

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE  
PROF. DR. RICHARD WARTH  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

„Untersuchung der Migrations- und Adhäsionsfähigkeit von CLN7-knockout Zellen“

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
Der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sebastian Lorenz

Jahr 2023



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE  
PROF. DR. RICHARD WARTH  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

„Untersuchung der Migrations- und Adhäsionsfähigkeit von CLN7-knockout-Zellen“

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
Der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sebastian Lorenz

Jahr 2023

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

PD Dr. Markus Reichold

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Frank Kullmann

Tag der mündlichen Prüfung:

26.04.2023

# **Inhaltsverzeichnis**

1.	Grundlagen zum Krankheitsbild "Neuronale Ceroid-Lipofuszinose" (NCL) .....	5
1.1.	Endozytosewege und Lysosomen .....	5
1.2.	Einführung in die Neuronale Ceroid-Lipofuszinose .....	7
1.3.	Neuronale Ceroid-Lipofuszinose Typ 7 – CLN7 .....	8
1.4.	Integrine und CLN7 .....	11
1.4.1.	Einführung in die Struktur der Integrine .....	11
1.4.2.	Umsatz und Stoffwechsel von Integrinen.....	15
1.4.3.	Phosphoinositol-3-Kinase-Signalweg .....	29
1.5.	Fragestellung/Ziele der Promotionsarbeit.....	34
2.	Material und Methoden .....	35
2.1.	Material.....	35
2.1.1.	Zellkultur .....	35
2.1.2.	Zellen .....	35
2.1.3.	Lösungen.....	36
2.1.4.	Versuchsspezifisches Material.....	40
2.2.	Methoden .....	44
2.2.1.	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR).....	44
2.2.2.	Migrationsassay (Neurosphere-Assay) .....	48
2.2.3.	Adhäsionsassays .....	51
2.2.4.	Fluoreszenzfärbungen .....	57
2.2.5.	Proliferationsassay .....	62
2.2.6.	Statistische Methoden .....	64
3.	Ergebnisse .....	65
3.1.	Quantitative Polymerase Kettenreaktion .....	65

3.2.	Migrationsassay .....	70
3.3.	Proliferationsassay .....	77
3.4.	Adhäsionsassays .....	79
3.4.1.	Schütteltest .....	79
3.4.2.	Flusstest .....	80
3.4.3.	Quantitativer Flusstest .....	81
3.5.	Fluoreszenzfärbungen.....	82
4.	Diskussion und Schlussfolgerung .....	90
4.1.	mRNA-Ausstattung (quantitative Polymerase Kettenreaktion) .....	90
4.2.	Migrationsfähigkeit („Neurosphere-Assay“) .....	91
4.3.	Proliferationsassay .....	94
4.4.	Fluoreszenzfärbungen.....	96
4.5.	Adhäsionsassays .....	98
5.	Zusammenfassung.....	102
6.	Literaturverzeichnis .....	103
7.	Danksagung.....	111
8.	Lebenslauf .....	112
9.	Eidesstattliche Erklärung.....	113

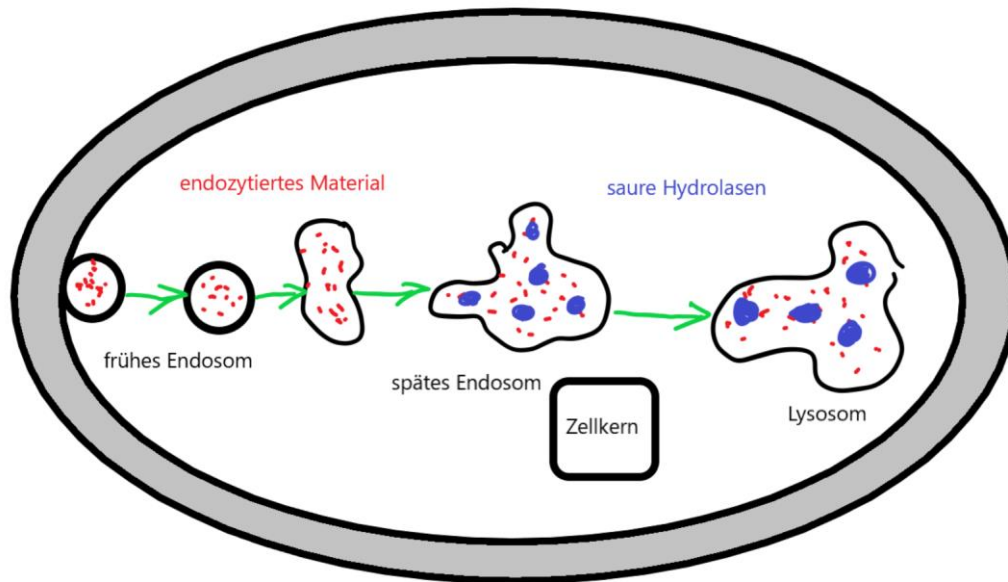
## **1. Grundlagen zum Krankheitsbild “Neuronale Ceroid-Lipofuszinose” (NCL)**

### **1.1. Endozytosewege und Lysosomen**

Eukaryotische Zellen sind auf eine ständige Aufnahme sowohl von Flüssigkeit als auch von Molekülen angewiesen. Der Prozess der Aufnahme wird auch als Endozytose bezeichnet. Nach und nach werden die benötigten Stoffe dabei von einem Teil der Plasmamembran umschlossen, nach intrazellulär gestülpt und schlussendlich abgeschnürt. Das nun entstandene Endozytosevesikel wird am Ende zu den Lysosomen befördert und dort in seine Bestandteile zerlegt. Man unterscheidet bei der Endozytose dabei zwei Formen: einerseits die Pinozytose, die hauptsächlich für die Aufnahme von Flüssigkeiten und Membranbestandteilen zuständig ist und kleine Vesikel formt und zum anderen die Phagozytose, bei der größere und feste Bestandteile aufgenommen werden. Zu letzterer Form zählt auch die Clathrin-vermittelte Endozytose. Der Ablauf der Phagozytose beginnt mit der Bindung bzw. der Erkennung von Substanzen an Rezeptoren. Dieser Reiz verleitet die Zelle dazu Membranfortsätze (Pseudopodien) auszubilden, um das Agens zu umschließen. Die Enden dieser Fortsätze verschmelzen und bilden so das internalisierte Phagosom, welches im Verlauf mit dem Lysosom verschmilzt. Die Pinozytose benötigt keine Rezeptoraktivierung, sondern findet ubiquitär über clathrin-coated-pits statt und endet schliesslich in Endosomen. Hierbei können auch in der extrazellulären Flüssigkeit gelöste Stoffe in die Zelle aufgenommen werden. Die internalisierte Plasmamembran wird jedoch nicht völlig abgebaut, sondern stetig mittels Exozytose recycelt.

Nach der Verschmelzung des aufgenommenen Vesikels mit einem Endosom wird das Verschmelzungsprodukt als frühes Endosom bezeichnet, das noch relativ nahe an der Plasmamembran lokalisiert ist. Als späte Endosomen bezeichnet man sie nach der Fusion mit anderen Endosomen oder einem späten Endosom. Diese wandern Richtung Zellkern. Ein wichtiges Bauteil des Endosoms stellt eine H<sup>+</sup>-ATPase dar, die das intraendosomale Milieu in einem saueren pH-Bereich von fünf bis sechs hält. Die saure Umgebung veranlasst unter anderem Moleküle dazu von ihren Rezeptoren zu dissoziieren, sodass die unbelegten Rezeptoren erneut in die Zellmembran eingebaut werden können. Diese Rezeptorsubstrate können später entweder im Lysosom abgebaut oder aber durch Transzytose zu anderen Organellen

gelangen. Späte Endosomen besitzen darüber hinaus bereits lysosomale Enzyme, die schon vor der Fusion mit einem Lysosom den Verdauungsprozess einleiten (siehe Abb.1).

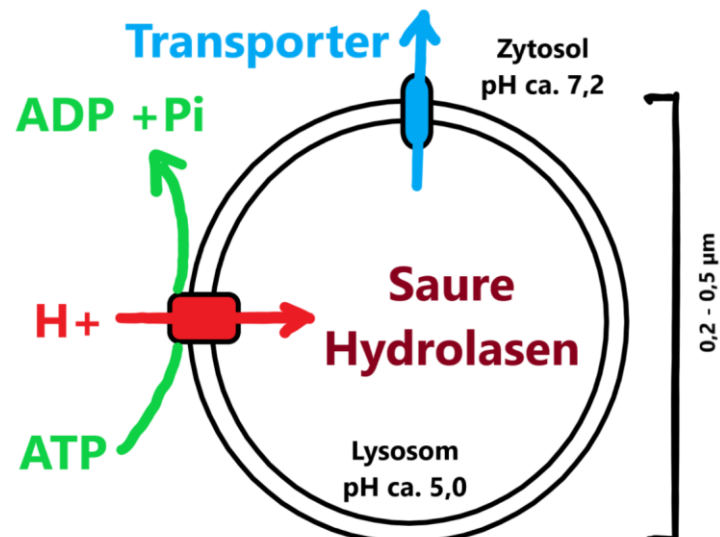


**Abbildung 1 - Endozytoseweg:** Verlauf von der Aufnahme von extrazellulärem Material in ein Vesikel über die Reifung zum späten Endosom und schliesslich zum Lysosom

Lysosomen stellen die Endstation von vielen aufgenommenen aber auch zelleigenen Stoffen dar (= Autophagie). Sie sind der Ort der geordneten intrazellulären Verdauung. Diese membranumschlossenen Organellen beinhalten mehr als 40 Arten hydrolytischer Enzyme und verdauen mit diesen sowohl Proteine (saure Proteasen) als auch Nukleinsäuren (saure Nukleasen) oder Phospholipide (saure Phospholipasen) und Oligosaccharide (saure Glykosidasen). Um optimal zu funktionieren benötigen alle Enzyme einen sauren pH-Wert, der durch eine H<sup>+</sup>-ATPase aufrecht gehalten wird, welche unter ATP-Verbrauch H<sup>+</sup>-Ionen aus dem Zytoplasma ins Lysosom transportiert (Überbegriff: saure Hydrolasen). Des Weiteren besteht hierin eine Schutzfunktion, denn bei Beschädigungen der lysosomalen Membran können diese katabolen Enzyme im physiologischen pH-Bereich des Zytoplasmas nicht mehr richtig funktionieren und schädigen die Zelle bei Freisetzung somit nicht. Neben der charakteristischen Ausstattung mit Enzymen sollte auch noch der einzigartige Aufbau der lysosomalen Membran hervorgehoben werden. Hier stellen Exportproteine einen großen Anteil dar (siehe Abb. 2). Diese Proteine benötigen jedoch einen intralysosomalen Schutz vor den saueren Proteasen. Dafür



sind diese Transporter an ihren intralysosomalen Domänen besonders stark glykosyliert. Diese Membranproteine werden im endoplasmatischen Retikulum produziert, danach über den Golgi-Apparat geleitet und mit Mannose-6-Phosphat als Adressmolekül für das Lysosom versehen.



**Abbildung 2 - Lysosom mit charakteristischen Merkmalen:** Zu sehen ist ein schematisiertes Lysosom mit physiologischem intralysosomalem pH-Wert, der H<sup>+</sup>-ATPase, Transportern

## 1.2. Einführung in die Neuronale Ceroid-Lipofuszinose

Neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL, Batten-Disease) ist ein Überbegriff für eine Reihe von erblichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Dabei verursacht eine heterogene Gruppe von Mutationen an verschiedenen Genloci eine Kaskade von Störungen in den Lysosomen. Es ist jedoch nicht klar, ob Abbauprodukte akkumulieren und dabei die Zellhomöostase stören, oder ob andere Mechanismen auslösend wirken. Momentan werden 14 verschiedene Genloci (Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal 1 – 14, „CLN 1 – 14“) beschrieben, die jeweils für verschiedene Proteine oder Enzyme codieren und durch eine Vielzahl an verschiedenen Mutationen ihre Funktion verändern oder verlieren. Dies scheinen jedoch nur Hypothesen zu sein, da die Funktion der Proteine nicht bei allen CLNs abschliessend geklärt ist. Man unterscheidet jedoch vier NCL Hauptformen, die sich nach einer veralteten Einteilung durch das Manifestationsalter der Erkrankung

definieren. Es wurden frühkindliche (infantil), kindliche (late-infantil), jugendliche (juvenil) und adulte Hauptformen unterschieden.

Meist beginnt die Erkrankung im Kindesalter und die Vererbung folgt überwiegend einem autosomal-rezessiven Erbgang. Im anglosächsischen Raum liegt die Inzidenz der NCL bei circa 1/12500. Die Mehrzahl der Symptome betreffen das zentrale Nervensystem und sind geprägt von Myoklonien (= kurze, unwillkürliche Zuckungen einzelner Muskeln oder Muskelgruppen), generalisierten Krampfanfällen, Epilepsie, psychomotorischen Entwicklungsstörungen, psychischen Manifestationen (Entwicklungsverzögerung, Lernschwäche, Persönlichkeitsveränderungen, Demenz, uvm.) und Verlust der Sehfähigkeit. Ein Charakteristikum ist des Weiteren eine stetige Progredienz der Symptomatik aus dem mutmaßlich gesunden Zustand heraus. Alle Formen führen unweigerlich und momentan ohne kausale Therapiemöglichkeit zum frühen Tode des Patienten. In der Literatur kann zum Teil auch die klinische Beschreibung "progressive myoklonische Epilepsie" gefunden werden.

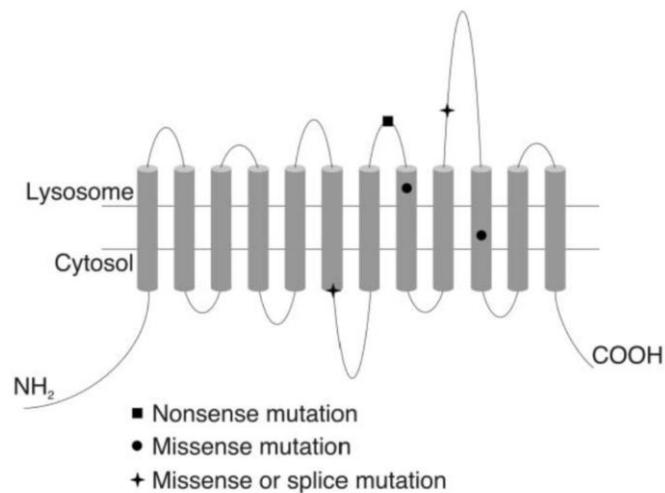
Im histopathologischen Präparat von Geweben aus betroffenen Regionen (v.a. Gewebe des ZNS) fallen autofluoreszierende Lipopigmente auf. Eine genauere Untersuchung dieser Pigmente mit Hilfe von Elektronenmikroskopie zeigt granuläre osmiophile Ablagerungen (GROD – granular osmiophilic Deposits) in Form von curvilinear- oder fingerprint-bodies. Je nach Art der Erkrankung treten die Veränderungen kombiniert oder einzeln auf und lassen somit eine Eingrenzung der möglichen Lokalisation der Genschädigung zu. (14, 15)

### **1.3. Neuronale Ceroid-Lipofuszinose Typ 7 – CLN7**

Die genetische Variante der NCL, die in der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet werden soll, wird durch Mutationen im CLN7-Gen (auch MFSD8 genannt) verursacht. Es handelt sich hierbei um eine im späten Kindesalter (spät-infantil) auftretende Erkrankung, die initial bei Patienten aus der Türkei beobachtet wurde. (3)

CLN7 codiert für ein aus 518 Aminosäuren bestehendes Protein, welches aus 12 transmembranären Domänen besteht und dessen N- und C-terminales Ende jeweils in das Zytosol ragt (siehe Abbildung 3). Aus Anfärbestudien mit Überexpression von

CLN7 konnte unter Verwendung des lysosomalen Markers Lamp-1 eine Lokalisation in der lysosomalen Membran beobachtet werden. (4, 15)



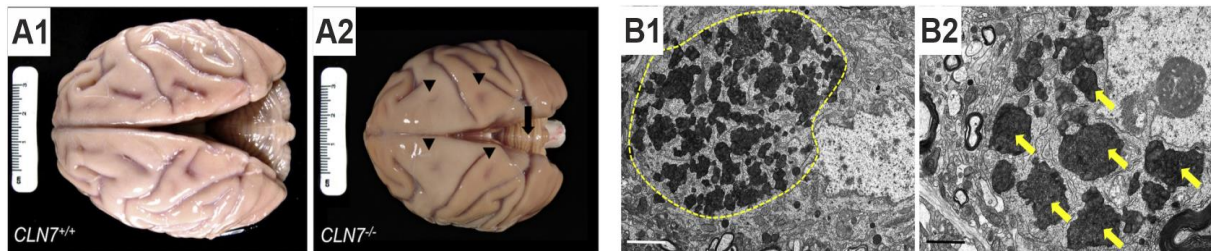
**Abbildung 3 - CLN7/MFSD8 Genprodukt:** Protein mit 12 Transmembrandomänen und im Cytosol gelegenen N- und C-terminalem Ende; zusätzlich sind mögliche Mutationen aufgeführt. (3, 4)

Aufgrund eines homologen Sequenzaufbaus wird das CLN7-Protein auch der Klasse der major facilitator superfamily (MFSD) zugeordnet, welche eine Gruppe von sekundär-aktiven Transportern darstellt. Diese Proteine transportieren mannigfaltige kleinere Substrate wie Zucker, Metabolite der Zelle, Medikamente, Aminosäuren, Nucleoside und auch Vitamine. Substrate von CLN7 und Richtung des Transports sind bisher noch nicht identifiziert worden. CLN7 wird auch als MFSD8 bezeichnet. Es wird jedoch angenommen, dass es am Transport von gelösten Stoffen über die lysosomale Membran hinweg und demzufolge auch an der Verdauung und am Recycling von Zellbestandteilen beteiligt ist. Als Motor des sekundär aktiven Transportes wird der ausgeprägte Protonengradient über die lysosomale Membran diskutiert. (3)

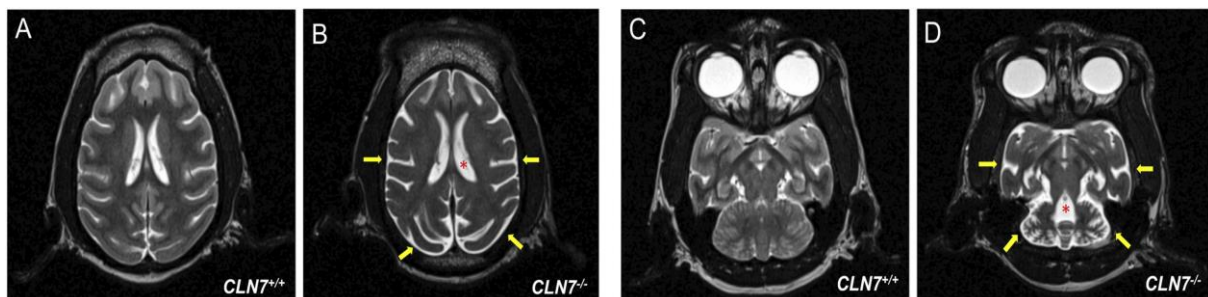
Normalerweise wird CLN7 quantitativ in unterschiedlichem Ausmaß und qualitativ in unterschiedlichen Splicevariationen in allen Geweben des Menschen exprimiert. Eine Sonderstellung nehmen dabei jedoch Neurone des Gehirns und der Retina ein, wo die Expressionsrate besonders hoch ist. (3, 4)

Bei der postmortalen histopathologischen Untersuchung von Patienten mit nachgewiesenen Anomalien im CLN7-Gen konnten autofluoreszierende Ablagerungen von Ceroid-Lipofuszin in bestimmten Regionen des Gehirns

nachgewiesen werden. (11) Elektronenmikroskopisch imponierten in den Lysosomen membranähnliche Ablagerungen in fingerprint-Form. (3) Eine Neurodegeneration wurde vor allem in der Rindenregion des Großhirns (hauptsächlich in Schicht V), in Neuronen des Hippocampus (CA2-Region), in der Purkinjzellschicht des Kleinhirns (wie in Abbildung 4 und 5 zu sehen) und in der Retina beobachtet. (11)



**Abbildung 4 – Pathologische Veränderungen bei CLN7:** A1 und A2 zeigen Gehirne von Primaten, wobei A1 ein Wildtyp-Gehirn und A2 ein CLN7<sup>-/-</sup>-Gehirn zeigt. Auffällig ist, dass in A2 eine deutliche Groß- sowie Kleinhirnatrophie auftritt. B1 und B2 zeigen typische lysosomale Einlagerungen in Form granulärer osmiophiler Ablagerungen (granular osmiophilic deposits – GROD). Aus: (11)



**Abbildung 5 – Magnetresonanztomographische Darstellung von Primaten im Vergleich:** A und C stellen ein gesundes Gehirn dar, wohingegen auf Bild B und D ein CLN7-erkranktes Gehirn abgebildet ist. Bei A und B ist ein Schnittbild der beiden Großhirnhemisphären dargestellt. Hier ist eine verminderte Mark-Rinden-Differenzierung des erkrankten Gehirns erkennbar, die auf eine Neurodegeneration in der Rindenregion des Großhirns (beschrieben vor allem in Schicht V) hinweist. Bild C und D zeigen ein Schnittbild durch eine Ebene des Kleinhirns. Auch das Kleinhirn stellt sich deutlich atroph dar. Weiterhin ist ein vergrößerter vierter Ventrikel gezeigt (roter Stern) und eine Atrophie des Temporallappens (Epilepsie). Aus: (11)

Bei der Untersuchung von CLN7-knockout -Mäusen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der CLN7-Protein-Abbau von lysosomalen Proteasen übernommen wird. Hierbei wird es in N- und C-terminale Fragmente gespalten, die nach extrazellulär transportiert werden. Eine mögliche Fehlfunktion kann hierbei zur Akkumulation in den Lysosomen führen. Auch eine Beeinträchtigung des mTOR-Signalweges (Serin-/Threoninkinase, beteiligt an Signalkaskaden der Proliferation, Differenzierung und Vermehrung von Zellen) wird beschrieben. (15)

Während der Promotionsarbeit wurde hauptsächlich mit humanen embryonalen Zellen gearbeitet (HEK293T), die sowohl als MFSD8-Wildtyp sowie in Form von zwei Knockout-Varianten vorlagen. Diese wurden mit unterschiedlichen Guide-RNAs über die CRIPR-Cas-Methode hergestellt und werden als 99.4 und 94.5 Knockout-Zellen bezeichnet.

#### **1.4. Integrine und CLN7**

In einer ersten Untersuchung des mRNA-Gehaltes in HEK293T MFSD8 Wildtypzellen, HEK293T MFSD8 Knockout-Zellen und HEK293T CLN7-EGFP überexprimierenden Zellen, konnte eine Regulierung von Integrinbestandteilen beobachtet werden. Hierbei stellte die sogenannte  $\beta_1$ - und die  $\alpha_2$ -Untereinheit eine herausragende Rolle dar. Es soll im Weiteren eine Übersicht über den Aufbau, den Stoffwechsel und die Signalwege der Integrine dargestellt werden.

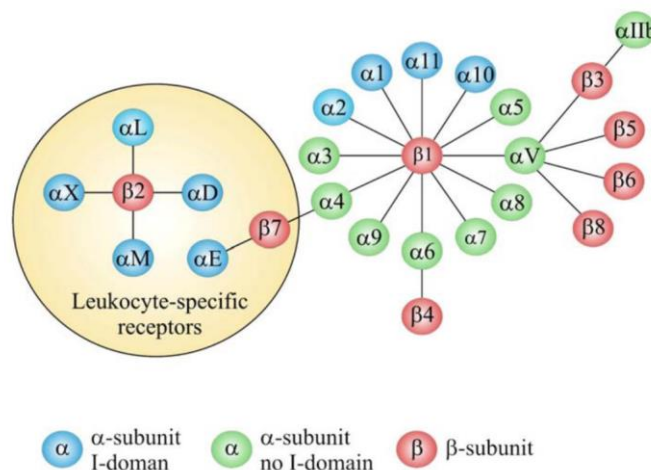
##### 1.4.1. Einführung in die Struktur der Integrine

Integrine sind eine Gruppe von transmembranären Rezeptoren, die als Ankerrezeptoren zwischen der extrazellulären Matrix und dem Cytoskelett gesehen werden. Bei Vertebraten werden 24 verschiedene Integrin-Heterodimere mit verschiedener Substratspezifität und Gewebeexpression beschrieben. (2)

Alle kernhaltigen Zellen besitzen Integrine in hoher Anzahl und in verschiedener Zusammensetzung. Integrine können als bilaterale Rezeptoren gesehen werden, die sowohl ein Outside-in- als auch ein Inside-out-Signal vermitteln können. Bei einem Outside-in-Signal bindet ein Ligand an Integrin, was eine Änderung der Konformation bewirkt und somit ein Signal ins Innere der Zelle vermittelt. Bei einem Inside-out-Signal kommt es entweder durch einen "nicht-integrin"-vermittelten Stimulus von Außen über einen Rezeptor oder über intrazelluläre Moleküle zu einer Regulation von verschiedenen Signalwegen, die schlussendlich zu einer Aktivierung oder Deaktivierung von Integrinen führen. Beide Arten der Signalvermittlung laufen in einem intakten Zellsystem nebeneinander ab.

### 1.4.1.1. Extrazelluläre Domänen

Alle Integrine bilden Heterodimere aus und bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Sie bestehen des Weiteren aus einem ligandenbindenden Kopfteil, der mit zwei Schwanzteilen verbunden ist.  $\alpha$ -Untereinheiten werden nach dem Vorhandensein einer I-Domäne nochmals unterteilt. Die I-Domäne dient als primäre Bindungsstelle für Liganden, während bei Fehlen der I-Domäne sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit die Bindungsstelle bilden (siehe Abbildung 6).



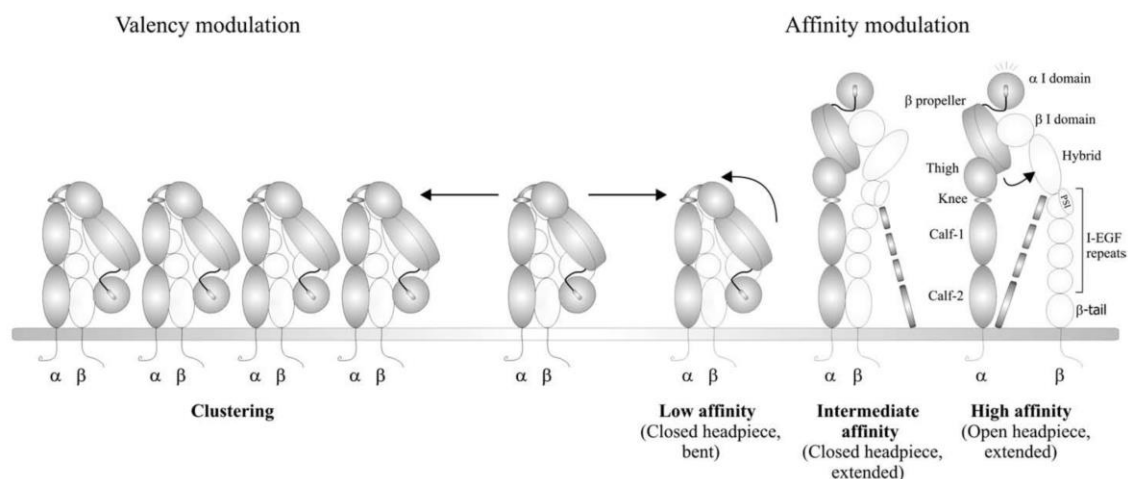
**Abbildung 6 - Integrin-Untereinheiten:**  
Kombinationsmöglichkeiten (aus: (1))

I-Domänen können zwei Konformationen annehmen, die als high-affinity und low-affinity-Konformation bezeichnet werden. Beim Übergang vom low-affinity zum high-affinity-Zustand ist die sogenannte "Metal-Ion-Dependent-Adhesion-Site" (MIDAS) von größter Bedeutung. Hier binden divalente Metal-Kationen (meist Magnesium) und bewirken eine strukturelle Verlagerung einer  $\alpha$ -Helix, was die Affinitätsänderung bewirkt.

Bei Integrinen, die keine I-Domäne besitzen, binden Liganden primär an die  $\beta$ -Untereinheit. Diese besitzt eine I-Domänen-ähnliche Bindungsstelle, die drei Bindungsplätze für Metallionen besitzt – MIDAS, "adjacent to the MIDAS" (ADMIDAS) und "Ligand Induced Metal Binding Site" (LIMBS).

In der Realität kann man mittels Elektronenmikroskopie drei Konformationsstatus erkennen. Einerseits können Integrine einen Kopfteil aufweisen, der zur Plasmamembran gewandt ist und somit gewinkelt erscheint, was zu einer geringen Affinität führt. Andererseits kann der geöffnete Kopfteil auf den Schwanzteilen

senkrecht stehen, sodass die Bindungsstelle für die Liganden gut zugänglich ist und eine hohe Affinität bewirkt. Des Weiteren gibt es einen Zustand mit mittlerer Affinität, der durch eine senkrecht koordinierte, geschlossene Kopfgruppe gebildet wird. Die Interaktion zwischen  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit ist entscheidend für die Funktion der Integrin-Signalkaskade (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7 - Konformationsformen von Integrinen:** Links ist die gewinkelte Konformation mit einer niedrigen Affinität gezeigt – Kopfteil zeigt zur Plasmamembran und die Bindungsstelle für den Liganden ist schwer zugänglich, Mittig ist die Konformation mit mittlerer Affinität gezeigt, bei dem das Integrinheterodimer gestreckt ist und eine geschlossene Kopfgruppe aufweist, Rechts ist eine Konformation mit maximaler Affinität gezeigt, bei der das Integrin gestreckt ist und eine dislozierte  $\alpha$ -Helix den Kopfteil öffnet und den Zugang nochmals erhöht (aus: (1)).

#### 1.4.1.2. Transmembrandomänen

Über die Transmembrandomänen der Integrine ist bisher noch nicht allzu viel bekannt. Jedoch wird eine Transmembranhelix beschrieben, die eine Biegung in der Lipiddoppelschicht beschreibt und mit einem Lys-716 aus der hydrophoben Schicht hinausragt, jedoch sofort wieder inseriert. Der Biegungswinkel scheint die Domänenfunktion und die bidirectionale Kommunikation zu gewährleisten.

#### 1.4.1.3. Zytoplasmatische Domänen

Im Allgemeinen fallen zytoplasmatische Domänen von Integrinuntereinheiten relativ kurz aus (Ausnahme:  $\beta 4$ ) und besitzen keine enzymatische Aktivität. Nichtsdestoweniger stellen diese Domänen einen wichtigen Bestandteil der Funktion von Integrinen dar. Es kann festgestellt werden, dass die  $\alpha$ -Untereinheiten

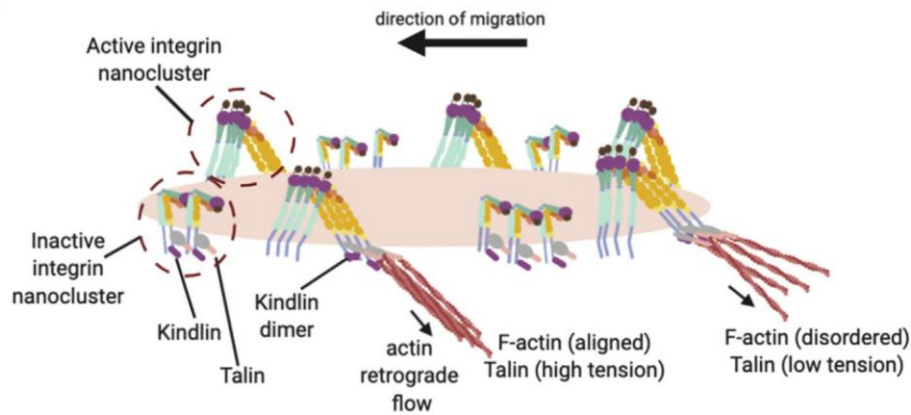
relativ verschieden aufgebaut sind, wohingegen die  $\beta$ -Untereinheiten stark konserviert zu sein scheinen und ähnliche Funktionen erfüllen. Im Ruhezustand lagern sich proximale  $\alpha$ -Helices aneinander und werden durch eine Arginin-Aspartat-Interaktion (sehr konservierte Region) stabilisiert.

Bindet nun ein Ligand an das Integrin-Heterodimer, so kommt es zu einer Trennung der zytoplasmatischen Untereinheiten. Durch den zytoplasmatischen Aktivator Talin kommt es ebenso zu einer Dissoziation. Diese Erkenntnisse konnten durch die Einbringung von Salzbrücken-bildenden Peptiden in die intrazellulären Domänen (IZD) gefestigt werden. Diese bewirken eine feste Dimerisierung und folglich eine Inaktivierung der Integrinfunktion. Gegensätzliches passierte bei Peptiden, die eine Dimerisierung verhinderten. (1)

#### 1.4.1.4. Architektur der Integrine in Fokalen Adhäsionen

Bei der Migration von Zellen ist eine Dynamik des Auf- und Abbaus von Zell-ECM-Kontakten von zentraler Bedeutung. Hierbei stellt die Funktion von Integrinen eine Schlüsselrolle dar. Integrine organisieren sich in fokalen Adhäsionen zu Nanoclustern, in denen sich parallel aktivierte und inaktivierte Funktionszustände finden. Aktive Integrine nehmen dabei eine sehr geordnete Verteilung in Richtung der F-Actin-Ausrichtung ein und haften sehr stark an Komponenten der extrazellulären Matrix (siehe Abbildung 8). Inaktive Integrine liegen weniger geordnet auf der Plasmamembran verteilt und scheinen eine eher mobile Komponente zu sein und als eine Art "schnelle Einsatztruppe" zu dienen. Trotz dieser Unterschiede können beide Integrin-Cluster-Arten mit Talin und Kindlin interagieren. Die Ausrichtung bzw. Verteilung der Integrine und ihre Interaktion mit den Adaptorproteinen spiegelt die anisotrope Spannung in fokalen Kontakten wieder. Bei einer hohen Spannung treten dimere Kindlinstrukturen mit Talin auf und unter geringer Spannung kann eine Adaptorstruktur mit lediglich monomerer Kindlin-Talin Anordnung gefunden werden. Auch die Ausrichtung von F-Actin-Bündeln kann einen Hinweis auf die Spannung geben, so kommt es bei einer hohen Kraft zu einer parallelen Ausrichtung und im Ruhezustand erscheinen die Fasern eher ungeordnet (siehe Abbildung 8).





**Abbildung 8 - Molekulare Struktur von Integrinclustern in fokalen Adhäsionen:** Anordnung und Organisation von Integrin-ECM-Interaktionen bei einer Migrationsbewegung. Links unter Ruhe und Rechts bei Migrationsbewegungen (aus: (8))

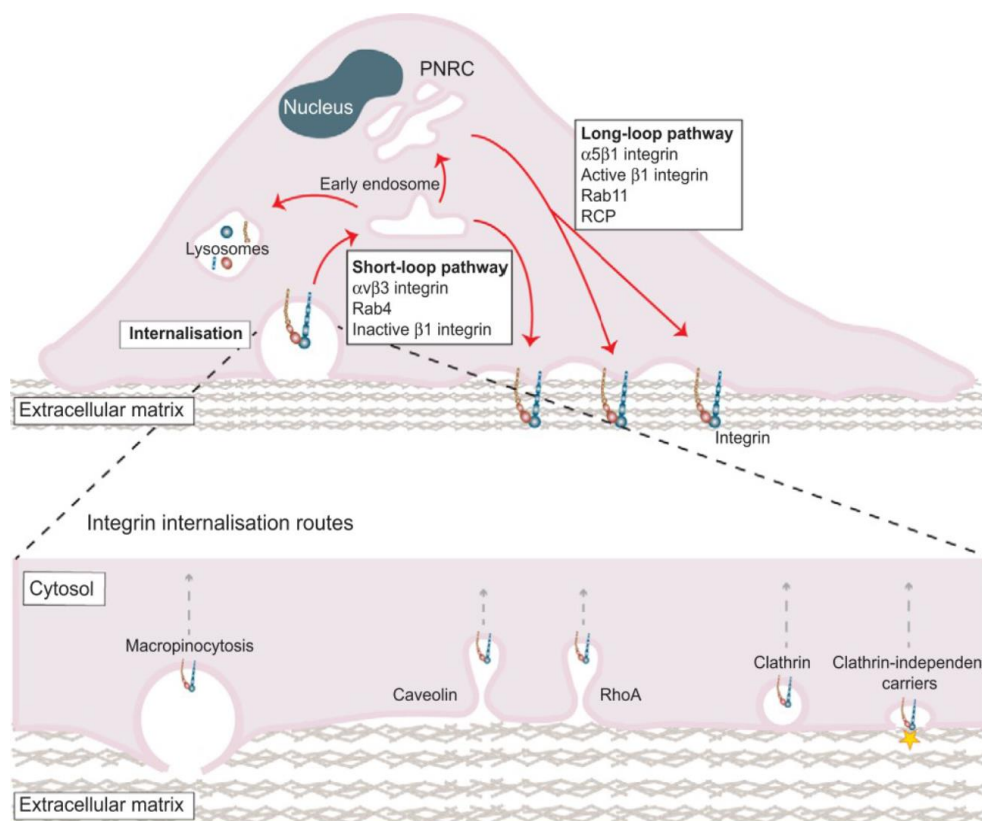
Um eine feste und stabile Adhäsionsstruktur zu gewährleisten, muss des Weiteren eine vorübergehende Lateraldiffusion der Cluster stattfinden. Hierfür sind sogenannte Kank-Proteine zuständig, die an eine Talindomäne an der Seite des Adhäsionskomplexes binden. Dieser Komplex vermindert die Talin-Actin-Bindung und damit die Kräfte, die auf die fokalen Kontakte wirken (verminderte Migration). (8)

#### 1.4.2. Umsatz und Stoffwechsel von Integrinen

Um einen stetigen, frischen Pool an Integrinen auf der Zelloberfläche zu gewährleisten und neue Adhäsionen bilden zu können, müssen Integrine möglichst wirtschaftlich umgesetzt werden. So können Integrine auf zwei verschiedene Wege internalisiert werden. Klassischerweise unterscheidet man dabei eine clathrinabhängige und eine clathrinunabhängige Endocytose. Weitere Wege des Integrinumsatzes stellen die Makropinocytose aus F-Actin-reichen Regionen der apikalen Zellmembran, sogenannten Circular Dorsal Ruffles (CDR) dar. Weiterhin wird eine RhoA-abhängige Form der clathrinabhängigen Endocytose beschrieben. Diese beiden Wege werden über Growth-Factor-Pathways gesteuert. (2)

Eine Besonderheit stellt die Endocytose von  $\beta_1$ -Integrinen über einen Carrier (CLICs) dar, wofür Actin und Glycosphingolipide notwendig sind. Dieser Prozess wird von extrazellulär eingeleitet. Galectin-3 bindet die glykosylierte extrazelluläre Domäne des  $\beta_1$ -Integrins und führt danach zu einer mechanischen Deformation der Plasmamembran und schlussendlich zur Internalisation (siehe Abbildung 9).

Grundsätzlich kann es nach der Aufnahme der Integrine entweder zu einem lysosomalen Abbau kommen oder zu einem Recycling. Hierbei kann ein langer von einem kurzen Weg unterschieden werden. Der kurze Weg führt über das kleine G-Protein Rab4, das als Navigator der integrinbesetzten Vesikel vom frühen Endosom zur Plasmamembran fungiert. Der lange Weg hat zwischen frühen Endosomen und Membran eine weitere Station. Diese Station wird als Perinukleäres Recycling Compartment (PNRC) bezeichnet und ist mit Rab11 besetzt, das den Transport zur Plasmamembran steuert (siehe Abbildung 9). (2)



**Abbildung 9 - Überblick der Integrinumsatzrouten:** Von links nach rechts: Makropinozytose, Caveolin- und RhoA-vermittelt und sowohl clathrinabhängige als auch clathrinunabhängige Endozytose; zusätzlich zu sehen sind der kurze und der lange Weg des Integrinumsatzes (aus: (2))

Doch wie kommen die Proteine der Integrin-Endozytose an den Ort der Vesikelbildung? Hierfür ist die räumlich begrenzte Produktion von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI4,5P<sub>2</sub>) durch die Typ I Phosphatidylinositolphosphat Kinase (PIPKI) von Bedeutung, die durch die Zell-ECM-Interaktion getriggert wird. Von diesem Enzym gibt es drei Isoformen und

mehrere Splicevarianten, von welchen insgesamt zwei am Umbau von fokalen Adhäsionen beteiligt sein sollen.

