD und des autophagosomalen Cargo-Rezeptors SQSTM1	63
Abbildung 19 Immunoblot zum Autophagie-assoziierten vesicle SNARE VTI1b	64
Abbildung 20 Der Pull-down Assay mit GST, GST-EVH1 und GST-FL-SPRED2 (Glutathion S-Transferase full length SPRED2)	65
Abbildung 21 FRET-Interaktionsanalysen von SPRED2-eCFP und pmVenus-SQSTM1-N18	66

Abkürzungsverzeichnis

aa	=	amino acid
ATG	=	autophagy-related gene
BSA	=	bovines Serumalbumin
CMA	=	chaperone-mediated autophagy
EVH1	=	Ena/VASP homology
EGF	=	endothelial growth factor
FGF	=	fibroblast growth factor
FRET	=	Förster Resonanzenergietransfer
GABARAP	=	γ -Buttersäure-Rezeptor assoziiertes Protein
GATE	=	Golgi-associated ATPase Enhancer of 16 kDa
GMP	=	Guanosinmonophosphat
GTP	=	Guanosintriphosphat
KBD	=	c-Kit bindende Domäne
kDa	=	Kilodalton
KO	=	knockout
LC3	=	light-chain 3 (s. MAPLC3)
MAPK	=	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MAPKK	=	Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase
MAPKKK	=	Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MAPLC3	=	Microtubuli-associated protein light chain 3
mTOR	=	mammalian target of rapamycin
mTORC	=	mammalian target of rapamycin complex
NBR1	=	neighbour of BRCA1
PB1	=	Phox/Bem-1
PE	=	Phosphatidylethanolamin
Raf	=	rapidly accelerated fibrosarcoma / rat fibrosarcoma
Ras	=	rat sarcoma
RT	=	Raumtemperatur
RTK	=	Rezeptortyrosinkinase
SA	=	Spleißakzeptor
SDS	=	Sodiumdodecylsulfat
SPR	=	Sprouty-related
SPRED	=	Sprouty-related EVH1-domain containing
SQSTM1	=	Sequestosome-1
TierSchG	=	Tierschutzgesetz
UBA	=	Ubiquitin-assoziierte Domäne
VASP	=	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
v/v	=	Volumen / Volumen
w/v	=	Gewicht / Volumen

1 Einleitung

1.1 SPRED Proteine

SPRED (**S**prouty-related **EVH1** domain containing) Proteine bezeichnen eine Familie von MAP-Kinase Inhibitoren, die innerhalb der MAP-Kinase-Signalkaskade downstream des monomeren GTP-bindenden Proteins Ras und den Raf-Isoformen (Serin/Threonin-Proteinkinasen) inhibitorisch agieren.

1.1.1 SPRED2 Domänenstruktur

Das SPRED2-Gen ist bei der Maus auf Chromosom 2, 2p14 lokalisiert und weist eine Struktur aus 6 Exons auf. Exon 1-3 codieren hierbei für die EVH1-Domäne, Exon 4 und Exon 5 codieren für eine Interregion zwischen EVH1-Domäne und KBD, Exon 6 codiert sowohl für die KBD und die Interregion zwischen KBD und SPR, als auch für die C-terminale SPR-Domäne. Die gesamte Exon-Struktur resultiert in einer 1233 bp großen mRNA, die für die 418 Aminosäuren von SPRED2 codieren. Das SPRED2 Protein selbst weist eine Molekülmasse von ca. 46 kDA auf.

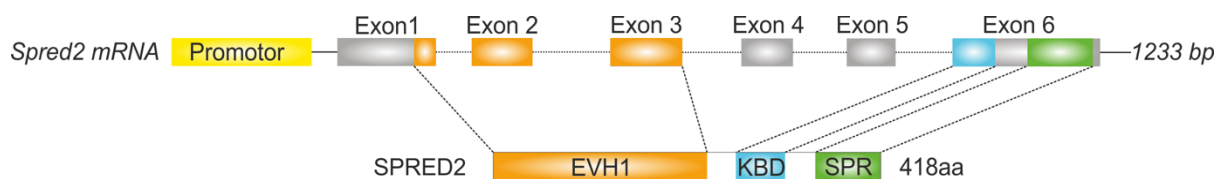


Abbildung 1 SPRED2-mRNA. Dargestellt sind die intronischen und exonischen Sequenzabschnitte mit einer Gesamt Länge von 1233 Nucleotiden. Das 3'-Ende von Exon 1 bis Exon 3 codieren für die EVH1-Domäne. Exon 4 und Exon 5 codieren für die Interregion zwischen EVH1 und KBD. Exon 6 codiert am 5'Ende für die KBD und am 3'-Ende für die C-terminale Sprouty-Domäne.

1.1.2 EVH1-Domänen

Charakteristisch für nahezu alle Isoformen der SPRED-Proteine ist eine dreiteilige Domänenstruktur aus N-terminaler EVH1-Domäne, einer zentralen c-Kit bindenden

Domäne und einer C-terminalen Cystein-reichen Sprouty-Domäne, die essentiell für die Lokalisierung der SPRED-Proteine an die Zellmembran ist.

Die EVH1 Domäne ist ein aus 115 Aminosäuren bestehendes, N-terminales 13 kDa Protein-Interaktionsmodul, welches interagierende Proteine mit intrazellulären Signalwegen, wie dem MAP-Kinase-Signalweg, assoziiert. EVH1-Domänen erkennen und interagieren mit spezifischen Prolin-reichen Sequenzen (PRS). Die Interaktion der EVH1-Domäne mit anderen Proteinen ist durch eine hohe Spezifität und niedrige Affinität gekennzeichnet. Die Erkennungsstelle der EVH1-Domäne ist das Ziel einer kleinen, 3-6 Aminosäuren langen PRS des interagierenden Proteins. Weitere Protein-Protein-Interaktionen werden durch flankierende, die Interaktion stabilisierende Aminosäure-Sequenzen unterstützt [1]. Die EVH1-Domäne interagiert mit FPPPP-Motiven von Rezeptorproteinen, mit fokalen Adhäsionsproteinen wie Vinculin [2] und mit dem Protein-Interaktionsmodul PB1 (Phox/Bem1) sowie den Autophagie-assoziierten Transportrezeptoren NBR1 und SQSTM1. Ena/VASP Proteine besitzen ebenfalls eine EVH1-Domäne und sind eine konservierte Actin-regulierende Gruppe von Proteinen, bestehend aus EVH1- und EVH2-Domänen, sowie einer Prolin-reichen zentralen Region. Ena/VASP Proteine regulieren Actin-basierte, zelluläre Prozesse wie die Migration von Fibroblasten und Axonen. Für Ena/VASP Proteine sind sowohl fördernde und inhibierende Effekte für Actin-abhängige Prozesse beschrieben [3]. Innerhalb der SPRED- und anderen Proteinfamilien, weisen die entsprechenden Formen nur eine einzige EVH1-Domäne auf.

SPRED3, welches vornehmlich im Gehirn exprimiert ist, besitzt keine funktionelle c-Kit bindende Domäne. Während die EVH1-Domäne für Proteininteraktionen zuständig ist, vermittelt die c-Kit bindende Domäne die Interaktion mit der die Zellmembran durchspannenden Tyrosinkinase c-Kit. Die Sprouty-Domäne vermittelt nicht ausschließlich nur die intrazelluläre Translokation von SPRED2 vom Cytoplasma zur Zellmembran, sondern auch die Homodimerisierung von SPRED2 und stellt damit einen essentiellen Teil der Funktion der SPRED-Proteine dar.

1.1.3 c-Kit bindende Domäne (KBD)

Die c-Kit bindende Domäne von SPRED Proteinen ist eine ca. 50 Aminosäuren umfassende zentrale Domäne (aa234 – aa286). SPRED1/2 besitzen funktionelle c-Kit

Domänen und inhibieren in vollem Umfang die Aktivierung der MAP-Kinase Signalkaskade, wohingegen die inhibitorische Wirkung von SPRED3 im Vergleich verringert ist. Die KBD von SPRED3 weist an einer essentiellen Stelle die Substitution von Arg247 durch Glycin auf, was darauf hinweist, dass die KBD für die inhibitorische Wirkung von SPRED vorteilhaft, nicht jedoch essentiell ist [4].

1.1.4 SPR-Domäne

SPRED-Proteine besitzen eine konservierte, C-terminale 110 Aminosäuren große Cystein-reiche SPR-Domäne, die homolog zu der C-terminalen Domäne von Sprouty Proteinen ist. Sprouty-Proteine bezeichnen eine Familie aus 4 Proteinen, die allesamt als Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) beschrieben und als Regulatoren von RTK-Signalkaskaden während der Organentwicklung und in verschiedenen Krankheitsprozessen identifiziert worden sind [5].

Ursprünglich wurden Sprouty Proteine (*dSpry*) von *Hacohen et al.* als Inhibitoren des *fibroblast growth factor 3* (FGF3) in *Drosophila melanogaster* während der Organogenese des Trachealsystems beschrieben [6]. Nach Analysen auf Sequenzhomologien wurden 4 Sprouty Proteine in Säugetieren entdeckt, drei Homologe von *dSpry* (Sprouty 1/2/3) als humane Sprouty Proteine (hSprouty) und ein weiteres Sprouty Protein wurde im Mausmodell entdeckt (mSprouty 4) [7]. Alle humanen Homologe von Sprouty besitzen eine Cystein-reiche c-terminale Domäne, die Ähnlichkeiten zu den verwandten Sprouty Proteinen in *D. melanogaster* [6] aufweist. Die Expressionsmuster von mSprouty decken sich während der Organogenese mit der Expression von FGF3 [7-10], was darauf hinweist, dass Wachstumsfaktoren die Expression von Sprouty Proteinen beeinflussen.

Funktionell ermöglicht die SPR die Membranlokalisation von SPRED und Sprouty durch die Interaktion der SPR-Domäne mit membranständigen Gerüstproteinen wie bspw. Caveolin1 und dem Signal- und Gerüstpeptid Neurofibromin1, welche beide direkt an der inneren Zellmembran lokalisiert sind.



Abbildung 2 Die SPRED-Proteinfamilie. Allen SPRED-Proteinen ist die dreiteilige Domänenstruktur gemeinsam. Die EVH1-Domäne vermittelt die Interaktion mit anderen Proteindomänen, wie bspw. Phox/Bem1 (PB1) oder weiteren EVH1- und EVH2-Domänen. Die c-Kit bindende Domäne vermittelt die Interaktion mit der Tyrosinkinase c-Kit und die Sprouty-Domäne ist essentiell für die Funktion von SPRED, indem es die Translokation zur Zellmembran ermöglicht. Die Exon-Struktur von SPRED2 besteht aus 1233 codierenden Nukleotiden und resultiert in einem Protein mit einer errechneten Molekülmasse von 46 kDa. Im Gegensatz zu SPRED1/2 besitzt SPRED3 keine funktionelle c-Kit bindende Domäne, da das für die Funktion der c-Kit Domäne essentielle Arg247 durch Glycin substituiert ist.

1.2 Inhibitorische Funktion von SPRED Proteinen *downstream* von Ras und Raf

SPRED2 bindet konstitutiv an die GTPase Ras, verhindert jedoch weder die Aktivierung von Ras, noch die Translokation von Raf an die Zellmembran. Vielmehr verhindert SPRED2 die Aktivierung der MAP Kinase durch Inhibition der Phosphorylierung von Raf an Serin388, das für die Aktivierung von Raf notwendig ist. SPRED2 inhibiert spezifisch den MAP-Kinase Signalweg zwischen Ras und Raf; eine Inhibition von EGF-induzierter MAP-Kinase Aktivität konnte nicht gezeigt werden [11].

1.3 SPRED2 Gene Trap KO

Gene Traps oder auch *gene targeting* Vektoren nutzen das aus dem pGTO gene trap Vektor stammende β -geo Konstrukt, das für eine β -Galactosidase und eine Neomycin-Resistenz codiert, um einerseits die Funktion eines bestimmten Gens durch den Splice-Akzeptor (SA) auszuschalten und andererseits gleichzeitig eine Reporterfunktion zu integrieren, mit der Zellen und Gewebe identifiziert werden können, in welchen das *gene of interest* (goi) exprimiert wird [12]. Der Gene Trap ist eine kosteneffiziente und schnelle Methode mit Hilfe einer zufälligen Insertion eines Gene Trap Konstrukts eine Mutation und Reporterfunktion unter die Kontrolle des entsprechenden Promotors zu bringen und die Genaktivität auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen [13]. Die Reporterfunktion des fusionierten Gens (β -Galaktosidase) kann mit Hilfe einer Färbung von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-

galactopyranosid (X-Gal) sichtbar gemacht werden. Ist das β -geo Konstrukt exprimiert, wird unter Sauerstoffexposition aus dem chromogenen Substrat X-Gal der Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo. Durch die Intensität der Färbung mit X-Gal lässt sich nicht nur eine Aussage darüber treffen, ob ein Protein in bestimmten Zellen und Geweben exprimiert wird, sondern auch darüber, wie aktiv ein Promotor in unterschiedlichen Geweben ist.

Abb. 3 zeigt den Gene Trap, mit dem der globale SPRED2 knockout generiert wurde, der das Objekt der Untersuchungen dieser Arbeit ist. Das Gene Trap Konstrukt besteht am 3'-Ende aus einer intronischen *engrailed2* Sequenz (*en2 intron1*), einem Spleißakzeptor, der β -Galaktosidase/Neomycin Resistenz Fusions-cDNA, einer SV40pA-Polyadenylierungssequenz zur Termination der Transkription und einer *pUC backbone* Vektorsequenz.

Im Fall des in dieser Arbeit genutzten Gene Trap Mausmodells wird das zwischen Exon 4 und Exon 5 mutierte SPRED2 Gen entsprechend der Promotoraktivität in bestimmten Geweben exprimiert. Hierbei erfolgt die Transkription des Gens über das Exon 4 hinaus. Das inserierte β -geo Konstrukt wird ebenfalls transkribiert, jedoch stoppt die Transkription nach der Polyadenylierungssequenz. Genprodukt ist eine noch immer funktionelle EVH1-Domäne von SPRED2, die an eine β -Galaktosidase fusioniert ist.

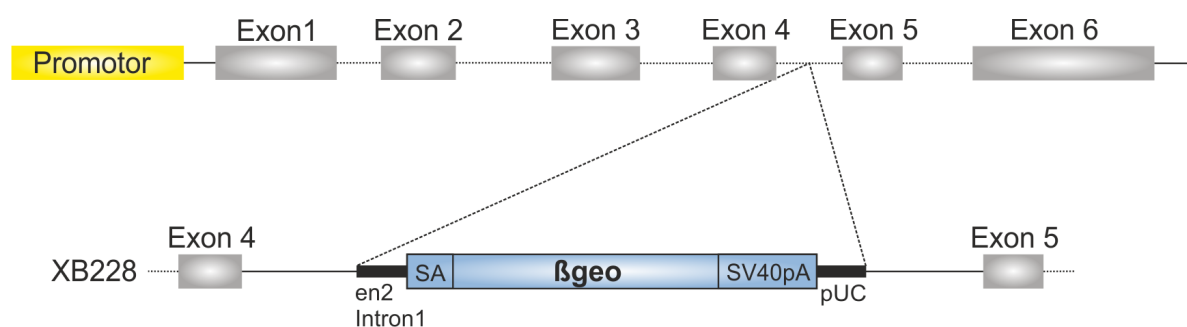


Abbildung 3 SPRED2 Gene Trap KO Konstrukt. Die Insertion des Gene Trap Konstrukts erfolgte zwischen Exon 4 und Exon 5. Das Konstrukt besteht aus einer *engrailed2* Intron-Sequenz, einem Spleißakzeptor, einem Fusionsgen aus β -Galaktosidase/Neomycin cDNA, einer SV40pA-Polyadenylierungssequenz, um die Transkription zu terminieren und einer abschließenden pUC backbone Sequenz. Bei der Expression des Gens wird eine mRNA transkribiert, die für die von Exon 1-3 codierte EVH1-Domäne codiert, sowie des daran fusionierten, artifiziiellen Fusionsproteins β -Galaktosidase.

1.4 Phänotyp von SPRED2-defizienten *Mus musculus*

Die Untersuchung von SPRED2 ist aus vielerlei Hinsicht wissenschaftlich ergiebig. Zum einen sind über die Funktion des MAP-Kinase-Inhibitors SPRED2 im Herzen noch wichtige Fragen offen, zum anderen ist SPRED2 während der Embryonalentwicklung im Herzen prominent exprimiert, ohne dass die genaue Funktion auf die Entwicklung des Herzens dargestellt wurde.

In der frühen Embryonalentwicklung zeigt sich die Expression von SPRED2 in ektodermalem und mesodermalem Gewebe, während der späteren Ausdifferenzierung der Gewebe ist SPRED2 sowohl in sich entwickelndem Nervengewebe, in Herz und Lunge, sowie in den Wachstumszonen während der chondralen Ossifikation exprimiert. Der Effekt auf die Knochenbildung zeigt sich bei SPRED2^{-/-} Mäusen in einem Minderwuchs. Ein wichtiger regulativer Mechanismus bei der Induktion zur Bildung von Knochengewebe, sowie zahlreichen weiteren Entwicklungsprozessen, ist die Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs durch *fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3). FGFR3 wird in proliferierenden und prähypertrophischen Chondrozyten exprimiert. Eine Überexpression von FGFR3 und eine verringerte Inhibition des dem FGFR3 folgenden MAPK-Signalkaskade resultieren in einem Achondroplasie-ähnlichen Phänotyp. Charakteristisch für SPRED2-defiziente Mäuse ist ein verringertes Körpergewicht, eine reduzierte Tibia-Länge im Vergleich zu Individuen mit funktionellem SPRED2, sowie schmalere Wachstumsplatten während der Knochenbildung.

Weiterhin konnte für die in dieser Arbeit untersuchte SPRED2-KO Mauslinie ein OCD (*obsessive compulsive disorder*)-ähnlicher Phänotyp festgestellt werden [14].

1.5 Der MAP-Kinase Signalweg

Um differenziert auf extrazelluläre Reize reagieren zu können, muss das Signal durch Liganden, die bspw. an RTKs binden, zunächst in der Zelle weitergereicht und verarbeitet werden (*downstream signaling*). Dabei wird über eine komplexe Verkettung von sequenziellen Phosphorylierungsreaktionen die Amplitude und Dauer der Signaltransduktion reguliert. Hierbei spielen die MAP-Kinase Signalwege eine

bedeutende Rolle. Durch Ligandenbindung der Rezeptor-Tyrosin Kinasen auf der Außenseite der Zellmembran, die Wachstumsfaktoren wie FGFs (*fibroblast growth factors*), EGFs (*endothelial growth factors*) oder Hormone binden, werden Signale externer Liganden registriert, durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren weitergeleitet und dann durch eine sequentielle Phosphorylierung *downstream* in der Zelle übertragen, bis durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Nucleus eine Reaktion in Form von induzierter Genexpression hervorgerufen wird.

Durch das Binden spezieller Liganden wie bspw. FGF, EGF oder VEGF an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) wird die katalytische Aktivität des Rezeptors durch eine Dimerisierung der katalytischen Domänen erhöht und dieser anschließend intrazellulär an spezifischen Tyrosin-Resten phosphoryliert. Die Phosphorylierung von RTKs hat die Formierung von Proteinkomplexen zur Folge, deren Zusammensetzung die weitere Signalkaskade bestimmt. So ist oftmals die Aktivierung des monomeren G-Proteins Ras wichtiger Bestandteil der auf die Aktivierung folgenden Signalkaskade. Die Rekrutierung von Ras erfolgt durch Adapter- bzw. Gerüstproteine, wie bspw. die Proto-Onkogen Tyrosin-Proteinkinase Src, welche mit dem *growth factor-receptor bound protein 2* (Grb2) am intrazellulären Teil der RTK lokalisiert ist. Die Tyrosin-Kinase Src phosphoryliert spezifische Tyrosinreste anderer Proteine. Eine Erhöhung der Src-Aktivität ist mit gesteigerter Proliferation assoziiert [15]. Das Adapterprotein Grb2 besitzt eine SH2-Domäne, welche an die phosphorylierte RTK bindet und zwei SH3-Domänen, welche Prolin-reiche Regionen anderer Proteine erkennen, wodurch Grb2 als Brücke zwischen RTK und nachfolgenden Faktoren wirkt [16]. SH (*Src-homology*)-Domänen sind in zahlreichen Adapterproteinen vorhanden, die intrazellulär Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelte Signale weiterleiten. Proteine mit SH-Domänen sind in der Lage, andere Proteine zu binden, die an speziellen Tyrosinresten phosphoryliert sind [17].

Nach erfolgreicher Bindung von FGF an den FGFR und der darauffolgenden intrazellulären Phosphorylierung des Rezeptors bindet der *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) *Son of Sevenless* (Sos) an den Src-Grb2-Komplex und sorgt am G-Protein Ras für den Austausch von GDP zu GTP. GTP-gebundenes Ras interagiert unter anderem mit Isoformen der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase Raf. Vermutlich resultiert das Binden von Ras an Raf in einer Konformationsänderung, welche die Aktivität von Raf drastisch erhöht [18]. Aktiviertes Raf wiederum aktiviert die Serin/Tyrosin/Threonin-selektiven MAPK/ERK-Kinasen

(MEK, MKK oder auch MAPKK) MEK1 und MEK2, welche daraufhin die *Mitogen-activated protein* Kinasen (MAPKs), wie *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), phosphorylieren. ERKs sind Proteinkinasen intrazellulärer Signalwege, die wiederum zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wie bspw. ELK1, durch Phosphorylierung aktivieren. Durch diese aktivierten Transkriptionsfaktoren beeinflussen die MAPK-Signalkaskaden die Expression spezifischer Gene und ermöglichen durch die serielle Signalweiterleitung nicht nur eine intrazelluläre Reaktion der Zelle auf einen exogenen Stimulus, sondern auch die Möglichkeit die Signalamplitude und die inhibitorische Rückkopplung zu beeinflussen (Abb. 4).

Einige Krankheiten, denen eine fehlreguliere Aktivität von Ras innerhalb des MAP-Kinase-Signalkaskade zugrunde liegt, werden unter dem Begriff „Rasopathien“ zusammengefasst und sind sowohl für die kognitive und neuronale Entwicklung, sowie für cardiovaskuläre Integrität bedeutend.

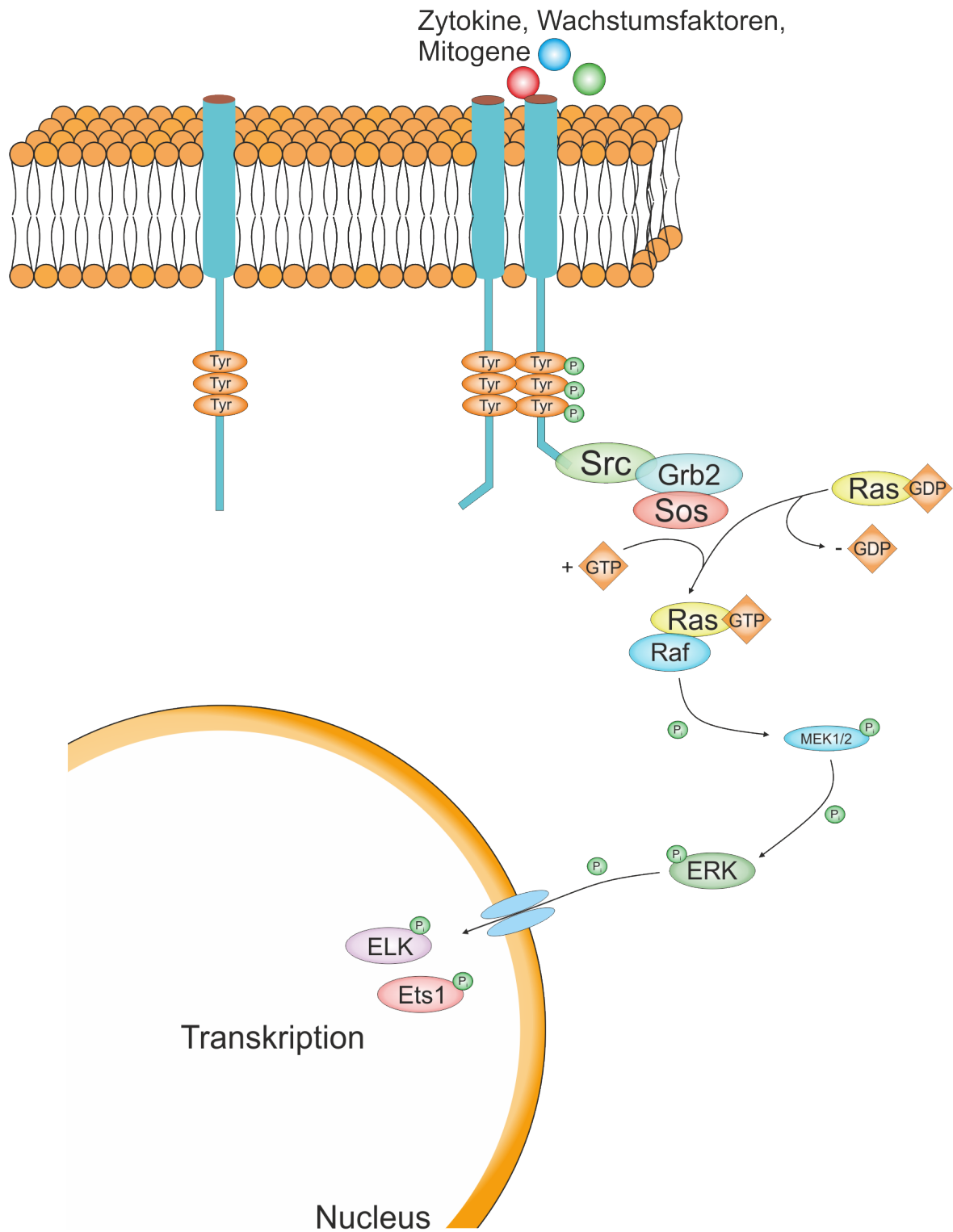


Abbildung 4 Der MAP-Kinase Signalweg. Extrazelluläre Liganden binden an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Dies führt zu einer intrazellulären Dimerisierung der katalytischen Region und zu Phosphorylierungen an spezifischen Tyrosin-Resten. Ein Proteinkomplex, bestehend aus dem Gerüstprotein Src, dem Adapterprotein Grb2 und dem *guanine-nucleotide-exchange factor* Sos (*son-of-sevenless*), wird geformt, welcher für die Abspaltung von GDP von Ras und infolgedessen zur GTP-Assoziation der GTPase Ras führt. GTP-gebundenes Ras bindet an die Proteinkinase Raf und es kommt zur sequenziellen Phosphorylierung der downstream befindlichen Proteinkinasen, wie MEK1/2 und ERK, sowie den Transkriptionsaktivatoren ELK und Ets1. Der Transkriptionsfaktor Ets1 führt zur Expression spezifischer Gene.

1.6 Rasopathien

RASopathien bezeichnen eine Gruppe kongenitalen, meist autosomal dominanter Erkrankungen, bei denen die Regulation des MAP-Kinase Signalweg fehlgeleitet ist. Hierzu zählen neben anderen das Costello-Syndrom, das Legius Syndrom, das mit dem Verlust der Funktion von SPRED1 assoziiert ist, als auch die Neurofibromatose Typ 1 (Morbus Recklinghausen).

Neurofibromatose Typ 1 (NF-1) ist eine zahlreiche Organe treffende Erkrankung mit einer Inzidenz von 1 in 4.000 Geburten. Symptomatisch für die Neurofibromatose Typ 1 sind neben craniofaciellen Alterationen Minderwuchs, Makrocephalie, Lisch-Knoten in der Iris und verlangsamter geistiger Entwicklung auch die markanten Café-au-lait Flecken, die als scharf begrenzte, nicht maligne Veränderungen der Haut auftreten. Weiterhin sind für die NF-1 nicht maligne dermale und noduläre, sowie plexiforme Neurofibrome typisch. Individuen mit NF-1 sind prädisponiert für die Entwicklung maligner Tumoren, insbesondere Neurofibrosarcome (*malignant peripheral nerve sheath tumors*, MPNSTs). Bei Säuglingen und Kindern im Alter bis etwa 2 Jahren mit NF-1 sind 2% aller Leukämien eine juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML). Verursacht werden die Symptome, vornehmlich die Entwicklung der Neurofibrome, durch eine bi-allelische Inaktivierung des *NF1* Gens. Das Produkt des *NF1*-Gens ist das 327 kDa große Protein Neurofibromin, das als RasGAP (Ras GTPase aktivierendes Protein) agiert. Der Verlust der NF1-Funktion resultiert *downstream* von Ras in der unkontrollierten Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs und somit u.a. in einer deregulierten Proliferation. Neurofibromin wirkt als negativer Regulator von Ras durch die Umwandlung von aktiviertem RasGTP zu inaktivem RasGDP. Durch die negative Regulation von Neurofibromin wird die Aktivität von Ras um den Faktor 1.000 reduziert.

Das Legius-Syndrom (LS) ist ebenfalls eine auf den Verlust der negativen Regulation der GTPase Ras zurückzuführende Erkrankung. Symptome des LS sind ähnlich wie bei der NF-1 die in unterschiedlicher Anzahl und unterschiedlich starker Ausprägung auftretenden Manifestationen der Café-au-lait Flecken, verlangsamte geistige Entwicklung und/oder Lernschwierigkeiten, als auch Makrocephalie. Im Gegensatz zur NF-1 ist das Legius-Syndrom symptomatisch abzugrenzen, da keine Lisch-Knoten in der Iris, keine Neurofibrome und keine Veränderungen der Knochen auftreten. Jedoch zeigen sich im Erwachsenenalter bei LS-betroffenen Individuen eine

Häufung subkutaner Lipome. Betroffene Individuen mit LS zeigen keine Mutation im NF1-Lokus. Das Legius Syndrom wird ebenfalls durch eine bi-allelische Inaktivierung des Proteins *Sprouty-related EVH1 domain containing protein 1* (SPRED1) verursacht.

1.7 Autophagie

Autophagie bezeichnet einen in jeder Zelle basal ablaufenden, katabolen Prozess der zytoplasmatische Komponenten, wie defekte Proteine oder Zellorganellen einer lysosomalen Degradation zuführt, um die allgemeine Homöostase aufrecht zu erhalten. Autophagie stellt dabei auch eine wichtige zytoprotektive Antwort auf zellulären Stress dar. Eine unzureichende oder exzessive Autophagie beeinflusst die Zellphysiologie permanent negativ; eine fehlerhafte Autophagie ist mit zahlreichen pathologischen Folgen, wie Krebs [19], vorzeitigem Altern [20], erhöhter Apoptose [21] und neurodegenerativen Erkrankungen [22-24] assoziiert und muss deshalb genau reguliert werden.

