



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

# **Die Warburg Mikro Syndrom-assoziierten Proteine RAB3GAP1/2, RAB18 und TBC1D20 modulieren die Autophagie**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

**Anne Feldmann**

geboren am 10.06.1988 in Kirn

Mainz, 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2017

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Mainz, den 27.07.2017

.....

Anne Feldmann

**Inhalt**

1.	Einleitung .....	1
1.1.	Autophagie - eine wichtige Säule der Proteinhomöostase .....	1
1.2.	Die Makroautophagie – wenn Zellen sich selbst „aufessen“ .....	3
1.2.1.	Autophagosomale Biogenese .....	5
1.3.	Lipidtröpfchen (Lipid Droplets) - nicht nur ein Lipidspeicher der Zelle .....	8
1.4.	RAB GTPasen, RAB GAPs und RAB GEFs – Regulatoren des zellulären Transports .....	10
1.4.1.	RAB GTPasen, RAB GAPs, RAB GEFs und Autophagie.....	11
1.5.	Der RAB3GAP-Komplex – kein gewöhnliches RAB GAP.....	13
1.6.	Die RAB GTPase RAB18 – ein wichtiger Modulator des Lipidmetabolismus .....	14
1.7.	Das RAB GTPase aktivierende Protein TBC1D20 .....	16
1.8.	Das Warburg Mikro Syndrom (WARBM Syndrom).....	17
1.9.	Vorarbeiten: Identifizierung von RBG-1 und RAB3GAP1/2 als positiver Autophagiemodulator .....	20
1.10.	Zielsetzung.....	23
2.	Material und Methoden .....	24
2.1.	Materialien .....	24
2.1.1.	Geräte .....	24
2.1.2.	Chemikalien und Kits .....	25
2.1.3.	Antikörper.....	25
2.1.4.	Zelllinien.....	26
2.1.5.	Bakterienstamm .....	27
2.1.6.	Oligonukleotide .....	27
2.1.6.1.	siRNA.....	27
2.1.6.2.	Plasmide.....	27
2.1.6.3.	Primer für die Real Time PCR-Analyse .....	28
2.1.6.4.	Primer für PCR .....	29
2.1.7.	EDV-Programme .....	29
2.2.	Methoden .....	30
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden .....	30
2.2.1.1.	Bakterienanzucht.....	30
2.2.1.2.	Transformation chemisch-kompetenter Bakterien durch Hitzeschock.....	30
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden .....	31
2.2.2.1.	Klonierung.....	31
2.2.2.1.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31

2.2.2.1.2.	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.2.1.3.	Gelextraktion .....	32
2.2.2.1.4.	DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen .....	32
2.2.2.1.5.	Ligation zweier DNA-Fragmente.....	33
2.2.2.1.6.	Sequenzierung .....	33
2.2.2.2.	Plasmidpräparation.....	33
2.2.2.3.	Gewinnung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen .....	33
2.2.2.4.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
2.2.2.5.	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	34
2.2.2.6.	Quantitative Real-Time-PCR Analyse (qPCR) .....	34
2.2.2.7.	Human Autophagy Primer Library .....	35
2.2.2.8.	Einfügen von Punktmutationen in RAB3GAP1.....	35
2.2.3.	Zellbiologische Methoden .....	36
2.2.3.1.	Kultivierung von IMR90 Fibroblasten und HeLa Zellen.....	36
2.2.4.	Proteinbiochemische Methoden .....	40
2.2.4.1.	Proteinpräparation .....	40
2.2.4.2.	Proteinquantifizierung .....	40
2.2.4.3.	Western Blot Analyse.....	41
2.2.4.4.	Densitometrische Auswertung der Western Blots .....	43
2.2.4.5.	Immunzytochemie .....	44
2.2.4.6.	Biochemische Analyse der autophagischen Aktivität.....	45
2.2.5.	Statistische Auswertung .....	45
3.	Ergebnisse.....	46
3.1.	Funktionelle Charakterisierung der Autophagiemodulation von RAB3GAP1/2.....	46
3.1.1.	RAB3GAP1/2 ko-lokalisieren mit ATG8 Proteinen an Lipidtröpfchen .....	46
3.1.2.	Die RAB3GAPs beeinflussen die autophagosomale Biogenese .....	48
3.1.3.	Der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Autophagie ist abhängig von der GAP-Aktivität und unabhängig von der RAB GTPase RAB3.....	51
3.2.	Die RAB GTPase RAB18 ist ein positiver Modulator der Makroautophagie.....	53
3.2.1.	Der knockdown von RAB18 führt zu einer verminderten autophagischen Aktivität ..	53
3.2.2.	Die Überexpression von RAB18 erhöht die autophagische Aktivität .....	56
3.2.3.	RAB18 und RAB3GAP1/2 beeinflussen sich funktionell gegenseitig und regulieren die Autophagie .....	58
3.3.	Beeinflussung der Autophagie durch TBC1D20.....	61
3.3.1.	Das RAB GAP TBC1D20 ist ein positiver Modulator der Autophagie.....	61

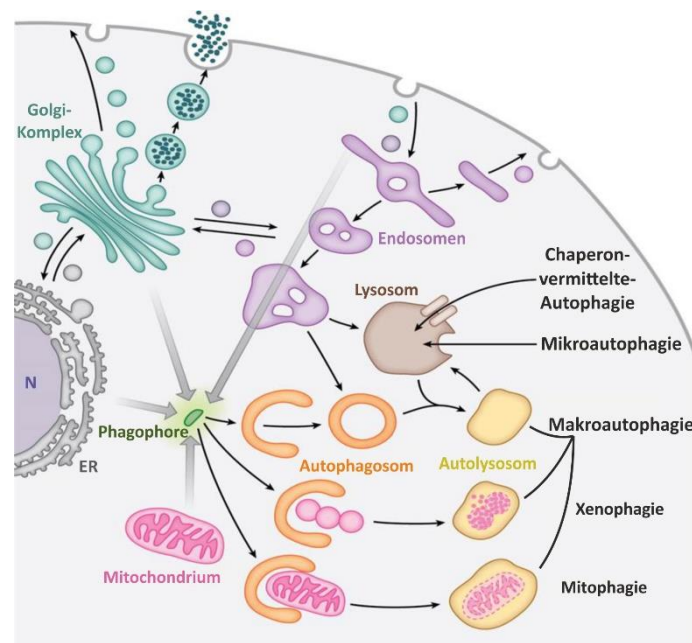
3.4.	RAB3GAP1/2 und RAB18 beeinflussen die Proteostase .....	63
3.4.1.	Einfluss des RAB3GAP-Komplexes und RAB18 auf die Proteinhomöostase.....	63
3.5.	Das Warburg Mikro (WARBM) Syndrom und die Autophagie.....	67
3.5.1.	Patientenzellen weisen keine veränderte Autophagie im Vergleich zu wildtypischen Kontrollzellen auf.....	67
3.5.2.	Patientenzelle weisen eine veränderte Genexpression von Autophagie-relevanten Genen auf .....	69
3.6.	HeLa knockout (KO) Zellen als Modellsystem für das WARBM Syndrom.....	71
3.6.1.	HeLa KO Zellen ähneln den Patientenzellen des Warburg Mikro Syndroms.....	71
3.6.2.	Analyse der Autophagie in HeLa KO Zellen.....	73
3.6.3.	KO Zellen zeigen eine veränderte Expression von Autophagie-relevanten Genen.....	74
3.6.4.	Die Mobilisierung von Fettsäuren aus LDs ist in den HeLa KO Zelllinien verringert....	76
4.	Diskussion .....	79
4.1.	RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 sind positive Modulatoren der Autophagie und beeinflussen die Synthese von Autophagosomen.....	79
4.2.	Der RAB3GAP-Komplex: Ein besonderes RAB GAP mit neuronaler Funktion .....	84
4.3.	Loss-of-function Mutationen von RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 beeinflussen die Autophagie: Auswirkung auf das Warburg Mikro Syndrom .....	86
4.4.	Die Bedeutung von RAB18 und RAB3GAP1/2 für die zelluläre Proteostase .....	89
4.5.	Ausblick.....	92
5.	Zusammenfassung .....	93
6.	Summary.....	94
7.	Literaturverzeichnis .....	95
8.	Anhang.....	109
8.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	109
8.2.	Primerliste der Human Autophagy Primer Library .....	110
8.3.	Primersequenzen Autophagy Array.....	113
8.4.	Pipettierschema Autophagy Array.....	115

## 1. Einleitung

### 1.1. Autophagie - eine wichtige Säule der Proteinhomöostase

Die Autophagie ist ein hoch-konservierter Prozess, der der Degradation von intrazellulären Proteinen und Organellen dient und bereits in den 1960er Jahren von Christian De Duve und Kollegen als eine morphologische Veränderung des Zytoplasmas beschrieben wurde. De Duve war es auch, der den Begriff der Autophagie (griechisch für „selbst Essen“) prägte (Duve und Wattiaux 1966). In den 90er Jahren wurde mittels eines Screens Autophagie-defizienter Mutanten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* die ersten sogenannten ATG (*Autophagy related*) Proteine identifiziert. Durch die Entdeckung und funktionelle Charakterisierung dieser ATG Proteine konnte der Prozess der Autophagie immer genauer aufgeklärt werden (Tsukada und Ohsumi 1993; Nakatogawa et al. 2009). Bis heute wurden über 40 essentielle ATG Proteine in der Hefe beschrieben, wovon eine Vielzahl in Pflanzen, Nematoden, Fliegen und dem Säuger konserviert sind (Nakatogawa et al. 2009; Glick et al. 2010; Reumann et al. 2010). Anfänglich ging man davon aus, dass der Prozess der Autophagie ein rein nicht-selektiver (*bulk*) Abbau von zytoplasmatischen Bestandteilen und Organellen ist. Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass die Autophagie einen hoch-selektiven Abbaumechanismus der Zelle darstellt. Vor allem unter basalen Bedingungen werden Proteine und Organellen selektiv abgebaut und die Autophagie unterstützt so die Qualitätskontrolle der Zelle.

Die Autophagie kann in drei Hauptarten unterteilt werden: die Mikroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA; *Chaperone mediated autophagy*) und die Makroautophagie (Abb. 1) (Mizushima und Komatsu 2011).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Autophagie.** Der autophagische Prozess wird in drei Hauptarten unterteilt: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA) und Makroautophagie. Die Makroautophagie wird, je nach abgebauten Substrat, noch weiter unterteilt (verändert nach Mizushima *et al.* 2011).

## Einleitung

---

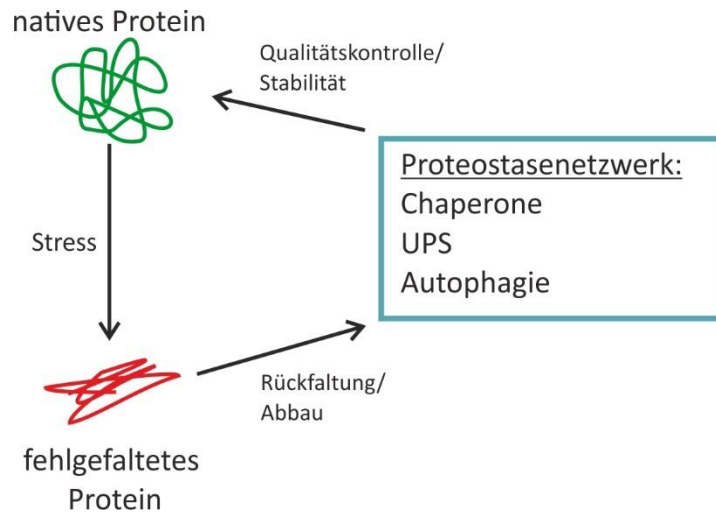
Bei der Mikroautophagie werden abzubauenende Bestandteile direkt in das Lysosom überführt und durch die dort vorliegenden Hydrolasen abgebaut. Hierbei bildet sich ein sogenanntes „Tube“ im Lysosom, welches sich anschließend zu einem Vesikel abschnürt und abgebaut wird. Bisher wurde die Mikroautophagie im Säuger als ein nicht-selektiver Abbauweg beschrieben (Li et al. 2012).

Die CMA ermöglicht dagegen einen selektiven Abbau von einzelnen Proteinen. Die Zielproteine tragen das Aminosäuremotiv KFERQ, welches durch HSC70 (*Heat shock cognate 70kDa protein*) spezifisch erkannt wird und in ihrem Transport zum Lysosom resultiert. Dort bindet HSC70 das lysosomale Protein LAMP2A (*Lysosom-associated membrane protein 2A*) in der lysosomalen Membran und das abzubauenende Protein wird entfaltet. Zusammen mit dem Chaperon-Komplex wird das Protein in das Lumen des Lysosoms transferiert und abgebaut (Kaushik und Cuervo 2012). Interessanterweise tragen viele Proteine, welche auch mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, ein KFERQ-Motiv und stellen so ein potentiell Substrat für die CMA dar (Cuervo et al. 2004; Martinez-Vicente et al. 2008; Vogiatzi et al. 2008).

Der dritte Weg des autophagischen Abbaus stellt die Makroautophagie dar. Der makroautophagische Abbau ist bisher am besten charakterisiert und wird in dieser Arbeit an anderer Stelle detailliert betrachtet (siehe 1.2).

Eine effiziente Autophagie ist entscheidend für die Gesundheit und das Überleben von Zellen und eine Störung des Abbauweges ist mit unterschiedlichen Krankheiten, wie neurodegenerativen Erkrankungen, Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen, Infektionskrankheiten aber auch Stoffwechselerkrankungen assoziiert (Choi et al. 2013; Kroemer 2015). Neben Chaperonen und dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), ist die Autophagie eine wichtige Säule des Proteostasenetzwerkes (Abb. 2) (Hartl et al. 2011; Hipp et al. 2014). Die Proteinhomöostase, kurz Proteostase, gewährleistet die Integrität des Proteoms. Das Proteom stellt die Gesamtheit aller in einer Zelle vorkommenden Proteine dar und ist ein hoch-dynamisches aber auch sensibles System, dass sehr anfällig für Störungen ist, die unmittelbar in der Akkumulation fehlgefalteter Proteine resultiert. Um solche Störungen zu vermeiden muss permanent eine effiziente Qualitätskontrolle erfolgen, sowie ein Gleichgewicht zwischen der Neusynthese und dem Abbau von Proteinen in der Zelle bestehen, was generell durch das Proteostasenetzwerk bewerkstelligt wird (Abb. 2) (Hartl et al. 2011; Hipp et al. 2014).





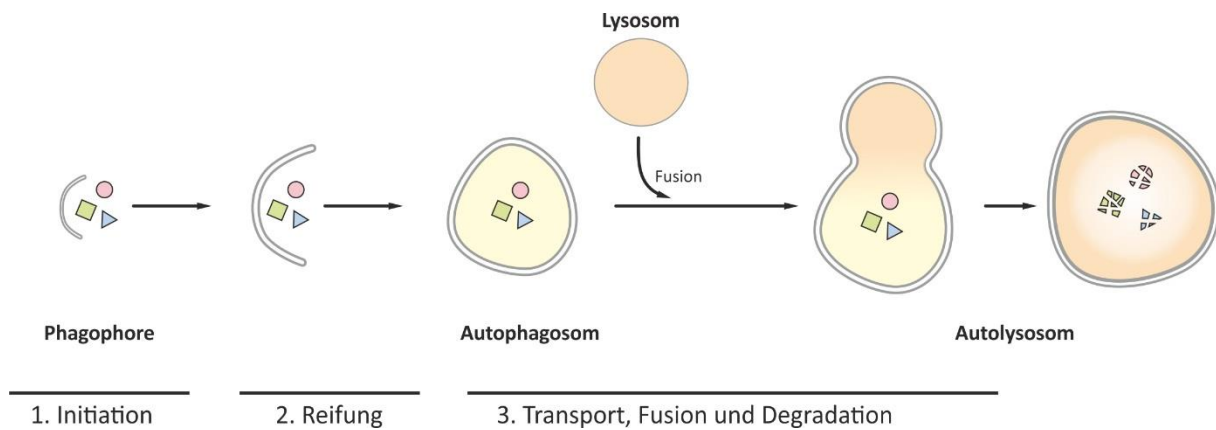
**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteinhomeostase.** Für die Aufrechterhaltung der Proteostase sind Chaperone, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Autophagie von zentraler Bedeutung.

## 1.2. Die Makroautophagie – wenn Zellen sich selbst „aufessen“

Bei der Makroautophagie (im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Autophagie bezeichnet) werden Proteine und Organellen in autophagische Vesikel, sogenannte Autophagosomen, eingeschlossen und kontrolliert zum Lysosom transportiert. Je nach abzubauenem Substrat kann man die Autophagie weiter unterteilen. So wird z. B. der Abbau von Aggregaten als Aggrephagie, der Abbau von Mitochondrien als Mitophagie, der Abbau von Peroxisomen als Pexophagie und die autophagische Beseitigung von Pathogenen als Xenophagie bezeichnet (Mizushima et al. 2011; Khaminets et al. 2016).

Funktionell lässt sich die Autophagie in drei Schritte unterteilen: 1. Initiation und Bildung der Phagophore, 2. autophagosomale Reifung und 3. vesikulärer Transport mit anschließender Fusion mit dem Lysosom (Abb. 3).

Die Initiation der Autophagie beginnt mit der Bildung der Phagophore, einer becherförmigen Doppelmembran, die sich im Laufe der autophagosomalen Reifung vergrößert und dabei abzubauenende zytoplasmatische Bestandteile umschließt. Die Größe passt sich hierbei ihrem Cargo an und am Ende der Reifung verschließen sich die Membranenden zum reifen Autophagosom. Das Autophagosom wird entlang der Mikrotubuli, zum Mikrotubuli-Organisationszentrum transportiert (Kimura et al. 2008, Longatti und Tooze 2009). Dort fusionieren Autophagosom und Lysosom zum Autolysosom und die abzubauenenden Substanzen werden mittels saurer Hydrolasen enzymatisch abgebaut. Die resultierenden Abbauprodukte werden im Anschluss über lysosomale Permeasen und andere Transportsysteme ins Zytoplasma exportiert. Dort stehen sie für die Neusynthese von Makromolekülen oder zur Energiegewinnung zur Verfügung (Banerjee et al. 2010).



**Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Makroautophagie.** Die Initiation der Autophagie beginnt mit der Bildung der Phagophore. Während der Reifung erweitert sich die Phagophore zum reifen Autophagosom, welches die abzubauenen Proteine und Organellen vollständig umschließt. Das reife Autophagosom wird anschließend zum Lysosom transportiert, wo es mit diesem fusioniert und das Autophagosom, zusammen mit dem Cargo, abgebaut wird (verändert nach Kern et al. 2015).

Die Auswahl des autophagischen Cargos verläuft größtenteils selektiv wofür spezifische Cargo-Rezeptoren verantwortlich sind, die mit autophagosomalen Proteinen interagieren. Bekannte Cargo-Rezeptoren sind: SQSTM1/p62 (*Sequestome 1*), NBR1 (*Neighbor of BRCA1 gene 1*), CALCOCO/NDP52 (*Nuclear dot protein 52 kDA*) und OPTN1 (Optineurin) (Boyle und Randow 2013; Stolz et al. 2014).

Eine weitverbreitete Möglichkeit abzubauendes Substrat zu markieren stellt die mehrfache Ubiquitinierung von Proteinen aber auch Organellen dar (Husnjak und Dikic 2012; Popovic et al. 2014). Interessanterweise kommt es vor allem in alternden Zellen verstärkt zu einer Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen, die mittels Autophagie abgebaut werden können. Hierbei besitzen die Proteine der BAG-Familie (*Bcl-2 associated athanogene*), BAG1 und BAG3, eine große Bedeutung. Im Laufe der Alterung kommt es zu einer Verschiebung des Expressionsniveaus von BAG1 hin zu BAG3. In jungen Zellen begünstigt BAG1 den Abbau von Proteinen mittels Proteasom, wogegen im Alter der BAG3-vermittelte autophagische Abbau gefördert wird (Gamerding et al. 2009; Behl 2011, 2016; Stürner und Behl 2017).

Neben der ständig ablaufenden Autophagie unter basalen Konditionen kann der Abbauweg auch induziert werden. Die AMPK (*Adenosinmonophosphate activated Protein Kinase*) ist ein zellulärer Sensor für den Energiegehalt der Zelle und misst das zelluläre Verhältnis zwischen ADP und ATP (Gwinn et al. 2008; Ganley et al. 2009; Weidberg et al. 2011). Ist der Energiegehalt der Zelle zu gering, wird die AMPK aktiviert, welche anschließend die Serin/Threonin Proteinkinase mTOR (*Mechanistic target of Rapamycin*) inhibiert. Aktives mTOR verhindert, durch eine Phosphorylierung des ULK-Komplexes, die Induktion der Autophagie. Durch die Inhibition von mTOR kommt es allerdings zu einer Dephosphorylierung des ULK-Komplexes und somit zu einer Induktion der Autophagie (Kuma und Mizushima 2010). Aufgrund dieser Regulation der Autophagie ist vor allem der Nährstoffmangel

(depletiertes Medium) oder die pharmakologische Inhibition von mTOR (Rapamycin) eine weitverbreitete Möglichkeit den Prozess zu induzieren (Noda und Ohsumi 1998; Mizushima 2007; Shang et al. 2011).

### 1.2.1. Autophagosomale Biogenese

Nach der Initiation der Autophagie, durch die Bildung der Phagophore, einer becherförmigen Doppelmembran, beginnt die autophagosomale Biogenese. Im Laufe der autophagosomalen Reifung vergrößert sich die Phagophore und umschließt hierbei abzubauenende zytoplasmatische Bestandteile. Für die Elongation der Phagophore sind Proteine der Atg8 Familie von besonderer Bedeutung. Im Säuger gibt es mehrere Proteine, die der Atg8 Familie angehören. Hierzu zählen die Unterklassen der MAP1LC3- (*Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain*), GABARAP- und GABARAPL2-Proteine (*Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*). Alle Proteine der Atg8 Familie haben die gleiche Struktur aus zwei  $\alpha$ -Helices am N-terminalen Ende und einem Ubiquitin-ähnlichen Kern (Shpilka et al. 2011). Sie werden als Vorläuferproteine synthetisiert und durch die Cysteinprotease ATG4 am C-terminalen Ende geschnitten. Hierbei wird die unlipidierte Form der Atg8 Proteine (ATG8-I) gebildet. Im Anschluss daran werden sie am C-Terminus mit einem Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert, was zur Assoziation an die Phagophore führt (Kabeya et al., 2004). Die Konjugation von PS wird durch ein Ubiquitin-ähnliches Konjugationssystem katalysiert (Abb. 4). Das Konjugationssystem ist somit für die Bildung der Autophagosomen und gleichzeitig für die Lipidierung von Proteinen der Atg8 Familie essentiell (Geng und Klionsky 2008).

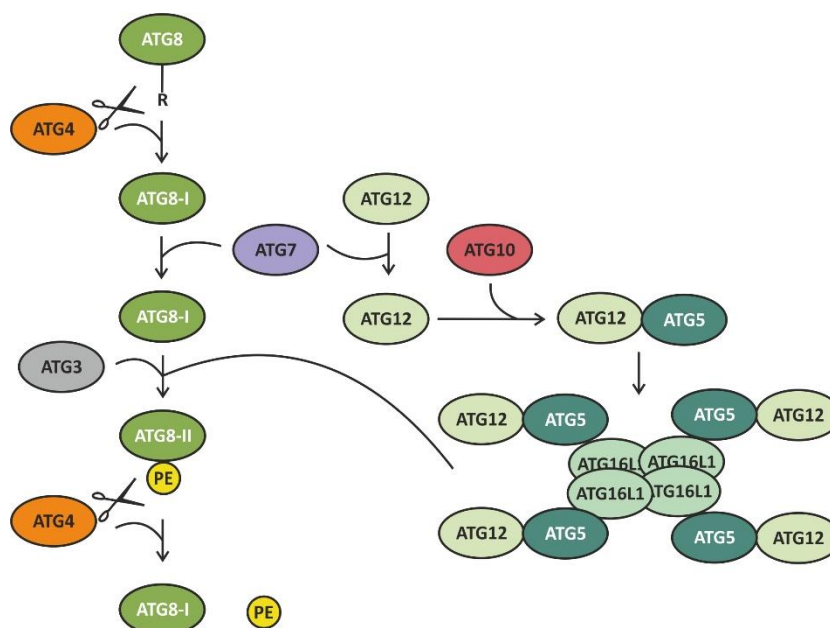
Im Zuge der ATG8 Prozessierung werden ATG5 und ATG12 kovalent durch ATG7 (E1-Enzym) und ATG10 (E2-Enzym) miteinander verbunden. Der ATG12-ATG5-Komplex bindet schließlich an ATG16L1 und der entstandene ATG12-ATG5-ATG16L1-Komplex bildet im Anschluss, durch Homooligomerisierung von ATG16L1, einen großen multimeren Komplex (Tanida et al. 2001; Mizushima et al. 2003a; Mizushima et al. 2003b).

Parallel werden ATG8-I Proteine ebenfalls durch das E1-Enzym ATG7 aktiviert und auf ATG3 (E2-Enzym) übertragen (Tanida et al. 1999; Tanida et al. 2002). Die Lipidierung der Atg8 Proteine wird anschließend durch den ATG12-ATG5-ATG16L1-Komplex katalysiert. Der Komplex wirkt hierbei als E3-Enzym und katalysiert den Austausch von ATG3 mit PE, wodurch die lipidierte Form der Atg8 Proteine entsteht (Abb. 4) (Tanida et al. 2004).

Die Lipidierung der Atg8 Proteine ist ein essentieller Bestandteil der autophagosomalen Biogenese. Die Proteine der Atg8 Familie befinden sich sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran des Autophagosoms. Das im Inneren vorliegende ATG8-II wird im Lysosom abgebaut, wohingegen das an

## Einleitung

der äußeren Membran vorliegende ATG8-II zumindest teilweise durch ATG4 regeneriert wird und wieder zu ATG8-I umgewandelt werden kann (Abb. 4) (Geng und Klionsky 2008; Yu et al. 2012).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der ATG8 Lipidierung.** Die lipidierten ATG8 Proteine spielen eine große Rolle für die Elongation der Phagophore. Die Konjugation von PE an ATG8 Proteine wird durch eine Kaskade von ATG-Proteinen katalysiert.