PIPKIb vermittelt die Endozytose von aktiven  $\beta_1$ -Integrinen aus fokalen Adhäsionen und verstärkt somit den Abbau dieser Kontaktpunkte. Wird PIPKIb geblockt, so werden weniger Clathrinvesikel gebildet und die Zelle haftet mehr an ihrer Umgebung, was einer Migration entgegenwirkt. (2)

PIPKIc661 scheint eine gegensätzliche Wirkung zu haben. Es scheint am Aufbau von fokalen Haftpunkten mitzuhelfen, indem es Talin und Vinculin durch die lokale Produktion von  $PI4,5P_2$  bindet.  $PI4,5P_2$  stellt somit die Grundlage für mehrere spezifische Schritte des Auf- und Abbaus von Fokalen Adhäsionen dar. Die genaue Regulation ist hierbei leider noch nicht vollständig klar.

Ein weiteres wichtiges Glied beim Aufbau des Adhäsionsapparates stellt Cholesterol dar, das in Low-Density-Lipoproteinen (LDL) an den Ort des Geschehens kommt. Es wird aus späten Endosomen durch eine saure Lipase, dem Niemann-Pick C1 Protein (NPC1) und Rab8a-abhängig zum Bildungsort verfrachtet. Die Anreicherung mit Cholesterol bewirkt eine Erhöhung sowohl der Zahl als auch der Größe sowie den Umsatz von Adhäsionskonstrukten in der Zellmembran. Eine Verminderung der Cholesterolkonzentration im Trans-Golgi-Netzwerk scheint das Recycling der Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$  zu vermindern und damit die Zellmigration zu hemmen (Tumormetastasierung!!!). (2)

#### 1.4.2.1. Clathrin-abhängige Internalisation

Bei dieser Art des Recyclings ist die Markierung der Adhäsionskomplexe durch Mikrotubuli von großer Bedeutung. Dadurch kann ein vesikulärer Transport dorthin gewährleistet werden, um Matrix-Metalloproteasen und die Proteinausstattung für die Endozytose an den Wirkungsort zu transportieren. Hier sei Dynamin 2 genannt, das nach der Ausbildung der Clathrin-coated-Pits an der Abschnürung beteiligt ist. Es bindet direkt an die Fokale Adhäsionskinase (FAK), nachdem diese über den Src – PIP2 Weg "angelockt" wurde.

Auch die Adaptorproteine Dab2, Eps8 und Numb beeinflussen die Endozytose über ihre Phosphotyrosin-Bindungsmotive an den zytoplasmatischen Domänen der Integrin  $\beta$ -Untereinheit. Dab2 und Numb sind Adaptoren für Clathrin, ordnen sich

direkt an fokalen Adhäsionsclustern an und können die Zelladhäsion direkt beeinflussen.

Numb kann an  $\beta_1$  und  $\beta_3$  Untereinheiten binden und arbeitet eher an der Zellfront einer migrierenden Zelle. Die Funktion wird über Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch die Par-3-atypische-Proteinkinase C (aPKC) gesteuert. Zusammen mit AP2, einem Adaptorprotein, kann Numb die Zellmigration an der Zellfront bei der Belegung der Integrine mit einem Liganden durch Erhöhung des Umsatzes der Zelladhäsionen steuern.

Dab2 ist ebenso für den Umsatz der Adhäsionen an der Basis der Zelle unterhalb des Zellkerns und dem Zellheck zuständig. Es wird durch die Kinesin-Motor-Family KIF15 an den Wirkungsort gebracht. Dab2 ist vor allem an der Internalisation von  $\beta_1$ -Integrinen beteiligt und wird durch die Adaptorproteine ARH und AP-2 an die Clathrin-Bucht gebunden.

Ein dritter Weg der Clathrin vermittelten Endozytose sind die GTPasen vom Arf-Typ. Sie werden hauptsächlich für  $\beta_1$ -Untereinheiten benötigt und können die Ausbildung von Blutgefäßen über den VEGF-Weg beeinflussen. Auch kleine GTPasen wie Rab5 können die Vesikelbildung und die Funktion von frühen Endosomen beeinflussen und steuern. Dabei können hauptsächlich  $\beta_1$ -Untereinheiten nach der Aktivierung von Rab5 durch Rin2 und der folgenden Rekrutierung von R-Ras internalisiert werden. Parallel wird auch Rac aktiviert, was einen Adhäsionsumsatz und Migrationserhöhung auf Fibronectin fördert (RN-tre ist ein Inhibitor von Rac und kann die Migration auf Fibrinectin hemmen). Rab21 fördert die Zelladhäsion und die Migration auf Kollagen-Substraten durch den Integrinumsatz von kollagenbindenden Integrinen wie  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_11\beta_1$ . Jedoch ist die clathrinabhängige Endozytose nicht nur für den Aufbau von Adhäsionsbereichen wichtig, sondern auch für den Umsatz von inaktiven Integrinen am Zellheck. Dies hat einen konstanten intrazellulären Integrin-Pool zum Zweck, der bei Bedarf zur schnellen Ausbildung von neuen Zelladhäsionen nötig ist. (2, 13)

#### 1.4.2.2. Clathrinunabhängige Internalisation

Bei der clathrinunabhängigen Endozytose von Integrinen und auch CD44 spielen vor allem clathrin-independent-carrier (CLICs) eine bedeutende Rolle. Um

ordnungsgemäß an der Zellfront zu funktionieren, benötigen CLICs für ihre Produktion Glycosphingolipide, Galectin-3 und die GTPase GRAF1 (GRAF1 bindet an die phosphorylierte FAK).

Ein weiterer Mechanismus, der ohne Clathrin abläuft, ist die Internalisation über Caveolae. Diese sind cholesterol- und sphingolipidreiche Bereiche der Plasmamembran, welche die Aufnahme von Cargo und folglich auch Integrienen bewirken. Meist wird diese Aufnahmeform an der Hinterseite der Zelle gesehen. Der Caveolae-Weg wird über PKCa reguliert. Hier soll vor allem die Internalisation von LFA-1 (= Integrin  $\alpha_L\beta_2$ , ICAM-Rezeptor von Leukozyten) genannt werden, der für das Rolling an der Blutgefäßwand und schliesslich die Migration aus den Blutgefäßen in Gewebereiche verantwortlich ist.

Eine Aufnahme von Integrin  $\alpha_5\beta_1$  kann auch über einen Actin-Komplex aus SCAR/WAVE und Arf4 geschehen. Hier wird das Integrin mitsamt seinem Liganden internalisiert. Arf4 ist generell mit dem Transport vom und zum Golgi-Apparat assoziiert, was für den Cargo-Verkehr von Bedeutung ist. Werden ligandenbeladene Integriene aufgenommen und zu Lysosomen transportiert, so wird der mammalian target of Rapamycin (mTOR) Pathway aktiviert. Dieser ist für den Stoffwechsel von Bedeutung und stellt einen Crosslink zwischen Integrienen und anabolen Stoffwechselwegen dar (Krebserkrankungen).

Ein wichtiger Weg für die schnelle Wiederbereitstellung von Integrienen stellt die Makropinozytose dar. Dieser Weg wird von Growth-Factor (GF) und Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) induziert bzw. stimuliert. Es kommt dabei zur Akkumulation von  $\beta_1$  und  $\beta_3$  Integrienen am Heck der Zelle und zur Ausbildung von sogenannten circular dorsal ruffles (CDRs). An diesen Zellraffungen kommt es vornehmlich zur Wiederaufnahme von Integrienen durch Makropinozytose. Auch hierbei kommt es zu einer Acquisition eines intrazellulären Integrin-pools. (13)

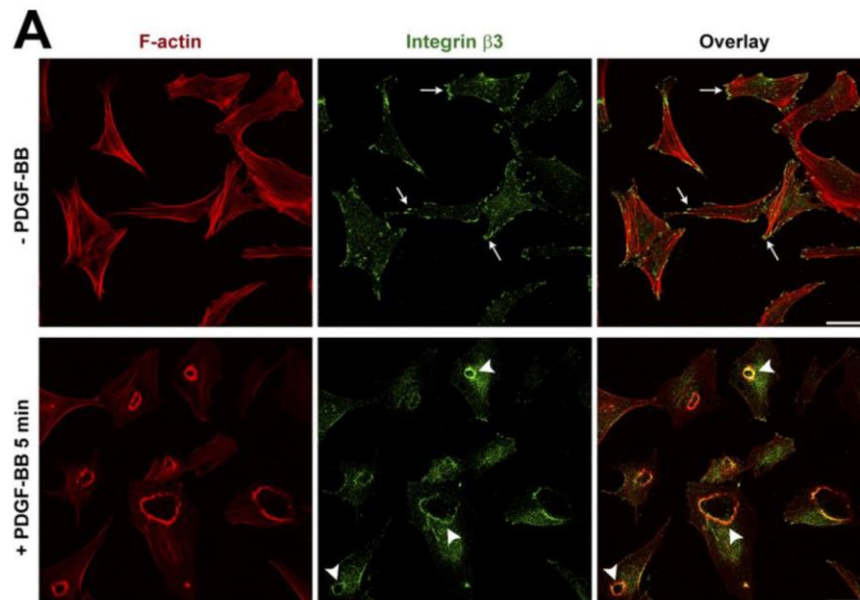
#### 1.4.2.3. Makropinozytose

Während die clathrinabhängige Endozytose eher beim basalen Integrinumsatz eine Rolle zu spielen scheint, gibt es Hinweise dafür, dass eine Induktion der Migration durch den GF eine Erhöhung der Makropinozytose bewirkt. Dies würde auch die

erhöhte Migration bei pathologischen Prozessen wie Inflammation und Wundheilung erklären, bei der eine Up-Regulation von GF getriggert wird.

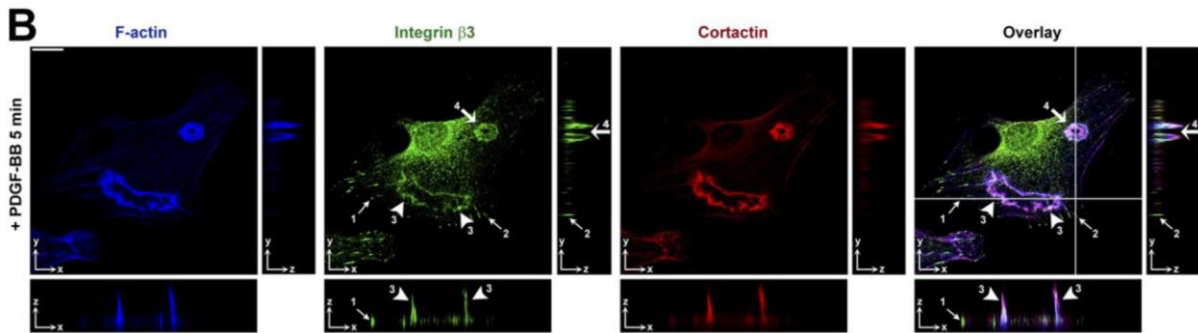
Wie oben beschrieben geht die Pinozytose von sogenannten circular dorsal ruffles (CDR) aus, die im Endeffekt große Strukturen des Actin-Umbaus darstellen und innerhalb von Minuten durch die Stimulation über GFs entstehen können. Dieser Mechanismus ist völlig autark und unabhängig von anderen Integrin-Internalisationsmodi. (9)

In einer Studie von Zhizhan Gu et al., bei der eine Stimulation von Mausfibroblasten mit PDGF durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass Integrine an Fokalen Adhäsionen kumulieren. Es wurde nun PDGF für fünf Minuten zugegeben und man konnte eine Verschiebung der Integrine zu actinreichen Strukturen, die CDRs entsprechen, beobachten (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10 - Dislokalisierung von Integrin  $\beta 3$  bei Stimulation durch PDGF:** Oben – 0 min. Zeitpunkt bei Applikation von PDGF, dabei von links nach rechts; verschiedene Kanäle einer F-Actin-Integrin  $\beta 3$ -Kofärbung mit retikulärer Struktur, unten: gleiche Färbung nach 15 Minuten: hier können die Adhäsionsbecher gesehen werden. (aus: (9)).

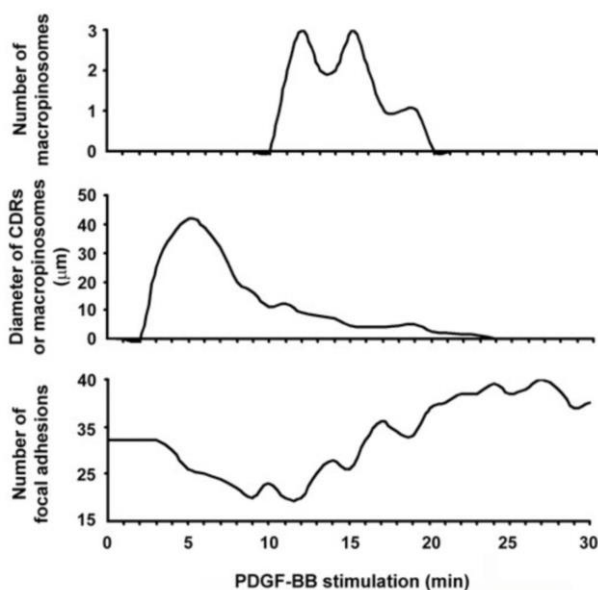
Dies wurde durch eine Kollokalisationsfärbung untermauert (Integrinfärbung und F-Actin/Cortactin für CDRs; siehe Abbildung 11). Dabei fiel weiterhin auf, dass diese Strukturen eine becherähnliche Gestalt annahmen, die aus dem Zellheck auswuchsen. Das Actinunabhängige Protein Major Histocompatibility Complex I (MHCI) folgte NICHT dieser Dynamik.



**Abbildung 11 - Kolokalisationsfärbung von Integrin  $\beta 3$  und CDRs:** Nach der Stimulation durch PDGF kommt es zu einem dynamischen Umbau des Zytoskeletts und einer Verlagerung der Integrine zu den mit Cortactin gefärbten CDRs (aus: (9))

CDRs haben eine begrenzte Halbwertszeit und unterliegen einer extrem schnellen Dynamik. So konnte vermutet werden, dass eine clathrin-/endozytoseunabhängige, direkte Recyclingroute existieren müsse. Nach der Bildung der oben beschriebenen Becherstrukturen sinken diese unter das Zellmembranniveau und bilden Makropinosomen. In dieser Arbeit wurden weiterhin die Anzahl von fokalen Zellkontakten, der Durchmesser von CDRs und die Anzahl der Pinosomen gemessen.

Es wird beschrieben, dass nach der Stimulation mit PDGF die Zahl der fokalen Adhäsionen abnimmt, der Durchmesser der CDRs zunimmt, was eine Verlagerung der Integrine dorthin vermuten lässt. Nach kurzer Zeit nimmt der CDR-Durchmesser wieder ab, die Zahl der Pinosomen jedoch zu; Pinosomen werden von CDRs abgeschnürt und internalisiert. Mit kurzer Latenz kann nun eine Zunahme der Anzahl der fokalen Adhäsionen gesehen werden (siehe Abbildung 12). (9)



**Abbildung 12 - Zeitlicher Verlauf eines Experimentes zur Dynamik der Makropinozytose:** oberes Diagramm – Verlauf der Anzahl an Makropinosomen, mittleres Diagramm – Verlauf des Durchmessers der Strukturen, unteres Diagramm – Verlauf der Anzahl an fokalen Adhäsionen. Alles wurde in Abhängigkeit zur Applikationszeit von PDGF dargestellt. (aus: (9))

In einem Western Blot konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Zunahme der Fokalkontakte nicht auf einen katabolen-anabolen-Integrinstoffwechsel beruht, sondern auf eine Redistribution der vorhandenen Integrine durch die Pinozytose.

Makropinosomen sind charakterisiert durch eine Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit, die Aufnahme von EEA1 in ihre Membran bei der Reifung und einen Verlust von F-Actin. Um zu zeigen, dass Integrine tatsächlich durch Makropinozytose bei GF-Stimulation recyclet werden, wurde dem Zellmedium fluoreszenzmarkiertes Dextran zugegeben. Es konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Stimulation mit PDGF eine Internalisation von antikörpermarkierten Integrinen in EEA-1 und F-Actin positive, jedoch Dextran negative runde Zellstrukturen stattfand. Dies deutet auf eine Aufnahme aus den CDRs hin, da aus CDRs keine Flüssigkeit resorbiert wird. Nach einer kurzen Wartezeit von zehn Minuten konnte dann eine Internalisation in typisch konfigurierte Makropinosomen dargestellt werden (Dextran positiv). Nach Auftreten dieser Strukturen wurde ein Einsetzen der Migration mit Redistribution von markierten Integrinen in die Zellfront beobachtet.

Der Weg der Pinosomen geht jedoch nicht direkt von CDRs zur Zellfront, sondern über frühe Endosomen (Kokalisation von Integrinantikörperfärbung und EEA-1, Rab5 und Rab4) und Recyclingendosomen (Rab11 positiv). (9)

Ein weiteres Protein, das für die Ausbildung von Pinosomen von Bedeutung ist, ist das Brefeldin-A-ADP-ribosylierte-Substrat (BARS). So konnte durch eine Downregulation von BARS über siRNA gezeigt werden, dass weniger Integrin-positive Makropinosomen entstehen konnten, die CDR-Bildung jedoch nicht beeinflusst wurde. Diese CDRs konnten Becher bilden und Invaginieren, waren jedoch nicht in der Lage zu kondensieren und Pinosomen abzuschneiden. Weiterhin wurde durch die Beeinflussung der Pinozytose eine verminderte Migrationseigenschaft auf einen PDGF-Stimulus gesehen.

Um die Rolle des Actin-Cytoskeletts für die Bildung von CDRs und die Integrintranslokation aus Fokalen Kontakten zu untersuchen und den Einfluss auf den schnellen Integrinumsatz zu beobachten, wurde das Protein WAVE1 herunterreguliert. Dies führte zu einem CDR-Bildungs-Stop und einer verminderten Pinosomenbildung, was eine Notwendigkeit der Actin-Remodellierung für den Integrinumsatz über Makropinozytose nahelegt. Auch der Abzug von Integrinen aus bestehenden Haftkontakten wurde durch die WAVE-Regulation erreicht.



All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Makropinozytose eher für die schnelle ligandengesteuerte Migration zuständig ist und die clathrin- und caveolin1-abhängige Endozytose eher für den basalen Integrinumsatz verantwortlich sind. (9)

#### 1.4.2.4. Sortierung der aufgenommenen Integrine

Neben der Aufnahme der Integrine in die Zelle stellt das intrazelluläre Recycling und die Degradation eine weitere Stellschraube der Zelladhäsion bzw. der Zellmigration dar. Diese Pathways sind für jeden Integrintyp unterschiedlich. Welches Schicksal das jeweilige Integrinmolekül erwartet, wird in den frühen Endosomen determiniert. Um Integrine vor der Degradierung in den späten Endosomen bzw. den Lysosomen zu schützen und wieder in die Plasmamembran einzubauen, werden Sorting-Nexine (SNX) vom Typ 17 und 31 an ein stark konserviertes Motiv der  $\beta$ -Untereinheiten der Heterodimere gebunden. Weiterhin gilt WASH, ein Arp2/3-Aktivator, als Sorting-Protein für das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin. Neben dem lysosomalen Abbau wird auch ein Abbau von  $\beta_1$ -Integrinen durch Autophagosomen beschrieben.

Bei Signalwegen, die ein Recycling aus frühen Endosomen steuern, muss man einen kurzen und einen langen Weg unterscheiden (siehe Abbildung 14). (2, 13)

Der Kurze Weg wird bei der Stimulation mit GF eingeleitet und führt über das kleine G-Protein Rab4. Initiiert wird dieser Weg von Rabaptin-5, welches schlussendlich über Zwischenwege Rab4 an Rab5 bindet. Dieser Komplex stellt ein Substrat für die PKD dar und vermittelt ein Recycling von Integrinen aus den frühen Endosomen. Dieser Signalweg wird vor allem für die Ausbildung von Lamellopodien an der Zellfront und somit auch der Zellmigration (bei geringer Fibronectindichte) benötigt. Weiterhin ist Supervillin, Rabenosyn-5 und Vps45 bei der Wiederverwertung von  $\beta$ -Integrinen involviert.

Das Perinukleäre Recycling Compartment (=PNRC) beschreibt ein zwischengeschaltetes Organell im Recycling von Integrinen, die den langen Recyclingweg beschreiten. Es ist gekennzeichnet durch Rab11. Darüberhinaus enthält es noch andere GTPasen wie Rab8, Rab22a oder Arf6. (2) (13)

Nicht nur Integrine, sondern auch anderer Cargo wird durch PNRCs recyclet. Jedoch gibt es einige Marker in den PNRCs, die spezifisch für die Integrinverwertung sind. Für das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin existiert das Rab-Coupling-Protein (RCP) welches als Rab11-

Effektor dient. Es existieren noch viele andere Pfade, die einen Integrinumsatz aus den bestehenden Integrin-pools steuern. Es soll hier nur noch die PKB/Akt-Pathway induzierte Phosphorylierung von Arf6-GAP-ACAP1-Complex beschrieben werden. Der Phosphorylierungsstatus entscheidet hierbei über die Interaktion mit  $\beta_1$ -Integrinen, deren Recycling über den Rab11-vermittelten langen Weg und somit die Migration in Richtung Fibronectin. (13)

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass verschiedene Integrine auch verschiedene Recyclingwege gehen müssen, um erneut an die Plasmamembran zu kommen. Diese Wege sind an komplexe Signalwege gekoppelt und sind noch nicht vollständig verstanden.

Recycling route	Integrin(s)	Key regulators	Comments
Rab4	$\alpha v \beta 3$	PKD1/2, Rabaptin-5, AMAP1, Rabip4, AAKL1, EHD3	Growth-factor-induced recycling in migrating fibroblasts, endothelial and cancer cells
	$\alpha 7 \beta 1$	Bro1 (HDPTP), Supervillin, hVPS42, Rabenosyn-5	Serum-induced recycling, inactive integrin
Rab11/Arf6	$\alpha 5 \beta 1 / \alpha v \beta 3$	PKB/Akt-GSK3b, Syndecan-4, Syntaxin-6	Src phosphorylation of Syndecan-4 dictates recycling of $\alpha v \beta 3$ versus $\alpha 5 \beta 1$ ; Syntaxin-6 localises to the perinuclear recycling compartment when trans-Golgi network cholesterol is depleted
	$\alpha 5 \beta 1$	RCP, DGK $\alpha$	Promoted by expression of gain-of-function mut-p53 or $\alpha v \beta 3$ inhibition/loss
	$\alpha 7 \beta 1$	PKB/Akt-ACAP1, Clathrin	PKB/Akt phosphorylates ACAP1 to recruit $\beta 1$ integrins, ACAP1 and clathrin form a recycling coat
		PKC $\epsilon$ , vimentin	Phosphorylation of vimentin releases $\beta 1$ -integrin-containing vesicles from the perinuclear region
		P120RasGAP	p120RasGAP displaces Rab21 from the $\alpha$ -subunit to promote recycling
		ACAP4	EGF induces Grb2-ACAP4 interaction to control recycling
		Rab35/Chloride intracellular channel 4 (CLIC4)	Rab35 suppresses Arf6-dependent recycling; CLIC4 inhibits Rab35 to promote recycling
		EHD1, MICAL-L1, Rab8a	MICAL-L1 links Rab8a to EHD1
		ARNO/Cytohesin-2	
		SNAREs, VAMP3, SNAP23/ Syntaxin-4	
	$\alpha 6 \beta 4$	Microtubules	Hypoxia stabilises microtubules to promote recycling and invasion
	LFA-1	Lipid raft	Recycling promotes neutrophil migration
Rab25	$\alpha 5 \beta 1$	CLIC3, Neu3	Sorting of inactive and active integrin for recycling in invasive cancer cells
Rab13	LFA-1	Mst1, DENND1C	Mst1 activates DENND1C (Rab13 GEF) to regulate lymphocyte motility/trafficking
Rab1a	$\alpha 7 \beta 1$		Recycling to lipid rafts
Arf1	$\alpha 5 \beta 1$	Phosphatase of regenerating liver-3	
Rap2	LFA-1		Internalisation and recycling in T-lymphocytes
?	$\alpha 3 \beta 1$	Syntaxin6/VAMP-3	Recycling via the trans-Golgi network
?	$\alpha 7 \beta 1$	Clathrin, Hip1, actin	Gyrating (G-) clathrin controls exit of internalised integrin from endosomes

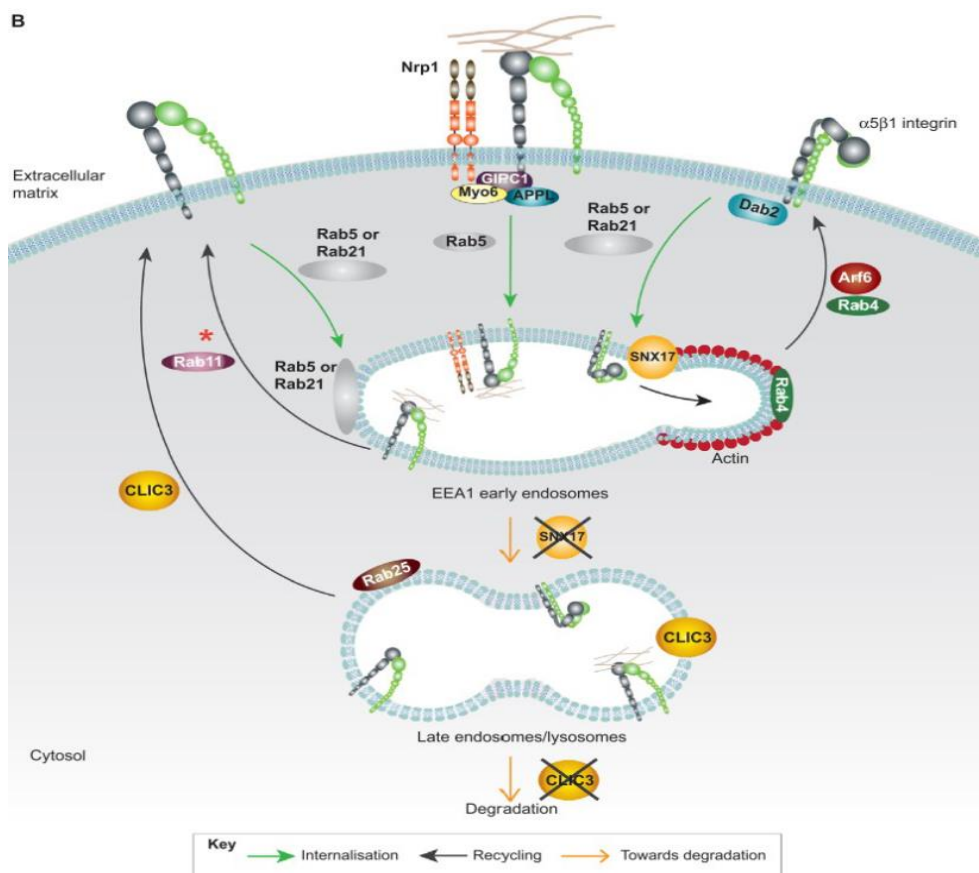
**Abbildung 13 - Übersicht der Integrinrecyclingrouten:** Beachte die mannigfaltigen Möglichkeiten des Integrinrecyclings über kleine GTPasen oder andere Enzymsysteme (aus (13))

Während Integrine normalerweise in den Lysosomen abgebaut werden, kommt es nach der Aufnahme von Integrinliganden wie Fibronectin im Sinne eines schnellen Recyclings zu einem Rücktransport zur Zellmembran. Dies trägt zur Migrations- und Invasionsfähigkeit bei. Weiterhin kann beispielsweise Rab25 direkt an die zytoplasmatische Domäne von  $\beta_1$ -Integrinen binden und den  $\alpha 5 \beta 1$ -Verkehr regulieren. Dies treibt die Migration und Invasion in fibronectinreicher ECM voran. Rab25-reiche Vesikel sind an der Spitze von Pseudopodien zu finden, in denen sie internalisiertes und inaktives  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin sortieren und für die Ausbildung neuer

Adhäsionsbereiche wiederverwerten und ein Auswachsen von Zellausläufern ermöglicht (siehe Abbildung 14). (2)

Rab25 bewirkt auch eine Aufnahme von aktiven Integrin  $\alpha_5\beta_1$  in Endosomen, die schlussendlich zu Lysosomen wandern, die mit dem chloride intracellular channel 3 (CLIC-3) ausgestattet sind. Dieser verhindert einen Abbau von Integrinen und veranlasst eine Wiederverwendung in der Plasmamembran. Dies bewirkt eine Aktivierung des Src-PKB/Akt-Signalweges und demnach eine Vorwärtsbewegung der Zelle. Bei Abwesenheit von CLIC-3 in der lysosomalen Membran erfolgt ein Abbau der internalisierten Integrine und es folgt eine verminderte Zellmotilität. (2)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der dynamische Auf- und Abbau von Integrin-ECM-Anheftungen essentiell für die Stabilisierung von Membranausstülpungen und der Ausübung von Kräften auf die Zellumgebung und das intrazelluläre Kompartiment ist. Dies macht eine Bewegung (= Migration) der Zelle möglich. Eine zentrale Stellschraube stellt das Recycling der Integrine dar (siehe Abbildung 14). (2)



**Abbildung 14 - Übersicht des Stoffwechsels von aktiven (ECM gebundenen) und inaktiven Integrinheterodimeren: Erklärung siehe Text! (aus: (2))**

#### 1.4.2.5. Steuerung des Integrinstoffwechsels

Kleine GTPasen sind wichtige Signalmoleküle der Zelle. Sie spielen bei mannigfaltigen Zellfunktionen eine dirigierende Rolle. Es gibt immer zwei Formen von kleinen GTPasen, einerseits eine aktive mit GTP beladene Form und eine inaktive mit GDP beladene Form. Der Wechsel von der einen zur anderen Form wird von Guaninnucleotid Exchange Factors (GEF) und GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) gesteuert. Bei Stoffwechselwegen, die den Integrinumsatz und die -funktion betreffen, sind vor allem kleine GTPasen aus der Rho-, Rab- und Arf-Familie von Bedeutung (siehe Abbildung 15). (2)

Rab-Proteine bilden die größte Gruppe von Molekülen, die den Transport von Vesikel bzw. deren Verschmelzung und Abschnürung steuern. Rab-Moleküle befinden sich in spezifischen endosomalen Membransystemen, sodass angenommen werden kann, dass jede GTPase eine einzigartige Funktion beim Recycling übernimmt.

Bei der Internalisation von Integrinen in frühe Endosomen spielen vor allem Rab5 und Rab21 eine Rolle. Dabei geht Rab21 eine direkte Verbindung mit dem aufzunehmenden Integrin über eine stark konservierte Sequenz der  $\alpha$ -Untereinheiten ein. Das Integrin wird dadurch in seiner Gesamtheit in ein EEA-1-positives frühes Endosom aufgenommen. Im Inneren des Endosoms konkurriert Rab21 mit dem p120RasGAP (RASA1) um die Bindungsstelle. Eine RASA1-Bindung bewirkt das Recycling von  $\beta_1$ -Untereinheiten zurück zur Plasmamembran, was für die Zellmigrationseigenschaften von Bedeutung ist. (2)

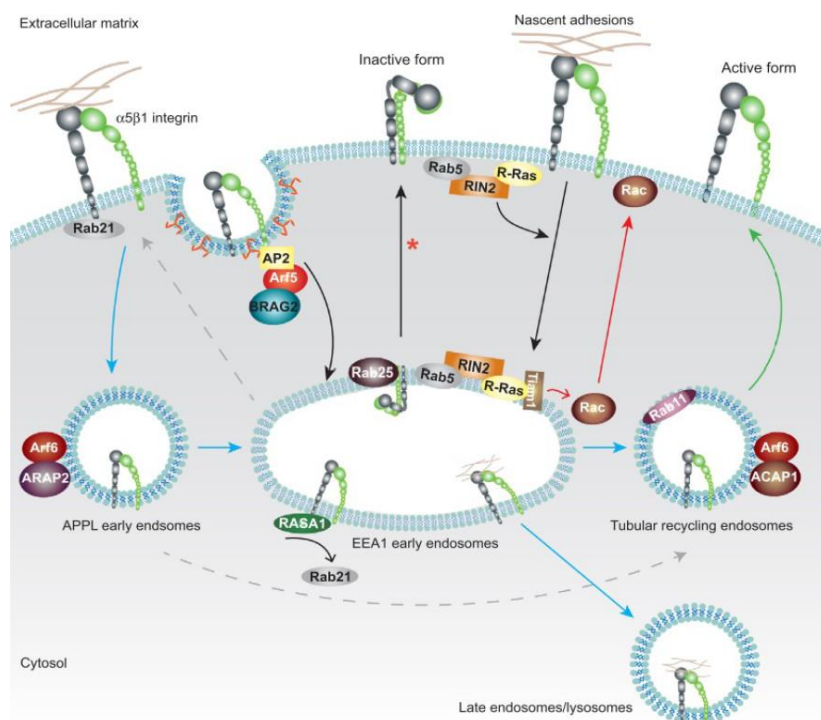
Rab25 spielt beim Recycling von  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen eine Rolle und ist hauptsächlich für den Rücktransport in Abhängigkeit vom Integrin-Rezeptorstatus aktiv. Wobei inaktive/unbesetzte Integrine einem schnellen Wiedereinbau in die Zellmembran folgen, um eine Migration zu fördern und aktive/besetzte Integrine einer Degradation in späten Endosomen zugeführt werden. (2)

Bei einer Interaktion von ECM und Integrinen wird des Weiteren R-Ras aktiviert, welches das Adaptorprotein RIN2 an die intrazelluläre Domäne der  $\beta$ -Untereinheit von ausbildenden Lamellopodien bringt. Dabei wird die Affinität von RIN2 für aktives Rab5 erheblich gesteigert und damit die Endozytose hochgefahren. Das Integrin wird dabei mitsamt des R-Ras-RIN2-Rab5-Komplex in das frühe Endosom aufgenommen, wobei R-Ras die GTPase Rac1 aktiviert. Rac1 wird dadurch in Folge an Arf6- vermittelt an die Plasmamembran transloziert, wobei die Actin-Polymerisation an der

Zellfront gesteigert wird. Dies wiederum fördert die R-Ras Aktivität (positives Feedback). Ein Inhibitor des im vorausgehenden beschriebenen Vorgangs stellt RNTre dar.(2)

Weiterhin gibt es sogenannte Arf-Proteine, welche eine relativ kleine Gruppe von kleinen GTPasen darstellen und eine Schlüsselrolle bei der Steuerung des Membranbaus spielen. Arf6 ist sowohl bei der clathrinunabhängigen Endozytose als auch beim Rücktransport zur Plasmamembran involviert. Für die Steuerung der Arf-Funktion sind unter anderem die GAPs ACAP1 und ARAP2 zuständig. Sie binden an Arf6-positive Endosomen und verursachen verschiedene Effekte auf die gebundenen Zellkompartimente. ARAP2 bindet das Protein APPL und verursacht einen Transport von  $\beta_1$ -Integrinen aus sehr frühen APPL1-positiven Endosomen über EEA1-positive frühe Endosomen. Dementgegen führt eine Bindung von ACAP1 zu einem schnelleren Integrinumsatz über Rab11-positive tubuläre Endosomen.

Arf5 spielt speziell bei der Endozytose von  $\beta_1$ -Integrinen eine Rolle. Dabei aktiviert das brefeldinresistente Arf-GEF 2 (BRAG2) Arf5 (aber auch Arf4 und Arf6), was in fibrillären fokalen Adhäsionen zu einer Integrininternalisation führt. BRAG2 wird dabei von Clathrin-Coated-Pits direkt an die Zellmembran gebunden und interagiert hier auch mit PI4,5P<sub>2</sub>, was seine Wirkung potenziert. (2)



**Abbildung 15 - Schema zur Verdeutlichung der Rolle von kleinen GTPasen bei der Verstoffwechslung von Integrinen:** Erklärung siehe Text (aus: (2))

#### 1.4.2.6. Aktivierung von Integrinen

Die Aktivierung von Integrinen ist komplex, da Integrine, je nach Zusammensetzung, eine spezifische Fülle an Bindungspartnern besitzen. Es gibt Integrine, die eher spezifisch an Proteine der extrazellulären Matrix binden und andere, die eine Vielzahl an Proteinen binden. Eine Bindungsstelle stellt die sogenannte RGD-Sequenz dar (Arginin-Glycin-Aspartat), die vielen Aktivatoren wie Fibronectin oder auch Laminin gemeinsam ist. Des Weiteren stellen Kollagentreptide eine Interaktionsstelle für kollagenbindende Integrine dar. (1)

Derzeit wird eine Interaktion des hochkonservierten RGD-Motivs bei Integrinen mit den Spike-Proteinen (S-Protein) des „Severe Acute Respiratory Syndrome related Coronavirus II“ (= SARS-CoV 2) vermutet. Das Virus solle sich bei diesem Vorgang an die Wirtszelle anheften, durch die Internalisation von Integrinen in die Zelle gelangen und die Zelle infizieren können. Diese Beobachtungen stellen auch eine weitere Hoffnung für die Therapie der Coronavirus-Disease-19 (= Covid 19) dar. Dabei soll durch integrinspezifische Antikörper wie Natalizumab oder Tirofiban versucht werden die Virusaufnahme zu hemmen. (16)

Eine Kommunikation mit immunglobulinähnlichen Strukturen spielt zum Beispiel bei der Adhäsion und Migration von Leukozyten am Endothel eine wichtige Rolle. Hier erkennen Integrine unter anderem Vascular-Cell-Adhesion-Molecules (VCAM) und Intercellular-Cell-Adhesion-Molecules (ICAM). ICAM-5 ist ausschliesslich in Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert und ist ein starker Induktor für das Auswachsen von Dendriten und wird bei der Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren durch Matrix-Metalloproteasen abgebaut.

Die Aktivierung der Integrine „von Außen“ induziert meist eine Konformationsänderung, welche eine Affinitätssteigerung hervorruft. Diese Änderungen sind vielfältig und meist spielt eine Verlagerung der  $\alpha$ 7-Helix der I-Domäne eine Rolle, was zu einem „Aufklappen“ der gebeugten Struktur des Integrindimers führt und in eine Clusterbildung aus mehreren aktivierten Integrinen führt (valency increase). (1)

Es soll im Folgenden vor allem auf die Phosphorylierung der  $\beta$ 1-Untereinheit eingegangen werden:  $\beta$ -Untereinheiten besitzen immer zwei wichtige zytoplasmatische NPxY/F-Sequenzen, welche bei  $\beta$ <sub>1</sub> an den Stellen N-780PIY und N792PKY zu finden sind. An diesen Stellen kann jeweils die Aminosäure Tyrosin (Y)

phosphoryliert werden. Schlussendlich ist die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domänen eine Möglichkeit, die Interaktion mit Adaptorproteinen und dem Zytoskelett zu steuern. Dies macht eine Steuerung von Downstreameffekten möglich.  $\beta_1$ -Untereinheiten können bei ihrer Aktivierung über ihre Liganden beispielsweise nach der Phosphorylierung durch das Protein 14-3-3 die kleine GTPase Cdc42 aktivieren, welches eine Polarisierung der Zellmembran über die Ausbildung eines Polaritätskomplexes, der die Proteinkinase C beinhaltet, hervorruft. Weiterhin steht die Aktivierung von Cdc42 mit der Ausbildung von Filopodien und dem Metabolismus des Actincytoskeletts in Zusammenhang.

Aber nicht nur Phosphorylierungen spielen bei der Regulation der Integrin-Funktionen eine Rolle, sondern auch Phosphatasen. Hier sei die Phosphatase A2 genannt, die bei der Interaktion des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  mit Kollagen eine Dephosphorylierung von Akt und der Glycogensynthase-Kinase 3 $\beta$  bewirkt und deren Funktion hemmt. Ein weiteres Beispiel stellt die Aktivierung der Tyrosin-Phosphatase TCPTP durch das  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin dar, was eine Down-Regulation des Epidermal-Growth-Factor-Signalweges hervorruft.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für eine einwandfreie Funktion der Integrinwirkung sowohl ein suffizientes Inside-Out-Signalling (Aktivierung der Integrine und konsekutive Affinitätserhöhung für den Liganden  $\rightarrow$  Adhäsion wird stärker) als auch ein Outside-In-Signalling (Rückkopplung bei Bindung mit folgender Regulation der Downstream-Pathways mit Erhöhung der Integrindichte an der Zelloberfläche usw.) von Nöten ist. (1) Die Integrinaktivierung ist ein sehr fein regulierter Prozess. (8)

Bei der Aktivierung der Integrine kommt es zu mannigfaltigen Prozessen innerhalb der Zelle. Hierunter wird auch der Signalweg der Phosphoinositol-3-Kinase (=PI3K) gezählt, der über verschiedene Zwischenschritte einen Einfluss auf das Zellüberleben, die Zellproliferation und auch auf den Umbau des Zytoskeletts hat. (10)

#### 1.4.3. Phosphoinositol-3-Kinase-Signalweg

Verbindungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) spielen eine essentielle Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen. Hierbei können

beispielsweise die Zellmotilität, Proliferation, Differenzierung, Genregulation und -expression und das Überleben der Zelle angeführt werden. An den Kontaktpunkten zwischen Zelle und ECM werden sogenannte fokale Adhäsionen gebildet. Diese werden über Integrine und mehrere Moleküle (Plaqueproteine) an Aktinbündel verankert. Einige Bestandteile dieser Komplexe beteiligen sich an der Verbindung von Membranrezeptoren und dem Zytoskelett, andere sind für die Interaktion bzw. Vermittlung von Signalkaskaden wie Proteinkinasen und -phosphatasen verantwortlich.