Das generelle Prinzip der Autophagie ist das Einschließen zytoplasmatischer Komponenten innerhalb eines transienten Zellorganells aus einer Doppelmembran, welches Autophagosom genannt wird, das daraufhin mit im Zytoplasma befindlichen Lysosomen fusioniert, um die im Autophagosom enthaltenen Organellen und Makromoleküle enzymatisch mit Hilfe von Proteasen und Hydrolasen zu degradieren [25]. Im Gegensatz zum Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), welches kurzlebige Proteine abbaut, werden langlebige Proteine und größere Zellorganellen durch die autophagische Degradation in ihre makromolekularen Bestandteile zerlegt [26, 27]. Weiterhin hat die autophagische Degradation eine nahezu unbegrenzte degradative Kapazität und beschränkt sich nicht auf die Degradation von Proteinen, sondern baut ebenso DNA, RNA und Fettsäuren ab.

Der Prozess der Autophagie lässt sich je nach zu degradierenden Bestandteilen des Zytoplasmas in drei Unterformen einteilen: Mikroautophagie ist ein Prozess, der in der Zelle für die in den meisten Fällen nicht-selektive Degradation von Proteinen verantwortlich ist und besondere Bedeutung bei Nährstoff- oder Stickstoffmangel hat [28]. Hierbei werden die abzubauenen zellulären Bestandteile direkt von lysosomalen Vesikeln eingeschlossen. Aufgabe der Mikroautophagie ist die Aufrechterhaltung der

Größe bestimmter Zellorganellen, der Membranhomöostase und des Zellüberlebens unter Stickstoffmangel. Der Prozess der Mikroautophagie läuft gemeinsam mit und in Abstimmung mit anderen „selbst verdauenden“ Prozessen, wie der selektiven Mikroautophagie, der Chaperon-vermittelten Autophagie (*chaperone-mediated autophagy*, CMA) und der selektiven Makroautophagie, ab. Innerhalb der Mikroautophagie gibt es ebenfalls selektive Degradationsmechanismen, wie die Mikropexophagie, bei der Peroxisomen, die neben degradierenden Vakuolen liegen, sequestriert werden, die Piecemeal-Autophagie, bei der Teile des Nucleus degradiert werden und die Mikromitophagie, einem Mechanismus zur Degradation von Mitochondrien. Die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) bezeichnet die Chaperon-abhängige Selektion von im Zytoplasma gelösten Substraten, die durch ein KFERQ-Motiv gekennzeichnet sind und mit Hilfe von hsc70/Cochaperon-Komplexen direkt zur lysosomalen Membran gebracht und mittels LAMP-2A Multimeren zum Abbau in das Lysosom transportiert werden [28]. Die am umfangreichsten untersuchte Form der Autophagie ist die selektive Makroautophagie, die im Folgenden ‚Autophagie‘ genannt wird. Hierbei werden Ubiquitin-markierte Substrate, i.d.R. langlebige, größere Proteine und Zellorganellen, selektiv in einer expandierenden Membran, dem Autophagosom, eingeschlossen und die enthaltenen Bestandteile nach Fusion mit Lysosomen degradiert. Abb. 5 zeigt die Formen der Autophagie.

Das Autophagosom wird ausgehend von der *phagophore assembly site*, oder auch *pre-autophagosomal structure* (PAS) *de novo* gebildet [29, 30]. Diese ist kein Teil eines auf Autophagie spezialisierten, bestehenden Organells, sondern wird bei jeder autophagischen Degradation neu gebildet. Als mögliche Orte der PAS werden das Endoplasmatische Reticulum, mitochondriale Membranen oder auch der Golgi-Apparat diskutiert [31]. So sind die *endoplasmatic reticulum exit sites* (ERES), ein spezieller Bereich des ER, mit der Bildung autophagischer Membranen assoziiert. Das ER spielt vermutlich in seiner Funktion Phospholipide zu synthetisieren, eine maßgebliche Rolle in diesem zellulären Degradationsmechanismus, der hochgradig abhängig von der Bildung neuer Membranstrukturen ist. Ein weiterer möglicher Ort der PAS stellt der Golgi-Apparat dar. *Geng, et al.* haben gezeigt, dass im Fall einer gesteigerten Autophagie unter Stressbedingungen Membranen des Golgi-Apparates vermehrt an der Bildung von Autophagosomen beteiligt sind, anstatt in die Zellmembran transportiert zu werden [32].

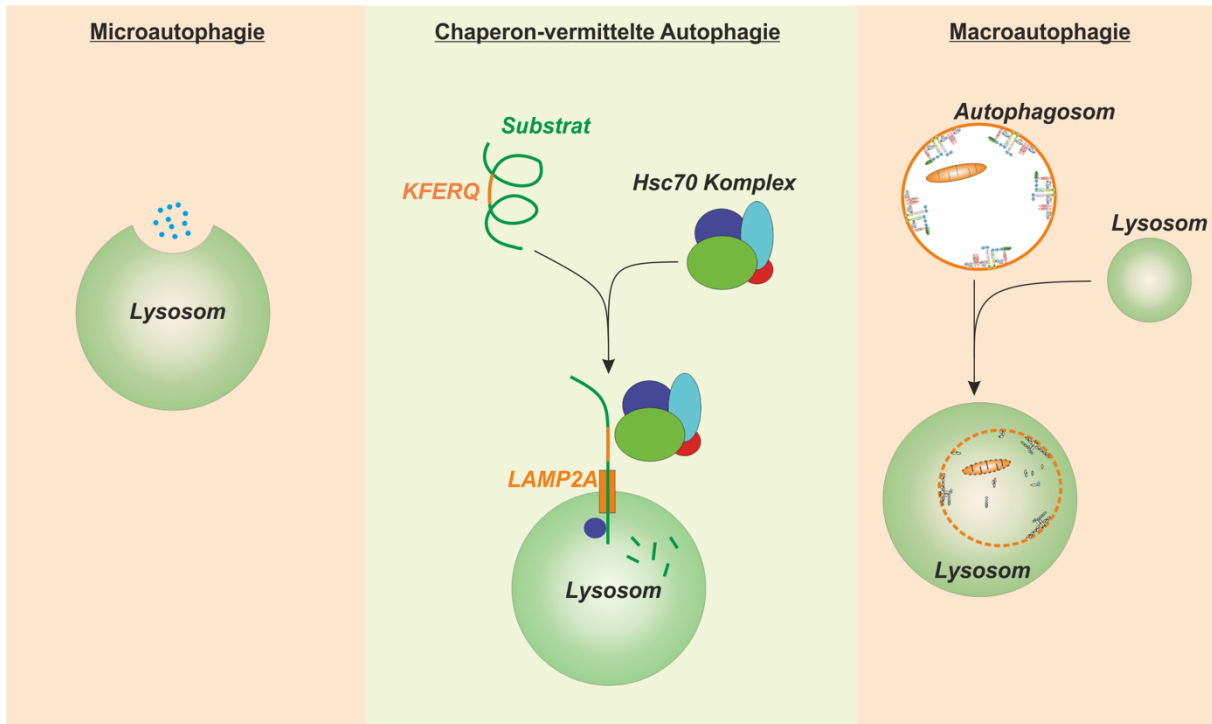


Abbildung 5 Microautophagie, CMA und Macroautophagie. Bei der Degradation kurzlebiger Proteine und zellulärer Bestandteile werden Peroxisomen, Teile des Nucleus und zum Teil Mitochondrien degeneriert. Die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) beschreibt die Chaperon-abhängige Selektion von Proteinen, welche durch eine KFERQ-Sequenz gekennzeichnet sind. Die Translokation dieser Proteine in Lysosomen wird unter anderem durch den hsc70-Komplex vermittelt. Bei der Macroautophagie, die oftmals einfach „Autophagie“ genannt wird, werden langlebige Proteine und Zellorganellen durch Ubiquitin markiert und selektiv von Cargo-Rezeptoren, wie SQSTM1 und NBR1, an eine expandierende, die zu degradierenden Proteine und Zellorganellen umschließende Membran gebunden. Das entstandene Autophagosom fusioniert anschließend mit Lysosomen, wo die Proteine und Zellorganellen hydrolysiert werden.

Bei diesem Vorgang wirken die beiden post-Golgi Proteine sec4 und sec2. sec4 bezeichnet eine Rab GTPase, welche mitverantwortlich für zahlreiche Transportprozesse unterschiedlicher Vesikel in die verschiedenen Kompartimente der Zelle ist. sec2 bezeichnet den Kofaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) für sec4. Rab GTPasen sind aktiv, wenn GTP gebunden ist und sind inaktiv, wenn GDP gebunden ist. Der Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Zustand wird durch eine Konformationsänderung in der Nukleotidbindungsregion hervorgerufen, welche durch den entsprechenden GEF ausgelöst wird [33].

Entdeckt wurde der Prozess der Autophagie in den 1960er Jahren durch Arbeiten an der Distribution von Enzymen in der Leber von Ratten und der Entdeckung des Peroxisoms [34]. Die grundlegenden molekularen Mechanismen jedoch, sowie die beteiligten Proteine und Signaltransduktionswege, die bei der Autophagie eine Rolle

spielen, wurden erst etwa 30 Jahre später genauer untersucht [35]. Ein essentieller Schritt bei der Aufklärung der autophagischen Degradation stellte die Entdeckung der sogenannten *autophagy-related genes* (ATGs) in der Hefe *S. cerevisiae* dar, die ursprünglich noch als APGs [36, 37] bezeichnet wurden. ATGs bezeichnen hochkonservierte, spezifisch die Autophagie regulierende Proteine. Eine Vielzahl der ursprünglich in *S. cerevisiae* entdeckten ATGs hat ein entsprechendes Ortholog in Säugetieren [38]. Die Entdeckung von ATGs, sowie die Identifizierung ihrer entsprechenden Orthologe hat die experimentelle Manipulation der autophagischen Degradation in vivo, bpsw. durch Generation entsprechender knockout Mausmodelle, und dadurch die funktionelle Aufklärung dieses essentiellen Prozesses der zellulären Homöostase, ermöglicht.

Innerhalb der Gruppe der ATGs nehmen *Autophagy-related gene 8* (Atg8 / MAPLC3) und Atg12 durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu Ubiquitin eine besondere Rolle ein. Ubiquitin ist ein 8,5 kDa großes Peptid aus 76 Aminosäuren, das seine Bezeichnung durch das ubiquitäre Vorhandensein in allen Zellen erhalten hat. Ubiquitin ist ein durch sämtliche Phyla hochkonserviertes Protein, das u.a. bei der Signaltransduktion und Zellzyklusregulation regulative Aufgaben ermöglicht, indem beteiligte Proteine ubiquitinyliert werden. Zu ubiquitinylierende Proteine werden über das Gly76 kovalent gebunden, über zwei Lysine, Lys48 und Lys63, können weitere Ubiquitine an ein bereits gebundenes Ubiquitin kovalent gebunden werden, sodass es zu einer Polyubiquitinylierung kommt. Die meisten Ubiquitinylierungen sind transient und nicht permanent [39].

Eine wichtige posttranslationale Modifikation innerhalb von eukaryotischen Zellen stellt die Konjugation und Dekonjugation von Ubiquitin und Ubiquitin-ähnlichen (*ubiquitin-like proteins*, UBLs) Peptiden an andere Proteine dar. Unter den über 30 bisher identifizierten ATGs gibt es zwei UBLs, Atg8 und Atg12. Innerhalb der autophagischen Degradation wird analog zur Ubiquitinylierung Atg12 an Atg5 kovalent gebunden. Atg8, Atg12 und Atg5 sind Bestandteile von zwei Konjugationssystemen, deren Funktion im Folgenden noch genauer beschrieben wird. Obwohl Atg12 und Atg8 keine klare Sequenzhomologie zu Ubiquitin aufweisen, zeigen kristallographische Experimente eine strukturell konservierte, Ubiquitin-ähnliche Region [40], welche für die funktionelle Ähnlichkeit zur Ubiquitinylierung verantwortlich ist. Sowohl Atg8, als auch Atg12 sind funktionell mit der E1-Ligase Atg7 assoziiert [41].

Die autophagische Degradation spielt neben ihrer basalen Form, welche den Umsatz zellulärer Komponenten reguliert und für eine Degradation langlebiger Proteine sorgt, eine besondere Rolle bei der Reaktion auf verschiedene Formen von zellulärem Stress, wie Nährstoff- und Wachstumsfaktorenentzug, oxidativem Stress oder Hypoxie. Während Phasen, in denen die Zelle diesen Bedingungen ausgesetzt ist, ermöglicht die Rückgewinnung von Aminosäuren für die *de novo* Proteinsynthese und ATP-Generierung, die Aufrechterhaltung der biosynthetischen Kapazität für die Dauer dieses Mangel- oder Stresszustands. In einem von *Mizushima et al.* generierten Mausmodell wurde eine erhöhte Autophagie durch Detektion von LC3-GFP Fusionsproteinen in nahezu allen Geweben während einer Nährstoffdepletion festgestellt [42]. Das *microtubule-associated protein light chain 3* (MAPLC3), im Folgenden LC3 bezeichnet, ist ein wesentlicher Bestandteil eines der beiden wichtigsten Konjugationssysteme im Prozess der Autophagie.

Durch die Generation von Mäusen, in deren Genom verschiedene ATGs ausgeschaltet wurden, konnten essentielle Gene für die Autophagie identifiziert werden. So weisen *Atg7^{-/-}* Mäuse eine erniedrigte intrazelluläre Konzentration von Aminosäuren in Plasma und Gewebe auf und verenden wenige Stunden nach der Geburt aufgrund einer gestörten Autophagie während der neonatalen Hungerperiode [43]. *Atg7* ist zum einen verantwortlich für die Konjugation von *Atg12* an *Atg5*, indem es ähnlich wie beim Vorgang der Ubiquitylierung als E1-Enzym *Atg12* aktiviert und zu einem E2-Enzym, *Atg10*, transportiert und anschließend an *Atg5* konjugiert. *Atg7* spielt in ähnlicher Weise auch bei der Aktivierung von *Atg8*, in Säugerzellen LC3, eine Rolle, indem es ebenfalls als E1-Enzym wirkend *Atg8* aktiviert und zu dem E2-Enzym *Atg3* transportiert [44], bevor es während der Bildung und Extension der Phagophore weiter modifiziert wird.

Rouschop et al. haben gezeigt, dass Tumorzellen, die zellulären Stress in Form von Nährstoffentzug und Hypoxie erfahren, eine gesteigerte Autophagie durch erhöhte Expression von MAP1LC3B und *Atg5* aufweisen [45], beides essentielle Proteine für die Elongation der Membran des Autophagosoms. In einem Mausmodell von *Mizushima et al.* konnte weiterhin gezeigt werden, dass LC3 in Abhängigkeit von *Atg5* an die Phagophore gebunden wird [46]. Zellen von *Atg5^{-/-}* Mäusen waren nicht in der Lage, LC3 gezielt an die elongierende Membran zu führen, wodurch in den Zellen dieser Tiere signifikant weniger Phagophoren und nahezu keine mit LC3-GFP markierte Autophagosomen gefunden werden. Dies weist darauf hin, dass *Atg5* bei

der Elongation der Phagophore und bei der Lokalisation von LC3 eine wichtige Rolle spielt.

Bei der Initiation der Autophagie ist der Atg1/ULK-Komplex von entscheidender Bedeutung. ULK (Unc51-like kinase) ist ein funktionelles Homolog zu Atg1 in *S. cerevisiae* [47]. Dort besteht der Autophagie-initiiierende Atg1-Komplex aus der Serin/Threonin-Kinase Atg1 und Atg13, sowie dem dreiteiligen Subkomplex aus Atg17-Atg31-Atg29. Die Aktivität des Atg1-Komplexes ist durch die Bindung an TOR (target of rapamycin) und der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKA wegen der Tor-abhängigen Phosphorylierung von Atg1 konstitutiv stark reduziert [48]. TOR/mTOR ist ein in allen Säugetieren vorkommende Kinase, welche am Anfang zahlreicher Signaltransduktionskaskaden steht und Zellwachstum sowie Proliferation durch Regulation der Proteinsynthese beeinflusst, indem sie nachfolgende Proteine *downstream* durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität verändert. In Säugerzellen inhibiert mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) direkt den ULK-Komplex aus ULK-Atg13-FIP200-Atg101, um dessen Membran-Translokation zu verhindern. Unter Stressbedingungen werden die Untereinheiten des ULK-Komplexes phosphoryliert und dadurch die inhibierende Wirkung des mTORC1 und mTORC2 aufgehoben. Der Phosphorylierungsstatus des ULK-Komplexes reguliert die Initiation der Autophagie (s. Abb. 7A) [49].

Ist die Autophagie durch den ULK-Komplex initiiert, werden weitere ATGs zur PAS rekrutiert. Vermittelt wird die Rekrutierung durch Atg14, welches auch während der finalen Phase der Autophagie bei der Membranfusion von Autophagosom und Lysosom durch Interaktion mit Syntaxin-17 (STX17) und dem Vesikel-assoziierten Protein (*vesicle-associated membrane protein 8*) VAMP8 bedeutend ist [50]. Atg14 ist ein Autophagie-spezifischer Regulator und Teil des *class III Phosphatidylinositol-3-Kinase* Komplexes (PI3KC3) [51]. Atg14 verbessert die Fusion der Membranen von Liposomen und Membranen von Liposomen, die mit target (t)-SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) [52, 53] und dem Vesikel-assoziierten Protein SNAP29 (*synaptosomal-associated protein 29*) besetzt sind. SNARE-Proteine katalysieren die extrem spezifische Fusion von Vesikelmembranen (*vesicle SNAREs*) mit einer Zielmembran (*target SNAREs*). SNAPs stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die Syntaxine binden und die Fusion von synaptischen Vesikelmembranen vermitteln und stabilisieren. Atg14 bindet an die SNARE *core domain* von STX17 und stabilisiert den STX17-SNAP29 t-SNARE

Komplex von autophagosomalen Membranen. STX17 rekrutiert Atg14 auch an die ER-Mitochondrium Kontaktstelle, die aktuell auch als Ort der PAS diskutiert wird [54], und fördert die Reifung und Formierung des Autophagosoms. Aktives Atg14 bildet Homo-Oligomere, welche für dessen Funktion erforderlich sind. In Zellen, in denen diese Oligomerisierung verhindert wird, bilden sich zwar funktionelle Autophagosomen, jedoch fusionieren diese nicht mit Endolysosomen und die autophagische Degradation kommt an diesem Punkt zum Erliegen. Rekombinante Atg14 Homo-Oligomerisierungsmutanten verlieren sogar die Fähigkeit zur Membranfusion und SNARE-vermittelten Membranfusion komplett [50].

Während der Rekrutierung weiterer ATGs zur Elongation der Membran entwickelt sich nach initiiertem Autophagie an der PAS eine isolierende Membranausstülpung, die Phagophore. In dieser Elongationsphase der Phagophore sind zwei essentielle Konjugationssysteme (das Atg8- und das Atg12-Atg5—Atg16 Konjugationssystem) verantwortlich für die Membranexpansion und die Bindung Ubiquitin-markierter Proteine und Zellorganellen an die Membran mittels Cargo-Rezeptoren [55]. Die Ubiquitylierung von Proteinen oder Zellorganellen ist für deren autophagische Degradation essentiell und spielt nicht nur bei der Degradation endogener Proteine und Organellen eine Rolle, sondern auch bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene, die mit Ubiquitin markiert wurden. So kommt der Autophagie nicht nur große Bedeutung bei der Homöostase, sondern auch bei der kongenitalen Immunreaktion zu [56].

In *S. cerevisiae* kommt dem Protein Atg8, bzw. dem Ortholog MAP1LC3 und seinen Homologen [57] in Säugerzellen durch dessen Konjugation an das Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE) [58] (Abb. 7B) besondere Bedeutung zu. Atg8, bzw. LC3 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das u.a. durch die Serin-Protease Atg4 an Phosphatidylethanolamin konjugiert werden kann. Die mindestens acht Orthologe von Atg8 in Säugerzellen können weiterhin in zwei Familien unterteilt werden: die MAPLC3-Familie, welche aus MAPLC3 A, -B, -B2 und -C besteht, sowie die (*γ*-butyric acid receptor-associated protein) GABARAP/ (*Golgi-associated ATPase Enhancer 16*) GATE-16-Familie, die aus GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2/GATE-16 besteht [59]. LC3, bzw. Atg8 durchläuft mehrere posttranslationale Modifikationen, um dessen Assoziation mit der Phagophore zu gewährleisten. Zunächst wird am C-Terminus von LC3, bzw. Atg8 durch die Cystein-

Protease Atg4 ein Glycinrest (Gly140) zugänglich gemacht [60]. Hierdurch entsteht die C-terminal gespaltene Form, LC3-I. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym Homolog Atg7 (E1) transferiert das modifizierte LC3-I zu dem E2-Enzym Atg3, welches die kovalente Bindung von PE an den freigelegten Glycinrest katalysiert [61]. Die gespaltene Form von Atg8/LC3 wird dann als LC3-I bezeichnet, die Lipid-konjugierte Form als LC3-II. Das in der Membran der Phagophore verankerte LC3-II ist sowohl auf der konvexen, als auch der konkaven Seite der Membran vorhanden. Auf der konkaven Seite der Membran ist LC3-II als Bindungsstelle für Cargo-Rezeptorproteine, wie SQSTM1 und NBR1, verantwortlich die zur Degradation markierten Proteine zu binden. Zur Degradation markierte Proteine werden über Polyubiquitinylierungen kenntlich gemacht. Den Cargo-Rezeptorproteinen sind drei Domänen gemein, die für die Erkennung von zu degradierenden Proteinen erforderlich sind (Abb. 6); die PB1-Domäne, welche Protein-Interaktionen, bspw. mit EVH1-Domänen, und Homooligomerisierungen u.a. mit weiteren PB1-Domänen, bzw. dessen Proteinen vermittelt [62]; die *light-chain interacting region* (LIR), welche die Bindung an Atg8, bzw. LC3-II arrangiert [63]; und schließlich die Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA), welche den Rezeptorproteinen die Erkennung Ubiquitin-markierter, zellulärer Inhalte ermöglicht [64, 65] (Abb. 6 und 7 C).

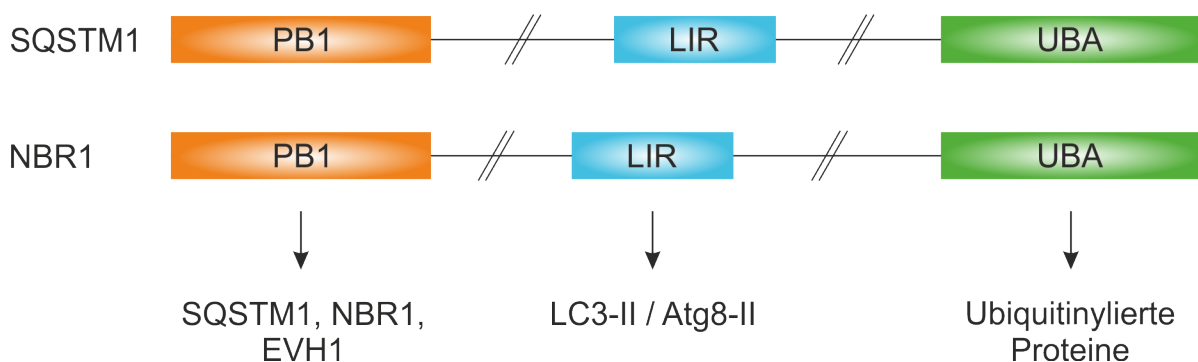


Abbildung 6 Die gemeinsamen Domänen der Cargo-Rezeptoren SQSTM1 und NBR1. Die Phox/Bem1-Domäne ist ein Protein-Interaktionsmodul, welches in Proteinen, die eine solche Domäne tragen, nur ein einziges Mal vorhanden ist. Die PB1-Domäne interagiert sowohl mit weiteren PB1-Domänen, als auch mit der EVH1-Domäne, so wie sie in SPRED2 vorhanden ist. Die light-chain interacting region (LIR) ist diejenige Domäne, welche die Cargo-Rezeptoren zur Interaktion mit MAPLC3, bzw. Atg8 befähigt. Die Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) bindet Ubiquitin und damit die zur Degradation markierten Proteine und zellulären Bestandteile.

Durch die Ermittlung der Menge an in der Zelle vorhandenem, an PE-konjugiertem LC3-II im Verhältnis zu unkonjugiertem LC3-I lässt sich eine Aussage über die Autophagie-Rate treffen. Eine verringerte Autophagie-Rate zeichnet sich daher durch eine Verringerung der Menge an konjugiertem LC3-II aus, wohingegen eine erhöhte Autophagie durch vermehrte Konjugation von LC3 an PE gekennzeichnet ist. Die Messung des Konjugationsstatus des gesamten vorhandenen LC3-Bestands hat sich gemeinhin als Marker für die Autophagie-Rate etabliert [66-68].

Atg4 übernimmt während der Autophagie eine duale Rolle, da es sowohl für die Konjugation als auch für die Dekonjugation von LC3-II zuständig ist [69, 70]. Wann und durch welchen Mechanismus die Dekonjugation reguliert wird, insbesondere um eine vorzeitige Dekonjugation noch während der Membranexpansion der Phagophore zu verhindern, wird gegenwärtig noch diskutiert [71].

Der Prozess der Autophagie ist weiterhin abhängig von der Funktion eines zweiten Konjugationssystems, bei dem Atg12, Atg5 und Atg16 eine essentielle Rolle spielen. Der Atg12-Atg5—Atg16-Komplex bindet Atg8-abhängig an Vesikel und ist für die korrekte Konjugation von Atg8-II an PE unabdingbar [72]. Während der Expansion der autophagosomalen Membran wird das Ubiquitin-ähnliche Protein Atg12 an einen Lysin-Rest von Atg5 konjugiert. Die Reaktion wird von Atg7 als E1-Enzym und von Atg10 als Ubiquitin-konjugierendes E2-Enzym katalysiert. Das Atg12-Atg5-Konjugat bindet daraufhin über eine nicht-kovalente Wechselwirkung an Atg16. In Säugetieren existieren zwei Isoformen, Atg16L1 und Atg16L2. Atg16L1 ist eines der Risiko-Allele, die mit Morbus Crohn assoziiert werden. Abbildung 7 zeigt den Verlauf der Initiation der Autophagie, die Expansion der Membran der Phagophore, sowie die Fusion des neu gebildeten Autophagosoms mit dem degradierenden Lysosom.

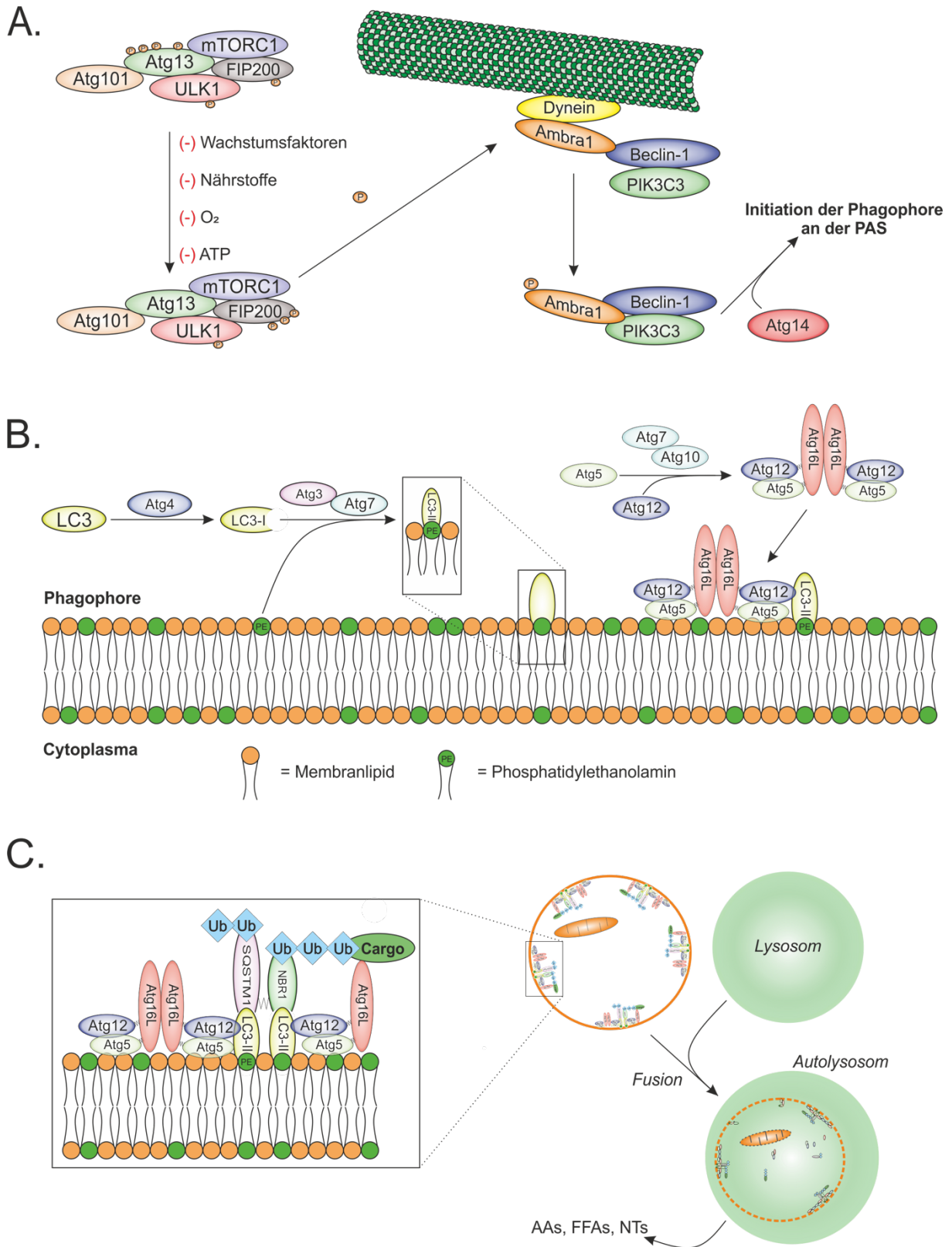


Abbildung 7 Die Macroautophagie von der Initiation bis hin zur Bildung des Autolysosoms.¹

Atg5 agiert in dem Atg12-Atg5—Atg16-Komplex teilweise als E3-Ligase für die Konjugation von Atg8-II an PE. Die Bindung von Atg16 an das Atg12-Atg5-Konjugat führt zu einer Konformationsänderung in Atg5, welche eine Membranbindungsstelle freilegt und die Bindung des Atg12-Atg5-Konjugats an die expandierende Membran der Phagophore ermöglicht. Atg16 bindet als Dimer an die Atg12-Atg5-Konjugate. Jeder der Atg12-Atg5—Atg16-Komplexe besteht also aus einem zentralen Atg16-Dimer und jeweils zwei Atg12-Atg5-Konjugaten, sodass der Atg12-Atg5—Atg16-Komplex in der Lage ist, Membranen zu binden. Die Fähigkeit Membranen zu binden ist entscheidend, da Atg12 innerhalb des Atg12-Atg5—Atg16-Komplexes die Rekrutierung von Atg8-II-beladenem Atg3 übernimmt, welches dadurch in engen räumlichen Kontakt mit PE innerhalb der expandierenden Membran kommt [73, 74]. Durch die Atg16-abhängige Bindung des Atg12-Atg5—Atg16-Komplexes an die expandierende Membran der Phagophore kann die Bildung des Autophagosoms reguliert werden. Die Expansion der Phagophorenmembran führt letztendlich zum Einschließen der intrazellulären Bestandteile und dem Formen des kompletten Autophagosoms.