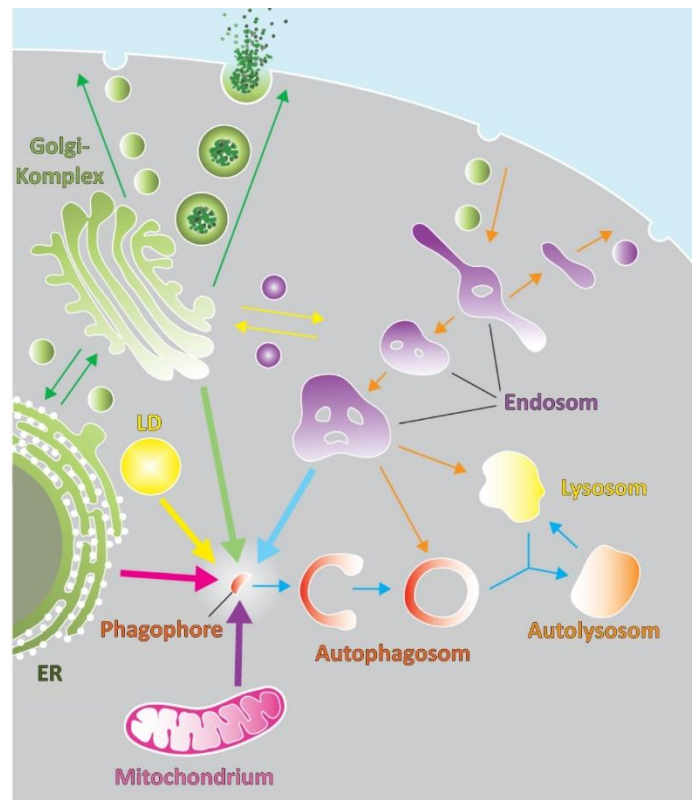
Die Autophagie ist ein hoch-dynamischer Prozess, der im großen Maße vom vesikulären Transport sowie von der Verfügbarkeit von Lipiden und Membranen abhängig ist. Während der raschen Induktion der Autophagie muss eine Zelle in der Lage sein, innerhalb kürzester Zeit, ausreichend Autophagosomen zu bilden. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist die ausreichende Verfügbarkeit von Membranen und Lipiden, die bereitgestellt werden müssen, ohne dass dadurch andere Vesikeltransportwege beeinträchtigt werden und die Zelle Schaden nimmt.

In der Hefe wird die Phagophore an der PAS (*Phagophore assembly site*), einer speziellen Struktur in der Nähe der Vakuole, gebildet (Nakatogawa et al. 2009). Hierbei wurde gezeigt, dass ATG9 und ATG18 (im Säuger WIPI1 (*WD repeat protein interacting with phosphoinositides*)) eine wichtige Rolle spielen. ATG9 ist das einzige bekannte ATG mit einer Transmembrandomäne, welches zwischen der PAS und vesikulären Membranen hin und her wandert. Zusammen mit WIPI1 stellt es so Membranbestandteile zur autophagosomalen Biogenese bereit (Reggiori et al. 2005; Proikas-Cezanne et al. 2007; Obara et al. 2008; Mari et al. 2010; Yamamoto et al. 2012).

Im Säuger hingegen existiert keine eindeutige PAS und es scheint, als könnte die Phagophore an mehreren Zellkompartimenten gebildet werden. Neben dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Komplex (Golgi) wurden die Plasmamembran, das Mitochondrium und Lipidtröpfchen als mögliche Lipidquellen der autophagosomalen Biogenese beschrieben (Abb. 5) (Hailey et al. 2010;

## Einleitung

Ravikumar et al. 2010; Tooze und Yoshimori 2010; Yen et al. 2010; Dupont et al. 2014). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Bereitstellung der Membranen durch eine Vielzahl von Proteinen des Vesikeltransports reguliert wird. Die Kontaktstellen zwischen unterschiedlichen Organellen könnten hierbei eine wichtige Funktion besitzen (Biazik et al. 2015; Schrader et al. 2015; Gomez-Suaga et al. 2017). Gleichermäßen konnte auch im Säuger ATG9 in Vesikeln lokalisiert werden, welche zwischen dem trans-Golgi Netzwerk und Endosomen wandern. Dieser Vesikeltransport ist von der Aktivität des ULK-Komplexes abhängig und dient wahrscheinlich dem Transport von Membranbestandteilen zur Phagophore (Young et al. 2006).

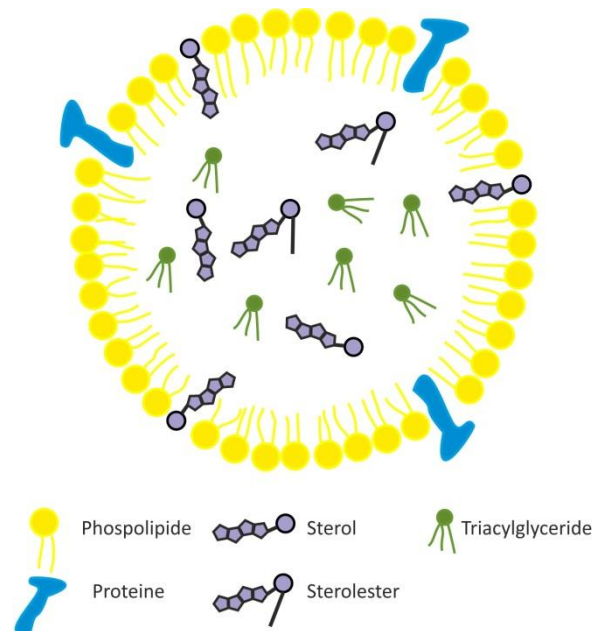


**Abbildung 5: Potentielle Membranquellen der autophagosomalen Biogenese.** Als mögliche Membranquellen für die autophagosomale Biogenese wurden das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Komplex, das Mitochondrium, die Plasmamembran und Lipidtröpfchen beschrieben (verändert nach Tooze und Yoshimori 2010).

Eine weitere Hypothese der Membran- und Lipidbereitstellung für die autophagosomale Biogenese ist die *de novo*-Synthese. Hierbei werden Lipide, die für die Bildung der Autophagosomen benötigt werden, am ER synthetisiert und direkt für die Elongation der Phagophore verwendet (Girardi et al. 2011). Für diese Hypothese spricht die Erkenntnis, dass bisher noch keine Membranproteine in der autophagosomalen Membran festgestellt wurden, die von anderen zellulären Kompartimenten stammen (McEwan und Dikic 2010). Zudem ist das ER an der Bildung von Phospholipiden beteiligt, die für die Membranbiogenese der Autophagosomen benötigt wird (Girardi et al. 2011).

### 1.3. Lipidtröpfchen (Lipid Droplets) - nicht nur ein Lipidspeicher der Zelle

Lipidtröpfchen (LDs) sind Organellen, die der Lipidspeicherung in eukaryotischen Zellen dienen. Sie treten ubiquitär auf und ihre Bildung bzw. der Abbau wird in der Zelle strikt kontrolliert (Martin und Parton 2006). Die Oberfläche der LDs besteht aus einer Phospholipideinzelschicht mit freiem Cholesterol. Im Inneren befinden sich Lipidester, Triacylglyceride und Cholesterolester (Abb. 6).



**Abbildung 6: Schematischer Aufbau von Lipidtröpfchen (LDs).** LDs dienen als zellulärer Lipidspeicher. Ihre Oberfläche besteht aus einer Phospholipidschicht mit freiem Cholesterol (Sterol) und mehreren Proteinen (z.B. Perilipine, Lipasen, Proteine der Lipidsynthese und für den Membrantransport). Im Inneren der Lipidtröpfchen sind Lipidester, Sterole und Triacylglyceride gelagert.

Wie LDs in der Zelle gebildet werden ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine Möglichkeit stellt die *de novo*-Synthese am ER dar. Hierbei bilden Neutralfette eine Linsen-artige Struktur in der ER Membran, welche anschließend abgeschnürt wird. Für diesen Prozess ist unter anderem eine konservierte Proteinfamilie, die FIT Proteine (*Fat storage-inducing transmembrane proteins*) verantwortlich. In der Hefe und in höheren Eukaryoten konnte gezeigt werden, dass ein Verlust dieser Proteine darin resultiert, dass LDs nicht vom ER abgeschnürt werden und an diesem Kompartiment verbleiben. FIT Proteine sind somit für die Abschnürung der gebildeten LDs am ER verantwortlich (Choudhary et al. 2015). Ein weiteres Modell zur Generierung der LDs ist das *bicelle model*. Hierbei akkumulieren Neutralfette zwischen der inneren und äußeren ER-Membran und das entstehende LD wird aus dem ER herausgeschnitten. Die Phospholipideinzelschicht des entstandenen LDs besteht somit aus der zytosolischen und der luminalen ER Membran. Dieses Modell könnte auch erklären, wie große ungefaltete Proteine oder Viren aus dem ER-Lumen in das Zytosol geschleust werden (Ploegh 2007). Ein drittes Modell, das die LD-Synthese erklären soll, ist das *vesicular budding model*. In diesem Modell

## Einleitung

---

dienen kleine Vesikel, welche am ER verharren als Entstehungsort für LDs. Neusynthetisierte Lipide werden in diese Vesikel geschleust, wodurch das LD gebildet wird (Walther und Farese, JR 2009).

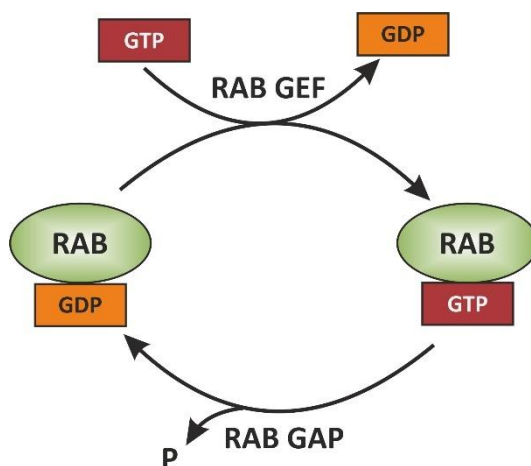
Durch ihre Funktion als Lipidspeicher besitzen LDs eine wichtige Rolle für den Lipidmetabolismus, für die Energieversorgung der Zelle und die Biogenese von Membranen. So werden Fettsäuren aus den LDs mit Hilfe von Lipasen mobilisiert, um den Energiegehalt in der Zelle zu regulieren oder aber um Lipide für die Membranbiogenese bereitzustellen. Zudem zeigen LDs komplexe Interaktionen mit anderen Organellen, z.B. ER, Plasmamembran, Peroxisomen und Mitochondrien und werden für eine effiziente Replikation von Viren benötigt (Guo et al. 2009). Interessanterweise konnte zudem eine Verbindung zwischen einem gestörten Lipidmetabolismus in Nervenzellen und neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und der Amyotrophen Lateralsklerose hergestellt werden (Yadav und Tiwari 2014).

Im Kontext der Autophagie wurde von Singh *et al.* und Velikkakath *et al.* beschrieben, dass LDs durch die Autophagie abgebaut werden können, ein Prozess der als Makrolipophagie bezeichnet wird (Singh et al. 2009; Velikkakath et al. 2012). Interessanterweise wurden die Lipidreservoirs aber kürzlich auch als wichtige Lipidquelle für die autophagosomalen Biogenese beschrieben. In Hefezellen wurde gezeigt, dass LDs und die Mobilisierung von Fettsäuren eine Schlüsselrolle für die Synthese von Autophagosomen spielen (Shpilka et al. 2015). Die Metabolisierung der LDs findet am ER statt, genau dort, wo auch die Autophagosomen gebildet werden (Murphy 2001; Martin und Parton 2005). Die räumliche Nähe dieser beiden Ereignisse könnte darauf hinweisen, dass auch im Säuger, LDs Fettsäuren bereitstellen, die nach ihrer Umwandlung zu Phospholipiden im ER, für die Bildung der Autophagosomen bereit gestellt werden (Dupont et al. 2014; Deretic 2015). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Lipide und Membranen, für die Elongation der Phagophore, *de novo* synthetisiert werden und nicht nur durch die Abschnürung von Membranen bereits bestehender Organellen vergrößert wird (McEwan und Dikic 2010; Kern et al. 2015).

#### 1.4. RAB GTPasen, RAB GAPs und RAB GEFs – Regulatoren des zellulären Transports

RAB GTPasen (*Ras-related in brain*) sind hoch-konservierte ubiquitär verbreitete Proteine die essentielle Faktoren des zellulären Vesikeltransports darstellen. Sie sorgen für einen effizienten Transport in der Zelle und sind an vielen Schritten des vesikulären Transportsystems beteiligt. So kontrollieren sie durch Interaktion mit diversen Effektoren die Bildung von Vesikeln, den Vesikeltransport entlang des Zytoskeletts und die Fusion der Vesikel mit der Zielmembran (Frasa et al. 2012). Die funktionelle Beeinträchtigung von RAB GTPasen und ein daraus resultierender gestörter intrazellulärer Vesikeltransport hat schwerwiegende Folgen für die Zelle und ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen, wie Neuropathien, Diabetes Typ 2, Immunschwäche oder Krebs verbunden (Mosesson et al. 2008; Stenmark 2009).

RAB GTPasen sind molekulare Schalter, die zwischen einer aktiven GTP- und einer inaktiven GDP-gebundene Form wechseln können, was durch RAB GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) und RAB GAPs (*GTPase activating proteins*) katalysiert wird (Cherfils und Zeghouf 2013) (Abb. 7). RAB GEFs und RAB GAPs kontrollieren und koordinieren den Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus der RAB Proteine und modulieren dadurch zelluläre Prozesse die von RAB GTPasen abhängig sind. Sie verhindern die Fehllokation von Effektoren, rekrutieren RAB GTPasen zu ihren zellulären Kompartimenten und entfernen diese auch wieder von ihrer Zielmembran (Frasa et al. 2012).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des RAB GTPase Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus durch RAB GEFs und RAB GAPs.** RAB GTPasen wirken als molekulare Schalter. Die Regulation erfolgt durch die RAB GEFs und RAB GAPs. RAB GEFs katalysieren den Wechsel von GDP zu GTP und RAB GAPs katalysieren die GTP Hydrolyse.

RAB GEFs katalysieren die Dissoziation von GDP damit zytosolisches GTP an die RAB GTPase binden kann. Die aktivierte RAB GTPase kann anschließend an seine Effektor Proteine binden.

Es gibt drei spezifische GEF-Domänen, die VPS9-Domäne (*Vacuolar protein sorting 9*), die DENN-Domäne (*Differentially expressed in normal and neoplastic cells*) oder die SEC2-Domäne (Carney et al. 2006; Barr und Lambright 2010; Marat et al. 2011). Neben diesen drei GEF-Domänen gibt es zudem



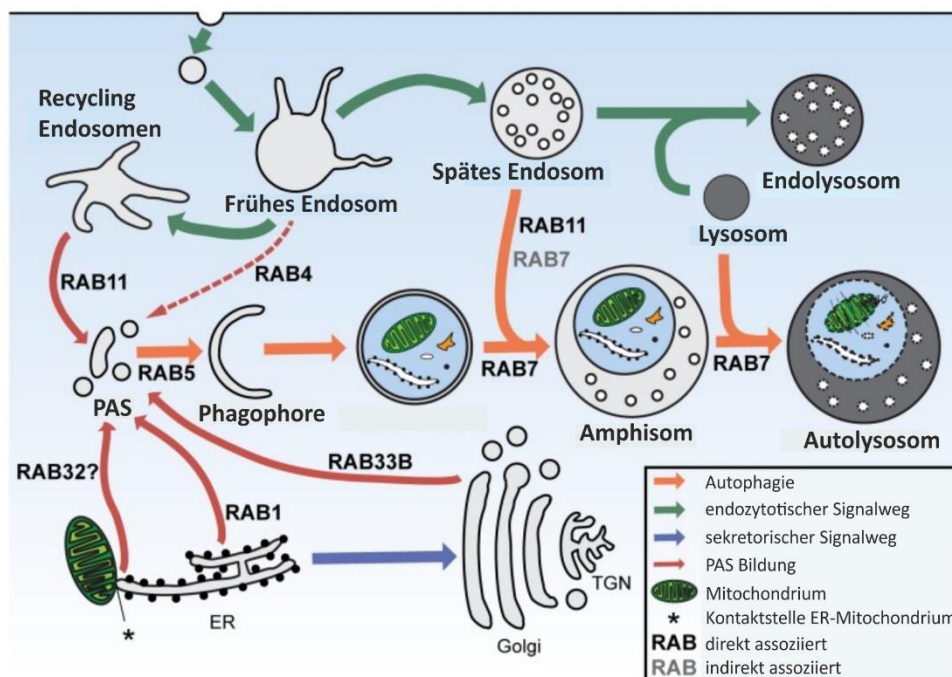
noch ein weiteres GEF, den TRAPP-Komplex (*Transport protein particle*) (Carney et al. 2006; Barrowman et al. 2010; Barr und Lambright 2010; Marat et al. 2011).

Die Inaktivierung der RAB GTPasen wird durch die RAB GAPs katalysiert. Da die intrinsische Hydrolyserate von RAB GTPasen sehr gering ist, wird die GTP Hydrolyse durch RAB GAPs vermittelt (Cherfils und Zeghouf 2013). Die meisten RAB GAPs sind durch die hoch-konservierte TBC-Domäne (TRE-2, BUB2 und CDC16) charakterisiert. In dieser rund 200 Aminosäure langen TBC-Domäne sind zwei katalytische Reste, ein Arginin- und ein Glutamin-Rest, für die GAP-Aktivität verantwortlich (Pan et al. 2006). Das einzig bislang bekannte RAB GAP Protein ohne eine solche TBC-Domäne ist der, in der vorliegenden Arbeit untersuchte RAB3GAP-Komplex, der sich in vielerlei Hinsicht von den TBC GAPs unterscheidet, aber trotzdem eine potente GAP-Aktivität aufweist (Clabecq et al. 2000; Frasa et al. 2012; Gavriljuk et al. 2012) (siehe Kapitel 1.5).

Mittlerweile ist bekannt, dass RAB GAPs nicht nur Regulatoren von RAB GTPasen sind, sondern auch andere zelluläre Prozesse regulieren und z. B. die Zytokinese und Autophagie beeinflussen. Hierbei regulieren sie den Transport von Membranen und koordinieren verschieden Signalwege (Faitar et al. 2006; Itoh et al. 2011; Popovic et al. 2012).

#### **1.4.1. RAB GTPasen, RAB GAPs, RAB GEFs und Autophagie**

Die Autophagie ist ein dynamischer Prozess, der stark von dem kontrollierten Transport von Vesikeln und einer hohen Flexibilität von Membranen abhängig ist. Neben der Versorgung mit Lipiden und Proteinen, für die Bildung der Phagophore und der Reifung der Autophagosomen, sind auch der Transport zum Lysosom und die Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom von klassischen Vesikeltransportwegen abhängig. Somit teilen sich der Vesikeltransport und die Autophagie viele funktionelle Eigenschaften und interessanterweise regulieren sie sich gegenseitig. Der intrazelluläre Vesikeltransport lässt sich in eine Abfolge bestimmter Schritte unterteilen: Cargo Selektion, Vesikelabschnürung von der Donormembran, Translokation entlang des Zytoskeletts und letztendlich die Fusion mit den Zielorganellen. Mitglieder der Proteinklasse der RAB GTPasen und den SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) sind Regulatoren, welche für den Vesikeltransport und die Dynamik von Membranen wichtig sind (Amaya et al. 2015). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass RAB1 den ER-Golgi Transport reguliert. RAB5 reguliert den frühen endosomalen Transport und RAB27A besitzt eine Funktion bei der Exozytose von Granula (Chua et al. 2011; Mitra et al. 2011; Chua und Tang 2015). Durch ihre Funktion für den Vesikeltransport und die Membrandynamik ist es nicht verwunderlich, dass zahlreiche RAB Proteine und ihre Regulatoren mit der Autophagie assoziiert wurden (Abb. 8).



**Abbildung 8: Rolle der RAB GTPasen für den Ablauf der Autophagie.** Der Prozess der Autophagie ist stark mit dem Vesikeltransport in der Zelle verbunden. Daher wurden zahlreiche RAB GTPasen direkt und auch indirekt mit der Autophagie assoziiert und gezeigt, dass in jedem Abschnitt des autophagischen Prozesses RAB GTPasen beteiligt sind (verändert nach Szatmári und Sass, 2014).

Unter anderem wurden RAB1, RAB5 und RAB7 als Modulatoren der Autophagie beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass RAB1 an der Bildung der Phagophore beteiligt ist und RAB5 die Synthese der Autophagosomen moduliert (Ravikumar et al. 2008, Zoppino et al. 2010). RAB7 reguliert hingegen den Transport der Autophagosomen entlang der Mikrotubuli und ist zusätzlich für die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen verantwortlich, wodurch Autolysosomen gebildet werden (Jager et al. 2004; Gutierrez et al. 2004). Interessanterweise wurden auch zahlreiche RAB GAPs und RAB GEFs mit der Modulation der Autophagie in Verbindung gebracht. So verfügen unter anderem TBC1D5 und TBC1D25 über ein Bindungsmotiv für Proteine der Atg8 Familie, ein sogenanntes LIR-Motiv (*LC3 interacting region*) und wurden funktionell mit der Rekrutierung von ATG9, ULK1 und ATG16L1 zur Phagophore verbunden (Popovic et al. 2012; Popovic und Dikic 2014). TBC1D14 wurde als ein negativer Modulator der Autophagie charakterisiert, der den Membrantransport von RAB11-positiven „Recycling Endosomen“ zur autophagosomalen Biogenese kontrolliert. Hierbei bindet TBC1D14 an den TRAPP-Komplex und reguliert den Transport von ATG9. Zudem wird sowohl der TRAPP-Komplex als auch TBC1D14 für die Regulation von RAB1 benötigt (Lamb et al. 2016).

Der TRAPPIII-Komplex scheint ebenfalls frühe Prozesse der Autophagie zu modulieren. So konnte in der Hefe gezeigt werden, dass der Komplex für die Rekrutierung von ATG9-Vesikeln zur PAS erforderlich ist und die Synthese von Autophagosomen beeinflusst (Lynch-Day et al. 2010; Kakuta et al. 2012). Auch im Säuger führt ein Funktionsverlust des TRAPP-Komplexes, dem RAB GEF der RAB GTPase RAB1, zu

einer reduzierten Bildung der Phagophore (Zoppino et al. 2010; Mochizuki et al. 2013; Lamb et al. 2016).

### **1.5. Der RAB3GAP-Komplex – kein gewöhnliches RAB GAP**

Der RAB3GAP-Komplex gehört zu den RAB GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) allerdings ist der Komplex ein eher ungewöhnliches RAB GAP. Interessanterweise ist es das einzige RAB GAP, das einen heterodimeren Komplex bildet. Dabei stellt RAB3GAP1 die katalytische Untereinheit und RAB3GAP2 die nicht-katalytische Untereinheit dar. Zusammen bilden beide Untereinheiten einen 280 kDA großen Proteinkomplex (Fukui et al. 1997; Nagano et al. 1998). Der RAB3GAP-Komplex ist zudem das einzig bekannte RAB GAP ohne eine GAP typische TBC-Domäne (Pan et al. 2006; Gavriliuk et al. 2012; Frasa et al. 2012). Für die katalytische Aktivität von RAB3GAP ist, wie auch in anderen TBC RAB GAPs, ein Arginin Rest verantwortlich. Dieses Arginin befindet sich an Stelle 728 in der katalytischen Untereinheit von RAB3GAP1 (Clabecq et al. 2000).

Der RAB3GAP-Komplex wurde als erstes als ein spezifisches GTPase aktivierendes Protein für die RAB GTPase RAB3 beschrieben (Fukui et al. 1997). RAB3 ist für die Neurotransmitter- und Neurohormonausschüttung verantwortlich (Sudhof 2004; Sakane et al. 2006). Es existieren vier Isoformen von RAB3: RAB3A, RAB3B, RAB3C und RAB3D (Schlüter et al. 2002).

Die Funktion des RAB3GAP-Komplexes für die Neurotransmitterausschüttung wurde unter anderem in der RAB3GAP1 *knockout* Maus untersucht. Durch den Verlust der katalytischen Untereinheit akkumuliert die GTP-gebundene Form von RAB3 an der Synapse und kann nicht mehr in die GDP-gebundene Form hydrolysiert werden, wodurch der RAB3-vermittelte synaptische Vesikelkreislauf gestört wird. Zudem zeigen die *KO* Mäuse eine veränderte Kurzzeitplastizität in der hippokampalen CA1 Region. Somit ist der RAB3GAP-Komplex eine wichtige Komponente der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Neurohormon- und Neurotransmitterausschüttung (Sakane et al. 2006).

In *Drosophila* konnte zudem gezeigt werden, dass RAB3GAP notwendig für den Erhalt der synaptischen Homöostase ist und diese wird durch ein Verlust gestört (Muller et al. 2011).

Trotz seiner ungewöhnlichen GAP-Domäne ist der RAB3GAP-Komplex ein etabliertes RAB GAP. Interessanterweise wurde aber kürzlich gezeigt, dass der Komplex zusätzlich eine Funktion als RAB GEF besitzt und die RAB GTPase RAB18 reguliert, was funktionell für die Aufrechterhaltung und Integrität der ER-Struktur notwendig ist. In einem RAB GEF Assay wurde die Nukleotidaustauschaktivität von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 untersucht. Hierbei wurde für beide Komponenten des Komplexes eine GEF Aktivität gezeigt. Beide Untereinheiten werden für eine Regulation von RAB18 benötigt und fehlt eine

Untereinheit des Komplexes, bzw. ist eine Untereinheit des Komplexes mutiert, wird die GEF Aktivität gestört und es findet kein GDP Austausch statt. Dies führt zu einer fehlerhaften Rekrutierung von RAB18 an das ER (Gerondopoulos et al. 2014). Der RAB3GAP-Komplex ist somit das bislang einzig bekannte GAP, das neben seiner GAP-Funktion auch eine GEF-Funktion besitzt und damit unterschiedliche RAB GTPasen reguliert.