Die Integrin-Signalkaskade ist sowohl abhängig von der Aktivität der Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen-Aktivität von FAK, src und shc (in Abb. 16 blau), als auch deren Adaptorprotein-Funktionen. (17-20)

Die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) ist eine Lipid-Kinase, die die 3'-OH-Gruppen der Inositolringen von Membranlipiden wie Phosphoinositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) phosphoryliert und damit Einfluss auf etliche Stoffwechselwege nehmen kann. Als Produkt entsteht (unter anderem) Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>).

Es gibt drei Klassen der PI3K, die strukturell eng miteinander verwandt sind: PI3K Typ 1 bis Typ 3. PI3K1 ist der einzige Typ dieser Kinasen, der mit extrazellulären Stimuli gekoppelt ist. Das Hauptprodukt ist wie vorher dargestellt hauptsächlich PIP<sub>3</sub>, welches in Folge an pleckstrin-homology-Domänen (= PH-Domänen) von Proteinen binden kann und somit deren Aktivität oder ihre Translokation in die Plasmamembran beeinflussen kann. PI3K1 steht mit mannigfaltigen zellulären Prozessen im Zusammenhang: Zellzyklus, Zellwachstum, Zellüberleben, Zellmotilität und Zelladhäsion.

Die in-vivo-Funktion von PI3K2 ist noch nicht verstanden; PI3K3 soll im Zusammenhang mit dem intrazellulären Vesikeltransport stehen.

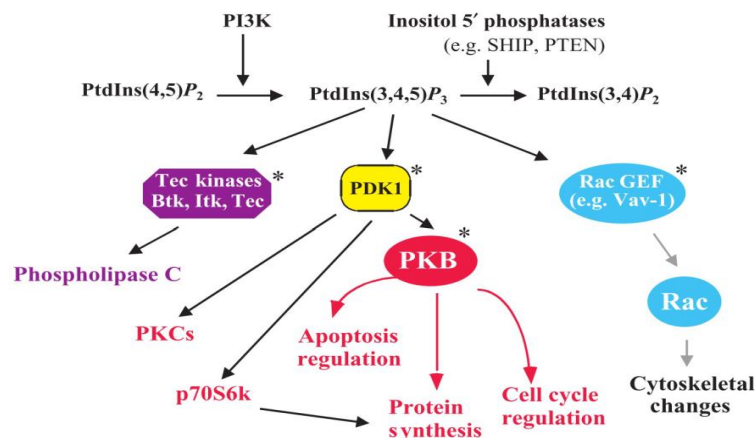
PI3K1 besitzt eine katalytische Untereinheit (4 Isoformen:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) und eine regulatorische Adapter-Untereinheit (p85).

Ein Weg der Aktivierung erfolgt über aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche durch eine hochaffine Bindung von SH2-Domänen (Src-homology Domänen) an spezifische phosphorylierte Domänen der cytosolischen Seite der Rezeptor-Tyrosinkinase zustande kommt. Hier kommt es auch durch p85 zum Kontakt von PI3K1 mit seinem Substrat – PIP<sub>2</sub> aus der Plasmamembran. Es entsteht PIP<sub>3</sub> (siehe Abbildung 16).



Ein weiterer Effekt von p85 ist die endogene Inhibierung der katalytischen Untereinheit, die ansonsten konstitutiv aktiv wäre.

Die Aktivierung von PI3K ist jedoch nicht nur rezeptorabhängig, sondern wird auch durch Interaktionen zwischen der Adapter-Untereinheit und Signalmolekülen anderer Signalkaskaden wie Shc, Grb2 und Gab2 (Zytokinantwort etc.) und heterotrimeren G-Proteinen aktiviert. (17-20)



**Abbildung 16 - Übersicht der Hauptsignalwege, die von PIP3 beeinflusst werden:** PIP3 steuert unter anderem die Phospholipase C, die unter anderem an der Calciumhomöostase beteiligt ist, weiterhin kann PIP3 den Zellzyklus und Apoptose sowie die Proteinsynthese beeinflussen. Schlussendlich wird über Rac auch der Umbau des Zytoskeletts beeinflusst. (aus: (2, 10))

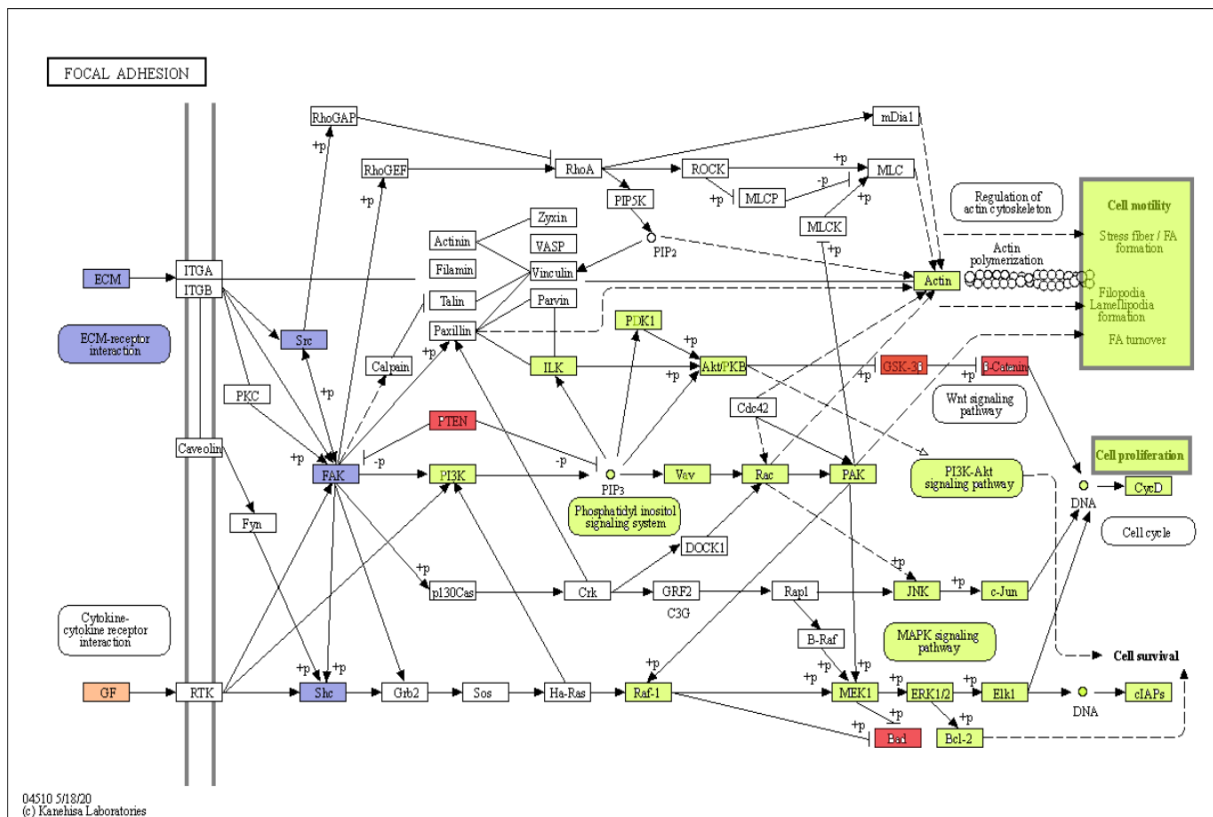
Wichtige Ziele der Produkte von PI3K sind die GTPasen Rac und Rho, die eine Schaltstelle für die dynamische Regulation und Organisation des Actin-Zytoskeletts sind. Des Weiteren spielen sie auch bei der Etablierung von Integrin-Interaktionsstellen eine Rolle (siehe Abbildung 16).

Dabei ist ein Weg von Bedeutung, der über PIP3 (Produkt von PI3K) vermittelt wird. PIP3 bindet an den Guaninnucleotide-exchange-factor (GEF) Vav-1, der folglich die Aktivität von Rac drastisch erhöht. RhoA reguliert die Bildung von Actin-Stress-Fasern und fokalen Adhäsionen. Rac1 kontrolliert die Ausbildung von Lamellopodien, ist auch an der Ausbildung von fokalen Adhäsionen beteiligt und kann den Rho-vermittelten Actin-Stoffwechsel ankurbeln.

Rac und Rho haben darüber hinaus auch noch andere Effekte auf die Zelle. Es wird eine Regulation von stressabhängigen MAP-Kinasen wie p38 und JNKs und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beschrieben.

Eine interessante Beobachtung ist, dass die PI3K-Stimulation nicht alle Funktionen von Rac/Rho in Erscheinung treten lässt. Eine Erklärung steht noch aus.

Ein weiterer essentieller Effekt von PI3K stellt die Beeinflussung von Serin/Threoninkinasen dar. Eine herausragende Stellung nimmt dabei die Proteinkinase B (PKB oder AKT) ein (Abbildung 17).



**Abbildung 17 - Integrin-PI3K-Signalweg mit Effektorsystemen:** Farben: Blau – Integrinvermittelte Enzymsysteme, Grün – Aktivierung von folgenden Enzymsystemen, Rot – Inhibitoren (aus: (5-7))

Bei der Regulierung von AKT interagiert dessen PH-Domäne mit PIP3, was zu einer Navigation zur Zellmembran und dessen Aktivierung führt. AKT wird dabei an zwei Stellen phosphoryliert (Thr308 und Ser473). Thr308 wird von der PIP3-abhängigen Protein-Kinase PDK-1, Ser473 vom mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) mit einem Phosphatmolekül beladen, was eine maximale Aktivierung von AKT bewirkt (Abbildung 17).

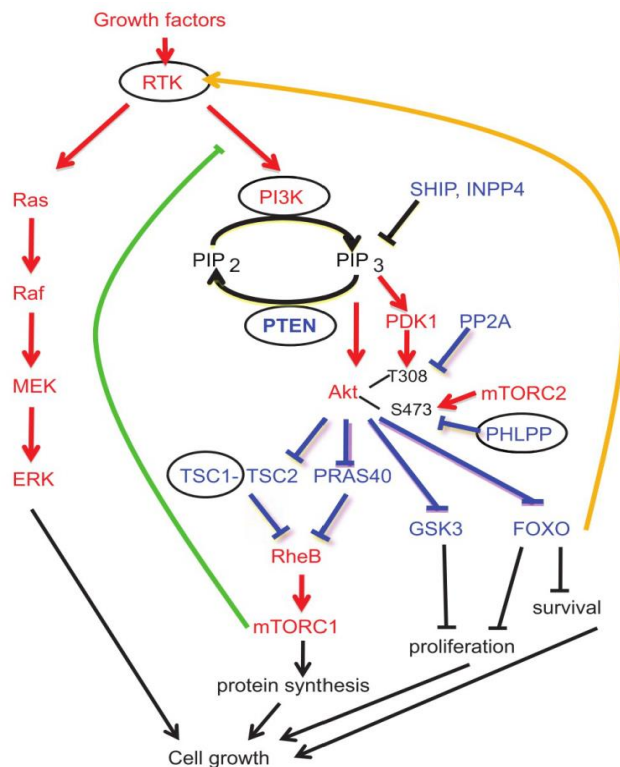
AKT spielt auch eine wichtige Rolle für das Zellüberleben, für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F) und den Zellzyklus. Weiterhin ist es am Glykogenstoffwechsel beteiligt. Hier hemmt es das Enzym Glykogensynthase-Kinase 3, welches die Glykogensynthase durch Phosphorylierung deaktiviert. Hierdurch

findet eine Disinhibierung des Glykogenstoffwechsels statt (siehe Abbildung 17). (10)  
(21)

Ein Beispiel für den Einfluss von AKT auf den Zellzyklus stellt die Inhibition der FOXO-Transkriptionsfaktoren dar, welcher normalerweise einen Zellzyklusarrest bedingt und auch an der Vermittlung der Apoptose über die proapoptische Bcl2-Molekülfamilie beteiligt ist. Durch AKT werden diese Wege disinhibiert. Folge ist eine verminderte Hemmung des Zellzyklusses sowie eine herabgesetzte Apoptosefähigkeit der Zelle (siehe Abbildung 17). (12)

Die epitheliale-mesenchymale Transformation ist ein wichtiger Bestandteil der embryonalen Entwicklung. Dabei kommt es zu einer Umwandlung von mesenchymalem Gewebe, das eine relative geringe interzelluläre Adhärenz und eine hohe Motilität besitzt, zu einem epithelialen Gewebe (z.B. Mesoderm), das durch feste Adhäsion und starke Zell-Zell-Verbindungen charakterisiert ist. Hierfür ist die Ausbildung von fokalen Adhärenzkontakten und der Umstrukturierung und Organisation von Zytoskelettanteilen von hohem Wert.

Xue et. al. zeigten, dass migrierende, mesodermale Zellen, die mit einem PI3K/AKT-Inhibitor behandelt wurden, keine von der Plasmamembran auswachsenden Strukturen wie Filopodien oder Pseudopodien mehr ausbilden konnten. Dies führt folglich zu einer verringerten Zellmigration. (21)



**Abbildung 18 - Inhibition des PI3K-Systems:** Der PI3K-Pathway kann auf verschiedenen Ebenen gehemmt werden, so katalysiert PTEN die Hydrolyse von PIP3 zu PIP2, PHLPP kann auf einer nachgeschalteten Ebene den Signalweg durch Hemmung von Akt bremsen. Ein weiterer wichtiger Inhibitor des Systems ist der mTORC1 Komplex, der ein intrinsisches physiologisches Steuerungsmolekül darstellt (aus: (12))

Einen intrinsischen Inhibitor des PI3K/AKT-Pathways stellt der mTOR-Komplex 1 dar. Dieser kann durch Rapamycin inhibiert werden, was zu einer gesteigerten Aktivität von PI3K/AKT führt (siehe Abbildung 18).

Ein weiteres wichtiges zelleigenes Instrument zur Hemmung des Signalweges stellt PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) dar (siehe Abbildung 18). Es wird auch als Tumorsuppressorgen bezeichnet, da es über die Hydrolyse von PIP3 die Funktionsgrundlage der downstream-Signale des PI3K/AKT-Signalweges hemmt und so zu einer geringeren Migrationsfähigkeit beiträgt. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass bei einem Ausfall von PTEN eine erhöhte Zellmigration folgen wird, was sich bei Tumorerkrankungen in erhöhter Metastasierungsrate bemerkbar macht (zweithäufigste Mutation eines Tumorsuppressorgenes nach p53).

Weitere Inhibitoren sind SHIP (Inhibierung von PIP3), PHLPP (Hemmung von AKT durch Inhibierung der Phosphorylierung von Ser473 – mTORC2) und PP2A (Hemmung von AKT durch Inhibierung der Phosphorylation von Thr308 – PDK1) (siehe Abbildung 16). (12)

### **1.5. Fragestellung/Ziele der Promotionsarbeit**

Nach Hinweisen aus Vorversuchen zur Untersuchung der Funktion des CLN7-Proteins konnte bei einer Genchip-Untersuchung eine Regulierung von Genen der Integrin-Familie und der folgenden Signalwege beobachtet werden. Der Frage nach der Auswirkung auf die Funktionen der Zelle wurde in dieser Promotionsarbeit nachgegangen. Hierfür wurden die Ergebnisse des Genchips mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR, Real-Time-PCR) verifiziert. Anschliessend wurden Experimente zur Testung der Migrationsfähigkeit und der Adhäsionsfähigkeit etabliert, um eine veränderte Integrinwirkung sehen zu können. Weiterhin sind Untersuchungen zur Zellteilungs-/Proliferationsrate durchgeführt worden, um Fehlerquellen bei der Auswertung des Migrationsassays in Sinne einer erhöhten Zellteilungsrate bzw. eines erhöhten Zellvolumens auszuschliessen. Auch wurden (Immun-) Fluoreszenzfärbungen angefertigt, um sowohl zytoskelettale Bestandteile wie Aktin und Tubulin als auch die  $\beta$ 1-Untereinheit der Integrine auf ihre Quantität und ihre Lokalisation zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zellkultur

**Table 1** - Verwendete Geräte für die Durchführung der Arbeiten an der Zellkultur

<b>Zellkultur-Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilbank – MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc./US
Mikroskop Zeiss Primovert	Carl Zeiss AG, DE
Inkubationsschrank C170 (37,0°C, 5,0% CO <sub>2</sub> )	Fa. Binder, Tuttlingen/DE
Wasserbad WNE 29 zur Erwärmung der Medien	Fa. Memmert, Büchenbach/DE
Zentrifuge EBA 20	Fa. Hettich, Tuttlingen/DE
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG/DE

**Table 2** - Verbrauchsmaterial für Arbeiten mit Zellkulturen

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
BD Microlance 3 Kanülen 22 G 1 1/4 0,7 x 30 mm	B. Braun Melsungen AG/DE
Menzel-Deckglas, rund, Ø 22 mm	Thermo Fisher Scientific Inc./US
Nunc™ EasYFlask™ Zellkulturflaschen (T25)	Thermo Fisher Scientific Inc./US
Zellkultur-/Petrischalen (35 mm x 10 mm; 60 mm x 15 mm)	Thermo Fisher Scientific Inc./US

#### 2.1.2. Zellen

**Table 3** - Im Verlauf der Promotion verwendete Zelllinien mit Herkunft und Spezies: Für HEK293T-Zellen wurde weiterhin in MFSD8-Wildtyp-Zellen und zwei Knockout-Linien unterschieden, die mit unterschiedlichen CRISPR-CAS-Guide-RNA hergestellt wurden und als 99.5 und 94.5 bezeichnet werden. MEF-Zellen lagen als Wildtyp und nur als eine Knockout-Variante vor.

<b>Zellart</b>	<b>Spezies</b>	<b>Ursprüngliches Gewebe</b>	<b>Bereitgestellt von</b>
HEK293T	Mensch	Menschliche embryonale Nierenzellen	CLN7-knockout Zellen: Monther Abu-Remaileh Assistant Professor of Chemical Engineering and Genetics Stanford University ChEM-H Building, Room: N227 290 Jane Stanford Way Stanford, CA 94305
MEF	Maus	Embryonale Fibroblasten	PD Dr.rer.nat. Stephan Storch, Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Klinikum Hamburg Eppendorf Campus Lehre N55 Martinistraße 52 20246 Hamburg

### 2.1.3. Lösungen

#### 2.1.3.1. Nährmedium

**Tabelle 4** - Zusammensetzung des Nährmediums für HEK293T- und MEF-Zellen

<b>HEK-/MEF-Nährmedium</b>	<b>Dosierung</b>
Modified Eagle´s Medium (MEM) mit Earle Salzen und L-Glutamin	500 ml
FCS	10%
Penicillin/Streptomycin	1%

#### 2.1.3.2. Zehnfache Ringerlösung

**Tabelle 5** - Zusammensetzung der zehnfachen Ringerlösung mit Stoffmenge und Angabe der Masse der Einwaage

<b>Ringerlösung 10-fach</b>	<b>Stoffmengenkonzentration (mM)</b>	<b>Einwaage (g)</b>
Natriumchlorid (NaCl)	1450	84,74
Kaliumchlorid (KCl)	36	2,68
Hepes-Puffer	50	11,62
Glucose	50	9,90
Wasser (Milli-Q)	ad 1000 ml	

#### 2.1.3.3. Einfache Ringerlösung

**Tabelle 6** - Inhaltsstoffe der einfachen Ringerlösung

<b>Ringerlösung 1-fach</b>	<b>Stoffmengenkonzentration (mM)</b>	<b>Einwaage (g)</b>
Ringer 10-fach	100 ml (= 1/10 der oben angegebenen Stoffmengenkonzentration der 10-fach Ringerlösung) NaCl – 145 mM KCl – 3,6 mM Hepes-Puffer – 5,0 mM Glucose – 5,0 mM	
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	1,0	1000 µl einmolarer Stammlösung MgCl <sub>2</sub>
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	1,3	1300 µl einmolarer Stammlösung CaCl <sub>2</sub>
pH-Wert Einstellung auf pH = 7,4 mit NaOH oder HCl (einmolar)	Dosierung nach pH-Wert	
Wasser (Milli-Q)	ad 1000ml	

#### 2.1.3.4. Phosphatgepufferte Salzlösung - PBS (zehnfach)

**Tabelle 7** - Rezeptur der zehnfachen phosphatgepufferten Salzlösung (= PBS) mit Stoffmenge und Masse der Einwaage

<b>PBS 10-fach</b>	<b>Stoffmengenkonzentration (mM)</b>	<b>Einwaage (g)</b>
Natriumchlorid (NaCl)	1370,000	80,063
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	18,000	2,450
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	103,000	18,230
Wasser (Milli-Q)	ad 1000 ml	

#### 2.1.3.5. Phosphatgepufferte Salzlösung - PBS (einfach)

**Tabelle 8** - Verdünnte gebrauchsfertige (= einfache) phosphatgepufferte Salzlösung mit Verdünnungsmodus

<b>PBS 1-fach</b>	<b>Stoffmengenkonzentration (mM)</b>	<b>Einwaage (g)</b>
PBS 10-fach	100 ml (= 1/10 der oben angegebenen Stoffmengenkonzentration der 10-fach Ringerlösung) NaCl – 137 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 10,3 mM	
pH-Wert Einstellung auf pH = 7,4 mit NaOH oder HCl (einmolar)	Dosierung nach pH-Wert	
Wasser (Milli-Q)	ad 1000ml	

#### 2.1.3.6. Agarose-Lösung

**Tabelle 9** - Zusammensetzung der Agaroselösung zur Beschichtung der 96-Well-Platten (F-Shape) für den Migrationsassay

<b>Agarose-Lösung (Well-Plates)</b>	<b>Dosierung</b>
Universal Agarose (VWR-Lifescience)	1 g
PBS 1x	100 ml

#### 2.1.3.7. Accutase-Lösung

**Tabelle 10** - Accutase-Gebrauchslösung für die Ablösung der Zellen für den Proliferationsassay

<b>Accutase 40 ml</b>	<b>Dosierung</b>
Accutase Cell Detachment Solution (Fa. Capricorn Scientific)	8 ml
PBS 1x	32 ml

### 2.1.3.8. Coating-Lösungen

**Tabelle 11** - Zubereitungen der Lösungen zur Beschichtung der 96-Well-Platten (U-Shape) mit Proteinen der extrazellulären Matrix für den Migrationsassay

<b>Kollagen I Lösung 8 ml</b>		<b>Dosierung in <math>\mu</math>l</b>
Collagen from calf skin (Fa. Sigma (C8919) 0.1% Solution) 1mg/ml		288
Streptomycin/Penicillin (Fa. Capricorn Scientific (PS-B) 100x)		80
Wasser (Milli-Q)		7632
<b>Kollagen IV Lösung 8 ml</b>		<b>Dosierung in <math>\mu</math>l</b>
Cultrex Mouse Collagen IV (R&D-Systems/Bio Techne GmbH) 1mg/ml		288
Streptomycin/Penicillin (Fa. Capricorn Scientific (PS-B) 100x)		80
Wasser (Milli-Q)		7632
<b>Laminin Lösung 8 ml</b>		<b>Dosierung in <math>\mu</math>l</b>
Cultrex Mouse Laminin I (R&D-Systems/Bio Techne GmbH) 1mg/ml		288
Streptomycin/Penicillin (Fa. Capricorn Scientific (PS-B) 100x)		80
Wasser (Milli-Q)		7632
<b>Fibronectin Lösung 8 ml</b>		<b>Dosierung in <math>\mu</math>l</b>
Bovine Fibronectin (Fa. PromoCell: C-43060) 1mg/ml		80
Streptomycin/Penicillin (Fa. Capricorn Scientific (PS-B) 100x)		80
PBS 1x		7840

**Tabelle 12** - Zusammensetzung der Coatinglösungen für die Beschichtung der Ibbi-Adhäsionskammern

<b>Fibronectin Lösung 1 ml</b>		<b>Dosierung in <math>\mu</math>l</b>
Bovine Fibronectin (Fa. PromoCell: C-43060) 1mg/ml		200
Streptomycin/Penicillin (Fa. Capricorn Scientific (PS-B) 100x)		10
PBS 1x		790



**Tabelle 13** - Zusammensetzung der Lösung zum Beschichten der Glasplättchen zur besseren Anheftung von HEK293T-Zellen für das Life-Cell-Imaging

<b>Coating-Medium (Glasplättchen)</b>	<b>Firma</b>	<b>Dosierung in ml</b>
F-12 Nut Mix (Ham)	Fa. Capricorn Scientific	97
Bovine Fibronectin 1 mg/ml	Fa. PromoCell	1
Collagen I from Claf Skin (0,1 % Solution)	Fa. Sigma	1
Bovine Albumin Fraction V (7,5 %)	Fa. Gibco	0,05
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Fa. Capricorn Scientific	1

### 2.1.3.9. Färbelösungen

**Tabelle 14** - Färbelösungen unter Angabe der Hersteller und Farbstoffziffern

<b>Färbelösungen</b>	<b>Firma</b>
Cytoskeleton-Kit (CY-SC006) – SiR Actin und SiR Tubulin + Verapamil	Fa. Spirochrome/Cytoskeleton Inc.
HOECHST-Färbelösung Zellkern (Bis-Benzimide H33342)	Fa. Sigma-Aldrich/US
Integrinantikörper - CD29 (Integrin beta 1) Monoclonal Antibody (eBioHMb1-1 (HMb1-1)), APC, eBioscience™	Fa. Invitrogen/Thermo Fisher Scientific

**Tabelle 15** – Antikörperverdünnungslösung unter Angabe der Zusammensetzung und des verwendeten Volumens der Zutaten

<b>Antikörper-Färbelösung 50 ml</b>	<b>Volumen in ml</b>
Bovines Serumalbumin Lösung (BSA) (Fraction V, Solution 7,5%)	0,25
Octoxinol 9 (TritonX-100)	0,02
Phosphate Buffered Salin (PBS) (1x)	50,00

### 2.1.3.10. Fixierlösung I

**Tabelle 16** – Rezeptur der Fixierlösung zur Herstellung eines fixierten Präparates für die Immunfluoreszenz. Die Bestandteile werden bei 70 °C gelöst und anschliessend ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

<b>Fixierlösung</b>	<b>Konzentration [mmol/l]</b>	<b>Einwaage in g</b>
NaCl	90,0	5,260
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15,0	3,423
EGTA	1,0	0,380
MgCl <sub>2</sub>	2,0	0,407
Saccharose	100,0	34,230
ParaformaldehydEM Grade	3,0	30,000
Wasser dest.	Ad 1000 ml	

### 2.1.4. Versuchsspezifisches Material

#### 2.1.4.1. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

**Tabelle 17** - Auflistung der verwendeten Primer jeweils als humane Variante für HEK293T-Zellen und als Mausvariante für MEF-Zellen. Alle Primer wurden bei der Firma Invitrogen bestellt.

<b>Primer</b>	<b>Produkt des Primers</b>	<b>Primersequenz</b>	<b>Temp. [°C]</b>
hITGB1-se	Integrin $\beta$ 1-Untereinheit (human) NM_002211.4	GCCGCGCGGAAAAGAT GA	61.50
hITGB1-as	Integrin $\beta$ 1-Untereinheit (human) NM_002211.4	TTGAATTTGTGCACCAC CCAC	59.86
mITGB1-se	Integrin $\beta$ 1-Untereinheit (Maus) NM_010578.2	CTTGTTGGTCAGCAACGCAT	59.69
mITGB1-as	Integrin $\beta$ 1-Untereinheit (Maus) NM_010578.2	CAGCCAATCAGCGATC CACA	60.75
hITGA2-se	Integrin $\alpha$ 2-Untereinheit (human) NM_002203.4	TTAGCGCTCAGTCAAGGCAT	59.75
hITGA2-as	Integrin $\alpha$ 2-Untereinheit (human) NM_002203.4	TTGCTTCTGGGAGACCA ACA	59.16
mITGA2-se	Integrin $\alpha$ 2-Untereinheit (Maus) NM_008396.3	ACCCGATCCACCAACAT CAA	59.30
mITGA2-as	Integrin $\alpha$ 2-Untereinheit (Maus) NM_008396.3	CCGGCTGTTACCTTGA GGG	60.08
hDDR2-se	Discoidin Domain Receptor Tyrosin Kinase 2 (human) NM_001014796.3	TGCACCCGTTGATATGC CTC	60.46
hDDR2-as	Discoidin Domain Receptor Tyrosin Kinase 2 (human) NM_001014796.3	GAGTCCAGCCAAAGGT CTCC	60.04

<b>Primer</b>	<b>Produkt des Primers</b>	<b>Primersequenz</b>	<b>Temp. [°C]</b>
mDDR2-se	Discoidin Domain Receptor Tyrosin Kinase 2 (Maus) XM_006496696.4	CACCGGCAAAGTGGAA AAAGA	59.59
mDDR2-as	Discoidin Domain Receptor Tyrosin Kinase 2 (Maus) XM_006496696.4	AGGTCGCTTGTAGATTT CCTTCC	60.37
hTNC-se	Tenascin C (human) XM_017014678.2	TCTCGCCCATCGGAAA GAAAA	60.00
hTNC-as	Tenascin C (human) XM_017014678.2	GGCTCTAGGGCTCTAG GGTAT	59.64
mTNC-se	Tenascin C (Maus) NM_001369211.1	CACGGCTACACAGAG GC	60.13
mTNC-as	Tenascin C (Maus) NM_001369211.1	GTCCAGCAGCTTCCCA GAAT	60.03
hSDC3-se	Syndecan 3 (human) NM_014654.4	GAGGTGCTCGTAGCTG TGATT	60.13
hSDC3-as	Syndecan 3 (human) NM_014654.4	AGCAGTGTGACCAAGA AGGC	60.54
mSDC3-se	Syndecan 3 (Maus) NM_011520.3	CGCGGGGGCTCAACG	60.56
mSDC3-as	Syndecan 3 (Maus) NM_011520.3	CCTGCTCGAAGTAGCC AGAG	59.90
hLAMA1-se	Laminin $\alpha$ 1-Untereinheit (human) NM_005559.4	TGGCCTGTTGGTCAGG TAAA	59.15
hLAMA1-as	Laminin $\alpha$ 1-Untereinheit (human) NM_005559.4	GCATCTTGCTGAGACG GGAT	60.18
mLAMA1-se	Laminin $\alpha$ 1-Untereinheit (Maus) NM_008480.2	TGGCTATCCTGCCACACA TC	59.16
mLAMA1-as	Laminin $\alpha$ 1-Untereinheit (Maus) NM_008480.2	GTAGGTCAAAGGCTCG GCTC	60.46
hCOL4A5-se	Kollagen 4 $\alpha$ 5-Untereinheit (human) NM_000495.5	GTCATCACTGCCAGGA CCAA	59.96
hCOL4A5-as	Kollagen 4 $\alpha$ 5-Untereinheit (human) NM_000495.5	GGGACCAGGTAGGCCT TGTA	60.62
mCOL4A5-se	Kollagen 4 $\alpha$ 5-Untereinheit (Maus) NM_053185.2	CTTCCCCACACTGTCCT GAAT	59.65
mCOL4A5-as	Kollagen 4 $\alpha$ 5-Untereinheit (Maus) NM_053185.2	GAACAGCCACAATCCA GGGT	60.25
hCOL4A6-se	Kollagen 4 $\alpha$ 6-Untereinheit (human) NM_001287758.1	CCACTTCGTCCACCTAC TCTG	59.80
hCOL4A6-as	Kollagen 4 $\alpha$ 6-Untereinheit (human) NM_001287758.1	AGCAGCCACAACCCAG G	59.50
mCOL4A6-se	Kollagen 4 $\alpha$ 6-Untereinheit (Maus) NM_001163155.1	CCTGGTTCTCCTGGTCA AGC	60.32
mCOL4A6-as	Kollagen 4 $\alpha$ 6-Untereinheit (Maus) NM_001163155.1	CTGTACCTGGTGGACC TTGAA	59.30

**Tabelle 18** – Geräte und Kits zur Durchführung der qPCR Untersuchung mit Herstellerangabe

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
LightCycler® 480 Instrument II (96-well)	F. Hoffmann-La Roche AG (CH)
NucleoSpin® RNA Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (DE)
Reverse Transcription System	Promega Corporation (US)
Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue	Eurogentec (BE)
Dulbecco´s Phosphate Buffered Salin (DPBS)	Thermo Fisher Scientific Inc./US

#### 2.1.4.2. Migrationsassay

**Tabelle 19** - Geräte und Verbrauchsmaterial zur Durchführung des Migrationsassays

<b>Migrationsassay</b>	<b>Hersteller</b>
96-Well-Platten F-Shape, 0,36 ml	nerbe plus GmbH, 21423 Winsen/Luhe/DE
96-Well-Platten U-Shape, 0,36 ml	nerbe plus GmbH, 21423 Winsen/Luhe/DE
Deckel 96-Well-Platten	nerbe plus GmbH, 21423 Winsen/Luhe/DE
Mikroskop Zeiss Observer Z1	Carl Zeiss AG, DE
Software Zeiss Zen Blue	Carl Zeiss AG, DE

#### 2.1.4.3. Adhäsionsassays

**Tabelle 20** - Geräte und Verbrauchsmaterial zur Durchführung der Adhäsionsassays

<b>Adhäsionsassays</b>	<b>Hersteller</b>
Adhäsionskammern: $\mu$ -Slide VI 0.4 Uncoated: #1.5 polymer coverslip, hydrophobic, sterilized	Ibidi GmbH, 82166 Gräfelfing/DE
Rollerpumpe PPS 2	multichannel systems, 72770 Reutlingen/DE
Mikroskop Zeiss	Carl Zeiss AG, DE
Software Zeiss Zen Blue	Carl Zeiss AG, DE
Schüttler: Neolab Shaker DOS-10L	Neolab/DE
Venenverweilkanülen 14G	Fa. Braun/DE
Infusionssystem: AIR-P	Fa. Braun/DE
Vollelektrolytlösung: Jonosteril in Plastikflasche	Kabi/Fresenius/DE
Software zur Auswertung der Fluoreszenzfläche: Image J 2.0 (64-bit)	ImageJ

#### 2.1.4.4. Fluoreszenzfärbungen

**Tabelle 21** – Verbrauchsmaterial für die Durchführung der Färbeversuche

<b>Immunfluoreszenz</b>	<b>Hersteller</b>
Menzel-Deckglas, rund, Ø 22 mm	Thermo Fisher Scientific Inc./US
Leibovitz´s Medium (L15 Medium)	Fa. Gibco
Dulbecco´s PBS (1x) ohne Ca/Mg und Phenol Red	Corning Scientific
Polysine Objektträger, geschliffen, geputzt, gebrauchsfertig – 25 x 75 x 1,0 mm	O. Kindler GmbH/DE
Dako Glycergel Mounting Medium	Aligent Technologies/US

#### 2.1.4.5. Proliferationsassay

**Tabelle 22** - Geräte und Verbrauchsmaterial zur Durchführung des Proliferationsassays

<b>Proliferationsassay</b>	<b>Hersteller</b>
CaSy 2 TT – Cell Counter and Analyzer	Roche Diagnostics Ltd., Mannheim/DE
CaSy-Cups	OMNI Life Science GmbH, Bremen/DE
CaSy-Ton-Lösung	OMNI Life Science GmbH, Bremen/DE

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Als Grundlage der Untersuchungen in dieser Arbeit diente eine in der Vergangenheit durchgeführte Genchip-Untersuchung von CLN7-defizienten Zellen. Hierbei wurden CLN7-Wildtypzellen, MFSD8-knockout-Zellen und CLN7-EGFP-transfizierte Knockout-Zellen verglichen. Eine bedeutende Differenz unter diesen Gruppen bestand hierbei bei Genen, die für die Zell-ECM-Interaktion wichtig sind. Diese codieren für die beiden Integrinuntereinheiten  $\beta_1$  und  $\alpha_2$  (ITGB1, ITGA2), das nicht-Integrin-Adhäsionsmolekül Discoidin-Domain-Tyrosinkinase-Rezeptor 2 Protein (DDR2) und Proteine der extrazellulären Matrix (Syndecan 3 – SDC3, Tenascin – TNC,  $\alpha_1$  Untereinheit des Laminins LAMA1 und die Kollagen-IV-Untereinheiten A5 und A6 – COL4A5 und COL4A6). Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde eine quantitative Polymerase Kettenreaktionsuntersuchung durchgeführt. Weiterhin wurden MEF-Zellen als Knockout- und Wildtyp-Variante untersucht.

Für die Durchführung dieser Untersuchung war eine Isolation von mRNA aus den MEF-Zellen erforderlich (mRNA aus HEK-Zellen lagen bereits aus der Gen-Chip-Untersuchung vor). Hierfür wurde das RNA-Isolationskit NucleoSpin® von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (DE) verwendet und nach deren Protokoll verfahren. Dafür wurden die Zellen in 6-well-Platten ausgesät und bei Erreichen der gewünschten Zelldichte lysiert. Die Zellen wurden auf Eis mit Dulbecco's Phosphate Buffered Salinlösung (DPBS) gewaschen und im Anschluss pro Well 350  $\mu$ l RA1-Puffer mit 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben. Danach erfolgte die Lösung der Zellen vom Schalenboden mit einem Zellschaber und die Überführung in ein Eppendorf-Cup mit nachfolgender Homogenisierung. Schliesslich wurde die Lösung auf einen NucleoSpin®-Filter aufgetragen und eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Die Filter wurden dann mit 350  $\mu$ l 70%igem Ethanol versehen. Es folgte die RNA-Isolation durch Auftragen auf spezielle Säulen des Herstellers. Durch einminütiges Zentrifugieren bei 11.000 g wurde die RNA spezifisch an die Säule gebunden. Danach wurden die NucleoSpin®RNA-Säulen durch Zugabe von 350  $\mu$ l des Membrane Desalting Puffers sowie durch einminütiges Zentrifugieren bei 11.000 g entsalzt. Letztendlich erfolgte die Behandlung mit 10  $\mu$ l rDNase (+ 90  $\mu$ l rDNase-Reaction-Puffer) zum Verdau von DNA-Verunreinigungen. Nach 15 Minuten wurde

diese Reaktion durch mehrere Waschschrirte beendet. Es folgte ein Waschrirrit mit 200 µl RAW2-Puffer und einminütiger Zentrifugation bei 11.000 g, ein zweiter Waschrirrit mit 600 µl RA3-Puffer für 3 Minuten bei 11.000 g und ein drittes Waschen mit 250 µl RA3-Puffer mit nachfolgender Zentrifugation bei 11.000 g über 3 Minuten bis zur Trocknung der Säule. Abschließend wurden die Säulen in 1,5 ml fassende Eppendorf-Cups gestellt und die RNA mit 40 µl RNAse-freiem Wasser und Zentrifugation bei 11.000 g ausgewaschen. Als letzten Schrirrit konnte eine Qualitätskontrolle mittels Photometrie durchgeführt werden und die RNA-Lösung bei - 80 °C für längere Zeit gelagert werden.

Für die Durchführung einer quantitativen Real-Time-PCR ist jedoch DNA nötig. Dies erfordert ein Umschreiben von RNA in DNA und ist mit Hilfe der reversen Transkription möglich. Das Schlüsselenzym für diesen Vorgang stellt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase dar (= reverse Transkriptase), die eine komplementäre DNA (= cDNA) der vorliegenden RNA synthetisiert. Diese cDNA diente später als Grundlage für die qPCR.

Die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des Reverse Transcription System der Promega Corporation (US). Das durchgeführte Protokoll entsprach den Herstellerempfehlungen und wurde wie folgt umgesetzt:

Zu Beginn wurden 4 µg RNA und 4 µl Random-Primer mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 56 µl verdünnt und über 5 min bei 70 °C inkubiert. Dies war nötig, um Sekundärstrukturen der RNA und der eingesetzten Bestandteile zu durchbrechen und ein optimales Bindungsverhalten zu gewährleisten. Um die Restitution von Sekundärstrukturen zu verhindern, wurden die Proben unmittelbar nach dem Denaturierungsschrirrit auf Eis gekühlt. Folgend wurde 20 µl Reverse-Transkriptase-Puffer, 5 µl dNTP-Mix, 4 µl RNAse-Inhibitor und 15 µl Aqua dest. hinzupipettiert, wodurch ein Gesamtvolumen von 100 µl entstand.