Lysosomen sind die degradierenden Organellen der Zelle, in deren Innern ein saures Milieu durch V-ATPasen (*vacuolar-type H⁺ ATPases*) und glykosylierte LAMPs (*lysosomal associated membrane proteins*) aufrechterhalten wird, um die Degradation durch spezialisierte Hydrolasen zu ermöglichen. Essentiell für die Generierung und Funktion von Lysosomen ist die Endozytose, bei der Invaginationen der Zellmembran

¹ **A.** Die Proteindegradation durch Autophagie kann durch endogene Auslöser, wie ATP-Mangel oder Nährstoffdepletion, initiiert werden oder aber durch exogenen Stress, wie Sauerstoffmangel oder einen Mangel an Wachstumsfaktoren. Wird ein solcher endogener oder exogener Stress in der Zelle festgestellt, kommt es zu einer Änderung des Phosphorylierungsstatus des mTORC1- und mTORC2-Komplexes. Dies führt zu einer Phosphorylierung von Ambra1, welches zusammen mit Beclin-1 und der PIK3C3 von Dynein dissoziiert. Die PIK3C3 bildet Phosphoinositol-3-phosphat, welches gemeinsam mit Atg14 für eine Rekrutierung in der Autophagie nachgeschalteter Atgs erforderlich ist. **B.** Die Konjugationssysteme LC3 / Atg8 und der Atg12-Atg5—Atg16-Komplex sind für die korrekte Expansion der Phagophore nötig. Die Cystein-Protease Atg4B spaltet LC3 / Atg8 am C-Terminus und legt Gly140 frei, welches die Konjugation von LC3 an das Phospholipid Phosphatidylethanolamin durch Atg3 und Atg7 ermöglicht. Atg7 ist ebenfalls bei der Konjugation von Atg5 an Atg12 mit Hilfe des Ubiquitin-konjugierenden E2 Enzym Analogs Atg10 bei der korrekten Ausbildung des Atg12-Atg5—Atg16-Komplexes beteiligt. Der Atg12-Atg5—Atg16-Komplex ist essentiell für die Membranexpansion, für die korrekte Lokalisation von LC3 und durch seinen dimeren Charakter für die korrekte Bindung und Fusion von Membranen. **C.** Die Proteine, die degradiert werden sollen, wurden i.d.R. vorher durch Ubiquitinylierungen markiert. Diese Markierungen sind notwendig, damit die Autophagie-assoziierten Cargo-Rezeptoren, wie SQSTM1 und NBR1, die Proteine und Zellorganellen mit der Ubiquitin-assoziierten Domäne (UBA) binden können. Die LIR Domäne von SQSTM1 und NBR1 ermöglicht die Bindung der beladenen Rezeptoren an membrangebundenes LC3. Nachdem das Autophagosom geschlossen ist, fusioniert dieses mit Lysosomen, um die Proteine und zellulären Bestandteile zu hydrolysieren.

ins zelluläre Lumen erzeugt werden, die sich als eigenständige Vesikel abschnüren [75]. Diese *early endosomes* (EEs), frühe Endosomen, durchlaufen einen Reifeprozess, an dessen Ende im Innern des Endosoms durch V-ATPasen ein pH-Wert von pH = 6.0 bis pH = 4.9 erreicht wird [76]. Autophagosomen fusionieren sowohl mit frühen, als auch mit späten Endosomen.

Die Verbindung von SPRED2 als Inhibitor des MAPK-Signalwegs und dessen möglicher Effekt auf die autophagische Degradation lässt sich durch den Wirkmechanismus von mTOR herstellen (s. Abbildung 7); einer Kinase, die essentiell für die Initiation der Autophagie ist. Der Akt- und MAPK-Signalweg unterdrücken die Aktivität von mTOR, wohingegen die AMP-aktivierte Proteinkinase AMPK und der Transkriptionsfaktor p53 die Aktivität von mTOR fördern.

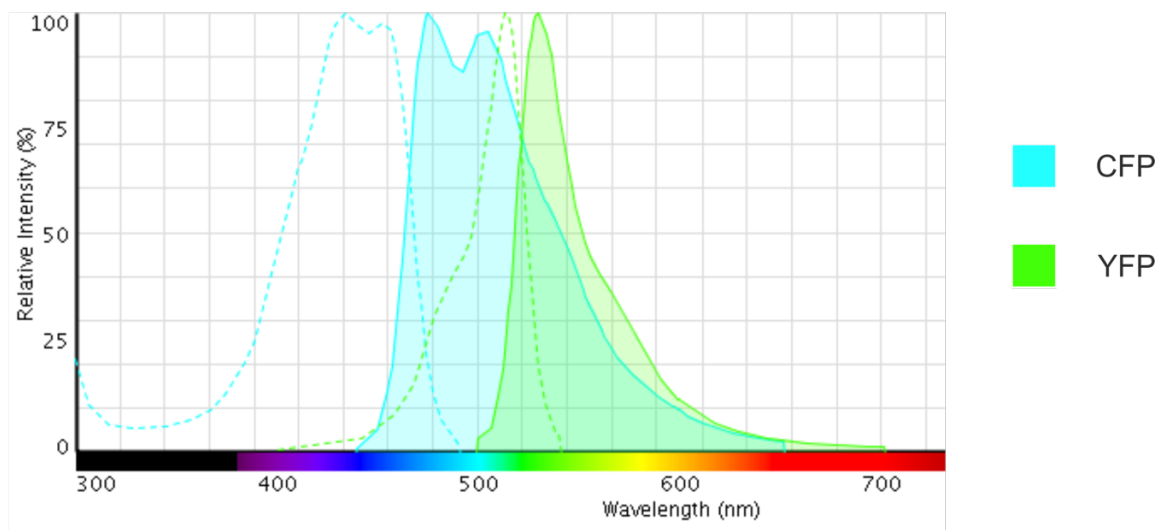
1.8 Förster Resonanzenergietransfer

Der Förster Resonanzenergietransfer bezeichnet einen Distanz-abhängigen fotophysikalischen Prozess, bei dem strahlungsfrei Energie von einem Donor-Molekül zu einem Akzeptor übertragen wird. Perrin hat 1920 erstmalig das Konzept der Dipol-Dipol-Wechselwirkung und der damit verbundenen Distanz-abhängigen Energieübertragung ohne molekularen Kontakt vorgeschlagen. Die erste Erklärung dieses Phänomens wurde jedoch erst 1948 von *Th. Förster* beschrieben [77]. FRET findet statt, wenn es zu einer resonanzbasierten Interaktion von Chromophoren ohne einer Transmission von Photonen von einem Donor zu einem Akzeptor kommt. Unterhalb von intermolekularen und interatomaren Distanzen von 1 nm kommt es zu einer molekularen Kollision von Donor und Akzeptor, was die resonanzbasierten Energieübertragung hemmt. Oberhalb von Distanzen von 10 nm ist die Photonenemission des Donors dominant. Die räumliche Auflösung von FRET liegt also zwischen 1 – 10 nm und trifft diesbezüglich eine sehr viel genauere Aussage über Interaktionswahrscheinlichkeiten als bspw. immunhistochemische bildgebende Verfahren, welche eine räumliche Auflösung von 50 – 100 nm bieten. FRET ist jedoch kein Verfahren, um die räumliche Auflösung von bildgebenden Verfahren zu verbessern. Vielmehr ermöglicht FRET eine Aussage darüber, welcher Anteil von Molekülen, wie bspw. Proteinen, in einem definierten Volumenelement proportional zur Summe aller gemessenen Moleküle interagiert.

Damit es zwischen Fluorophoren zu einem Resonanzenergie transfer kommt, müssen drei entscheidende Anforderungen gegeben sein. Zum einen muss die Distanz der Fluorophore zwischen 1 – 10 nm liegen. Des Weiteren müssen die Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorophore überlappen. Und letztlich spielt die geometrische Anordnung der Fluorophore eine entscheidende Rolle. Zwischen orthogonal zueinander orientierten Fluorophoren kommt es zu keinem Resonanzenergie transfer.

Im Jablonski-Diagramm lässt sich das Prinzip des FRET simpel abbilden. Hierbei wird ein Donor-Molekül, wie bspw. ein Protein oder Fluorophor-tragendes Protein, mit Hilfe einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Elektronen des Donors werden dadurch in einen angeregten, energiereichen Zustand versetzt, S_1 . Diese Energie wird frei, wenn die Elektronen wieder in ihren Ausgangszustand, S_0 , zurückkehren. Dies kann entweder direkt über die Emission von Photonen einer bestimmten Wellenlänge geschehen oder aber, sobald sich ein Akzeptor mit niedrigerer Anregungswellenlänge in räumlicher Nähe befindet, über einen nicht-strahlenden Resonanzenergie transfer. Hierbei werden Elektronen in einem Akzeptor in den S_1 -Zustand gehoben. Die angeregten Elektronen geben diese Energie infolgedessen als emittierte Photonen bestimmter Wellenlänge ab. Die Immissions- und Emissionswellenlängen für jedes Fluorophor sind einzigartig. Eine längere Wellenlänge bedeutet hierbei gleichzeitig die Emission von Photonen mit niedrigerer Frequenz, d.h. einer niedrigeren Energie.

A



B

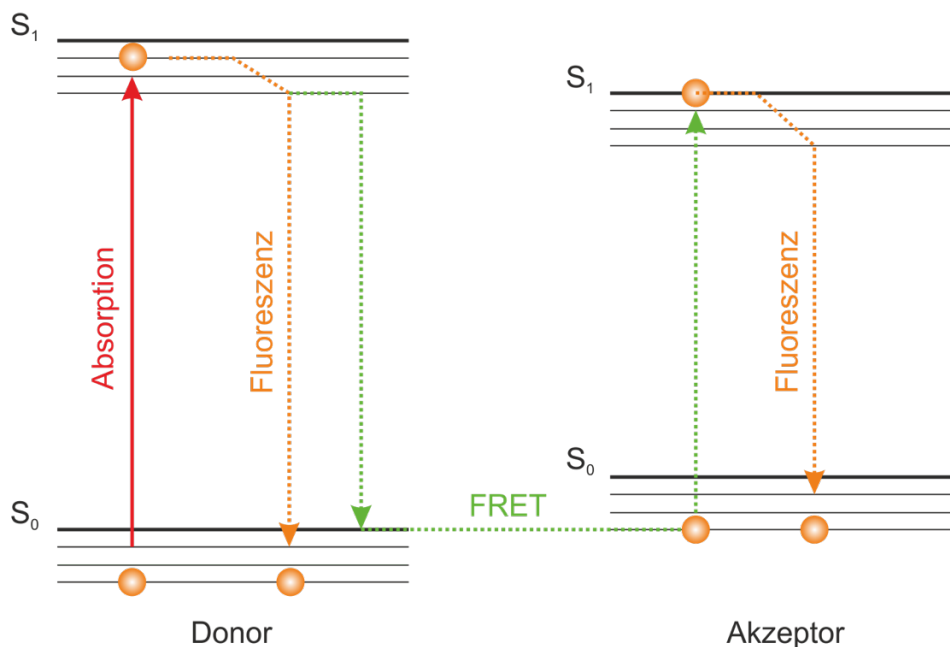


Abbildung 8. Prinzip des Förster Resonanzenergietransfers.²

1.9 Maus als Tierversuchssystem

Die Maus (*Mus musculus*) spielt bei der Aufklärung wissenschaftlicher Fragestellungen nach der Funktion und Wirkung von Proteinen und zellulären Signalwegen eine bestimmende Rolle. Durch die verhältnismäßig einfache und schnelle Manipulation des Mausgenoms, bpsw. durch Gene Trap oder CRISPR/Cas9, können schnell und kosteneffizient Gene im Genom der Maus verändert, erweitert oder

deletiert werden, um die Funktion betroffener Proteine aufzuklären. Weiterhin eignet sich das Mausmodell wegen einer sehr hohen Reproduktionsrate, hoher Generationsfolge mit zahlreichen Nachkommen pro Wurf und einem niedrigen räumlichen Anspruch für die wissenschaftliche Arbeit.

Eine dabei essentielle Eigenschaft des Mausgenoms ist die hohe Ähnlichkeit zum Genom des Menschen, sowohl was die Funktion der jeweiligen Gene, als auch die Lage der Gene auf den Chromosomen angeht. In dem in dieser Arbeit untersuchten Mausmodell wurde im Genom der SPRED2-KO Mauslinie das Genom wie in 1.1 beschrieben manipuliert und die Mäuse dieser Linie für alle Versuche verwendet.

² **A.** Die überlappenden Spektren der Fluorophore CFP (cyan fluorescent protein) und YFP (yellow fluorescent protein). CFP wird bei 405 nm angeregt und emittiert Licht bei 485 nm. YFP, bzw. mVenus, ein YFP-Derivat, wird bei 514 nm angeregt und bei 527 nm detektiert. Essentiell für den Resonanzenergietransfer ist, dass das Emissionsspektrum von CFP mit dem Exzitationsspektrum des mVenus überlappt. Bei räumlichen Abständen der Fluorophore von 1 – 10 nm kommt es hierbei zur Übertragung von Energie des Donors (CFP) zum Akzeptor (YFP), ohne, dass dabei der Donor Energie in Form von Photonen (Fluoreszenz) emittiert. Die Anregungsenergie bewirkt im Akzeptor-Fluorophor die Anregung von Elektronen in den S1-Zustand. Bei der infolge freiwerdenden Energie in Form von Photonen wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Die Emissionswellenlänge ist hierbei immer länger, als die Immissionswellenlänge. **B.** Bei der Anregung von Elektronen in Form von elektromagnetischer Strahlung in einem Donor-Molekül, werden Elektronen in einen erhöhten Energiezustand (S1) versetzt. Diese Energie kann u.A. als Fluoreszenz, d.h. einer Emission von Photonen, direkt freiwerden. Befindet sich ein Akzeptor mit einer niedrigeren Anregungswellenlänge in räumlicher Nähe zum Donor, kommt es zu einem nicht-strahlenden Resonanzenergietransfer, bei welchem Elektronen im Akzeptor in einen angeregten S1-Zustand versetzt werden. Diese Energie der angeregten Elektronen kann dann als Emission von Photonen freiwerden (Fluoreszenz). Diese Form des Resonanzenergietransfers kann dazu genutzt werden, festzustellen, ob Fluorophore in Wechselwirkung zueinander stehen.

2 Zielsetzung

SPRED2 übernimmt als inhibitorisches Protein innerhalb der MAPK-Signalkaskade *downstream* von Ras eine essentielle Rolle bei der korrekten Regulation von zellulärer Homöostase, Proliferation und der Expression zahlreicher Gene durch Phosphorylierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Ist die Regulation durch SPRED-Proteine beeinträchtigt, kommt es zu einem breiten Spektrum physiologischer Symptome, wie kardialer Hypertrophie und neurologischen Phänomenen, wie Demenzercheinungen oder zwanghaften Verhaltensweisen (OCD).

Der kardiale Phänotyp einer SPRED2-Defizienz zeigt sich u.a. durch eine erhöhte Fibrosierung des Herzgewebes. Innerhalb der Kardiomyozyten zeigt eine SPRED2-Defizienz eine markante Akkumulation von vesikulären Strukturen innerhalb der longitudinalen Reihen der Mitochondrien zwischen den ansonsten intakten Sarkomeren.

Zielsetzung der Arbeit ist es, zu eruieren, ob die akkumulierten vesikulären Strukturen die Ursache oder die Folge eines gestörten Degradationsprozesses, wie der Autophagie sein kann. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Akkumulation von Vesikeln auf einen veränderten Transportmechanismus zurückzuführen ist.

Da die vesikulären Strukturen auffällig häufig in direkter Nähe zu degradierten und in der Degradation begriffenen Mitochondrien lokalisiert zu sein scheinen, soll untersucht werden, ob SPRED2-defiziente Kardiomyozyten eine veränderte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies aufweisen.

Letztlich soll der kardiale Phänotyp in Bezug zu dem Protein SPRED2 gestellt werden und beleuchtet werden. Weiterhin soll die Frage beantwortet werden, inwieweit ein direkter, oder durch eine Interaktion mit weiteren Proteinen bestehender, Zusammenhang zwischen SPRED2 und der Vesikelakkumulation besteht.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Adenosintriphosphat-Dinatriumhydrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Agarose	AppliChem (Würzburg/Versbach)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bacterial Agar	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
β-Mercaptoethanol	igma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Di-Natrium-Hydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
EGTA	Roth (Karlsruhe)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe)
Kalium-Dihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver (Non-fat dried milk powder)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natrium-Deoxycholat	Roth (Karlsruhe)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Nancy-520	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natrium-Hydrogenphosphat (NaHPO_4)	Roth (Karlsruhe)
NP-40	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TRIS	Roth (Karlsruhe)
Tween-20	AppliChem (Darmstadt)

3.2 Geräte

Sicherheitswerkbank	HeraSafe	Thermo Electron Corporation
Binokular-Mikroskop	SZ51	Olympus
CCD-Kamera	GelLogic100	Kodak
CCD-Kamera	FluorChemSP	AlphalInnotech
Gelkammer PCR	-	hausinterne Werkstatt
Gelkammer Western Blot	-	hausinterne Werkstatt
Multilabel Counter	Viktor2 Wallac 1420	Perkin Elmer
Nanodrop	SimpliNano	GE Health Care
Nitrocellulosemembran	Whatman Protran BA 85	GE Health Care
PCR Cycler	-	CLEMENS
Powerlab Netzteil	Consort EV202	
Rührwerk	RW20 IKA Werk	Janke & Kunkel
Thermomix	Thermomixer compact	eppendorf
Ultrazentrifuge		
UV Transilluminator		
UltraThurax	PT 3100 Polytron	Kinematica
Zellkultur Inkubator	B 5042 E	Heraeus
Zellkultur Inkubator	Inkubator 1000	Heidolph
Zellkultur Schüttler	Unimax 1010	Heidolph
Zentrifuge	FRESCO 17 Centrifuge	Heraeus

3.3 Antikörper

Primärantikörper	Konzentration	Hersteller / Vertrieb
Rabbit- α -Atg3	1:1.000	NEB, Frankfurt
Rabbit- α -Atg4	1:1.000	NEB, Frankfurt
Rabbit- α -Atg5	1:1.000	NEB, Frankfurt
Rabbit- α -Atg7	1:1.000	NEB, Frankfurt
Goat- α -Atg8-I/-II	1:1.000	SantaCruz, Heidelberg
Rabbit- α -Atg12	1:1.000	NEB, Frankfurt

Rabbit- α -Atg16	1:1.000	NEB
Rabbit- α -Cas3	1:1.000	CST, Leiden, NL
Rabbit- α -Cathepsin D	1:1.000	antibodies-online
Rabbit- α -GAPDH	1:200	NEB
Rabbit- α -NBR1	1:1.000	NEB
Rabbit- α -SPRED2	1:1.000	Zur Verfügung gestellt von Dr. Peter Benz
Rabbit- α -SQSTM1	1:1.000	SantaCruz, Heidelberg
Goat- α -VT11b	1:1.000	antibodies-online

3.4 Versuchstiere der SPRED2-KO Mauslinie

Die für diese Arbeit genutzten Versuchstiere mit der globalen SPRED2-Defizienz wurden von Prof. Dr. Kai Schuh zur Verfügung gestellt.

SPRED2-defiziente Mäuse und Wurfgeschwister-Kontrollen wurden mit einem gemischten 129/Ola X C57Bl/6 Hintergrund in einem Alter von 8-12 Monaten für sämtliche Experimente genutzt. Alle Experimente mit Versuchstieren wurden in Übereinstimmung mit den Europäischen Richtlinien (2010/63/EU) durchgeführt und von der Regierung Unterfranken (K.S. und M.U., TV Nr. 55.2-2531.01-98/14) genehmigt.

3.5 Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in Makrolon-Typ-II Käfigen auf Holzeinstreu und entsprechendem Beschäftigungsmaterial (*environmental enrichment*) entsprechend der aktuellen gesetzlichen Vorschriften gemäß TierSchG gehalten. Als Futter wurde die 1320 Maintenance Diet for Rats and Mice (Altromin) gegeben und Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt.

3.6 Organentnahme und Herstellung der Gewebshomogenate

Die Versuchstiere wurden mittels CO₂-Begasung getötet und anschließend eine zervikale Dislokation durchgeführt. Anschließend wurden Thorax und Abdomen geöffnet und die benötigten Organe entnommen. Hierbei wurden die Organe zunächst in 1 x PBS von Blutresten und umliegenden Geweberesten befreit.

Die gereinigten Organe wurden gewogen und in 5 ml auf Flüssigstickstoff vorgekühltem 99% 2-Methylbutan (Sigma-Aldrich) schockgefroren, um Gefrierschäden im Gewebe zu verhindern. Die so entnommenen Organe wurden entweder direkt zur Gewebshomogenisierung verwendet oder bis zu ihrer Verwendung auf -80°C gelagert.

Um die aus den Versuchstieren gewonnenen Organe zu homogenisieren und elektrophoretisch aufzutrennen, wurden diese zunächst von -80°C in RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 1,0% NP-40; 0,5% Na-Deoxycholat (w/v); 0,1% SDS (w/v); 50 mM Tris pH 8,0; Proteaseinhibitor (cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) Roche) überführt (1.000 µl RIPA-Puffer / 100 mg Gewebe). Anschließend wurden die Organe auf Eis in RIPA-Puffer elektrisch homogenisiert (PT 3100 Polytron, Kinematica) und 15 min bei 17.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in einzelnen Reaktionsgefäßen zu je 100 µl aliquotiert und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gewebshomogenisaten wurde zunächst die Proteinmenge mittels Bradford-Test quantifiziert. Hierfür wurde die Extinktion der Proben während der Bradford-Reaktion auf eine standardisierte Konzentrationsreihe von BSA (Bovines Serumalbumin) referenziert (0 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,04 mg/ml; 0,06 mg/ml; 0,08 mg/ml und 0,1 mg/ml). Um Messungen im linearen Bereich zu gewährleisten, wurden 1:100 Verdünnungen der Proben hergestellt und 20 µl der jeweiligen Verdünnung mit 200 µl Bradford-Reagenz in einer lichtdurchlässigen 96-Well Mikrotiterplatte zusammengeführt. Anhand der gemessenen Proteinkonzentration wurden die Gewebslysate mit 1 x Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris; 10% Glycerin (w/v); 5% β-Mercaptoethanol (v/v); 1% SDS (w/v);

0,005% Bromphenolblau (w/v)) auf 10 µg/µl eingestellt und die so für den Immunoblot vorbereiteten Proteinlysate bis zu ihrer Verwendung auf -20°C gelagert.

3.8 Immunoblot (Western Blot)

Um Proteine zur Analyse nach ihrer Größe aufzutrennen, wird eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt (SDS-PAGE). Hierbei werden Proteine mit SDS komplexiert und deren eigene Ladung mit der negativen Ladung des SDS maskiert. Werden die Proteine auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, trennen sich diese beim Anlegen eines Spannungsfeldes nach ihrer Größe auf, wobei sich größere Proteine im Netz des Polyacrylamidgels langsamer fortbewegen, als kleinere.

3.8.1 Herstellung von 10%, 12.5% und 15% SDS-Polyacrylamidgelen

Zunächst werden die SDS-Gele für jeweils vier Sammel- und Trenngele nach ihren unterschiedlichen Konzentrationen in folgendem Schema angesetzt:

Tab. 1. SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel				Sammelgel	
Prozentualität	10.0	12.5	15.0	6.0	
Vol. [ml] / Gel	8.0	8.0	8.0	Vol. [ml] / Gel	5.0
H ₂ O	3.8 ml	3.35 ml	2.8 ml	H ₂ O	2.9 ml
Bis-Acrylamid (37%)	2.0 ml	2.5 ml	3.0 ml	Bis-Acrylamid (37%)	0.75 ml
1.5M Tris (pH 8.8)	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	0.5M Tris (pH 6.8)	1.25 ml
10% SDS	80 µl	80 µl	80 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	80 µl	80 µl	80 µl	10% APS	50 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	TEMED	5 µl

Durch die Zugabe der entsprechenden Menge N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Sigma Aldrich) wird die Polymerisationsreaktion der SDS-Gele katalysiert.

Die Glasplatten zur Herstellung der SDS-Gele wurden gründlich mit 70% Ethanol gereinigt und mit warmem 1%-Agarosegel abgedichtet. Das Trenngel wurde bis 1,5 - 2,0 cm unter dem Rand aufgefüllt und zur Polymerisation unter Luftabschluss mit

1 ml ddH₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser durch Abkippen wieder entfernt.

Das Sammelgel wurde über dem Trenngel aufgegossen und mit dem Geltaschenkamm abgedichtet.

3.8.2 SDS-Gelelektrophorese

Die auspolymerisierten Gele wurden dann in die Laufkammer eingesetzt, der Kamm entfernt und mit 1 x SDS-Laufpuffer (1:10 Verdünnung des vorbereiteten 10 x SDS-Laufpuffers (30 g TRIS, 144 g Glycin, 10 g SDS auf 1.000 ml ddH₂O)) befüllt. Neben einem Protein Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific) wurden die präparierten Proteinproben gevortext und den ausgerechneten Konzentrationen und Mengen entsprechend auf die Gele aufgetragen.

An dem Gel wurde dann eine Spannung von 80V für das Sammelgel und 150V für das Trenngel angelegt. Währenddessen wurden die Nitrocellulosemembranen auf die entsprechenden Gelgrößen zugeschnitten und die obere linke Ecke der Membran zur Orientierung eingeschnitten. Danach wurden die Membranen zusammen mit sechs Filterpapieren in Transblotpuffer (80 ml 1 x SDS-Laufpuffer aus der Laufkammer, 20 % Methanol) eingeweicht.

Nach der Auftrennung der Proteine wurden die Gele aus den Glasplatten herausgelöst, das Sammelgel entfernt und das Gel ebenfalls in den Transblotpuffer gelegt und in einem semi-dry Verfahren geblottet. Pro Membran wurde für 60 min eine Stromstärke von 200 mA angelegt und so die SDS-komplexierten Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Nitrocellulosemembran mit den geblotteten Proteinen wurde 1 min mit Ponceau-Lösung (2% Ponceau-S (w/v), 30% Trichloressigsäure (w/v), 30% Sulfosalicylsäure (w/v) Lösung eingefärbt und dokumentiert.

3.8.3 Blocking und Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Zum Blocken unspezifischer Oberflächenstrukturen wurde die Membran zunächst in 1 x PBS-T (0,05%) (1:10 Verdünnung aus vorbereitetem 10 x PBS, 500 µl Tween-20) gewaschen und 1-2 h bei RT in frisch angesetzter Blocking-Lösung (5% Milch (Non-fat dried milk powder, AppliChem) in 1 x PBS-T (0,05%)) geschwenkt. Danach wurde der Primärantikörper nach Herstellervorgaben in 10 ml 5% Milch PBS-T (0,05%) verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4°C auf einer Rocking Platform (Biometra) inkubiert. Anschließend wurde die Membran durch dreimaliges Waschen in 1 x PBS-T (0,05%) von ungebundenen Antikörpern befreit und der Sekundärantikörper nach Herstellervorgaben in 10 ml 1 x PBS-T verdünnt und die Membran darin für 1-2 h bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Membran dreimalig für je 5 min mit 1 x PBS-T (0,05%) gewaschen und die Chemilumineszenz in frisch angesetzter Detektionslösung (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate) in einer lichtisolierten Fotokammer dokumentiert.

3.8.4 Relative Quantifizierung der Proteinmengen

Um die Proteinmengen im Western Blot zu quantifizieren, wird mit Hilfe der Analysesoftware ImageJ (FIJI) zunächst aus dem aufgenommenen Bild des Blots ein horizontaler Bereich, in dem sich die zu analysierenden Banden befinden, ausgewählt. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Banden horizontal im analysierten Bildausschnitt liegen und sich eindeutig voneinander differenzieren lassen, um die Intensität der einzelnen Banden quantifizieren zu können. Sind die Banden ausgewählt, wird nun anhand der Grauwerte (0-255) ein Plot erstellt, in welchem die unterhalb des Graphen liegende Fläche der Intensität der Grauwerte entspricht. Eine im Bild dunkel dargestellte Bande wird hohe Grauwerte liefern und im Plot als Erhöhung dargestellt, weniger intensive Banden als niedrigere Anhebungen. Die einzelnen Flächen unter den Erhebungen werden ermittelt und die Zahlenwerte in einer Tabelle zur weiteren quantitativen Analyse festgehalten.

3.9 Polymerasekettenreaktionen (PCR und colony PCR)

3.9.1 Primer Design

Die zur Erstellung der Primer grundlegenden Sequenzen wurden mit SerialCloner (Molecular Biology Software) und dem Plasmid Editor ApE 2.0.50 (M. Wayne Davis) erstellt und bei EurofinsGenomics (Ebersberg), sowie bei ThermoFisher (Darmstadt) synthetisiert. Hierbei wurde zunächst eine entsprechende Sequenz aus dem jeweiligen DNA-Template identifiziert und eine 14-29 bp lange Sequenz entsprechend ihrer Schmelztemperatur und ihrem GC-Anteil ausgewählt.

Tab. 2 zeigt die für diese Arbeit verwendeten Primer samt T_m und GC-Anteil. Wo immer möglich, wurde für die T_m eine Temperatur von 60°C und ein Anteil an G- und C-Basen von 50-60% angestrebt.

Tab. 2 Verwendete Primer samt T_m , GC-Anteil und Länge

Name	Sequenz	T_m [°C]	GC [%]	bp
5'peCFP N1 Seq	5'-GTGAACCGTCAGATCCGCTAG-3'	58,0	57	21
5'SPRED2-CFPconnect	5'-GTACCACTGTATGTCCGACCC-3'	58,0	57	21
5'eGFP N1 Seq	5'-CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG-3'	67,0	73	22
5'pEGCPC1 Seq	5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'	61,0	59	22
CMV-F	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'	65	66,7	21
SV40pA-R	5'-GAAATTTGTGATGCTATTGC-3'	49	35	20

3.9.2 PCR

Zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen wurden Polymerasekettenreaktionen (PCRs) durchgeführt. Hierfür wurden Template-Sequenzen zu 100 nM mit den korrespondierenden Primerpaaren zu 10 mM in die Reaktion eingebracht. Bei den Genotypisierungen von transfizierten E. coli wurden einzelne Klone als Templates mit sterilen 10,0 µl Eppendorf-Pipettenspitzen von den Agarose-Platten gepickt und in 30,0 µl ddH₂O überführt. Hiervon wurden 2,5 µl als Template in die PCR eingebracht. Entsprechend den Schmelztemperaturen (T_m) der Primer wurden die Annealing-Temperaturen gewählt und pro Reaktion 25-30 Zyklen gefahren.