### **1.6. Die RAB GTPase RAB18 – ein wichtiger Modulator des Lipidmetabolismus**

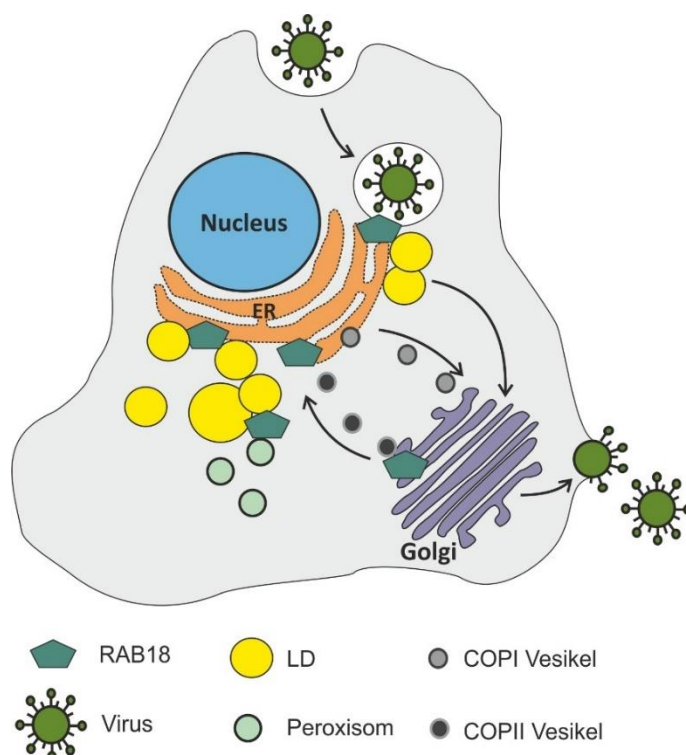
RAB18 ist eine konservierte RAB GTPase, die sowohl in Pflanzen als auch im Säuger vorkommt, allerdings nicht in der Hefe zu finden ist. Zu Beginn wurde RAB18 in polarisierten Epithelzellen an Endosomen lokalisiert. Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass RAB18 Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Lokalisation aufweist und unterschiedliche zelluläre Funktionen erfüllen kann (Abb. 9). So zeigt RAB18 auch einen Zelltyp-spezifischen Unterschied im Expressionsspiegel und wird zum Beispiel im Gehirn und Herzen stark exprimiert (Elias et al. 2012; Klopper et al. 2012). RAB18 ist unter anderem am ER, und an Peroxisomen zu finden (Gronemeyer et al. 2013; Gerondopoulos et al. 2014). Ebenfalls lokalisiert RAB18 an sekretorischen Granula und reguliert dort deren Transport (Vazquez-Martinez und Malagon 2011). Außerdem ist es an LDs zu finden und moduliert den Lipidmetabolismus, was die am besten charakterisierte Funktion von RAB18 darstellt. Hierbei kontrolliert RAB18 die Assoziation zwischen ER und LDs, wodurch der Lipidtransfer zwischen beiden reguliert wird (Martin et al. 2005; Ozeki et al. 2005; Pulido et al. 2011). Interessanterweise sind wildtypisches RAB18 und dominant-aktives RAB18 an LDs lokalisiert, wohingegen inaktives RAB18 nicht an den Lipidreservoirs gebunden vorliegt. Die Überexpression von RAB18 resultiert in einer vermehrten Assoziation der RAB GTPase an LDs und verringert gleichzeitig die Menge von LD-assoziertem ADRP (*Adipocyte differentiation-related protein*). Die reduzierte ADRP-Bindung führt zu einer verstärkten Rekrutierung von LDs an das ER (Ozeki et al. 2005). Die genaue Funktion von ADRP ist bisher unbekannt, jedoch führt die Überexpression von ADRP dazu, dass vermehrt LDs gebildet werden und umgekehrt bewirkt der *knockdown* von ADRP eine Verringerung der LDs. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ADRP an der Entstehung und Stabilität von LDs beteiligt ist (Imamura et al. 2002; Nakamura und Fujimoto 2003; Nakamura et al. 2004). Die gegensätzliche Bindung von ADRP und RAB18 an LDs könnte somit darauf hindeuten, dass RAB18 eine Funktion bei der Lipolyse am ER besitzt und nicht die Biogenese von LDs reguliert. Dafür spricht auch, dass die Überexpression von RAB18 keine verstärkte LD-Synthese bewirkt und RAB18 durch eine Stimulation der Lipolyse vermehrt an LDs rekrutiert wird (Ozeki et al. 2005, Martin et al. 2005). Die Lokalisation von RAB18 an Peroxisomen und

## Einleitung

LDs fördert zudem die Verbindung zwischen der Lipolyse in LDs mit der peroxisomalen Fettsäure Oxidation (Gronemeyer et al. 2013).

Neben der Funktion von RAB18 im Lipidmetabolismus wurde die RAB GTPase auch mit der Koordination des retrograden COPI (*Coat protein complex I*)-unabhängigen Transports zwischen Golgi- und ER-assoziiert. Interessanterweise wurde RAB18 kürzlich auch als eine Faktor charakterisiert, der mit den RAB3GAPs zusammen, für die Aufrechterhaltung der Struktur und Integrität des ER notwendig ist (Dejgaard et al. 2008; Gerondopoulos et al. 2014). Zudem besitzt RAB18 eine Rolle für die Hepatitis C- und Dengue-Virusreplikation. RAB18 vermittelt dabei die Interaktion zwischen der viralen Replikation und den LDs (Abb. 9) (Salloum et al. 2013; Dansako et al. 2014; Tang et al. 2014).

Wie erwähnt wurde der RAB3GAP-Komplex als ein neuartiges RAB GEF für RAB18 beschrieben (Gerondopoulos et al. et al. 2015). Interessanterweise wurde kürzlich der TRAPP-II-Komplex als ein weiteres RAB18 GEF charakterisiert und ebenso wurde gezeigt, dass COPI die Rekrutierung von TRAPP-II zu LDs fördert. TRAPP-II aktiviert anschließend die RAB GTPase RAB18 und beeinflusst dadurch die Lipidhomöostase (Li et al. 2017).

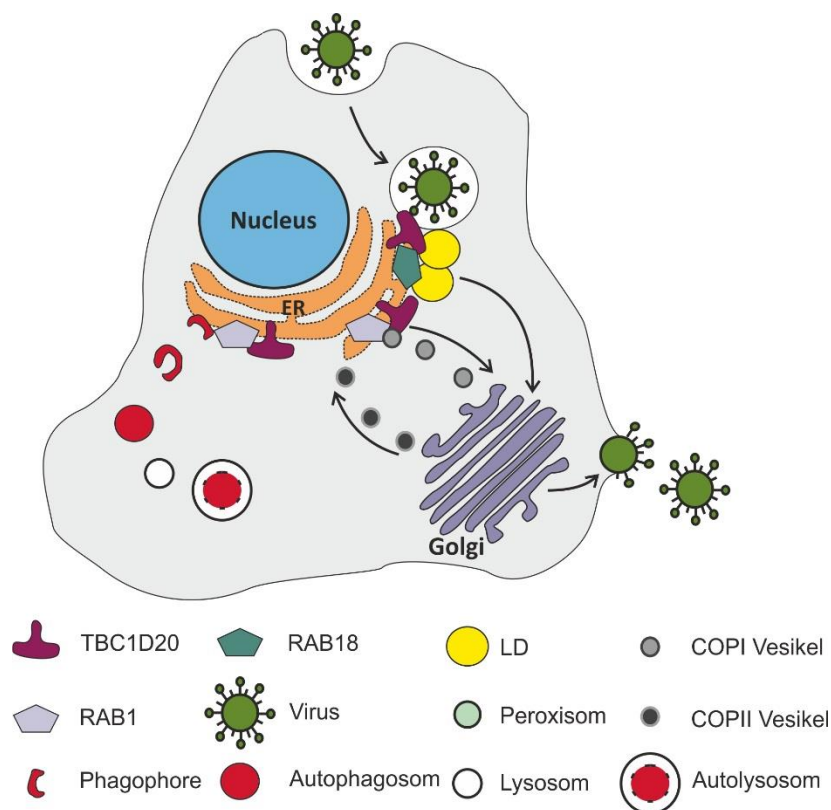


**Abbildung 9: Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation und Funktionen von RAB18.** RAB18 koordiniert den retrograden COPI-unabhängigen Transport zwischen Golgi und ER, ist für die Aufrechterhaltung der ER Struktur notwendig und besitzt eine Rolle bei der Replikation von Viren. Zudem lokalisiert RAB18 an Peroxisomen und LDs. Hierbei fördert RAB18 die Verbindung zwischen der Lipolyse in LDs und der peroxisomalen Fettsäure-Oxidation und reguliert den Lipidmetabolismus.

### 1.7. Das RAB GTPase aktivierende Protein TBC1D20

TBC1D20 gehört zu der Proteinfamilie der RAB GAPs und besitzt eine konservierte TBC-Domäne, die für die GAP-Aktivität verantwortlich ist (Frasa et al. 2012). Es gehört zu den ER Typ II Membranproteinen und ist das einzig beschriebene GAP Protein, welches eine Transmembrandomäne besitzt. Seine TBC-Domäne zeigt hierbei ins Cytosol (Haas et al. 2007). GAP Proteine, wie auch TBC1D20, katalysieren die GTP-Hydrolyse von RAB Proteinen und sind für die Inaktivierung von RAB GTPasen verantwortlich (Frasa et al. 2012). Zuerst wurde TBC1D20 als GAP für RAB1B *in vivo* und für RAB2A *in vitro* beschrieben (Haas et al. 2007; Sklan et al. 2007). Diese beiden RAB GTPasen regulieren den anterograden Vesikeltransport zwischen ER und Golgi und sind wichtig für die Erhaltung der Golgi-Struktur (Haas et al. 2007). Allerdings zeigten *knockdown* Studien von TBC1D20 in HeLa Zellen, dass ein verringerter TBC1D20 Proteinspiegel keinen Einfluss auf den sekretorischen Transport und auch keine veränderte Golgi-Struktur zur Folge hatte (Haas et al. 2007). Die RAB GTPase RAB1 wurde zudem als ein Modulator für die autophagosomale Biogenese beschrieben (Zoppino et al. 2010). Neben der Funktion als GAP für die RAB GTPasen RAB1 und RAB2 wurde mittlerweile auch die Hypothese aufgestellt, dass TBC1D20 ein potentielles RAB GAP für RAB18 ist (Handley et al. 2015). Interessanterweise vermittelt TBC1D20, neben RAB18, die Hepatitis C-Virusreplikation durch eine Interaktion mit dem Lipidtröpfchen assoziierten NS5A (*Nonstructural protein 5A*) (Abb. 10) (Sklan et al. 2007; Nevo-Yassaf et al. 2012).

Im Laufe dieser Arbeit wurde von Sidjanin *et al.* publiziert, dass TBC1D20 ein positiver Modulator der Autophagie ist und diese Modulation über RAB1 vermittelt wird (Sidjanin et al. 2016).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der zellulären Lokalisationen sowie Funktionen von TBC1D20.** TBC1D20 gehört zu den GAP Proteinen und reguliert die Aktivierung von RAB Proteinen. Es wurde gezeigt, dass TBC1D20 ein GAP für die RAB GTPase RAB1, RAB2 und womöglich auch für RAB18 ist. TBC1D20 koordiniert den anterograden Transport zwischen ER und Golgi und ist wichtig für die Erhaltung der Golgi-Struktur. Zudem besitzt TBC1D20 eine Rolle für die Hepatitis C-Virusreplikation.

## 1.8. Das Warburg Mikro Syndrom (WARBM Syndrom)

Das Warburg Mikro Syndrom wurde zum ersten Mal 1993 beschrieben und ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Entwicklungsstörung. Merkmale dieses Syndroms sind schwerwiegende Gehirnehlbildungen, verbunden mit einer Mikrozephalie und Mikrophthalmie. Darüber hinaus kommt es zu Augenfehlbildungen, einer gestörten neurologischen Entwicklung und mentaler Retardation sowie Hypogonadismus. Betroffene Kinder entwickeln sich meistens nicht über das geistige Entwicklungsstadium von vier Monaten hinaus (Handley et al. 2013).

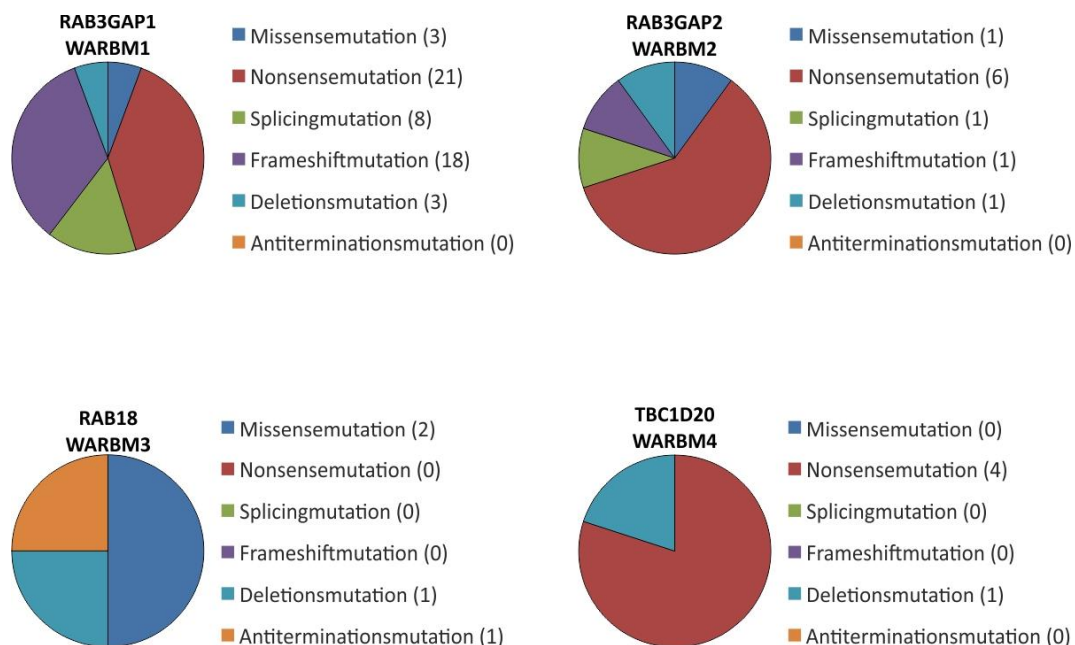
Das erste Gen, das mit dem WARBM Syndrom kausal verbunden werden konnte war RAB3GAP1, die katalytische Untereinheit des RAB3GAP-Komplexes (Aligianis et al. 2005; Morris-Rosendahl et al. 2010). Anschließend wurden auch Mutationen in der nicht-katalytischen Untereinheit RAB3GAP2 bei Patienten festgestellt, die zuerst mit dem Martsof Syndrom assoziiert wurden, welches eine schwächere Ausprägung des WARBM Syndroms darstellt. Mittlerweile sind aber auch Mutationen in RAB3GAP2 bekannt, welche zum WARBM Syndrom (WARBM2) führen (Aligianis et al. 2006; Borck et al. 2011; Handley et al. 2015; Handley et al. 2013). Durch die funktionelle Beziehung beider Proteine

wurde vermutet, dass ein Funktionsverlust des RAB3GAP-Komplexes zu einer gestörten RAB3 Funktion führt. Dies würde eine gestörte Neurotransmission verursachen und dadurch womöglich den krankhaften Phänotyp erklären (Bem et al. 2011). Auch in Hunden wurden mittlerweile Mutationen in RAB3GAP1 und RAB3GAP2 entdeckt, die zu einem vergleichbaren Phänotyp wie im Menschen führen (Wiedmer et al. 2015; Mhlanga-Mutangadura et al. 2016). Allerdings wurden im Laufe der Jahre weitere Mutationen in zwei weiteren Genen bei betroffenen Kindern festgestellt. So führen Mutationen in RAB18 im Menschen zum WARBM Syndrom (WARBM3) (Bem et al. 2011; Handley et al. 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein *knockout* von RAB18 in Zebrafischen und in Mäusen zu einer gestörten neuronalen Entwicklung, Neurodegeneration und Augenfehlbildungen führten, also Phänotypen bewirken, die dem WARBM Syndrom ähneln (Bem et al. 2011; Carpanini et al. 2014).

Das letzte Protein, welches durch seinen Funktionsverlust mit dem WARBM Syndrom assoziiert wurde, ist TBC1D20 (WARBM4). Eine erste Verbindung von TBC1D20 mit dem Syndrom wurde hergestellt, nachdem gezeigt wurde, dass die *blind sterile mouse*, eine Mutation in TBC1D20 aufweist. Die Mäuse wurden vor über 30 Jahren entdeckt und es liegt eine spontane autosomal rezessive Mutation vor, die zu einem totalen Funktionsverlust von TBC1D20 führt. Der Phänotyp der Mäuse ist vergleichbar mit dem WARBM Syndrom im Menschen. So weisen sie vergleichbare Augenfehlbildungen wie Patienten auf und sind infertil (Liegel et al. 2013).

Zusammenfassend konnten bisher 54 Mutationen in RAB3GAP1, 10 Mutationen in RAB3GAP2, fünf Mutationen in TBC1D20 und vier Mutationen in RAB18 identifiziert werden, die das WARBM Syndrom verursachen. Alle Mutationen führen zu einem Funktionsverlust der Proteine und es liegen Missense-, Nonsense-, Splicing-, Frameshift-, Deletionsmutanten und eine Antiterminationsmutation vor (Abb. 11). Für viele diagnostizierte WARBM Syndrom Patienten konnte allerdings bisher noch keine verursachende Mutation beschrieben werden. Es kann also angenommen werden, dass in Zukunft noch weitere Mutationen und womöglich auch weitere Gene mit dem Syndrom assoziiert werden (Handley et al. 2013; Liegel et al. 2013; Picker-Minh et al. 2014; Asahina et al. 2016; Imagawa et al. 2015).





**Abbildung 11: Mutationsspektrum des Warburg Mikro Syndroms (WARBM).** Art der Mutation in RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB18 oder TBC1D20, die zum WARBM Syndrom führt. Alle Mutationen bedeuten immer einen kompletten Funktionsverlust der Proteine.

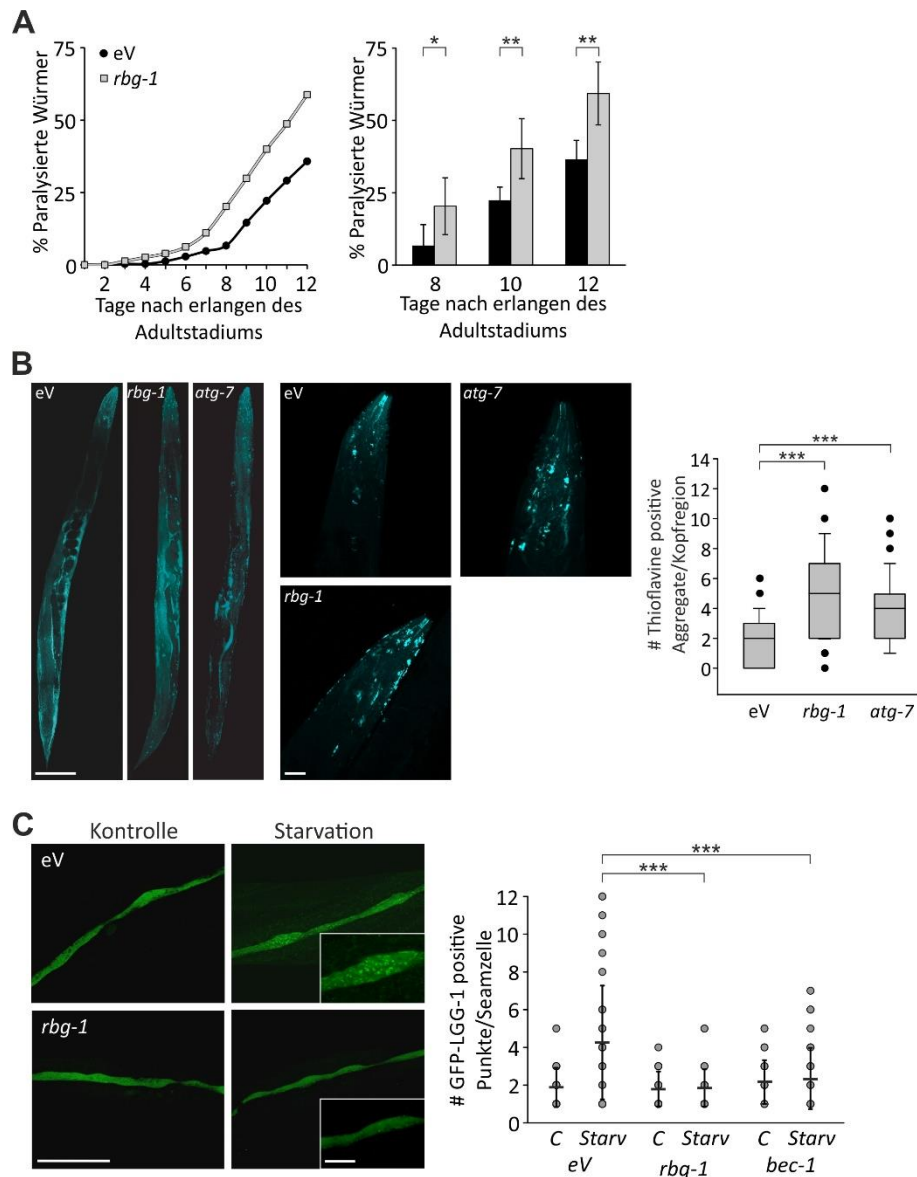
Der genaue zelluläre Prozess, der alle vier Proteine verbindet und die Entstehung des Syndroms erklären würde, ist bisher nicht aufgeklärt. Allerdings wurde gezeigt, dass der RAB3GAP-Komplex neben seiner Funktion als GAP für die RAB GTPase RAB3 auch als ein GEF für RAB18 fungiert (Gerondopoulos et al. 2014). Des Weiteren stellte Handley et al. (2015) die Hypothese auf, dass TBC1D20 womöglich ein GTPase aktivierendes Protein für RAB18 ist (Handley et al. 2015). Somit wurde das erste Mal eine regulatorische Verbindung zwischen RAB18, TBC1D20 und dem RAB3GAP-Komplex aufgezeigt. Der genaue molekulare Mechanismus, welcher diese vier Proteine verbindet ist allerdings noch nicht geklärt und auch nicht, wieso ein Funktionsverlust dieser Proteine diesen schwerwiegenden Phänotyp hervorruft.

Die zellulären Auswirkungen des Funktionsverlusts von RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB18 oder TBC1D20 wurden bisher ebenfalls noch nicht detailliert untersucht. Patientenzellen zeigen keine auffälligen zellulären Defekte. Der einzige bisher beschriebene Unterschied ist, dass Patientenzellen und auch embryonalen Maus Fibroblasten (MEFs) der *blind sterile mouse* einen auffälligen LD-Phänotyp aufweisen. So zeigten die Zellen im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle nach einer Behandlung mit Ölsäure vergrößerte LDs (Liegel et al. 2013; Park et al. 2014).

### **1.9. Vorarbeiten: Identifizierung von RBG-1 und RAB3GAP1/2 als positiver Autophagiemodulator**

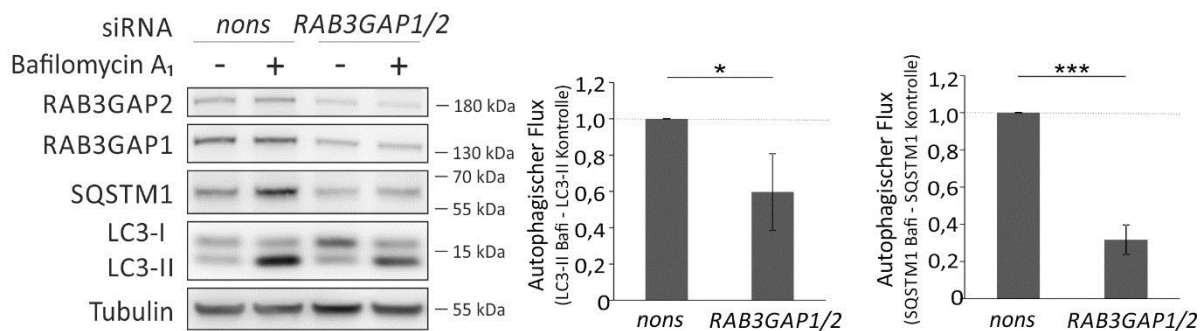
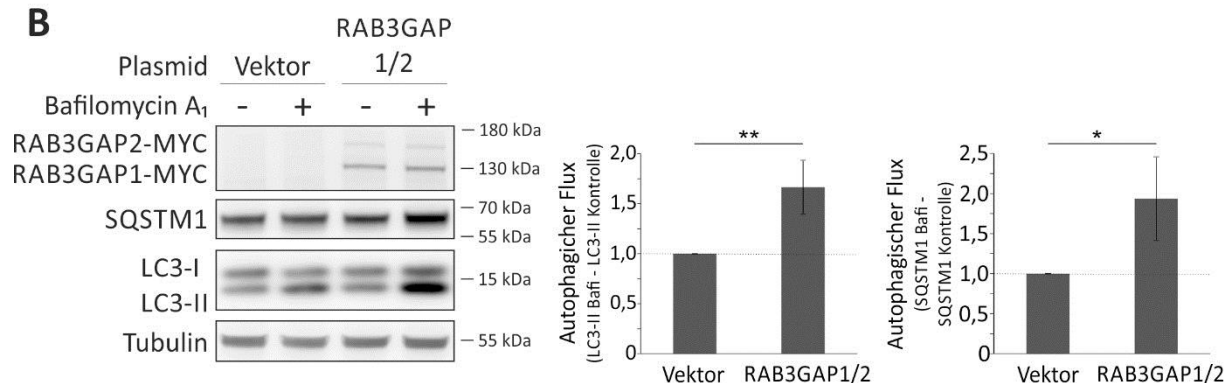
In einem RNAi-Screen in *C. elegans*, der neue Effektoren der Proteinhomeostase aufklären sollte, wurde RBG-1, das *C. elegans* Ortholog von dem Säugerprotein RAB3GAP1, als ein funktioneller Faktor identifiziert. Der Verlust des Proteins durch RNAi-vermittelten *knockdown* führte zu einer verstärkten Proteinaggregation eines Reporterproteins, was mit einer Störung der Proteostase gleichzusetzen ist. Um den Einfluss von RBG-1 auf die Proteostase zu bestätigen, wurden Würmer untersucht, welche humanes A $\beta$ 42 (Amyloid  $\beta$  42) in Muskelzellen exprimieren. Diese Würmer sind durch eine zeitabhängige Paralyse gekennzeichnet, welche durch eine Akkumulation von A $\beta$ 42 Aggregaten in den Muskeln verursacht wird. Interessanterweise waren Würmer nach *knockdown* von *rbg-1* früher paralysiert als Kontrollwürmer und wiesen mehr Thioflavin-positive A $\beta$ 42 Aggregate auf. Dies zeigt deutlich, dass RBG-1 die zelluläre Proteostase beeinflusst (Abb. 12 A, B).

Aufgrund von massenspektroskopischen Analysen von Christian Behrends, in denen die humanen RAB3GAPs mit dem Autophagienetzwerk assoziiert wurden (Behrends et al., 2010), haben wir nachfolgend untersucht, ob auch RBG-1 funktionell mit der Autophagie verbunden ist. Hierfür wurden GFP-LGG-1 Würmer verwendet. LGG-1 ist das *C. elegans* Homolog zum Säuger MAP1LC3 (kurz LC3) und durch den GFP-Tag konnte das Protein im lebenden Wurm lokalisiert und autophagosomale Strukturen evaluiert werden. Diese konnten in Kontrollwürmern nach Induktion der Autophagie deutlich beobachtet werden, wohingegen der *knockdown* von *rbg-1* dies verhinderte. (Abb. 12 C). Dies deutet darauf hin, dass RBG-1 die Autophagie beeinflusst und ein positiver Modulator der Autophagie darstellt (Spang, Feldmann et al. 2014).



**Abbildung 12: RBG-1, das *C. elegans* Ortholog zu RAB3GAP1, beeinflusst Proteostase und Autophagie.** A) *rbg-1*-RNAi behandelte CL2006 Würmer paralisieren früher als Kontrollwürmer. B) Konfokale Aufnahmen von Thioflavin-gefärbten A $\beta$ 42 Aggregaten. Der RNAi-vermittelte *knockdown* von *rbg-1* und *atg-7* verstärkt die Aggregation von A $\beta$ 42 im Vergleich zu den Kontrollwürmern. C) Konfokale Aufnahmen von GFP-LGG-1 exprimierenden Würmern. LGG-1 ist das Homolog zu LC3 im Säuger und durch Induktion der Autophagie mittels *starvation* akkumulieren autophagosomale Strukturen in den Würmern. Durch die *rbg-1* RNAi-Behandlung hingegen ist die Autophagie gestört und es akkumulieren weniger autophagosomale Strukturen. (Spang, Feldmann et al. 2014)

Im Anschluss an die Studien mit *C. elegans* wurden diese Daten in humane Zelllinien überführt und gezeigt, dass RAB3GAP1 und RAB3GAP2 positive Modulatoren der Autophagie sind (Feldmann 2013, Diplomarbeit; Spang, Feldmann et al. 2014). (Abb. 13).