Von dieser Lösung wurden 10 µl für die Kontrolllösung ohne Reverse Transkriptase abgezogen und zu den verbleibenden 90 µl 3,5 µl Monolay Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) hinzugefügt. Die Hybridisierung der Primer mit den RNA-Molekülen erfolgte bei einer Inkubation von 10 Minuten unter Raumtemperatur. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch für 50 Minuten auf 50 °C erwärmt, um eine Elongation der cDNA zu erreichen. Den letzten Schrirrit stellte die

Terminierung der M-MLV RT-Aktivität dar, die durch eine Erhitzung auf 70 °C über 15 Minuten erfolgte.

Hieran schloss sich die eigentliche Durchführung der qPCR (= quantitative Real-Time-PCR) an. Die Grundlage dieser Untersuchungsmethode bildet die exponentielle Replikation der ursprünglichen DNA und deren photometrische Darstellung. Diesen Verlauf kann man in Echtzeit nach jedem Replikationsdurchgang verfolgen. Die Quantifizierung des DNA-Gehaltes erfolgt durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green, welcher mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA bindet und dabei seine Intensität um den Faktor 1000 erhöht. Damit ist die Fluoreszenzintensität proportional zur entstehenden DNA-Menge.

Der Reaktionsansatz setzte sich aus 10 µl Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue des Unternehmens Eurogentec (BE), jeweils 0,5 µl eines Sense-/ Antisense-Primers für das jeweilige Gen, 3,5 µl Wasser und 1 µl des Templates zusammen. Dieser Master Mix beinhaltet eine Hotstart-DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Puffer, sowie den Fluoreszenzfarbstoff SYBRgreenI. Eine Listung der Sequenzen und der Annealing-Temperaturen der Primer kann in Tabelle 14 eingesehen werden. Alle eingesetzten Primer stellten sogenannte Intron-Spanning-Primer dar

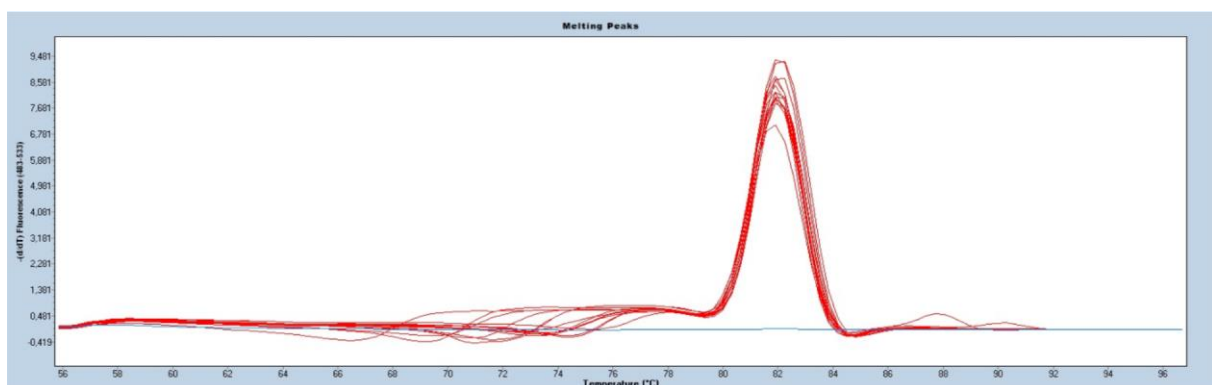
Die Reaktionslösungen wurden in 96-Well-Platten pipettiert. Die Katalyse wurde in dem LightCycler® 480 Instrument II (96-well) der F. Hoffmann-La Roche AG (CH) durchgeführt. Für die Vervielfältigung der cDNA wurden 40 Vermehrungszyklen durchgeführt. Dabei entfielen 3 Minuten auf eine Aktivierung der Polymerase auf 95 °C, 15 Sekunden auf eine Denaturierungsphase bei 95 °C, 20 Sekunden Annealing bei 57 °C und eine Elongationsphase von 20 Sekunden bei 72 °C. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte jeweils am Ende der Elongation.

Als Negativkontrolle diente die Lösung ohne Reverse Transkriptase (RT). Dabei sollte kontrolliert werden, ob eine Verunreinigung mit DNA bestand. Da bei fehlender RT keine cDNA synthetisiert werden kann, sollten in der Negativkontrolle keine DNA-Moleküle vorliegen. Somit kann in der qPCR kein Produkt amplifiziert werden. Dies konnte durch einen sehr hohen C<sub>t</sub>-Wert verifiziert werden. Der C<sub>t</sub>-Wert (C<sub>t</sub> - cycle threshold) bezeichnet den PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz der amplifizierten DNA signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Je größer die Template-



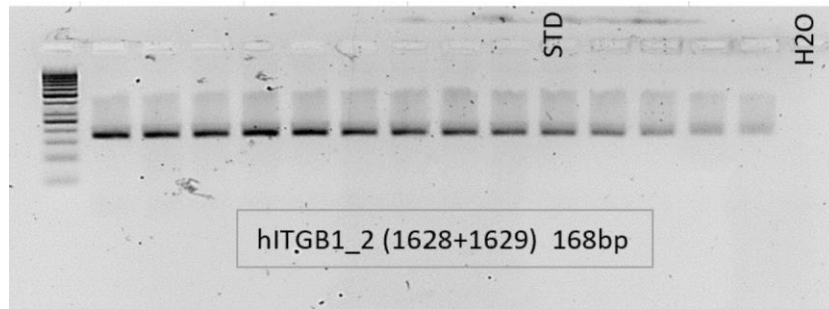
Menge, desto früher übersteigt die Fluoreszenz den Hintergrund und desto kleiner stellt sich der  $C_T$ -Wert dar.

Die synthetisierte DNA wurde nach dem Amplifizieren erneut langsam von 60 °C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz gemessen, um das Schmelzverhalten zu untersuchen. Mit dieser Methode sollten Verunreinigungen des quantitativen PCR-Produktes mit unspezifischen Amplikons detektiert werden. Da der Fluoreszenzfarbstoff SYBRgreenI unspezifisch mit DNA interkaliert, käme es dabei zu einem falsch niedrigen  $C_T$ -Wert. Bei 56 °C liegen alle DNA-Moleküle doppelsträngig vor und SYBRgreenI kann ohne Probleme binden und sein Fluoreszenzpotential voll ausschöpfen. Bei der Erhöhung der Temperatur wird jedoch nach und nach der Doppelstrang aufgebrochen und der Farbstoff kann nicht mehr binden. Das Signal nimmt ab. Die größte Änderung des Fluoreszenzsignals findet bei der Temperatur  $T_m$  statt. Hier liegt die Hälfte der DNA als Doppelstrang vor. Da  $T_m$  von der Größe des DNA-Moleküls abhängig ist, kann bei Vorliegen nur eines Peaks das Vorhandensein weiterer unspezifischer Produkte weitestgehend ausgeschlossen werden (Beispiel siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19 - Schmelzkurve des ITGB1-Reaktionsansatzes:** Einzelner Peak spricht hierbei für nur ein Amplikon ohne Verunreinigungen.

Zusätzlich wurden die PCR-Produkte auf einem 3%igen Agarosegel aufgebracht und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde darauf geachtet, dass nur eine einzelne sauber abgrenzbare Bande entsteht. Diese Schritte sind zur Untersuchung der Spezifität von Nöten (Beispiel in Abbildung 20).



**Abbildung 20 - Gelelektrophorese des ITGB1 Reaktionsansatzes:**  
saubere einzelne Banden sprechen für eine gute Reinheit der Probe.

Für die Auswertung der Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR wurden die  $C_t$ -Werte herangezogen. Um die Daten aus der PCR vergleichen zu können, wurden allen Daten auf ein sogenanntes „Housekeeping-Gen“ normalisiert. Es wird davon ausgegangen, dass solche Gene in Zellen gleicher Organe von verschiedenen Tierarten in gleichem Umfang exprimiert werden.  $\beta$ -Actin stellt ein solches System dar. Die Normalisierung soll somit einer großen Schwankung der eingesetzten cDNA-Menge vorbeugen, die durch unterschiedliche Effizienzen der cDNA-Synthese oder aber verschiedene Zellzahlen entstehen können.

### 2.2.2. Migrationsassay (Neurosphere-Assay)

Zelladhäsion stellt einen sehr komplexen, fein regulierten Prozess der Zelle dar. Man muss hier zwischen einer chemotaktisch/haptotaktisch stimulierten und gerichteten Migration unterscheiden, die vor allem bei Zellen des Immunsystems von immenser Bedeutung ist, und einer ungerichteten Zellmigration, die vor allem bei der Zell-ECM-Interaktion von jeglichen Zellen von Bedeutung ist. Der Neurosphere-Assay ist ein Test zur Überprüfung der ungerichteten Migrationsfähigkeit einer Zelle und stellt eine Abwandlung des Under-the-Agarose-Gel-Tests dar. (22) Er basiert auf der Ausbildung von kugeligen, schwebenden Zellanhäufungen in sogenannten U-Wellen von Microplatten, die mit Agarose beschichtet sind. Kultivierte Zellen können hierauf nicht anwachsen und lagern sich zu ihrer thermodynamisch und mechanisch stabilsten Form zusammen. Diese Gebilde beschreiben die Form einer Kugel. (23) Werden diese Sphären nun auf eine Oberfläche aufgebracht, an der sie anwachsen können, so werden sie versuchen flächig, zentrifugal auszuwachsen und zu migrieren. Somit kann nach der Beschichtung (= Coating) mit bestimmten Molekülen

die Migrationsfähigkeit der Zellen auf unterschiedlich gecoateten Oberflächen untersucht werden. Dafür muss die Fläche der auswachsenden Zellkugeln in der Aufsicht (Mikroskop) direkt nach der Aussaat auf der neuen Oberfläche und nach definierten Zeitspannen gemessen werden. Die Migrationsfähigkeit der Zellen stellt eine Funktion der Flächenvergrößerung über die Zeit dar. (24)

Für den Test wurden 96-well-Platten mit 1%iger Agarose beschichtet. Dafür wurde eine Lösung von Agarose in PBS im Verhältnis 1/100 unter Erhitzen vollständig gelöst. Danach befüllte man die Wells mit 100 µl Agarose, welche bei Raumtemperatur abkühlten. Anschließend wurden jeweils 5000 Zellen in einem Volumen von 200 µl/Well ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Parallel wurden die finalen Wellplatten mit verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet:

Die Beschichtung mit Laminin erfolgte mit 10 µg/cm<sup>2</sup>, wobei ein Well eine Fläche von ca. 0,36 cm<sup>2</sup> aufweist (entspricht 3,6 µg/Well). Die Inkubation erfolgt für 2-3 Stunden bei 37 °C. (25-27)

Fibronectin (1 mg/ml Stammlösung mit Verdünnung auf 10 µg/ml in PBS) wurde mit einer Dosis von 2-5 µg/cm<sup>2</sup> in einem möglichst geringen Volumen in ein Well appliziert (entspricht 0,27-1,8 µg/Well), unmittelbar danach abgesaugt und mindestens für 60 Minuten luftgetrocknet. Die abgesaugte Lösung kann für den nächsten Testdurchgang verwendet werden (Protokoll nach PromoCell, (28, 29)).

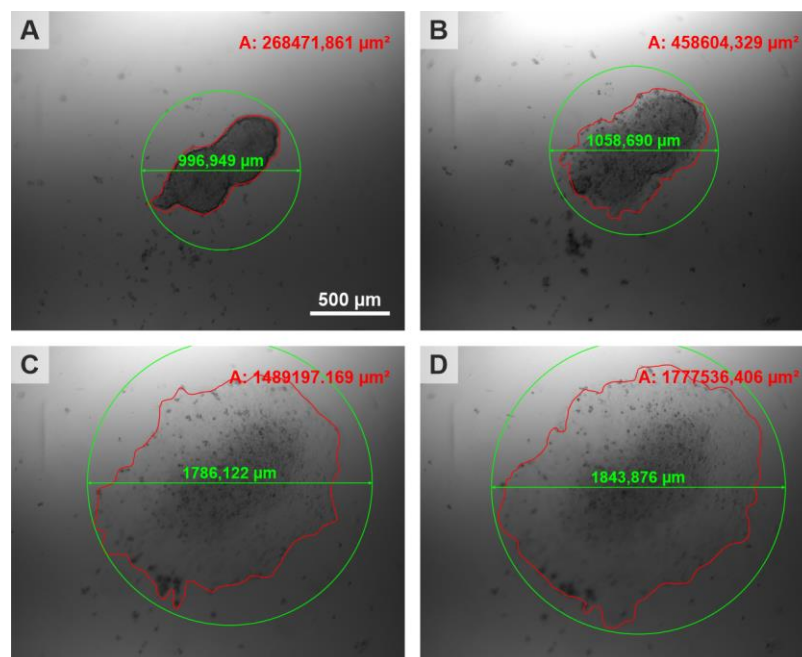
Kollagen I (Sigma-Aldrich Collagen from calf-skin 1 mg/ml, Verdünnung auf 0,1 mg/ml mit Aqua dest.) wurde mit einer Konzentration von 10 µg/cm<sup>2</sup> (entspricht 3,6 µg/Well) in die Wells appliziert, die danach für mehrere Stunden bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 2-8 °C) inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Well-Platte über Nacht getrocknet. Vor dem Aussäen von Zellen erfolgte eine Spülung mit Kulturmedium. (Protokoll nach Sigma-Aldrich, (30, 31)).

Kollagen IV (Cultrex® Mouse Collagen IV, R&D-Systems - Konzentration 1 mg/ml) wurde zunächst schonend aufgetaut, dann zu einer Basislösung von 350 µg/ 200 µl (= 10 mg/cm<sup>2</sup>) verdünnt. Folgend wurden die Wells mit 200 µl befüllt und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Lösung abgesaugt und die Microplate über Nacht getrocknet (Protokoll nach R&D-Systems, (32)).

Nach der Kultivierungszeit aus dem jeweiligen Coating-Protokoll erfolgte die Umsetzung der Sphären in die gecoateten 96-Well-Platten, in denen 100 µl

Zellkulturmedium vorgelegt wurde. Schlussendlich konnten die einzelnen Wells unter dem Lichtmikroskop fotografiert werden und folgend bei 37 °C und 5,0 % CO<sub>2</sub> in einem Inkubatorschrank gelagert werden. Eine erneute Fotografie erfolgte nach 3, 19, 25 und 43 Stunden (siehe Abb. 21).

Um die Migrationsfähigkeit beurteilen zu können ist eine Bestimmung der Fläche der auswachsenden Zellen und des Radius der Zellkugeln entscheidend. Hierbei wurde der 0-Stunden-Wert des jeweiligen Spheres subtrahiert und die Werte gemittelt. Zusätzlich wurde die Gestalt der auswachsenden Zellansammlungen beobachtet und auf Unterschiede, wie zum Beispiel die Kontinuität des Zellrasens oder der Auswuchsform, untersucht (siehe Abbildung 21). Aus den erhobenen Rohdaten konnte die Migrationsgeschwindigkeit mit der Formel  $v = \Delta r / \Delta t$  abgeschätzt werden. Durch diese Daten konnte eine Aussage über die Fähigkeit der Zellen zur Migration und auch indirekt zur Adhäsion abgeschätzt werden.



**Abbildung 21 - Beispiel für die Wachstumskinetik anhand eines HEK293T CLN7 99.4 KO Spheres: A: 0h, B: 3h, C: 19h, D: 43h**

### 2.2.3. Adhäsionsassays

Um einen ersten Überblick über die Adhäsionsfähigkeit von HEK293T MFSD8-knockout-Zellen (99.4 und 94.5) im Vergleich zu HEK293T MSFD8-Wildtyp-Zellen zu erhalten, wurden zwei einfache qualitative/semiquantitative Tests ausgearbeitet. Diese Tests wurden vor dem Hintergrund der Genchip-Daten durchgeführt. Hier fiel auf, dass Gene für die  $\beta_1$ -Untereinheit (ITGB1) und für die  $\alpha_2$ -Untereinheit (ITGA2) der IntegrinGruppe und nicht-integrin-Adhäsionsmoleküle (DDR2) eine Regulierung aufwiesen. Bei der Testung der Adhäsion können grundsätzlich zwei Gruppen von Tests unterschieden werden. Einerseits statische Tests und zum anderen dynamische Tests. (33, 34)

All diesen Tests gemein ist eine Ausübung von mechanischer Kraft auf Zellen. Bei statischen Tests wird eine Kraft von „Außen“ auf untergrundgebundene Zellen ausgeübt. So zum Beispiel mit Hilfe von Flüssigkeitsströmen oder Auftriebskräften. (35) Auch die Zentrifugalkraft wird zur Ablösung von Zellen zum Beispiel mit Zuge des CAFCA-Tests (centrifugal assay for fluorescence-based cell adhesion) eingesetzt. (36) Viele Assays setzen jedoch spezielles, sehr kostspieliges Equipment voraus und können in einem Labor, das nicht auf Tests zu dieser Zellfunktion spezialisiert ist, meist nicht etabliert werden.

Dynamische Tests basieren auf einer Zellsuspension, die meist durch ein mit verschiedenen Substanzen beschichtetes Kapillarsystem geleitet wird. Dabei kommen die zirkulierenden Zellen mit diesen Proteinen in Kontakt und es kann die Stärke der Interaktion gemessen werden, indem der Fluss der Suspension variiert wird (höherer Fluss, geringere Kontaktzeit und höhere Geschwindigkeit der Zellen → bei Bindung: höhere Affinität zum Protein). Diese Tests werden vor allem in der Analyse des hämatopoetischen Systems herangezogen, um die Interaktion von Zellen des Blutes mit dem Endothel des Gefäßsystems zu untersuchen. (37)

#### 2.2.3.1. Schütteltest

Beim Schütteltest wurde eine Zellkulturschale, die mit einem konfluentem Zellrasen besetzt war, einer mechanischen Kraft in Form eines Durchganges auf einem Schüttler ausgesetzt. Da Zellen dies normalerweise relativ gut tolerieren, wurden sie mit einem milden Ablösungsreagenz (Accutase oder EDTA) versetzt. Dafür wurden

zwei Versuchsgruppen gebildet. Einerseits HEK293T MFSD8-knockout-Zellen vom Typ 99.4 und andererseits HEK293T Wildtyp-Zellen. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz zuerst vom Kulturmedium befreit und dann entweder mit zwei Milliliter calciumfreier Ringerlösung oder Accutase versetzt. Schlussendlich stellte man die Zellkulturschälchen auf den Schüttler und führte ein definiertes Protokoll mit 3 x 1 Minute bei 100 Rounds per Minute (RPM), folgend 3 x 1 Minute bei 150 RPM und schlussendlich 3 x 1 Minute bei 200 RPM, aus.

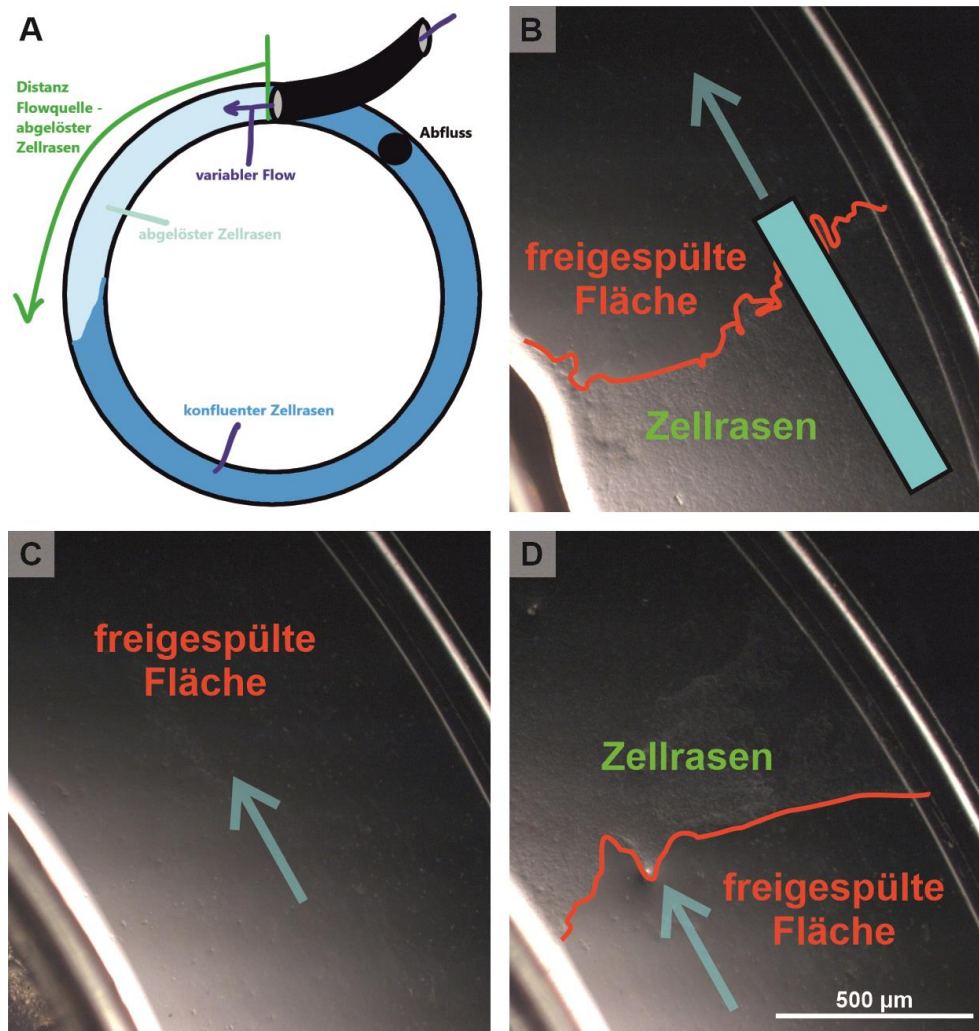
Nach jedem einminütigen Durchgang erfolgte eine visuelle Beurteilung des Zellrasens und des Ablösungsverhaltens der Zellen.

#### 2.2.3.2. Flusstest

Die Grundlage für den Flusstest basiert auf der Etablierung einer Scherkraft auf einen konfluenten Zellrasen mit Hilfe eines definierten Flüssigkeitsstromes. Für den Test wurde eine kleinere Petrischale in eine große Petrischale geklebt (flexibler Sekundenkleber ohne Cyanoacrylate), um ein ringförmiges Kanalsystem zu erhalten (siehe dazu Abb. 22, oberes Bild). Zudem musste ein Loch in den Kanal gebohrt werden, um einen Ablauf der Flüssigkeit zu gewährleisten und eine Quelle etabliert werden, damit ein Flüssigkeitsstrom im Kanal generiert werden konnte. Hierfür wurde eine Venenverweilkanüle mit einer Stärke von 14 Gauge (Fa. Braun) durch den Deckel der Petrischale in den Kanal gelegt und so gekürzt, dass die Spitze des Kunststoffkatheters den Boden der Petrischale nicht berührte. Es bestand nun die Möglichkeit über den Luer-Lock-Anschluss der Kanüle ein Infusionssystem anzuschließen und eine Flüssigkeit in den Kanal zu entlassen. Die Zellen wurden in den Kanal ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen.

Es konnte nun ein definierter frei einstellbarer Flüssigkeitsstrom in den Kanal entlassen werden, der nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille durch den Innenradius und die Länge der Kanüle begrenzt (ca. 350 ml/min. bei frei-hängender Infusion) und von der Höhe der Aufhängung des Infusionsbeutels abhängig ist. Nach einer vorgegebenen Zeit wurde die Distanz des abgelösten Zellrasens gemessen. Dies konnte nun für verschiedene Zelllinien und verschiedene Flussgeschwindigkeiten gemessen und verglichen werden. Hier stellt die Adhärenz eine Funktion aus Flussgeschwindigkeit und Distanz der Ablösung dar. Da die

Flussgeschwindigkeit im Verlauf des Kanals abnimmt, ergibt sich auch eine Verminderung der Scherkräfte, die auf den Zellrasen wirken. Dies bedeutet: Je größer die Ablösedistanz, desto schwächer die Adhärenz. (siehe Abbildung 22).

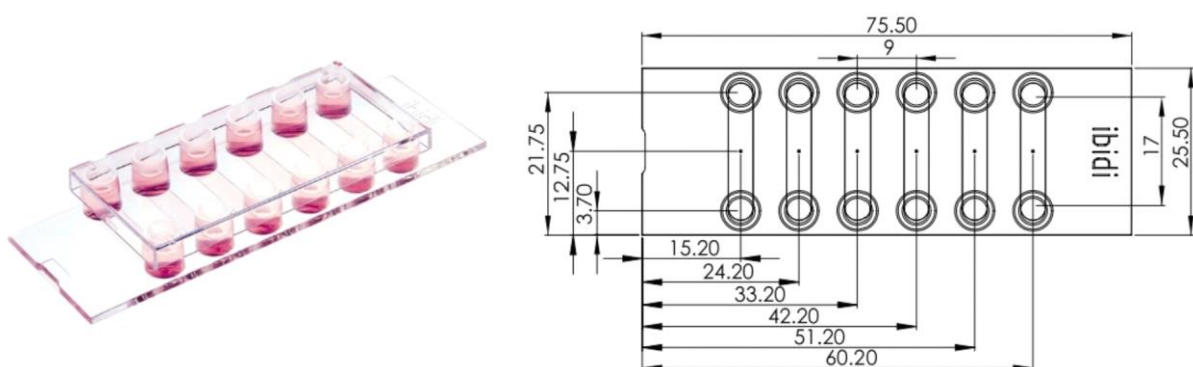


**Abbildung 22 - Versuchsanordnung mit HEK293T 99.4 KO-Zellen nach der Applikation eines Flusses von 300-350 ml/min. Ringerlösung für eine Minute:**  
 A: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus, B: Beginn der Ablösungsfläche an der Insertionsstelle der Flowquelle, blau dargestellt C: Zwischenabschnitt mit komplett blankem Petrischalenboden, D: Wiedereinsetzen des Zellrasens mit scharfer Grenze am Übergang der brachen Fläche zum Zellbesatz (blauer Pfeil jeweils zur Symbolisierung der Flussrichtung)

### 2.2.3.3. Quantitativer Flusstest

Um die Beobachtungen der Vorversuche zu quantifizieren wurde ein weiterer Zelladhäsionstest etabliert. Hierfür eignen sich sogenannte Flusskammer-Tests sehr gut, da in den Kammern ein laminarer, frei wählbarer, konstanter Fluss auf die Zellen entlassen werden kann und sowohl deren Morphologie als auch deren Anhaftungsvermögen untersucht und quantifiziert werden kann. (38) (39)

Hierfür wurden unbeschichtete  $\mu$ -Slides VI 0.4 der Firma Ibidi-Systems (siehe Abbildung 23) mit Fibronectin nach dem Herstellerprotokoll der Testkammern und der Coatingmedien beschichtet. Für das Coating von Oberflächen ist immer die sogenannte Coating-Fläche von entscheidender Bedeutung. Diese setzt sich in einem Kanal aus dem Boden, den Seitenwänden und der Deckenfläche zusammen und wird bei kommerziellen Produkten meist in den Herstellerangaben bereitgestellt. Ibidi gibt für die verwendeten Testgefäße eine Fläche von  $1,2 \text{ cm}^2$  an bei einem Volumen von  $30 \text{ }\mu\text{l}$ . Die Herstellerangaben des Coatingmediums sehen für Beschichtung mit Fibronectin eine Dosierung von  $2\text{-}5 \text{ }\mu\text{g}$  pro  $\text{cm}^2$  vor. Aus diesen Zahlen wurde jeweils  $1 \text{ ml}$  einer wiederverwendbaren Coatinglösung hergestellt (siehe Tabelle 12 im Materialteil). Die Beschichtung erfolgte durch blasenfreies zupipettieren von  $30 \text{ }\mu\text{l}$  der jeweiligen Lösung pro Kanal und einer Inkubation bei  $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$  bei  $5,0 \text{ \% CO}_2$  im Inkubatorschrank über Nacht. Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt und die Kammern bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen getrocknet.



**Abbildung 23 - Ibidi  $\mu$ -Slide VI 0.4:** Flusskammersystem mit 6 Kammern, jeweils mit einer Höhe von  $0,4 \text{ mm}$  und einem Volumen von  $30 \text{ }\mu\text{l}$  bei einer Coatingfläche von  $1,2 \text{ cm}^2$ . (aus den Herstellerangaben der Ibidi GmbH / Gräfelfing DE)

Nach der Trocknung der Kammern über Nacht wurden diese zweimal mit PBS gespült, mit Zellkulturmedium befüllt und für ein optimal blasenfreies Ergebnis im



Inkubator erwärmt und äquilibriert. Danach wurde durch Trypsinieren und folgender Überführung der Zellen in das Zellkulturmedium eine Zellsuspension mit einer optimalen Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml hergestellt und jeweils ca. 200  $\mu$ l dieser Lösung in die gecoateten Kammern pipettiert (Einfluss- und Ausflusstutzen zureichend gefüllt). Dafür wurde die Pipettenspitze direkt an den Eingang des Kanals angelegt und die Kammern zügig gefüllt, um Luftblasen zu verhindern. Es folgte eine Inkubation von circa 3 Stunden im Brutschrank (37,0 °C, 5,0 % CO<sub>2</sub>) bis zur Adhäsion der Zellen.

Vor dem Experiment wurden die Adhäsionskammern unter dem Mikroskop auf die Zelldichte untersucht. Um eine Aussage über die Adhäsionsfähigkeit der Zellen machen zu können, ist es von enormer Bedeutung, dass der jeweilige Zellrasen einen ähnlichen Konfluenzgrad aufweist, da die Adhäsion bei zu dichtem Zellbesatz abnimmt und die Zellen sich dadurch leichter ablösen lassen können.

War die Zelldichte in den Kammern zufriedenstellend, so wurde circa eine halbe Stunde vor dem Start der Mikroskopie ein Färbevorgang mit einer Hoechst 33342-Färbelösung (1/400 in Leibovitz's Medium) vorgenommen. Hierfür wurde zuerst das Zellkulturmedium aus beiden Reservoirs abgenommen und danach ein ausreichendes Volumen der Färbelösung in einen Stutzen entlassen. Sodann wurden die Messkammern für mindestens 30 Minuten im Inkubator eingelagert. Hiernach konnte das Rollerpumpensystem mit einfacher, erwärmter Ringerlösung befüllt werden (Rezept siehe Tabelle 6 im Materialteil).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine erste Aufnahme von einem 2500  $\mu$ m x 2500  $\mu$ m messenden Teil der Kammer-Bodenfläche angefertigt. Hierbei wurde eine Durchlichtaufnahme, sowie eine DAPI-Fluoreszenzaufnahme mit voreingestelltem Setup durchgeführt. Nachfolgend wurden die Zellen einer mechanischen Kraft mit Hilfe eines Flüssigkeitsstromes ausgesetzt. Diese Kraft wird auch Scherstress genannt und kann mit Hilfe der dynamischen Viskosität der perfundierenden Ringerlösung (ca. 0,0068 dyn s/cm<sup>2</sup>), der Flussrate in  $\mu$ l/min und einem kammer-spezifischen Faktor (berechnet sich aus der Geometrie der Kammer) berechnet werden:

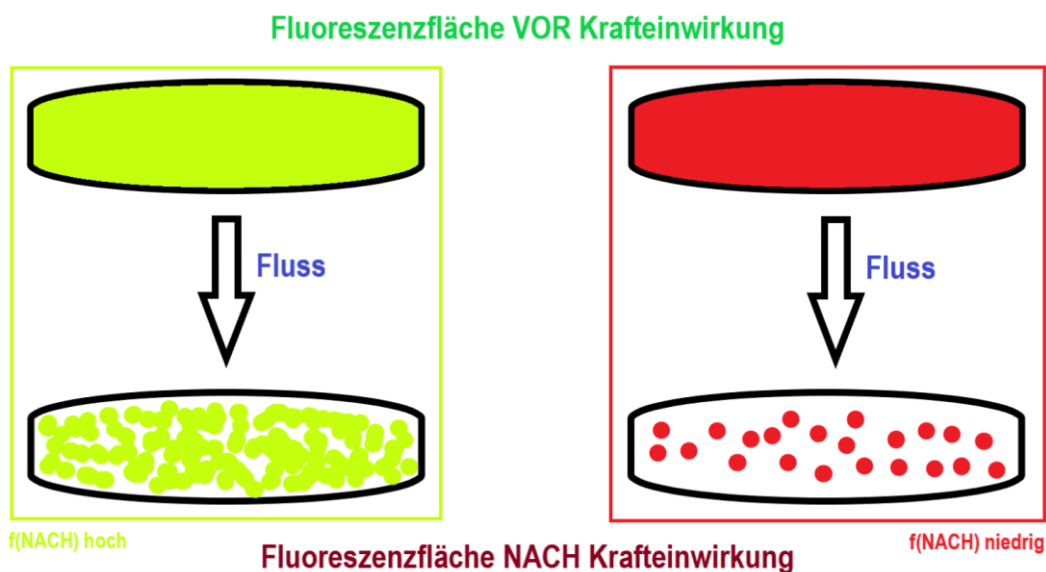
$$\tau = \eta \cdot 176,1 \cdot \varphi$$

Nach Ablauf der Perfusionszeit von 5 Minuten bei einer Flussrate von 50 ml/min (Stufe 99 der Rollerpumpe) wurde in Analogie zur ersten Übersichtsaufnahme eine weitere Aufnahme angefertigt. Für eine Quantifizierung der Zahl der adhären-

Zellen vor und nach dem Scherstress wurde die Fläche der Fluoreszenz der Übersichtsaufnahmen (vor und nach Kraffteinwirkung) des DAPI-Kanals gemessen. Diese stellt eine Abschätzung der Zellzahl dar, da die Fluoreszenzfläche mit der Anzahl der Zellkerne und somit der Zahl der Zellen bei im Durchschnitt gleicher Zellkerngröße steigt (Abbildung 24). Vergleicht man nun die Fluoreszenzfläche vor ( $f_{VOR}$ ) und nach ( $f_{NACH}$ ) der Zuführung des Flusses, so kann abgeschätzt werden wie viele Zellen durch die mechanische Kraft abgewaschen wurden. Teilt man nun die Fluoreszenzfläche  $f_{NACH}$  durch die Fluoreszenzfläche  $f_{VOR}$  so erhält man einen Quotienten, der proportional zur Adhäsionsfähigkeit des untersuchten Zelltypes ist:

$$Q_{ADHÄSION} = \frac{f_{NACH}}{f_{VOR}}$$

Je größer Q ist, desto weniger Zellen haben sich abgelöst und desto höher sind die Adhäsionskapazitäten der Zellen. Je kleiner dieser Wert ist, desto weniger Zellen haften nach der Untersuchung noch am Kammerboden und desto geringer ist die Adhäsionsfähigkeit der Zellen. Diese Bilder wurden mit der kostenfreien Software Image-J 2.0 ausgewertet. (40)



**Abbildung 24 - Fluoreszenzflächenvergleich:** Die Abbildung soll die Messmethode veranschaulichen. Dargestellt ist eine Aufsicht der Adhäsionskammern zweier verschiedener Zellarten mit unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften. Die oberen beiden Kammern stellen den Zellrasenbesatz vor der Verabreichung des Flüssigkeitsstromes dar, unten sind jeweils die selben Kammern nach der Kraffteinwirkung dargestellt. Die Zellen der linken Kammer weisen nach dem Flussexperiment eine höhere Fluoreszenzfläche auf als die Zellen der rechten Kammer ( $f(NACH)$ ). Dadurch ergibt sich ein unterschiedliches Q. Die Zellen der linken Kammer haben ein hohes Q und eine hohe Adhäsionskraft, die Zellen der linken Kammer ein niedriges Q und eine niedrige Adhäsionsfähigkeit.

Bei diesem Versuch wurden jeweils 12 Testkammern ( $n = 12$ ) HEK293T MFSD8 Wildtypzellen, HEK293T MFSD8-knockout-Zellen der Varianten 99.4 und 94.5 getestet.

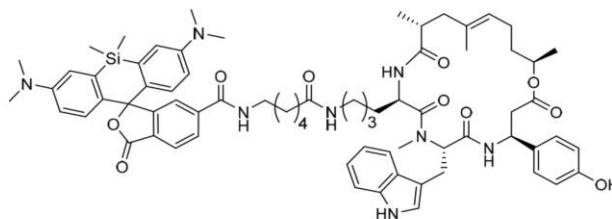
## 2.2.4. Fluoreszenzfärbungen

### 2.2.4.1. Zytoskelettfärbung

Da die Zellmigration und der dazugehörige Umsatz an Integrinen und nichtintegrin-Adhäsionsmolekülen sehr stark von cytoskelettalen Strukturen abhängt, wurde im Zuge der Promotionsarbeit eine Färbung von Tubulin und Aktin durchgeführt. Weiterhin besteht ein Zusammenhang des integrinvermittelten Outside-In-Signallings. Dabei führt eine Aktivierung des Integrindimers zu einer Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase und über den PI3K-Pathway zu einer Beeinflussung der Aktinpolymerisation (9) (10).

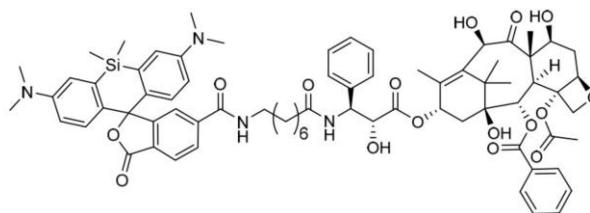
Die verwendeten Farbstoffe entstammen einem kommerziell vertriebenen Kit (Cytoskeleton Kit (CY-SC006) Live Cell Fluorogenic Microtubule Labelling Probe Kit) und basieren beide auf der Koppelung des fluoreszierenden Farbstoffes Silikonrhodamin (= SiR) an ein spezifisch bindendes Molekül. Für die Aktinfärbung ist hierbei das Molekül Jasplakinolid und für die Tubulinfärbung Docetaxel mit dem Farbstoff verbunden (siehe Abbildungen 25 und 26)

$\lambda_{\text{abs}}$	652 nm
$\lambda_{\text{Em}}$	674 nm
$\epsilon_{652 \text{ nm}}$	$1.0 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
MW	1241.6 g/mol
MF	$\text{C}_{71}\text{H}_{88}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{Si}$



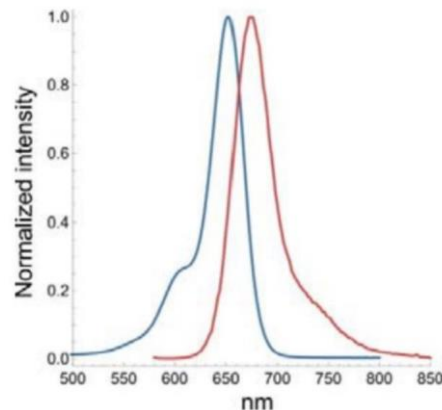
**Abbildung 25 - Eigenschaften und Struktur von SiR-Actin**

$\lambda_{\text{abs}}$	652 nm
$\lambda_{\text{Em}}$	674 nm
$\epsilon_{652 \text{ nm}}$	$1.0 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
MW	1303.6 g/mol
MF	$\text{C}_{73}\text{H}_{86}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{Si}$



**Abbildung 26 - Eigenschaften und Struktur von SiR-Tubulin**

Da beide Färbeagenzien das gleiche Fluorophor enthalten und somit auf der gleichen Wellenlänge angeregt werden, sowie Licht des gleichen Spektrums emittieren, war es mit diesem Kit leider unmöglich eine Kofärbung durchzuführen (Abbildung 27). Deshalb wurden HEK293T MFSD8-Wildtypzellen und ihr Knockoutpendant jeweils einzeln mit SiR-Actin und SiR-Tubulin gefärbt.