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen werden 12,5 µl des RedTaq PCR Mastermix (2X) (Genaxxon, M3029.0100), 8 µl ddH₂O, entsprechende Forward- und Reverse-Primer zu je 1 µl (10 mM) in einem Reaktionsgefäß gemischt.

3.9.3 1% Tris-Acetat-EDTA Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe, wurde ein 1%-Tris-Acetat-EDTA (TAE) Agarosegel hergestellt. Als Elektrophorese-Puffer diente eine 1:50 Verdünnung eines 50 x TAE Puffers (0,01 M EDTA pH 8,0; 0,2 M Eisessig; 0,4 M Tris in 1l Endvolumen in ddH₂O). Entsprechend dem Endvolumen des Gels wurde 1% Agarose (w/v) mithilfe einer Feinwaage abgewogen und in kochendem TAE-Puffer gelöst. Als Fluoreszenzfarbstoff wurden pro 100 ml Agarosegel 5 µl Nancy-520 (Sigma-Aldrich, 01494) verwendet. Nach dem Aushärten des Agarosegels wurde dieses 60 min in 1xTAE-Puffer platziert und eine Spannung von 10V/cm angelegt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht ($\lambda=355$ nm) (BRL UV Transilluminator TFX-35M; Life Technologies/Gibco) analysiert.

3.10 Relative Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in SPRED2-KO Herzlysaten

Das OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence) (Cell Biolabs, Inc., # STA-347) ermöglicht die Quantifizierung der gesamten Radikalaktivität in einer bestimmten Probe durch den Vergleich mit einer Wasserstoffperoxid-Verdünnungsreihe. Der funktionelle Teil des Assays besteht aus der fluorogenen Substanz, Dichlordihydrofluorescein (DCFH), die an einen Quencher, DiOxyQ, gebunden ist. Die Substanz DCFH reagiert prinzipiell mit Wasserstoffperoxid, Peroxylradikalen (ROO^{*}), Salpetersäureradikalen und Peroxinitrit-Anionen (ONOO⁻). Diese freien radikalischen Moleküle stehen repräsentativ für RNS, als auch ROS, und erlauben eine Messung der totalen freien Radikalpopulation innerhalb einer ausgewählten Probe.

Zur Vorbereitung des Assays wurde zunächst aus den 1,5 ml 10 x Stabilization Solution (No. 234702) durch Zugabe von 13,5 ml ddH₂O eine 1 x Stabilization Solution hergestellt. Diese dient zur Stabilisierung des DCFH nach Entfernen des Quenchers.

Weiterhin wurde aus der 250 x katalysierenden Lösung (No. 234703) durch Zugabe von 2,49 ml 1 x PBS für 50 Reaktionen eine 1x katalysierende Lösung hergestellt.

Um das DCFH-DiOxyQ in die reaktive Form zu bringen, wurde dieses zunächst mit der Priming Solution (*Priming Reagent*, No. 234701) im Verhältnis 1:5 versetzt, um den Quencher zu entfernen (für 50 Reaktionen werden 25 µl DCF-DiOxyQ zu 100 µl Priming Reagent gegeben). Das entsprechende Reaktionsgefäß wurde vor Licht geschützt aufbewahrt und das Reaktionsgemisch homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung 30 min bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 4,875 ml der Stabilisierungslösung hinzugegeben, sodass das reaktive fluorogene Substrat Dichlorhydrofluorescein als DCFH stabil in Lösung vorliegt. Pro Reaktionsansatz wurden 100 µl der DCFH-Lösung, 50 µl des 1 x Catalyst und 50 µl der zu analysierenden Probe kombiniert. Vor Licht geschützt wurde die ELISA-Plate 15-45 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden bei 480 nm angeregt und bei 530 nm detektiert.

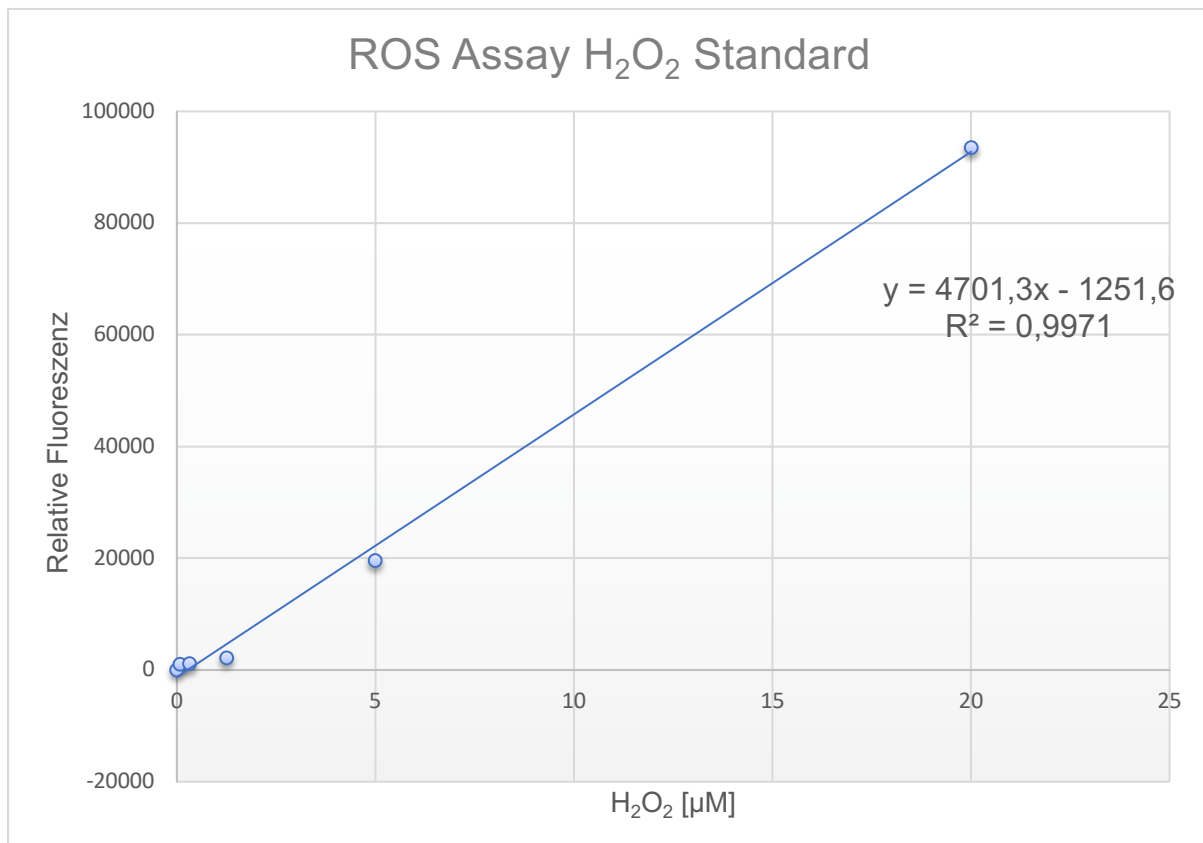


Abbildung 9 H₂O₂-Standard für den In-Vitro ROS-Assay. Aus den Messergebnissen der verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen wird eine Restriktionsgerade gebildet und das dazugehörige Gütemaß (R^2) ermittelt. Aus der Restriktionsgleichung lässt sich anhand der bei den Proben ermittelten Fluoreszenzen die Konzentration an enthaltenen Radikalen durch Einsetzen der ermittelten relativen Fluoreszenz als Y ermitteln. Das Gütemaß gibt die Qualität für den Kurvenverlauf des Standards an. Ein Gütemaß von $R^2 = 1,0$ entspräche einer perfekten Annäherung.

Als Proben wurden Organlysate des Herzens von SPR2^{-/-} und Wildtyp Mäusen verwendet, die bis zu Versuchsbeginn bei -80°C gelagert oder direkt nach der Präparation verwendet wurden (s. Organentnahme 2.1).

3.11 Vesikelpräparation aus SPRED2-KO Gehirnhomogenaten

Um Analysen zur Interaktion von SPRED2 mit Membran-Vesikeln zu untersuchen, wurde eine Vesikelpräparation durch mehrere sequentielle Zentrifugationsschritte durchgeführt. Hierfür wurden die SPRED2-defizienten Mäuse und eine äquivalente Anzahl an Wildtyp-Individuen gleichen Alters entsprechend 2.4 Organentnahme und Gewebshomogenisate geopfert, die Schädelkalotte vorsichtig geöffnet und die Gehirne herauspräpariert. Von den entnommenen Organen wurde das Gewicht

bestimmt. Danach wurden die Gehirne dreimalig in 1 x PBS gewaschen, schockgefroren und auf Eis in einem vorgekühlten, elektrischen Glasmörser in 2 ml Puffer C (0,6 mM Sucrose; Protease-Inhibitor (cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) Roche); 10 mM MOPS) homogenisiert. Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Das Homogenat wurde bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen.

Der so entstandene Überstand (S1) wurde 30 min bei 12.000 x g zentrifugiert, der Überstand (S2) wiederum in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und mit 40 ml Puffer D (160 mM NaCl; Protease-Inhibitor (cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche); pH 7,4) verdünnt. Anschließend wurden 10 ml 1 M Sucrose zugegeben und die resultierende Lösung (S2') für 1 h bei 70.000 x g zentrifugiert. Das hierbei entstandene Pellet (M) enthält die vesikulären Membranstrukturen der entnommenen Organe. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1.000 ml Puffer E (54 mM LiCl; 6 mM KCl; 100 mM NaCl; Protease-Inhibitor (cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Roche); 20 mM MOPS; pH 7,4) aufgenommen. Die so präparierten vesikulären Membranen und alle anderen Fraktionen der Zentrifugationsschritte wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

3.12 Motor Assays

3.12.1 Kinesin Motor Protein Assay

Um die Aktivität der Kinesin-ATPase zu quantifizieren wurde der Kinesin Motor Assay (Cytoskeleton, Cat. # BK053) ausgewählt. Der Kinesin Motor Assay ermöglicht die Messung des ATP-Umsatzes der Kinesin Motor-Domäne innerhalb eines einzigen Reaktionsansatzes mit Hilfe eines Malachitgrün-basierten Detektionssystems und vorisolierten Microtubuli, sodass keine Präparationsschritte zur Isolation von Microtubuli vor dem Assay nötig sind. Kinesine setzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse um, um eine anterograde Bewegung entlang der Microtubuli durchzuführen. Sobald Kinesine an Microtubuli binden, wird ihre Aktivität um den Faktor 100 – 1.000 gesteigert [78]. Das Malachit-basierte Detektionssystem des Assays ermittelt also die Generation von anorganischen freien Phosphaten durch den Umsatz der Kinesin-ATPase. Der Assay wurde mit den aus 2.10 isolierten Vesikeln aus Gehirnhomogenisaten in einer lichtdurchlässigen 96-Half-Area Well Plate (Corning™) zu 180 µl Reaktionsvolumen bei 650 nm durchgeführt.

3.12.1.1 Microtubuli

Um die Microtubuli (Cat # MT002) für den Assay vorzubereiten, werden 500 µl des Kinesin Reaction Buffer (KRB, Part # KRB01) auf 37°C für 10 min erwärmt. Bei RT werden dem KRB 5 µl in DMSO rekonstituierten Taxols (Cat. # TXD01) zugegeben und bei RT gelagert. Pro Microtubuli-Tube werden 100 µl des Taxol-KRB zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Microtubuli werden vorsichtig resuspendiert und der Inhalt auf 4 Reaktionsgefäße aufgeteilt und erneut resuspendiert. Es ist essentiell die Reaktionsgefäße mit den Microtubuli in Flüssigstickstoff schockzufrieren, um deren Funktion zu erhalten. Bis zur Durchführung werden die MT-Stocks auf -80°C gelagert.

3.12.1.2 Kinesin Motor Control Protein

Die im Assay enthaltenen Tubes mit Kinesin Motor Control Protein (Cat. # KR01) werden in 10 µl KRB rekonstituiert. Die ergibt eine Stocklösung von 2,5 mg/ml Protein. Die so vorbereiteten Kinesine werden zu je 2 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.12.1.3 CytoPhos Reagent und Phosphatstandard

CytoPhos Reagent (Part # CYPH) terminiert die Reaktion. Um eine Kontamination mit freien Phosphaten (P_i) zu vermeiden, wird das Reagenz zu 10 x 7 ml aliquotiert. Der Phosphatstandard benötigt weder Rekonstitution noch Aliquotierung.

3.12.1.4 ATP-Stocks

Das für den Assay benötigte ATP wurde in 100 mM Stocks zu je 20 μ l aliquotiert. Hierfür werden 55,1 mg ATP-Dinatriumhydrat (Sigma, Cat. # A3377) in 900 μ l phosphatfreiem 100 mM PIPES-Puffer (302,37 mg PIPES (Sigma, P6757) in 10 ml ddH₂O, pH = 7.0) gelöst. Die ATP-Stocks werden zu je 20 μ l aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.12.1.5 Microtubuli-aktivierte ATPase-Reaktion

Für die Durchführung des Motor Assays werden pro 24 Reaktionen 1 ml Kinesin Reaction Buffer benötigt. Der KRB wird mit 10 μ l Taxol supplementiert und bei RT gelagert.

20 μ l des ATP-Stocks (100 mM ATP, pH = 7.0) werden mit 1 ml eiskalten ddH₂O verdünnt und auf Eis gelagert.

Pro 24 Reaktionen wird jeweils 1 Tube der vorbereiteten Microtubuli für 2-3 Minuten in einem Wasserbad bei RT inkubiert und danach bei RT gelagert.

240 μ l des Taxol-supplementierten KRBS werden pro Tube mit Microtubuli gegeben, um eine Arbeitslösung von 0,2 mg/ml zu erhalten.

Pro 24 Reaktionen wird jeweils 1 Tube Kinesin Control Protein mit 58 μ l Reaktionspuffer ohne Taxol verdünnt, um eine Arbeitslösung von 0,08 μ g/ μ l zu erhalten.

Die Durchführung der Microtubuli-aktivierten ATPase-Reaktionen wird nach Tab. X durchgeführt und die Emission bei 650 nm nach exakt 5 min ermittelt. Die ersten 17 Reaktionen stellen die für die ATPase-Reaktion essentiellen Negativkontrollen dar.

Tab. 3. Microtubuli-aktivierte ATPase-Reaktion des Kinesin Motor Proteins

Well Position	KRB-T [μ l]	MTs (0.2 mg/ml) [μ l]	KHC (0.08 mg/ml) [μ l]	Vesikel	Test
B2	30,00	---	---	---	Blank
C2	20,00	10	---	---	MT only
D2	20,00	10	---	---	MT only
E2	27,5	---	2,5	---	KHC only
F2	27,5	---	2,5	---	KHC only
<hr/>					
B3	15,0	10	5,0	---	ATPase
C3	15,0	10	5,0	---	ATPase
D3	15,0	10	5,0	---	ATPase
<hr/>					
B4	17,5	10	---	2,5	SPR2 + MT
C4	17,5	10	---	2,5	SPR2 + MT
D4	25	---	2,5	2,5	SPR2 + KHC
E4	25	---	2,5	2,5	SPR2 + KHC
<hr/>					
B5	29,75	---	---	0,25	SPR2 0.25 μ l only
C5	29,5	---	---	0,5	SPR2 0.5 μ l only
D5	29,0	---	---	1,0	SPR2 1.0 μ l only
E5	28,5	---	---	1,5	SPR2 1.5 μ l only
F5	27,5	---	---	2,5	SPR2 2.5 μ l only
<hr/>					
B6	17,25	10,0	2,5	0,25	SPR2 0.25 Test
C6	17,25	10,0	2,5	0,25	SPR2 0.25 Test
D6	17,25	10,0	2,5	0,25	SPR2 0.25 Test
E6	17,25	10,0	2,5	0,25	SPR2 0.25 Test
F6	17,25	10,0	2,5	0,25	SPR2 0.25 Test
<hr/>					
B7	17,0	10,0	2,5	0,5	SPR2 0.5 Test
C7	17,0	10,0	2,5	0,5	SPR2 0.5 Test
D7	17,0	10,0	2,5	0,5	SPR2 0.5 Test
E7	17,0	10,0	2,5	0,5	SPR2 0.5 Test
F7	17,0	10,0	2,5	0,5	SPR2 0.5 Test
<hr/>					
B8	16,5	10,0	2,5	1,0	SPR2 1.0 Test
C8	16,5	10,0	2,5	1,0	SPR2 1.0 Test
D8	16,5	10,0	2,5	1,0	SPR2 1.0 Test
E8	16,5	10,0	2,5	1,0	SPR2 1.0 Test
F8	16,5	10,0	2,5	1,0	SPR2 1.0 Test
<hr/>					
B9	16,0	10,0	2,5	1,5	SPR2 1.5 Test
C9	16,0	10,0	2,5	1,5	SPR2 1.5 Test
D9	16,0	10,0	2,5	1,5	SPR2 1.5 Test
E9	16,0	10,0	2,5	1,5	SPR2 1.5 Test
F9	16,0	10,0	2,5	1,5	SPR2 1.5 Test
<hr/>					
B10	15,0	10,0	2,5	2,5	SPR2 2.5 Test
C10	15,0	10,0	2,5	2,5	SPR2 2.5 Test
D10	15,0	10,0	2,5	2,5	SPR2 2.5 Test
E10	15,0	10,0	2,5	2,5	SPR2 2.5 Test
F10	15,0	10,0	2,5	2,5	SPR2 2.5 Test

} neg. Ktrl.

3.12.2 Dynein Motor Protein Assay

Die Aktivität der Dynein ATPase wird analog zu der Microtubuli-aktivierten ATPase-Aktivität der Kinesin ATPase ermittelt. Als Basis für die Messung des Phosphatumsatzes der Microtubuli-aktivierten Dynein-ATPase wird das Kinesin ATPase END-POINT BIOCHEM KIT (Cytoskeleton, # BK053) verwendet. Als Motor Protein wird das Cytoplasmic Dynein Motor Protein (Cytoskeleton, Cat. # CS-DN01-A) nach Herstellerangaben verwendet. Das genutzte Dynein Motor Protein wurde nach *Paschal et al.* aus den Gehirnen von Hausschweinen (*Sus scrofa*) isoliert und enthält die *dynein heavy chain* (520 kDa), die *intermediate chain* (54 kDa, 59 kDa und 74 kDa), sowie die *light chain* (20 kDa) und ist voll kompatibel mit dem Kinesin ATPase END-POINT BIOCHEM KIT.

3.12.2.1 Rekonstitution des Cytoplasmic Dynein Motor Proteins (DN01)

Das Cytoplasmic Dynein Motor Protein (Cytoskeleton, Cat. # CS-DN01-A) wird in 1 ml eiskaltem ddH₂O rekonstituiert. Dies ergibt eine 1 mg/ml Arbeitslösung (20 mM Tris-HCl pH = 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 20% (w/v) Sucrose). Das rekonstituierte Protein wird bei 4°C gelagert.

3.12.2.2 Microtubuli zu 2.0 mg/ml in PEM

Für 96 Assays werden 1 mg Tubulin (Cat. # MT002) in 500 µl eiskaltem PEM-Puffer (100 mM PIPES pH = 6.95, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄) und 10% Glycerol resuspendiert und 2 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 1 µl 2 mM Taxol zugegeben und 2 min bei RT inkubiert. Die Zugabe von 1 µl 2 mM Taxol wird wiederholt und erneut 2 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 3 µl 2 mM Taxol (finale Konzentration 4+4+12 µM). Die so präparierten MTs werden bei RT gelagert.

3.12.2.3 Motor Mix

10 ml PM12-Puffer werden mit Taxol (12 mM PIPES-KOH, pH = 7.0, 2 mM MgCl₂, 10 µM Taxol) supplementiert. Der Motor Mix für wird nach Tab. 3 in einem Polypropylenreaktionsgefäß zusammengestellt.

Tab. 4. Microtubuli-aktivierter Dynein ATPase Motor Mix

96 Assays	[µl]
PM12 + Taxol	3200
2.0 mg/ml MTs in PM12 + 20 µM Taxol	400
100 mM ATP	7
2.5 M Natrium-Azid	6
DN01 1 mg/ml	100

3.12.2.4 Microtubuli-aktivierter Dynein ATPase-Reaktion

Zur Durchführung der Dynein ATPase-Reaktionen wurde das Pipettierschema nach Tab. 4 genutzt. Hierbei wird, wie bei der Microtubuli-aktivierten ATPase-Reaktion des Kinesin Motor Protein Assays, die Vesikelmengen vorgelegt und daraufhin 30 µl des Dynein Motor Mix zugegeben. Bei RT wird der Reaktionsansatz zunächst 1 min bei 400 rpm gemischt und anschließend bei 37°C für 20 min inkubiert. Die Reaktion wird mit 120 µl CytoPhos gestoppt und die Emission bei 650 nm anschließend photometrisch detektiert.

Tab. 5 Microtubuli-aktivierte ATPase-Reaktion des Dynein Motor Proteins

Well Position	Dynein Motor Mix [μ l]	Vesikel	Test
B1	30,00	---	Blank
C1	30,00	---	Dynein Motor Mix only
D1	30,00	---	Dynein Motor Mix only
E1	30,00	---	Dynein Motor Mix only
F1	30,00	---	Dynein Motor Mix only
} neg. Ktrl.			
B2	30,00	1.0	WT Brain 1.0 Test
C2	30,00	1.0	WT Brain 1.0 Test
D2	30,00	1.0	WT Brain 1.0 Test
E2	30,00	1.0	WT Brain 1.0 Test
F2	30,00	1.0	WT Brain 1.0 Test
B3	30,00	1.5	WT Brain 1.5 Test
C3	30,00	1.5	WT Brain 1.5 Test
D3	30,00	1.5	WT Brain 1.5 Test
E3	30,00	1.5	WT Brain 1.5 Test
F3	30,00	1.5	WT Brain 1.5 Test
B4	30,00	2.5	WT Brain 2.5 Test
C4	30,00	2.5	WT Brain 2.5 Test
D4	30,00	2.5	WT Brain 2.5 Test
E4	30,00	2.5	WT Brain 2.5 Test
F4	30,00	2.5	WT Brain 2.5 Test
B6	30,00	1.0	KO Brain 1.0 Test
C6	30,00	1.0	KO Brain 1.0 Test
D6	30,00	1.0	KO Brain 1.0 Test
E6	30,00	1.0	KO Brain 1.0 Test
F6	30,00	1.0	KO Brain 1.0 Test
B7	30,00	1.5	KO Brain 1.5 Test
C7	30,00	1.5	KO Brain 1.5 Test
D7	30,00	1.5	KO Brain 1.5 Test
E7	30,00	1.5	KO Brain 1.5 Test
F7	30,00	1.5	KO Brain 1.5 Test
B8	30,00	2.5	KO Brain 2.5 Test
C8	30,00	2.5	KO Brain 2.5 Test
D8	30,00	2.5	KO Brain 2.5 Test
E8	30,00	2.5	KO Brain 2.5 Test
F8	30,00	2.5	KO Brain 2.5 Test

3.13 Plasmide

3.13.1 pmVenus-SQSTM1, pcDNA3.1-mycHis A (-) _5'NotI-SPRED2-HindIII'3 und pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1

Das in Abbildung 10 gezeigte Plasmid pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1 enthält neben der cDNA für SPRED2 am 5'-Ende die Restriktionsschnittstelle für *XhoI*, sowie am 3'-Ende die Restriktionsschnittstelle für *HindIII*. Das an SPRED2 angefügte Fluorophor eCFP ist am 3'-Ende lokalisiert. Die rot markierten Pfeile in der Vektorkarte bezeichnen 19-29 bp lange Primersequenzen, die für die Sequenzierung genutzt wurden. Das Plasmid besitzt des Weiteren eine Kanamycin / Neomycin-Resistenz als Selektionsmarker.

Abbildung 11 zeigt das Plasmid pcDNA3.1-mycHis A (-) _5'NotI-SPRED2-HindIII', welches für die Exzision der NotI-SPRED2-HindIII-Sequenz genutzt wurde.

Die Sequenzen für die Fusionsproteine mVenus-Sequestosome1-C-18 (Addgene plasmid # 56392) und mVenus-Sequestosome1-N-18 (Addgene plasmid # 56335) wurden von Michael Davidson zur Verfügung gestellt. Sequenzierungen liegen nur für die codierenden Sequenzabschnitte vor (s. Anhang). Die Sequenzierung zur Sequenzverifizierung wurde mit den Standardprimern CMV-F (5'-CGCAAATGG GCGGTAGGCGTG-3') und SV40pA-R (5'-GAAATTTGTGATGCTATTGC-3') durchgeführt.

Für die Klonierung wurden beide Plasmide mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *HindIII* geschnitten. Hierfür wurden 100 µg der entsprechenden Plasmide mit 2,5 µl Buffer 2 (NEB) und 1 µl des Restriktionsenzym bei einem Reaktionsvolumen von 25 µl für 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend bei 80°C für 20 min gestoppt.



Abbildung 10 Das Plasmid pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1. Enthalten ist die cDNA für SPRED2 und für das am 3'-Ende angefügte Fluorophor eCFP. Als Selektionsmarker diente eine Kanamycin / Neomycin-Resistenz. Mit roten Pfeilen markiert sind die zur Sequenzierung verwendeten Primer.

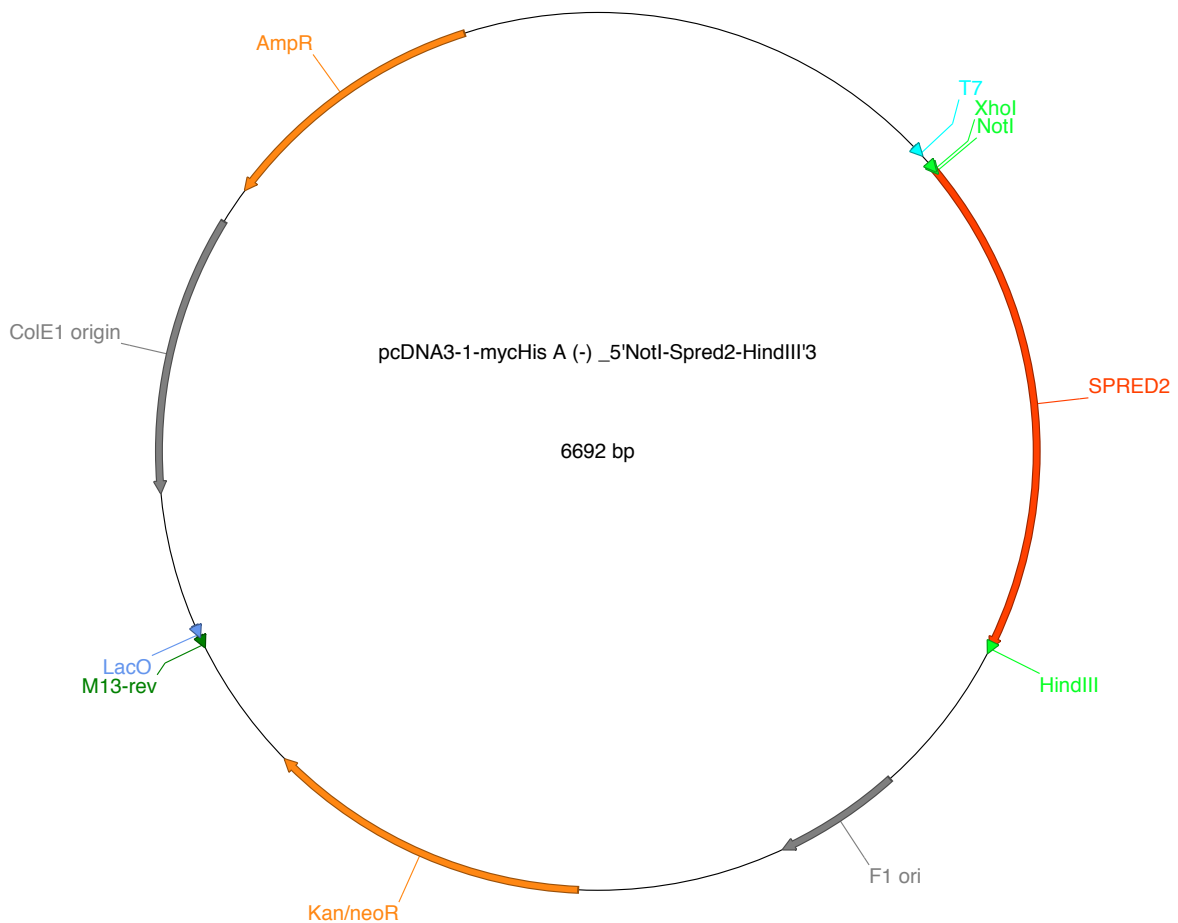


Abbildung 11 Das Plasmid pcDNA3-1-mycHis A (-)_5'NotI-SPRED2-HindIII'3. Das Plasmid lieferte die Sequenz von SPRED2, sowie die zur Klonierung benötigten Schnittstellen *XhoI*, *NotI* und *HindIII*. Für die Klonierung wurde SPRED2 mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* ausgeschnitten und in das Backbone des Plasmids pcDNA3.1-eCFP-KpnI-N1 kloniert.

3.13.2 Hitzeschock-Transformation chemisch kompetenter DH5a

Um kompetente *E. coli* (DH5a) mit Plasmid-DNA zu transformieren, wurde der Hitzeschock-Ansatz gewählt. Als Zellen wurden die NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency, New England Biolabs, Cat. C2987H) sowohl für Retransformationen als auch für initiale Transformationen gewählt.

Zunächst wurden 100 ng zu transformierender DNA mit den kompetenten DH5a vorsichtig in einem Transformationsgefäß zusammengebracht und auf Eis für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die DH5a für 42 sec einer Temperatur von 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Sofort danach wurden die transformierten DH5a 2 min auf Eis inkubiert, bevor 500 - 1.000 µl SOC-Medium zugesetzt wurden. Die Suspension wurde

dann 1 h bei 37°C und 750 rpm inkubiert, bevor adäquate Volumina der Bakteriensuspension auf YT-Agaroseplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert wurden.

3.13.3 Plasmidpräparationen (Mini/Midi/Maxi)

Die Plasmidpräparationen wurden mittels der DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Cat No./ID: 69504) zur Präparation von Plasmid-DNA nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte i.d.R. in einer adäquaten Menge Elutionspuffer (70°C).

3.14 Zellkultur

3.14.1 Rekonstitution von HEK293-Frostkulturen

Zur Durchführung der Zellkultur-basierten Versuche wurden *hamster embryonic kidney cells* (HEK293s) verwendet und bis zu einer Konfluenz von 80% bei 37°C und 5% CO₂ zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Nährmedium inkubiert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) unter Zugabe von 10% FCS (v/v) und 1% Pen/Strep (v/v) verwendet. Die Zellen wurden entweder in beschichteten 10 ml Zellkulturplatten (Corning®) oder 75 ml Zellkulturflaschen (Corning® Falcon™ Zellkulturflaschen) inkubiert.