**A****B**

**Abbildung 13: RAB3GAP1 und RAB3GAP2 sind positive Modulatoren der Autophagie.** A) Western Blot Analyse der autophagischen Aktivität nach Herunterregulation von RAB3GAP1/2 im Vergleich zu *nonsense* (*nons*) transfizierten Kontrollzellen. Die Zellen wurden mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 4 - 12 % NuPAGE Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der mit Bafilomycin A<sub>1</sub> behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande und der Kontroll-DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande ermittelt. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 4$ ,  $t$ -Test. Dieselben Ergebnisse wurden auch nach einer Induktion der Autophagie mit Rapamycin gezeigt (Daten nicht gezeigt). B) Western Blot Analyse der Autophagie nach Überexpression von RAB3GAP1/2 im Vergleich zur Leervektor (Vektor) transfizierten Kontrolle. Die Zellen wurden mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 4 - 12 % NuPAGE Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II und SQSTM1 Bande und der Kontroll-DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande ermittelt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $t$ -Test. (Spang, Feldmann et al. 2014)

### 1.10. Zielsetzung

Als Bestandteil des Proteinhomöostasenetzes ist die Autophagie mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert (Morawe et al. 2012). Die immer genauere Charakterisierung des autophagischen Prozesses und die Aufklärung von beteiligten Genen und Proteinen sind von großer Bedeutung, um den Einfluss der Autophagie auf die Pathogenese von Erkrankungen zu verstehen und mögliche therapeutische Ansätze zu finden.

Der RAB3GAP-Komplex wurde bisher als Modulator der neuronalen Transmitter- und Neurohormonausschüttung beschrieben. Zudem führen Mutationen in der katalytischen als auch in der nicht-katalytischen Untereinheit des RAB3GAP-Komplexes zu einer fatalen Entwicklungsstörung mit schwerwiegenden neurologischen Störungen, dem WARBM Syndrom. Nachdem der RAB3GAP-Komplex in *C. elegans* und im Säugersystem mit der Proteostase und der Autophagie verknüpft werden konnte (Feldmann 2013, Diplomarbeit; Spang, Feldmann et al. 2014), soll in dieser Arbeit genauer untersucht werden, welcher molekulare Schritt der Autophagie durch die RAB3GAPs moduliert wird. Aufgrund der genetischen Verbindung von RAB3GAP1/2, der RAB GTPase RAB18 und dem RAB GAP TBC1D20 mit dem WARBM Syndrom sollte zudem der Einfluss der von RAB18 und TBC1D20 auf die Autophagie untersucht werden. Bisher konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen allen vier Proteinen und deren Rolle für die Entstehungen des Syndroms nicht aufgeklärt werden. Hier sollte nun mit der Autophagie ein molekularer Mechanismus aufgezeigt werden, der alle vier Proteine funktionell verbindet. Als zelluläre Modellsysteme wurden in dieser Arbeit primäre humane IMR90 Fibroblasten verwendet. Zudem wurden Patientenzellen des WARBM Syndroms, mit Mutationen in RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20, untersucht und stabile HeLa *CRISPER/Cas9 knockout* Linien für RAB18, RAB3GAP1 und TBC1D20 hergestellt und diese als Krankheitsmodell charakterisiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

<b>Zellbiologie</b>	
Absaug-System VacuSafe	Integra, Fernwald
Amara Nucleofector Maschine	Lonza, Wuppertal
Inkubatoren	Binder, Tuttlingen
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Zählkammer Neubauer-Improved	Optik Labor
Zentrifuge: Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

<b>Proteinbiochemie</b>	
Amersham Imager 600	GE Healthcare Life Science, Freiburg
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Heizblock: Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenlesegerät; Multiscan RC	Thermo Labsystem, Ulm
Mini protean III Western Blotting system	BioRad, München
Netzteil Powerpac 300	BioRad, München
Laserscanning-Mikroskop: LSM 710	Zeiss, Göttingen
LAS-3000 Intelligent Dark Box	Fuji, Düsseldorf
SDS-PAGE-System, Mini-PROTEAN® 3 Cell	BioRad, München
Sonifikator Micro Ultrasonic Cell Disrupter	Fisher, Schwerte
Western Blot System, Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München
Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad, München
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tutlingen

<b>Molekularbiologie</b>	
Agarosegelkammer, Agagel-Mini Biometra	Biometra, Göttingen
Bakterienschüttler	Bioteck
iCycler	BioRad, München
iQ Real-Time-PCR Thermozykler	BioRad, München
PCR DNA Thermozykler	Biometra, Göttingen
Sub-CellGT Agarose Gel Elektrophorese System	BioRad, München
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

<b>Allgemeines</b>	
Dampfsterilisator VarioClav	H+P, Oberschleißheim
Geferierschränke (-20°C)	Liebherr, Kirchdorf
Geferierschränke (-80°C)	Heraeus, Hanau
Kühlschränke 4 °C	Liebherr, Kirchdorf
Magnetrührer	IKA, Staufen
pH-Meter C6825	Schott, Mainz
Schüttler	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VWR, Radnor/USA

### 2.1.2. Chemikalien und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen A. Hartenstein (Würzburg), AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Difco (Detroit/USA), Gibco (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), LC Laboratories (Woburn/USA), Merck (Frankfurt a. M.), New England BioLabs (Frankfurt a. M.), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Die Chemikalien wurden nach den Angaben der Hersteller aufbewahrt und verwendet.

### 2.1.3. Antikörper

#### Primärantikörper für *Western Blot* Analyse

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
ATG3	Kaninchen	1:500	Cell signaling, Frankfurt a.M.
ATG16L1	Maus	1:500	MBL, Wobrun/USA
CALCOCO2	Kaninchen	1:500	Sigma Aldrich, Deisenhofen
GABARAP	Maus	1:500	MBL, Wobrun/USA
LC3B	Kaninchen	1:500	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Myc	Maus	1:500	Clontech, Mountain View/USA
NBR1	Maus	1:500	Abcam, Cambridge/UK
SQSTM1/p62	Meerschweinchen	1:500	Progen, Heidelberg
RAB18	Kaninchen	1:500	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RAB18	Kaninchen	1:500	Proteintech, Manchester/UK
RAB3GAP1	Kaninchen	1:500	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RAB3GAP2	Kaninchen	1:500	Sigma Aldrich, Deisenhofen
TBC1D20	Kaninchen	1:500	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tubulin	Maus	1:1000	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ubiquitin	Kaninchen	1:500	Dako, Waldbronn

#### Sekundärantikörper für *Western Blot* Analyse

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
anti- Kaninchen; HRP gekoppelt	Esel	1:5000	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK
anti-Maus; HRP gekoppelt	Esel	1:5000	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK
Anti-Meerschweinchen; HRP-gekoppelt	Esel	1:5000	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK

**Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
<b>Primärantikörper</b>			
ATG5	Kaninchen	1:200	Novus biologicals, Littleton/USA
CLIMP36	Maus	1:200	Enzo, Lörrach
GM130	Maus	1:200	BD Biosciences, Heidelberg
HA	Maus	1:200	Cell signaling, Frankfurt a.M.
LC3B	Maus	1:200	Nano Tools, Tenningen
PLIN2	Maus	1:200	Progen, Heidelberg
RAB3GAP1	Kaninchen	1:200	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RAB18	Kaninchen	1:200	Sigma Aldrich, Deisenhofen
SQSTM1/p62	Meerschweinchen	1:200	Progen, Heidelberg
TBC1D20	Kaninchen	1:200	Sigma Aldrich, Deisenhofen
<b>Sekundärantikörper</b>			
anti-Meerschweinchen Dylight-488 gekoppelt	Esel	1:200	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK
anti- Maus Carbocyanin 3 (Cy3) gekoppelt	Esel	1:200	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK
anti- Kaninchen Carbocyanin5 (Cy5) gekoppelt	Esel	1:200	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK
<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>			
BODIPY 493/503	Fluoreszenzfärbung von Lipidtropfen	Invitrogen, Carlsbad/USA	
DAPI	Fluoreszenzfärbung von Nuclei	Calbiochem, Darmstadt	
DPH	Fluoreszenzfärbung von Lipidtropfen	Sigma Aldrich, Deisenhofen	

**2.1.4. Zelllinien**

Für diese Doktorarbeit wurden kommerziell erhältliche primäre humane IMR90 Fibroblasten verwendet (Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA). Diese stammen aus dem Lungengewebe eines 16 Wochen alten klinisch normalen weiblichen Fötus und wurden 1975 entnommen (Nichols *et al.*, 1977). Zusätzlich wurden humane HeLa Zellen verwendet. Diese Zellen stammen aus einer Gewebeprobe, des Zervixkarzinom der Patientin Henrietta Lacks und wurden 1951 entnommen (Landry *et al.* 2013). Die HeLa Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Mark Handley (MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh) zur Verfügung gestellt. Sie wurden zur Generierung stabiler RAB18 und RAB3GAP1 *knockout* Linien mittels des *CRISPR/Cas9*-System (siehe 2.2.3.1.10) verwendet. TBC1D20 *knockout* Zellen, ebenfalls mittels *CRISPR/Cas9*-System hergestellt, wurden von Dr. Mark Handley zur Verfügung gestellt.



### 2.1.5. Bakterienstamm

Stamm	Genotyp
<i>DH5α</i> (New England BioLabs, Frankfurt a.M.)	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>

### 2.1.6. Oligonukleotide

#### 2.1.6.1. siRNA

siRNA	Sequenz
ns siRNA	5'-AUUCUC CGAACGUG CACG-3'
siATG3-a	5'-GAUGGAAUUAUUCAGAUGAA-3'
siATG3-b	5'-UGUAAUGAAGAGAGCAUAA-3'
siATG16L1-a	5'-UCUGGACUGUGGAUGAUUA-3'
siATG16L1-b	5'-CUGGUGAUUGACCUCAAUA-3'
siRAB3GAP1a	5'-UCAGUACACUCACUUAUCA-3'
siRAB3GAP1b	5'-UCAUUCACCAGAUUACU-3'
siRAB3GAP2-1	5'-UGACUUGGCUCUGUUACUA-3'
siRAB3GAP2-2	5'-UGAACCAAGAACCUGAA-3'
siRAB18-a	5'-UGUCACAAGAAGAGAUACA-3'
siRAB18-b	5'-AAUCGUGAAGUCGAUAGAA-3'
siTBC1D20-a	5'-AUAGUUCUCAUCAGAAGGA-3'
siTBC1D20-b	5'-AGAACUGAUUGACAUCAUC-3'

#### 2.1.6.2. Plasmide

Plasmid	Resistenz	Verwendung	Bezugsquelle
<i>pEGFP-C1-hATG3</i>	Kanamycin	Überexpression von ATG3	Prof. Dr. Ivan Dikic (Institut für Biochemie II, Goethe Universität Frankfurt am Main)
<i>pCl neo-Myc Rab3Gap p130</i>	Ampicillin	Überexpression von RAB3GAP1	Prof. Dr. Takuya Sasaki (Institut für Biochemie, Universität Tokushima)
<i>pCl neo-Myc Rab3Gap p150</i>	Ampicillin	Überexpression von RAB3GAP2	Prof. Dr. Takuya Sasaki (Institut für Biochemie, Universität Tokushima)
<i>RAB3GAP1-R728A</i>	Kanamycin	Überexpression von mutantern GAP-inaktivem RAB3GAP	Site directed mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara/USA)
<i>p-N1</i>	Kanamycin	Leervektor	Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin Mainz; AG Behl
<i>pCMV-HA-C</i>	Kanamycin	Leervektor	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/FR
<i>pCMV-HA-N</i>	Kanamycin	Leervektor	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/FR
<i>pCMV-HA-RAB18</i>	Kanamycin	Überexpression RAB18	Kloniert (siehe 2.2.2.1)

## Material und Methoden

Plasmid	Resistenz	Verwendung	Bezugsquelle
pCMV-HA-RAB3GAP1	Kanamycin	Überexpression RAB3GAP1	Kloniert (siehe 2.2.2.1)
pCMV -TBC1D20-HA	Kanamycin	Überexpression TBC1D20	Kloniert (siehe 2.2.2.1)
RAB18 mCherry	Kanamycin	Überexpression von RAB18	Dr. Mark Handley (MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburg
pEGFP-N1_G85R-SOD1	Kanamycin	Überexpression von mutantem SOD <sup>G85R</sup>	Institut für Pathobiochemie , Universitätsmedizin Mainz; AG Behl

## 2.1.6.3. Primer für die Real Time PCR-Analyse

Primer	Sequenz
<i>atg-3 for</i>	5'-GATGGCGGATGGGTAGATACA-3'
<i>atg-3 rev</i>	5'-TCTTCACATAGTGCTGAGCAATC-3'
<i>atg-4B for</i>	5'-ATGGACGCAGCTACTCTGAC-3'
<i>atg-4B rev</i>	5'-TTTTCTACCCAGTATCCAAACGG-3'
<i>atg-7 for</i>	5'-TGGAACAAGCAGCAAATGAG-3'
<i>atg-7 rev</i>	5'-AGACAGAGGGCAGGATAGCA-3'
<i>atg-16L1 for</i>	5'-ATGCGCGGATTGTCTCAGG-3'
<i>atg-16L1 rev</i>	5'-GTCCACTCATTACACATTGCTCT-3'
<i>atg-16L2 for</i>	5'-TCTGAGGTCAATGCTGTTTCG-3'
<i>atg-16L2 rev</i>	5'-AGGGGTCAAAGTCCACACTG-3'
<i>map1lc-3A for</i>	5'-AACATGAGCGAGTTGGTCAAG-3'
<i>map1lc-3A rev</i>	5'-GCTCGTAGATGTCCGCGAT-3'
<i>map1lc-3B for</i>	5'-CTGTTGGTGAACGGACACAG-3'
<i>map1lc-3B rev</i>	5'-CTGGGAGGCATAGACCATGT-3'
<i>nbr-1 for</i>	5'-GTTGCTGCCTCTGCATACAA-3'
<i>nbr-1 rev</i>	5'-TTTCTTCAGCAGCCGTAGGT-3'
<i>ndp-52/calco2 for</i>	5'-GTGGAAGACAACCCGTGAGT-3'
<i>ndp-52/calco2 rev</i>	5'-TTCTGGACGGAATTGGAAAG-3'
<i>p62/SQSTM-1 for</i>	5'-GACTACGACTTGTGTAGCGTC-3'
<i>p62/SQSTM-1 rev</i>	5'-AGTGTCCGTGTTTACCTTCC-3'
<i>rab3A for</i>	5'-ACTGGTCCACCCAGATCAAG-3'
<i>rab3A rev</i>	5'-CCACGTTCTGATGATGACACCAC-3'
<i>rab3B for</i>	5'-GAGAGGGTTGTTCCCACTGA-3'
<i>rab3B rev</i>	5'-AAAGGCCTGCCTTACACTGA-3'
<i>rab3C for</i>	5'-ATCTGCATTGTCAGCACAG-3'
<i>rab3C rev</i>	5'-TGTATCTTTCTGGCCTGCT-3'
<i>rab3D for</i>	5'-TACTGTGGGCATCGATTCA-3'
<i>rab3D rev</i>	5'-TCCTGATTGGCGATGTCATA-3'
<i>rab3gap-1 for</i>	5'-TCTCAGCGAATCTAAGTGCAAC-3'
<i>rab3gap-1 rev</i>	5'-AGCAGACCTGATAAGTGAGTGTA-3'
<i>rab3gap-2 for</i>	5'-TGCTTGTGCGAAATCAGGTAGC-3'
<i>rab3gap-2 rev</i>	5'-GACATGGCAGGTGGACTATTTT-3'
<i>rpl-19 for</i>	5'-GAAATCGCCAATGCCAACTC-3'
<i>rpl-19 rev</i>	5'-TTCCTTGGTCTTAGACCTGCG-3'

#### 2.1.6.4. Primer für PCR

Primer	Sequenz
<i>RAB18 for</i>	5'-CGAGTCGACGATCATGGACGAGGACGTGCTAAC-3'
<i>RAB18 rev</i>	5'-CCTAGATCTTCGTTATAACACAGAGCAATAACCACC-3'
<i>RAB3GAP1 for</i>	5'-GCGGTCGACGGCTATGGCTGCCGACAGTGAGC-3'
<i>RAB3GAP1 rev</i>	5'-CGCGGTACCCGCTCAGAAGAAGGAAGTATCTGATG-3'
<i>TBC1D20 for</i>	5'-CCTGTGACTCCATGGCCCTCCGGAGTGCG-3'
<i>TBC1D20 rev</i>	5'-TAAGGTACCCGCGGGAAACAGCTGCAGCTGAA-3'

Restriktionsenzym	Sequenz
Sall	5'-GTCGAC-3'
BglII	5'-AGATCT-3'
KpnI	5'-GGTACC-3'

#### 2.1.7. EDV-Programme

Programm	Verwendung
AIDA Image Analyzer v.4.26	Densitometrische Auswertung
Clone manager	Primer-Design
CorelDRAW X6	Bildbearbeitung
Image J v. 1.4.6	Bildbearbeitung
Photoshop CS5	Bildbearbeitung
REST2009	Auswertung der <i>Real Time PCR</i>
SigmaStat Version 3.5	Statistische Auswertung
ZEN 2011 SP2 (black edition) Version 8.0	Aufnahmen Laser-Scanning-Mikroskop

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Bakterienanzucht

Bakterien wurden in Flüssig- oder Plattenkultur herangezogen. LB-Flüssigkulturen, denen das entsprechende Antibiotikum zugefügt wurde, wurden zur Amplifikation von Plasmiden verwendet. LB-Plattenkulturen, die ebenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurden, dienten dem Vereinzeln von Bakterienklonen, was z.B. nach einer Transformation nötig war.

#### **LB-Medium:**

Bacto-Trypton	1 % [w/v]
Hefeextrakt	0,5 % [w/v]
NaCl	1 % [w/v]

Das Medium wurde nach der Herstellung autoklaviert.

Für die Platten-Kultur wurde zusätzlich 1,5 % Agar zu dem LB-Medium hinzugefügt.

Die entsprechenden Antibiotika wurden, in der erforderlichen Endkonzentration, nach Abkühlen des Mediums auf 50 °C, hinzugefügt.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

#### 2.2.1.2. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

Plasmide wurden in Bakterien mittels Hitzeschocktransformation vermehrt. Hierfür wurden chemisch-kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien vom Stamm *DH5α* (New England BioLabs, Frankfurt a. M.) verwendet. 25 µl Bakteriensuspension wurden auf Eis aufgetaut und 300 - 600 ng der entsprechenden Plasmid DNA hinzugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis, folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien für 2 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien mit 250 µl LB-Medium versetzt und für etwa 60 min bei 37 °C geschüttelt.

75 - 100 µl der transformierten Bakterien wurden auf vorgewärmte Antibiotikum-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten. Danach wurden die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Durch das zugegebene Antibiotikum wuchsen nur Bakterienklone, welche erfolgreich transformiert waren, da nur diese die entsprechende Antibiotikateranz aufwiesen.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1. Klonierung

Um die Proteine RAB18, RAB3GAP1 und TBC1D20 in eukaryotischen Zellen in erhöhtem Spiegel zu exprimieren, wurden diese in den Expressionsvektor pCMV-HA-N (RAB18, RAB3GAP1) bzw. pCMV-HA-C (TBC1D20) kloniert. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Arbeitsschritte der Klonierung beschrieben, die mit Hilfe von Frau Huesmann (AG Behl) durchgeführt wurden.

#### 2.2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*) wurden spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert. Der zu amplifizierende Abschnitt wird am Anfang und am Ende von zwei kurzen Primern (*forward*-, *reverse*-Primer) flankiert. Die verwendeten Primer (siehe 2.1.6.4) wurden von Eurofins-MWG-Operon bezogen. Durch die Verwendung einer DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) wurde, ausgehend von an dem DNA-Einzelstrang gebunden Primern, jeweils komplementäre Stränge synthetisiert und durch mehrere Zyklen der Reaktion die gewünschte Sequenz exponentiell vervielfältigt. Zur Amplifizierung von RAB18, RAB3GAP1 und TBC1D20 wurde ein humaner cDNA-Pool (*complementary DNA*) verwendet und die PCR-Reaktion auf Eis pipettiert.

#### Restriktion

Humane cDNA	1 µl
<i>High-Fidelity-Buffer</i> (5X)	10 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol)	1 µl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase</i> (2000 U / ml)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem Reaktionsansatz von 50 µl angesetzt.

Reaktionsschritt	
1. Initiale Denaturierung	98 °C, 22 sec
2. Denaturierung der DNA	98 °C, 10 sec
3. Anlagerung der Primer	60 °C, 20 sec
4. Elongation	72 °C, 1000 bp / 30 sec, 27 Zyklen von Schritt 2 - 4
5. Finale Elongation	72 °C, 5 min
6. Pause	4 °C, ∞

### 2.2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Durch die negative Ladung der DNA ist es möglich diese mittels Gelelektrophorese in Abhängigkeit ihrer Größe aufzutrennen. Als Trennmatrix wurden 1 % Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und anschließend 2 Tropfen Ethidiumbromid (*Dropper Bottle*, Sigma-Aldrich) zu der noch flüssigen etwas abgekühlten Agarose gegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann mit UV-Licht angeregt werden, was der Visualisierung der DNA-Banden im Gel dient. Als Größenmarker wurde der *MassRuler™ DNA Ladder* von Fermentas verwendet und die Proben mit 6x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 50 mA. Durch eine möglichst kurze Anregung von Ethidiumbromid mittels UV-Licht, wurde die entsprechende DNA-Bande mit einem Spatel ausgeschnitten. Um DNA Schäden zu vermeiden wurde dabei die Belastung mit UV-Licht möglichst kurz gehalten.

#### 1x TAE-Puffer:

Tris-Base	40 mM
Na-Acetat	20 mM
EDTA	1 mM

### 2.2.2.1.3. Gelextraktion

Zur Extraktion der DNA aus dem ausgeschnittenen Gel wurde das *NucleoSpin® Extract II*-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Das ausgeschnittene Gelstück wurde hierfür gewogen und nach Angaben des Herstellers die DNA extrahiert.

### 2.2.2.1.4. DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Für die Ligation wurde, sowohl der Leervektor pCMV-HA-N bzw. pCMV-HA-C, als auch die extrahierten DNA-Konstrukte mit identischen Restriktionsendonukleasen restringiert. Damit wurde sichergestellt, dass beide Ligationsedukte komplementäre Enden aufweisen und so eine spezifische Ligation gewährleisten. Die Restriktionsreaktion wurde wie folgt pipettiert und anschließend für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

#### Restriktion

Leervektor (pCMV-HA-N bzw. pCMV-HA-C)	1000 ng
bzw. Extrahierte DNA Konstrukte	~ 500 ng
CutSmart Buffer (10X)	2 µl
Restriktionsenzym I	1 µl
Restriktionsenzym II	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 20 µl

#### **2.2.2.1.5. Ligation zweier DNA-Fragmente**

Für die Ligation wurden der Vektor und das DNA-Konstrukt im Mengenverhältnis 2:1 eingesetzt. Die Ligation wurde mit Hilfe des *Rapid DNA Ligation Kits* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.2.2.1.6. Sequenzierung**

Zur Kontrolle der hergestellten Konstrukte wurden diese bei Eurofin-MWG-Operon (Ebersberg) sequenziert. Hierfür wurden die Plasmide entsprechend der Vorgaben verdünnt und mit Sequenzierungsprimer versetzt und eingeschickt.

#### **2.2.2.2. Plasmidpräparation**

Die Amplifikation der generierten Plasmide fand in den transformierten Bakterien statt, die auf einer LB Antibiotikum Platte ausgestrichen wurde.

Ein Bakterienklon wurde in 250 ml LB-Medium, dem geeigneten Antibiotikum, bei ausreichender Sauerstoffzufuhr unter Schütteln bei 37 °C über Nacht kultiviert. Mittels Zentrifugation wurden die Bakterien am nächsten Tag pelletiert und das Plasmid mit Hilfe des *NucleoSpin® Plasmid Kit* (Macherey&Nagel, Düren) nach Vorgabe des Herstellers isoliert. Die Reinheit und Konzentration wurden photometrisch bestimmt und das isolierte Plasmid für die kurzfristige Lagerung bei 4 °C und für die längerfristige Lagerung bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.2.3. Gewinnung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen**

Die Gewinnung der Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurde mit dem RNA Miniprep Kit der Firma Agilent Technologies (Santa Clara/USA) durchgeführt und nach deren Vorgaben durchgeführt. Das Kit erlaubt die phenol-/chloroformfreie Gewinnung von RNA über ein Silikat-Säulenprinzip. Die Gefahr einer DNA-Kontamination wurde durch eine zusätzliche Behandlung mit DNase bei 37 °C verringert und die gewonnene RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA basiert auf der Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm. Die Messung wurde in Quarzküvetten gegen destilliertes Wasser als Nullwert durchgeführt und die Konzentration der Nukleinsäuren durch das Lambert-Beer-Gesetz ermittelt.

Lambert-Beer-Gesetz:  $E\lambda = \epsilon\lambda * c * d$

$E\lambda$  = Extinktion[nm]  
 $\epsilon\lambda$  = molarer Extinktionskoeffizient [L/mol\*cm]  
 $c$  = Konzentration der absorbierenden Flüssigkeit [mol/l]  
 $d$  = Weglänge des Lichtes [cm]

#### 2.2.2.5. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) lässt sich RNA in cDNA (*complementary DNA*) umschreiben. Die reverse Transkription wurde mit dem Omniscript® RT-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Um die Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren wurden 1000 ng Gesamt-RNA auf 10 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Zur Verhinderung einer Renaturierung der RNA wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Zu jeder Probe wurden 10 µl des Mastermixes zugegeben und anschließend bei 37 °C für 60 min inkubiert. Für den Nachweis auf Kontaminationen mit genomischer DNA wurde parallel eine Kontrolle (Mock) durchgeführt, welche keine Reverse Transkriptase enthielt. Die gewonnene cDNA wurde entweder sofort für eine quantitative *Real-Time-PCR* (siehe 2.2.2.6) eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

##### **Mastermix RT-PCR**

10x RT-Puffer	2 µl
5 mM dNTPs	2 µl
10 µmol Oligo-dT15-Primer	2 µl
RNAse-Inhibitor RNAsin (10 U/ ml)	0,25 µl
Reverse Transkriptase (4 U / ml)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,75 µl

#### 2.2.2.6. Quantitative *Real-Time-PCR* Analyse (*qPCR*)

Mittels der *quantitativen Real Time PCR* Analyse wurde die Genexpression sensibel quantifiziert. In der PCR-Reagenzmischung lagen 2x PCR-Puffer, dNTPs sowie Taq-Polymerase vor. Im Anschluss an eine 15-minütige Denaturierung/Aktivierung bei 95 °C wurden 35 PCR-Zyklen (je 20 sec bei 95 °C, 20 sec bei 60 °C und 30 sec bei 72 °C) durchgeführt. Aus den gewonnenen Amplifikationskurven wurde der Zyklus („*Threshold Cycle*“,  $C_t$ ) ermittelt, welcher nach der Amplifikation des PCR-Produktes in die



exponentielle Phase übergang. Durch die Analyse der Schmelzkurve am Ende der PCR wurde die Spezifität der Reaktion bestätigt. Als Referenzgene dienten *rpl-19* und *b2m*, welche nicht durch die entsprechenden Behandlungen reguliert waren. Die relativen Genexpressionsspiegel wurden mit der Software „*relative expression software tool (REST 2009; Quiagen, Hilden)*“ ermittelt.