**Abbildung 27 - Anregungsspektrum blau und Emissionsspektrum rot**

Für die Färbung wurde die jeweilige Zellart in einer kleinen Petrischale, in der ein mit Coatingmedium beschichtetes Glasplättchen vorgelegt wurde, kultiviert. Nach einer Nacht bei 37°C und 5,0% CO<sub>2</sub> wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Des Weiteren wurde 1 µM der jeweiligen Färbelösung hinzugefügt (entsprechend 1 µl). Da einige Zellarten eine Vielzahl an Effluxpumpen exprimieren und dadurch die Farbstoffe sehr effektiv aus der Zelle schaffen können, wird vom Hersteller die Zugabe von Verapamil empfohlen. Dieser Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Inhibitor wirkt auch hemmend auf viele Auswärtstransporter. Es wurde hiervon zehn µM eingesetzt. Die präparierten Zellen wurden nach Herstellerangabe für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5,0% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur Aufnahme der Zellproben wurden die Glasplättchen schlussendlich mit Schliff fett auf Plättchenhalter aufgebracht und mit Leibowitz-Medium versetzt. Dieses Medium hat die Besonderheit, dass es farblos ist und die Bildqualität, bzw. eine Farbechtheit für die Mikroskopie gewährleistet. Weiterhin wurden die Zellkerne mit 50µl HOECHST-Farbstoff (DNA-Interkalator) gefärbt. Die Aufnahme erfolgte sowohl für Tubulin als auch für Aktin auf der Cy5-Wellenlänge. Die Zellkerne wurden mit dem DAPI-Modus dargestellt. Um einen guten Kontrast von Zellkern und Cytoskelett zu

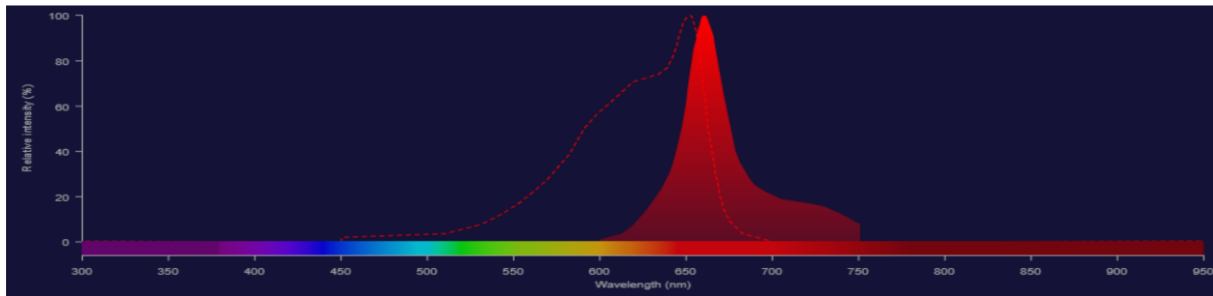
erhalten, wurde die Cy5-Wellenlänge (emittiert normalerweise Licht im infraroten Wellenlängenbereich) über die ZEN-Software von ZEISS als grün definiert. (41)

#### 2.2.4.2. Integrinfärbung

Der Nachweis antigener Strukturen auf oder in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper (Ak), die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen oder Isotopen gekoppelt sind, nennt man Immunhistochemie. Dabei kann eine direkte von einer indirekten Markierung unterschieden werden. Bei der direkten Immunfluoreszenz wird ein einziger spezifischer Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, eingesetzt. Bei Bindung und Anregung in einem gewissen Spektrum emittiert das Fluorophor Licht mit einer definierten Wellenlänge, die dann detektiert werden kann. Bei der indirekten Immunhistochemie werden zwei unterschiedliche Antikörper eingesetzt. Der primäre, nicht mit einem Fluorophor markierte Antikörper bindet zunächst an das Zielprotein. Anschliessend wird der Zell-/Gewebeprobe ein zweiter Antikörper (sekundärer Antikörper) zugegeben, der sich gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers richtet und diesen spezifisch bindet. Zuletzt wird der Antigen-Antikörper-Komplex wiederum mit einem Licht entsprechender Wellenlänge angeregt.

Da sowohl in der Genchipuntersuchung als auch bei der quantitativen PCR eine Regulation der  $\beta_1$ -Untereinheit der Integrine (ITGB1) hervorstach, wurde eine direkte Immunfluoreszenzfärbung mittels monoklonalem ITGB1-Antikörper (IgG aus dem Armenischen Hamster) der Firma Invitrogen (ThermoFisher GmbH) durchgeführt. Dieser bindet an Integrine der Maus und der Ratte, aber auch eine Kreuzaffinität zu humanen Proteinen (vor allem bei Stammzellen) ist beschrieben. (42-44)

An den Antikörper ist ein Fluorophor gebunden, das im Wellenlängenbereich von 633 bis 647 nm angeregt wird (Cy5/APC-Programm des Mikroskopes) und Licht von 660 nm excitiert (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28 - Anregungs- und Emissionsspektrum des verwendeten ITGB1-Antikörpers:** Die gestrichelte Linie stellt das Anregungsspektrum dar, der rot-untransparente Bereich beschreibt das emittierte Licht (Abb. Aus der Internetpräsenz der Thermo Fisher Inc.)

Bei den Versuchen wurden MEF-Zellen (embryonale Mausfibroblasten) sowohl im fixierten Zustand als auch lebend untersucht.

Am Tag vor der geplanten Färbung wurden dafür 800.000 Zellen pro Schälchen mit vorgelegtem Glasplättchen ausgesät und über Nacht bei 37,0 °C und 5,0 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, sodass die Zellen eine circa 80 %ige Konfluenz aufwiesen. (42-44)

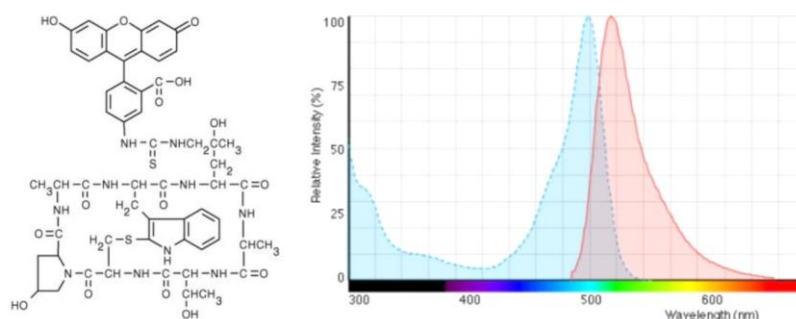
Für das Live-Cell-Imaging (= Lebendfärbung) wurde am Versuchstag das Zellmedium entfernt und ein Waschvorgang mit PBS durchgeführt. Danach wurde die Antikörperlösung vorbereitet. Hierfür wurde eine Verdünnung von 1/400 gewählt, sodass in jedes Schälchen (a 1 ml Medium) 2,5 µl (= 2,5 µg) eingefüllt wurden. (42-44) Das Färbemedium wurde der Zellprobe nach dem Absaugen des PBS zupipettiert und für 30 Minuten in Dunkelheit bei 37,0 °C und 5,0 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Färbemedium abgesaugt und ein weiterer Waschgang mit PBS durchlaufen. Zuletzt wurden die Zellen in Leibovitz's L-15-Gibco®-Medium überführt. Dieses Medium setzt Phosphate und freie basische Aminosäuren zur Pufferung des pH-Wertes ein, wodurch eine CO<sub>2</sub>-Stabilisierung des pH-Wertes nicht notwendig war. Die zweite Methode stellte die Mikroskopie von fixierten Zellen dar. Für die Fixierung wurde das Zellmedium abgesaugt und eine Fixierlösung mit 3,0 % Paraformaldehyd für 3 Minuten zugegeben. Nach dem Fixierschritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nachfolgend mit 1 ml Färbelösung (analog Live-Cell-Imaging 1/400 Antikörperlösung) bedeckt, zu der zur Anfärbung der Zellkerne 2,5 µl bisBenzimide H 33342 (HOE 33342 hinzugegeben wurde. (42-44) Die Zellen wurden mit dieser Färbelösung 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Mounting-Medium (gelartiges Medium zur Fixierung der Glasplättchen auf einem Objektträger) im

Wasserbad erwärmt und Objektträger vorbereitet. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einem zweiten Waschgang mit PBS unterzogen und nach der Aufbringung von zwei bis drei Tropfen des Mounting-Mediums auf einen Objektträger fixiert und dauerhaft haltbar gemacht. Zuletzt erfolgte eine Kühlung bei 4 °C für mindestens 20 Minuten im Kühlschrank, um das Mounting-Medium auszuhärten. Die Mikroskopie erfolgte analog der Lebendfärbung.

#### 2.2.4.3. Integrin-Aktin-Kofärbung

Um einen Eindruck über die Lokalisation von Integrinen bzw. deren Kolo-kalisation mit Aktininsertionen an der Plasmamembran zu bekommen, wurde eine Kofärbungsuntersuchung mit Mausfibroblasten (Wildtyp, MFSD8-knockout-Variante). Dieses Experiment sollte auch einen Aufschluss über eine Zellpolarität entlang einer Migrationsfront geben. In der Literatur wird diesbezüglich eine Aufbau-kinetik über Lamellopodien bzw. Filopodien beschrieben. Hier sollten sich zahlreiche Aktinfaseranheftungen und eine Anreicherung an Integrinen zeigen, die zur Ausbildung von neuen fokalen Adhäsionen führen sollen. (45)

Da der vorliegende Integrin  $\beta_1$ -Antikörper, ebenso wie das Cytoskeleton-Kit, ein nahezu identisches Fluoreszenzspektrum im Cy5-Bereich vorweisen, musste auf ein alternatives Aktin-Färbeagenz zurückgegriffen werden. Als Alternative wurde Phalloidin-FITC ausgewählt, welches Licht mit einer Wellenlänge von 496 nm absorbiert und ein Licht von 516 nm emittiert (somit deutlich unterschiedlich vom Cy5-Bereich; siehe Abbildung 29). Phalloidin ist ein Derivat des Giftes des Knollenblätterpilzes und bildet selektiv stabile Komplexe mit dem C-terminalen Ende des filamentären F-Actins (Abbildung 29). (46)



**Abbildung 29 - Struktur des Phalloidins und das Fluoreszenzspektrum von FITC**

Am Tag vor dem geplanten Anfärben wurden die jeweiligen Zellen sehr dünn (300.000/35 x 10 mm Zellkulturschälchen) auf ein mit Coating-Medium beschichtetes Glasplättchen ausgesät, um diese vereinzelt darstellen und damit deren Strukturen (Lamellopodien etc.) besser beurteilen zu können. Es folgte eine Inkubationsphase über Nacht bei 37,0 °C und 5,0 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Für die Fixierung wurde das Zellmedium abgesaugt und eine Fixierlösung mit 3,0 % Paraformaldehyd für 3 Minuten zugegeben. Es folgte ein Waschschrift mit einfacher PBS-Lösung für weitere 2 Minuten. Während der Fixierung wurde eine Färbelösung bestehend aus der Antikörper-Verdünnungslösung (PBS, 0,5 % BSA, 0,04 % Triton, siehe auch Materialteil Tabelle 15), die mit dem ITGB1-Antikörper, dem Phalloidin-FITC Farbstoff und dem Hoechst-Farbstoff jeweils im Verhältnis 1/400 versetzt wurde, hergestellt. Nach dem Waschschrift wurde jeweils 1 ml der Färbelösung zu den Zellproben pipettiert und für 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper-Verdünnungslösung sollte durch den Zusatz von Triton-Puffer eine Permeabilisation der Zellmembran bewirken, damit der Antikörper die Zellmembran überwinden und zur jeweiligen Zielstruktur gelangen kann.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Aufbringung der Glasplättchen auf die Objektträger.

#### 2.2.5. Proliferationsassay

Für die Bestimmung der Zellzahl einer Zellkultur eignet sich die Methode der elektrisch basierten Zellzählung. In der vorliegenden Untersuchung wurde dafür das Zellzählgerät CASY (Cell Counter, Modell TT, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) ausgewählt. Neben der Zellzahl erlaubt das CASY-System eine Erkennung des Zustandes der Zellen. Dabei können lebende von toten Zellen unterschieden und die Zellgröße bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf einer Tot-Lebend-Differenzierung. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der vorliegenden Untersuchung mit zwei verschiedenen Programmen. Sowohl wurde ein neues Programm für Fibroblasten (MEF-Zellen - C<sub>L</sub>: 12,0 µm, C<sub>R</sub>: 30,0 µm, N<sub>L</sub>: 6,30 µm, N<sub>R</sub>: 30,0 µm bei einer Verdünnung von: 2,01) als auch für die Testreihen mit den HEK293T-Zellen (C<sub>L</sub>: 10,20 µm, C<sub>R</sub>: 29,33 µm, N<sub>L</sub>: 6,15 µm, N<sub>R</sub>: 29,33 µm



bei einer Verdünnung von: 201) etabliert. Durch die Einstellung des Zelltyps wird eine Zellzählung mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit erreicht. Um diese Parameter bestimmen zu können, war es nötig, die Zellen durch die Behandlung mit Accutase sanft von der Kulturunterlage abzulösen und somit in eine Zellsuspension zu überführen. Die gewonnene Zellsuspension wurde in eine isotonische Elektrolytlösung (CASYton) in einem festgelegten Verhältnis (50 µl Zellsuspension in 10 ml CASYton) gegeben. Die in der isotonischen Elektrolytlösung resuspendierten Zellen werden bei einem Messdurchgang durch eine Messkapillare (Durchmesser 150 µm) in definierter Menge von 400 µl angesaugt (je Durchgang dreimal). An diese Messkapillare ist über zwei Platinelektroden elektrische Spannung angelegt. Eine lebende Zelle fungiert als elektrischer Isolator und vermindert einen elektrischen Stromfluss durch ihre intakte Membran, da sie die leitfähige Elektrolytlösung verdrängt. Tote Zellen besitzen jedoch eine perforierte, undichte Zellmembran und können so die leitende CasyTon-Lösung nicht mehr so gut verdrängen, sondern nehmen sie in ihr Inneres auf (der Widerstand sinkt). Dadurch nimmt der Stromfluss nicht so sehr ab und es kann ein Rückschluss auf die Zellgröße/Vitalität gewonnen werden. Am Ende einer Messung gibt das Gerät die voreingestellten Messparameter wie Gesamt- und Lebendzellzahl als auch Zelldurchmesser an.

Für die vorliegende Arbeit war es nötig einen Eindruck von der Replikationsdynamik aller untersuchten Zelltypen zu bekommen. Dies ist wichtig, um etwaige Ergebnisse aus den Migrationsassays nicht mit einem proliferations- oder wachstumsvermittelten Effekt zu verwechseln. Durch die zeitlich gestaffelte Zellzahlmessung mittels CASY konnte das Zellwachstum (Zellvolumen) als auch die Proliferation (Zellzahl zu Zeitpunkt t/Zellzahl der 24h-Messung) abgeschätzt werden.

Für die Messungen wurde jeden Montag eine konstante Anzahl an Zellen in kleine Petrischalen ausgesät (300.000 Zellen/Schälchen) und folgend bei 37°C und 5,0% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Messungen erfolgten nach einem Waschvorgang mit PBS 1x und der Ablösung mit Accutase nach 24, 48, 72 und 96 Stunden. Jede Zellsuspension wurde dreimal gemessen und jeweils ein Mittelwert für die Zellzahl und das Zellvolumen bestimmt. Weiterhin wurde ein Proliferationsfaktor ( $F_P = N(t_x)/N(24h)$ ) errechnet, da die Absolutwerte der Zellzahlen immer auch von der Anfangszellzahl abhängen. Hier liegt eine Fehlerquelle für die Interpretation, da sich die Anfangszellzahlen zum Teil deutlich unterschieden. Dies hing vor allem an der

„ungenauen“ Zellzählungsmethode über eine Neubauer-Zählkammer bei der Aussaat und die individuelle Adhäsionskinetik der Zellen bei jeder einzelnen Zellkulturschale.

#### 2.2.6. Statistische Methoden

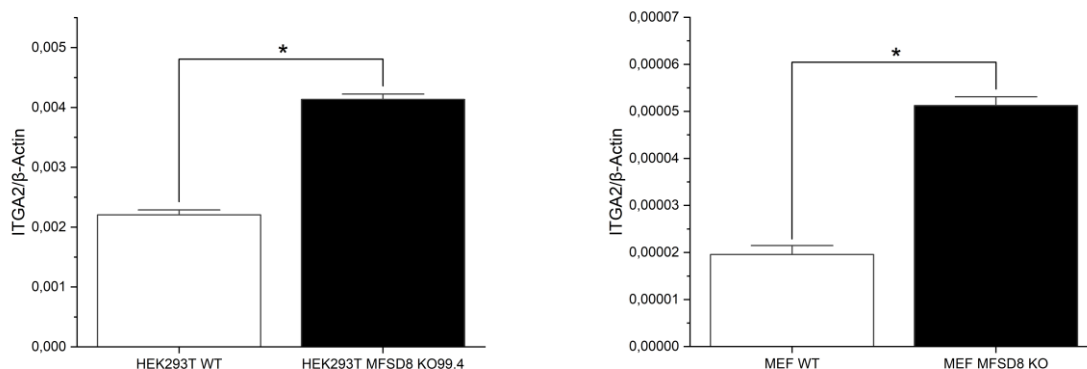
Die im Verlauf der Versuchsdurchführungen gewonnenen Daten wurden als Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen wiedergegeben. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen verschiedenen Gruppen wurde ein One-Way Anova mit Turkey's post-hoc Test angewandt. Für die statistische Auswertung wurde ein Unterschied als signifikant mit einem Stern gekennzeichnet, wenn dieser einen p-Wert unter 0,05 vorwies. Die Berechnungen sowie die Abbildungen wurden mit dem Statistikprogramm Origin 2020 erstellt.

### 3. Ergebnisse

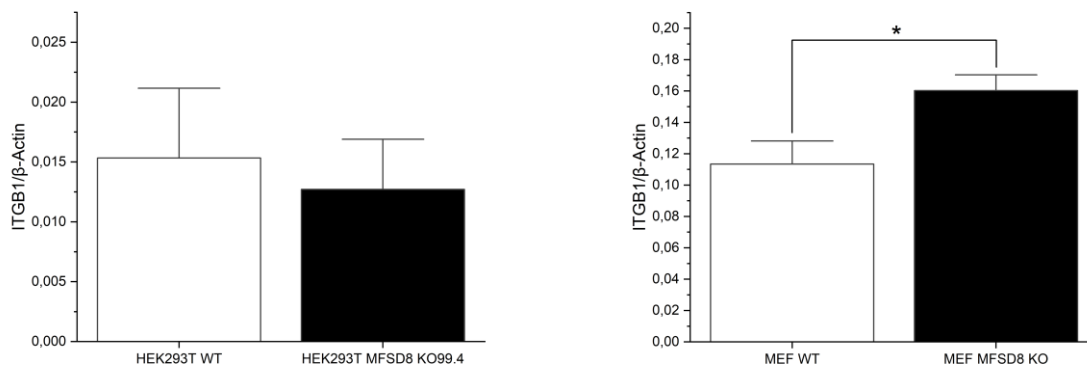
#### 3.1. Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Eine Genchip-Untersuchung erbrachte eine Regulierung mehrerer für die Zellmigration sowie der Zelladhäsion verantwortlicher Gene. Um die Ergebnisse aus diesem Vorexperiment zu bestätigen, wurde eine quantitative Polymerase Kettenreaktionsuntersuchung (qPCR) durchgeführt. Für die PCR-Versuche verwendete man die vorhandene mRNA der HEK-Zellen aus dem Chip-Experiment und führte das Experiment zudem auch noch an MEF Wildtyp- und MEF MFSD8-knockout-Zellen nach oben genanntem Protokoll durch. Alle untersuchten Gene stammen aus dem Bereich der Zell-ECM-Interaktion und sind sowohl in Inside-Out- als auch Outside-In-Signalwege eingebunden. ITGB1 und ITGA2 sind Gene der Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\alpha_2$  der heterodimeren Integrin-Moleküle, die bei der Zellmigration (45) und der Zelladhäsion an der extrazellulären Matrix von Bedeutung sind. Sie stellen eine Verbindung der Zelle zu ihrer „Mikroumwelt“ dar und können mannigfaltige Prozesse in der Zelle beeinflussen. (47)

In der vorliegenden PCR-Untersuchung fiel auf, dass HEK293T Wildtyp-Zellen im Vergleich zu Knockout-Zellen vom Typ 99.4 eine höhere mRNA-Expression von ITGB1, jedoch eine geringere Menge an mRNA des ITGA2-Gens aufwiesen. Diese Ergebnisse konnten auch mit einer differentiellen CLN7-knockout Mutante (94.5) reproduziert werden. (48) Analog verhielt sich die ITGA2-Expression bei den MEF-Zellen. Beim ITGB1-Gen sah man jedoch ein gegensätzliches Verhalten (siehe Abbildungen 30 und 31).



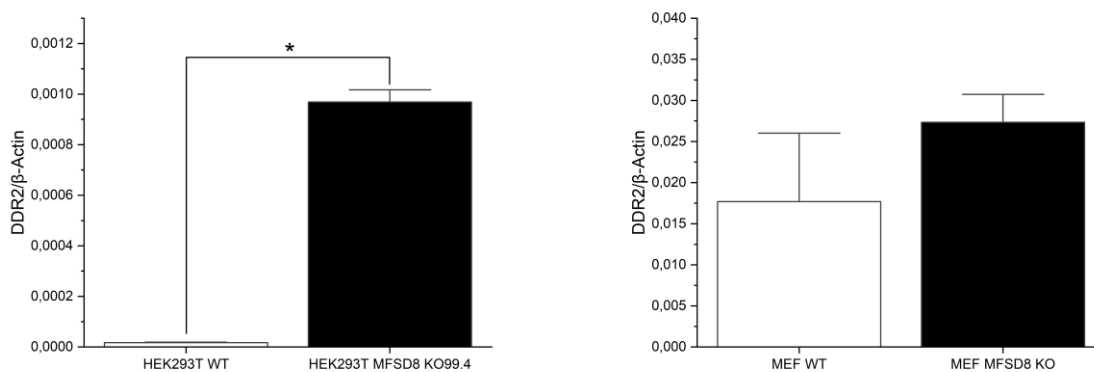
**Abbildung 30 - Ergebnisse der qPCR auf ITGA2-mRNA:** Die Expression der  $\alpha_2$ -Untereinheit der Integrine erschien bei HEK293T Wildtypzellen sowie der WT-Variante der Mausfibroblasten erniedrigt zu sein.



**Abbildung 31 - Ergebnisse der qPCR auf ITGB1-mRNA:** Hier konnte eine Heraufregulierung bei den HEK-Wildtypzellen gegenüber KO-Zellen gesehen werden. Bei der Betrachtung der MEF-Zellen imponiert ein gegensätzliches Verhalten.

Des Weiteren wurde das Gen für das nicht-integrin Adhäsionsmolekül Discoidin Domain receptor 2 (= DDR2) untersucht. Dieser Rezeptor gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird wie die Gruppe der Integrine mit vielen Zellfunktionen wie Zellproliferation, Adhäsion und Zellmigration in Verbindung gebracht. (49)

Die mRNA von DDR2 wurde in deutlich geringerem Ausmaß in HEK293T Wildtypzellen gefunden. Bei MEF-Zellen zeigte sich eine ähnliche Tendenz, jedoch in geringer Ausprägung als bei den HEK-Zellen (siehe Abbildung 32)

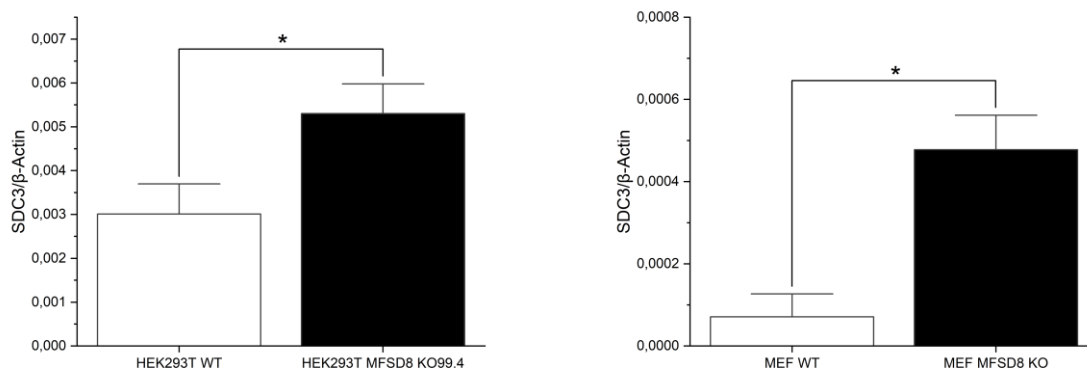


**Abbildung 32 - Ergebnisse der qPCR auf DDR2-mRNA:** Bei der Expression des nicht-integrin-Adhäsionsmoleküls DDR2 konnte eine deutliche Hochregulierung der Gene bei KO-Zellen gegenüber WT-Zellen beobachtet werden. Die gleiche Tendenz war bei den Fibroblasten in geringerem Ausmaß zu sehen.

Weiterhin konnte ein Unterschied des mRNA-Gehaltes von Syndecan 3 (SDC3) beobachtet werden. Syndecane (4 Typen) stellen Oberflächenproteine der Zelle dar und werden zu der Gruppe der Heparan-Sulfat-Proteoglycane gezählt. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakten. Zusätzlich wird auch eine Aufgabe als Ko-Rezeptor für Wachstumsfaktoren

beschrieben. Syndecan 3 mRNA wird hauptsächlich in Zellen des Nervensystems, der Nebenniere und der Milz gebildet. Bei einer Überexpression soll eine Ausbildung von langen, filopodienartigen Strukturen erfolgen. Deshalb wird Syndecan auch eine noch nicht vollständig bekannte Funktion bei der Ausbildung der Zellform und der Organisation des Actin-Zytoskelettes zugeschrieben. (50)

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der qPCR fiel eine deutlich höhere mRNA-Expression von SDC3 bei KO-Zellen sowohl der HEK- als auch der MEF-Gruppe auf (siehe Abbildung 33).



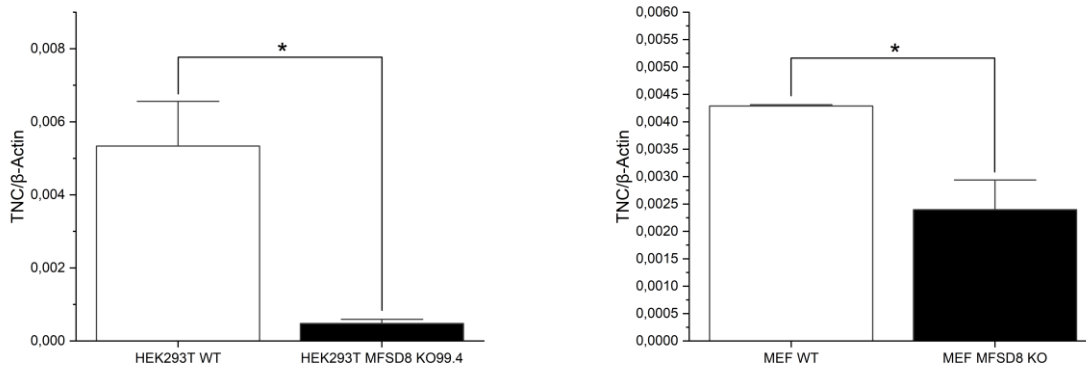
**Abbildung 33 - Ergebnisse der qPCR auf SDC3-mRNA:** Es konnte für SDC3 eine Heraufregulierung der Knockout-Varianten sowohl von HEK293T- als auch bei MEF-Zellen beobachtet werden.

Im Zuge der qPCR wurde zusätzlich nach Genen gesucht, die Proteine der extrazellulären Matrix codieren, um das Inside-Out-Signalling der Zellen und die Interaktionsfähigkeiten mit ihrer Umwelt durch die Produktion von extrazellulärer Matrix zu prüfen. Es wurden dabei drei Moleküle untersucht: Tenascin-C, Laminin und Kollagen IV. Hier eine kurze Liste der Gennamen einfügen. Dabei konnte beobachtet werden, dass HEK293T-KO-Zellen bei jedem untersuchten Gen den Wildtypzellen in der Expression hinterherhinkten. MEF-Zellen wiesen bei Tenascin-C und der Laminin  $\alpha$ -Untereinheit ein ähnliches Expressionsmuster auf, bei den getesteten Kollagen IV-Genen zeigte sich jedoch im Vergleich zu den HEK-Zellen ein differentes Bild (siehe Abbildungen 34 bis 36).

Das erste Protein ist Tenascin-C (TNC), welches aus vier Domänen besteht und eine Reihe an Interaktionspartnern besitzt. Es steht im Zusammenhang mit der Aktivierung von Integrinen, da es fibronectinähnliche Bindungsmotive besitzt. Dies befähigt Tenascin zu einer Beeinflussung von Zellmigration, Zelladhäsion,

Proliferation, die Steuerung der ECM-Produktion, Neuritenwachstum sowie die Beeinflussung von inflammatorischen Effekten. (51)

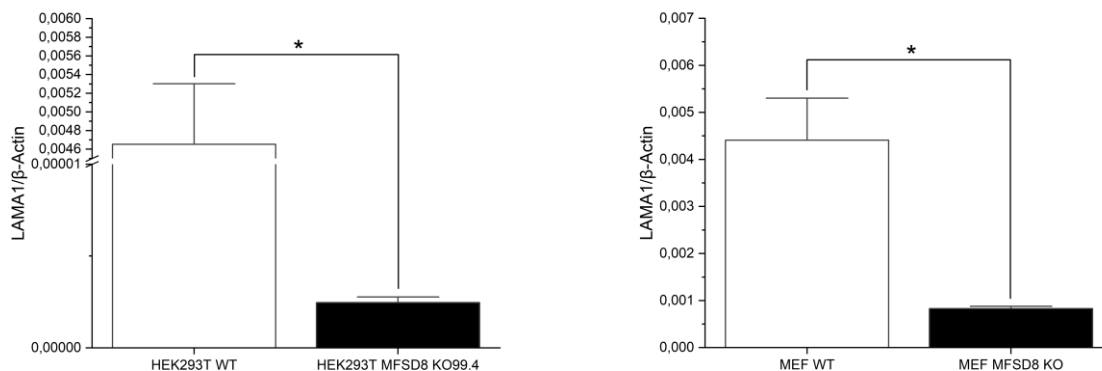
Hier zeigte sich, dass HEK- und MEF-Wildtyp-Zellen eine deutlich bessere Ausstattung an TNC-mRNA hatten als KO-Zellen (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34 - Ergebnisse der qPCR auf TNC-mRNA:** Bei der Expression von TNC zeigte sich im Gegensatz zu den Adhäsionsmolekülen eine deutliche Herabregulation der mRNA in Knockout-Zellen (MEF und HEK293T).

Ein Glycoprotein der extrazellulären Matrix stellt Laminin dar. Laminine haben eine heterotrimere Struktur und bestehen aus jeweils einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit. Laminine kommen vor allem in der Basalmembran vor und übernehmen dort imminente wichtige Funktionen (Mutationen der Laminin-Gene führen häufig zum Tod bzw. zu schweren Funktionseinschränkungen). Zu den Aufgaben von Lamininen gehört die Zell-ECM-Adhäsion sowie Zelldifferenzierung, Migration und eine Beeinflussung des Axonwachstums. (52)

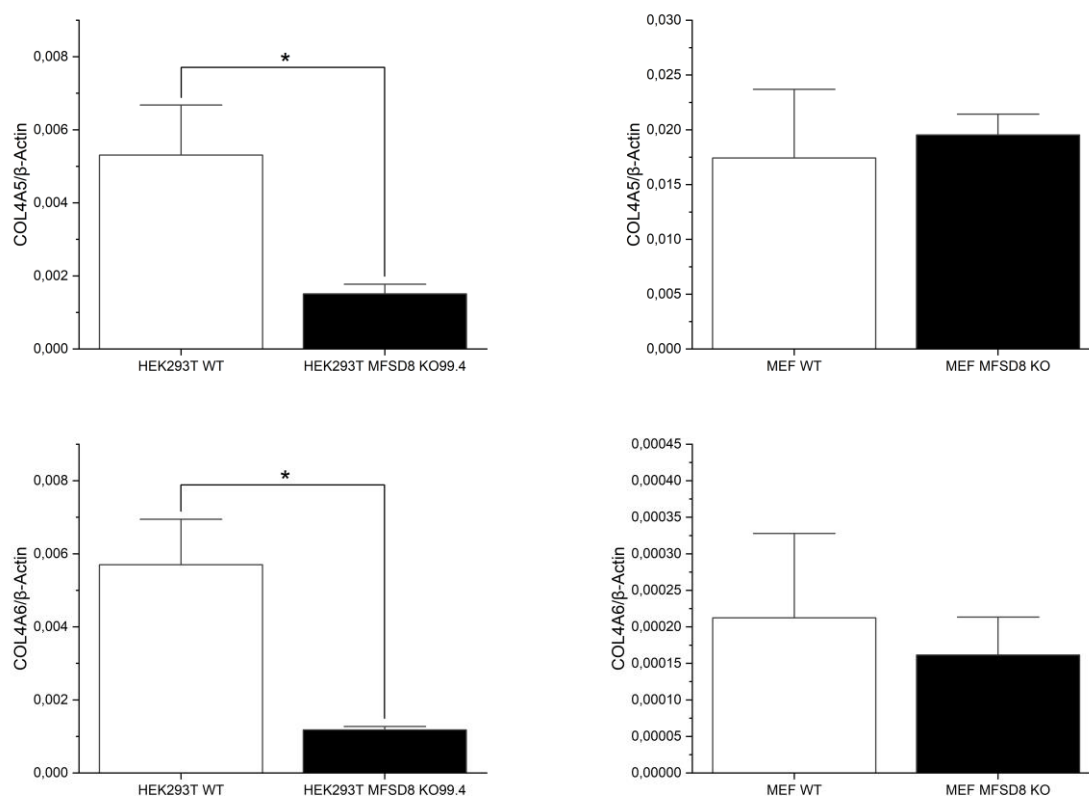
Wie oben erwähnt zeigten MFSD8-knockout-Zellen von beiden Zellgruppen eine verminderte mRNA-Expression von Laminin (siehe Abbildung 35)



**Abbildung 35 - Ergebnisse der qPCR auf LAMA1:** Ähnlich wie bei der Expression von TNC, schienen hier die Wildtyp-Zellen beider Zellgruppen einen wesentlich höheren LAMA1- mRNA-Gehalt zu haben.

Die letzten Untersuchungen sollte die mRNA quantifizieren, welche für die Untereinheiten  $\alpha_5$  und  $\alpha_6$  des Kollagen IV Proteins codieren. Kollagen IV ist ein trimeres, vernetzendes Protein der extrazellulären Matrix und kommt in jeder Basalmembran vor. Diese ist kein statisches Konstrukt, sondern wird ständig umgebaut und mit neuem Kollagen IV versehen. Dabei binden an Kollagen IV unter anderem Integrine, DDR1 und DDR2, was die Signifikanz des Kollagens für eine Fülle an Zellfunktionen unterstreicht. (53)

Es konnte durch die qPCR gezeigt werden, dass bei HEK-Zellen die Wildtyp-Population eine deutlich höhere Expression von COL4A5 und COL4A6 aufwies als deren knockout Variante. MEF-Zellen zeigten nur bedingt ein solches Verhalten. Für COL4A6 schien die Tendenz in geringerem Ausmaß übereinzustimmen, für die  $\alpha_5$ -Untereinheit zeigte sich jedoch ein gegensätzlicher Trend (siehe Abbildung 36).



**Abbildung 36 - Ergebnisse der qPCR auf COL4A5- und COL4A6-mRNA:** Analog den beiden anderen Proteinen der extrazellulären Matrix stellte sich bei HEK293T-Zellen heraus, dass beide Untereinheiten in Knockout-Zellen deutlich herunterreguliert waren. Bei MEF-Zellen erschien der Unterschied hierbei nicht so deutlich zu sein, bei COL4A5 konnte sogar eine gegensätzliche Tendenz gezeigt werden.

### 3.2. Migrationsassay

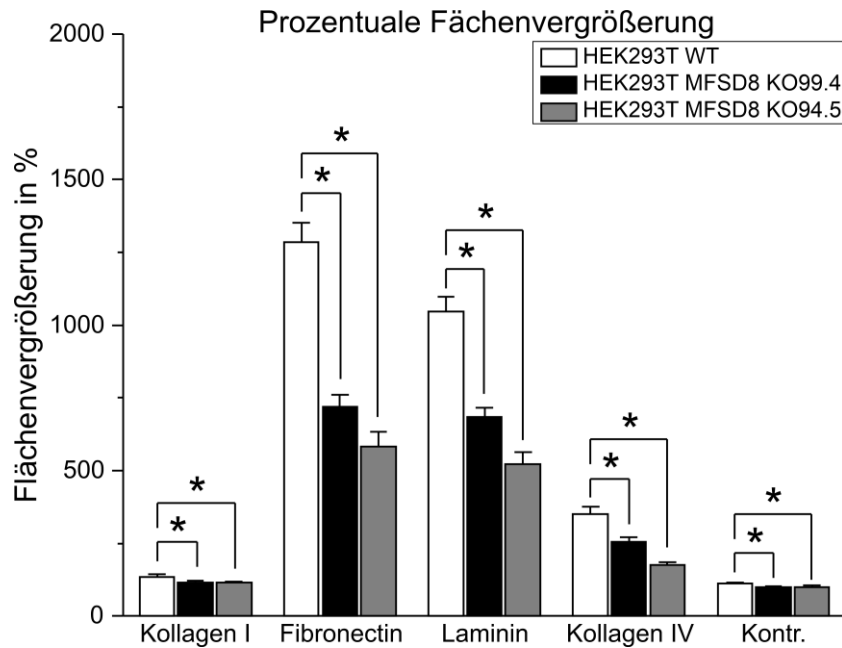
Da die Ergebnisse der quantitativen PCR die Gen-Chip-Untersuchung bestätigten, wurde im Folgenden der Neurosphere-Migrationsassay durchgeführt. Dabei wurden HEK293T-Zellen als MFSD8-Wildtyp-Variante und die beiden Knockout-Zelllinien 99.4 und 94.5 untersucht. Es wurde sowohl die relative Flächenvergrößerung in Prozent als auch die relative Radiusvergrößerung in Prozent gemessen. Diese normalisierten Größen glichen die anfänglichen Unterschiede in der Zellkugel-Größe aus und liefern so ein aussagekräftigeres Ergebnis.