Die für die Versuche genutzten HEK-Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung auf -80°C gelagert. Um diese in die Zellkultur zu überführen, wurde zunächst das entsprechende Medium auf 37°C im Wasserbad erwärmt und 9 ml Nährmedium in ein 15 ml Falcon Reaktionsgefäß gegeben. Die gefrorenen Zellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut und zu dem Nährmedium zugegeben. Anschließend wurde die Suspension 4 min bei 250 x g und 25°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. In 9 ml des vorbereiteten Nährmediums wurden die HEK-Zellen resuspendiert, in einer 10 ml Zellkulturplatte ausgesät und bis zur Konfluenz von 80% bei 37°C und 5% CO₂ (g) inkubiert.

3.14.2 Splitten der HEK293-Zellkulturen

Zum Splitten der konfluenten HEK293-Zellen wurde zunächst das Nährmedium mittels Vakuum-Pumpe entfernt. Das zum Waschen der Zellen genutzte 1 x PBS (steril) wurde auf 37°C erwärmt und die Zellen vorsichtig mit 10 ml 1 x PBS überspült. Das PBS wurde danach entfernt und 1 ml Trypsin/EDTA zugegeben. Unter vorsichtigem Schwenken wurden die Zellen 1-2 min inkubiert und zur Inaktivierung des Trypsins 9 ml Nährmedium zugegeben. Durch mehrmaliges Auf-und-Ab-Pipettieren der Suspension wurden die adhärenen Zellen abgelöst, resuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde für 4 min bei 250 x g und 25°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Je nach gewünschter Dichte wurden die Zellen auf 10 ml Zellkulturplatten ausgesät.

3.14.3 Transfektion von HEK293-Zellkulturen mit den Plasmiden pmVenus-SQSTM1-N18 und pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1 für FRET Analysen

Zur Analyse transfizierter HEK293-Zellen mit den Plasmiden pmVenus-SQSTM1-N18 und pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1 wurden die HEK293-Zellen als Frostkultur rekonstituiert, für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und in eine 6-Well Zellkulturschale passagiert. In den Wells wurden zuvor runde 25 mm Deckgläser mit einer Dicke von ca 0,16 – 0,19 mm positioniert. Dort wurden die Zellen bei o.g. Bedingungen für weitere 18-24 h bis zu einer Konfluenz von ca. 60-70% inkubiert und mittels XtremeGENE™ 9 Transfection Reagent (Cat. No. 06365787001, Roche) transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurden 18 µl XtremeGENE™ 9 Transfection Reagent mit 3,75 µl pmVenus-SQSTM1-N18 mit einer Konzentration von 0,4 µg/µl, bzw. 3,0 µl pcDNA3.1 XhoI-SPRED2-HindIII-eCFP-KpnI-N1 mit einer Konzentration von 0,5 µg/µl und 500 µl optiMEM gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Pro Well einer 6-Well Plate (Corning® Falcon™) wurden 165 µl des Transfektionsreagenz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Um die Auswirkung der Autophagie auf die Interaktion von SQSTM1 und SPRED2 zu untersuchen, wurde der o.g. Ansatz sowohl für transfizierte, als auch für transfizierte und anschließend einem Mangelmedium ausgesetzten HEK293-Zellen durchgeführt. Die Inkubation von transfizierten HEK293-

Zellen in Mangelmedium zur Autophagie-Induktion wurde für 20 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für FRET-Analysen verwendet.

Nach der Transfektion wurden die lediglich transfizierten Zellen weitere 24 h inkubiert und dann für FRET-Analysen verwendet.

3.15 FRET

Für die FRET-Analysen wurden die Deckgläser mit den transfizierten HEK293-Zellen aus den 6-Well Platten herausgehoben und mehrmals mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser mit den transfizierten HEK293-Zellen in einer Halterung mit 400 µl FRET-Puffer (1 x PBS, pH = 7.5, 100mM HEPES, 0.4 mM KF, 0.1% BSA) [79] überschichtet.

Die Messungen wurden mit einem Olympus IX71 Inversionsmikroskop mit einem 60 x Öl-Immersionsobjektiv durchgeführt. Das Inversionsmikroskop war mit einem Strahlteiler (DV2, Photometrics) mit 05-EM Filterset verbunden, das einen 505DCXR dichroitischen Spiegel enthält. ET480/30M und ET535/40M wurden als Emissionsfilter verwendet. Als anregende Lichtquelle wurde eine COOLED pE-100, 440 nm genutzt. Aufgezeichnet wurden die Aufnahmen mit einem optiMOS™ sCMOS Kamerasystem (QImaging).

3.16 Software und Statistik

Zur Sequenzanalyse, Darstellung von Plasmiden, Berechnung der T_m von Primersequenzen und Speicherung der Plasmidsequenzen wurde die Software ApE (A Plasmid Editor by M. Wayne Davis, Biologylabs Utah, v2.0.52, June 2017) für Mac OS X, sowie SerialCloner 2.6 für Mac OS X verwendet. Quantitative Analysen der Immunoblots wurden mit Hilfe von ImageJ (NIH) FIJI durchgeführt. Statistische Auswertung und Darstellung der quantifizierten Immunoblots erfolgte mit GraphPad Prism 5. Bei der statistischen Analyse wurden die Gruppen mit dem Anderson Darling Test auf Normalverteilung kontrolliert. Als statistisches Verfahren bei unabhängigen normalverteilten Datenmengen mit gleicher Varianz wurde der Student's T-Test [80] nach William Sealy Gosset durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Der kardiale SPRED2 knockout Phänotyp

Zunächst wurde, um die SPRED2-Defizienz zu bestätigen ein Immunoblot gegen SPRED2 durchgeführt. Es ist deutlich zu sehen, dass SPRED2 im Herzen von Wildtyp-Individuen vorhanden ist. Im knockout hingegen konnte eine Deletion von SPRED2 in voller Länge nach Inkubation mit einem Antikörper gegen SPRED2 gezeigt werden.

Daraufhin wurde der strukturelle Aufbau von SPRED2-defizienten Herzmuskelzellen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen genauer untersucht (Abb. 12B). Hierbei ist auffällig, dass in regelmäßigen Abständen entlang der Reihen aus Mitochondrien vakuoläre Strukturen sichtbar sind. Bemerkenswert ist auch die Lage der vakuolären Strukturen. Während die Sarkomere sich nicht im Vergleich zum Wildtyp unterscheiden und strukturell integer erscheinen, befinden sich die vakuolären Strukturen fast ausschließlich in der Nähe der Z-Scheiben der Sarkomere. Die vakuolären Strukturen weisen neben ihrem regelmäßigen Auftreten eine sie umschließende Membran auf. Weiterhin zeigen sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Ablagerungen von Vesikeln mit elektronendichtem Material. Diese Vesikel und vakuolären Strukturen finden sich oftmals als Ansammlungen und sind über die gesamte Zellarchitektur der Herzmuskelzellen zu finden.

In Abbildung 12B, Darstellung links unten, sind die Z-Scheiben (Z) zu erkennen, sowie funktionelle Mitochondrien (M), in der Degeneration begriffene Mitochondrien (dM) und Vesikel (V), die von einer Membran umschlossen sind.

Die Ansammlungen von vesikulären Strukturen wirft die Frage nach dessen Ursache auf. Die Makroautophagie als Mechanismus zum Abbau großer Mengen von defekten zellulären Bestandteilen durch spezialisierte Vesikel ist hierbei eine vielversprechende Antwort, da sowohl die Degradation von zellulären Bestandteilen, als auch die groß angelegte Degradation von Mitochondrien (Mitophagie) mechanistisch in engem Zusammenhang stehen.

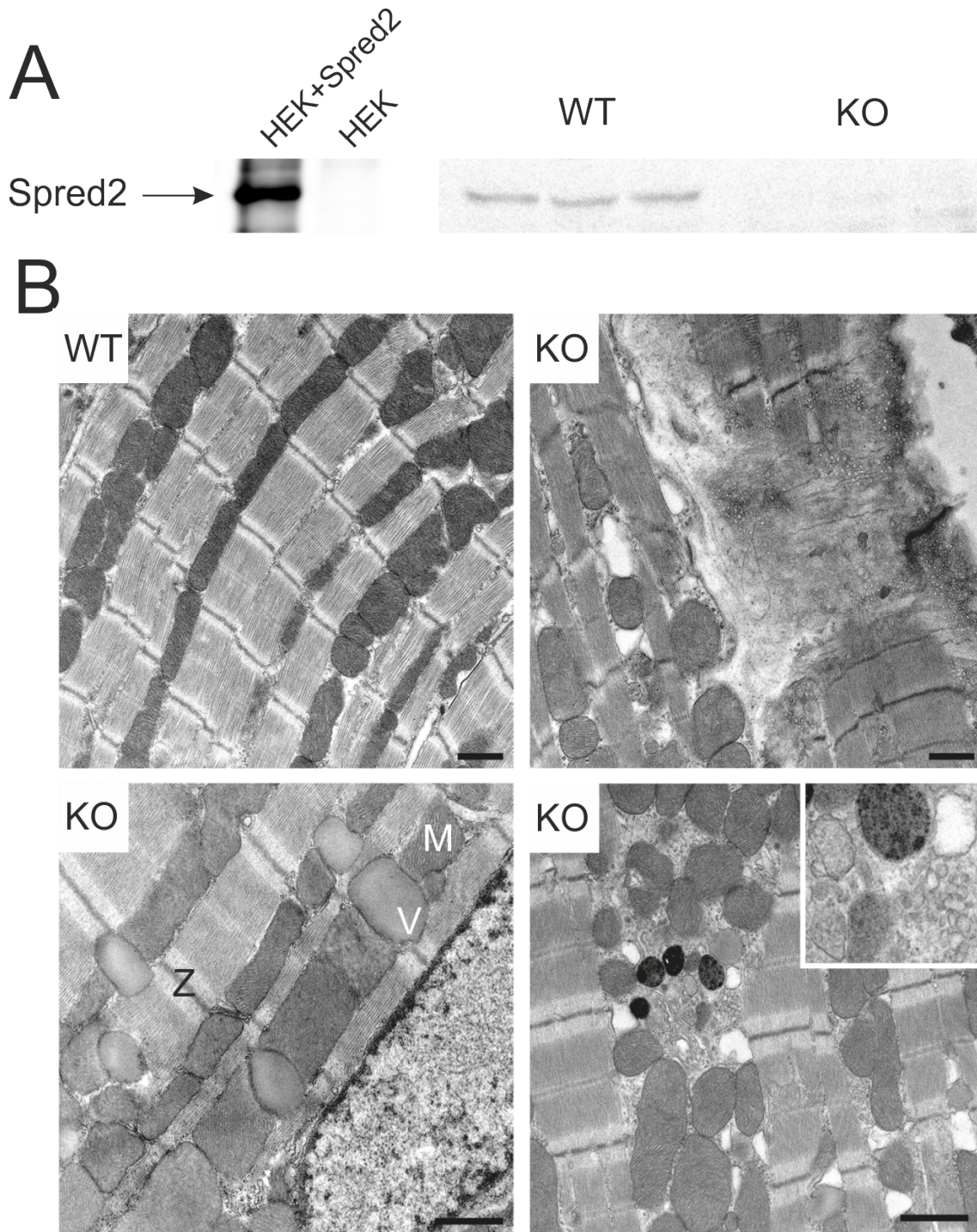


Abbildung 12 Der SPRED2-Phänotyp in Cardiomyocyten. A. Immunoblot-Analyse von lysiertem Herzgewebe von Wildtyp- und knockout Individuen. Es ist deutlich erkennbar, dass SPRED2 im Herzgewebe von SPRED2-defizienten Mäusen nicht vorhanden ist. B. Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus Wildtyp- und SPRED2-defizienten Cardiomyocyten. Die Aufnahme oben links zeigt das Innere einer Herzmuskelzelle aus Wildtyp-Herzen. Zwischen den regelmäßigen Sarkomeren sind die Mitochondrien in Reihen angeordnet. Die Aufnahme unten links zeigt den Phänotyp einer SPRED2-defizienten Herzmuskelzelle. Auffällig ist hier das regelmäßige Auftreten vakuöler Strukturen (V) in den Reihen der Mitochondrien nahe der Z-Scheibe (Z). Sowohl intakte Mitochondrien (M), als auch in der Degeneration begriffene Mitochondrien (dM) sind zu erkennen. Die Aufnahme unten rechts zeigt eine Akkumulation vesikulärer und vakuöler Strukturen und Ablagerungen elektronendichten Materials.

4.2 Im Herzen von SPRED2-defizienten Mäusen sind Schlüsselproteine der Autophagie herunterreguliert

Um die Auswirkungen einer SPRED2-Defizienz auf die Autophagie mechanistisch einzugrenzen, wurden eine Vielzahl von Schlüsselproteinen im Immunoblot analysiert. Besonderes Interesse galt hierbei Proteinen, die bei der Initiation der Autophagie beteiligt sind, wie bspw. Beclin-1 oder Atg14, sowie Proteinen, die entweder Teil eines der beiden autophagosomalen Konjugationssysteme oder an der Konjugation von MAPLC3A/B beteiligt sind.

Beclin-1 ist hierbei als Teil des PtdIns 3-Kinase Komplexes, als auch des Beclin 1-Vps34-Vps15-Komplexes während der Initiation der Phagophore beschrieben. Es interagiert mit zahlreichen Kofaktoren, wie Ambra1 und Atg14. In der quantitativen Immunoblot-Analyse zeigt sich im direkten Vergleich von Wildtyp- und knockout Individuen jedoch, dass Beclin-1 in SPRED2-defizienten Herzen nicht signifikant verändert ist.

Sowohl bei der Konjugation von MAPLC3A/B an das Phospholipid PE, als auch bei der Aktivierung von Atg12 spielt Atg7 als Ubiquitin-aktivierendes (E1) Enzym eine entscheidende Rolle. Die Analysen im Immunoblot von Atg7 zeigen im knockout eine signifikante Reduktion von Atg7 um 46%.

Als nächstes wurden die am Atg12-Atg5—Atg16-Komplex beteiligten Atgs untersucht. Hierbei zeigte sich im knockout im Hinblick auf das Ubiquitin-ähnliche Protein Atg12 keine signifikante Veränderung und auch Atg5 ist quantitativ nicht signifikant verändert.

Atg16 ist innerhalb des Atg12-Atg5—Atg16-Komplexes das einzige nicht-kovalent gebundene Protein. Es liegt innerhalb seines Komplexes als Dimer vor. Atg16L zeigt sich im Immunoblot um 38% reduziert.

Alle auf diese Art analysierten, in Abbildung 13 dargestellten Proteine wurden auf die korrespondierende Menge des *housekeeping genes* GAPDH normalisiert. Die Anzahl der getesteten Herzlysate lag für die Aussagen über den Wildtyp und knockout jeweils bei mindestens n = 14, sodass sich die Daten für eine Analyse aus insgesamt mindestens 28 Individuen ergaben.

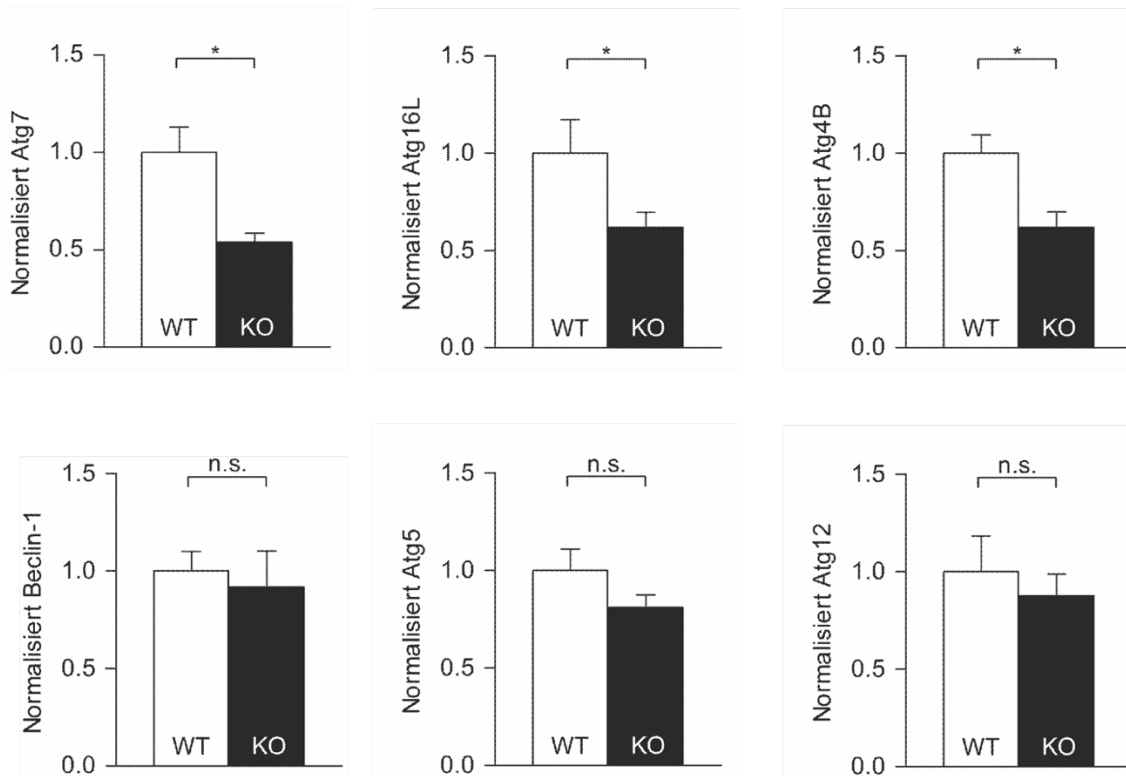
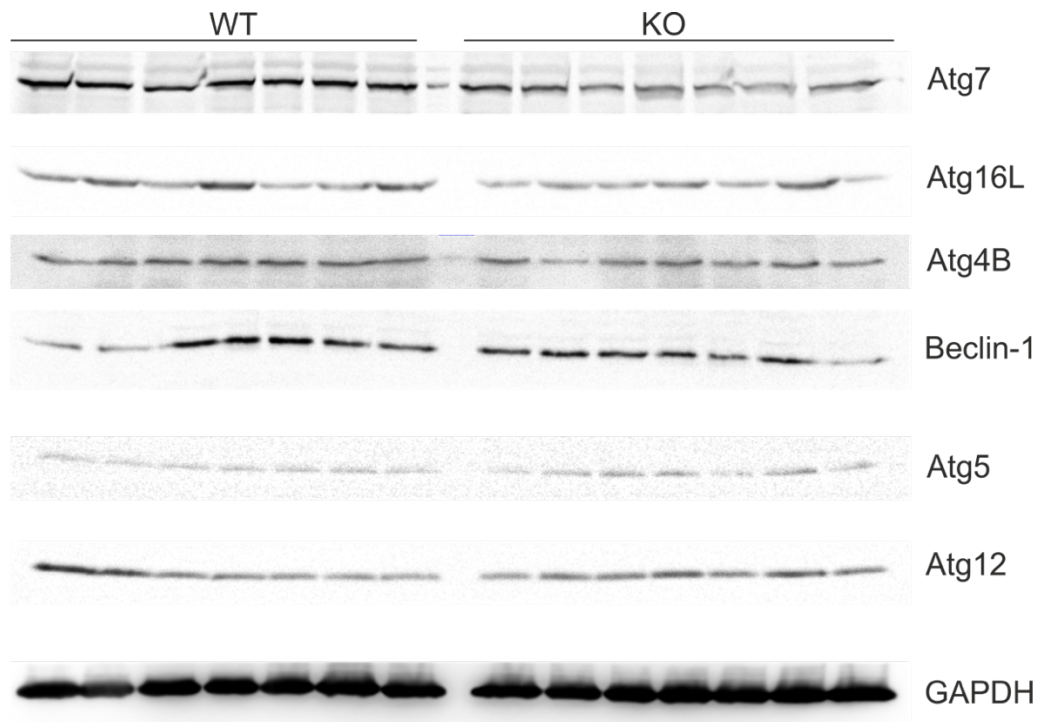


Abbildung 13 Quantitative Immunoblot-Analysen von Schlüsselproteinen in der Autophagie. Das Ubiquitin-aktivierende E1 Enzym Atg7 ist im knockout signifikant reduziert. Auch das im Konjugationssystem Atg12-Atg5—Atg16 beteiligte Atg16L, das einzige in dem Komplex nicht-kovalent gebundene Protein, ist quantitativ verringert. Allerdings sind nicht alle an der Autophagie beteiligten Proteine quantitativ reduziert. So zeigt Beclin-1, repräsentativ für initiiierende Proteine in der Autophagie, keine signifikante Veränderung. Auch das bei der Initiation beteiligte Atg14 (Daten nicht abgebildet) ist nicht verändert. Die beiden kovalent aneinander gebundenen Atgs, Atg12 und Atg5, sind ebenfalls nicht verändert. Bei der Auswertung wurden die Daten der Wildtyp-Individuen auf 1 normalisiert. n = 28. p < 0,05.

4.3 Die Autophagie-Rate im SPRED2-KO Mausmodell ist verringert

Während der Bildung des Autophagosoms und der Expansion der Membran der Phagophore wird zytoplasmatisches LC3 von Atg4 unter katalytischer Hilfe von Atg3 und Atg7 C-terminal gespalten und exponiert den Aminosäurerest Gly140. Das so entstandene LC3-I wird posttranslational so modifiziert, dass das exponierte Gly140 an das Phospholipid Phosphatidylethanolamin in der expandierenden Phagophorenmembran konjugiert werden und LC3-II als Angriffspunkt für die autophagosomalen Cargo-Rezeptoren dienen kann.

Die posttranslationale Modifikation und anschließende Konjugation von LC3-I an PE mit Hilfe der beteiligten Atg-Proteine der beiden Konjugationssysteme Atg8 und Atg12-Atg5—Atg16 stellt einen zentralen Punkt des autophagosomalen Degradationsprozesses dar. Zudem ist das Verhältnis von konjugiertem zu unkonjugiertem LC3 (LC3-II / LC3-I) ein anerkannter Marker für die Autophagie-Rate. Abb. 8 zeigt die Immunoblot-Analyse von LC3-A/B und die anschließende Quantifizierung mit Normalisierung der korrespondierenden Daten von LC3 auf das *housekeeping gene* GAPDH. Hierbei ist LC3-I bei ca. 19 kDa detektiert und LC3-II bei ca. 17 kDa. Das an LC3-I konjugierte PE verändert das Laufverhalten des Proteins im Acrylamidgel, sodass die konjugierte Form von LC3 sich schneller im Gel bewegt als die nicht konjugierte Form.

Es ist deutlich sichtbar, dass das unkonjugierte LC3-I bei 19 kDa im Wildtyp als auch im knockout in identischen Mengen vorhanden ist. Das bei 17 kDa detektierte, konjugierte LC3-II hingegen zeigt sich im knockout deutlich weniger vorhanden, als im korrespondierenden Wildtyp.

Die quantitative Analyse zeigt eine deutliche Verringerung der Autophagie-Rate im knockout im Vergleich zum Wildtyp um 56%. Die Quantifizierung von LC3 im Wildtyp und knockout zeigt keinen signifikanten Unterschied. Die Quantifizierung von LC3-II zeigt im knockout ein deutlich verringertes Verhältnis von LC3-II zu GAPDH um 73%.

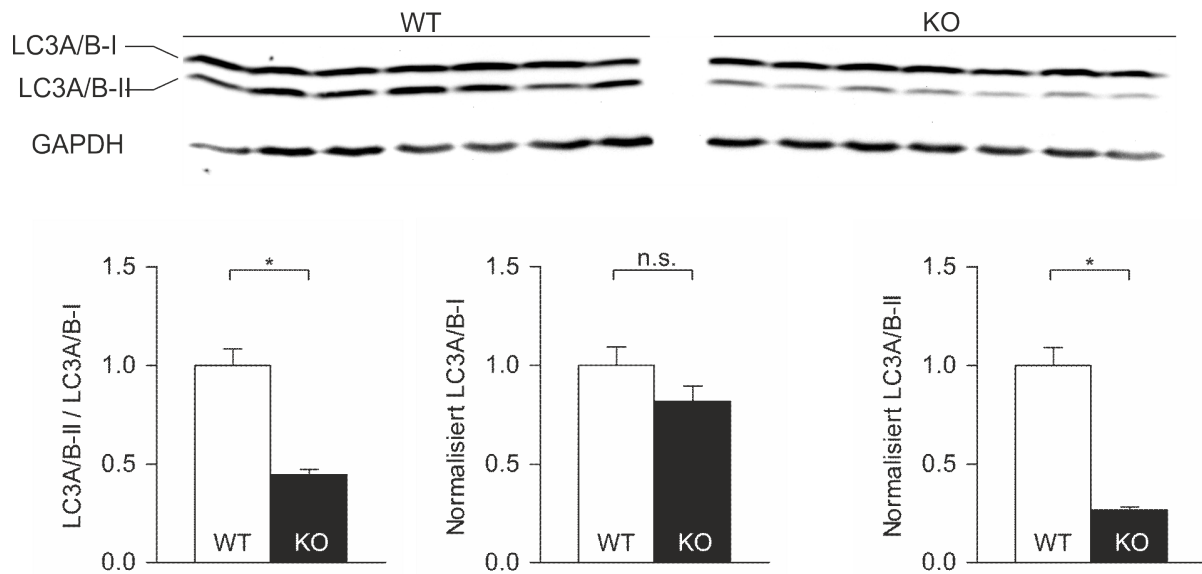


Abbildung 14 Quantitative Immunoblot-Analyse von MAPLC3. Die konjugierte Form von MAPLC3, LC3-II läuft in der SDS-PAGE bei 17 kDa. Die nicht-konjugierte Form LC3-I, welche lediglich C-terminal gespalten ist und die Aminosäure Gly140 exponiert, läuft in der SDS-PAGE bei 19 kDa. Das langsamere Laufverhalten von LC3 erklärt sich aus den veränderten Laufeigenschaften von LC3-II, welches sich trotz seiner höheren Masse aufgrund des hydrophoben Konjugats schneller im Gel bewegt. Im knockout ist das unkonjugierte LC3-I nicht signifikant verändert. Das konjugierte LC3-II jedoch ist im knockout um 73% deutlich reduziert vorhanden. Um eine Aussage über die Autophagie-Rate zu treffen, wurde sowohl das auf das *housekeeping gene* GAPDH normalisierte LC3-I und LC3-II analysiert. LC3-I zeigt sich nicht signifikant verändert, wohingegen die normalisierte Menge LC3-II deutlich reduziert vorliegt. Aus dem Vergleich der Mengen an LC3-I mit LC3-II lässt sich außerdem die Aussage über eine um 54% verringerte Autophagie-Rate im SPRED2 knockout treffen.

4.4 Erhöhte Apoptose im Herzen SPRED2-defizienter Mäuse

Um ein genaueres Bild davon zu bekommen, ob die degenerierten Mitochondrien eine erhöhte Apoptose zur Folge haben könnten, wurde die Caspase-3 im Immunoblot analysiert. Caspase-3 (Cas-3 / CASP3) ist ein Mitglied der Cystein-Asparaginsäure Proteasen Familie und ist an der sequentiellen Aktivierung der zellulären Apoptose beteiligt. Cas-3 liegt im Zytoplasma in einer inaktiven, ungespaltenen Form und in einer aktivierten gespaltenen Form. Die inaktive Cas-3 bewegt sich in der SDS-PAGE bei 35 kDa, die aktivierte Cas-3 bei 17-19 kDa. Durch das Verhältnis von aktiver zu inaktiver Cas-3 lässt sich die Aussage darüber treffen, ob in den untersuchten Zellen eine erniedrigte oder erhöhte Apoptose vorliegt. In den hier untersuchten Herzlysaten ist deutlich erkennbar, dass die Menge an aktivierter Cas-3 im knockout deutlich um 190% im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht ist. Die Anzahl untersuchter Herzlysate aus Wildtyp- und knockout-Individuen lag bei n = 8.

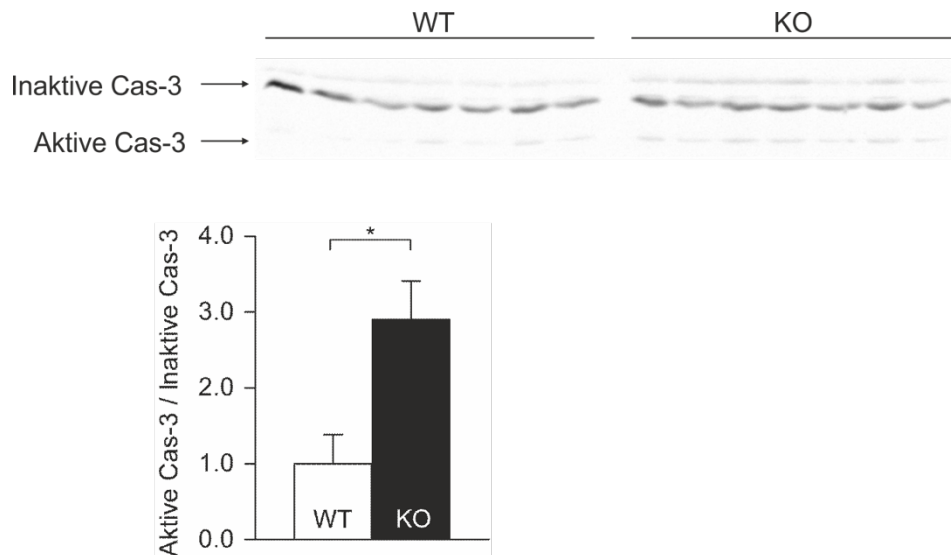


Abbildung 15 Aktivierte Cas-3 als Marker für Apoptose. Im Immunoblot wurden sowohl die inaktive Cas-3 bei 35 kDa, als auch die aktive Cas-3 bei 17-19 kDa nachgewiesen. Im knockout zeigt sich die inaktive Cas-3 nicht signifikant verändert, jedoch ist die gespaltene aktive Form der Cas-3 signifikant um 290% erhöht. Dies spricht für eine vermehrte Apoptose im knockout relativ zum Wildtyp.

4.5 Der MAP-Kinase Inhibitor SPRED2 beeinflusst die Aktivität der Dynein-ATPase positiv

Um zu untersuchen, ob die Vesikelakkumulation im knockout auf eine Veränderung im anterograden oder retrograden Transport zurückzuführen ist, wurden die Proteine genauer betrachtet, die bei dem ATP-abhängigen Transport von Vesikeln tragende Rollen übernehmen. Die untersuchten Motor Proteine sind Kinesin und Dynein.

Kinesine sind für den anterograden, oder auch zentrifugalen, Transport von Vesikeln verantwortlich. Sie ermöglichen die Bewegung von Vesikeln entlang der Microtubuli vom Zellkörper in Richtung Zellmembran, bpsw. während des anterograden Vesikeltransports entlang des Axons von Neuronen.

Der retrograde Transport von Vesikeln entlang der Microtubuli von der Zellmembran in Richtung des Somas wird durch den ATP-Umsatz von Dynein ermöglicht. Ähnlich wie bei dem anterograden Transport durch Kinesin wird ATP-abhängig einerseits die Bewegung entlang der Microtubuli erzeugt, andererseits ATP zu ADP und freiem Phosphat (P_i) hydrolysiert. Der ATP-Umsatz dieser Reaktion kann

durch die Messung des freiwerdenden P_i gemessen werden und lässt einen Rückschluss auf die Aktivität des jeweiligen Motorproteins zu.