#### Mastermix qPCR

cDNA	1 µl
SYBR Green Supermix	12,5 µl
<i>forward</i> -Primer 10 pmol	0,5 µl
<i>reverse</i> -Primer 10 pmol	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

#### 2.2.2.7. Human Autophagy Primer Library

Die *Human Autophagy Primer Library* wurde über Biomol (Hamburg, HATPL-1) erworben. Die *Library* wurde nach Herstellerangaben angesetzt und einem Volumen von 1 µl in 96-well Platten aliquotiert und bis zur Analyse mittels *Real Time PCR* Analyse bei -20 °C gelagert. Eine Liste der verwendeten Primer ist im Anhang unter 8.2 zu finden.

Für die Analyse der HeLa *knockout* Linien wurde ein selbst designtes *Autophagy Array* zusammengestellt. Die Primer wurden bei Eurofins-MWG-Operon (Ebersberg) bestellt und nach Hersteller Angaben angesetzt. Die Primer wurden anschließend auf die gewünschte Konzentration verdünnt, in 96-well Platten aliquotiert und bis zur *qPCR* Analyse bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Primersequenzen und das Pipettierschema der 96-well Platten sind im Anhang unter 8.3 und 8.4 zu finden.

#### 2.2.2.8. Einfügen von Punktmutationen in RAB3GAP1

Im Zuge dieser Arbeit wurde in RAB3GAP1 eine Punktmutation eingefügt (RAB3GAP1(R728A)). Die Mutationsreaktion wurde mit dem *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent, Waldbronn) nach Hersteller Angaben durchgeführt. Die zu mutierende Aminosäure lag ungefähr in der Mitte des Primers und das Basentriplet kodierte für ein Alanin anstelle eines Arginins.

### 2.2.3. Zellbiologische Methoden

#### 2.2.3.1. Kultivierung von IMR90 Fibroblasten und HeLa Zellen

##### 2.2.3.1.1. Inkulturnahme der Zellen

Zur Kultivierung wurden die zuvor in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und daraufhin unmittelbar in 5 ml des entsprechenden Kompletmediums überführt. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen, wurden die Zellen bei 311 g für 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kompletmedium resuspendiert und die Zellzahl der IMR90 Fibroblasten mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. Hierfür wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau versehen, um tote Zellen anzufärben und aus der Bestimmung der Zellzahl ausschließen zu können.

Die Zellzahl errechnete sich aus:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{Mittelwert lebender Zellen der 4 Großquadrate} \times 2 \times 10^4.$$

2 entspricht dem Verdünnungsfaktor mit Trypanblau und  $10^4$  dem Umrechnungsfaktor auf 1 ml.

Die gewünschte Zellzahl (300.000 – 500.000 Zellen) wurde anschließend in 10 cm Zellkulturschalen überführt, in denen die Zellen in 10 ml Kompletmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert wurden.

Die HeLa Zellen wurden auf drei bis fünf 10 cm Zellkulturschalen überführt und ebenfalls in 10 ml Kompletmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Einen Tag nach dem Auftauen der Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Alle für die Kultivierung verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt.

##### **Kompletmedium IMR90:**

###### *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*

aktives fötales bovines Serum (FBS)	10 % [v/v]
Natriumpyruvat (100x)	1 % [v/v]
Antibiotika (100x)	1 % [v/v]
nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	1 % [v/v]

##### **Kompletmedium HeLa:**

###### *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*

inaktives fötales bovines Serum (FBS)	10 % [v/v]
Natriumpyruvat (100x)	1 % [v/v]
Antibiotika (100x)	1 % [v/v]

### 2.2.3.1.2. Kultivierung der Zelllinien

Für die Kultivierung wurden Zellen jeden zweiten bis dritten Tag passagiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kulturen generell nicht über eine Konfluenz von 80 % wuchsen. Zur Passage wurden die Zellen mit 1x PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung „*phosphate buffered saline*“, Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen und anschließend etwa 2 min bei 37 °C mit 1x Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt, um die adhären Zellen von der Zellkulturschale zu lösen. Anschließend wurden sie Zellen mit der dreifachen Menge an Komplettmedium aufgenommen und für 4 min bei 311 g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Komplettmedium resuspendiert. Mittels Zählkammer wurde die Zellzahl der IMR90 Fibroblasten ermittelt und die gewünschte Zellzahl (350.000 – 500.000 Zellen) in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

Für HeLa Zellen, welche direkt für Experimente ausgesät wurden, wurde die Zellzahl ebenfalls mittels Zählkammer bestimmt und die entsprechende Zellzahl verwendet (10 cm Kulturschale: 330000 Zellen; 6 cm Kulturschale: 110000 Zellen; 24-well Platte: 11000 Zellen). Für die Standardkultur wurden die HeLa Zellen gemäß einem Verdünnungsfaktor ausgesät (1:5 – 1:20).

#### 1x PBS (pH 7,4):

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

### 2.2.3.1.3. Bestimmung der Populationsverdopplungslevel bei IMR90 Fibroblasten

Zur Bestimmung des aktuellen Populationsverdopplungslevels (PDL) der IMR90 Kultur wurde diese bei jeder Passage mit folgender Rechnung ermittelt:

$$PDL = (\log C_h - \log C_s) / \log (2)$$

Dabei entspricht  $C_h$  der Lebendzahl der geernteten Zellen und  $C_s$  der zuvor ausgesäten Zellzahl.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (s. 2.2.3.1.1).

#### 2.2.3.1.4. Langfristige Aufbewahrung der Zellen

Für die langfristige Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden subkonfluente Zellen von der Zellkulturschale mittels Trypsin abgelöst. Im Fall von IMR90 Fibroblasten wurde zunächst der aktuelle PDL ermittelt. Mittels Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und in 1 ml Kulturmedium mit DMSO (1:10) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer isopropanol-haltigen Einfrierbox langsam auf -80 °C eingefroren und am Folgetag zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 2.2.3.1.5. Transfektion der Zellen

Die Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Durch einen elektrischen Impuls wurde die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert, wodurch Oligonucleotide und Plasmide in die Zelle eingeschleust werden. Die Zellen wurden zunächst wie in 2.2.3.1.2 beschrieben trypsiniert, gezählt und zentrifugiert.

Die gewünschte Zellzahl (IMR90 Fibroblasten: 350000 Zellen für *knockdown* Experimente, 450000 Zellen für Überexpressionsexperimente / 6 cm Schale; HeLa Zellen: 350000 / 6 cm Schale) wurde in 400 µl Elektroporationspuffer resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt, in welcher die entsprechenden siRNA Oligonucleotide (30 - 60 µg) oder Plasmide (10 - 30 µg) vorgelegt waren. Die Elektroporation wurde in der Amaxa Nucleofactor System Maschine (Lonza, Wuppertal) mit dem Programm U-24 durchgeführt und die Zellen anschließend für 8 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen im entsprechenden Kompletmedium überführt und in 6 cm Kulturschalen ausgesät. 24 Stunden nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden 48 Stunden nach erfolgter Transfektion entsprechend behandelt und geerntet (siehe 2.2.3.1.6, 2.2.3.1.7, 2.2.3.1.8 und 2.2.4.1).

#### **Elektroporationspuffer:**

KCL	135 mM
CaCl <sub>2</sub>	200 µM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
EGTA	5 mM
HEPES (pH 7,3)	10 mM
aktives fötales Rinderserum (FBS)	25 %

### 2.2.3.1.6. Behandlung der Zelllinien zur Untersuchung der Autophagie

48 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die subkonfluenten Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Behandlungsmedium versetzt.

Zur Untersuchung der Autophagie wurden die Zellen mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin A<sub>1</sub> bzw. dem Induktor Rapamycin (LC Laboratories, Woburn/USA) behandelt. Bafilomycin A<sub>1</sub> wurde in einer Endkonzentration von 2 µM eingesetzt und Rapamycin in 10 µM. Als Kontrolle wurden parallel Zellen mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO inkubiert.

Nach 2 - 4-stündiger Behandlung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen, wie in 2.2.4.1 beschrieben, lysiert.

Eine weitere Möglichkeit Autophagie zu induzieren stellt das Hungern dar. Die Zellen werden hierbei in ein spezielles Hungermedium (EBSS Medium; Invitrogen, Karlsruhe) überführt, welches weder Serum, Glucose noch Aminosäuren beinhaltet. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 1 - 6 Stunden mit EBSS Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Analyse des autophagischen Fluxes wurden zusätzlich 2 µM Bafilomycin A<sub>1</sub> bzw. DMSO zum EBSS Medium hinzugefügt.

### 2.2.3.1.7. Behandlung der Zelllinien mit Ölsäure

Humane IMR90 Fibroblasten wurden 24 Stunden mit 400 µM BSA-gekoppelter Ölsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) behandelt, um die Bildung von Lipidtröpfchen zu induzieren. Hierfür wurden sie mit 1x PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Behandlungsmedium versetzt.

### 2.2.3.1.8. Behandlung von IMR90 Fibroblasten mit Canavanin

Canavanin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure und ein Analogon der Aminosäure Arginin (Abb. 14). Canavanin wird anstelle von Arginin während der Translation von Proteinen eingebaut (Ishida et al. 2013). Humane IMR90 Fibroblasten wurden mit 4 µM Canavanin für 4 und 8 Stunden behandelt. Vor der Behandlung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, anschließend das mit Canavanin versetzte Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für die entsprechende Zeit inkubiert. Zur Kontrolle wurde die entsprechende Menge an ddH<sub>2</sub>O zu den Zellen gegeben.

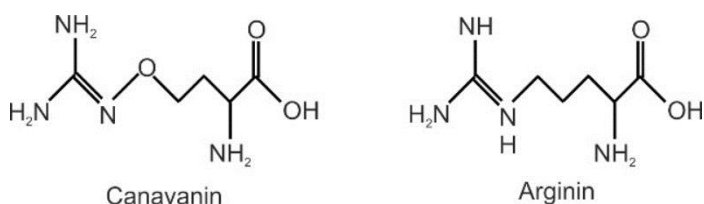


Abbildung 14: Chemische Strukturformel von Canavanin und Arginin.

### 2.2.3.1.9. Herstellung von HeLa *KO* Zellen mittels *CRISPR/Cas9*-System

Die verwendeten *CRISPR/Cas9* Konstrukte wurden über Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen und HeLa Zellen mit diesen Konstrukten über eine Elektroporation transfiziert (siehe 2.2.3.1.5). Im Anschluss wurden die Zellen in einer 96-well Platte vereinzelt und die positiven Klone über eine Puromycin Behandlung selektiert. Der erfolgreiche *knockout (KO)* wurde zum Schluss mittels Western Blot Analyse überprüft.

## 2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1. Proteinpräparation

Für die Proteinpräparation wurden Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1x Lysispuffer in der Zellkulturschale unter Verwendung eines Zellschabers abgelöst und lysiert. Das Lysat wurde anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und mit drei Pulsen für jeweils 5 sec bei mittlerer Sequenz sonifiziert. Zuletzt wurden die Präparationen für 5 min bei 95 °C inkubiert und bei -80 °C gelagert.

#### **3x Lysispuffer:**

Tris-HCL (pH 6,8)	187,5 mM
SDS	6 % (w/v)
Saccharose	30 % (w/v)
EDTA	3 mM

Der 1x Lysispuffer wurde durch Verdünnung mit H<sub>2</sub>O frisch hergestellt und zusätzlich stets Proteinaseinhibitor (Roche, Mannheim) hinzugegeben.

### 2.2.4.2. Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration wurde nach der BCA (Bicichinon-Säure) -Methode ermittelt und das Protokoll wie vom Hersteller (BioRad, München) beschrieben durchgeführt. Durch die Komplexbildung der Proteine mit Cu<sup>2+</sup> Ionen (*Biuret*-Reaktion) werden diese reduziert und bilden mit BCA einen violetten Farbkomplex. Die Absorption des Farbkomplexes kann photometrisch bestimmt und dadurch die Konzentration der eingesetzten Proteinlösung ermittelt werden.

Die Proteinproben wurden mit dem BCA-Reagenz versehen und bei 60 °C für 20 min inkubiert. Zur Quantifizierung wurde eine Rinderserumalbumin-Standardkurve erstellt, welche auf die gleiche Weise wie die Proteinproben behandelt wurde. Im Anschluss der Inkubation wurden alle Proben photometrisch bei 560 nm gemessen.

### 2.2.4.3. Western Blot Analyse

#### 2.2.4.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden 4 - 12 % NuPage Bis-Tris-Gradientengele (Invitrogen, Karlsruhe) oder 12 % Bis-Tris-gepufferte Acrylamidgele verwendet. Die Auftrennung erfolgte im NuPage System (Invitrogen, Karlsruhe) oder mit dem *Mini Trans-Blot Cell*-System.

Die Proteinproben wurden zunächst mit 4x Ladepuffer versetzt und 2 min bei 99 °C inkubiert. Durch das im Auftragspuffer enthaltenen  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS sowie das Aufkochen bei 99 °C denaturierten die Proteine. Zusätzlich wurden die Proteine durch die Bindung von SDS mit einer negativen Ladung „umhüllt“. Somit erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von ihrer Eigenladung. Als Proteingrößenstandard wurde der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1x NuPage MES Laufpuffer (Invitrogen, Karlsruhe) befüllt. Nach dem Beladen des Gels mit den Proteinproben wurden diese zunächst bei 80 - 100 V in das Gel einlaufen gelassen und danach bei 130 - 160 V aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für die *Western Blot* Analyse verwendet.

#### **Bis-Tris Gelpuffer:**

Bis-Tris (pH 6,8)	1,25 M
-------------------	--------

#### **4x Ladepuffer:**

Tris-HCl (pH 6,8)	200 mM
SDS	4 % [w/v]
Glycerin	40 % [v/v]
Bromphenolblau	0,2 % [v/v]
$\beta$ -Mercaptoethanol	200 $\mu$ l/ml

#### 2.2.4.3.2. Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels *Western Blot* Analyse

Im Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine werden durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Auf dieser Membran können die Proteine anschließend durch Antikörperbindung spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele zusammen mit der Nitrocellulosemembran, Filterpapier und Schwämmchen zu einer Transfereinheit zusammengebaut und in eine Blotkammer eingespannt. Die Blotkammer wurde mit 1x Transferpuffer befüllt. Die Übertragung der Proteine erfolgte über Nacht bei 30 V.

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran etwa 30 sec in eine Ponceau S-Färbelösung gelegt und anschließend mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Durch die reversible Bindung des Ponceau S an die Proteinbanden konnte die Qualität des Transfers überprüft werden.

#### **1x Transferpuffer:**

Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM
Glycerin	250 mM
Methanol	20 % (v/v)

#### **Ponceau S-Färbelösung:**

Ponceau S	0,02 % (w/v)
Trichloracetat	0,3 % (w/v)
Sulfosalicylsäure	0,3 % (w/v)

### **2.2.4.3.3. Immundetektion spezifischer Proteine**

Im Anschluss an den Transfer erfolgte der immunologische Nachweis der Proteine. Hierfür wurde die Membran zunächst für 1 – 2 Stunden in Blockierungspuffer auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Blockierung werden freie Bindungsstellen auf der Membran besetzt, um die Spezifität der nachfolgenden Antikörperbindung zu erhöhen.

Die Inkubation mit dem Primäantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primäantikörper wurden in 1x PBS/Tween-20 mit 0,02 % Natriumazid verdünnt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran innerhalb von 30 min regelmäßig mit 1x PBS/Tween-20 gewaschen und anschließend für 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem zugehörigen Peroxidase-konjugierten Sekundäantikörper inkubiert. Mittels der gekoppelten Meerrettichperoxidase (*horsredish peroxidase*, HRP) wurden die Proteine indirekt über die Peroxidase-reaktion detektiert. Alle Sekundäantikörper wurden 1:5000 in 1x PBS/Tween-20 verdünnt. Die Membran wurde abermals für 30 min regelmäßig mit 1x PBS/Tween-20 gewaschen und anschließend mit 1 ml ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Lösung benetzt. Das Chemilumineszenzsignal wurde mit dem Amersham Imager 600 aufgenommen.



## Material und Methoden

**1x PBS/Tween-20:**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,8 mM
Tween-20	0,05 % (v/v)

**Blockierungspuffer:**

Magermilchpulver in 1x PBS/Tween-20	5 % (w/v)
-------------------------------------	-----------

**ECL-Lösung:**Lösung A:

Tris-HCl (pH 8,6)	0,1 M
Luminol	0,025 % (w/v)

Lösung B:

para-Hydroxycommarinsäure in DMSO gelöst	0,11 % (w/v)
------------------------------------------	--------------

Lösung C:

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 %
-------------------------------	------

Für jede Membran wurden eine ECL-Lösung aus 1000 µl Lösung A, 100 µl Lösung B und 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frisch angesetzt.

**2.2.4.4. Densitometrische Auswertung der *Western Blots***

Um eine Quantifizierung der bei der Immundetektion von Proteinen erhaltenen Banden durchzuführen, wurde die Software AIDA (Bio Imaging) verwendet. Unter Berücksichtigung des Hintergrundes wurden die entsprechenden Banden densitometrisch ausgewertet und die ermittelten Werte in *Microsoft Excel* exportiert, wo sie relativ zueinander ausgewertet wurden. Die Analyse des Zytoskelettproteins Tubulin diente dabei als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinladung und wurde als Referenz in die Auswertungen der Banden einbezogen.

#### 2.2.4.5. Immunzytochemie

Mittels Immunozytochemie können Proteine *in situ* in Einzelzellen gefärbt werden. Dies ermöglicht z.B. ihre subzelluläre Lokalisation oder spezifische Protein-Protein-Interaktionen aufzuklären. Die Zellen wurden hierfür in entsprechender Anzahl ohne oder nach einer transienter Transfektion für die Immunofärbung auf Deckgläsern in 24-well Schalen unter Standardbedingungen kultiviert. Dabei wurden für IMR-90 Zellen nach siRNA-Behandlung 15000 Zellen pro well ausgesät und nach Überexpression 20000 Zellen pro well. Für die HeLa Zellen wurden nach transienter Transfektion 15000 Zellen pro well ausgesät und ohne Transfektion 10000 Zellen pro well. Als vorbereitender Schritt der Färbung wurden die Zellen zunächst 2-mal mit 1x PBS gewaschen und danach für 25 min mit 3,5 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde 3-mal mit 1x PBS gewaschen und daraufhin für 6 min mit -20 °C kaltem 90 %-igem Methanol behandelt. Dieser Schritt diente der Permeabilisierung der Membranen, um das spätere Eindringen der Antikörper zu gewährleisten. Nach weiteren 4 Waschschritten mit 1x PBS wurden die Deckgläser in eine Feuchtkammer auf Objektträger überführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3 % BSA in 1x PBS behandelt. Nachdem unspezifische Bindungsstellen blockiert waren, erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Hierfür wurden die Primärantikörper mit 1 % BSA in PBS in einer Verdünnung von 1:200 angesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Deckgläser gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen 3-mal mit 1x PBS gewaschen. Die entsprechenden Sekundärantikörper wurden in 1x PBS verdünnt auf die Deckgläser gegeben und ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Da es sich um einen fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper handelte, der Lichtsensitiv ist, wurde die Sekundärantikörperinkubation im Dunkeln durchgeführt. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen 2-mal mit 1x PBS gewaschen, um den ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit Eindeckmedium auf einen Objektträger überführt, mit Nagellack versiegelt und bei -20 °C gelagert.

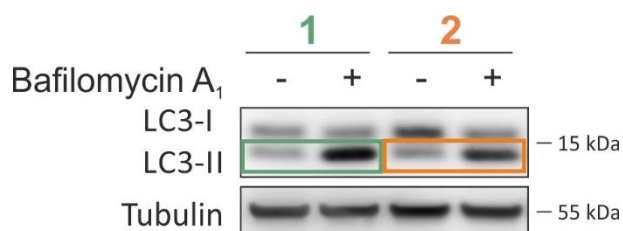
Die Aufnahmen der immunogefärbten Zellen erfolgten mittels konfokaler Mikroskopie mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM710 (Zeiss, Göttingen). Die nachfolgende Bearbeitung der Bilder erfolgte mit den Bildbearbeitungsprogrammen *ImageJ* und *Photoshop CS 5.1*. (Adobe).

#### **Eindeckmedium (pH 8,5):**

P-Phenylendiamin	1 mg/ml (Endkonzentration)
Glycerol	70 %
in 1x PBS	

### 2.2.4.6. Biochemische Analyse der autophagischen Aktivität

Die Bestimmung des autophagischen Fluxes ist eine etablierte Möglichkeit die autophagische Aktivität der Zelle zu untersuchen (Mizushima und Yoshimori 2007). Dabei wird der Umsatz von Autophagiesubstraten in einem bestimmten Zeitraum analysiert, indem durch Inhibition der lysosomalen Degradation der Abbau der Substrate verhindert wird. Die Differenz der Proteinspiegel nach Inhibition des Abbaus und unter basalen Bedingungen entspricht ihrem Flux und ist somit der autophagischen Aktivität gleichzusetzen (Abb. 15) (Mizushima et al. 2003a).



**Abbildung 15: Beispielhafte Analyse des autophagischen Fluxes am Beispiel von LC3.** Nach Ermittlung der optischen Bandenintensität und Nummierung auf Tubulin wurde die LC3-II Bande nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung mit der unbehandelten Kontrolle subtrahiert und der autophagische Flux ermittelt. In diesem Beispiel ist der autophagische Flux der Probe 2 (orange) im Vergleich zur Probe 1 (grün) verringert und somit auch die autophagische Aktivität der Probe 2 reduziert.

In dieser Arbeit wurde der autophagische Flux durch die Autophagiesubstrate LC3-II, GABARAP-II, SQSTM1, NBR1 und CALCOCO2 untersucht und der lysosomale Abbau mittels Bafilomycin A<sub>1</sub> geblockt. Bafilomycin A<sub>1</sub> inhibiert die Ansäuerung der Lysosomen, verhindert so die Bildung des Autolysosoms und damit den Abbau der Substrate (Yamamoto et al. 1998).

### 2.2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *SigmaStat* (SYSTAT). Alle Ergebnisse wurden mittels *t*-Test auf Signifikanz geprüft. Das Signifikanzniveau lag bei 5 %.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Funktionelle Charakterisierung der Autophagiemodulation von RAB3GAP1/2

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in einem RNAi-Screen in *C. elegans* nach neuen Modulatoren der Proteinhomöostase gesucht und das Protein RBG-1 entdeckt. Der *knockdown* des Gens *rbg-1* verstärkt die Proteinaggregation und beeinflusst die Autophagie (Spang, Feldmann et al. 2014). RBG-1 weist eine 60-prozentige Homologie zu dem im Säuger vorkommenden Protein RAB3GAP1 auf, das die katalytisch aktive Untereinheit des RAB3GAP-Komplexes darstellt. Dieser Komplex gehört zu den RAB GAPs, welche eine wichtige Aufgabe für den zellulären Vesikeltransport besitzen, indem sie die Aktivität von RAB GTPasen regulieren und koordinieren. Der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Autophagie wurde in primäre humane Fibroblasten überführt und durch siRNA-vermittelten *knockdown* sowie Überexpression gezeigt, dass die Proteine positive Modulatoren der Autophagie sind (Feldmann 2013 Diplomarbeit; Spang, Feldmann et al. 2014). Ursprünglich wurde der RAB3GAP-Komplex als RAB GAP für die RAB GTPase RAB3 beschrieben und funktionell mit der RAB3-vermittelten Regulation des synaptischen Vesikeltransports und der Neurotransmitter- und Neurohormonausschüttung assoziiert (Sakane et al. 2006). Die Assoziation von RAB3GAP1/2 mit der Autophagie ordnet den Proteinen eine neue zelluläre Funktion zu und im Weiteren soll genauer untersucht werden, welcher molekulare Schritt der Autophagie durch die RAB3GAPs auf welche Art und Weise moduliert wird.

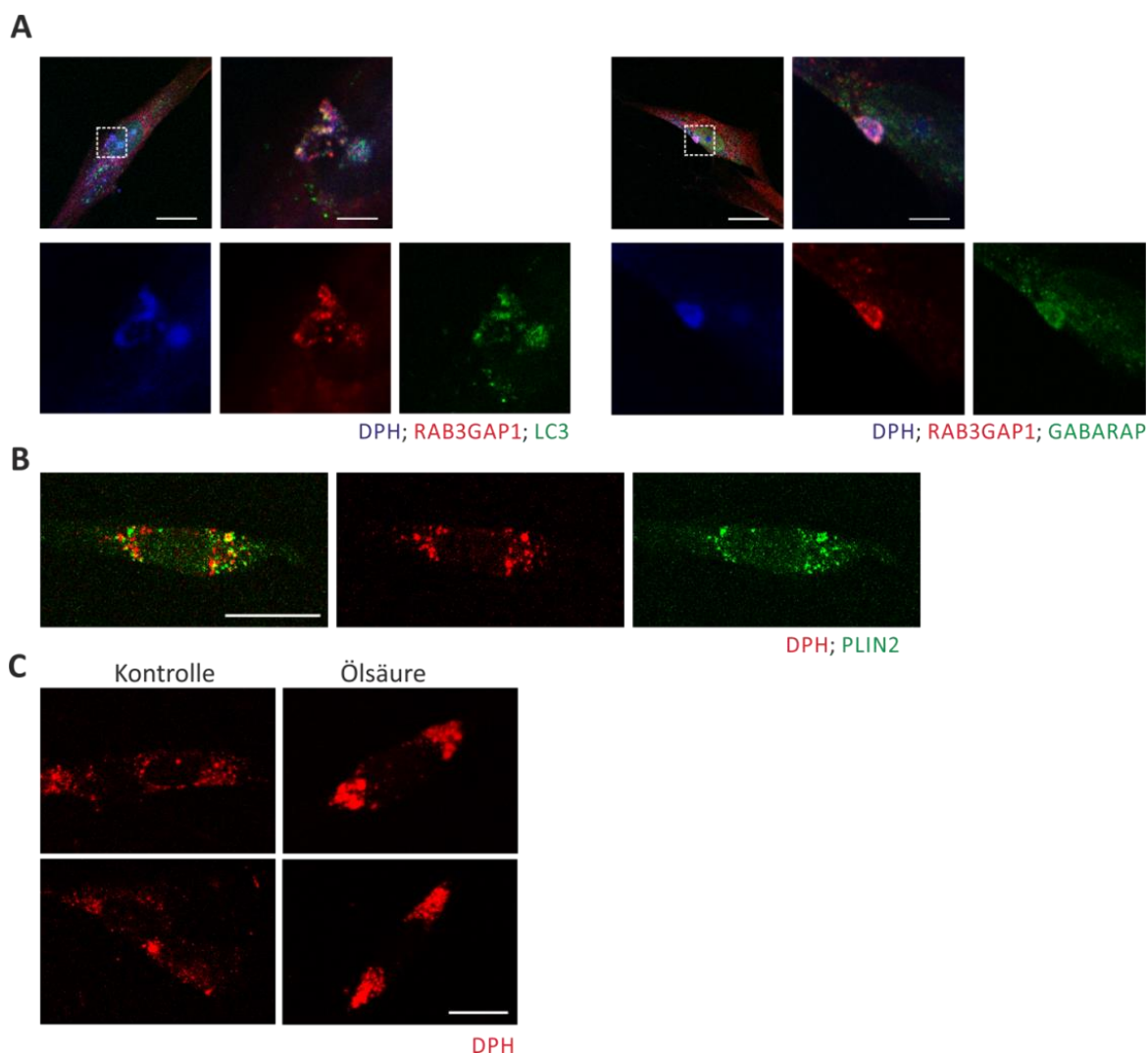
##### 3.1.1. RAB3GAP1/2 ko-lokalisieren mit ATG8 Proteinen an Lipidtröpfchen

Durch *knockdown* und die Überexpression von RAB3GAP1/2 in humanen Fibroblasten wurde demonstriert, dass die RAB3GAPs neuartige Regulatoren der Autophagie sind (Feldmann 2013 Diplomarbeit; Spang, Feldmann et al. 2014). Interessanterweise wurden die RAB3GAPs durch die Massenspektrometrie-basierten Interaktomstudien von Behrends *et al.* direkt mit dem Autophagienetzwerk assoziiert und genauer mit dem Interaktom der Atg8 Familie. Aus diesem Grund wurden Immunpräzipitationstudien (IP-Studien) durchgeführt, um diese vermeintliche Interaktion der RAB3GAPs mit Atg8 Proteinen (LC3 und GABARAP) zu bestätigen, was aber leider nicht gelang (Spang 2015, Doktorarbeit).