Während der Durchführung der Einzelexperimente konnte beobachtet werden, dass alle untersuchten Zelltypen auf den ungecoateten Wellflächen nicht auswuchsen. Der größte Unterschied in der Migrationsgeschwindigkeit zeigte sich bei Zellen, die auf einem Fibronectinuntergrund ausgesät wurden (siehe Abbildung 39). So wuchsen Wildtypzellen innerhalb von 25 Stunden auf 1283 % ( $\pm 46$  %,  $n = 50$ ) ihrer Ausgangsfläche an und der Radius stieg um 341 % ( $\pm 8$  %,  $n = 50$ ). Hierbei ergaben sich, wie in den Abbildungen 37 bis 39 zu sehen, auch die deutlichsten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Knockout-Zellen vom Typ 99.4 kamen auf ein Flächenwachstum von 719 % ( $\pm 28$  %,  $n = 50$ ) und einer Radiusvergrößerung von 245 % ( $\pm 6$  %,  $n = 50$ ), KO94.5-Zellen auf ein 584 %iges Flächenwachstum ( $\pm 34$  %,  $n = 28$ ) und einer Radiusveränderung von 235 % ( $\pm 9$  %,  $n = 28$ ). Zusammenfassend kann hier von einem signifikanten Unterschied des Migrationsverhaltens von HEK 293T WT zu beiden KO-Zelllinien sowohl bezüglich der Flächen- als auch der Radiuszunahme gesprochen werden:

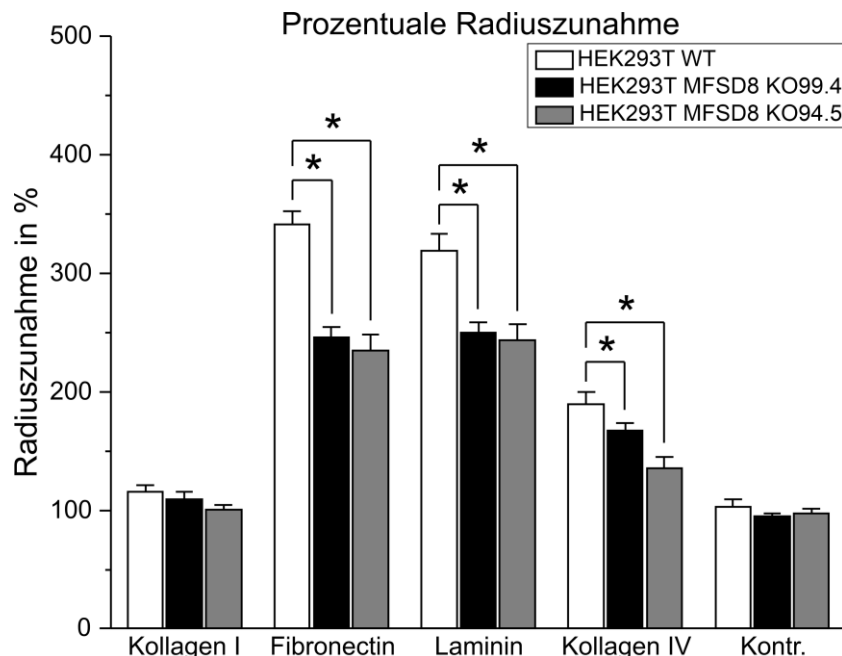
Flächenzunahme:  $p$  (WT vs. KO99.4) =  $5,4 \times 10^{-20}$ ,  $p$  (WT vs. KO94.5) =  $2,4 \times 10^{-21}$

Radiuszunahme:  $p$  (WT vs KO99.4) =  $6,3 \times 10^{-17}$ ,  $p$  (WT vs. KO94.5) =  $1,5 \times 10^{-15}$

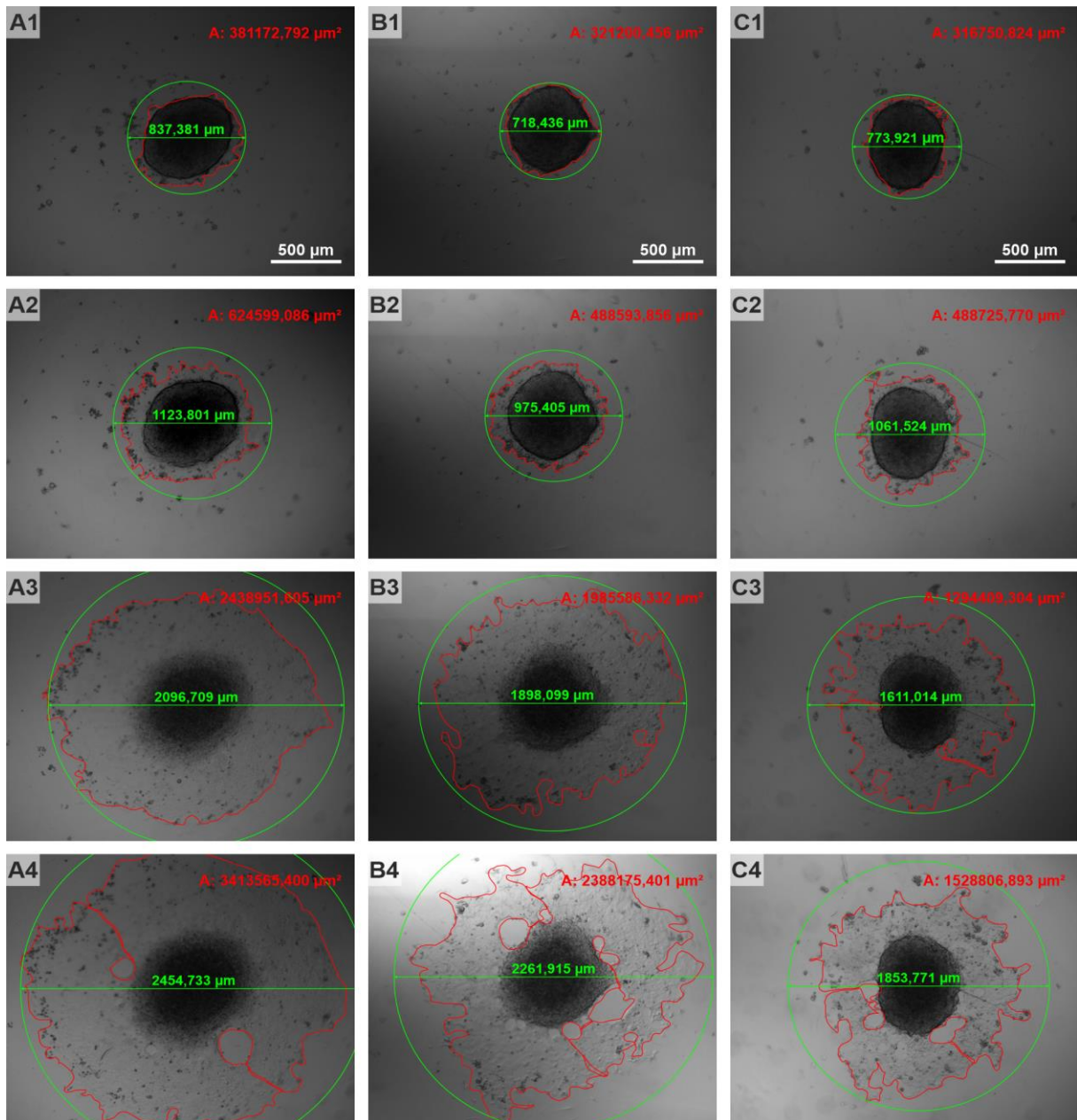




**Abbildung 37 - Prozentuale Flächenvergrößerung der Zellsphären nach 25 Stunden:** Aufgeführt sind die drei Zellgruppen (weiß: WT, schwarz: KO99.4, grau: KO94.5) und deren Flächenveränderung auf den verschiedenen Beschichtungen. Zellen auf Fibronectin-Beschichtung zeigten das beste Wachstum, gefolgt von Laminin, Kollagen IV, Kollagen I und den ungecoateten Wells. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Zellen ergaben sich bei Fibronectin, Laminin, Kollagen IV und Kollagen I. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass dieser Effekt keinen Off-Target-Effekt des CRISPR-CAS-Verfahrens darstellt, da sich beide Knockout-Varianten konkordant gegenüber der Wildtyppopulation verhalten.



**Abbildung 38 - Prozentuale Radiusvergrößerung der Zellkugeln nach 25 Stunden:** Aufgeführt sind wiederum die drei untersuchten Zellgruppen (weiß: WT, schwarz: KO99.4, grau: KO94.5) und ihre Radiusveränderungen. Hierbei sticht das Wachstum auf Fibronectin und Laminin ins Auge. Hier gibt es signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Zellen und beiden KO-Zellen. Auch bei Kollagen IV konnte im geringeren Ausmaß ein bedeutender Unterschied festgestellt werden. Auch hierbei verhielten sich beide KO-Zellen konkordant zueinander.

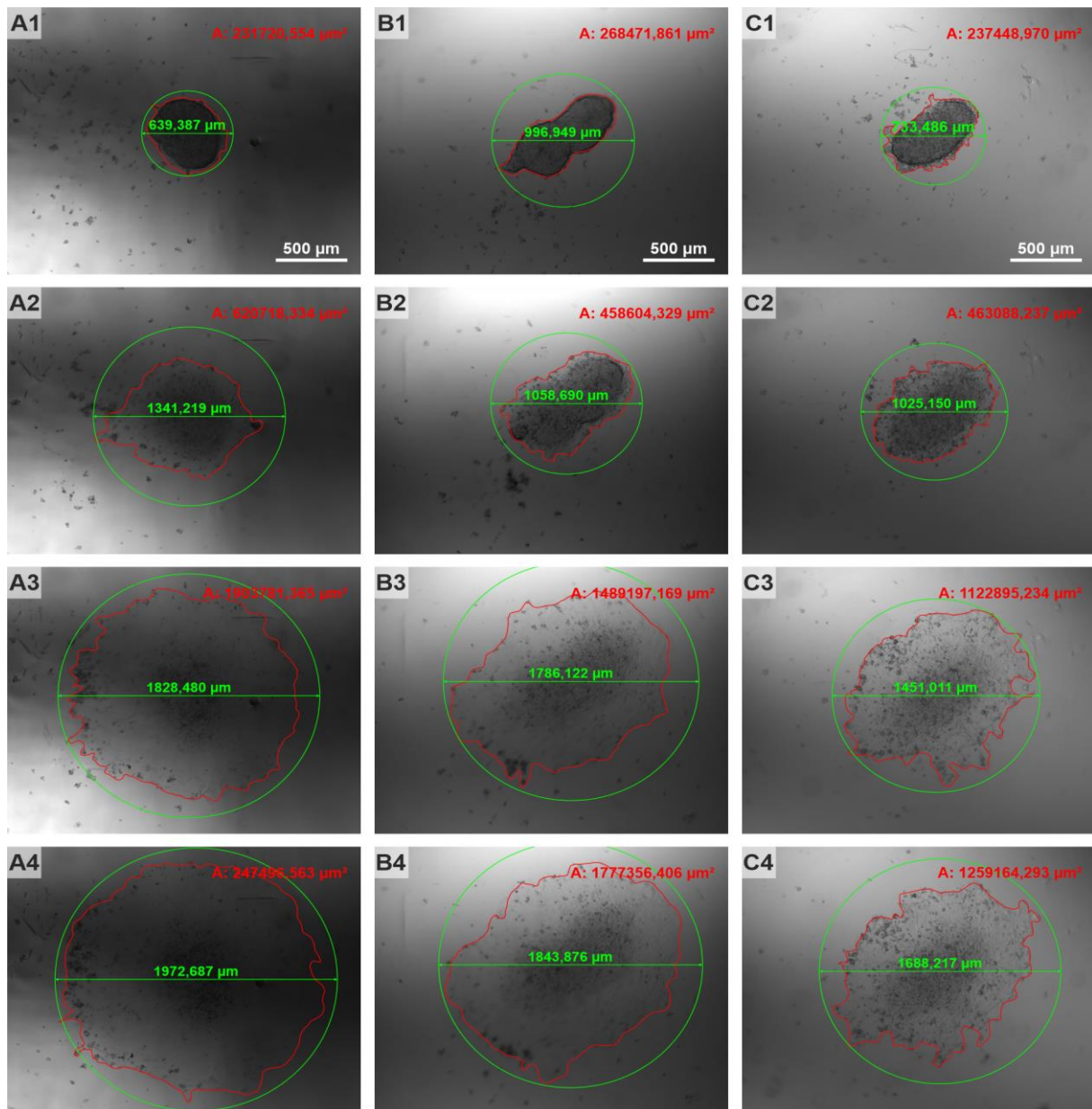


**Abbildung 39 - Wachstumskinetik auf Fibronectincoating im Vergleich:** Zu sehen ist pro Spalte jeweils die gleiche HEK293T-Zellkugel (A1-4: Wildtyp, B1-4: KO99.4, C1-4: KO94.5). Von oben nach unten ist der zeitliche Wachstumsverlauf in den Stationen A1-C1: 0 Stunden, A2-C2: 3 Stunden, A3-C3: 19 Stunden und A4-C4: 25 Stunden aufgeführt. Alle Zelltypen wuchsen gut auf Fibronectin aus. Nach drei Stunden wiesen die Zellrasen noch eine vergleichbare Fläche auf, nach der Inkubation über Nacht und der darauffolgenden 19 Stunden Messung wurden bereits deutliche Unterschiede in der Zellfläche und dem Radiuszugewinn erkennbar. Die deutlichsten Unterschiede kristallisierten sich jedoch in der letzten Messreihe nach 25 Stunden heraus. (Beachte auch die Zellrasenmorphologie)

Eine ähnliche, jedoch nicht ganz so stark ausgeprägte Wachstumskinetik zeigte sich auch in Wells, die mit Laminin beschichtet waren (siehe Abbildung 40). Wildtyp-Zellen wuchsen wiederum am schnellsten und vergrößerten die Zellrasenfläche um 1046 % ( $\pm 33$  %, n = 49) und den Radius um 319 % ( $\pm 9$  %, n = 49). Bei den Versuchen kristallisierte sich auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen WT-Zellen und den KO-Zelllinien heraus. Dabei konnten KO99.4-Zellen ein Flächenwachstum von 685 % ( $\pm 21$  %, n = 50) und KO94.5-Zellen ein Wachstum von 523 % ( $\pm 26$  %, n = 29) vorweisen. Bei der Betrachtung des Radius zeigten sich Vergrößerungswerte von 250 % ( $\pm 6$  %, n = 50, KO99.4) und 243 % ( $\pm 9$  %, n = 29, KO94.5). Diese Änderungen auf der mit Laminin gecoateten Oberfläche konnten durchwegs als signifikante Änderungen der Auswuchsfläche sowie der Radiusvergrößerung bezeichnet werden:

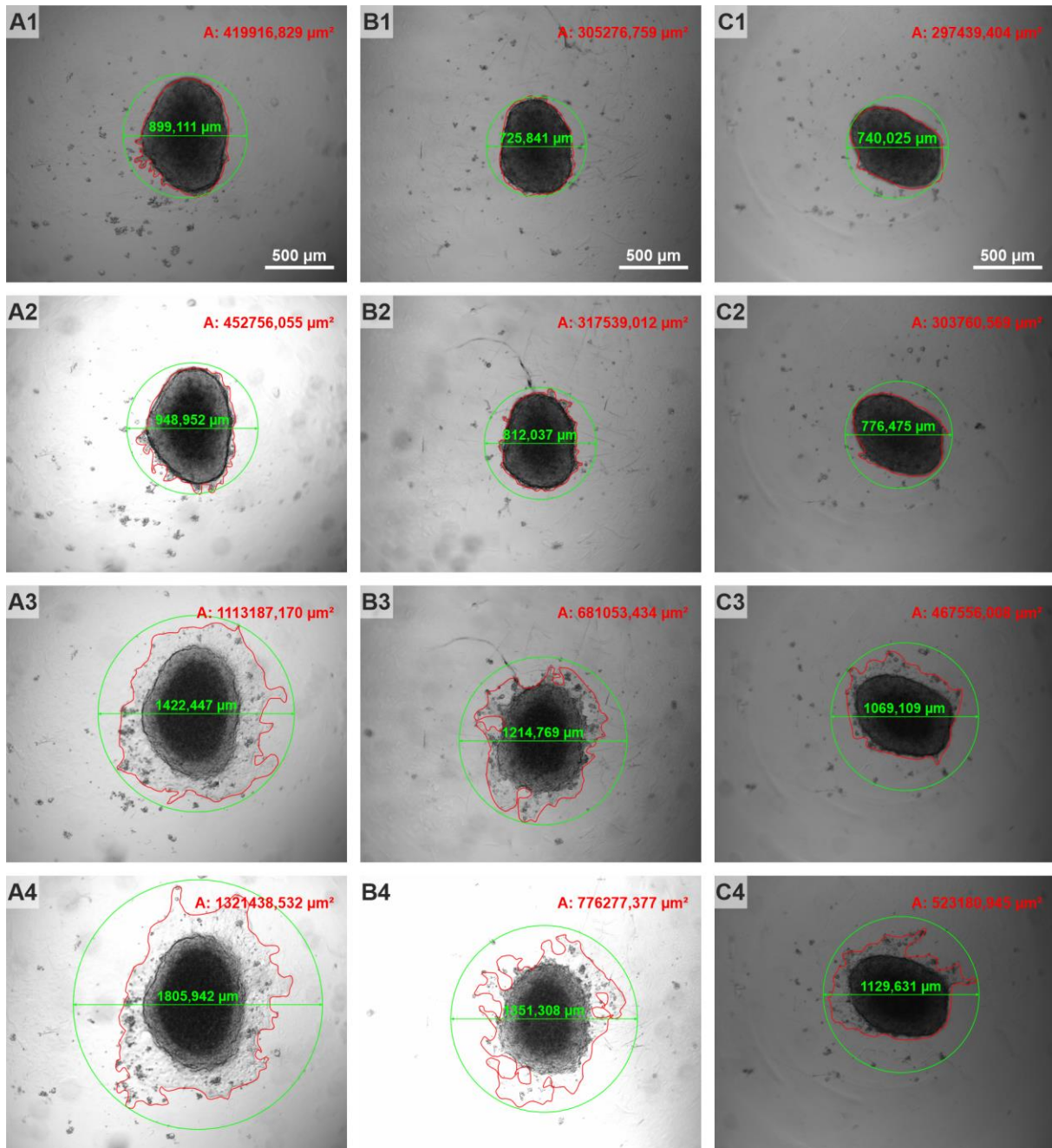
Flächenzunahme: p (WT vs. KO99.4) =  $2,07 \times 10^{-16}$ , p (WT vs. KO94.5) =  $4,0 \times 10^{-22}$

Radiuszunahme: p (WT vs KO99.4) =  $7,5 \times 10^{-9}$ , p (WT vs. KO94.5) =  $5,3 \times 10^{-8}$



**Abbildung 40 - Wachstumskinetik auf Lamininbeschichtung im Vergleich:** Zu sehen sind drei auswachsende Zellkugeln (A1-4: HEK293T Wildtyp-Zellen, B1-4: HEK293T KO99.4-Zellen, C1-4: HEK293T KO94.5-Zellen). Von oben nach unten ist das Auswachsen der Zellen zu Beginn der Messreihe (A1-C1 - 0h), nach 3 Stunden (A2-C2), nach 19 Stunden (A3-C3) und nach 25 Stunden (A4-C4) aufgeführt. Alle drei Zelllinien wuchsen auf Lamininuntergrund an und zeigten eine deutliche Wachstumskinetik. Wildtyp-Zellen schienen bereits nach 3 Stunden ein größeres Wachstum als die Knockout-Varianten zu zeigen. Bei den folgenden Messungen konnte dieser Eindruck bestätigt werden und es konnte ein deutlich schnelleres Wachstum der Wildtypzellen bestätigt werden. Im Vergleich zum Fibronectincoating schien der Unterschied zwischen WT und KO-Zellen nicht ganz so groß zu sein. Dieser Eindruck deckte sich mit den quantitativen/statistischen Erhebungen der Auswertung.

Das Wachstum auf den Kollagenen I und IV fiel nicht ganz so deutlich aus wie bei Fibronectin und Laminin (Abbildung 41). So wuchsen Zellen besser auf Kollagen IV als auf Kollagen I aus. Dabei waren auch hier HEK-Wildtyp-Zellen führend bei Flächen- und Radiusvergrößerung (siehe Abbildungen 37 und 38).



**Abbildung 41 - Wachstumskinetik auf Kollagen IV im Vergleich:** Es sind drei Zellkugeln der untersuchten Zelllinien HEK293T Wildtyp-Zellen (A1-A4), HEK293T MFSD8 99.4-Knock-Out-Zellen (B1-B4) und HEK293T MFSD8 94.5-Knock-Out-Zellen (C1-C4) zu erkennen. Von oben nach unten ist der zeitliche Verlauf von Beginn des Experimentes (A1-C1 - 0h) über die 3 Stunden Messung (A2-C2) und die 19 Stunden Messung (A3-C3) zur letzten Messung nach 25 Stunden (A4-C4). Im Vergleich zum Wachstum auf Fibronectin und Laminin konnte bei allen Zellvarianten eine wesentlich geringere/langsamere Kinetik gesehen werden. Ein Vergleich der Zellgruppen zeigte jedoch erneut, dass Wildtyp-Zellen schneller auswuchsen. Weiterhin schien der Zellflächenrand bei Wildtypzellen glatter und weniger zerklüftet zu sein (ähnlich der Lochbildung bei Fibronectin und Laminin).

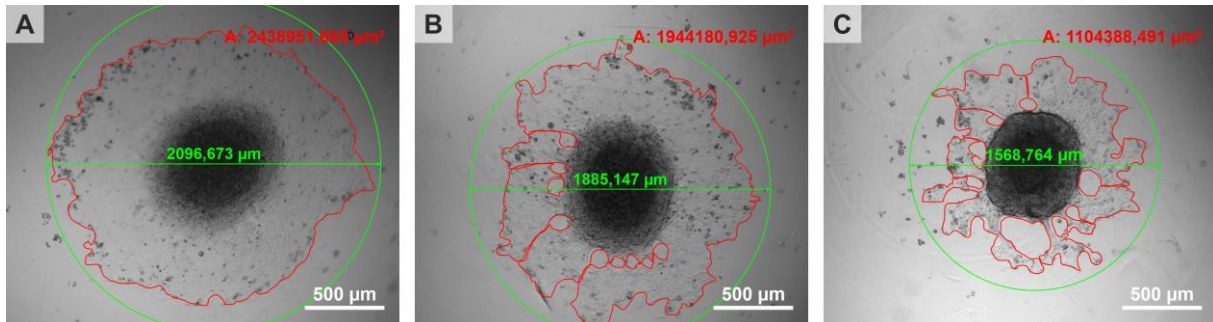
Auf Kollagen IV konnten Wildtyp-Zellen einen Flächenzuwachs von 350 % ( $\pm 18$  %, n = 49) und einen Radiuszugewinn von 189 % ( $\pm 7$  %, n = 49) erreichen. 99.4-knockout-Zellen blieben mit 254 % ( $\pm 11$  %, n = 50) Flächenzugewinn und 167 % ( $\pm 4$  %, n = 50) Zuwachs beim Radius hinter ihrem Wildtypendant zurück. Das Schlusslicht bildete hier wiederum die Knockout-Variante 94.5 mit Werten von 175 % ( $\pm 8$  %, n = 28) beziehungsweise 135 % ( $\pm 6$  %, n = 28) für Fläche und Radius. Hier zeigte sich im direkten Vergleich schlussendlich ebenso eine statistische Signifikanz:  
Flächenzunahme: p (WT vs. KO99.4) =  $3,5 \times 10^{-6}$ , p (WT vs. KO94.5) =  $3,4 \times 10^{-12}$   
Radiuszunahme: p (WT vs KO99.4) = 0,01, p (WT vs. KO94.5) =  $4,5 \times 10^{-8}$

Das gleiche Bild zeigte auch die Betrachtung des Wachstumsverhaltens auf Kollagen I. Hier stellte die MFSD8-Wildtyp-Population die geringfügig, jedoch bedeutsam stärker wachsende Gruppe dar. Es ergaben sich Werte von 135 % ( $\pm 5$  %, n = 50) für die Fläche und 115 % ( $\pm 4$  %, n = 50) für den Radius. Auch hier lagen KO-Zellen im Wachstum hinter der Wildtypvariante. So konnte nur eine Flächenvergrößerung von 117 % ( $\pm 4$  %, n = 50, KO99.4) und 114 % ( $\pm 4$  %, n = 29, KO94.5) erzielt und für die Radiusveränderung Werte von 109 % ( $\pm 4$  %, n = 50, KO99.4) und 101 % ( $\pm 3$  %, n = 29, KO94.5) beobachtet werden (siehe Abbildungen 37 und 38). Eine statistisch relevante Veränderung konnte somit nur im Vergleich der WT-Zellen und der beiden KO-Varianten im prozentualen Flächenzuwachs, nicht jedoch in der prozentualen Radiuszunahme beobachtet werden:

Flächenzunahme: p (WT vs. KO99.4) = 0,013, p (WT vs. KO94.5) = 0,013

Radiuszunahme: p (WT vs KO99.4) = 0,72, p (WT vs. KO94.5) = 0,05

Über die Messwerte hinaus wurde die Morphologie des Wachstums beurteilt. Hier zeigte sich ein Bild eines unterschiedlichen Zellrasenwuchses. Wildtypzellen wuchsen nahezu immer homogen als konfluenter Zellrasen aus und zeigten wenige bis gar keine Zellrasenlöcher. Bei beiden Knockout-Zelllinien war dies weniger der Fall. Hier zeigte sich ein eher löchriges Zellwachstum, mit Unterbrechungen der Kontinuität des Zellrasens (siehe Abbildung 42).



**Abbildung 42 - Morphologie der auswachsenden Zellkugeln nach 19 h:** A) HEK293T Wildtyp-Zellen: konfluenter, ununterbrochener Zellrasen, B) HEK293T MFSD8 99.4-knockout-Zellen: Die Wachstumszone erschien kleiner als bei Wildtypzellen (siehe Durchmesser) und andererseits waren einige kleine Diskontinuitäten im Zellrasen sichtbar, C) HEK293T MFSD8 94.5-knockout-Zellen: Bei diesem Zelltyp war im Vergleich mit Wildtyp-Zellen erneut ein kleinerer Durchmesser zu erkennen, des Weiteren ein extrem zerklüfteter Zellrasen. (Grün: Durchmesser, Rot: Zellumriss und dazugehörige Fläche).

### 3.3. Proliferationsassay

Hintergrund für die Durchführung des Proliferationsassays mittels Casy-Gerät stellte die Möglichkeit einer Missinterpretation der Radius- beziehungsweise der Flächenzunahme der Zellkugeln aus dem Migrationsassay sowie der abnehmenden Zellzahl der Adhäsionsuntersuchung dar. Durch eine mögliche Zellzahl-/Zellvolumenveränderung könnte hierbei eine Beeinträchtigung der realen Flächenzunahme verursacht werden.

Bei diesem Experiment wurden HEK293T-Wildtypzellen, HEK293T MFSD8-knockout-Zellen vom Typ 99.4 und 94.5, sowie Wildtyp-Mausfibroblasten (MEF) und deren Knockout-Partner untersucht. Neben der absoluten Zellzahl wurde des Weiteren ein auf die Anfangszellzahl normalisierter Wert berechnet. Dieser wird im Folgenden als Proliferationsfaktor bezeichnet. Hierbei wurden die Werte zu jedem Zeitpunkt durch den 24-Stunden-Wert dividiert ( $F_P = N(t_x)/N(24h)$ ). Dieser Wert erscheint aussagekräftiger, da die anfänglichen Unterschiede beim Anwachsen an den Petrischalenuntergrund eine untergeordnete Rolle spielen sollte. Nach 72 Stunden zeigten sich innerhalb der HEK-Zellen (intraindividuell) keine signifikanten Unterschiede beim Proliferationsfaktor. Nach 96 Stunden zeigten CLN7-WT-HEK-Zellen einen deutlich höheren Zellproliferationsfaktor. Nach 72 Stunden sowie nach

96 Stunden konnten Werte für Pf von 5,79 und 15,55 bei HEK Wildtyp-Zellen gegenüber 3,38 bzw. 4,46 (KO99.4), 2,07 und 3,97 (KO94.5), 1,81 und 2,35 (MEF-WT) und schliesslich 2,28 und 2,17 (MEK-KO) wie in Abbildung 43 zu sehen beobachtet werden. Abschliessend wurden die Zellvolumina der verschiedenen Zelllinien betrachtet. Hierbei stellte sich heraus, dass HEK-Zellen sich untereinander kaum in Ihrem Zellvolumen unterschieden. Auch die Fibroblastengruppe unterschied sich intraindividuell nicht in ihrer Zellgröße. Zu sehen war jedoch ein signifikanter Unterschied beim Volumen zwischen HEK293T-Zellen und den Mausfibroblasten. HEK-Zellen waren dabei zu jedem Messzeitpunkt voluminöser als MEF-Zellen (siehe Abbildung 44).

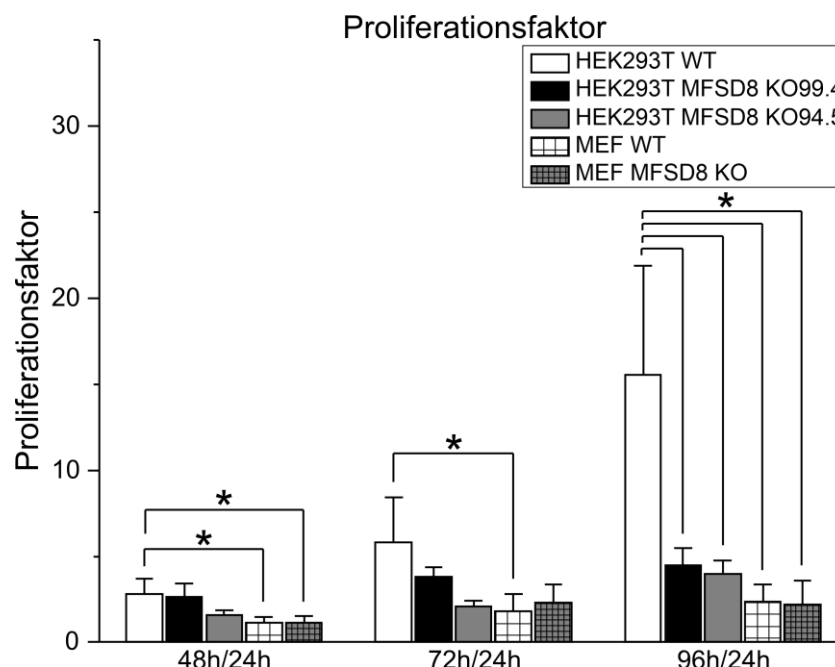
Proliferationsfaktor HEK 48h/24h:  $p$  (WT vs. KO99.4) = 0,997,  $p$  (WT vs. KO94.5) = 0,205

Proliferationsfaktor HEK 72h/24h:  $p$  (WT vs. KO99.4) = 0,566,  $p$  (WT vs. KO94.5) = 0,055

Zellvolumen HEK 24h:  $p$  (WT vs KO99.4) = 0,997,  $p$  (WT vs. KO94.5) = 0,085

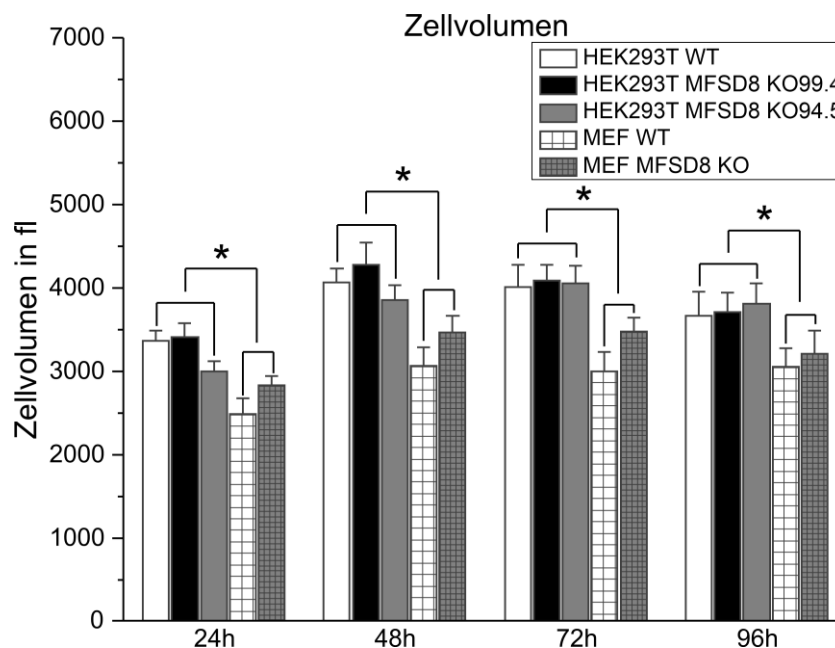
Zellvolumen HEK 48h:  $p$  (WT vs KO99.4) = 0,832,  $p$  (WT vs. KO94.5) = 0,812

Zellvolumen HEK 72h:  $p$  (WT vs KO99.4) = 0,997,  $p$  (WT vs. KO94.5) = 0,999



**Abbildung 43 - Proliferationsfaktor im zeitlichen Verlauf im Vergleich:** Ab der 72h-Messung konnte durch die Normalisierung auf den Anfangswert (24h) der Zellzahlmessung eine deutlich gesteigerte Proliferation der HEK293T-WT-Zellen im Vergleich zu allen anderen Zelltypen beobachtet werden (jeweils n=8).





**Abbildung 44 - Zellvolumen in Femtoliter im Vergleich:** HEK- sowie MEF-Zellen zeigten untereinander zwar geringfügige Volumenunterschiede, diese erwiesen sich jedoch als nicht signifikant. Einen deutlichen Unterschied konnte indes interindividuell gezeigt werden. So wiesen HEK-Zellen ein deutlich höheres Volumen als MEF-Zellen vor.

### 3.4. Adhäsionsassays

#### 3.4.1. Schütteltest

Auf Grund der veränderten mRNA-Ausstattung bezüglich Integrinuntereinheiten sowie Korezeptoren der Zelladhäsion und Proteinen der extrazellulären Matrix wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem eine Scherkraft durch ein Schütteln von Petrischalen auf den Zellrasen ausgeübt wurde. Bei diesem Experiment konnte beobachtet werden, dass es sowohl unter Behandlung mit calciumfreier Ringerlösung als auch mit Accutase zu einer schnelleren Ablösung der Wildtypzellen kam. Des Weiteren wurden die Zellsuspension und der verbliebene Zellrasen unter einem Mikroskop betrachtet. Hierbei konnte gesehen werden, dass sich die abgelösten Zellen in der Suspension deutlich unterschieden. Wildtypzellen lösten sich in verhältnismäßig großen "Zellfetzen" ab, die zum Teil auch noch am Schälchenboden adhärten (beim Schwenken des Schälchens bot sich ein Bild wie bei schwingendem Seegras). Die Zellsuspension von abgelösten Knockout-Zellen schien eher von kleinen Zellansammlungen bestimmt zu sein (griesartig). Da die Zellkulturschälchen in diesen ersten Tests nicht mit Molekülen der extrazellulären

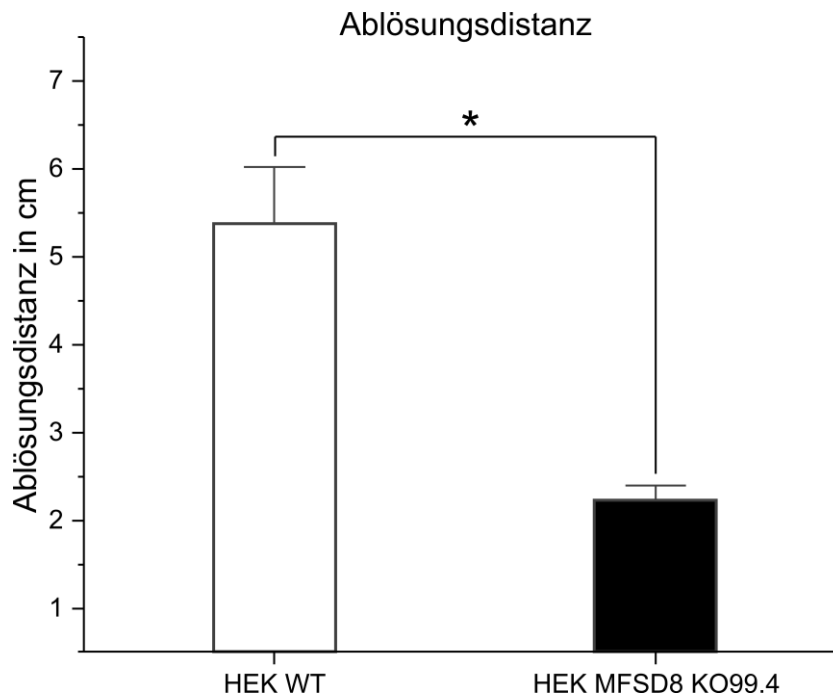
Matrix beschichtet waren und somit nicht die physiologische Interaktion der Zellen wiedergeben konnten, wurde ein zweiter Vorversuch durchgeführt, bei dem die Schälchen mit Kollagen I gecoatet wurden. Die Schalen wurden hierfür mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  beschichtet (Fläche ca.  $10 \text{ cm}^2 \rightarrow 1 \text{ ml}$  Kollagenlösung mit  $100 \mu\text{g}$  Kollagen, Inkubation über Nacht und Aussäen der Zellen nach dem Trocknen der gecoateten Schälchen). Auch bei diesem Experiment konnten analoge Beobachtungen gemacht werden mit dem Unterschied, dass beide Zelllinien etwas besser an der kollagenbeschichteten Oberfläche hafteten. Diese Ergebnisse rechtfertigten weitere Untersuchungen zur Quantifizierung der Unterschiede von Zell-ECM-Interaktion sowie der Zell-Zell-Haftung.

#### 3.4.2. Flusstest

Um eine erste Quantifizierung der Beobachtungen aus dem Schütteltest zu vollziehen wurde im Verlauf ein Test durchgeführt, der auf der Abgabe einer gerichteten Kraft mittels Flüssigkeitsstrom beruht. Hierfür wurde durch die Verklebung einer großen sowie einer kleinen Petrischale ein Flusskanal hergestellt und ein Flüssigkeitsstrom mittels Venenverwilkanüle verabreicht. Bereits visuell konnten nach der Anlage des Flusses deutliche Unterschiede im Zellrasenbesatz festgestellt werden. So wurde beobachtet, dass HEK293T 99.4 KO-Zellen scheinbar deutlich besser haften als das Wildtypendant. Weiterhin konnte eine ähnliche Ablösungskinetik wie beim Schüttelversuch gesehen werden. KO-Zellen lösten sich in kleineren Zellgruppen ab. Wildtypzellen hingegen wurden in Form größerer Zellrasenfetzen abgespült.

Wie in Abbildung 22 erkenntlich, wurde ein klarer Zellrasenrand gefunden, bis zu welchem der Abstand zur Flowquelle gemessen wurde.

Hierbei konnte, wie in Abbildung 45 gezeigt, eine Ablösungsdistanz bei Wildtypzellen von  $5,4 \text{ cm} (\pm 0,7 \text{ cm})$  und bei KO-Zellen von  $2,2 \text{ cm} (\pm 0,2 \text{ cm})$  gemessen werden ( $p= 0,0037$ ,  $n= 4$ ). Hieraus scheint sich ein signifikanter Unterschied in der Zelladhäsionsfähigkeit zu ergeben, was eine genauere quantitative Analyse dieser Zellfunktion für sinnvoll erschienen ließ. Dies sollte in weiterführenden Experimenten mit kommerziellen Flowkammern mit vorgegebenen Volumen, einem definierten Querschnitt und einem genau definierten Volumenfluss getestet werden.

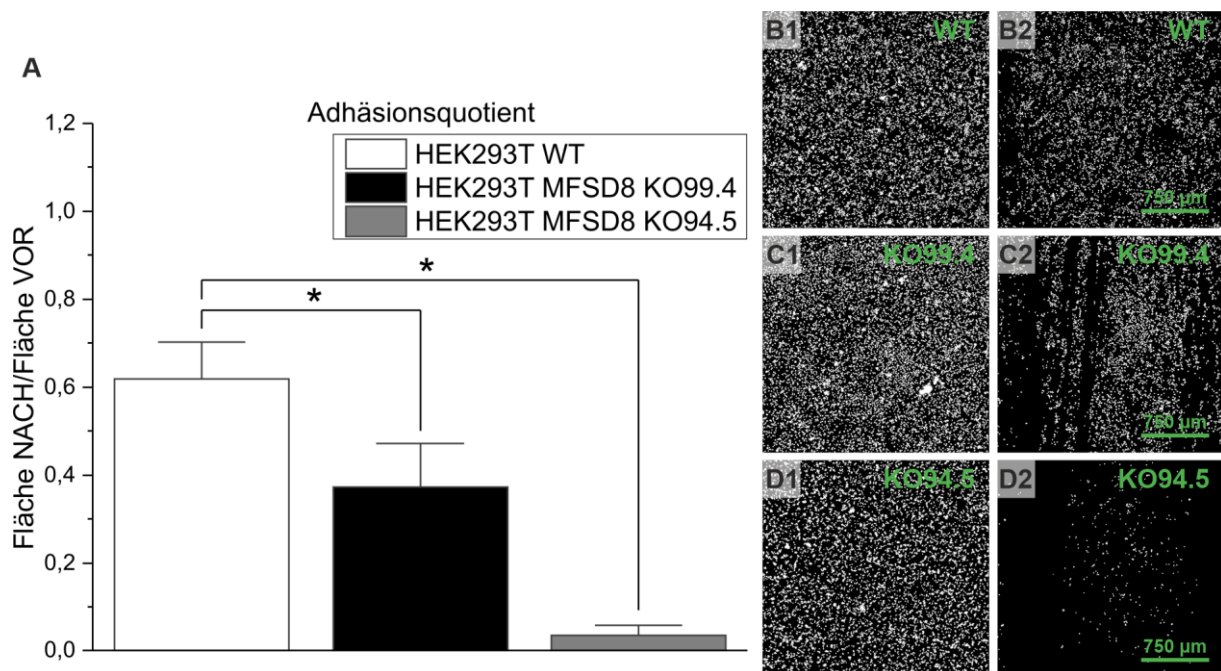


**Abbildung 45 - Ablösedistanz HEK293T Wildtyp vs. HEK293T KO99.4:** Erkennbar ist ein deutlicher Unterschied in der Ablösedistanz; HEK293T WT: 5,4cm (± 0,7 cm), HEK293T KO99.4-Zellen: 2,2 cm (± 0,2 cm), (p= 0,0037, n= 4)

### 3.4.3. Quantitativer Flusstest

Bei der Durchführung des quantitativen Adhäsionstests wurden jeweils 12 Messkammern für HEK293T Wildtyp-Zellen und HEK293T MFSD8-knockout-Zellen der Typen 99.4 und 94.5 ausgewertet. Hierbei konnte, wie in den Vorversuchen beschrieben, ein deutlicher Unterschied in der Adhäsionskapazität der Zellen gesehen werden. Bei der visuellen Betrachtung der zellbesetzten Kammern nach Anlegen des Flusses wurde deutlich, dass WT-Zellen gut am Untergrund haften blieben, MFSD8-KO-Zellen vom Typ 94.5 wurden fast vollständig abgewaschen, wohingegen 99.4-knockout-Zellen eine Zwischenposition annahmen. Im Folgenden konnte nach der Normalisierung auf die Anfangszellzahl (Kernfluoreszenzfläche der ersten Messung) über die Berechnung des Adhäsionsquotienten ( $Q_{\text{ADHÄSION}} = f_{\text{NACH}} / f_{\text{VOR}}$ ), wie in Abbildung 46 gezeigt, eine deutlich bessere Zell-Fibronectin-Interaktion bei Wildtypzellen ( $Q = 0,629 \pm 0,19$ ) gegenüber Knockout-Zellen vom Typ 99.4 ( $Q =$

0,373 ± 0,23) und des Typs 94.5 (Q = 0,034 ± 0,057) bestätigt werden (p (WT vs. 99.4) = 0,00492, p (WT vs. 94.5) = 6,4x10<sup>-9</sup>).