Für die Messung des ATP-Umsatzes wurden zunächst Vesikelpräparationen von 11 Wildtyp und 11 knockout Individuen aus Hirngewebe durch eine sequentielle Zentrifugation gewonnen (Abb. 16A). Da im Gehirn zahlreiche Vesikel in den Neuronen vorhanden sind, wurde dieses Organ für die Vesikelpräparation ausgewählt.

Abb. 16B zeigt Immunoblots mit den Vesikelpräparationen gegen die Autophagie-Cargorezeptoren NBR1 und SQSTM1, sowie SPRED2 und die Na^+K^+ -ATPase. Als Lysate wurden untransfizierte HEK-Zelle und mit dem Plasmid pcDNA3.1-SPRED2 transfizierte HEK-Zellen, sowie die Vesikelpräparationen aus den lysierten Gehirnen von Wildtyp und knockout Mäusen benutzt.

NBR1 lässt in untransfizierten HEK-Zellen im Western Blot nicht nachweisen und ist auch in den mit pcDNA3.1-SPRED2 transfizierten HEK-Zellen nur schwach nachweisbar. In den Vesikelpräparationen des Wildtyps sind SQSTM1 und NBR1 deutlich und vergleichbar stark nachweisbar, in den knockout Vesikelpräparationen sind beide kaum nachweisbar.

In den mit pcDNA3.1-SPRED2 transfizierten HEK-Zellen und den Vesikelpräparationen des Wildtyps ist SPRED2 deutlich nachweisbar, die Präparationen aus knockout Mäusen enthalten erwartungsgemäß kein SPRED2.

Der Nachweis des Transmembranproteins Na^+K^+ -ATPase diene als Ladekontrolle für die Menge von Membranvesikeln.

Abb. 16C zeigt die Quantifizierungen des freien P_i in den verschiedenen Motor Protein Assays für Kinesin (links) und Dynein (rechts) mit den Vesikelpräparationen. Die photometrisch gemessene Konzentration an P_i wurde auf den Phosphatstandard bezogen und die so ermittelten P_i -Konzentrationen auf die eingesetzte Menge an Protein relativiert, da unterschiedliche Volumina der Vesikelpräparation eingesetzt wurden. Die Konzentration von freiem P_i ist in [nmol/mg Protein] angegeben. In den Motor Protein Assays wurden 1,0 μ l, 1,5 μ l und 2,0 μ l an Vesikelpräparation eingesetzt, um festzustellen, ob die eingesetzte Menge an Vesikeln einen Unterschied auf den ATP-Umsatz hat. Das Gesamtvolumen pro Ansatz in jedem Assay betrug 30 μ l.

Im Kinesin Motor Assay liegt die relative Konzentration freien Phosphats bei 122 – 149 nmol/mg Protein, ohne dass im Vergleich von KO und Wildtyp signifikante Abweichungen zu erkennen sind.

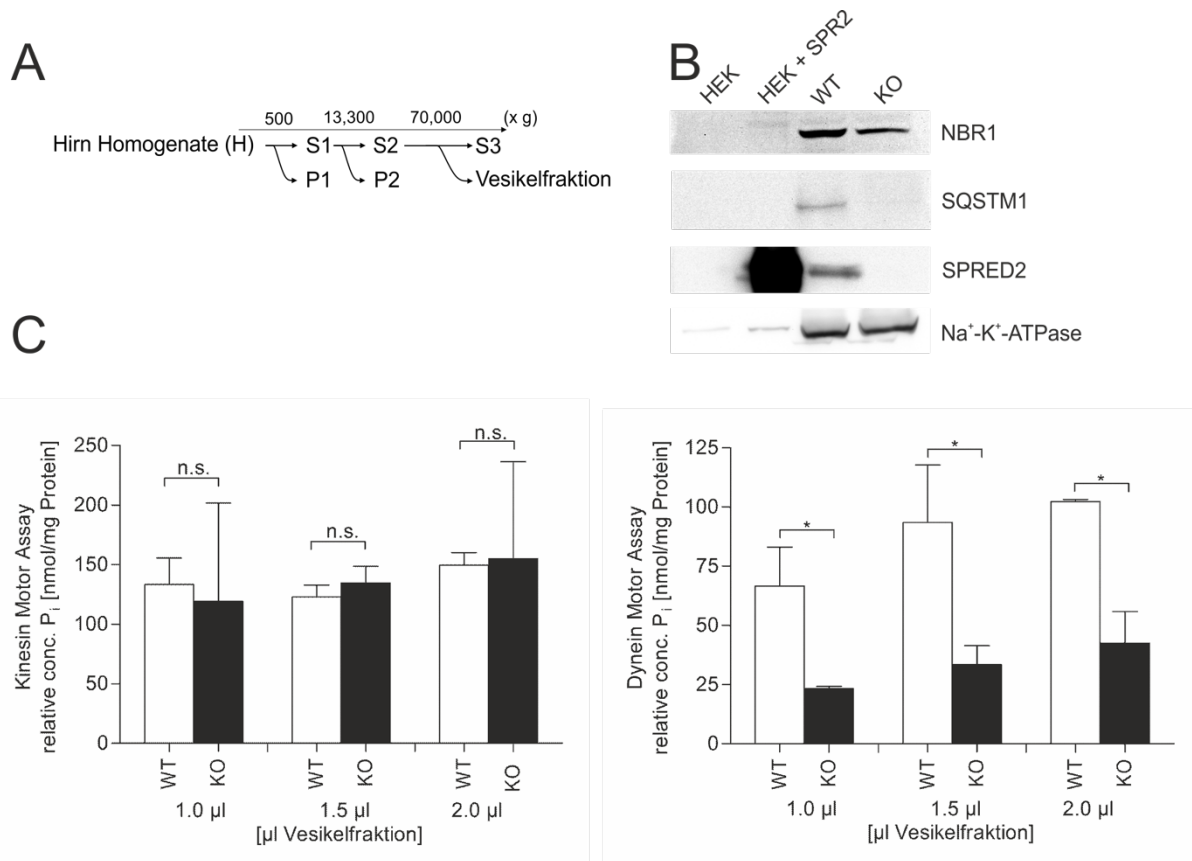


Abbildung 16 Motor Protein Assays zur Messung des Umsatzes von ATP. **A.** Schematische Darstellung der sequentiellen Zentrifugation von Maushirn-Homogenisaten. S = *supernatant* (Überstand), P = Pellet. Die Homogenisate wurden zuerst bei 500 x g zentrifugiert, um zelluläre Feststoffe, wie Zellmembran und Organellen zu entfernen. Bei 13.300 x g wurde der Überstand S1 zentrifugiert, um Zellkerne und restliche Feststoffe zu isolieren. Bei 70.000 x g wurde der Überstand S2 für 60 min zentrifugiert, um Vesikel und kleinere Membranen zu isolieren. **B.** Im Western Blot zeigt sich, dass in den Vesikelpräparationen von Wildtyp Gehirnen sowohl NBR1, als auch SQSTM1 vorhanden sind, im knockout hingegen sind sowohl SQSTM1 und NBR1 so gut wie nicht mehr nachweisbar. SPRED2 findet sich erwartungsgemäß nur in der Vesikelpräparation des Wildtyps und den transfizierten HEK-Zellen. **C.** Quantifizierung des ATP-Umsatzes durch Kinesin und Dynein. Die gemessene Generierung an freiem Phosphat zeigt zwischen Wildtyp und knockout keine signifikanten Abweichungen und liegt je nach Ansatz zwischen 122 – 149 nmol/mg Protein. Die Microtubuli-aktivierte Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i im Dynein Motor Assay zeigt eine eindeutig verringerte Generierung von P_i im knockout Präparat um 58 – 65%. Endreaktionsvolumina bei allen Ansätzen lagen bei 30 μ l mit einer Endzeitmessung von 35 min.

Betrachtet man hingegen den Phosphatumsatz durch die Dynein-ATPase, zeigt sich zwischen den Versuchsansätzen mit Wildtyp- und knockout-Vesikelpräparation eine deutliche Verringerung freien Phosphats von 66 nmol/mg Protein auf 23 nmol/mg Protein im Ansatz mit 1,0 μ l der Vesikelpräparation, was einem um 65% geringeren ATP-Umsatz entspricht. Der Versuchsansatz mit 1,5 μ l der Vesikelpräparation liefert im knockout einen um 64% verringerten ATP-Umsatz mit 33 nmol/mg Protein im Vergleich zu 93 nmol/mg Protein mit der Wildtyp-Vesikelpräparation. Im Ansatz mit 2,0 μ l der Vesikelpräparation zeigt sich ein um 58% reduzierter ATP-Umsatz, von

102 nmol/mg Protein mit der Wildtyp-Vesikelpräparation im Vergleich zu 42 nmol/mg Protein im knockout.

Die Motor Assays wurde als Endpunktmessung durchgeführt mit einer Dauer von 35 min und einem Endreaktionsvolumen von 30 μ l.

4.6 Auswirkung einer SPRED2-Defizienz auf die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Da die Akkumulationen der Vesikel in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der SPRED2 knockout Herzen innerhalb der longitudinalen Anordnung der Mitochondrien zu finden sind, stellte sich die Frage, ob der SPRED2 knockout eine Auswirkung auf die Funktion und das Überleben von Mitochondrien darstellt. Da eine Beeinträchtigung der Mitochondrien deutliche Auswirkungen auf die Atmungskette innerhalb der äußeren mitochondrialen Membranen hat, hat sich die Messung der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als Marker für die mitochondriale Konstitution etabliert.

Zu diesem Zweck wurde ein In-vitro ROS Assay durchgeführt, der über eine Malachitgrün-basierte Farbreaktion einen direkten Rückschluss auf die Konzentration von reaktiven Spezies (ROS / RNS) zulässt.

Hierfür wurde zunächst eine standardisierte H_2O_2 -Verdünnungsreihe zu 0 μ M, 0,078 μ M, 0,313 μ M, 1,25 μ M, 5,0 μ M und 20 μ M angelegt und in Intervallen zu je 300 s die Fluoreszenz ermittelt. Aus den ermittelten AFUs wurden für jedes Messintervall lineare Regressionen erstellt, anhand derer die AFUs aus den Messungen für die Wildtyp und knockout Herzlysate verglichen wurden. Als Zeitpunkt der Messung wurde die lineare Regression für 30 min ausgewählt, da hier die korrespondierenden Messwerte der Lysate im linearen, vergleichbaren Bereich lagen und das Gütemaß der entsprechenden Regression $R^2_{30min} = 0,99747$ entsprach.

Die Messung für die Wildtyp Herzlysate liefert eine Konzentration reaktiver Spezies von $c_{WT}(ROS/RNS) = 13,25 \mu$ M. Im Gegensatz dazu zeigt die Messung der knockout Herzlysate für $c_{KO}(ROS/RNS) = 17,88 \mu$ M einen deutlichen und signifikanten Anstieg reaktiver Spezies an.

Da der In-Vitro ROS Assay keine Unterscheidung von reaktiven Sauerstoffspezies, reaktiven Nitratspezies und Superoxiden zulässt, wird die im Assay ermittelte

$c(\text{ROS/RNS})$ als diejenige Konzentration betrachtet, die einer definierten Konzentration an H_2O_2 vergleichbar ist.

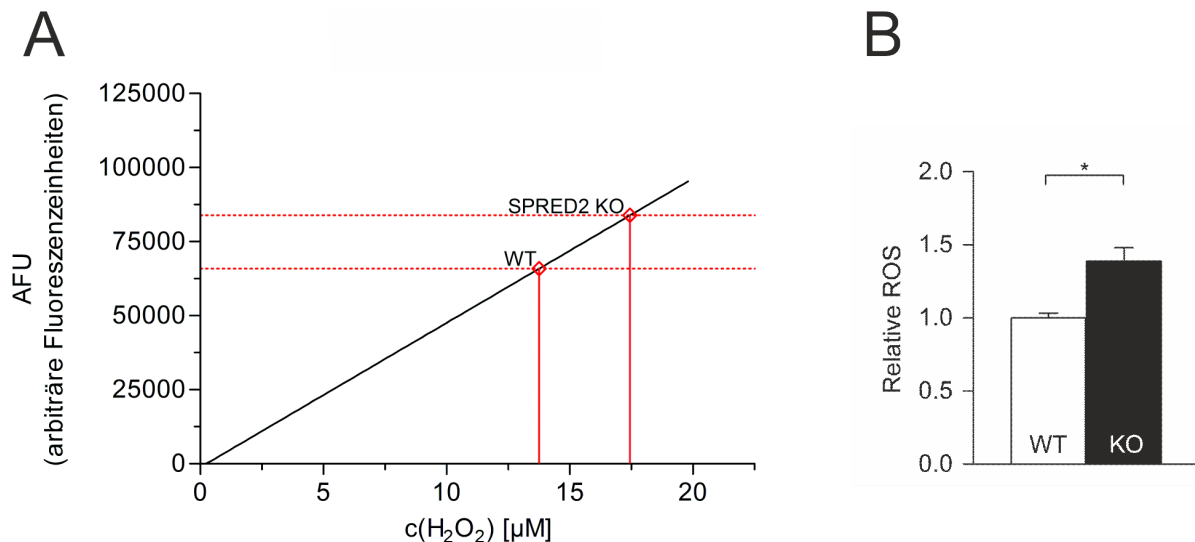


Abbildung 17 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Herzlysaten. A. Graphische Abbildung der quantifizierten Messung von ROS in Wildtyp- und knockout Herzlysaten. Zur Quantifizierung dienten arbiträre Einheiten (AFU), in denen die Fluoreszenz angegeben ist. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte für 55 min in Intervallen von 300 s. Die dargestellte Regression zeigt die Fluoreszenz des H_2O_2 -Standards bei 35 min, da dieser zu dem Zeitpunkt der Messung einen stabilen linearen Verlauf hat, im zeitlichen Median des Assays liegt und die korrespondierenden Messungen der Lysate dem linearen Verlauf gut zugeordnet werden können, ohne den Regressionsbereich zu verlassen. Aus den AFU der Messung der Wildtyp Herzlysate ergibt sich für $c_{\text{WT}}(\text{ROS/RNS}) = 13,25 \mu\text{M}$ und für die Messung der knockout Herzlysate eine $c_{\text{KO}}(\text{ROS/RNS}) = 17,88 \mu\text{M}$. Da der In-Vitro Assay keine Unterscheidung von verschiedenen reaktiven Spezies zulässt, ist $c_{\text{WT}}(\text{ROS/RNS})$ und $c_{\text{KO}}(\text{ROS/RNS})$ diejenige Konzentration reaktiver Spezies in den Lysaten, die einer definierten Konzentration an H_2O_2 als Referenz entspricht. **B.** Es wurden die Messungen der Konzentration an reaktiven Spezies auf die Messung der Wildtyp Herzlysate normalisiert, sodass lässt sich feststellen lässt, dass im knockout eine um 38% signifikant erhöhte Konzentration von ROS/RNS messbar ist. $n = 8$ / Genotyp, Signifikanzniveau $p < 0,05$.

4.7 Das Auftreten von vakuolären Strukturen in Cardiomyocytan wird begleitet von SQSTM1- und CathepsinD positiven Vesikeln

Um die zelluläre Struktur der Cardiomyocytan im Hinblick auf diejenigen Proteine zu untersuchen, die direkt mit der Autophagie und den degradierenden Vesikeln, den Lysosomen, assoziiert sind, wurden zunächst Herzen von SPRED2-defizienten Mäusen isoliert. Von den isolierten Organen wurden Paraffinschnitte und anschließende Antikörper-Färbungen (CathepsinD, ABIN1983671, antibodies-online) und SQSTM1 (sc-1017, SantaCruz) angefertigt. CathepsinD wird vom CTSD-Gen codiert und ist eine Aspartyl-Protease, die ubiquitär in Lysosomen lokalisiert ist. In den

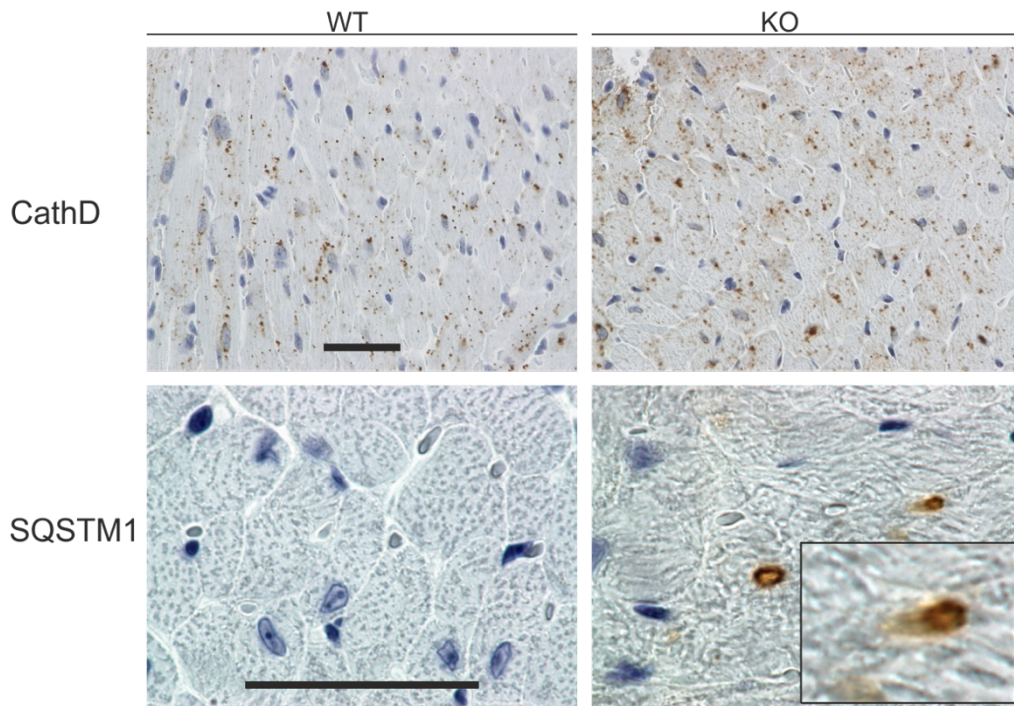
histologischen Analysen (mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. H. A. Baba, Institut für Pathologie, Universität Essen) konnten die Herzgewebe von Wildtypen und knockout Individuen von SPRED2 verglichen werden.

Im Wildtyp weisen die Herzmuskelzellen über das Gewebe hinweg verteilt CathepsinD-positive Strukturen auf, die als Lysosomen interpretiert wurden. Die Zellkerne sind in der Darstellung blau eingefärbt. Im knockout hingegen ist eine deutliche Zunahme der CathepsinD-positiven Vesikel sichtbar. Analysiert man die Menge des im Herzen vorhandenen CathepsinD im Immunoblot und in der anschließenden Quantifizierung, so ist ein deutlicher Anstieg der Menge von CathepsinD um 127% erkennbar.

Das autophagosomale Cargo-Rezeptorprotein SQSTM1 wird vom *SQSTM1*-Gen codiert und bildet die Ansatzstelle für Proteine, die selektiv degradiert werden sollen und der expandierenden Membran der Phagozytose. In den immunhistologischen Antikörperfärbungen sind im Wildtyp nur sehr wenige bis gar keine SQSTM1-positiven Strukturen erkennbar. Die Zellkerne sind in der Darstellung blau eingefärbt. Vergleicht man nun die Schnitte aus den knockout Herzen ist deutlich zu erkennen, dass sich einerseits die Anzahl der SQSTM1-positiven Vesikel deutlich erhöht. Andererseits ist in den SQSTM1-positiven Vesikeln eine granuläre Struktur erkennbar.

Im Immunoblot wurden beide Proteine aus homogenisierten, lysierten Organen analysiert. Hierbei wurden jeweils für jede Probe zwischen 25-50 µg Protein geladen und der Blot anschließend quantifiziert. Die Quantifizierungen des jeweiligen Proteins wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert und nebeneinander aufgetragen. Hierbei ist deutlich sichtbar, dass sich die Akkumulation SQSTM1-positiver Vesikel und der drastische Anstieg CathepsinD-positiver Vesikel in der Immunoblot-Analyse in einem Anstieg zu 150% an SQSTM1 und zu 127% an CathepsinD wiederfindet. Jede Gruppe (WT und KO) setzte sich aus 14 Individuen zusammen. Signifikanzniveau $p < 0,05$.

A



B

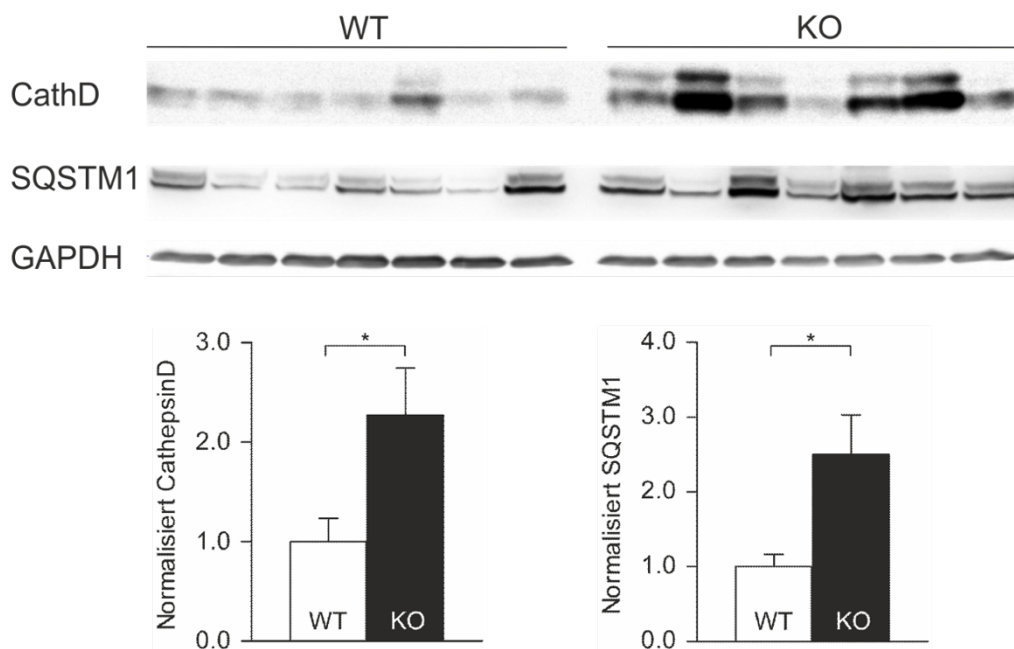


Abbildung 18 Analyse der Aspartyl-Protease CathepsinD und des autophagosomalen Cargo-Rezeptors SQSTM1. A. In immunhistologischen Antikörperfärbungen des Herzgewebes ist innerhalb des Wildtyps im Hinblick auf CathepsinD sind über das Gewebe homogen verteilt positive Vesikel zu erkennen. Bei der Betrachtung von SQSTM1 im Wildtyp sind nur sehr wenige bis keine positiven vesikulären Strukturen erkennbar. Im Herzgewebe aus knockout Mäusen sind im Vergleich zum Wildtyp drastisch zahlreichere CathepsinD-positive Vesikel sichtbar. Auch im Hinblick auf SQSTM1 sind die positiv gefärbten Vesikel über das Gewebe verteilt deutlich zahlreicher vorhanden, als im Wildtyp. Die eingezeichneten Maßstäbe entsprechen 50 μ m B. Die Analyse und anschließende Quantifizierung der korrespondierenden Immunoblots zeigt eine kongruente Erhöhung des Signals von CathepsinD und SQSTM1. CathepsinD zeigt sich im knockout um 127% erhöht, SQSTM1 zeigt sich um 150% erhöht. $n = 14$, $p < 0,05$.

4.8 SPRED2 interagiert im pull-down mit SQSTM1 und NBR1 und VT11b ist im SPRED2-KO erhöht

Um die Situation der Vesikelfusion näher zu untersuchen, wurde der *vesicle SNARE* VT11b im Immunoblot untersucht. SNARE ist das Akronym aus SNAP-Receptor (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) Proteine sind eine Superfamilie von Proteinen, die zusammen mit einer Proteingruppe, den *target SNAREs*, eine essentielle Rolle bei der Membranfusion übernehmen. Da im vorliegenden SPRED2 knockout Phänotyp die Fusion von Autophagosomen und den degradierenden Lysosomen beeinträchtigt sein könnte, wurde VT11b, als *vesicle SNARE*, das als Autophagie-assoziiert gilt, untersucht. *Atlashkin et al.* konnten zeigen, dass ein knockout von VT11b die Fusion von Autophagosomen beeinträchtigt [81]. Die Analyse im Immunoblot zeigt, dass in Lysaten von SPRED2-defizienten Mausherzen eine Anhäufung des *vesicle SNAREs* VT11b auf 176% auftritt. VT11b assoziiert mit autophagosomalen Vesikeln. Die Anhäufung von VT11b als autophagosomaler *vesicle SNARE* unterstützt die Betrachtungen anderer mit Autophagie assoziierter Proteine, dass eine vesikuläre Anhäufung von Vesikeln im SPRED2 knockout vorliegt. Die Anzahl der untersuchten Herzlysate lag bei $n = 14$ pro Gruppe, das Signifikanzniveau lag bei $p > 0,05$. Abbildung 19 zeigt die Immunoblot-Analyse für VT11b.

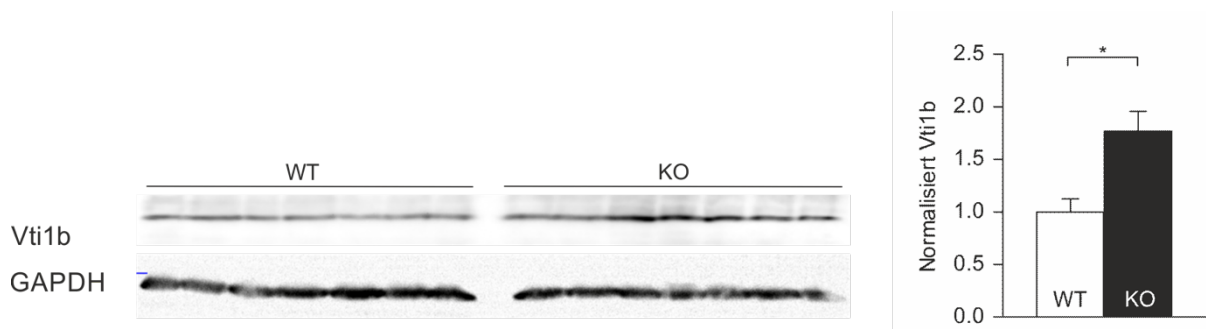


Abbildung 19 Immunoblot zum Autophagie-assoziierten *vesicle SNARE* VT11b. Im knockout ist ein stärkeres Signal im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Die Quantifizierung zeigt eine um 176% erhöhte Menge von VT11b. Die Proteinmengen wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert und nebeneinander aufgetragen. $n = 14$ pro Gruppe, $p < 0,05$.

Um einen möglichen Interaktionspartner von SPRED2 mit einem bei der Autophagie mitwirkenden Proteinen zu finden, wurde ein pull-down Experiment durchgeführt, bei dem bakteriell exprimiertes Glutathion S-Transferase-Protein (GST), ein GST-Fusionsprotein mit der EVH1-Domäne aus SPRED2 und ein GST-

Fusionsprotein aus GST und SPRED2 mit voller Länge genutzt wurden (Material zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Kai Schuh). Die Lysate von Wildtyp-Herzen und knockout Herzen wurden im pull-down Assay mit den jeweiligen GST-Konstrukten isoliert, um eine mögliche Interaktion von Proteinen in den Herzlysaten mit den jeweiligen GST-Konstrukten im Immunoblot nachzuweisen. In Abbildung 20 ist deutlich sichtbar, dass für SQSTM1, CathepsinD (CathD) und NBR1 keine Interaktion mit der Glutathion S-Transferase nachgewiesen werden kann. Es kann aber eine deutliche Interaktion von SPRED2 mit SQSTM1, CathD und NBR1 gezeigt werden. Die Ergebnisse aus den pull-down Assays mit dem GST-EVH1 Fusionsprotein legen weiterhin nahe, dass für die Interaktion von SPRED2 mit SQSTM1, CathD und NBR1 die EVH1-Domäne von SPRED2 ausreichend ist. Für Atg14, welches eine Komponente während der Initiation der Autophagie durch die Interaktion mit dem PtdIns-3 Kinase Komplex ist, kann weder eine Interaktion mit SPRED2, noch mit der EVH1-Domäne nachgewiesen werden.

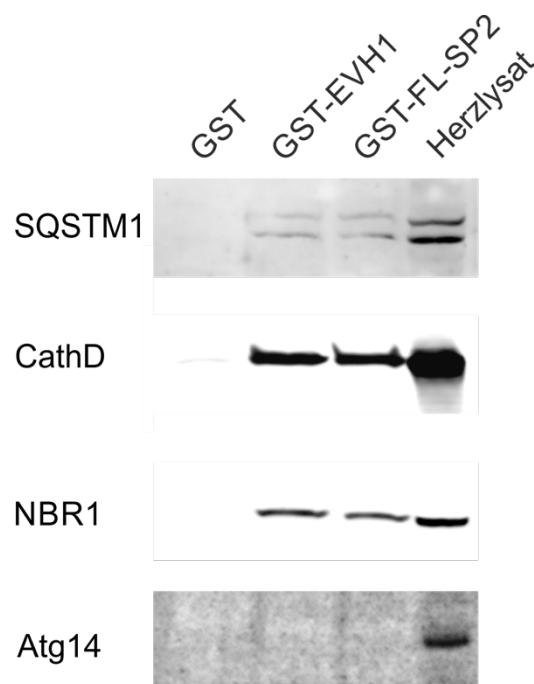


Abbildung 20 Der Pull-down Assay mit GST, GST-EVH1 und GST-FL-SPRED2 (*Glutathion S-Transferase full length SPRED2*). Im pull-down Assay ist eine Interaktion von SPRED2 mit SQSTM1, CathD und NBR1 erkennbar. Als Interaktionspartner für SQSTM1, CathD und NBR1 ist die EVH1-Domäne von SPRED2 ausreichend. Keine Interaktion mit der EVH1-Domäne oder SPRED2 in voller Länge im pull-down Assay ist für Atg14 erkennbar. SQSTM1, CathD, NBR1 und Atg14 sind in den Herzlysaten nachweisbar.

4.9 FRET-Analysen von SPRED2-eCFP und pmVenus-SQSTM1-N18

Um zu untersuchen, ob SPRED2 und SQSTM1 in vivo interagieren könnten, wurden HEK293-Zellen mit Plasmiden, welche für Fusionskonstrukte von SPRED2-eCFP und mVenus-SQSTM1 codieren, transfiziert und Mangelmedium ausgesetzt, um eine Induktion der Autophagie zu erwirken. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit eine induzierte Autophagie Auswirkungen auf die Interaktion von SPRED2 und SQSTM1 hat. Eine mögliche Interaktion durch ein positives FRET-Signal legt eine Interaktion der beiden Proteine nahe, da für den Resonanzenergietransfer eine räumliche Distanz von 1 – 10 nm nötig ist.