Aufgrund der nachgewiesenen Modulation der Autophagie durch die RAB3GAPs wurde im Weiteren untersucht, ob sie in der Zelle mit autophagosomalen Strukturen und entscheidenden Proteinen ko-lokalisieren. Dies sollte zudem einen ersten Hinweis darauf liefern, an welcher Stelle der Autophagie die RAB3GAPs den Prozess beeinflussen. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt in denen RAB3GAP1 und die Atg8 Proteine, LC3 und GABARAP, in IMR90 Zellen lokalisiert werden sollten.

## Ergebnisse

Die Färbungen zeigten, dass RAB3GAP1 und LC3 sowie GABARAP ko-lokalisierten und interessanterweise vor allem gemeinsam an speziellen kreisförmigen zellulären Strukturen zu beobachten waren (Abb. 16 A). Diese Strukturen konnten durch Färbung mit dem Lipidfluorophor DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) als LDs identifiziert werden (Abb. 16 A), was durch Immunfluoreszenzfärbungen gegen Perilipin 2 (PLIN2), einem LD-assoziiertem Protein, bestätigt werden konnte (Abb. 16 B). Da LDs sehr dynamische Organellen sind und ihr Spiegel in Abhängigkeit der Lipidverfügbarkeit variiert, wurde ihre Bildung durch Behandlung mit Ölsäure induziert. Interessanterweise war zu beobachten, dass durch diese Behandlung vermehrt LDs in der Zelle vorlagen, die durch die DPH-Färbung visualisiert werden konnten (Abb. 16 C). Somit wurden diese Strukturen eindeutig als LDs identifiziert.



**Abbildung 16: RAB3GAP1 ko-lokalisiert mit LC3 und GABARAP an LDs.** A) Konfokale Aufnahmen von RAB3GAP1, LC3 bzw. GABARAP und LDs in humanen Fibroblasten. Zur Färbung der LDs wurde DPH verwendet. Maßstabsskala = 20 und 5 µm. B) Konfokale Aufnahmen des LD-assoziierten Protein PLIN2 und DPH in humanen Fibroblasten. Maßstabsskala = 20 µm. C) Konfokale Aufnahmen von DPH nach Ölsäurebehandlung. Maßstabsskala = 20 µm. (Spang, Feldmann et al. 2014)

**Der RAB3GAP-Komplex ko-lokalisierte mit Proteinen der Atg8 Familie am deutlichsten an LDs.**

### 3.1.2. Die RAB3GAPs beeinflussen die autophagosomale Biogenese

Nach der Assoziation der RAB3GAPs mit Proteinen der Atg8 Familie wurde im Weiteren untersucht welchen Schritt der Autophagie die RAB3GAPs funktionell beeinflussen. Die Beobachtung, dass der Verlust von RAB3GAP1/2 in einer deutlich geringeren Zahl von Autophagosomen resultierte weist daraufhin, dass die RAB3GAPs die Autophagie zu einem frühen Zeitpunkt und möglicherweise schon während der Bildung oder Elongation der Phagophore von Bedeutung sind.

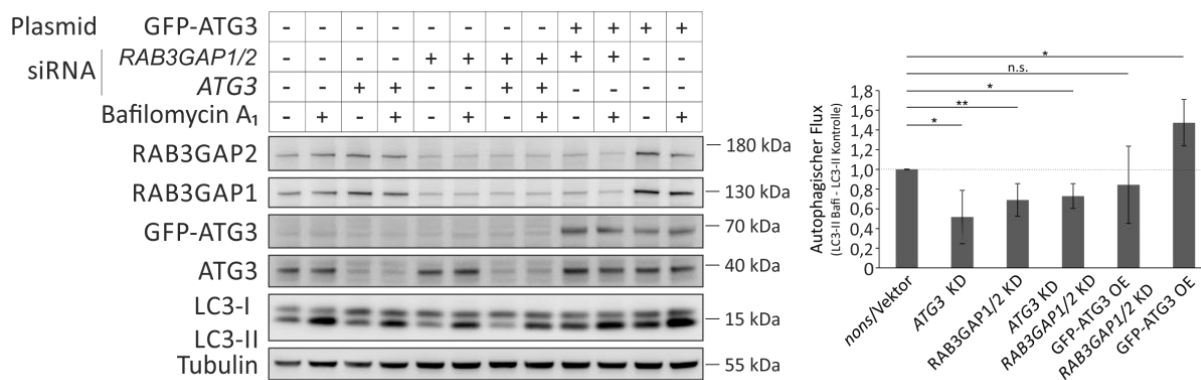
Die Generierung der Phagophore ist von zahlreichen Proteinen abhängig. ATG3 und ATG16L1 sind essentielle Faktoren dieses Prozesses und sind für die Lipidierung von Proteinen der Atg8 Familie entscheidend. Der Verlust von ATG3 oder ATG16L1 hat zur Folge, dass Phagophoren in der Zelle akkumulieren, keine reifen Autophagosomen gebildet werden und die Autophagie zum Erliegen kommt (Sou et al. 2008; Saitoh et al. 2008). Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von ATG3 oder ATG16L1 zu einer erhöhten autophagosomalen Biogenese und somit zu einer gesteigerten autophagischen Aktivität.

Durch die gezielte Manipulation von RAB3GAP1/2 und gleichzeitig von ATG3 bzw. ATG16L1 sollte der Einfluss des RAB3GAP-Komplexes auf die frühen Schritte der Autophagie, also der autophagosomalen Biogenese, untersucht werden. Nach der genetischen Manipulation der Zellen wurde die Beeinflussung des autophagischen Fluxes analysiert (Details zur Bestimmung des autophagischen Fluxes siehe 2.2.4.6).

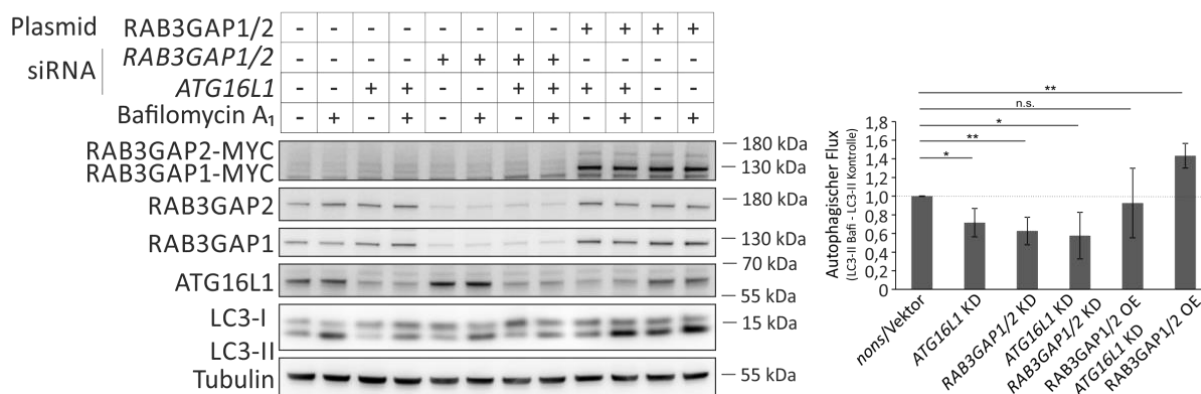
Im Vergleich zur *nonsense*/Leervektor transfizierten Kontrolle führte der siRNA-vermittelte *knockdown* von ATG3 und ATG16L1 zu einem reduzierten Flux von LC3-II und SQSTM1 und bewirkte somit, wie erwartet, eine verringerte Autophagie. Die gleichzeitige Herunterregulation von RAB3GAP1/2 resultierte ebenfalls in einer im Vergleich zur Kontrolle reduzierten autophagischen Aktivität, ohne dass dabei additive Effekte beobachtet werden konnten. Die Überexpression von ATG3 bewirkte eine verstärkte autophagische Aktivität. Interessanterweise verhinderte aber die parallele Herunterregulation von RAB3GAP1/2 die Förderung der Autophagie durch erhöhte ATG3-Spiegel. Ebenso bewirkte der siRNA-vermittelte *knockdown* von ATG16L1, trotz Überexpression von RAB3GAP1/2, eine Steigerung autophagische Aktivität. (Abb. 17 A, B). Insgesamt deutete dies daraufhin, dass die RAB3GAPs die Autophagie in frühen Schritten beeinflusst in denen auch ATG3 und ATG16L1 aktiv sind, was der Biogenese von Autophagosomen entspricht.

## Ergebnisse

## A



## B



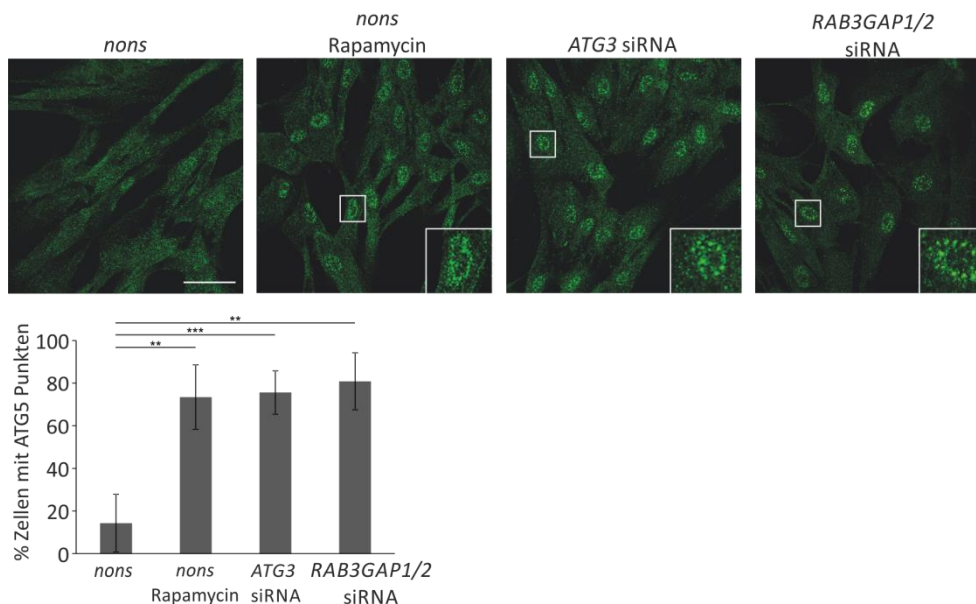
**Abbildung 17: Der RAB3GAP-Komplex beeinflusst die autophagosomale Biogenese.** A) Western Blot Analyse der autophagischen Aktivität. Die Zellen wurden mit der angegebenen siRNAs und Plasmiden transfiziert und mit DMSO (-) oder Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 4 - 12 % NuPAGE Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II Bande und der Kontroll-DMSO behandelten LC3-II Bande ermittelt. \*p<0,05, \*\*p<0,01, n = 4, t-Test. B) Wie in A; die Zellen wurden mit den angegeben siRNAs und Plasmiden transfiziert. \*p<0,05, \*\*p<0,01, n = 3, t-Test. (Spang, Feldmann et al. 2014)

Um den Einfluss der RAB3GAPs auf die autophagosomale Biogenese zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von ATG5 angefertigt. Dieses Protein ist Bestandteil des ATG5-ATG12-ATG16L1-Komplexes und spielt eine essentielle Rolle bei der Elongation der Phagophore. ATG5 ist direkt an der Phagophore lokalisiert und verbleibt dort bis zum Ende der Reifung des Autophagosoms. Aus diesem Grund ist ATG5 ein geeigneter Marker zur Bestimmung der Gesamtzahl an Phagophoren. Tatsächlich lagen unter basalen Bedingungen nur ausgesprochen wenige Phagophoren in der Zelle vor. Durch die Induktion der Autophagie akkumulierten vermehrt ATG5-positive Strukturen in den Zellen, die zu einer vermehrten Synthese von Autophagosomen und somit auch zu einer erhöhten Anzahl an Phagophoren führten. Genauso bewirkte der *knockdown* von ATG3 die Akkumulation phagophorischer Strukturen, da durch die verhinderte Lipidierung von ATG8 Proteinen die Reifung der Phagophore zum Erliegen kam. Somit boten sich sowohl die Rapamycin-vermittelte Induktion der Autophagie als auch der *knockdown* von ATG3 als Positivkontrollen an, um die Akkumulation von Phagophoren zu

## Ergebnisse

erzwingen und diese mittels Immunfluoreszenzfärbung von ATG5 zu visualisieren. Interessanterweise führte auch der siRNA-vermittelten *knockdown* von RAB3GAP1/2 zu einer vergleichbar starken Zunahme von ATG5-positiven Strukturen (Abb. 18).

Dieses Ergebnis bestätigte somit, dass die RAB3GAPs eine Funktion für die autophagosomale Biogenese besitzt und genau diesen Vorgang modulieren.



**Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbungen von Phagophoren in humanen Fibroblasten.** Konfokale Aufnahmen von ATG5-positiven Strukturen. Die Zellen wurden mit DMSO oder mit Rapamycin behandelt und mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Maßstabsskala = 50 µm. Für die statistische Auswertung wurden Zellen mit ATG5-positiven Punkten gezählt und im Verhältnis zu Zellen ohne ATG5-positiven Punkten ausgewertet. Es wurden 30 - 40 Zellen aus vier unabhängigen Experimenten pro Behandlung ausgewertet. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 4$ ,  $t$ -Test. (Spang, Feldmann et al. 2014)

**Die Analyse von RAB3GAP1/2 in Zusammenspiel mit etablierten Faktoren der autophagosomalen Biogenese zeigte, dass der RAB3GAP-Komplex diesen Prozess der Autophagie positiv modulierte.**

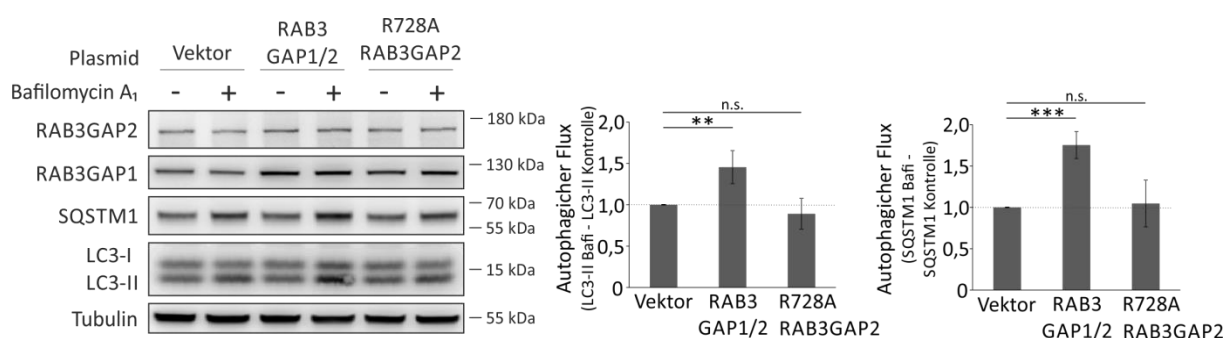


### 3.1.3. Der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Autophagie ist abhängig von der GAP-Aktivität und unabhängig von der RAB GTPase RAB3

RAB GAPs sind für die Regulation von RAB GTPasen verantwortlich. Sie katalysieren die Hydrolyse von GTP zu GDP und inaktivieren dadurch RAB Proteine. Abgesehen von RAB3GAP1/2 besitzen alle RAB GAPs eine konservierte TBC-Domäne in der zwei katalytisch aktive Aminosäuren (Arginin und Glutamin) für die GAP-Aktivität verantwortlich sind (Pan et al. 2006). Interessanterweise findet sich in der katalytisch aktiven Untereinheit RAB3GAP1 auch ohne TBC-Domäne ein Arginin-Rest (Stelle 728), der für die katalytische Aktivität von RAB3GAP1 notwendig ist (Clabecq et al. 2000).

Um zu untersuchen, ob die enzymatische Aktivität von RAB3GAP1 für die autophagische Funktion essentiell ist, wurde eine katalytisch-inaktive Mutante von RAB3GAP1 generiert (RAB3GAP1(R728A), siehe 2.2.2.8), indem das Arginin in der GAP-Domäne durch ein Alanin ersetzt wurde. Durch die nachfolgende Überexpression der inaktiven Mutante sollte die Bedeutung der GAP-Aktivität für die Modulation der Autophagie untersucht werden.

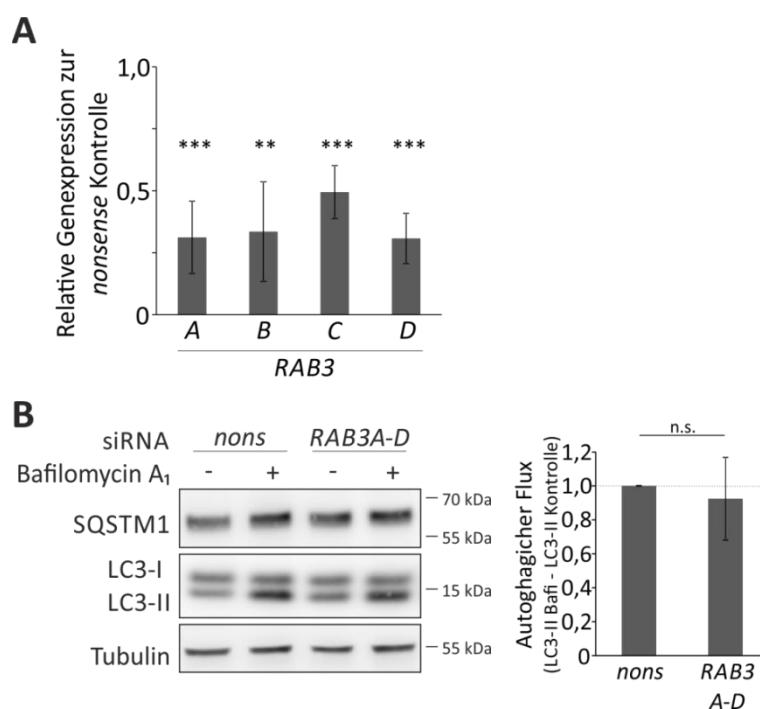
Die Überexpression der wildtypischen Form von RAB3GAP1 diene als Positivkontrolle und resultierte in der erwarteten Steigerung der autophagischen Aktivität im Vergleich zur Leervektor transfizierten Kontrolle. Durch die Überexpression der katalytisch inaktiven Variante RAB3GAP1(R728A) wurde interessanterweise kein Einfluss auf die zelluläre Autophagie beobachtet. Sie war im Vergleich zur Leervektor-transfizierten Kontrolle unverändert (Abb. 19). Dies demonstriert, dass die GAP-Aktivität von RAB3GAP1 für die Beeinflussung der Autophagie essentiell ist.



**Abbildung 19: Die katalytische Aktivität von RAB3GAP1 wird für die Modulation der Autophagie benötigt.** Western Blot Analyse der autophagischen Aktivität nach Überexpression von wildtypischen und mutanten RAB3GAP1 im Vergleich zur Leervektor (Vektor) transfizierten Kontrolle. Die Zellen wurden mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 4 - 12 % NuPAGE Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II und SQSTM1 Bande und der Kontroll-DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande ermittelt. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, n = 4, t-Test. (Spang, Feldmann et al. 2014)

Nachdem gezeigt wurde, dass die GAP-Aktivität von RAB3GAP1 für die Modulation der Autophagie benötigt wird wurde untersucht, ob die RAB GTPase RAB3 der vermittelnde *downstream* Faktor von RAB3GAP1/2 ist. Die RAB GTPase RAB3 ist ein wichtiger Regulator für den synaptischen Vesikeltransport und für die Neurotransmitter- und Neurohormonfreisetzung und der RAB3GAP-Komplex ist als RAB GAP für das namensgebende RAB3 sehr gut charakterisiert. Insgesamt gibt es vier Isoformen von RAB3 (A, B, C und D), welche alle eine ähnliche zelluläre Funktion besitzen und sich funktionell kompensieren können (Schluter et al. 2002). Um zu untersuchen, ob der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Autophagie durch RAB3 vermittelt wird, wurden alle Isoformen in einem siRNA-vermittelten *knockdown* Experiment gleichzeitig herunterreguliert. Der Erfolg des *knockdowns* wurde mittels *qPCR* Analyse überprüft und bestätigt (Abb. 20 A).

Wie zuvor wurde der autophagische Flux bestimmt und dadurch die autophagische Aktivität der Zellen untersucht. Durch die Herunterregulation der RAB3 Isoformen wurde die autophagische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst. Somit hat die RAB GTPase RAB3 offensichtlich keinen funktionellen Einfluss auf die Autophagie und die Modulation der Autophagie, durch RAB3GAP1/2, wird vermutlich durch eine alternative RAB GTPase vermittelt (Abb. 20 B).



**Abbildung 20: RAB3 hat keinen Einfluss auf die autophagische Aktivität der Zelle.** A) Statistische Auswertung der relativen Genexpression der vier RAB3 Isoformen nach *knockdown*. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 3$ , *t*-Test. B) Western Blot Analyse des autophagischen Fluxes nach Herunterregulation der RAB3 Isoformen im Vergleich zur *nonsense* (*nons*) transfizierten Kontrolle. Die Zellen wurden mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15  $\mu$ g Gesamtprotein wurden in einem 4 - 12 % NuPAGE Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II Bande und der Kontroll-DMSO behandelten LC3-II Bande ermittelt. Es wurde keine signifikante Veränderung festgestellt,  $n = 4$ , *t*-Test. (Spang, Feldmann et al. 2014)

Die GAP-Aktivität von RAB3GAP1 wird benötigt, damit die RAB3GAPs die Autophagie positiv modulieren können. Der *knockdown* von RAB3 zeigte zudem, dass der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Autophagie unabhängig von der RAB GTPase RAB3 ist. Somit scheint der Effekt auf die Autophagie durch eine alternative RAB GTPase vermittelt zu werden.

### 3.2. Die RAB GTPase RAB18 ist ein positiver Modulator der Makroautophagie

Das Protein RAB18 gehört zu der Proteinfamilie der RAB GTPasen, welche den zellulären Vesikeltransport kontrollieren und regulieren. RAB18 wurde bisher funktionell mit dem zellulären Lipidmetabolismus, Regulation von sekretorischer Granulae, ER-Golgi-Transport und der Virus Replikation assoziiert (Vazquez-Martinez und Malagon 2011; Gronemeyer et al. 2013; Gerondopoulos et al. 2014; Salloum et al. 2013; Dansako et al. 2014; Tang et al. 2014). Darüber hinaus beeinflusst RAB18 die Morphologie des ERs und wird dabei durch den RAB3GAP-Komplex reguliert. Interessanterweise wurde der RAB3GAP-Komplex hierbei als RAB GEF für RAB18 charakterisiert und eine direkte funktionelle Verbindung zwischen beiden Proteinen aufgezeigt (Gerondopoulos et al. 2014). Somit ist es möglich, dass RAB18 die *downstream* RAB GTPase darstellt, welche für die Modulation der Autophagie durch RAB3GAP1/2 verantwortlich ist. Dies sollte im Weiteren untersucht werden.

#### 3.2.1. Der *knockdown* von RAB18 führt zu einer verminderten autophagischen Aktivität

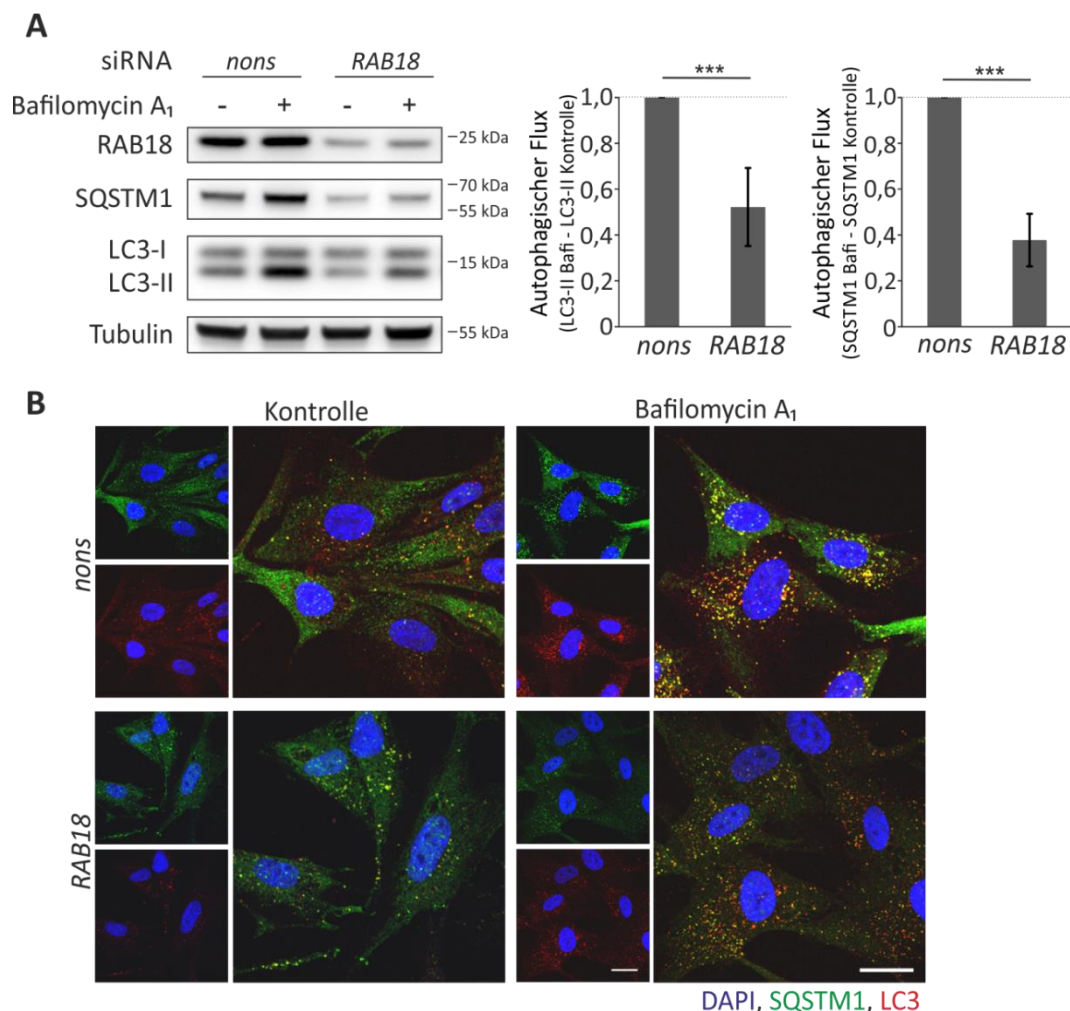
Die funktionelle Beeinflussung der Autophagie durch RAB18 in humanen Fibroblasten wurde zunächst durch siRNA-vermittelte *knockdown* Experimente untersucht und der autophagische Flux nach Herunterregulation von RAB18 analysiert.