**Abbildung 46 - Ergebnisse des quantitativen Zelladhäsionstests:** A: Erkennbar ist die deutlich bessere Adhäsionsfähigkeit der HEK293T Wildtypzellen mit einem Adhäsionsquotienten von ungefähr 0,63 gegenüber beiden MFSD8-knockout-Varianten (99.4 = 0,37, 94.5 = 0,034), B1: Zellkerndichte vor Anlage des Flusses bei HEK293T Wildtypzellen, B2 zeigt HEK293T WT-Zellen nach der Verabreichung des Flusses mit etwas geringerer Zell(kern)dichte. C1 und C2 zeigen HEK293T MFSD8-knockout-Zellen vor und nach dem Flussprotokoll, hier fiel ein etwas geringerer Zellkernbesatz auf als bei den Wildtypzellen. Die geringste Zelldichte zeigte sich bei HEK293T MFSD8-KO94.5-Zellen, erkennbar in D1 vor der Flussverabreichung und in D2 nach dem Protokoll.

### 3.5. Fluoreszenzfärbungen

Um die Unterschiede bei der ungerichteten Migration von Wildtyp-HEK-Zellen gegenüber den CLN7-knockout-Varianten zu erklären, wurden im Verlauf der Promotionsarbeit verschiedene (Immun-) Fluoreszenzfärbungen vorgenommen. Einerseits sollte das sogenannte Migrasom im Vergleich dargestellt werden, das eine Formation von Vesikeln am Zellheck einer migrierenden Zelle darstellt und mit einer Internalisation von Integrinen und anderen Zell-ECM-Interaktionspartnern in Verbindung gebracht wird. Dieses Migrasom soll des Weiteren an sogenannte Retraktionsfasern binden, welche aus Proteinen des Cytoskeletts bestehen und einen Zug auf diese Strukturen ausüben sollen. (54)

Weiterhin sollen Integrine und das Actin-Fasersystem in einem strengen Zusammenhang bei der Migration stehen. So soll es über die Einstellung von Retraktionskräften über die Actinfasern zu einer Ausrichtung von Integrinstrukturen kommen. Dies stellt eine Art der Inside-Out-Signalebene dar. (55)

Diese Umstände erklären auch eine Polarisierung von migrierenden Zellen. (56) Die Interaktionen von Cytoskelett, der extrazellulären Matrix und den vermittelnden Proteinen wird auch als Hypothese der molekularen Koppelung bezeichnet und entwickelte sich in den 1960er Jahren aus der Beobachtung von Lamellopodien von Fibroblasten. (57)

Neben dem Actin-Cytoskelett wird auch dem Mikrotubuli-System eine regulierende Funktion für die Zelladhäsion und -Migration zugeschrieben. Dabei sind diese Strukturen für den Umsatz des Adhäsionsapparates und die Vermittlung bzw. die Steuerung intrazellulärer Signalwege verantwortlich. Die genauen Mechanismen, die zu diesen Funktionen führen, sind noch nicht abschliessend geklärt, scheinen jedoch auf indirektem Wege über große Molekülkomplexe (unter anderem Rho) stattzufinden. Weiterhin beeinflussen Mikrotubuli auch die Funktion der Actin- und Myosininteraktion, was die Migrationseigenschaften beeinflussen kann. Andersherum kann auch die Integrinfunktion die Stabilität, den Umsatz und die Organisation des Mikrotubuli-Systems beeinflussen. (58)

Bei der Färbung von F-Actin, Tubulin und Integrin  $\beta_1$  wurde demnach darauf geachtet, ob es zwischen HEK293T-Wildtyp-Zellen und dem Knockout-Pendant quantitative Unterschiede (also der Fluoreszenzintensität) in der Proteinausstattung, als auch Unterschiede im Verteilungsmuster gibt.

In den Zytoskelettfärbungen der HEK293T-Zellen, bei der Integrin  $\beta_1$ -Färbung als auch der Kofärbung von MEF-Zellen konnten keine eindeutigen Unterschiede beobachtet werden. Hier stellt natürlich das menschliche Auge sowie die Mikroskopie begrenzende Faktoren dar.

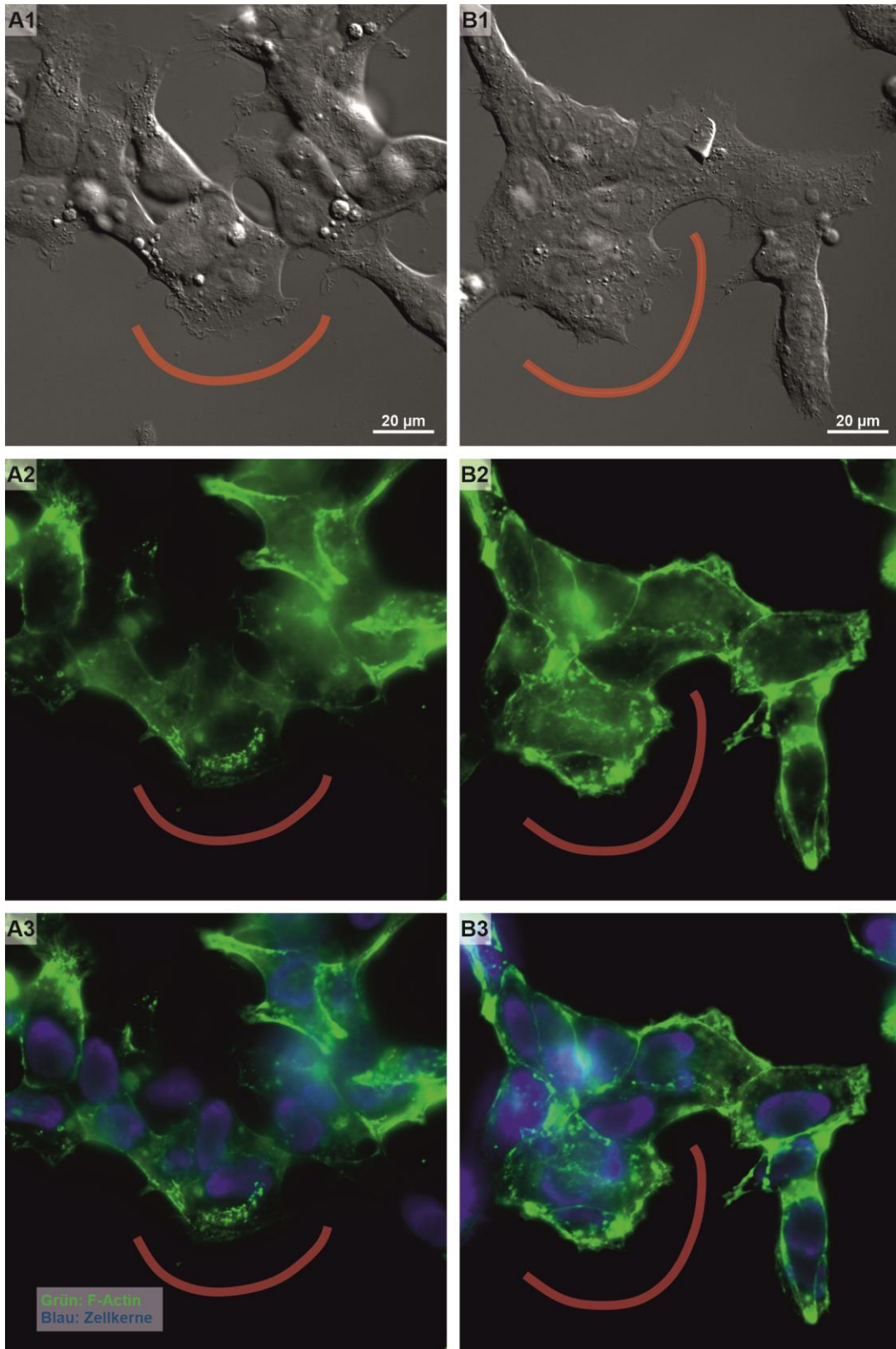
Bei der Actinfärbung konnten bei beiden Zellgruppen Bereiche identifiziert werden, in denen sich punktförmige Ansammlungen von F-Actin an der Zellmembran fanden. Hier konnten im Durchlichtbild meist Bereiche der Zellmigration in Form von Lamellopodien gefunden werden (siehe Abbildung 47).

Bei der Anfärbung von Tubulin zeigte sich ein retikuläres Muster von Mikrotubulifasern über den ganzen Zellkörper unter Aussparung des Zellkerns. Hier

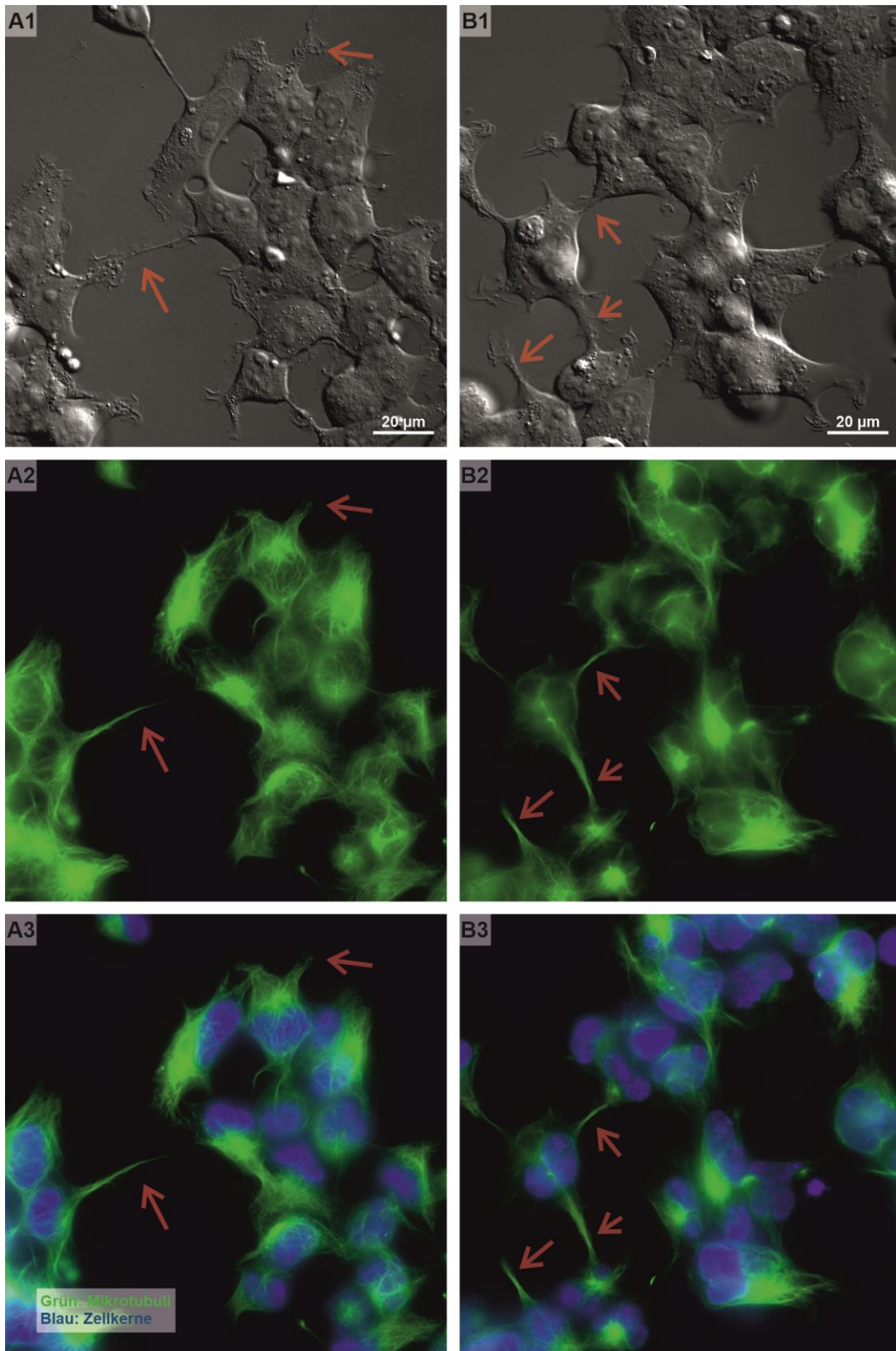
konnte die von Seetharaman et.al. (58) beschriebene Beteiligung von Mikrotubuli an der Ausbildung von Filopodien/Podosomen erahnt werden (siehe Abbildung 48). Auch konnte bei der Betrachtung von Lamellopodien ein radiäres Einstrahlen von Tubulinfasern in auswachsende Bereiche der Zelle gezeigt werden (Abbildung 49).

Die Integrin-Färbung ergab keine offensichtlichen Unterschiede in der Ausstattung von  $\beta_1$ -Integrinen zwischen Fibroblasten des Wildtyps im Vergleich zu MFSD8-Knockout-Zellen. Es wurde hier auf MEF-Zellen zurückgegriffen, da alle untersuchten HEK-Zellen eine für das Auflösungsvermögen des Mikroskopes sowie des Auges wahrscheinlich zu geringe Integrinausstattung und entsprechend geringe Fluoreszenz zeigten. Man konnte bei Betrachtung der Lokalisation eine stärkere Ausstattung von Integrinen nahe Zell-Zell-Grenzen sehen. Über den restlichen Zelleib zeigte sich eine relativ homogen-granuläre Verteilung am Zellboden (siehe Abbildung 50). Allerdings konnte bei dieser Färbung keine Aussage über Migrationsfronten gemacht werden, da das Wachstum nahezu konfluent war. Hierfür wurde eine letzte Färbeuntersuchung unter Aussaat einer sehr geringen Zellzahl durchgeführt.

Bei der Kofärbung von Integrin  $\beta_1$  und Actin-Fasern sollten Migrationsfronten bzw. deren Korrelate (Lamellopodien etc.) untersucht werden. Hierfür wurden Bereiche des Präparates mit sehr wenigen Zellen, die Migrationsbereiche zeigten, ausgesucht. Auch hier konnten keine Unterschiede bei der Integrin- und Actinausstattung gezeigt werden. Sehr gut erkennbar zeigten sich jedoch Bereiche der erhöhten Migration. Hier kumulierten Integrine (deutlich stärkere Fluoreszenz der Integrin-Ak, im Bild 51 rot dargestellt) und es zeigte sich ein radiäres Einstrahlen von Actin-Fasern in diese Bereiche (siehe Abbildung 51). Dies stellt ein Korrelat der sich vorschiebenden Zellmembran dar.

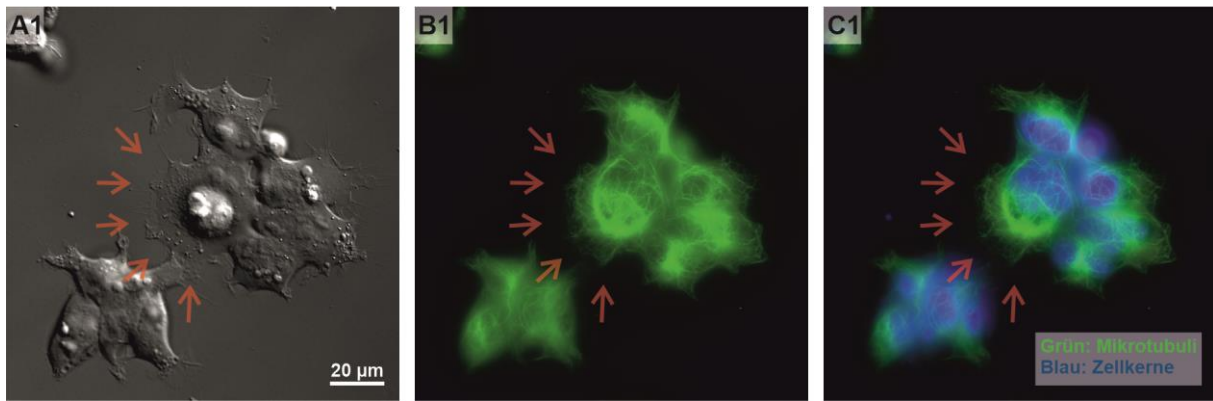


**Abbildung 47 – SiR-Actin-Färbung von HEK293T-Wildtyp-Zellen (A1-3) und MFSD8-KO-Zellen 99.4 (B1-3):** A1/B1 jeweils das Durchlichtbild, A2/B2 Actin-Färbung, A3/B3 Actin- und Zellkernfärbung. Hier ist kein Unterschied im Verteilungsmuster und bei der Fluoreszenzintensität der Actin-Färbung erkennbar. Im linken unteren Bereich jeweils Migrationsfronten (rote Kurven, Lamellopodien) mit punktförmig-granulären „Actinnestern“

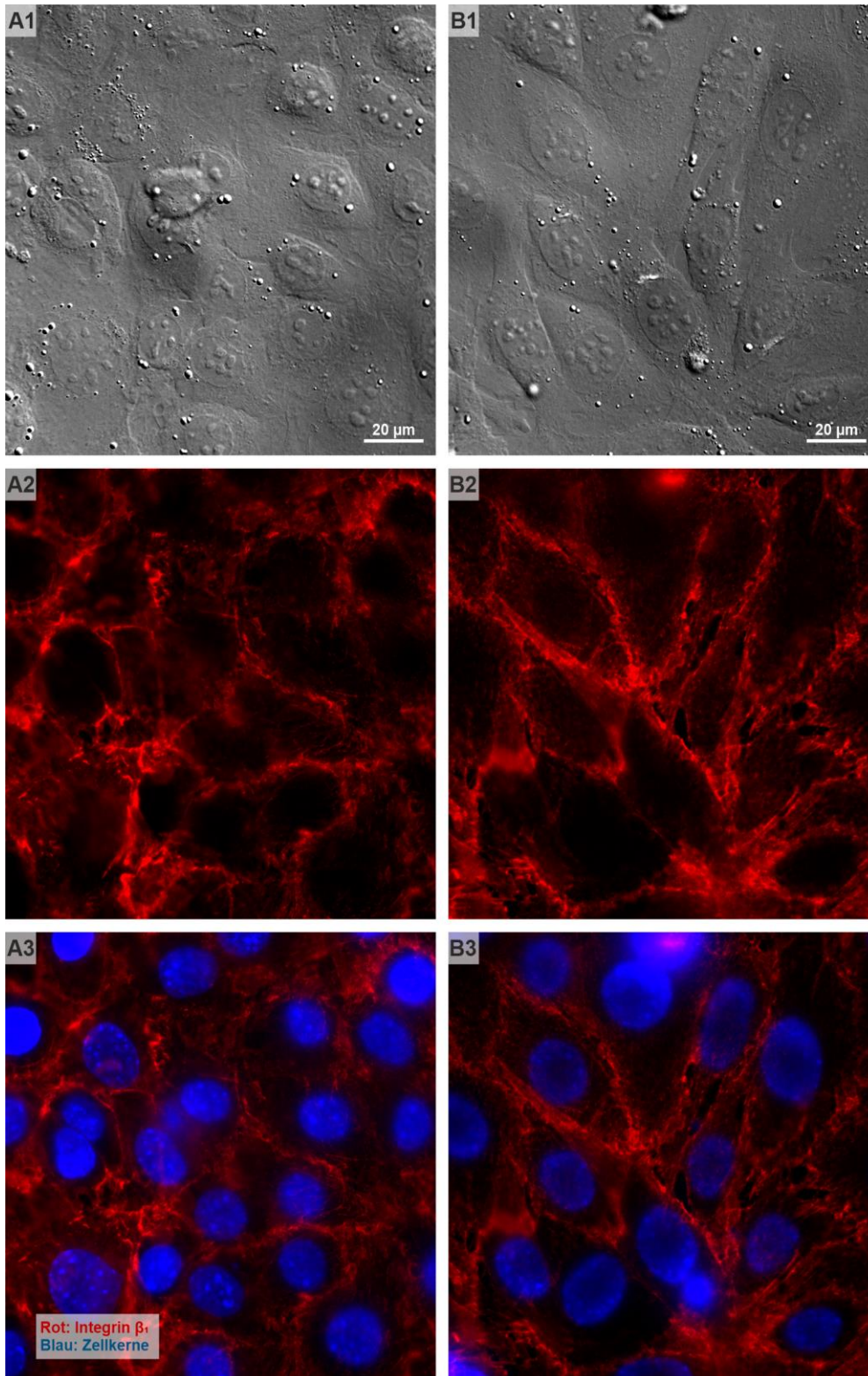


**Abbildung 48 - SiR-Tubulin-Färbung von HEK293T-Wildtyp-Zellen (A1-3) und MFSD8-KO-Zellen 99.4 (B1-3):** A1/B1 jeweils das Durchlichtbild, A2/B2 Mikrotubuli-Ausstattung, A3/B3 Mikrotubuli- und Zellkernfärbung. Weder das Verteilungsmuster noch die Intensität der Fluoreszenzmarkierung lässt eine Unterscheidung zwischen Wildtypzellen und Knockout-Zellen zu. Bei beiden Zelltypen ist ein retikuläres Tubulin-Muster (grün) zu erkennen, sowie eine Beteiligung in der Architektur von Zellausziehungen (beispielhaft rote Pfeile).

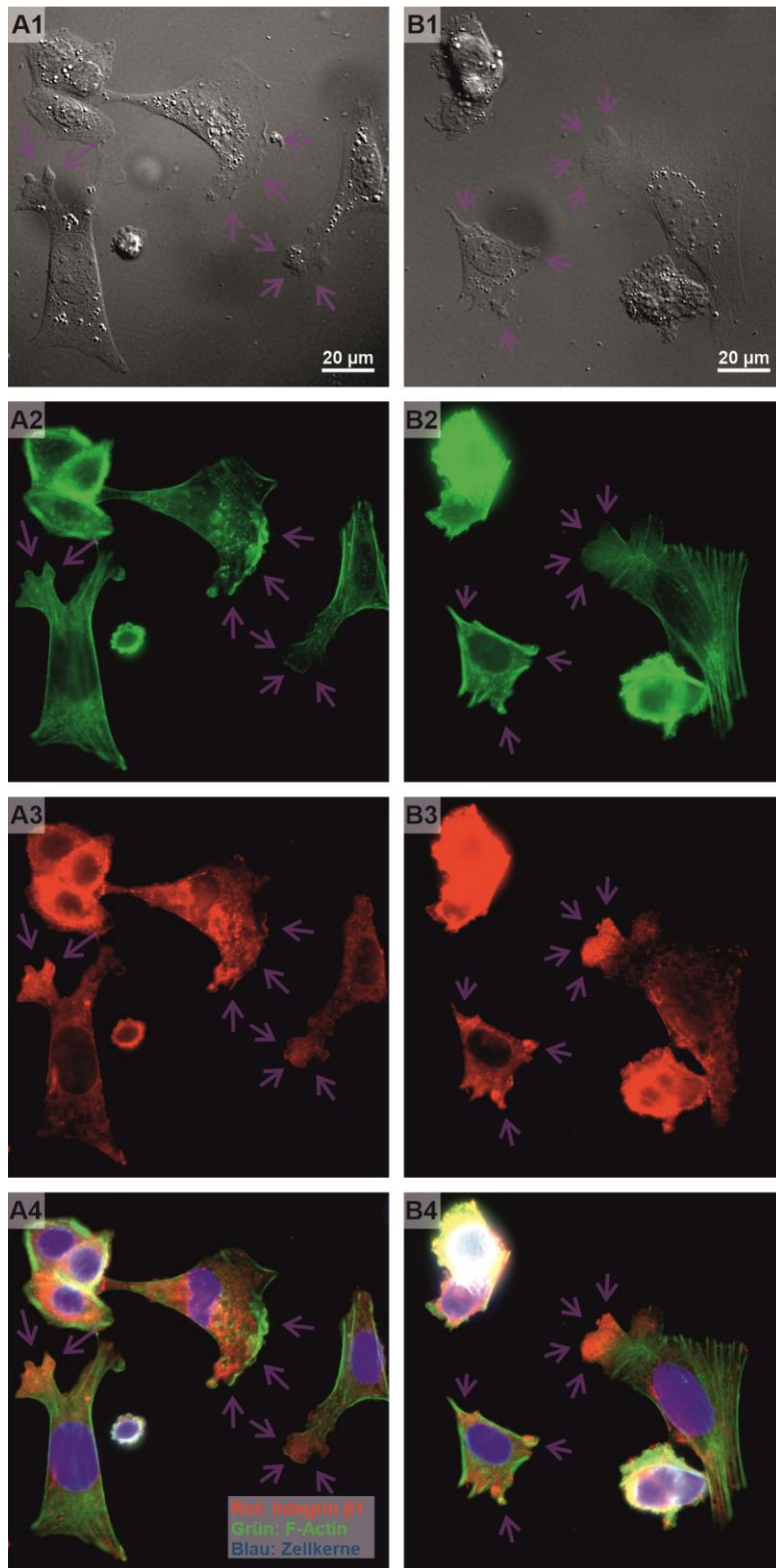




**Abbildung 49 – Aufnahme der SiR-Tubulin-Färbung von HEK293T MFSD8-knockout-Zellen:** A1 Durchlicht, B1 Tubulinfluoreszenz, C1 Mikrotubuli grün und blau Zellkerne. Zentral im Bild ein Lamellopodium (siehe rote Pfeile), bei dem gut die radiäre Einstrahlung der Tubuli erkennbar wird.



**Abbildung 50 – Integrin  $\beta_1$ -Färbung auf Grund eines unzureichenden Färbeverhaltens von HEK-Zellen an MEF-Wildtyp (A1-A3) und MEF-MFSD8-knockout-Zellen (B1-B3):** Dargestellt sind von oben nach unten Durchlichtbild, ITGB1-APC-Fluoreszenz und ITGB1 + Zellkernfärbung. Erkennbar ist ein dichter Zellrasen mit ungefähr gleicher Zelldichte von WT- und KO-Zellen. Die Intensität der Integrin-Fluoreszenz ist bei beiden Präparaten nahezu identisch. Auch der dichtere Besatz mit Integrinen an Zell-Zell-Grenzen und granulär-punktförmig am Zellboden ist gut zu sehen. Der Boden unter den Zellkernen scheint ausgespart zu sein.



**Abbildung 51 – Koförderung von ITGB1 und Actin-Zytoskelett bei MEF WT- (A1-A4) und MFSD8-KO-Zellen (B1-B4) auf Grund eines unzureichenden Färbeverhaltens von HEK-Zellen: A1/B1 Durchlichtbild, A2/B2 Actinfärbung, A3/B3 ITGB1-Färbung, A4/B4 Merge-Bild. Es sind bei beiden Zelllinien sehr dünn ausgesäte Zellen zu erkennen, die als Reaktion Lamellopodien gebildet haben. Hier fällt bei der Actinfärbung der radiäre Einfall der Actinfasern und bei der ITGB1-Färbung eine im Vergleich zum Rest der Zellen deutlich erhöhte Integrindichte auf (siehe violette Pfeile, wesentlich hellere Fluoreszenz), jedoch konnten auch hier keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien gefunden werden.**

## **4. Diskussion und Schlussfolgerung**

### **4.1. mRNA-Ausstattung (quantitative Polymerase Kettenreaktion)**

In einem Vorexperiment konnte bei einem Vergleich der Genexpression verschiedener Proteine der Zellmigration sowie der Zelladhäsion (siehe Methoden und Ergebnisse) eine signifikante Regulierung beobachtet werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen wurde zu Beginn der Arbeit eine Real-Time-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierbei wurde die Quantität der mRNA der Integrin Untereinheiten A2 und B2 (ITGA2 und ITGB1), des Discoidin Domain Rezeptors 2 (DDR2), von Syndecan 3, sowie der Proteine der Extrazellulären Matrix Tenascin-C, der Laminin-Untereinheit A1 sowie der beiden Untereinheiten A5 und A6 des Kollagens IV betrachtet. Die Real-Time-PCR bestätigte im Verlauf der Untersuchungen die Ergebnisse aus dem Genchip-Experiment und stellte somit die Grundlage für die weiteren Projekte dar. Hier wurden vor allem Gene untersucht, die für Proteine der Zell-ECM-Interaktion und Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) kodieren. Diese Proteine sind eminent für die migratorischen Fähigkeiten und die Adhäsion von Zellen, spielen aber darüber hinaus auch wichtige Rollen in Zellfunktionen wie der Steuerung des cytoskelettalen Umbaus oder auch des Zellzyklusses. Für Integrine wird unter anderem auch ein Zusammenhang mit der Entwicklung des Gehirnes und der Steuerung der Konnektivität von Neuronen und der beschrieben. (59) (16)

So scheint es nicht verwunderlich, dass im Manifestationsalter der neuronalen Ceroidlipofuszinose Typ VII die oben beschriebenen Symptome auftreten. In der kindlichen Entwicklung herrscht eine enorme neuronale Plastizität, die natürlich auch auf Überlebenssignale und auf eine differenzierte Steuerung des Zellzyklus (beides u.a. vermittelt über Zell-Zell- bzw. Zell-ECM-Interaktionen) angewiesen ist. Auch stellen Recyclingprozesse eine wichtige Rolle in Geweben mit hoher Stoffumsatzrate dar. Hier spielen auch Endozytose- und Pinozytoseprozesse und im Folgenden auch eine hohe cytoskelettale Plastizität eine Rolle. Ist eine Stufe in diesen Zellfunktionen gestört, so sollte es zu einer homöostatischen Dysregulation der Zellen und einer Dysfunktion der dazugehörigen Körperfunktion kommen. Hier scheinen die neurologischen Symptome der NCL Typ VII nur eine logische Konsequenz aus der Regulierung (unter anderem) der untersuchten Gene zu sein.

Aus dem Genchip wurde darüber hinaus die Problematik des funktionellen Knockout-Mechanismus bei Zellen erkannt, die entweder mit der Überexpression des EGFP-CLN7-Fusionsprotein (EGFP = „enhanced green fluorescent protein“, Fusionsprotein meint eine feste Verknüpfung des EGFPs an einen Teil des CLN7-Proteins) oder der persistierenden Aktivität des CRISPR/CAS-Systems, welches zur Herstellung der Überexpression benutzt wurde, einhergeht. Deshalb wurden während der gesamten Promotion Wildtyp-Zellen und Knockout-Zellvarianten miteinander verglichen. Zusammenfassend wiesen sowohl bei HEK293T-Zellen als auch bei MEF-Zellen die Wildtypvarianten tendenziell niedrigere mRNA-Expressionen von Proteinen der Zell-ECM-Interaktion auf, jedoch höhere Werte bei der Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix. Auf den ersten Blick stellt dies einen Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen dar. Jedoch muss hier die Bedeutung der qPCR bedacht werden. Die qPCR- wie auch die Genchip-Untersuchung stellen eine quantitative Aussage über den Gehalt an der jeweiligen mRNA dar. Dies korreliert aber nicht zwangsläufig auch mit der tatsächlichen Menge der untersuchten Proteine oder Enzyme. Auch geben diese Untersuchungen keine Antwort auf die Frage, warum ein Gen in größerem oder geringerem Maße exprimiert wird. Lediglich im interindividuellen Vergleich kann erahnt werden, in welchem Bereich der Zellfunktionen sich Unterschiede zeigen könnten. Um die tatsächlich translatierte Menge der Proteine (etc.) herauszuarbeiten, ist die Anfertigung eines Proteoms und eines Metaboloms (für Enzyme) mit Hilfe der Massenspektroskopie oder Western-Blots in der künftigen CLN7-Forschung nötig. (60)

#### **4.2. Migrationsfähigkeit („Neurosphere-Assay“)**

Nach der Bestätigung der unterschiedlichen Regulierung der oben genannten Adhäsions-/Migrationspartizipanten wurde ein Experiment zur Testung der ungerichteten Migrationsfähigkeit durchgeführt. Dies wurde mit Hilfe des sog. „Neurosphere-Assay“ umgesetzt. Hierbei wurden Zellen auf Agarose ausgesät, sodass diese in Zellkugeln auswuchsen. Danach wurden diese Kugeln auf verschiedenen beschichtete Untergründe überführt und die Flächen-/Radiusvergrößerung gemessen.

Bei der Betrachtung der ungerichteten Zellmigration konnte mit Hilfe dieses Experiments gezeigt werden, dass HEK293T-Zellen in der Wildtyp-Variante deutlich besser auf Fibronectin-, Laminin- und Kollagen IV-gecoateten Oberflächen auswachsen als die beiden Knockout-Varianten vom Typ 99.4 und 94.5. In Kollagen I-beschichteten Wells konnte nur ein marginales Auswachsen beobachtet werden. Diese Ergebnisse erscheinen plausibel, wenn die Ligandenaffinität von Integrin-Heterodimeren betrachtet wird, die sich aus der  $\alpha_2$ - bzw. aus der  $\beta_1$ -Untereinheit zusammensetzen. Hier wird in der Literatur eine besondere Affinität des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  zu nahezu allen Liganden der mittels Coating untersuchten extrazellulären Matrix beschrieben. (61)

Bei der Recherche über die Funktion des Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Moleküls lässt sich zudem eine Interaktion mit dem Integrin  $\alpha_3\beta_1$ -Dimer finden. Dieser Wechselwirkung wird eine Beteiligung an der Zell-Zell-Interaktion zugeschrieben und ließ sich durch die morphologischen Unterschiede der auswachsenden Zellkugeln bestätigen. (61) Dabei konnten bei der Wildtypvariante dichte, sehr homogen-auswachsende Zellen, die einen konfluenten, nahezu nicht unterbrochenen Zellrasen bildeten, gesehen werden. Demhingegen zeigten sich bei beiden Knockout-Zelltypen deutliche Unterbrechungen der Zellrasenkontinuität und ein eher fransiges Auswachsen.

Da die Integrinfunktion einem mannigfaltigem Steuerungsmechanismus unterliegt und somit einen sehr erheblichen Umfang an Störungsmöglichkeiten bietet, erscheint es schwer, eine abschliessende Erklärung für diese Ergebnisse zu liefern.

Eine Steuerung ist über das Outside-In-Signalling möglich. Das bedeutet, dass die umliegenden Liganden eine Aktivierung von Integrinen verursachen und es in Folge zu einem Umbau des Zytoskelettes (Grund für die Durchführung der Färbeversuche) mit Ausbildung einer Polarisation der Zelle und dynamischer Umverlagerung und Produktion von Integrin/Adhäsionsmolekülen kommt. (62)

Weiter kann der Integrinumsatz der Zelle einen Beitrag zur Dirigation der Adhäsion und Migration liefern. Hier muss zwischen clathrinvermittelter und clathrinunabhängiger Endozytose unterschieden werden. Die Endozytose mit Hilfe von Clathrin stellt einen eher langsamen Prozess dar und kann auch einen Umsatz von Integrinen, die noch Teile des Liganden gebunden haben, bewirken. Dieser Umsatzweg ist mit der Aquirierung des Mikrotubuli-Systems verbunden, welches die nötigen Proteine und Enzyme zum Internalisationsort befördert.

Ein weiterer wichtiger Weg der Internalisation ist die clathrinunabhängige Makropinozytose. Dieser Vorgang findet sehr schnell statt und ist unter anderem die Grundlage für das schnelle Recycling von Integrinen. Die Pinozytose findet an Circular-Dorsal-Ruffles (CDRs) statt und wird über kleine GTPasen vermittelt. Für diesen Prozess spielen auch Glycolipide wie das Monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) und dessen mehrfach glykosylierten Formen eine wichtige Rolle, um die Zellmembran einzustülpen und einen Pinozytosebecher zu bilden. Weiterhin sind Ganglioside neben Cholesterol wichtig für die Ausbildung von Lipid-Rafts und somit auch der Verankerung und Einbettung von Rezeptormolekülen (z.B. Integrine/Adhäsionsmoleküle) in der Zellmembran. (63)

Nun stellt die durchgeführte Untersuchung mittels Neurosphere-Assay nur eine Testung der ungerichteten (langsam ablaufenden) Migration dar und setzt keinen speziellen Modus für den Umsatz der Integrine für die Zellen voraus. Dies schränkt die Aussagekraft ein und muss in Zukunft von Untersuchungen zur gerichteten Migration ergänzt werden. So könnte zum Beispiel eine Migrationsuntersuchung mittels chemotaktischer Stimulation von Leukozyten erfolgen, um das schnelle Integrinrecycling über die Pinozytose zu testen. Weiter könnten Kollokalisationsstudien zu Integrinen und Lipid-Rafts bzw. zu an Makropinozytose beteiligten Proteinen durchgeführt werden, um einen Zusammenhang zwischen einer reduzierten Zellmigrationsfähigkeit durch eine erniedrigte Makropinozytose bzw. einen geringeren Einbau in die Zellmembran durch eine fehlerhafte Lipid-Raft-Ausstattung herzustellen.

Weiterhin sollte versucht werden, diese Versuche an neuronalen Zellen zu wiederholen, da die CLN7-Erkrankung hauptsächlich im zentralen Nervensystem seinen Ursprung hat. Dies sollte bei allen Versuchen im Hinterkopf behalten werden, da es sich bei den Ergebnissen auch um zelllinienspezifische Artefakte handeln könnte. Alle Untersuchungen wurden des Weiteren in einer zweidimensionalen Umgebung durchgeführt (Zellen wachsen auf einer Oberfläche aus). Dies stellt keine physiologische Bedingung dar und könnte durch die Etablierung einer Anzucht der Zellen in einem 3D-Medium verbessert werden. (64)

### 4.3. Proliferationsassay

Da die Auswertung der Migrationsassays anhand einer Durchlichtprojektion (eines 3-dimensionalen Objektes – Zellkugeln, somit keine Aussage über die Dicke des Zellrasens) geschah stellte sich die Frage, was die Größe der ausgewerteten Zellrasen beeinflussen könnte. So wurde im Verlauf klar, dass neben der Migration auch das Zellvolumen sowie eine unterschiedliche Zellproliferation die Fläche sowie den Radius der ausgemessenen Zellsphären beeinflussen hätte können. Aus diesem Grund wurde die Zellproliferation sowie das Zellvolumen mittels elektrisch basierter Zellzählung bestimmt.

Auf Grundlage dieser Überlegungen gäbe es drei Möglichkeiten für eine unterschiedliche Flächenvergrößerung der Zellsphären. Einerseits könnte eine erhöhte Zellteilungsrate durch einen Schub von Innen heraus diesen Effekt erzielen, aber auch ein unterschiedliches Zellvolumen hätte das Gesamtvolumen und damit auch die Anwachfläche der 5000 ausgesäten Zellen bedingen können. Die dritte Möglichkeit stellt eine interindividuell abweichende Zellmigrationsfähigkeit im Sinne eines Zuges auf die Zellkugel durch migrierende Zellen von außen dar. (65)

Außerdem zeigte ein anderes Projekt im Verlauf der Forschung an der CLN7-Erkrankung mittels Durchflusszytometrie/-sorting, dass CLN7-knockout Zellen ein etwas geringeres Zellvolumen vorwiesen, sodass diese Fehlerquelle ausgeschlossen werden musste.

Für die Durchführung des Migrationsassays wurden die eingesetzten Zellen für insgesamt 73 Stunden beobachtet (48 Stunden Kultivierung als Zellsphäre, dann Überetzen in gecoatete Wells und Beobachtung der Auswachenden Zellkugeln für weitere 25 Stunden), sodass für die Betrachtung des Zellproliferationsassays genau diese Zeitspanne vorgenommen wurde. Problematisch erschien für dieses Experiment ein Unterschied der Anzahl der primär in die Petrischalen ausgesäten Zellen. Dieses Problem wurde umgangen, indem ein Proliferationsfaktor definiert wurde. Hierfür wurden die jeweils gemessenen Zellzahlen auf den 24-h-Wert normalisiert, sodass die ausgesäte Zellzahl eine untergeordnete Rolle für die Auswertung gespielt haben sollte.

Bei der Auswertung der Ergebnisse des Zellproliferationsassays bezüglich des Zellvolumens sowie der Zellproliferation konnten keine Fehlerquellen ausgemacht werden, die die übrigen Experimente beeinflussen hätten können. Sowohl die



Proliferationsrate als auch das Zellvolumen von CLN7-WT gegenüber beider KO-Varianten unterschieden sich hierbei nicht signifikant.