Abbildung 21A zeigt das SpectraViewer Diagramm (Thermo Fisher) für eCFP und YFP. Klar zu erkennen sind die überlappenden Spektralbereiche im Bereich von 500 nm, ohne die kein Resonanzenergietransfer möglich wäre. In dem hier vorliegenden Experiment zeigen die transfizierten HEK293 nach Subtraktion von Hintergrundsignal und *bleedthrough*-Signalen, also Emissionen von eCFP, die im YFP-Kanal (520 nm) detektiert werden, ein deutlich um ca. 44% verringertes FRET-Signal (Abbildung 21B) nach Induktion der Autophagie durch Hungerstress.

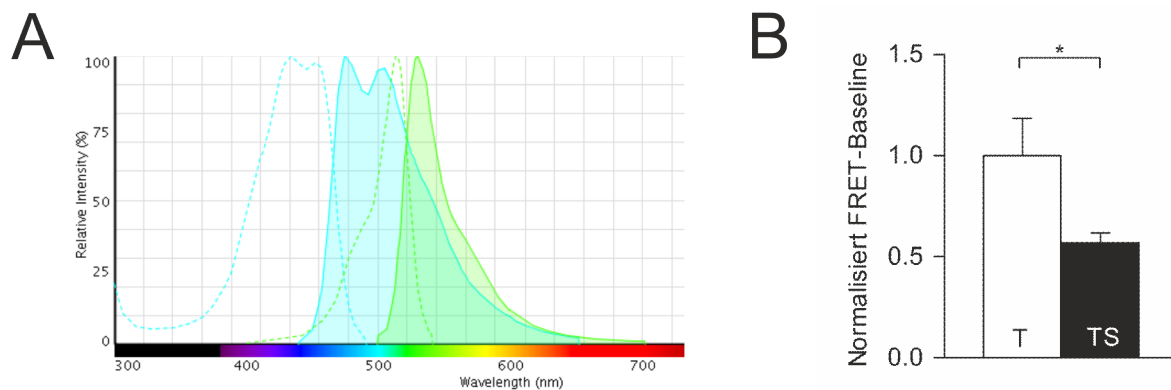


Abbildung 21 FRET-Interaktionsanalysen von SPRED2-eCFP und pmVenus-SQSTM1-N18.

A. Immissions- und Emissionsspektren von CFP (blau) und YFP (grün). Als Anregungswellenlänge wurden für die hier vorliegende Untersuchung 433 nm gewählt. Während der Emission von Energie durch angeregtes eCFP kommt es zur Exzitation von YFP bei einer Wellenlänge von 490 – 522 nm. Die Anregung von YFP wurde bei 540 nm gemessen. **B.** Die FRET-Baseline der transfizierten (T) und transfizierten und dem Hungermedium ausgesetzten HEK293 (TS) wurde auf die Baseline der transfizierten HEK293 normalisiert. Es ist zu erkennen, dass bei HEK293, welche dem Hungerstress als Autophagie-Induktor ausgesetzt waren, eine um ca. 44% verringertes FRET-Signal zeigen. n = 8 pro Gruppe, p < 0,05.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Phänotyp des bestehenden SPRED2 knockout Mausmodells auf die Fragestellung hin zu untersuchen, ob im Herzen betroffener Tiere der Mechanismus der gerichteten Proteindegradation eine Ursache der Herzhypertrophie sein könnte. Herzinsuffizienz und Herzversagen sind bedeutende kardiovaskuläre Erkrankungen in der klinischen Praxis.

Dieser Fragestellung gingen zunächst elektronenmikroskopische Aufnahmen (in Kooperation mit Dr. A. Unger) von betroffenen SPRED2^{-/-}-Kardiomyozyten voraus, welche die intrazelluläre Struktur der betroffenen Herzmuskelzellen initial dargestellt haben. In den betroffenen Zellen waren mehrere Auffälligkeiten zu entdecken. Zum einen ist eine gravierende Ansammlung von vakuolären Strukturen entlang der longitudinalen Anordnung der Mitochondrien sichtbar. Zum anderen tritt in bestimmten Bereichen der Herzmuskelzellen eine Akkumulation von Vesikeln auf. Innerhalb der Anordnung der Mitochondrien sind zum großen Teil intakte Mitochondrien zu erkennen, jedoch auch solche, die scheinbar gerade in der Degradation begriffen sind und solche, die bereits degradiert erscheinen (sichtbar als vakuoläre Strukturen ohne elektronendichtes Material). Auffällig ist die fast regelmäßige Anordnung dieser vakuolären Strukturen in der Nähe der Z-Scheiben der Sarkomere, die sich strukturell jedoch einwandfrei darstellen. Die strukturell normale erscheinenden Myofilamente sind hierbei insofern bemerkenswert, als dass *Saito et al.* gezeigt haben, dass bei menschlichen Patienten mit einer dilatativen Cardiomyopathie autophagische Vesikel nur in Cardiomyocyten akkumulieren, bei denen gleichzeitig eine Beeinträchtigung in der Struktur der Myofilamente auftritt [82]. In dem hier vorliegenden Phänotyp sind die Myofilamente jedoch unauffällig.

Die vakuolären Strukturen weisen eine umhüllende Membran auf, weshalb die Hypothese entstanden ist, ob die Ansammlung dieser vakuolären Strukturen auf einen durch die SPRED2-Defizienz verursachten, gestörten Transportprozess zurückzuführen ist - und falls dies der Fall ist, inwieweit der MAPK Inhibitor SPRED2 in Zusammenhang damit stehen kann.

Als Inbegriff der gerichteten Degradation von Proteinen und Zellorganellen im großen Maßstab gilt die selektive Makroautophagie. Während der Degradation von

Proteinen durch den Prozess der Autophagie werden zahlreiche Proteine und Proteinkomplexe aktiviert. Allein zur Autophagie gehören mindestens 30 sog. *autophagy-related genes* (Atgs). Diese Atgs regulieren den Ablauf der Autophagie, von der Initiation an der PAS bis hin zur Reifung des autophagosomalen Vesikels und zur Fusion mit Lysosomen zum Abbau des zellulären Materials. Neben den Atgs wirken jedoch eine Unzahl an weiteren Proteinen mit an der Initiation der Autophagie, bspw. der mTORC1 und mTORC2, deren Phosphorylierungsstatus die Aktivierung der Autophagie maßgeblich mitbestimmt. Ebenso die PtdIns-3 Kinase, welche direkte Wechselwirkungen mit Atg14 zu Beginn der Autophagie aufweist. Weiterhin sind für korrekte Degradation der Proteine die beiden Konjugationssysteme, LC3 / Atg8 und der Atg12-Atg5—Atg16-Komplex, maßgeblich an der korrekten Distribution von zum Abbau markierten Proteinen in der elongierenden Phagophore beteiligt. Ohne die korrekte Abstimmung mit einer weiteren Klasse, den Cargo-Rezeptoren wie SQSTM1 und NBR1, ist ebenfalls kein selektiver Proteinabbau durch die Autophagie möglich.

Um also die Beteiligung der an der Autophagie beteiligten Proteine näher zu untersuchen, wurden für eine Vielzahl der insgesamt 30 beteiligten Atgs Immunoblot-Analysen durchgeführt. Hierbei erschienen nicht alle Proteinmengen von einer Veränderung betroffen. Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass Beclin-1, welches zu Beginn der Autophagie zur Degradation beiträgt, keine Veränderung zeigt. Auch Atg5 und Atg12, die als Bestandteile des Atg12-Atg5—Atg16-Komplexes bei der Membranexpansion und der korrekten Lokalisation von LC3-II verantwortlich sind, von ihrer Expression nicht verändert sind. Beclin-1, Atg5 und Atg12 stehen repräsentativ für Autophagie-assoziierte Proteine, die sowohl zu Beginn der Autophagie, als auch während der Reifephase wichtige Aufgaben übernehmen. Es wurden außerdem Atg3, Atg10 und Atg14 auf Quantität getestet (Daten nicht gezeigt), jedoch konnte für all diese beteiligten Proteine keine Veränderung in Hinblick auf die Proteinmenge festgestellt werden.

Die Proteinmengen aus SPRED2 knockout Herzlysaten betreffend Atg4B, Atg7, der konjugierten Form von Atg8 (LC3-II) und Atg16L weichen jedoch deutlich und signifikant von den ermittelten Mengen im Wildtyp ab. Hierbei ist es wichtig zu betrachten, welche Atgs betroffen sind und wie sie über den zeitlichen Verlauf der Autophagie einzuordnen sind. Die Analyse der an der Autophagie beteiligten Proteine sollte außer der Quantifizierung im besten Falle auch noch eine Aussage darüber

zulassen, an welchem Punkt die gerichtete Degradation durch Autophagie durch die Spred2-Gendefizienz betroffen ist. Zu Beginn der Autophagie wirken von den untersuchten Proteinen, neben zahlreichen weiteren, Beclin-1 und Atg14. Diese sind in den hier vorliegenden Immunoblots allerdings nicht signifikant verändert. Diese Aussage ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen auf zellulärer Ebene. Es werden durch den autophagosomalen Proteinabbau Vesikel gebildet und es finden sich auch keine Hinweise darauf, dass die Initiation der Autophagie im SPRED2 knockout betroffen wäre.

Betrachtet man nun die analysierten Atgs, die eine Veränderung hinsichtlich ihrer Quantität aufweisen, so zeigt sich Atg4B um 38% signifikant verringert. Atg4B ist eine Cystein-Protease, die bei der Konjugation von LC3 / Atg8 eine entscheidende Rolle innehat. Atg4B spaltet zytoplasmatisches LC3 am C-Terminus und legt so bei LC3 einen entscheidenden Glycin-Rest (Gly140) frei. Es katalysiert des Weiteren einerseits die Konjugation von LC3 / Atg8, andererseits ist Atg4B auch verantwortlich für die Dekonjugation von bereits an das Phospholipid PE gebundenem LC3-II [83].

Die Proteinmenge des E1 aktivierenden Protein Homologs Atg7 ist um 46% reduziert. Atg7 wirkt als E1 aktivierendes Enzym sowohl bei der Spaltung von LC3 durch Atg4B, als auch bei der Aktivierung von Atg12, welches innerhalb des Atg12-Atg5—Atg16-Komplexes die korrekte Verteilung von LC3-II-gebundenem Atg3 übernimmt. Atg7 übernimmt also eine Schlüsselrolle innerhalb der Autophagie. Dafür spricht auch die dramatische Letalität von Atg7^{-/-} Mäusen direkt nach der Geburt aufgrund nicht funktioneller Autophagie [43].

Schließlich liefert die Quantifizierung von Atg16L eine reduzierte Proteinmenge im SPRED2 knockout um 38%. Atg16L ist die dimere Komponente des Atg12-Atg5—Atg16-Komplexes und essentiell für die Funktion des Komplexes Membranen zu binden. Atg16L ist sowohl funktionell entscheidend bei der Membranexpansion als auch bei der korrekten Verteilung von LC3 an das Phospholipid PE.

Die Akkumulation der autophagischen Vesikel zeigt sich sowohl in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen, als auch in der erhöhten Proteinmenge der Vesikel- und Lysosomenmarker, respektive SQSTM1, CathepsinD und NBR1. Die Reduktion der Schlüsselproteine Atg4B, Atg7 und Atg16L, sowie die reduzierte Autophagie-Rate könnten die Folge einer herunterregulierten Autophagie sein. Es ist anzunehmen, dass die Ansammlung der Vesikel zu einer Art Feedback-Regulierung

der Autophagie durch die Vesikelakkumulation führt. In der Tat gibt es Hinweise darauf, dass der Prozess der Autophagie durchaus in der Lage ist, Signale an vorangehende Stoffwechselkomponenten zu senden. So haben *Torres-Quiroz et al.* gezeigt, dass es eine direkte bidirektionale Interaktion zwischen Proteinen, welche die Autophagie regulieren und der Proteinkinase A (PKA) gibt, welche u.a. in der zellulären Homöostase wirkt [84]. In späteren Stadien der Autophagie wurde beschrieben, dass Lysosomen neben ihrer Aufgabe, den Inhalt der Autophagosomen zu degradieren, direkte regulative Auswirkungen auf die Initiation der Autophagie haben können [85]. Bei einem möglichen Feedback-regulativen Prozess scheint weiterhin SQSTM1 eine wichtige Rolle zu spielen. *Hayashi et al.* zeigen in ihren Studien mit auditorischen Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, dass SQSTM1 Signale an das Keap1-Nrf2-System weitergibt [86]. Der regulatorische Keap1-Nrf2 Signalweg übernimmt eine bestimmende Rolle dabei, die Zelle gegen oxidativen und xenobiotischen Stress zu schützen. Nrf2 wird in der Zelle kontinuierlich vom Cul3-Keap1 Ubiquitin E3 Ligase Komplex ubiquitinyliert und schnell über das UPS degradiert. Unter Stressbedingungen werden reaktive Cystein-Reste von Keap1 modifiziert, sodass es zu einer verringerten E3 Ligase Aktivität kommt und Nrf2 stabilisiert wird. In Folge kommt es zu einer Expression einer Vielzahl von cytoprotektiven Genen.

Die Analyse der beteiligten Proteine zeigt zusammenfassend, dass diejenigen Atgs und anderen Proteine, welche die Initiation der Autophagie steuern, im SPRED2-KO nicht signifikant verändert sind. Betrachtet man jedoch in der Phase der Membranexpansion die beteiligten Atgs, so ist auffällig, dass gerade die Atgs in ihrer Menge reduziert sind, die in einem funktionellen Zusammenhang mit LC3 / Atg8 stehen, sowohl, was die Konjugation von LC3 angeht, als auch hinsichtlich des Effekts auf die Membranexpansion und Membranfusion. Für die N-Termini von LC3 und seinem Ortholog GATE16 konnte gezeigt werden, dass die erste N-terminale α -Helix ausreichend ist, um die Membranfusion in der Autophagie positiv zu beeinflussen [87].

Ebenfalls von essentieller Bedeutung für die Fusion von autophagosomaler und lysosomaler Membran ist das *lysosome associated membrane protein 2*, LAMP2. Eine Depletion von LAMP2 verringert den Abbau autophagosomaler Vakuolen durch weniger effektive Fusion von Autophagosom und Lysosom, ist jedoch nicht ausreichend für eine Akkumulation von autophagosomalen Vakuolen [88]. Dies ist kongruent mit der Beobachtung im hier vorliegenden Phänotyp, bei dem die

Proteinmengen von LAMP2 im SPRED2 KO nicht signifikant im Vergleich zum Wildtyp verändert ist (Daten nicht gezeigt).

In fortgeschrittenen Stadien der Herzinsuffizienz ist die Produktion von ATP beeinträchtigt [89]. Stehen konventionelle Moleküle, wie z.B. Glucose für die Produktion von ATP nicht zur Verfügung, sind Cardiomyocyten, die einer O₂-Depletion ausgesetzt sind in der Lage Aspartat und Glutamat zu Succinat zu metabolisieren [90]. Eine Möglichkeit diese benötigten Aminosäuren für den Energiegewinn zu erlangen, ist die Degradation intrazellulärer Proteine durch Autophagie [91]. In Herzmuskelzellen konnte bereits sowohl im murinen Modell [92] als auch im menschlichen Patienten die Proteindegradation in Form der Autophagie und die Akkumulation von autophagischen Vesikeln nachgewiesen werden [93, 94]. *Kassiotis et al.* konnten zeigen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von Marker-Proteinen der Autophagie und der erhöhten linksventrikulären Belastung besteht [91]. Infolgedessen kam es bei den betroffenen Herzmuskelzellen zu einer erhöhten Autophagie. In dieser Studie waren Schlüsselproteine der Autophagie, wie Atg5 und Atg12, in vermehrt mechanisch belasteten Cardiomyocyten sowohl auf der Ebene der Genexpression, als auch die Proteinmengen selbst, signifikant erhöht. Zwar sind Atg5 und Atg12 im hier vorliegenden SPRED2-defizienten Phänotyp nicht signifikant verändert, es zeigt dennoch die Fähigkeit des Autophagie-Prozesses zur Adaption an mechanisch herausfordernde und komplexe Stoffwechselbelastungen in Cardiomyocyten. Der SPRED2-defiziente Phänotyp zeigt eine reduzierte Autophagie-Rate und reduzierte Proteinmengen von Schlüsselproteinen in der Membranexpansion. *Kassiotis et al.* zeigen, dass Herzen, deren Belastung durch Implantation eines Kunstherzens (*left ventricular assist device*, LVAD) verringert wird, eine Verringerung der Autophagie zeigen.

Auf die Frage, ob die Degradation von Proteinen durch die Autophagie einen positiven oder schädlichen Effekt auf das Überleben der Herzmuskelzellen hat, gibt es keine eindeutige Antwort. *Nakai et al.* konnten zeigen, dass eine gesteuerte Depletion des Proteins Atg5 in Herzmuskelzellen zu Hypertrophie, einer Vergrößerung des linken Ventrikels und kontraktile Dysfunktion im bereits entwickelten Mausherz führen kann, wohingegen die Depletion von Atg5 während der frühen Cardiogenese zunächst keinen Effekt zeigte, die Herzen der betroffenen Mäuse jedoch 7 Tage nach der Atg5-Depletion Rhythmusstörungen und linksventrikuläre Dilatation zeigten [95]. Dies zeigt,

dass die Autophagie in Herzmuskelzellen ein fein regulierter Prozess zur Homöostase darstellt, der je nach Lage des Stoffwechsels auf Veränderungen reagieren kann.

Betrachtet man die Mengen der verschiedenen Formen von LC3 / Atg8 im SPRED2-KO, so zeigt sich die zytoplasmatische Form von LC3 im KO verglichen mit dem Wildtyp nicht signifikant beeinflusst. Jedoch ist im SPRED2-KO die Menge an dem Konjugat LC3-II mit PE dramatisch um 73% verringert. Betrachtet man das Verhältnis zwischen unkonjugiertem LC3-I und konjugiertem LC3-II, so ergibt der reduzierte Konjugationsstatus von LC3-II / LC3-I eine um 54% verringerte Autophagie-Rate im SPRED2-KO. Da die normalisierte Menge von LC3-I zwischen Wildtyp und KO nicht signifikant verändert ist, ergibt sich die Änderung der Autophagie-Rate aus der verringerten Menge an LC3-II. Im SPRED2-KO liegt also eine Reduzierung der Konjugation von LC3-I an PE vor. Diese Konjugation wird katalysiert von Atg4B und Atg7, beides an der Autophagie beteiligte Proteine, die im SPRED2-KO ebenfalls reduziert sind. Dies lässt den Schluss zu, dass zwischen der verringerten Menge an Atg4B und Atg7 und dem reduzierten Konjugationsstatus von LC3 ein Zusammenhang besteht. *Jiang et al.* haben bereits gezeigt, dass eine Interaktion von SPRED2 und LC3 in diversen Zelllinien vorliegt und dass diese Interaktion durch die Bindung eines LIR-Motivs innerhalb der Sprouty-Domäne von SPRED-Proteinen vermittelt wird [96]. Die reduzierte Autophagie-Rate im SPRED2-KO könnte dadurch erklärbar sein, dass die Depletion von SPRED2 einen direkten Effekt auf diejenigen Protein-Interaktionen hat, die abhängig sind von einer Bindung von SPRED2 an LC3 durch die Sprouty-Domäne und infolgedessen eine gestörte Membranfusion vorliegen könnte. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit diesbezüglich kein mechanistischer Nachweis hierzu erbracht.

Der SPRED2-KO Herzphänotyp zeigt in Immunhistologischen Färbungen nach Analyse mit dem Fibrosemarker Collagen eine erhebliche kardiale Fibrosierung (Daten nicht gezeigt). Myokardiale Fibrosierung ist eine reaktive Akkumulation von Bindegewebe im interstitiellen Raum des Myokardiums, um den Verlust von Herzmuskelzellen auszugleichen.

Um die Apoptose im SPRED2-KO näher zu betrachten und um eine statistische Relevanz durch einen quantifizierbaren Ansatz zu erhalten, wurde ein Immunoblot für die inaktive und aktive Form der Caspase-3 gewählt. Caspasen bezeichnen eine Familie von Proteinen, die eine kaskadische Aktivierung der Apoptose einleiten und

ausführen. Hierbei werden initial Caspase-8 und Caspase-9 aktiviert, die wiederum nachgeschaltete Caspasen (Cas-3, Cas-6, Cas-7) spalten und aktivieren [97]. In dieser Caspase-abhängigen Apoptose werden intrazelluläre Proteine, wie Actin und Lamin, gespalten und die DNA an den interhistonischen Sequenzen geschnitten.

Im SPRED2-KO liegt eine dramatisch erhöhte Caspase-3 Aktivität vor. Im Vergleich zum Wildtyp liegt diese bei 290%. Die Fibrosierung des Herzgewebes könnte also die Folge einer erhöhten Apoptose der Herzmuskelzellen sein. *Kassiotis et al.* [91] haben in mechanisch belasteten Cardiomyocyten ebenfalls eine erhöhte Aktivität der aktivierten Caspase-3 festgestellt. Die Frage nach der Ursache der erhöhten Apoptose könnte in der gestörten Autophagie liegen. Die Autophagie ist ein Prozess der einen bedeutenden Einfluss auf die zelluläre Homöostase ausübt. Fehlregulationen innerhalb dieses Prozesses können zu einem beeinträchtigten Zellüberleben und infolgedessen zu vermehrter Apoptose und letztlich zur kardialen Fibrosierung führen. In der Tat stellt der auf den ersten Blick nicht intuitive Zusammenhang zwischen dem programmierten Zelltod und einem Prozess zur Homöostase und damit dem Erhalt der Zelle durch gerichtete Proteindegradation eine paradoxe Situation dar. Jedoch geht dem programmierten Zelltod oftmals das Vorkommen autophagischer Vesikel voraus. *Gonzalez-Polo et al.* konnten zeigen, dass eine vermehrte Apoptose und die inhibierte Fusion von Autophagosomen und Lysosomen hierbei in Zusammenhang stehen [88]. Die Autophagie ist aber ebenso in der Lage, den apoptotischen Zerfall der Zelle hinauszuzögern, wie *Abedin et al.* zeigen konnten [98]. Eine erhöhte Apoptose in Form von vermehrt aktiver Caspase-3 könnte demnach auch die Folge einer weniger effektiven Autophagie und dementsprechend größerem Nährstoffmangel sein.

Um die Ursache der vermehrten Apoptose zu untersuchen, wurde im Hinblick auf die Akkumulationen von Vesikeln innerhalb der longitudinalen mitochondrialen Anordnung innerhalb der Herzmuskelzellen durch die Analyse der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) versucht, Rückschlüsse auf die mitochondriale Integrität zu ziehen. *Kaminsky et al.* konnten zeigen, dass eine vermehrte oder verringerte Konzentration an ROS einen deutlichen Effekt auf die Assoziation von Autophagie und Apoptose hat [99]. Niedrige Konzentrationen von ROS führen unter anderem zur Modifikation von Atg4B, AMP-aktivierten Protein Kinasen und c-Jun N-terminalen Kinasen, die für die Signaltransduktion verantwortlich sind, was zu einer vermehrten Autophagie und reduzierten Apoptose führt. c-Jun N-terminale Kinasen

phosphorylieren N-terminale Aminosäurereste von c-Jun, einem onkogenen Transkriptionsfaktor, der an Zellzykluskontrolle und Apoptose beteiligt ist. Die hier vorliegenden Analysen der betroffenen Atgs und die reduzierte Autophagie-Rate legten jedoch keine vermehrte Autophagie und reduzierte Apoptose nahe, vielmehr wurde bei der ROS-Analyse erwartet, dass aufgrund der verringerten Autophagie-Rate und der Lokalisation der Vesikel innerhalb der Mitochondrien vermehrt reaktive Sauerstoffspezies entstehen. ROS sind ein aussagekräftiger Indikator für die mitochondriale Integrität [100] und in dem hier vorliegenden SPRED2-KO ergaben die Messungen der reaktiven Spezies, wie H₂O₂, RNS und Superoxiden, dass im Vergleich zum Wildtyp der knockout eine um 38% erhöhte Konzentration von reaktiven Spezies aufweist. Diese Beobachtung ist im Einklang zu der verringerten Autophagie und der Vermutung, dass die Integrität der Mitochondrien in den SPRED2-KO Herzmuskelzellen beeinträchtigt sein könnte. In klinischen Fällen, in denen eine dilatative Cardiomyopathie vorliegt, kommt es zu strukturellen Anomalitäten der Mitochondrien [82]. *Saito et al.* haben in derselben Studie zeigen können, dass mitochondriale Anomalitäten, wie bspw. mitochondriale Hyperplasie, mit dem Auftreten von autophagischen Vesikeln direkt assoziiert sind. Hierbei waren autophagische Vesikel nur geringfügig für interzelluläre Fibrosierung des linksventrikulären Herzgewebes verantwortlich, jedoch für eine Vielzahl der mitochondrialen Anomalitäten in linksventrikulären Cardiomyocyten. Die mitochondrialen Veränderungen im SPRED2-defizienten Phänotyp können also durchaus durch Veränderungen im Überleben oder der funktionellen Integrität der Mitochondrien begründet liegen.

Um jedoch eine genauere Aussage über den Einfluss der Mitochondrien auf den hier vorliegenden Phänotyp treffen zu können, sind weitere Experimente, wie bspw. Analysen der mitochondrialen Masse oder Aussagen über die Fusions- und Teilungsdynamik dieser hochdynamischen Zellorganellen angebracht.

Um die Akkumulation von vesikulären Strukturen zu erklären, sollte die Hypothese überprüft werden, ob Transportprozesse der Vesikel betroffen sein könnten. Hierbei übernehmen die ATP-abhängigen Motorproteine Kinesin und Dynein eine wesentliche Rolle. Um die Rolle von SPRED2 während des Vesikeltransports zu untersuchen und zu sehen, ob SPRED2 überhaupt an diesem zellulären Transportprozess einzuordnen ist, wurden zunächst aus SPRED2-KO und Wildtyp-Gehirnen Vesikelpräparationen

durchgeführt. Das Gehirn der SPRED2-KO Mäuse wurde hierbei gewählt, da das Gehirn aufgrund der hohen Anzahl an Vesikeln in den Neuronen und anderen Zellen eine ausreichend hohe Ausbeute an präparierten Vesikeln verspricht. Die aus der sequentiellen Zentrifugation und Ultrazentrifugation gewonnenen Membranpräparationen wurden für die Analyse im Immunoblot genutzt, um die Frage zu klären, ob sich SPRED2 sowie die Autophagie-assoziierten Cargo-Rezeptoren SQSTM1 und NBR1 in Vesikeln wiederfinden. Sowohl SPRED2, als auch die Cargo-Rezeptoren sind in den Vesikelpräparationen vorhanden.

Um die Fragestellung nach dem Einfluss von SPRED2 auf den Vesikeltransport zu beantworten, wurden ATP-abhängige Motor Protein Assays durchgeführt. Diese Assays ermöglichen die Quantifizierung des ATP-Umsatzes durch Kinesine und Dyneine an Microtubuli-Präparaten. Die Vesikelpräparationen wurden in diese Assays eingebracht, um den Effekt von SPRED2 und den Effekt einer Depletion von SPRED2 auf den ATP-Umsatz, der direkte Rückschlüsse auf den Transportprozess durch Kinesin und Dynein zulässt, zu beobachten.

Hinsichtlich des ATP-Umsatzes durch die Kinesin-ATPase ist im Vergleich von Wildtyp und knockout kein signifikanter Unterschied zu erkennen. In der Quantifizierung im Assay mit der Dynein-ATPase jedoch ist eine dramatische Reduktion des ATP-Umsatzes zu erkennen: im Vergleich zum Wildtyp ist der ATP-Umsatz um ca. 60% reduziert.

Diese Beobachtung und die Akkumulation der Vesikel in der elektronenmikroskopischen Aufnahme lässt den Schluss zu, dass der Transport der Vesikel unter der Depletion von SPRED2 gestört sein könnte. Dafür sprechen ebenfalls die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gehirn-Schnitten aus SPRED2-defizienten Mäusen. In den distalen Enden des Axons kommt es in den betroffenen Neuronen ebenfalls zu einer Ansammlung von Vesikeln. Dynein-ATPasen katalysieren den retrograden Transport von Vesikeln entlang der Microtubuli [101]. Ist dieser retrograde Transport beeinflusst, kommt es zu einem verringerten ATP-Umsatz und infolgedessen zu einem weniger effektiven Transport der Vesikel. In den im SPRED2-KO betroffenen Herzmuskelzellen könnte eben dieser gestörte Transportprozess maßgeblich zu der Akkumulation der Vesikel in den longitudinalen Reihen der Mitochondrien und an anderen intrazellulären Orten beteiligt sein. Der in dieser Arbeit vorgestellte Zusammenhang zwischen SPRED2 und der Aktivität der Dynein-ATPase stellt einen neuartigen Zusammenhang dar, der einen

vielversprechenden Ansatz sowohl für die Erforschung der Autophagie, als auch der mechanistischen Funktion der Motorproteine darstellt. So könnte eine verbesserte Aktivität der Dynein-ATPase die autophagische Vesikelakkumulation in den distalen axonalen Enden von Neuronen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer, reduzieren [102]. Dass SPRED2-defiziente Mäuse die neuropathologischen Voraussetzungen für Erkrankungen wie Demenz und Zwangsstörungen besitzen, konnte durch *Ullrich et al.* eindrucksvoll gezeigt werden [14, 103].

Als nächstes ergab sich die Frage, wie der MAPK Inhibitor SPRED2 in den Transportprozess und die veränderte Autophagie einzuordnen ist. SPRED2 interagiert über seine EVH1-Domäne mit zahlreichen weiteren Protein-Interaktionsmodulen. Eine dieser Interaktionsdomänen ist die Phox/Bem1-Domäne, die in den Cargo-Rezeptoren SQSTM1 und NBR1 vorhanden ist. In den Immunoblots mit den Vesikelpräparationen kann man im Wildtyp deutlich das Vorhandensein von SQSTM1 und NBR1 erkennen, im knockout hingegen sind SQSTM1 und NBR1 deutlich reduziert, bis gar nicht messbar. Da diese beiden die Interaktionsdomäne PB1 in ihrer Domänenstruktur aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass diese Proteine mit SPRED2 interagieren können. SQSTM1 ist ein Vesikel-assoziiertes Protein. Es ist denkbar, dass der Einfluss von SPRED2 auf den Vesikeltransport und die Aktivität der Dynein-ATPase mit der PB1-Domäne von SQSTM1 und auch NBR1 in Zusammenhang steht. SPRED2 könnte durch die Interaktion mit SQSTM1 den Proteinkomplex, der für den Vesikeltransport zuständig ist, stabilisieren. Auch könnte das durch *Jiang et al.* [96] beschriebene LIR-Motiv innerhalb der Sprouty Domäne von SPRED2 eine Assoziation an Microtubuli positiv beeinflussen.