Interessanterweise resultierte die Reduktion der RAB18-Spiegel in einer signifikanten Abnahme des autophagischen Fluxes im Vergleich zu der *nonsense* transfizierten Kontrolle und somit zu einer verringerten Autophagie (Abb. 21 A). Ebenso wurden die SQSTM1 Proteinspiegel durch die RAB18 Herunterregulation reduziert (Abb. 21 A). Diesen Effekt haben wir bereits durch einen *knockdown* von RAB3GAP1/2 beobachtet (Feldmann 2013, Diplomarbeit; Spang, Feldmann et al. 2014), was eine mögliche funktionelle Korrelation der RAB GTPase und ihres Regulators hervorhebt. Allerdings sind die Mechanismen, die SQSTM1-Ebenen beeinflussen, bisher unbekannt.

Neben der Western Blot Analyse wurde die Auswirkung des RAB18 *knockdowns* auf die Autophagie zusätzlich durch Immunfluoreszenzfärbungen untersucht, um autophagische Strukturen direkt zu visualisieren. Hierfür wurden Autophagosomen durch LC3 und SQSTM1 in IMR90 Zellen mit

## Ergebnisse

spezifischen Antikörpern angefärbt und die Autophagosomen nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung im Vergleich zur *nonsense* siRNA Kontrollbehandlung untersucht. Im Vergleich zu Kontrollzellen akkumulierten durch den *knockdown* von RAB18 deutlich weniger Autophagosomen nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung in den Zellen (Abb. 21 B).



**Abbildung 21: Der *knockdown* von RAB18 führt zu einer Verringerung der autophagischen Aktivität in humanen Fibroblasten.** A) Western Blot Analyse der autophagischen Aktivität nach Herunterregulation von RAB18 im Vergleich zur *nonsense* (*nons*) transfizierten Kontrolle. Die Zellen wurden mit DMSO (-) und mit Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II und SQSTM1 Bande und der DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande ermittelt. \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 5$ ,  $t$ -Test. B) Konfokale Aufnahmen von LC3 und SQSTM1 Immunfluoreszenzfärbungen. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Maßstabsskala = 20 µm. (Feldmann et al. 2017)

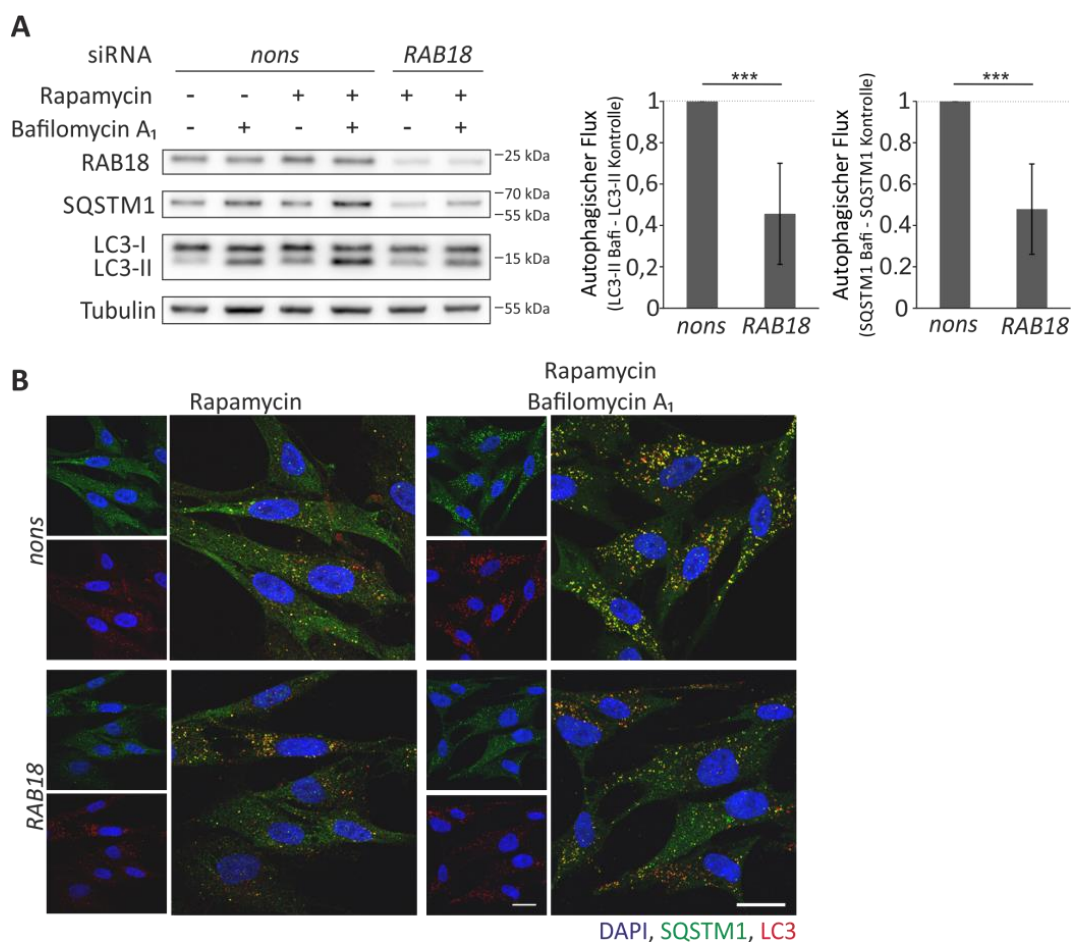
Die Autophagie ist ein sehr flexibler Abbaumechanismus der Zelle, welcher sich an verändernde Bedingungen anpassen muss. Neben der ständig ablaufenden Autophagie unter basalen Bedingungen kann die Autophagie in der Zelle auch rasch induziert werden. So wird z. B. durch einen Nährstoffmangel die Autophagie über eine Inhibition der Proteinkinase mTOR induziert. Die

entstandenen autophagischen Abbauprodukte stehen anschließend für die Neusynthese von Makromolekülen oder zur Energiegewinnung zur Verfügung (Banerjee et al. 2010). Die pharmakologische Behandlung von Zellen mit Rapamycin simuliert den Nahrungsmangel und führt zur Autophagieinduktion über die direkte Inhibition von mTOR (Noda und Ohsumi 1998).

Nachdem gezeigt wurde, dass die Reduktion der RAB18-Spiegel eine verringerte autophagische Aktivität unter basalen Bedingungen bewirkt sollte im Weiteren untersucht werden, ob RAB18 die Autophagie auch unter induktiven Bedingungen beeinflusst. Die Induktion der Autophagie durch Rapamycin führte in der *nonsense* transfizierten Kontrolle, wie zu erwarten, zu einer Steigerung der autophagischen Aktivität (Abb. 22 A). Die gesteigerte Autophagie wurde allerdings durch die Herunterregulation von RAB18 verhindert und die autophagische Aktivität war, im Vergleich zu den Kontrollzellen, in RAB18 *knockdown* Zellen reduziert (Abb. 22 A).

Dieses Ergebnis wurde durch die Anfertigung von Immunfluoreszenzfärbungen von autophagischen Strukturen unterstützt. In den Fluoreszenzfärbungen war zu beobachten, dass durch den *knockdown* von RAB18, weniger Autophagosomen nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung aufliefen als in den Kontrollzellen (Abb. 22 B).

Diese Ergebnisse zeigten, dass der verringerte RAB18 Proteinspiegel sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach Induktion der Autophagie, die Rate des autophagischen Abbaus moduliert.



**Abbildung 22: Analyse der autophagischen Aktivität nach Induktion der Autophagie und *knockdown* von RAB18 in humanen Fibroblasten.** A) Western Blot Analyse der Herunterregulation von RAB18 im Vergleich zur *nonsense* (*nons*) transfizierten Kontrolle. Die Zellen wurden mit DMSO (-), Rapamycin (+) und/oder mit Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II und SQSTM1 Bande und der DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande ermittelt. \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 5$ ,  $t$ -Test. B) Konfokale Aufnahmen von LC3 und SQSTM1 Immunfluoreszenzfärbungen. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Maßstabsskala = 20 µm. (Feldmann et al. 2017)

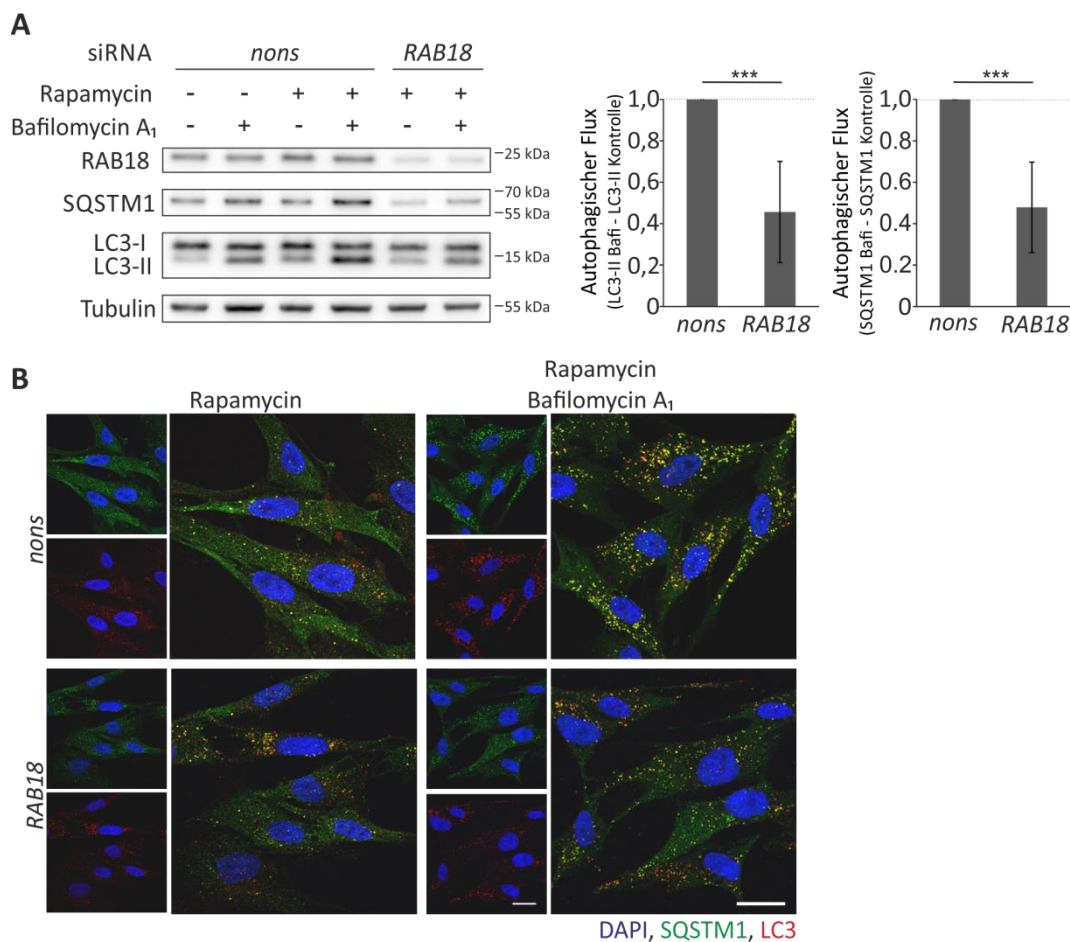
**Die Verringerung der RAB18 Proteinspiegel führte sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach der Induktion der Autophagie zu einer reduzierten autophagischen Aktivität.**

### 3.2.2. Die Überexpression von RAB18 erhöht die autophagische Aktivität

Der *knockdown* von RAB18 führte zu einer Reduktion der autophagischen Aktivität in der Zelle. Um den Einfluss von RAB18 auf die Autophagie zu bestätigen, wurde RAB18 überexprimiert und die Auswirkung der erhöhten Proteinspiegel auf die Autophagie untersucht.

## Ergebnisse

Dafür wurde HA-getaggttes RAB18 in humanen Fibroblasten überexprimiert und die autophagische Aktivität im Vergleich zu der Leervektor transfizierten Kontrolle sowohl in Western Blot Analysen als auch in Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.



**Abbildung 23: Die Überexpression von RAB18 führt zu einer Steigerung der autophagischen Aktivität in humanen Fibroblasten.** A) Western Blot Analyse der Überexpression von RAB18-HA im Vergleich zur Leervektor (Vektor) transfizierten Kontrolle. Die Zellen wurden mit DMSO (-) oder Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II und SQSTM1 Bande und der DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Kontrollbande ermittelt. \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 5$ ,  $t$ -Test. B) Konfokale Aufnahmen von LC3 und SQSTM1 Immunfluoreszenzfärbungen. Die Zellen wurden mit Rapamycin und Bafilomycin A<sub>1</sub> behandelt. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Maßstabsskala = 20 µm. (Feldmann et al. 2017)

Interessanterweise führte die Überexpression von RAB18 dazu, dass der autophagische Flux, im Vergleich zur Leervektor transfizierten Kontrolle, erhöht wurde und somit die autophagische Aktivität der Zelle, durch die Überexpression, gesteigert wurde (Abb. 23 A). Die angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten die erhöhte Autophagie nach Überexpression von RAB18, denn nach der Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A<sub>1</sub> traten mehr Autophagosomen in den RAB18

überexprimierten Zellen auf als in der Leervektor transfizierten Kontrolle (Abb. 23 B). Diese Ergebnisse bestätigten, dass RAB18, wie auch schon RAB3GAP1/2, ein positiver Modulator der Autophagie ist.

**Die Überexpression von RAB18 führte zu einer Erhöhung der autophagischen Aktivität was zeigte, dass RAB18 ein neuartiger positiver Modulator der Autophagie ist.**

### **3.2.3. RAB18 und RAB3GAP1/2 beeinflussen sich funktionell gegenseitig und regulieren die Autophagie**

Der *knockdown* und die Überexpression von RAB18 zeigten, dass die RAB GTPase, genau wie RAB3GAP1/2, ein positiver Modulator der Autophagie darstellt. Interessanterweise ist die RAB GTPase RAB3 nicht die *downstream* RAB GTPase für RAB3GAP1/2, die für die Modulation der Autophagie verantwortlich ist. Somit muss eine andere RAB GTPase der entscheidende *downstream* Faktor sein. Spannenderweise wurde vor kurzem gezeigt, dass der RAB3GAP-Komplex ein RAB GEF für RAB18 darstellt und diese RAB GTPase reguliert (Gerondopoulos et al. 2014). Dies deutet darauf hin, dass RAB18 möglicherweise auch bei der Beeinflussung der Autophagie durch die RAB3GAPs reguliert wird und der *downstream* Faktor der RAB3GAPs sein könnte. Dieser Zusammenhang sollte im Weiteren aufgeklärt werden.

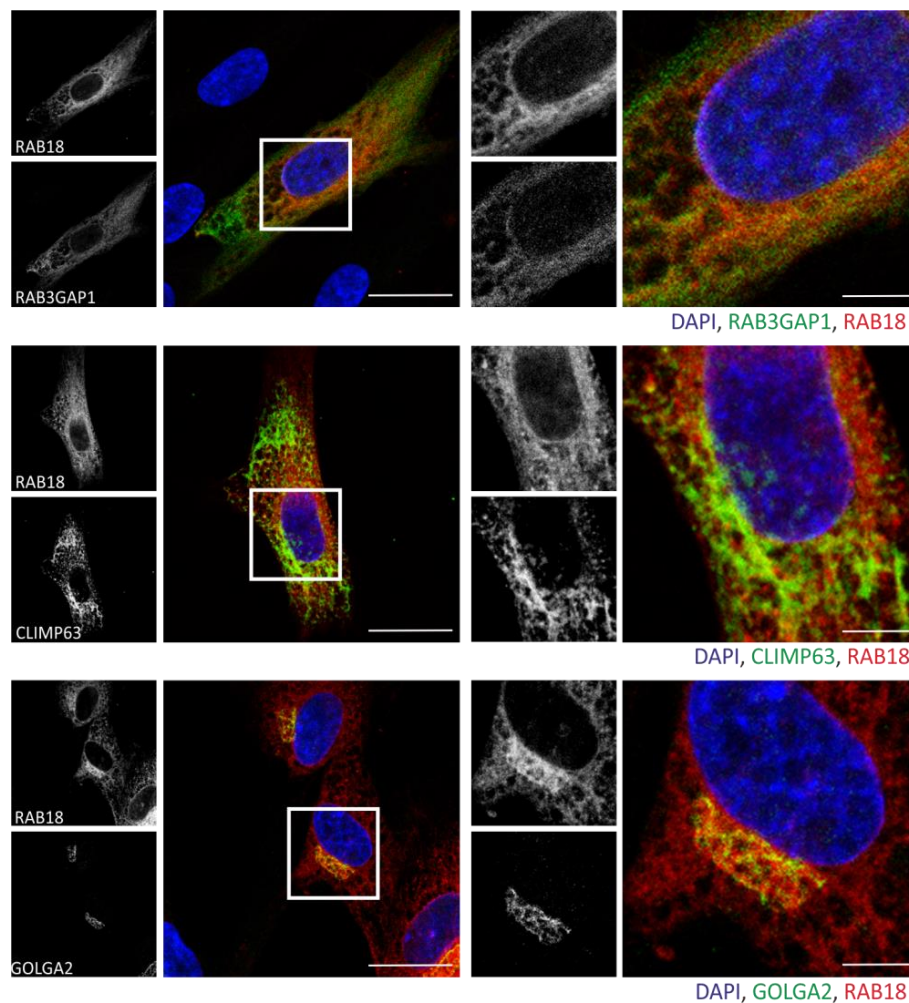
Die funktionelle Interaktion von RAB GEF und RAB GTPase setzt eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung voraus, allerdings konnte RAB18 in Co-IP-Studien mit RAB3GAP1 (Daten nicht gezeigt) und auch in der MS-basierten Interaktomanalyse von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 nicht eindeutig präzipitiert werden (Spang, Feldmann et al. 2014). Interessanterweise wurde aber auch durch Gerondopoulos (Gerondopoulos et al. 2014) keine direkte Interaktion gezeigt, sondern nur der funktionelle Zusammenhang von RAB3GAP1/2 und RAB18 sowie die Ko-Lokalisation am ER etabliert. Möglicherweise ist die RAB3GAP-vermittelte Interaktion als RAB GEF vergleichsweise kurzlebig und schwach und konnte deswegen nicht direkt gezeigt werden.

Eine funktionelle Verbindung von RAB18 und RAB3GAP1/2 setzt aber ebenso die Ko-Lokalisation in der Zelle voraus und diese wurde im Folgenden untersucht.

Hierfür wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt in denen RAB18 und RAB3GAP1 angefärbt wurden. Gleichzeitig wurde auch die Lokalisation von RAB18 am ER und am Golgi untersucht. Von diesen Organellen wurde bereits gezeigt, dass die RAB3GAPs dort vorliegen (Gerondopoulos et al. 2014, Spang, Feldmann et al. 2014).

In den konfokalen Aufnahmen war zuerkennen, dass RAB18 und der RAB3GAP-Komplex deutlich ko-lokalisierten und das RAB18 wie zu erwarten war auch in humanen Fibroblasten am ER und Golgi lokalisiert werden konnte (Abb. 24).

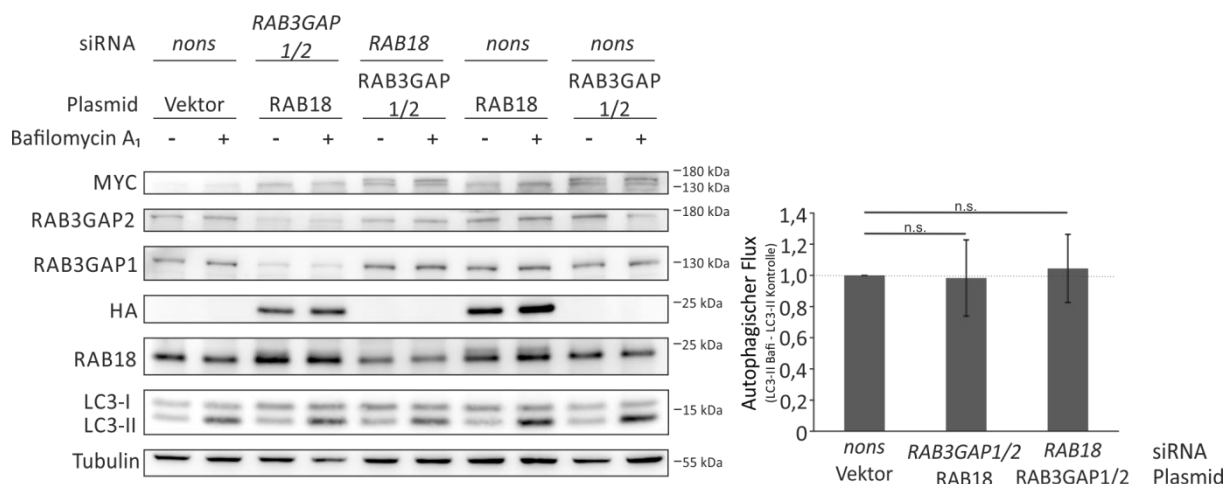




**Abbildung 24: RAB18 und RAB3GAP1 ko-lokalisieren in humanen Fibroblasten und RAB18 liegt verstärkt am ER und Golgi vor.** Repräsentative konfokale Aufnahmen von RAB18-mCherry, RAB3GAP1-HA, CLIMP63 (ER) und GOLGA2 (Golgi). Maßstabsskala = 20 µm. (Feldmann et al. 2017)

Nach der erfolgreichen Ko-Lokalisation von RAB18 und RAB3GAP1/2 wurde im Folgenden untersucht, ob eine funktionelle Abhängigkeit zwischen RAB18 und RAB3GAP1/2 bei der Beeinflussung der Autophagie existiert. Hierfür wurden RAB18 und die RAB3GAPs in humanen Fibroblasten in entgegengesetzter Weise überexprimiert bzw. herunterreguliert und im Anschluss die Auswirkung dieser Manipulation auf die autophagische Aktivität ermittelt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Erhöhung der autophagischen Aktivität, nach Überexpression von RAB18 oder der RAB3GAPs durch den gleichzeitigen *knockdown* des funktionellen Partners, verhindert wurde (Abb. 25). Dies zeigte, dass beide Proteine in einer funktionellen Beziehung zueinander stehen und deutet an, dass RAB18 die *downstream* RAB GTPase von RAB3GAP1/2 ist. Somit ist RAB18 scheinbar für die Modulation der Autophagie direkt verantwortlich und wird dabei über RAB3GAP1/2 positiv reguliert.

## Ergebnisse



**Abbildung 25: Bei der Beeinflussung der Autophagie sind RAB18 und der RAB3GAP-Komplex voneinander abhängig.** Western Blot Analyse der Autophagie nach der gegenseitigen genetischen Manipulation von RAB18 und RAB3GAP1/2. Die Zellen wurden mit DMSO (-) und Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Es wurde keine signifikante Veränderung festgestellt, n = 4, t-Test.

**RAB18 und RAB3GAP1 ko-lokalisierten in der Zelle und waren am ER und Golgi zu finden. Darüber hinaus regulierten sich RAB18 und die RAB3GAPs gegenseitig, was darauf hindeutet, dass der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Autophagie über die RAB GTPase RAB18 vermittelt wird.**

### 3.3. Beeinflussung der Autophagie durch TBC1D20

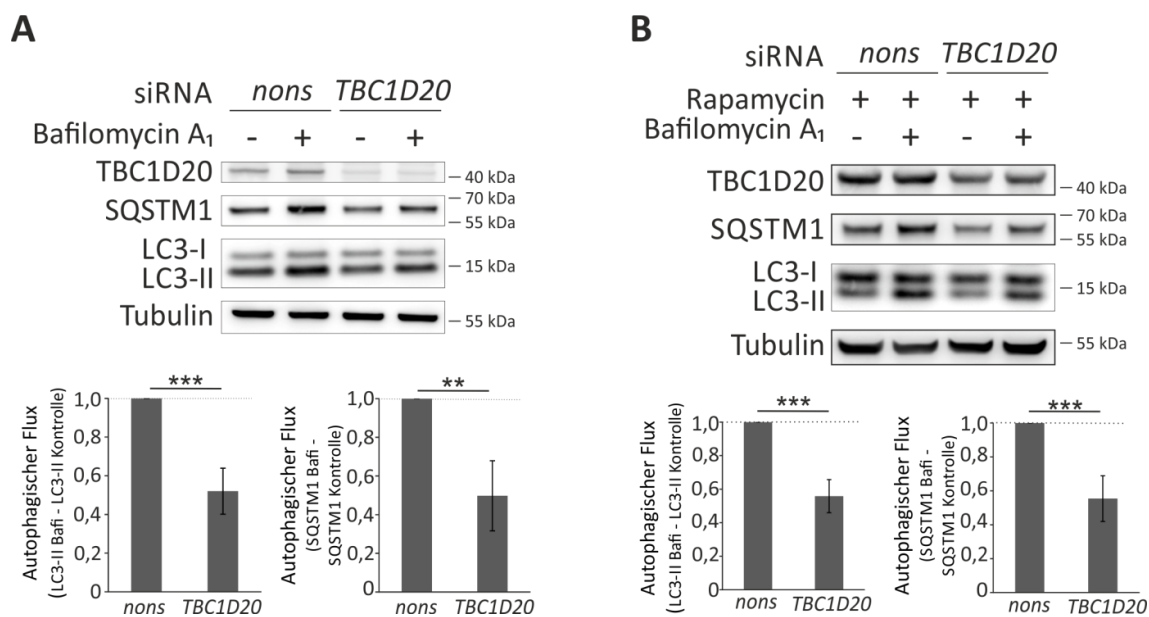
Innerhalb dieser Arbeit konnten die RAB GTPase RAB18 und die beiden Untereinheiten des RAB3GAP-Komplexes als neuartige positive Modulatoren der Autophagie charakterisiert werden. *Loss-of-function* Mutationen in den Gene, die für RAB18 oder RAB3GAP1/2 codieren, führen zu dem fatalen WARBM Syndrom und interessanterweise trifft dies auch auf das RAB GAP TBC1D20 zu (Liegel et al. 2013). Daher wurde im Weiteren der Einfluss von TBC1D20 auf den autophagischen Prozess untersucht. Hierbei wurden siRNA-vermittelte *knockdown* Experimente und Überexpressionsversuche durchgeführt und die autophagische Aktivität nach der genetischen Manipulation von TBC1D20 analysiert.