Nach 72 Stunden zeigten sich innerhalb der HEK-Zellen (intraindividuell) keine signifikanten Unterschiede beim Proliferationsfaktor. Nach 96 Stunden zeigten CLN7-WT-HEK-Zellen einen deutlich höheren Zellproliferationsfaktor. Dies sollte jedoch für die durchgeführten Untersuchungen keine Rolle spielen, weil sich die Zeitspannen bei allen Experimenten auf maximal 73 Stunden beliefen. Intraindividuell zeigten auch die Fibroblastengruppe (MEF-Zellen) ein ähnliches Verhalten bezüglich der Zellproliferation. Wie in der Literatur beschrieben zeigten MEF-Zellen eine deutlich niedrigere Proliferationstendenz gegenüber HEK-Zellen. (66)

Abschliessend wurden die Zellvolumina der verschiedenen Zelllinien betrachtet. Hierbei stellte sich heraus, dass HEK-Zellen sich untereinander kaum in Ihrem Zellvolumen unterschieden. Auch die Fibroblastengruppe unterschied sich intraindividuell nicht in ihrer Zellgröße. Zu sehen war jedoch ein signifikanter Unterschied beim Volumen zwischen HEK293T-Zellen und den Mausfibroblasten wie in der Literatur beschrieben. HEK-Zellen waren dabei zu jedem Messzeitpunkt voluminöser als MEF-Zellen. (67)

Da aktivierte Integrine im Sinne eines Outside-In-Signals auch Einfluss auf den Zellzyklus und damit auf die Zellteilung haben, stellt der Proliferationsassay darüber hinaus auch einen Funktionstest der Integrine dar. Würde es zu einem absoluten Funktionsverlust kommen, so würde der integrinvermittelte Reiz für die Zellproliferation entfallen und es würden sich voraussichtlich die proliferativen Eigenschaften der Zellen ändern. (68) Die 96-Stunden-Werte legen jedoch nahe, dass ein Knockout des CLN7-Gens nach einer gewissen Zeitspanne einen imminenten Einfluss auf die Zellproliferation und den Zellzyklus haben sollten. Dies könnte im Verlauf der NCL vom Typ VII eine Ursache der auftretenden Symptomatik sein. Jedoch kann aus diesen Ergebnissen heraus nicht beurteilt werden, welche Gründe dieser Störung zu Grunde liegen.

#### 4.4. Fluoreszenzfärbungen

Grundlegend für die Durchführung aller Färbeversuche war es, Unterschiede in der Ausstattung und der Lokalisation von verschiedenen Elementen der Zellmigration und Zelladhäsion zu visualisieren.

Wie beschrieben stellen fokale Adhäsionen, Migrationsfronten (im Sinne von Lamellopodien/Filopodien) und auch Circular Dorsal Ruffles Orte der erhöhten Actindichte dar. Störungen der migratorischen Fähigkeiten einer Zelle könnten somit auch durch eine gestörte Actinausstattung oder deren Zusammenspiel mit Adaptormolekülen in diesen Zellstrukturen erklärt werden. (69)

In der vorliegenden SiR-Actin-Färbung von HEK293T Wildtypzellen und deren KO-Variante 99.4 konnten jedoch bei einer vergleichbaren Zelldichte des Präparates keine offensichtlichen quantitativen Unterschiede sowie keine Unterschiede in der Lokalisation zwischen den Zelllinien beobachtet werden. Da auch das Mikrotubuli-Zytoskelett bei der Internalisation von Integrinen über den clathrinvermittelten Weg und dem Umbau der Integrinstruktur an Orten der vermehrten Zellmigration beteiligt ist, wurde auch diese Komponente des Zytoskelettes gefärbt. (70) Auch dieses Experiment wurde mit den beiden HEK293T-Varianten (WT und KO99.4) durchgeführt. Bei der Auswertung wurde wie bei der Betrachtung des Actins auf die Lokalisation und die Quantität geachtet. Analog der Actinfärbung konnte weder bei der Fluoreszenzintensität als auch bei der Verteilung der Mikrotubuli ein Unterschied beschrieben werden.

Auf Grund der veränderten Migrationseigenschaften und der unterschiedlichen mRNA-Expression der  $\beta_1$ -Integrine wurde eine Färbung mittels Anti-ITGB1-APC-Farbstoff durchgeführt. Für diese Färbung wurde die  $\beta_1$ -Untereinheit (ITGB1) ausgewählt, da die Bindungssequenzen für diese Untereinheit als konservierter beschrieben werden. (1)

Für die Bildgebung der Integrine wurden MEF-Zellen als Wildtypvariante und als KO-Variante verwendet. Entgegen der bisher durchgeführten Experimente wurde für die Fluoreszenzuntersuchungen des ITGB1 auf MEF-Zellen zurückgegriffen, da in ersten Probefärbungen mit HEK-Zellen keine ausreichende Fluoreszenz zur Darstellung der Integrinverteilung erreicht werden konnte. Es wurde wiederum die Fluoreszenzintensität und die Lokalisation untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Intensität beider Untersuchungsgruppen visuell nicht unterschied. Genauso

wurde ein identisches Verteilungsmuster vorgefunden. Der Zellbesatz war bei dieser Färbung jedoch relativ dicht, wodurch nahezu keine Bereiche des Auswuchses bzw. der Migration gefunden werden konnten. Diese Färbung stellte somit eine Beschreibung des „Ruhezustandes“ der Zellen dar und war nicht repräsentativ für die Verteilung der Integrine bzw. deren Umsatz in der Zelle.

Hierfür wurde eine abschliessende Kofärbung der beiden MEF-Zellvarianten durchgeführt. Dabei sollte ein dünner Zellrasen untersucht werden, um Bereiche des erhöhten Integrinumbaus und der Actindichte wie Lamellopodien oder CDRs betrachten zu können. Hierfür wurde der ITGB1-APC-Antikörper und für das Actingerüst das Phalloidin-FITC-Färbeagenz ausgewählt.

Bei der Auswertung der Bilder wurden Bereiche gefunden, in denen bei beiden Zelllinien eine ähnliche Zelldichte herrschte und an denen unter anderem Lamellopodien gesehen werden konnten. Hier sah man an den Lamellopodienfronten eine deutlich erhöhte Dichte an Integrinen und ein radiär einstrahlendes Actingerüst, das für den Vorschub der Zellmembran nötig ist. Bei der interindividuellen Betrachtung der Integrinintensität und -verteilung sowie der Ausstattung mit Actinfilamenten und deren Morphologie konnten jedoch auch hier keine offensichtlichen Unterschiede beobachtet werden.

Die Ergebnisse der verschiedenen Färbungen sind jedoch nur eine statische Momentaufnahme der Zellphysiologie und es können keine Aussagen über den Umsatz und die Umverlagerung der untersuchten Strukturen gemacht werden. Darüber hinaus stellt die Mikroskopie und die visuelle Auswertung der gefärbten Zellen kein quantitatives Untersuchungstool dar, sondern bedient sich lediglich der Erfahrung des Untersuchers. Unterschiede der Fluoreszenz können so nur bei einer deutlich differierenden Proteinausstattung unterschieden werden. Bereiche mit nur geringen Unterschieden können demnach nicht wahrgenommen werden und entziehen sich der Auswertung.

Eine Möglichkeit der weiteren Untersuchung wäre eine Quantifizierung der Integrinausstattung mit Hilfe der Durchflusszytometrie, wobei einerseits das Volumen über die Auswertung der Vorwärtsstreuung (Forwardscatter) reevaluiert, über die Seitwärtsstreuung (Sidewardscatter) die Granularität und über die Fluoreszenzintensität die Integrinmenge jeder einzelnen Zelle gemessen werden.

(71)

Zudem könnte auch der Integrimumsatz entweder über eine chemotaktische Stimulation oder durch die Verabreichung einer mechanischen Kraft auf die Zellen erhöht werden. Dabei könnte über zeitlich abgestufte (Immun-) Fluoreszenzfärbeversuche eine Veränderung in der Lokalisation und Quantität von Integrinen und einer veränderten Zytoskelettarchitektur untersucht werden. Hier gäbe es mehrere denkbare Kofärbungsmöglichkeiten. So könnte eine Integrin-Actin- bzw. eine Integrin-Tubulin-Färbung durchgeführt werden. Auch eine Dreifachfärbung von Zytoskelett, Integrin und Lipid-Rafts (zum Beispiel über die Anfärbung von GM1) könnte einen Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Zellen zeigen. Damit könnte ein Zusammenhang zwischen Integrinrecycling, den zytoskelattalen Bausteinen und der Notwendigkeit von Lipid-Rafts für die Internalisation geschaffen werden. (72)

Im Bezug auf die NCL vom Typ VII sollte diese Untersuchung mögliche Unterschiede der Integrinausstattung sowie der Endozytoseeigenschaften der untersuchten Zellen aufzeigen. Da die Funktion der Integrine einen Einfluss auf den Zellzyklus hat und weitreichende weitere Zellfunktionen beeinträchtigen, könnte eine deutlich unterschiedliche Ausstattung dieser Zellstrukturen einen möglichen Angriffspunkt für einen medikamentösen Therapieansatz zur Folge haben. So wird beispielsweise eine Hemmung durch Antikörper gegen Integrin  $\alpha_2\beta_1$  bei aggressiven, schnell metastasierenden soliden Tumoren beschrieben. (73) Analog könnte zum Ausgleich einer Dysregulation der Integrinmenge potentiell (je nach Expression und Proteinausstattug) ein aktivierender bzw. supprimierender Antikörper zur Hemmung bzw. zur Aktivierung des Outside-In-Signallings konstruiert werden.

Auch eine beeinträchtigte Endozytose sowie der cytoskelettale Umsatz, als auch der Einbau von Rezeptoren in Lipid-Rafts könnten potentielle Angriffspunkte für die Therapie der neuronalen Ceroidlipofuszinose sein.

#### **4.5. Adhäsionsassays**

Neben der Zellmigration (als Zeichen eines Umsatzes von Adhäsionsmolekülen und deren strukturellen Umbau) ist auch die Zelladhäsion eine Kenngröße für die Integrinausstattung und -Funktion. Bei der Zelladhäsion spielen neben den Integrinen als kontaktvermittelnde Proteine wiederum eine mannigfaltige Fülle an

Adaptorproteinen, Enzymen und Zytoskelettanteile eine Rolle. Der Prozess der Zelladhäsion lässt sich mit Hilfe der Ausübung einer mechanischen Kraft von Außen testen. Diese Kräfte werden von der Zellmembran über anhaftende Zytoskelettanteile auf Adhäsionsmoleküle übertragen und bewirken einen Umbau der Adhäsionskomplexe. Diese Gebilde werden im Zusammenhang mit dem Zytoskelett und den dazugehörigen Enzymen auch als Adhäsom bezeichnet. (74)

Im Verlauf der Promotion wurden für die Testung der Adhäsionsfähigkeit von HEK293T Wildtypzellen im Vergleich zu HEK293T MFSD8-knockout-Zellen (99.4 und 94.5) zwei Vorversuche erarbeitet. Diese Vorversuche erbrachten einen deutlichen Unterschied zwischen Wildtyp-Zellen und deren Knockout-Varianten hervor. So hafteten Wildtypzellen scheinbar deutlich schlechter als KO-Zellen. Die Betrachtung der Zellrasenmorphologie zeigte, dass sich Wildtyp-Zellen eher als große Zellketten ablösten und zum Teil noch an adhären Zellen hängen blieben, was den Eindruck eines schwingenden Seegrases vermittelte. Demhingegen hafteten KO-Zellen deutlich besser an der Oberfläche der Untersuchungsmaterialien, lösten sich im Vergleich jedoch als wesentlich kleinere griesähnliche Zellverbände ab. Die Beobachtung der Rasenmorphologie würde die These bekräftigen, dass Wildtypzellen eine bessere Zell-Zell-Interaktion zeigen. Da beide Versuche nicht quantitativ fassbar waren, wurde ein dritter Versuch etabliert, der die Adhäsionsfähigkeit in Zahlen fassen sollte.

Hierbei wurden Zellen in Ibidi-Kammern ausgesät, mit einem Flüssigkeitsstrom behandelt und jeweils vor und nach der Kraftverabreichung mikroskopische Bilder des Zellrasens angefertigt und folglich (indirekt über die Zellkernfläche) deren Zellzahl ausgewertet. Hier zeigte sich jedoch überraschenderweise ein völlig anderes Bild. Die Auswertung des Versuches erbrachte eine deutlich bessere Adhäsionsfähigkeit von Wildtyp-Zellen im Vergleich zu HEK293T MFSD8-knockout-Zellen.

Um diese Ergebnisse interpretieren zu können, ist es von immenser Bedeutung, sich der Morphologie des Zellrasens vor der Flussverabreichung klar zu werden. So wuchsen Zellen, die in den Vorversuchen in offenen Gefäßen ausgesät wurden zu einem nahezu konfluenten Zellrasen heran, welcher von Zell-Zell-Kontakten geprägt war. Anders wuchsen Zellen in den Ibidi-Kammern an. Die Geometrie der Flusskanäle bedingt hier eine Vereinzelung der Zellen auf der Oberfläche, sodass bei einer

kurzen Inkubationszeit nahezu keine Zell-Zellkontakte beobachtet werden konnten. (75)

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Ergebnisse aus dem quantitativen Flusstest im Vergleich zu den semiquantitativen Vorversuchen für eine Aussage über die Adhäsionsfähigkeit am wertvollsten sind.

In den Vorversuchen zeigte sich eine Ablösung des Zellrasens in größeren Zellfetzen. Dies sollte auch eine größere Angriffsfläche für den Flüssigkeitsstrom und folglich eine bessere Ablösung vom Untergrund bedingt haben. Auch legt diese Beobachtung nahe, dass diese Zellen eine bessere Zell-Zell Haftung besitzen sollten. Dies stellte auch eine Fehlerquelle der Einschätzung der Adhäsionsfähigkeit von CLN7-WT-Zellen in den Vorversuchen dar.

Die Technik der Adhäsionstestung mit Hilfe der Ibidi  $\mu$ -Slides stellt für künftige Experimente eine wertvolle Methode dar, da hier durch den Flüssigkeitsstrom Umbauprozesse im Sinne einer Polarisierung der Zelle und der Umbau des Adhesoms induziert werden können. Diese Prozesse könnten durch Immunfluoreszenzstudien visualisiert werden. Hierdurch ließe sich gegebenenfalls auch eine mögliche Beteiligung des CLN7-Proteins am Umbau und der Induktion des Adhesoms einschätzen. Beispielsweise wäre eine Integrin-Actin-Kofärbung denkbar, die die Funktion des schnellen Integrinrecyclings über die Makropinozytose darstellen könnte. Weiterhin könnte zu diesem Zweck auch eine Lipid-Raft-Integrin-Kofärbung angestrebt werden. All diese Untersuchungen könnten die Dynamik des zellulären Umbaus zeigen und stellen nicht nur eine Momentaufnahme, wie bei den bisher durchgeführten Färbestudien, dar. Als letzte Überlegung sollen noch Hemmungsstudien erwähnt werden. Hierbei könnte ein Vergleich von Zellsystemen, deren Integrin-Pathway auf verschiedenen Stufen gehemmt wurde, mit dem Knockout-Zellsystem nach der Stimulation des Adhesomumbaus durch mechanische Kraft stattfinden. Dies ließe eine Aussage über die vertikale Lage des CLN7-Proteins im Integrin-Signalsystem zu. (76)

Im Bezug auf die CLN7-Erkrankung stellen der Integrinumsatz sowie die Adhäsionsfähigkeit der Zellen und deren Regulation durchaus ein medikamentöses Target dar. Nach der Einordnung der Beteiligung des CLN7-Proteins in diesen Prozessen könnte im Folgenden jener Stoffwechselweg gezielt gehemmt oder überaktiviert werden. Alles in allem stellt die Zelladhäsion genauso wie die

Zellmigration eine wichtige Zellfunktion im Bezug auf die Steuerung des Zellzyklus sowie des Zellüberlebens dar. Effekte sollten daher vor allem bei schnell proliferierenden und sehr stoffwechelaktiven Geweben zum Tragen kommen. So ist es nicht verwunderlich, dass besonders viel CLN7-Protein in Gehirn (77, 78), Retina (79) und Nieren (80, 81) gefunden wird, wo die Organfunktion durch hohe Rezeptorexpression in der Zellmembran gewährleistet wird. Weiterhin stellen hier starke Zell-Zell- sowie Zell-ECM-Interaktionen eine Grundlage für die Gewebefunktion dar.

## 5. Zusammenfassung

Grundlage für die vorliegenden Experimente waren Vorversuche, welche eine Beteiligung des CLN7/MFSD8-Genproduktes an der Zellmigration sowie der Zelladhäsion vermuten ließen.

Deshalb wurde ein Konzept ausgearbeitet, diese Zellfunktionen vergleichend zu untersuchen. Primär konnten die Ergebnisse der Vorversuche mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion auf mRNA der regulierten Gene bestätigt werden.

Zur Untersuchung der Zellmigration wurde ein sogenannter Neurosphere-Migrationsassay etabliert, bei welchem Zellen in Zellkugeln angesät wurden und danach auf verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) kreisförmig auswachsen konnten. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit. CLN7-WT-Zellen wuchsen auf nahezu allen untersuchten ECM-Untergründen signifikant schneller aus als verschiedene Knockout-Varianten. Um problematische Fehlerquellen bei der Interpretation der Flächenzunahme im Migrationsassay auszuschliessen, erfolgte im Folgenden eine elektronisch basierte Zellzählung und Volumenmessung. Hier wurde die Proliferationsgeschwindigkeit der untersuchten Zellsysteme bestimmt, wobei sich in der für die Experimente relevante Zeitspanne keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Zellproliferation sowie -volumen zeigten und somit diesbezüglich keine Beeinflussung der Ergebnisse der übrigen Experimente anzunehmen war. Weiterhin wurden verschiedene Untersuchungen zur Adhäsionsstärke/-fähigkeit durchgeführt. Hierbei zeigte sich nach Anlage eines Flüssigkeitsstroms zur Ausübung einer Scherkraft auf den Zellrasen, dass Wildtyp-Zellen deutlich stärker an einer mit Fibronectin beschichteten Oberfläche hafteten als Knockout-Varianten. Auch zeigte sich hier eine differente Ablösekinetik auf Grund einer möglicherweise unterschiedlich ausgeprägten Zell-Zell-Haftung. Zuletzt wurden vergleichende (Immun)fluoreszenzfärbungen verschiedener Komponenten des Zytoskelettes und der Integrin  $\beta_1$ -Untereinheit angefertigt. Diese konnten keinen deutlichen visuellen Unterschied bezüglich der Verteilung als auch der Ausprägung der untersuchten Zellkomponenten erbringen. Nach Zusammenschau aller Daten lässt sich festhalten, dass CLN7- Wildtypzellen im Vergleich zu Knockout-Varianten eine deutlich bessere Migrations- sowie Adhäsionsfähigkeit besitzen.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Gronholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(6):431-44. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.007. PubMed PMID: 19289150; PubMed Central PMCID: PMCPMC2734279.
2. De Franceschi N, Hamidi H, Alanko J, Sahgal P, Ivaska J. Integrin traffic - the update. *J Cell Sci*. 2015;128(5):839-52. doi: 10.1242/jcs.161653. PubMed PMID: 25663697; PubMed Central PMCID: PMCPMC4342575.
3. Sharifi A, Kousi M, Sagne C, Bellenchi GC, Morel L, Darmon M, et al. Expression and lysosomal targeting of CLN7, a major facilitator superfamily transporter associated with variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human molecular genetics*. 2010;19(22):4497-514. doi: 10.1093/hmg/ddq381. PubMed PMID: 20826447; PubMed Central PMCID: PMC3298853.
4. Siintola E, Topcu M, Aula N, Lohi H, Minassian BA, Paterson AD, et al. The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *American journal of human genetics*. 2007;81(1):136-46. doi: 10.1086/518902. PubMed PMID: 17564970; PubMed Central PMCID: PMC1950917.
5. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):27-30. doi: 10.1093/nar/28.1.27. PubMed PMID: 10592173; PubMed Central PMCID: PMCPMC102409.
6. Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, Morishima K, Tanabe M. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D590-D5. doi: 10.1093/nar/gky962. PubMed PMID: 30321428; PubMed Central PMCID: PMCPMC6324070.
7. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci*. 2019;28(11):1947-51. doi: 10.1002/pro.3715. PubMed PMID: 31441146; PubMed Central PMCID: PMCPMC6798127.
8. Michael M, Parsons M. New perspectives on integrin-dependent adhesions. *Curr Opin Cell Biol*. 2020;63:31-7. doi: 10.1016/j.ceb.2019.12.008. PubMed PMID: 31945690; PubMed Central PMCID: PMCPMC7262580.
9. Gu Z, Noss EH, Hsu VW, Brenner MB. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J Cell Biol*. 2011;193(1):61-70. doi: 10.1083/jcb.201007003. PubMed PMID: 21464228; PubMed Central PMCID: PMCPMC3082178.

10. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 8):1439-45. PubMed PMID: 11282020.
11. McBride JL, Neuringer M, Ferguson B, Kohama SG, Tagge IJ, Zweig RC, et al. Discovery of a CLN7 model of Batten disease in non-human primates. *Neurobiology of disease.* 2018;119:65-78. doi: 10.1016/j.nbd.2018.07.013. PubMed PMID: 30048804; PubMed Central PMCID: PMC6200145.
12. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer.* 2010;1(12):1170-7. doi: 10.1177/1947601911407325. PubMed PMID: 21779440; PubMed Central PMCID: PMC63092286.
13. Paul NR, Jacquemet G, Caswell PT. Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Curr Biol.* 2015;25(22):R1092-105. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.049. PubMed PMID: 26583903.
14. Chabrol B, Caillaud C, Minassian B. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Handbook of clinical neurology.* 2013;113:1701-6. doi: 10.1016/B978-0-444-59565-2.00038-1. PubMed PMID: 23622391.
15. Mukherjee AB, Appu AP, Sadhukhan T, Casey S, Mondal A, Zhang Z, et al. Emerging new roles of the lysosome and neuronal ceroid lipofuscinoses. *Molecular neurodegeneration.* 2019;14(1):4. doi: 10.1186/s13024-018-0300-6. PubMed PMID: 30651094; PubMed Central PMCID: PMC6335712.
16. Sigrist CJ, Bridge A, Le Mercier P. A potential role for integrins in host cell entry by SARS-CoV-2. *Antiviral Res.* 2020;177:104759. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104759. PubMed PMID: 32130973; PubMed Central PMCID: PMC637114098.
17. Berman AE, Kozlova NI, Morozevich GE. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc.)* 2003;68(12):1284-99. doi: 10.1023/b:biry.0000011649.03634.74. PubMed PMID: 14756624.
18. Danen EH, Yamada KM. Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol.* 2001;189(1):1-13. doi: 10.1002/jcp.1137. PubMed PMID: 11573199.
19. Lee JW, Juliano R. Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells.* 2004;17(2):188-202. PubMed PMID: 15179030.
20. Petit V, Thiery JP. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell.* 2000;92(7):477-94. doi: 10.1016/s0248-4900(00)01101-1. PubMed PMID: 11229600.
21. Xue G, Hemmings BA. PKB/Akt-dependent regulation of cell motility. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(6):393-404. doi: 10.1093/jnci/djs648. PubMed PMID: 23355761.

22. Nelson RD, Quie PG, Simmons RL. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol.* 1975;115(6):1650-6. PubMed PMID: 1102606.
23. Jensen JB, Parmar M. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol.* 2006;34(3):153-61. doi: 10.1385/MN:34:3:153. PubMed PMID: 17308349.
24. Marshall GP, 2nd, Reynolds BA, Laywell ED. Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007;8(3):141-5. doi: 10.2174/138920107780906559. PubMed PMID: 17584087.
25. Malinda KM, Kleinman HK. The laminins. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28(9):957-9. doi: 10.1016/1357-2725(96)00042-8. PubMed PMID: 8930117.
26. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001;19(10):971-4. doi: 10.1038/nbt1001-971. PubMed PMID: 11581665.
27. Benton G, Crooke E, George J. Laminin-1 induces E-cadherin expression in 3-dimensional cultured breast cancer cells by inhibiting DNA methyltransferase 1 and reversing promoter methylation status. *FASEB J.* 2009;23(11):3884-95. doi: 10.1096/fj.08-128702. PubMed PMID: 19635753.
28. Tsvirkun D, Grichine A, Duperray A, Misbah C, Bureau L. Microvasculature on a chip: study of the Endothelial Surface Layer and the flow structure of Red Blood Cells. *Sci Rep.* 2017;7:45036. doi: 10.1038/srep45036. PubMed PMID: 28338083; PubMed Central PMCID: PMC5364477.
29. Poling J, Gajawada P, Richter M, Lorchner H, Polyakova V, Kostin S, et al. Therapeutic targeting of the oncostatin M receptor-beta prevents inflammatory heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2014;109(1):396. doi: 10.1007/s00395-013-0396-3. PubMed PMID: 24292852.
30. Tanzer ML. Cross-linking of collagen. *Science.* 1973;180(4086):561-6. doi: 10.1126/science.180.4086.561. PubMed PMID: 4573393.
31. Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:957-1003. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.004521. PubMed PMID: 6157354.
32. Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *The Journal of biological chemistry.* 1993;268(35):26033-6. PubMed PMID: 8253711.

33. Hug TS. Biophysical methods for monitoring cell-substrate interactions in drug discovery. *Assay Drug Dev Technol.* 2003;1(3):479-88. doi: 10.1089/154065803322163795. PubMed PMID: 15090185.
34. Puri KD, Chen S, Springer TA. Modifying the mechanical property and shear threshold of L-selectin adhesion independently of equilibrium properties. *Nature.* 1998;392(6679):930-3. doi: 10.1038/31954. PubMed PMID: 9582074.
35. Goodwin AE, Pauli BU. A new adhesion assay using buoyancy to remove non-adherent cells. *J Immunol Methods.* 1995;187(2):213-9. doi: 10.1016/0022-1759(95)00187-6. PubMed PMID: 7499880.
36. Giacomello E, Neumayer J, Colombatti A, Perris R. Centrifugal assay for fluorescence-based cell adhesion adapted to the analysis of ex vivo cells and capable of determining relative binding strengths. *Biotechniques.* 1999;26(4):758-62, 64-6. doi: 10.2144/99264pf01. PubMed PMID: 10343915.
37. Schmuke JJ, Welply JK. A method for measuring leukocyte rolling on the selectins. *Anal Biochem.* 1995;226(2):197-201. doi: 10.1006/abio.1995.1213. PubMed PMID: 7540807.
38. Sakariassen KS, Aarts PA, de Groot PG, Houdijk WP, Sixma JJ. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components. *J Lab Clin Med.* 1983;102(4):522-35. PubMed PMID: 6619647.
39. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Cornelissen C. A novel mouse-driven ex vivo flow chamber for the study of leukocyte and platelet function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(4):C876-92. doi: 10.1152/ajpcell.00500.2003. PubMed PMID: 14668262.
40. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev.* 2015;82(7-8):518-29. doi: 10.1002/mrd.22489. PubMed PMID: 26153368; PubMed Central PMCID: PMC5428984.
41. Lukinavicius G, Reymond L, D'Este E, Masharina A, Gottfert F, Ta H, et al. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods.* 2014;11(7):731-3. doi: 10.1038/nmeth.2972. PubMed PMID: 24859753.
42. Cai WF, Huang W, Wang L, Wang JP, Zhang L, Ashraf M, et al. Induced Pluripotent Stem Cells derived Muscle Progenitors Effectively Mitigate Muscular Dystrophy through Restoring the Dystrophin Distribution. *J Stem Cell Res Ther.* 2016;6(10). doi: 10.4172/2157-7633.1000361. PubMed PMID: 28979820; PubMed Central PMCID: PMC5624556.
43. Chi L, Huang Y, Mao Y, Wu K, Zhang L, Nan G. Tail Vein Infusion of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Alleviated Inflammatory Response and Improved Blood Brain Barrier Condition by Suppressing Endoplasmic

- Reticulum Stress in a Middle Cerebral Artery Occlusion Rat Model. *Med Sci Monit.* 2018;24:3946-57. doi: 10.12659/MSM.907096. PubMed PMID: 29888735; PubMed Central PMCID: PMC6026597.
44. Olabi S, Ucar A, Brennan K, Streuli CH. Integrin-Rac signalling for mammary epithelial stem cell self-renewal. *Breast Cancer Res.* 2018;20(1):128. doi: 10.1186/s13058-018-1048-1. PubMed PMID: 30348189; PubMed Central PMCID: PMC6198444.
  45. Conway JRW, Jacquemet G. Cell matrix adhesion in cell migration. *Essays Biochem.* 2019;63(5):535-51. doi: 10.1042/EBC20190012. PubMed PMID: 31444228.
  46. Faulstich H, Zobeley S, Heintz D, Drewes G. Probing the phalloidin binding site of actin. *FEBS Lett.* 1993;318(3):218-22. doi: 10.1016/0014-5793(93)80515-v. PubMed PMID: 8440376.
  47. Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(8):457-73. doi: 10.1038/s41580-019-0134-2. PubMed PMID: 31182865.
  48. Heintz ES, Lorenz S, Schmidt B, Nasser MLN, Mazzulli JR, Francelle L, et al. CLN7/MFSD8 may be an important factor for SARS-CoV-2 cell entry. *iScience.* 2022;25(10):105082. doi: 10.1016/j.isci.2022.105082. PubMed PMID: 36093380; PubMed Central PMCID: PMC9444308.
  49. Croissant C, Tuariihihoa A, Bacou M, Souleyreau W, Sala M, Henriot E, et al. DDR1 and DDR2 physical interaction leads to signaling interconnection but with possible distinct functions. *Cell Adh Migr.* 2018;12(4):324-34. doi: 10.1080/19336918.2018.1460012. PubMed PMID: 29616590; PubMed Central PMCID: PMC6363034.
  50. Berndt C, Casaroli-Marano RP, Vilaro S, Reina M. Cloning and characterization of human syndecan-3. *J Cell Biochem.* 2001;82(2):246-59. doi: 10.1002/jcb.1119. PubMed PMID: 11527150.
  51. Giblin SP, Midwood KS. Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adh Migr.* 2015;9(1-2):48-82. doi: 10.4161/19336918.2014.987587. PubMed PMID: 25482829; PubMed Central PMCID: PMC4422809.
  52. Florea F, Koch M, Hashimoto T, Sitaru C. Autoimmunity against laminins. *Clin Immunol.* 2016;170:39-52. doi: 10.1016/j.clim.2016.07.021. PubMed PMID: 27464450.
  53. Wu Y, Ge G. Complexity of type IV collagens: from network assembly to function. *Biol Chem.* 2019;400(5):565-74. doi: 10.1515/hsz-2018-0317. PubMed PMID: 30864416.

54. Wu D, Xu Y, Ding T, Zu Y, Yang C, Yu L. Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation. *Cell Res.* 2017;27(11):1397-400. doi: 10.1038/cr.2017.108. PubMed PMID: 28829047; PubMed Central PMCID: PMCPMC5674152.
55. Nordenfelt P, Moore TI, Mehta SB, Kalappurakkal JM, Swaminathan V, Koga N, et al. Direction of actin flow dictates integrin LFA-1 orientation during leukocyte migration. *Nat Commun.* 2017;8(1):2047. doi: 10.1038/s41467-017-01848-y. PubMed PMID: 29229906; PubMed Central PMCID: PMCPMC5725580.
56. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302(5651):1704-9. doi: 10.1126/science.1092053. PubMed PMID: 14657486.
57. Case LB, Waterman CM. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat Cell Biol.* 2015;17(8):955-63. doi: 10.1038/ncb3191. PubMed PMID: 26121555; PubMed Central PMCID: PMCPMC6300998.
58. Seetharaman S, Etienne-Manneville S. Microtubules at focal adhesions - a double-edged sword. *J Cell Sci.* 2019;132(19). doi: 10.1242/jcs.232843. PubMed PMID: 31597743.
59. Lilja J, Ivaska J. Integrin activity in neuronal connectivity. *J Cell Sci.* 2018;131(12). doi: 10.1242/jcs.212803. PubMed PMID: 29907643.
60. Kaur U, Meng H, Lui F, Ma R, Ogburn RN, Johnson JHR, et al. Proteome-Wide Structural Biology: An Emerging Field for the Structural Analysis of Proteins on the Proteomic Scale. *J Proteome Res.* 2018;17(11):3614-27. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00341. PubMed PMID: 30222357; PubMed Central PMCID: PMCPMC6524533.
61. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001;305(3):285-98. doi: 10.1007/s004410100417. PubMed PMID: 11572082.
62. Moreno-Layseca P, Icha J, Hamidi H, Ivaska J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat Cell Biol.* 2019;21(2):122-32. doi: 10.1038/s41556-018-0223-z. PubMed PMID: 30602723; PubMed Central PMCID: PMCPMC6597357.
63. Schnaar RL. The Biology of Gangliosides. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2019;76:113-48. doi: 10.1016/bs.accb.2018.09.002. PubMed PMID: 30851743.
64. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol.* 2015;230(1):16-26. doi: 10.1002/jcp.24683. PubMed PMID: 24912145.

65. Deleyrolle LP, Rietze RL, Reynolds BA. The neurosphere assay, a method under scrutiny. *Acta Neuropsychiatr.* 2008;20(1):2-8. doi: 10.1111/j.1601-5215.2007.00251.x. PubMed PMID: 26953088.
66. Madaboosi N, Uhlig K, Schmidt S, Vikulina AS, Mohwald H, Duschl C, et al. A "Cell-Friendly" Window for the Interaction of Cells with Hyaluronic Acid/Poly-L-Lysine Multilayers. *Macromol Biosci.* 2018;18(2). doi: 10.1002/mabi.201700319. PubMed PMID: 29231289.
67. Joerges J, Schulz T, Wegner J, Schumacher U, Prehm P. Regulation of cell volume by glycosaminoglycans. *J Cell Biochem.* 2012;113(1):340-8. doi: 10.1002/jcb.23360. PubMed PMID: 21928313.
68. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285(5430):1028-32. doi: 10.1126/science.285.5430.1028. PubMed PMID: 10446041.
69. Mueller J, Szep G, Nemethova M, de Vries I, Lieber AD, Winkler C, et al. Load Adaptation of Lamellipodial Actin Networks. *Cell.* 2017;171(1):188-200 e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.051. PubMed PMID: 28867286.
70. LaFlamme SE, Mathew-Steiner S, Singh N, Colello-Borges D, Nieves B. Integrin and microtubule crosstalk in the regulation of cellular processes. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(22):4177-85. doi: 10.1007/s00018-018-2913-x. PubMed PMID: 30206641; PubMed Central PMCID: PMC6182340.
71. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5 1 -5 1 11. doi: 10.1002/cpim.40. PubMed PMID: 29512141; PubMed Central PMCID: PMC65939936.
72. Bieberich E. Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. *Chem Phys Lipids.* 2018;216:114-31. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2018.08.003. PubMed PMID: 30194926; PubMed Central PMCID: PMC6196108.
73. Casal JI, Bartolome RA. RGD cadherins and alpha2beta1 integrin in cancer metastasis: A dangerous liaison. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018;1869(2):321-32. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.04.005. PubMed PMID: 29673969.
74. Horton ER, Byron A, Askari JA, Ng DHJ, Millon-Fremillon A, Robertson J, et al. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol.* 2015;17(12):1577-87. doi: 10.1038/ncb3257. PubMed PMID: 26479319; PubMed Central PMCID: PMC663675.
75. ibidi GmbH LS, 82166 Gräfelfing. How to grow cells in a  $\mu$ -(micro) channel. [https://ibidicom/img/cms/support/AN/AN03\\_Growing\\_cellspdf](https://ibidicom/img/cms/support/AN/AN03_Growing_cellspdf). 2012:5.

76. Zhao X, Guan JL. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(8):610-5. doi: 10.1016/j.addr.2010.11.001. PubMed PMID: 21118706; PubMed Central PMCID: PMCPMC3132829.
77. Menaceur C, Gosselet F, Fenart L, Saint-Pol J. The Blood-Brain Barrier, an Evolving Concept Based on Technological Advances and Cell-Cell Communications. *Cells.* 2021;11(1). doi: 10.3390/cells11010133. PubMed PMID: 35011695; PubMed Central PMCID: PMCPMC8750298.
78. Nguyen PT, Dorman LC, Pan S, Vainchtein ID, Han RT, Nakao-Inoue H, et al. Microglial Remodeling of the Extracellular Matrix Promotes Synapse Plasticity. *Cell.* 2020;182(2):388-403 e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.050. PubMed PMID: 32615087; PubMed Central PMCID: PMCPMC7497728.
79. Pouw AE, Greiner MA, Coussa RG, Jiao C, Han IC, Skeie JM, et al. Cell-Matrix Interactions in the Eye: From Cornea to Choroid. *Cells.* 2021;10(3). doi: 10.3390/cells10030687. PubMed PMID: 33804633; PubMed Central PMCID: PMCPMC8003714.
80. Borza CM, Chen X, Zent R, Pozzi A. Cell Receptor-Basement Membrane Interactions in Health and Disease: A Kidney-Centric View. *Curr Top Membr.* 2015;76:231-53. doi: 10.1016/bs.ctm.2015.07.003. PubMed PMID: 26610916; PubMed Central PMCID: PMCPMC4913201.
81. Combes AN, Davies JA, Little MH. Cell-cell interactions driving kidney morphogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2015;112:467-508. doi: 10.1016/bs.ctdb.2014.12.002. PubMed PMID: 25733149.



## **7. Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Markus Reichold für die Bereitstellung des anspruchsvollen und interessanten Themas. Weiterhin möchte ich die umfangreiche, professionelle, aber auch freundschaftliche Betreuung erwähnen. Ich bin sehr dankbar für das Vertrauen, das er mir bei der Ausarbeitung von neuen Experimenten und der Verwirklichung meiner Ideen entgegengebracht hat. Auch kreative Diskussionen und ein jederzeit offenes Ohr für Probleme waren immer selbstverständlich. Ein Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Warth, der bei Fragen zu jeglichem Thema immer kompetent und mit Gelassenheit helfen konnte und jederzeit ein guter Ansprechpartner für Probleme war. Weiterhin möchte ich mich besonders herzlich bei Frau Ines Tegtmeier bedanken, die jederzeit und unermüdlich (auch kurzfristig geänderte) Zellkulturpläne für mein Projekt umsetzte und den Umfang meiner Arbeit überhaupt erst möglich machte. Auch war sie jederzeit für Schwierigkeiten bei Zellkultur- und Laborfragen zur Stelle und konnte einem hilflosen Laborneuling helfen.

Ein großes Dankeschön auch an meine Kollegen Frau Dr. Anna-Lena Forst, Christina Sterner, Elena Heini, Katrin Jordan und Katrin Meindl, die alle zu einer sehr angenehmen und freundschaftlichen Atmosphäre während meiner Laborzeit beigetragen haben und bei Fragen und Problemen super Ansprechpartner waren. Zudem möchte ich allen anderen nicht genannten Personen danken, die in der einen oder anderen Form zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben. Zusätzlich möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern bedanken, die es mir ermöglicht haben, das Gymnasium zu besuchen, meine Ausbildung abzuschließen und das Studium der Humanmedizin zu absolvieren. Ihre ständige Motivation und beharrliche Förderung waren das Fundament meiner universitären Ausbildung. Zuletzt möchte ich noch meiner Frau Carina danken, die während meines Studiums immer als stärkende Hand hinter mir stand und mich immer unterstützt hat. Sie räumte mir immer die Freiräume, die ich zum Lernen brauchte, ein und entlastete mich so gut es ging. Sie stand mir in schwierigen Situationen immer bei. Dies war nicht mit Geld aufzuwiegen.

## 8. Lebenslauf

Name: Sebastian Lorenz  
Geburtsdatum und –Ort: 05.06.1989, Marktredwitz  
Anschrift: Karl-Stilp-Straße 7, 95615 Marktredwitz  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

1995 – 1999 Grundschule Marktredwitz  
1999 – 2000 Alexander-von-Humboldt-Volksschule Marktredwitz  
2000 – 2009 Otto-Hahn-Gymnasium Marktredwitz

### Berufsausbildung/-ausübung:

2009 – 2022 Ausbildung zum Rettungsassistenten mit folgender  
Anstellung im Rettungsdienst

- International Trauma Life Support Advanced-Kurs
- Advanced Life Support Provider Kurs
- Newborn Life Support Provider Kurs
- European Pediatric Life Support Provider Kurs
- Examen zum Critical-Care-Paramedic Certified (BCCTPC)

### Studium:

2016 – 2022 Studium der Humanmedizin - Universität Regensburg  
2022 Bestehen des dritten Staatsexamens und Approbation  
2022 Paper in geteilter Erstautorenschaft: Heini ES, Lorenz S, et al.:  
„CLN7/MFSD8 may be an important factor for SARS-CoV-2 cell  
entry.“ iScience. 2022;25(10):105082. doi:  
10.1016/j.isci.2022.105082. PubMed PMID: 36093380  
2019 – 2023 Promotion am Institut für medizinische Zellbiologie Prof. Dr.  
Richard Warth – AG PD Dr. Markus Reichold:  
„Untersuchung der Migrations- und Adhäsionsfähigkeit von  
CLN7-knockout-Zellen“.

## 9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken (gilt ebenso für Werke aus elektronischen Datenbanken oder aus dem Internet) wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, habe ich unter Angabe der Quelle und Einhaltung der Regeln wissenschaftlichen Zitierens kenntlich gemacht. Diese Versicherung umfasst auch in der Arbeit verwendete bildliche Darstellungen, Tabellen, Kartenskizzen und gelieferte Zeichnungen. Mir ist bewusst, dass Täuschungen nach der für mich gültigen Studien- und Prüfungsordnung geahndet werden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift des Verfassers