Um diese Hypothese zu stützen, wurden pull-down Assays mit den bakteriell exprimierten Fusionskonstrukten GST (Glutathion S-Transferase), GST-EVH1 und GST-FL-SPRED2 durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, dass sowohl für SQSTM1 als auch für NBR1 *in vitro* eine Interaktion mit SPRED2 nachgewiesen werden kann. In dem Immunoblot mit dem GST-EVH1 Fusionsprotein ist zudem ersichtlich, dass die EVH1-Domäne von SPRED2 für die Interaktion ausreichend ist. Somit lässt die Hypothese, dass SPRED2 mit den Autophagie-assoziierten Cargo-Rezeptoren SQSTM1 und NBR1 interagiert, den Schluss zu, dass SPRED2 durch die Interaktion mit SQSTM1 oder NBR1 oder SQSTM1 und NBR1 mit dem Vesikeltransport zumindest *in vitro* zu assoziieren ist. Diese Hypothese wird durch die Erkenntnisse der

FRET-Experimente mit SPRED2-eCFP und mVenus-SQSTM1 unterstützt. Stellt der pull-down eine artifizielle Umgebung für die Interaktion von SPRED2 und SQSTM1 dar, zeigt die *in vivo* Analyse durch die Fusionsproteine, dass die Interaktion von SPRED2 und SQSTM1 zumindest *in vivo* nicht auszuschließen ist. Jedoch ist bei der Interpretation der FRET-Analysen noch immer Vorsicht geboten. Zwar ist eine Interaktion von SPRED2 und SQSTM1 aufgrund der Ergebnisse nicht auszuschließen, es ist jedoch nicht geklärt, aus welchem Grund in Zellen, die Hungerstress ausgesetzt waren, eine verminderte Interaktion von SPRED2 und SQSTM1 zeigen. Möglich wäre, dass in hungernden Zellen die Expression des Akzeptors, mVenus-SQSTM1, reduziert ist. Ebenfalls möglich wäre, dass Donor, SPRED2-eCFP, und Akzeptor, mVenus-SQSTM1, nicht gleich stark exprimiert wurden. Um genauere Erkenntnisse über die Interaktion der beiden Konstrukte zu erlangen, ist ein Akzeptor-Photobleaching Experiment nötig, bei dem während der FRET-Messung nach der Etablierung der Baseline der Akzeptor mVenus-SQSTM1 vollständigem Photobleaching unterzogen wird. Käme es danach wieder zu einem FRET-Signal, wäre gesichert anzunehmen, dass eine Interaktion von SPRED2 und SQSTM1 auch *in vivo* stattfindet. Eine Interaktion von SQSTM1 und NBR1, vermittelt durch die PB1-Domäne, konnte bereits gezeigt werden [104]. Da die PB1-Domäne in SQSTM1 als auch NBR1 als Interaktionsdomäne vorhanden ist und an EVH1 binden kann, ist anzunehmen, dass eine Interaktion von SPRED2 und SQSTM1 wahrscheinlich ist.

Um die Bedeutung der Vesikelakkumulation weiter zu beleuchten, wurde ein Immunoblot für den *vesicle* SNARE VTI1b durchgeführt. VTI1b steht für *vesicle transport through interaction with t-SNARE homolog 1B*. VTI1b ist intrazellulär hauptsächlich an Endosomen und der tubulären Zellarchitektur, wie Microtubuli, lokalisiert [105]. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die Vesikelakkumulation durch den SPRED2-KO eine Anreicherung des Autophagie-regulierenden vesicle SNARE VTI1b hervorruft. Neben anderen vermitteln VTI1b und das *vesicle associated membrane protein 8* (VAMP8) die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen [106]. VAMP8 ist ein Mitglied der VAMP / Synaptobrevin-Familie und ist verantwortlich bei der Fusion von intrazellulären Vesikeln mit der präsynaptischen Membran. Der Immunoblot für VAMP8 zeigte im KO keine signifikante Änderung gegenüber dem Wildtyp. VTI1b jedoch zeigt sich im KO auf 176% erhöht. VTI1b bildet bei der Membranfusion einen SNARE-Komplex mit diversen Syntaxinen, unter anderen

Syntaxin 6, Syntaxin 7 und Syntaxin 17. Syntaxine bezeichnen eine Proteinfamilie von vesikulären Transportrezeptoren, die C-terminal in der Membran verankert sind [107]. Hinsichtlich Syntaxin 17 konnte jedoch keine Veränderung im SPRED2-KO festgestellt werden. Daher ergibt sich, insbesondere im Hinblick auf die verringerte Autophagie und verminderte Fähigkeit von Membranen zu fusionieren, die Hypothese, dass die Membranfusion von vesikulärer und Zielmembran der Endosomen, bzw. Lysosomen, derart gestört ist, dass die erhöhte Menge an VTI1b die Anreicherung von Lysosomen, Endosomen und Autophagosomen widerspiegelt.

Um diese Hypothese zu verifizieren, lag es nahe, das Herzgewebe in einer histologischen Antikörperfärbung auf SQSTM1- und CathepsinD-positive Vesikel zu überprüfen. Die Aspartyl-Protease CathepsinD ist gemeinhin in Lysosomen lokalisiert und dient als Marker-Protein für Lysosomen.

In der histologischen Betrachtung des Herzgewebes ist auffällig, dass im SPRED2 KO beträchtlich mehr SQSTM1-positive Vesikel zu finden sind, als im Wildtyp. Dies ist kongruent zu der Beobachtung in den korrespondierenden Immunoblots für SQSTM1 aus Gesamtherzlysaten, in denen SQSTM1 deutlich vermehrt vorhanden ist. In den histologischen Aufnahmen ist weiterhin zu erkennen, dass die SQSTM1-positiven Vesikel eine granuläre Struktur aufweisen, was darin zu begründen ist, dass SQSTM1, sobald die Proteindegradation, bspw. durch verringerten Abbau der Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), als auch bei verringerter Autophagie, gestört ist, sowohl in seiner löslichen Form, als auch seiner unlöslichen Form granulär in Vesikeln akkumuliert [108].

Bei der histologischen Antikörperfärbung gegen CathepsinD sind bereits im Wildtyp eine erkennbare Anzahl an CathD-positiven Vesikeln zu erkennen, die vermutlich während der normalen zellulären Homöostase vorhanden sind. In SPRED2 defizienten Zellen hingegen sind vermehrt CathD-positive Vesikel zu erkennen. CathepsinD ist ein Marker für Lysosomen. Im Hinblick auf den korrespondierenden Immunoblot, in dem CathepsinD um 127% erhöht vorliegt, ist die Beobachtung im Einklang mit der Erhöhung die bereits für VTI1b zu erkennen ist, welches vornehmlich an Endosomen und tubulären Strukturen auftritt. Die Erhöhung von SQSTM1, CathepsinD und VTI1b können also als Symptome einer ursächlichen SPRED2 Depletion interpretiert werden, die initial eine verringerte Fähigkeit zur Membranfusion verursacht. *Tannous et al.* haben gezeigt, dass auch eine intrazelluläre Akkumulation

von Proteinen ein Auslöser für myocardiale Autophagie darstellen kann [109]. Es ist also außerdem denkbar, dass die Akkumulation von Proteinen zur Akkumulation von Autophagiemarker-positiven Vesikeln beiträgt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das *Sprouty-related, EVH1 domain containing protein 2* (SPRED2) ist ein inhibitorisches, downstream von Ras wirkendes Protein des MAP-Kinase Signalwegs, welches entscheidenden Einfluss auf die Regulation von Proliferation, Expression von Proteinen und der zellulären Homöostase hat. Der kardiale Phänotyp von SPRED2-defizienten Mäusen zeigt nicht nur eine deutliche linksventrikuläre Hypertrophie, sondern auch eine erhöhte Fibrosierung des Herzgewebes. Zellulär wird die SPRED2-Defizienz durch die Akkumulation von vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle, sowie eine markant erhöhte Anzahl von Vesikeln entlang der longitudinalen Reihen der Mitochondrien gekennzeichnet.

Ziel dieser Arbeit war es, den Charakter dieser vesikulären Strukturen näher zu beleuchten und festzustellen, in welchem Zusammenhang die subzellulär veränderte Architektur mit der Hypertrophie der SPRED2-defizienten Tiere steht. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde zunächst nach einem vesikulären Degradationsmechanismus gesucht, der in SPRED2^{-/-}-Cardiomyocyten betroffen sein könnte. Die Macroautophagie, im folgenden Autophagie bezeichnet, ist ein solcher Degradationsmechanismus, bei dem selektiv langlebige Proteine und Zellorganellen abgebaut werden. Es konnten signifikante Veränderung der Protein-Level an Schlüsselpositionen der Autophagie identifiziert werden. Das Ubiquitin-aktivierende (E1) Enzym Homolog Atg7 sowie die Cystein-Protease Atg4B zeigen sich im SPRED2-KO deutlich reduziert. Ebenso Atg16L, das als essentieller Bestandteil des Atg5-Atg12-Atg16-Konjugationssystems bei der Konjugation von MAPLC3-II an das Phospholipid Phosphatidylethanolamin beteiligt ist. Die Autophagie-Rate als Verhältnis von konjugiertem zu unkonjugiertem MAPLC3 ist ebenfalls reduziert. Die Akkumulation der autophagischen Vesikel zeigt sich kongruent zu dem erhöhten Protein-Level der autophagischen Cargo-Rezeptoren SQSTM1 und NBR1, sowie des lysosomalen Markers CathepsinD. Außer der verringerten Autophagie-Rate zeigt sich in Einklang mit der Fibrosierung des Herzgewebes eine erhöht aktive Caspase-3 als Marker für Apoptose. Um die mitochondriale Integrität näher zu beleuchten, wurde die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Wildtyp und SPRED2-KO untersucht. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Menge an ROS im KO, was ein Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Mitochondrien darstellt.

Letztlich wurde die Hypothese überprüft, ob ein gestörter Transport der Vesikel durch eine Beeinträchtigung der Motorproteine Dynein und Kinesin vorliegt. In der Tat zeigte sich die Aktivität der Dynein-ATPase verringert in der Abwesenheit von SPRED2. Diese Beobachtung wird durch die erhöhten Mengen des vSNARE-Proteins VT11b unterstützt, was letztlich die Akkumulation der autophagischen Vesikel mit einer verringerten Fähigkeit zur Membranfusion und dem ineffizienteren Transport der Vesikel in Einklang bringt.

Da die gesamten Experimente in einem globalen SPRED2-KO System durchgeführt wurden, können eventuelle Auswirkungen der beeinflussten hormonellen Situation der SPRED2-KO Tiere auf den Herzphänotyp nicht final ausgeschlossen werden. Um die genaue Wirkung einer SPRED2-Defizienz auf das Herzgewebe und das Herz als Organ zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine SPRED2-defiziente knockout Mauslinie mit konditionalem Potential generiert, die eine gesteuerte Deletion von SPRED2 im Herzgewebe erlaubt.

The *Sprouty-related, EVH1 domain containing protein 2* (SPRED2) is a MAP kinase signaling inhibitor working downstream of Ras. It has a critical influence on regulating proliferation, differentiation, expression of proteins and cellular hemostasis. The cardiac phenotype of SPRED2 deficient mice not only shows a significant left ventricular hypertrophy but also a heightened fibrosis of the heart tissue. On the cellular level the SPRED2 deficiency is marked by an accumulation of ventricular structures within the cell, as well as a decisive number of vesicles along the longitudinal rows of mitochondria.

The aim of this work was to elucidate the properties of these vesicular structures and to determine in which context the subcellularly modified architecture and the hypertrophy of the SPRED2 deficient animals stand to each other. To answer this question, a protein degradation mechanism that could be changed within the SPRED2 deficient cardiomyocytes was identified. Macroautophagy, further called autophagy, is such a degradation mechanism, which degrades long-lived proteins and cell organelles. This work identified significant changes made to the protein level of key regulators of autophagy. The ubiquitin-activating (E1) enzyme homolog Atg7 as well as the cysteine protease Atg4B are reduced in the SPRED2 KO. Similarly, Atg16L, which acts as an essential part of the Atg5-Atg12-Atg16 conjugation system in the

process of conjugating MAPLC3 to the phospholipid phosphatidylethanolamine. The autophagic flux, as the relation between conjugated and unconjugated MAPLC3, is reduced in the knockout as well. The accumulation of autophagic vesicles is in accordance with the elevated protein levels of the cargo receptors SQSTM1 and NBR1 as well as the lysosomal marker CathepsinD. Besides the reduced autophagic flux there is an elevated protein level of activated caspase-3 as a marker of apoptosis. To further elucidate the mitochondrial integrity, the endogenous levels of reactive oxygen species were determined in wildtype and knockout individuals. It was shown that the SPRED2 knockout contains an elevated level of ROS which could be a sign of reduced mitochondrial survival.

Finally, it was investigated whether the disturbed transport of vesicles was due to impaired motor protein efficiency. It was shown that the activity of the dynein ATPase was reduced when SPRED2 was absent. This observation is supported by the elevated levels of the vSNARE protein VTI1b, which connects the accumulation of autophagic vesicles with the reduced ability to membrane fusion and a less efficient transport of vesicles.

The experiments of this work were conducted in a global SPRED2-KO system. Possible effects of the changed hormonal situation of the SPRED2 deficient animals to the heart phenotype cannot be excluded. For that reason a conditional SPRED2 knockout mouse line with conditional potential was created capable of further elucidating the effect of a SPRED2 deficiency to the heart.

7 Literaturverzeichnis

1. Ball, L.J., et al., *EVH1 domains: structure, function and interactions*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 45-52.
2. Haffner, C., et al., *Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP*. EMBO J, 1995. **14**(1): p. 19-27.
3. Krause, M., et al., *The Ena/VASP enigma*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 24): p. 4721-6.
4. Kato, R., et al., *Molecular cloning of mammalian SPRED-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **302**(4): p. 767-772.
5. Edwin, F., et al., *Intermolecular interactions of Sprouty proteins and their implications in development and disease*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(4): p. 679-91.
6. Hacohen, N., et al., *sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways*. Cell, 1998. **92**(2): p. 253-63.
7. de Maximy, A.A., et al., *Cloning and expression pattern of a mouse homologue of drosophila sprouty in the mouse embryo*. Mech Dev, 1999. **81**(1-2): p. 213-6.
8. Chambers, D. and I. Mason, *Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling*. Mech Dev, 2000. **91**(1-2): p. 361-4.
9. Minowada, G., et al., *Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed*. Development, 1999. **126**(20): p. 4465-75.
10. Tefft, J.D., et al., *Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of Drosophila sprouty, which negatively modulates respiratory organogenesis*. Curr Biol, 1999. **9**(4): p. 219-22.
11. Wakioka, T., et al., *SPRED is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling*. Nature, 2001. **412**(6847): p. 647-651.
12. Bundschu, K., et al., *Tissue-specific SPRED-2 promoter activity characterized by a gene trap approach*. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(3): p. 247-55.
13. Skarnes, W.C., et al., *A public gene trap resource for mouse functional genomics*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 543-4.
14. Ullrich, M., et al., *OCD-like behavior is caused by dysfunction of thalamo-amygdala circuits and upregulated TrkB/ERK-MAPK signaling as a result of SPRED2 deficiency*. Mol Psychiatry, 2017.
15. Wheeler, D.L., M. Iida, and E.F. Dunn, *The role of Src in solid tumors*. Oncologist, 2009. **14**(7): p. 667-78.
16. Lowenstein, E.J., et al., *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 431-42.
17. Koytiger, G., et al., *Phosphotyrosine signaling proteins that drive oncogenesis tend to be highly interconnected*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(5): p. 1204-13.
18. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
19. Wirawan, E., et al., *Autophagy: for better or for worse*. Cell Res, 2012. **22**(1): p. 43-61.
20. Lapierre, L.R., et al., *Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging*. Autophagy, 2015. **11**(6): p. 867-80.
21. Gump, J.M. and A. Thorburn, *Autophagy and apoptosis: what is the connection?* Trends Cell Biol, 2011. **21**(7): p. 387-92.
22. Cai, Y., et al., *Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders*. Autophagy, 2016. **12**(2): p. 225-44.
23. Rubinsztein, D.C., C.F. Bento, and V. Deretic, *Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases*. J Exp Med, 2015. **212**(7): p. 979-90.
24. Vidal, R.L., et al., *Targeting autophagy in neurodegenerative diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2014. **35**(11): p. 583-91.
25. Klionsky, D.J., E.L. Eskelinen, and V. Deretic, *Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused*. Autophagy, 2014. **10**(4): p. 549-51.
26. Schreiber, A. and M. Peter, *Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 163-81.
27. Ohsumi, Y., *Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 211-6.

28. Li, W.W., J. Li, and J.K. Bao, *Microautophagy: lesser-known self-eating*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(7): p. 1125-36.
29. Sanchez-Wandelmer, J., N.T. Ktistakis, and F. Reggiori, *ERES: sites for autophagosome biogenesis and maturation?* J Cell Sci, 2015. **128**(2): p. 185-92.
30. Hamasaki, M., S.T. Shibutani, and T. Yoshimori, *Up-to-date membrane biogenesis in the autophagosome formation*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(4): p. 455-60.
31. Ge, L. and R. Schekman, *The ER-Golgi intermediate compartment feeds the phagophore membrane*. Autophagy, 2014. **10**(1): p. 170-2.
32. Geng, J., et al., *Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(13): p. 2257-69.
33. Rinaldi, F.C., M. Packer, and R. Collins, *New insights into the molecular mechanism of the Rab GTPase Sec4p activation*. BMC Struct Biol, 2015. **15**: p. 14.
34. de Duve, D., *The peroxisome: a new cytoplasmic organelle*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1969. **173**(1030): p. 71-83.
35. Takeshige, K., et al., *Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction*. J Cell Biol, 1992. **119**(2): p. 301-11.
36. Kametaka, S., et al., *Structural and functional analyses of APG5, a gene involved in autophagy in yeast*. Gene, 1996. **178**(1-2): p. 139-43.
37. Mizushima, N., T. Noda, and Y. Ohsumi, *Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway*. EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3888-96.
38. Mizushima, N., *The role of the Atg1/ULK complex in autophagy regulation*. Opinion in Cell Biology, 2010(22): p. 132-9.
39. Hochstrasser, M., *Origin and function of ubiquitin-like proteins*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 422-9.
40. Sugawara, K., et al., *The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of Saccharomyces cerevisiae Atg8*. Genes Cells, 2004. **9**(7): p. 611-8.
41. Suzuki, N.N., et al., *The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy*. Autophagy, 2005. **1**(2): p. 119-26.
42. Mizushima, N., et al., *In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1101-11.
43. Komatsu, M., et al., *Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice*. J Cell Biol, 2005. **169**(3): p. 425-34.
44. Tanida, I., et al., *The human homolog of Saccharomyces cerevisiae Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1701-6.
45. Rouschop, K.M., et al., *The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 127-41.
46. Mizushima, N., et al., *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 657-68.
47. Klionsky, D.J., et al., *A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition)*. Autophagy, 2011. **7**(11): p. 1273-94.
48. Stephan, J.S., et al., *The Tor and cAMP-dependent protein kinase signaling pathways coordinately control autophagy in Saccharomyces cerevisiae*. Autophagy, 2010. **6**(2): p. 294-5.
49. Wong, P.M., et al., *The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation*. Autophagy, 2013. **9**(2): p. 124-37.
50. Diao, J., et al., *ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes*. Nature, 2015. **520**(7548): p. 563-6.
51. Fan, W., A. Nassiri, and Q. Zhong, *Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(19): p. 7769-74.
52. Bernard, A. and D.J. Klionsky, *Toward an understanding of autophagosome-lysosome fusion: The unsuspected role of ATG14*. Autophagy, 2015. **11**(4): p. 583-4.
53. Liu, R., X. Zhi, and Q. Zhong, *ATG14 controls SNARE-mediated autophagosome fusion with a lysosome*. Autophagy, 2015. **11**(5): p. 847-9.
54. Hamasaki, M., et al., *Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 389-93.
55. Boyle, K.B. and F. Randow, *The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(3): p. 339-48.

56. Xie, X., et al., *Molecular basis of ubiquitin recognition by the autophagy receptor CALCOCO2*. *Autophagy*, 2015. **11**(10): p. 1775-89.
57. Kabeya, Y., et al., *LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 13): p. 2805-12.
58. Ichimura, Y., et al., *In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(39): p. 40584-92.
59. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. *Autophagy*, 2016. **12**(1): p. 1-222.
60. Ichimura, Y., et al., *A ubiquitin-like system mediates protein lipidation*. *Nature*, 2000. **408**(6811): p. 488-92.
61. Geng, J. and D.J. Klionsky, *The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy*. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*, 2008. **9**(9): p. 859-64.
62. Sumimoto, H., S. Kamakura, and T. Ito, *Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants*. *Sci STKE*, 2007. **2007**(401): p. re6.
63. Johansen, T., et al., *Methods for Studying Interactions Between Atg8/LC3/GABARAP and LIR-Containing Proteins*. *Methods Enzymol*, 2017. **587**: p. 143-169.
64. Mardakheh, F.K., et al., *Nbr1 is a novel inhibitor of ligand-mediated receptor tyrosine kinase degradation*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(24): p. 5672-85.
65. Lamark, T., et al., *NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(13): p. 1986-90.
66. Farkas, T., M. Hoyer-Hansen, and M. Jaattela, *Identification of novel autophagy regulators by a luciferase-based assay for the kinetics of autophagic flux*. *Autophagy*, 2009. **5**(7): p. 1018-25.
67. Xu, M., et al., *Regulation of autophagic flux by dynein-mediated autophagosomes trafficking in mouse coronary arterial myocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12): p. 3228-36.
68. Zhou, C., et al., *Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells*. *Autophagy*, 2012. **8**(8): p. 1215-26.
69. Yu, Z.Q., et al., *Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy*. *Autophagy*, 2012. **8**(6): p. 883-92.
70. Nakatogawa, H., et al., *Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis*. *Autophagy*, 2012. **8**(2): p. 177-86.
71. Satoo, K., et al., *The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy*. *EMBO J*, 2009. **28**(9): p. 1341-50.
72. Mizushima, N., et al., *A protein conjugation system essential for autophagy*. *Nature*, 1998. **395**(6700): p. 395-8.
73. Romanov, J., et al., *Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation*. *EMBO J*, 2012. **31**(22): p. 4304-17.
74. Walczak, M. and S. Martens, *Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation*. *Autophagy*, 2013. **9**(3): p. 424-5.
75. Ganley, I.G., *Autophagosome maturation and lysosomal fusion*. *Essays Biochem*, 2013. **55**: p. 65-78.
76. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. *EMBO J*, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
77. Förster, T., *Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz*. *Annalen der Physik*, 1948. **437**(1): p. 55-57.
78. Hackney, D.D., *Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(17): p. 6314-8.
79. Kota, S., et al., *A time-resolved fluorescence-resonance energy transfer assay for identifying inhibitors of hepatitis C virus core dimerization*. *Assay Drug Dev Technol*, 2010. **8**(1): p. 96-105.
80. Student, *The Probable Error of a Mean*. *Biometrika*, 1908. **6**(1): p. 1-25.
81. Atlashkin, V., et al., *Deletion of the SNARE *vti1b* in mice results in the loss of a single SNARE partner, *syntaxin 8**. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(15): p. 5198-207.
82. Saito, T., et al., *Autophagic vacuoles in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy with initially decompensated heart failure predict improved prognosis*. *Autophagy*, 2016. **12**(3): p. 579-87.
83. Kirisako, T., et al., *The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(2): p. 263-76.

84. Torres-Quiroz, F., M. Filteau, and C.R. Landry, *Feedback regulation between autophagy and PKA*. *Autophagy*, 2015. **11**(7): p. 1181-3.
85. Li, M., et al., *Suppression of lysosome function induces autophagy via a feedback down-regulation of MTOR complex 1 (MTORC1) activity*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(50): p. 35769-80.
86. Hayashi, K., et al., *The autophagy pathway maintained signaling crosstalk with the Keap1-Nrf2 system through p62 in auditory cells under oxidative stress*. *Cell Signal*, 2015. **27**(2): p. 382-93.
87. Weidberg, H., et al., *LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis*. *Dev Cell*, 2011. **20**(4): p. 444-54.
88. Gonzalez-Polo, R.A., et al., *The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 14): p. 3091-102.
89. Taegtmeyer, H., Razeghi, H., Young, ME, *Alterations in cardiac metabolism in heart failure*. *Heart failure: a companion to Braunwald's Heart Disease*, ed. D. Mann. 2008, Philadelphia: Saunders. 315-337.
90. Taegtmeyer, H., *Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles*. *Circ Res*, 1978. **43**(5): p. 808-15.
91. Kassiotis, C., et al., *Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading*. *Circulation*, 2009. **120**(11 Suppl): p. S191-7.
92. Tanaka, Y., et al., *Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice*. *Nature*, 2000. **406**(6798): p. 902-6.
93. Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms*. *Circulation*, 2003. **107**(7): p. 984-91.
94. Kostin, S., et al., *Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts*. *Circ Res*, 2003. **92**(7): p. 715-24.
95. Nakai, A., et al., *The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress*. *Nat Med*, 2007. **13**(5): p. 619-24.
96. Jiang, K., et al., *Tumor suppressor SPRED2 interaction with LC3 promotes autophagosome maturation and induces autophagy-dependent cell death*. *Oncotarget*, 2016. **7**(18): p. 25652-67.
97. Kurokawa, M. and S. Kornbluth, *Caspases and kinases in a death grip*. *Cell*, 2009. **138**(5): p. 838-54.
98. Abedin, M.J., et al., *Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(3): p. 500-10.
99. Kaminsky, V.O. and B. Zhivotovsky, *Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **21**(1): p. 86-102.
100. Zorov, D.B., M. Juhaszova, and S.J. Sollott, *Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(3): p. 909-50.
101. Xiang, X., et al., *Cytoplasmic dynein and early endosome transport*. *Cell Mol Life Sci*, 2015. **72**(17): p. 3267-80.
102. Sanchez-Varo, R., et al., *Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus*. *Acta Neuropathol*, 2012. **123**(1): p. 53-70.
103. Ullrich, M., et al., *Identification of SPRED2 (sprouty-related protein with EVH1 domain 2) as a negative regulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(11): p. 9477-88.
104. Mardakheh, F.K., et al., *SPRED2 interaction with the late endosomal protein NBR1 down-regulates fibroblast growth factor receptor signaling*. *J Cell Biol*, 2009. **187**(2): p. 265-77.
105. Kreykenbohm, V., et al., *The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners*. *Eur J Cell Biol*, 2002. **81**(5): p. 273-80.
106. Furuta, N., T. Yoshimori, and A. Amano, *Mediatory molecules that fuse autophagosomes and lysosomes*. *Autophagy*, 2010. **6**(3): p. 417-8.
107. Bennett, M.K., et al., *The syntaxin family of vesicular transport receptors*. *Cell*, 1993. **74**(5): p. 863-73.
108. Korolchuk, V.I., et al., *Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates*. *Mol Cell*, 2009. **33**(4): p. 517-27.
109. Tannous, P., et al., *Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy*. *Circulation*, 2008. **117**(24): p. 3070-8.

8 Danksagung

Ich möchte in kurzer Form all denjenigen Menschen danken, die mich durch diese Arbeit hindurch begleitet haben und die ohne Ausnahme klüger sind als ich. Die Reihenfolge derer Erwähnung stellt im Übrigen keine Zuordnung von Wertigkeiten dar.

Prof. Dr. Kai Schuh gebührt der erste und bedeutende Dank, mir dieses interessante und ergiebige Thema als Dissertation zu überlassen, sowie für die hilfreichen und konstruktiven Diskussionen, die Möglichkeit der eigenen Entfaltung und das entgegengebrachte Vertrauen. Vielen Dank für die großartige Zeit am Physiologischen Institut.

Zweitens möchte ich Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für seine stete Bereitschaft danken, das Zweitgutachten zu übernehmen und bei den gemeinsamen Diskussionen Fragen und verständige Vorschläge einzubringen.

Prof. Dr. Oliver Ritter möchte ich für seine Bereitschaft danken, als dritter Gutachter für diese Arbeit aufzutreten. Und für den Cappuccino in der Kantine.

Dr. Petra Eder möchte ich herzlich danken, die Vertretung für Prof. Dr. Ritter in der Prüfungskommission zu übernehmen, für ihre Zeit und Anregungen. Allen Gutachtern danke ich für ihre Mühe, die sie zwangsweise mit der Erstellung des Prüfungsgutachtens gehabt haben.

Des Weiteren möchte ich gerne Prof. Dr. Bösl für seine Arbeit und Expertise bei der Generierung der Mauslinien danken. Ebenso allen Mitarbeitern des ZEMM, die bei der Betreuung und Pflege der Tiere ein achtsames Auge auf deren Wohlbefinden hatten.

Für die offene und hilfreiche Unterstützung mit der Organisation in der GSLS, dem exzellenten Angebot der Transferable Skills, den gelungenen Retreats und kulturellen Ausflügen möchte ich allen Mitarbeitern der Graduate School of Life Sciences Würzburg danken.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter, an die präsenten und ehemaligen, der AG Schuh: Melanie Ullrich, Marco Abeßer, Jessica Grein, Annemarie Augustin und Franziska Schmitt. Sowie an den Labor-Kevin. Vielen Dank für eure Hilfsbereitschaft und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein weiterer großer Dank an die Mitarbeiter der AG Friebe: Andreas Friebe, Fabian Schwering, Annemarie Aue, Katharina Beck, Linda Holzer, Dieter Groneberg und Barbara Voußen, mit der ich einige der besten Unterhaltungen geführt habe, an die ich mich erinnern kann.

Einen weiteren Absatz möchte ich der Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der AG Kuhn widmen: allen voran Konstanze Michel, die einen beinahe letalen Durchsatz an Detox-Tee hat. Vielen Dank auch an Sabine Tauscher, Jorge Gonzales, Yiliam Gonzales, sowie Estefania Prentki Santos, Katharina Spiranec, Wen Chen, Eric Miranda Laferte, Simone Pickel, Katharina Völker, sowie Prof. Dr. Michaela Kuhn für die einzigartige Zusammenarbeit.

Ein ganz großer Dank geht an Dr. Sarah Dünnes, ohne die ich den Weg nach Würzburg niemals gefunden hätte und die eine nicht unerhebliche Schuld daran hat, dass ich die Gelegenheit zum Anfertigen dieser Arbeit bekommen habe.

Ein weiterer Dank geht an Cody, der mich die letzten dreieinhalb Jahre begleitet hat und hoffentlich noch viele Jahre an meiner Seite sein wird. An alles, was er mir beigebracht hat. An sein sonniges Gemüt und an seine nicht enden wollende Treue, seinen frohen Blick auf die Welt. Ebenfalls ein riesiger Dank gehen an Katharina und Rayén vom Kirnbach für die endlosen gemütlichen Stunden.

Mein persönlich größter Dank geht an Angelina, die für mich der wichtigste Halt im Leben ist und an unsere fröhliche Tochter Elena, die mir in kürzester Zeit gezeigt hat, wie wertvoll das Leben sein kann. Für das erstaunliche Gefühl, einen Menschen aus dem Nichts heraus zu lieben.