Während die nachfolgenden Daten gewonnen wurden, wurde durch die Arbeitsgruppe von D.J. Sidjanin eine funktionelle Verbindung von TBC1D20 mit der autophagosomalen Biogenese publiziert (Sidjanin et al. 2016), was einerseits schade war, in diesem Wettkampf unterlegen gewesen zu sein, andererseits eine unabhängige Bestätigung meiner Arbeit war.

#### 3.3.1. Das RAB GAP TBC1D20 ist ein positiver Modulator der Autophagie

Zur Analyse des Einflusses von TBC1D20 auf die Autophagie wurden siRNA-vermittelte *knockdown* Versuche und Überexpressionsexperimente durchgeführt und der Einfluss der veränderten TBC1D20 Proteinspiegel auf die autophagische Aktivität unter basalen Bedingungen und nach Autophagieinduktion in humanen Fibroblasten untersucht.

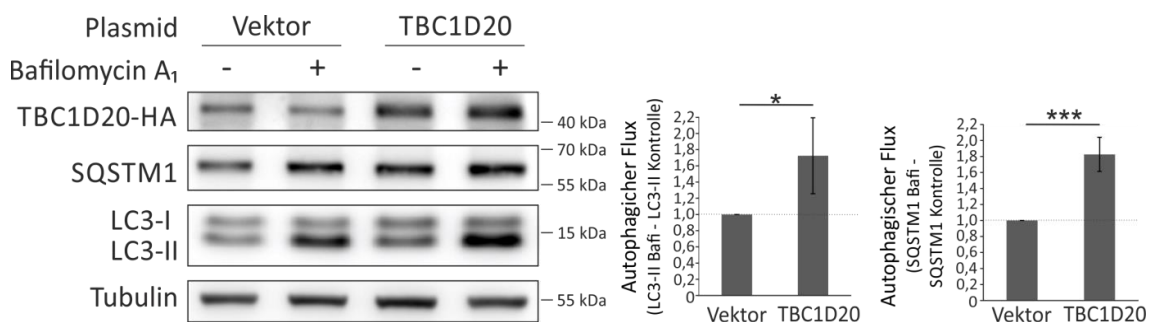
Die siRNA-vermittelte Reduktion der TBC1D20 Proteinspiegel führte zu einer Abnahme des autophagischen Fluxes, im Vergleich zur *nonsense* transfizierten Kontrolle (Abb. 26 A). Auch nach Induktion der Autophagie wurde die autophagische Aktivität durch die Reduktion des TBC1D20-Spiegels im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich verringert (Abb. 26 B). Somit moduliert TBC1D20, wie auch schon RAB18 und RAB3GAP1/2 (Feldmann 2013, Diplomarbeit; Spang et al. 2014; Feldmann et al. 2017), die stetig ablaufende Autophagie unter basalen Bedingungen als auch nach Induktion.



**Abbildung 26: Der knockdown von TBC1D20 führt zu einer Reduktion der autophagischen Aktivität in humanen Fibroblasten.** A) Western Blot Analyse der Autophagie nach Herunterregulation von TBC1D20. Zellen wurden mit DMSO (-) und mit Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II und SQSTM1 Bande und der Kontroll-DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande ermittelt. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, n = 4, t-Test. B) Wie A; Zusätzlich wurden die Zellen mit Rapamycin (+) und Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. \*\*\*p<0,001, n = 4, t-Test.

Nachdem beobachtet wurde, dass ein verringerter TBC1D20 Proteinspiegel die Autophagie reduziert, wurde TBC1D20 überexprimiert und die Auswirkungen erhöhter TBC1D20-Spiegel auf die autophagische Aktivität untersucht.

Die Überexpression von HA-getagtem TBC1D20 führte zu einer Erhöhung der autophagischen Aktivität (Abb. 27).



**Abbildung 27: Die Überexpression von TBC1D20 führt zu einer Steigerung der autophagischen Aktivität in humanen Fibroblasten.** A) Western Blot Analyse der Autophagie nach Überexpression von TBC1D20-HA. Zellen wurden mit DMSO (-) und Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II und SQSTM1 Bande und der DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande ermittelt. \*\*p<0,05, n = 5, t-Test.

**TBC1D20 wurde als neuartiger positiver Modulator der Autophagie charakterisiert. Somit wurden alle bislang identifizierten WARBM-assoziierten Proteine mit der Modulation der Autophagie verbunden.**

### **3.4. RAB3GAP1/2 und RAB18 beeinflussen die Proteostase**

Das Proteom stellt die Gesamtheit aller in einer Zelle enthaltenen Proteine dar und ist sehr anfällig für Störungen. Die verstärkte Aggregation von Proteinen ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert und auch im Alter treten vermehrt Proteinaggregate auf (Hipp et al. 2014; Morawe et al. 2012; Morimoto und Cuervo 2014). Um diese Störungen zu vermeiden müssen eine permanente Qualitätskontrolle sowie ein Gleichgewicht zwischen der Neusynthese und dem Abbau von Proteinen in der Zelle bestehen. Das Gleichgewicht und die Qualitätskontrolle wird als Proteinhomöostase, kurz Proteostase, bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass RAB18 und RAB3GAP1/2 positive Modulatoren der Autophagie sind. Dieser degradative Prozess ist ein wichtiger Bestandteil des Proteostasenetzes und für die Integrität des Proteoms von großer Bedeutung. Die Störung der Autophagie ist daher mit zahlreichen Proteinaggregationskrankheiten verbunden.

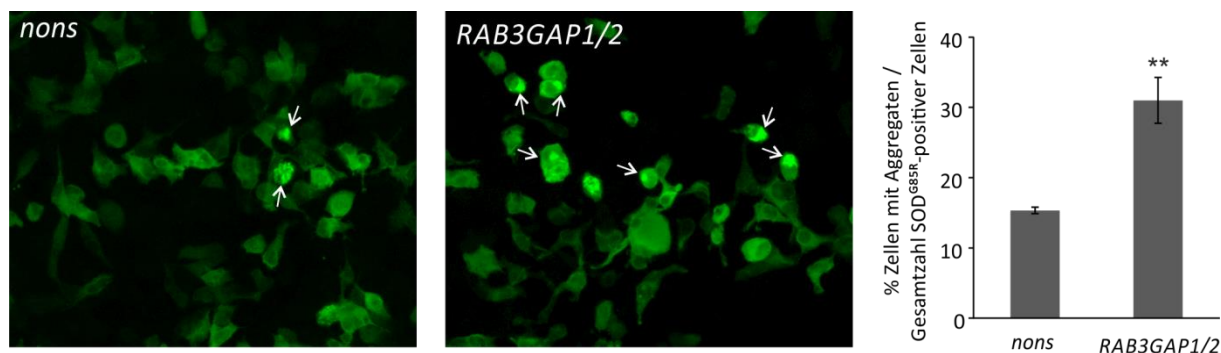
Im Folgenden sollte untersucht werden, ob RAB3GAP1/2 und die RAB GTPase RAB18 durch ihre Funktion als positiver Modulator der Autophagie auch einen Einfluss auf die Proteostase besitzen.

#### **3.4.1. Einfluss des RAB3GAP-Komplexes und RAB18 auf die Proteinhomöostase**

Um den Einfluss von RAB3GAP1/2 und RAB18 auf die Proteostase zu untersuchen, wurden Proteine mit einer erhöhten Aggregationstendenz in Zellen exprimiert und gleichzeitig beide Proteine mittels siRNA herunterreguliert. Dies fordert das Proteostasenetzes heraus und die Stärke der Aggregation gibt Auskunft über die Kapazität der Netzwerkkomponenten. Ein Protein, das eine erhöhte Aggregationstendenz aufweist ist mutante SOD1 (Superoxiddismutase 1), die mit der neurodegenerativen amyotrophen Lateralsklerose assoziiert ist (Cao et al. 2008). Eine GFP-getaggte mutante Form von SOD1, SOD<sup>G85R</sup>, wurde in HEK293 Zellen exprimiert und gleichzeitig wurden RAB3GAP1/2 herunterreguliert. Als Kontrolle dienten HEK293 Zellen, in die zusätzlich zur mutanten SOD1 *nonsense* siRNA transfiziert wurde. Durch Auszählung der Aggregate in SOD1-positiven Zellen wurde beobachtet, dass der *knockdown* der RAB3GAPs im Vergleich zur *nonsense* transfizierten

## Ergebnisse

Kontrolle vermehrt Aggregate verursachte (Abb. 28). Dies zeigt, dass die RAB3GAPs durch ihren Einfluss auf die Autophagie auch die zelluläre Proteostase beeinflussen. Somit hat ein verringerter RAB3GAP1/2 Proteinspiegel nicht nur eine reduzierte Autophagie zur Folge, sondern führt auch dazu, dass vermehrt potentiell schädliche Proteinaggregate in den Zellen akkumulieren.



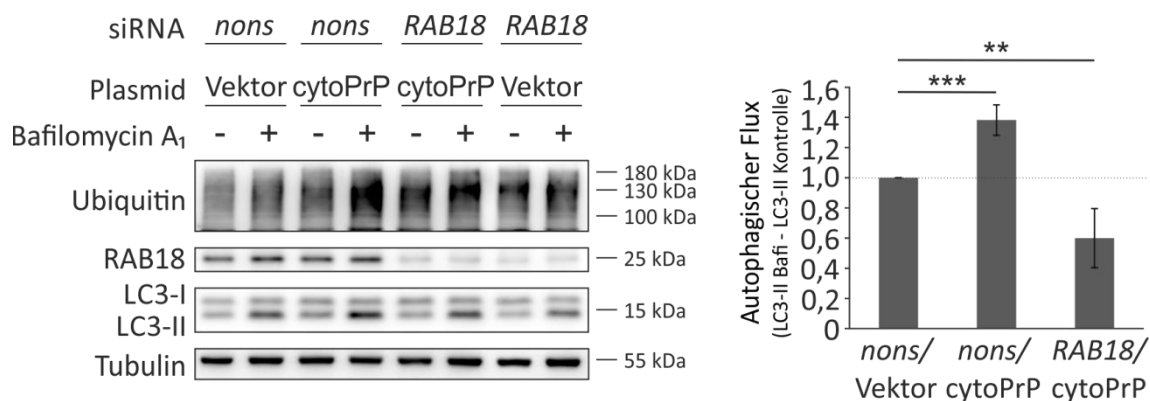
**Abbildung 28: RAB3GAP1/2 beeinflusst die Proteinhomöostase der Zelle.** HEK293 Zellen wurden mit SOD<sup>G85R</sup> und den angegebenen siRNAs transfiziert und die SOD-GFP-positiven Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie visualisiert. Für die statistische Auswertung wurden Zellen mit SOD1<sup>G85R</sup> Aggregaten in Relation zur Gesamtzahl der SOD1-GFP transfizierten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten, ausgewertet. \*\* $p < 0,01$ ,  $n = 3$ ,  $t$ -Test.

Neben RAB3GAP1/2 konnte in dieser Arbeit auch RAB18 erstmals als ein positiver Modulator der Autophagie beschrieben werden. Daher soll im Folgenden der Einfluss von RAB18 auf die Proteinhomöostase untersucht werden. Hierfür wurde zytosolisches Prion Protein (cytoPrP) in humanen Zellen überexprimiert.

Nach der Überexpression von cytoPrP wurde beobachtet, dass der Spiegel ubiquitinerter Proteine in den transfizierten Zellen erhöht war (Abb. 29). Dies zeigt, dass durch die Überexpression des Prion Proteins die Proteostase der Zelle gestört wurde und abzubauen Ubiquitin-markierte Proteine akkumulierten. Interessanterweise wurde unter diesen Bedingungen auch eine verstärkte Autophagie beobachtet und die Zelle reagierte wie erwartet auf den erhöhten proteotoxischen Stress mit einer Induktion des Abbauweges (Abb. 29).

Die siRNA-vermittelte Verringerung der RAB18-Spiegel führte dazu, dass die Ubiquitinspiegel, im Vergleich zu *nonsense* transfizierten Zellen, schon in den Leervektor transfizierten Zellen erhöht wurden (Abb. 29). Dies demonstrierte, dass der Verlust von RAB18 und der damit verbundenen Reduktion der autophagischen Aktivität schon alleine die Proteostase der Zelle beeinträchtigte und vermehrt ubiquitinierte Proteine in der Zelle akkumulierten. Die gleichzeitige Überexpression des cytoPrP verstärkte diese Beobachtung noch zusätzlich und die Spiegel von ubiquitinierten Proteinen waren stark erhöht (Abb. 29). Dieser additive Effekt ist durch eine massive Störung der Proteostase bei gleichzeitig verringerter Autophagie zu erklären. Tatsächlich verhinderte der *knockdown* von RAB18 die Prion Protein-vermittelte Induktion der Autophagie (Abb. 29).

## Ergebnisse

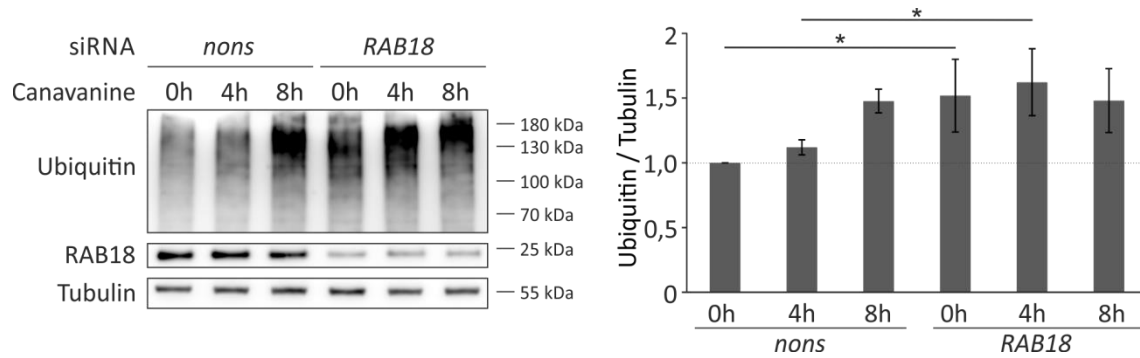


**Abbildung 29: Die RAB GTPase RAB18 besitzt einen Einfluss auf die Proteostase.** Western Blot Analyse der Spiegel ubiquitiniertes Proteins und der autophagischen Aktivität nach Prion Protein Überexpression und *knockdown* von RAB18. Die Zellen wurden mit DMSO (-) und Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II und SQSTM1 Bande und der DMSO behandelten LC3-II und SQSTM1 Bande ermittelt. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, n = 4, t-Test. (Feldmann et al. 2017)

Die Bedeutung von RAB18 für die zelluläre Proteostase wurde zusätzlich durch eine pharmakologische Behandlung mit Canavanin untersucht. Canavanin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure und ist ein Analogon zur Aminosäure Arginin. Während der Translation wird Canavanin in Proteine eingebaut und verdrängt dabei Arginin vollständig, wenn es im Überschuss angeboten wird (Ishida et al. 2013). Im Unterschied zu Arginin weist Canavanin ein Sauerstoffatom in der Seitenkette auf, was eine Fehlfaltung der Proteine zur Folge hat.

Die Behandlung mit Canavanin hatte tatsächlich zeitabhängig eine verstärkte Proteinefehlfaltung zur Folge, was durch die Akkumulation poly-ubiquitiniertes Proteins deutlich wurde (Abb. 30).

Der siRNA-vermittelte *knockdown* von RAB18 hatte wiederum auch schon ohne eine Behandlung mit Canavanin einen erhöhten Spiegel ubiquitiniertes Proteins zur Folge, was demonstrierte, dass die RAB GTPase für die Stabilität der Proteostase von Bedeutung ist. Die zusätzliche Behandlung mit Canavanin führte in den RAB18 *knockdown* Zellen zu einer weiteren Steigerung der Menge an ubiquitiniertes Proteins, was bestätigte, dass RAB18 das zelluläre Proteostasenetzwerk unterstützt und die Proteostase beeinflusst (Abb. 30).



**Abbildung 30: Einfluss der RAB GTPase RAB18 auf die Proteostase.** Western Blot Analyse der Spiegel poly-ubiquitiniertes Proteine nach Behandlung mit Canavanin und *knockdown* von RAB18 in humanen Fibroblasten. Die Zellen wurden mit ddH<sub>2</sub>O als Kontrolle oder Canavin für die angegebene Zeit behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung wurde durch Relation von Ubiquitin mit Tubulin ermittelt. \* $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ,  $t$ -Test. (Feldmann et al. 2017)

**Durch ihre Funktion als positive Modulatoren der Autophagie sind die RAB3GAPs und RAB18 wichtig für die Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase. Ein Verlust der Proteine führte zu einer Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen und Proteinaggregaten, welche auch mit der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind.**



### 3.5. Das Warburg Mikro (WARBM) Syndrom und die Autophagie

*Loss-of-function* Mutationen in den Proteinen RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB18 und TBC1D20 führen zu dem WARBM Syndrom, einer seltenen autosomal rezessiv vererbaren Entwicklungsstörung. Patienten weisen unter anderem schwerwiegende Augenfehlbildungen, eine gestörte neurologische Entwicklung und mentale Retardation auf. Der genaue Mechanismus der Pathogenese, der für diesen schwerwiegenden Phänotyp verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Allerdings wurden alle Proteine, die bislang mit dem Syndrom verbunden wurden, als positive Modulatoren der Autophagie beschrieben (Feldmann 2013, Diplomarbeit; Spang, Feldmann et al. 2014; Sidjanin et al. 2016; Feldmann et al. 2017). Somit sollte im Weiteren untersucht werden, ob die Autophagie in WARBM Patientenzellen verändert war. Die einzigen WARBM Zellen, die weltweit zur Verfügung stehen, sind humane Fibroblasten, die an der *MRC Human Genetics Unit* im *Institute of Genetics and Molecular Medicine* der Universität Edinburgh vorliegen und aus rechtlichen Gründen nicht weitergereicht werden dürfen. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Daten, im Rahmen eines vierwöchigen Laboraufenthalts, im *Institute of Genetics and Molecular Medicine*, Edinburgh, gewonnen.

#### 3.5.1. Patientenzellen weisen keine veränderte Autophagie im Vergleich zu wildtypischen Kontrollzellen auf

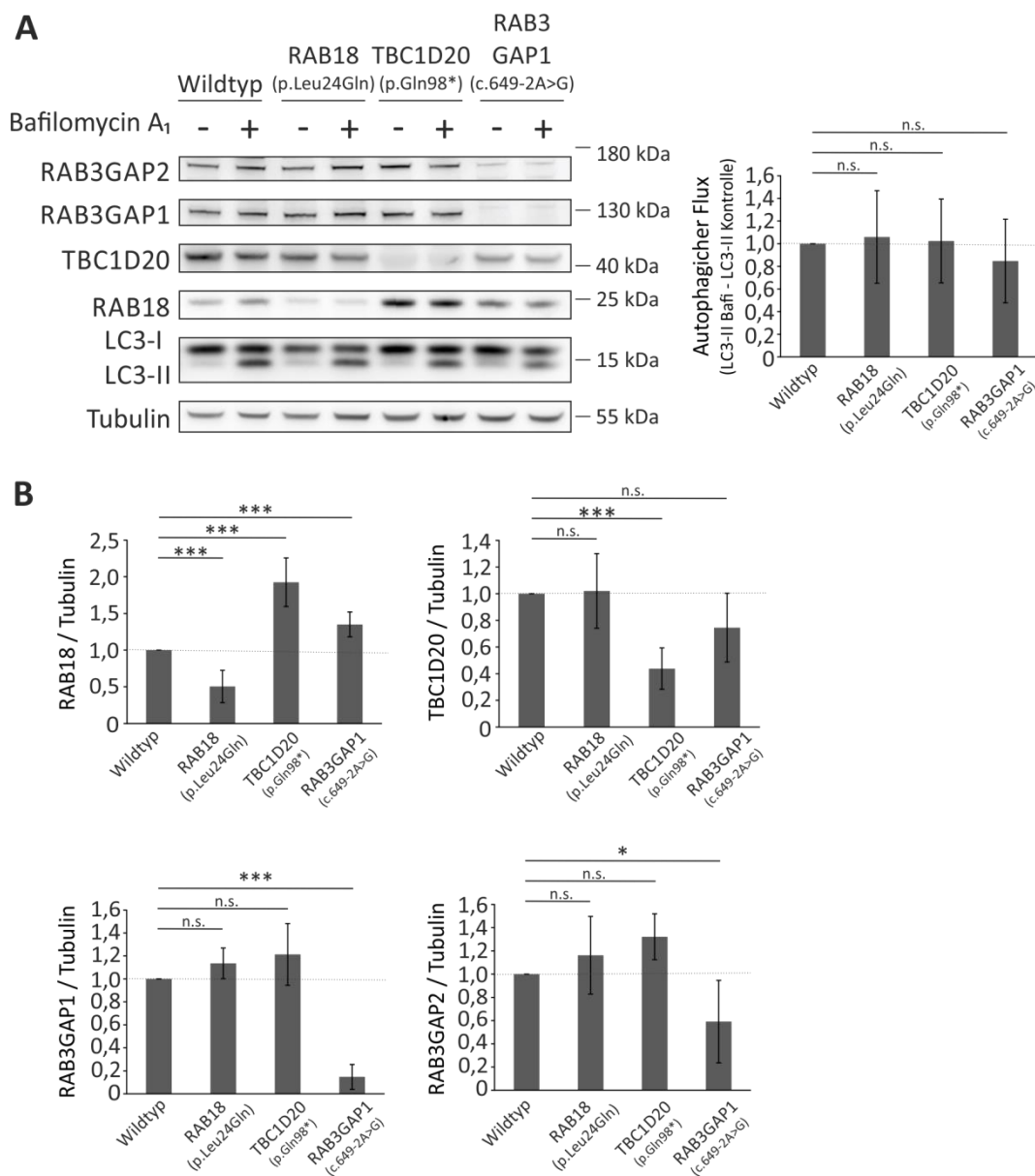
Die siRNA-vermittelte Herunterregulation und Überexpression von RAB3GAP1/2, RAB18 und TBC1D20 charakterisierten diese Proteine als positive Modulatoren der Autophagie. Um zu untersuchen, ob die WARBM Syndrom assoziierten Mutationen die Autophagie beeinflussen, wurde analysiert, ob die autophagische Aktivität in Patientenzellen verändert ist. Dafür wurden drei Patientenzelllinien verwendet: RAB18(pLeu24Gln), TBC1D20(pGln98\*) und RAB3GAP1(c.649 2A>G)

In den Patientenzellen war zu beobachten, dass die entsprechenden Proteinspiegel der mutanten Proteine deutlich verringert waren (Abb. 31 B). Interessanterweise war in der RAB3GAP1 Patientenzelllinie zudem zu beobachten, dass neben RAB3GAP1 auch die RAB3GAP2 Proteinspiegel reduziert waren, was die funktionelle Abhängigkeit dieser beiden Proteine verdeutlicht (Abb. 31 B). Zudem lagen sowohl in der TBC1D20 Patientenzelllinie als auch in der RAB3GAP1 Zelllinie erhöhte RAB18 Proteinspiegel vor (Abb. 31 B), was bereits durch Mark Handley publiziert wurde (Handley et al. 2015).

Interessanterweise wurde bei der Analyse der autophagischen Aktivität in den Patientenzellen, im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollzellen, kein Unterschied festgestellt (Abb. 31 A). Der autophagische Flux von LC3-II war unverändert. Somit scheint der permanente Funktionsverlust der

## Ergebnisse

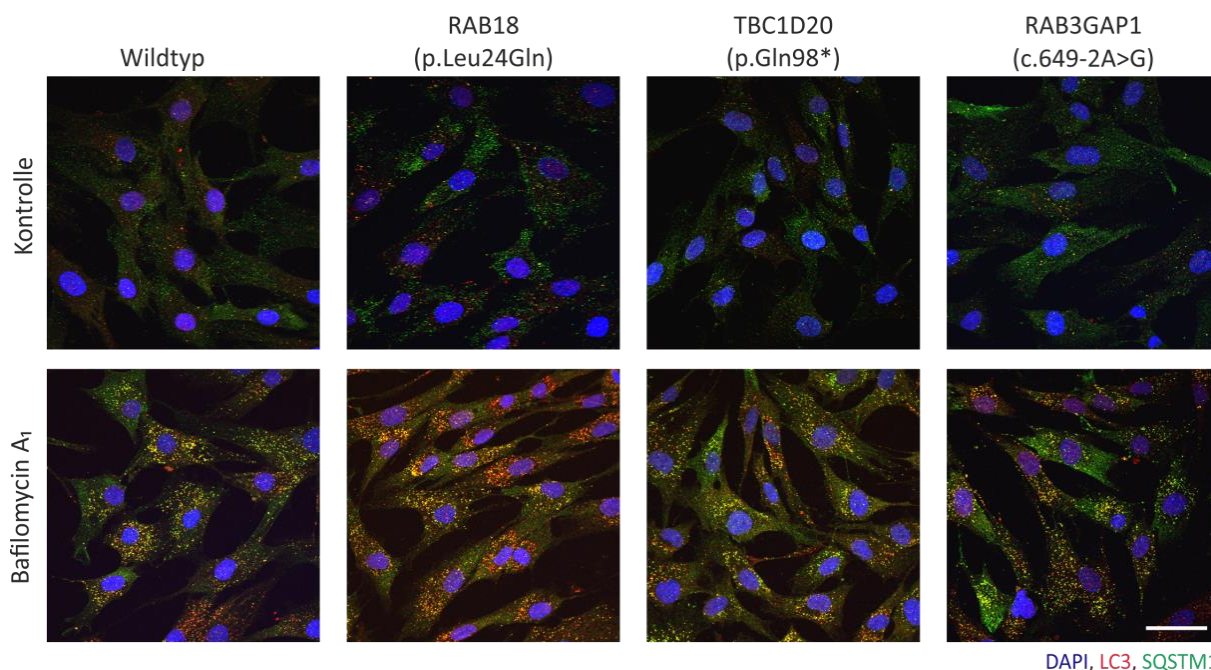
Proteine, anders als der kurzfristige Verlust während der transienten Transfektion, keinen erkennbaren Einfluss auf die Autophagie zu haben.



**Abbildung 31: Analyse der autophagischen Aktivität in Warburg-Mikro-Syndrom Patientenzelllinien.** A) Western Blot Analyse der Autophagie der mutanten Patientenzelllinien im Vergleich zu wildtypischen Zellen. Die Fibroblasten wurden mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 4 - 12 % NuPAGE Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II Bande und der DMSO behandelten LC3-II ermittelt. n = 5, t-Test. B) Statistische Auswertung der Proteinspiegel von RAB18, TBC1D20, RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in den Patientenzelllinien. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001, n = 5, t-Test.

Zusätzlich zu der Analyse der autophagischen Aktivität mittels Western Blot wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Patientenzelllinien angefertigt um den Einfluss der Mutationen auf die Autophagie zu untersuchen.

Wie bereits in den Western Blot Analysen zeigte sich kein Unterschied in der autophagischen Aktivität zwischen den drei Mutanten Patientenzelllinien, im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle (Abb. 32). Die Zahl der detektierten Autophagosomen war unter basalen Bedingungen wie auch nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung gleich. Dies bestätigt, dass die Autophagie in den Patientenzellen, durch den Funktionsverlust der Proteine nicht beeinträchtigt beeinflusst wurde.

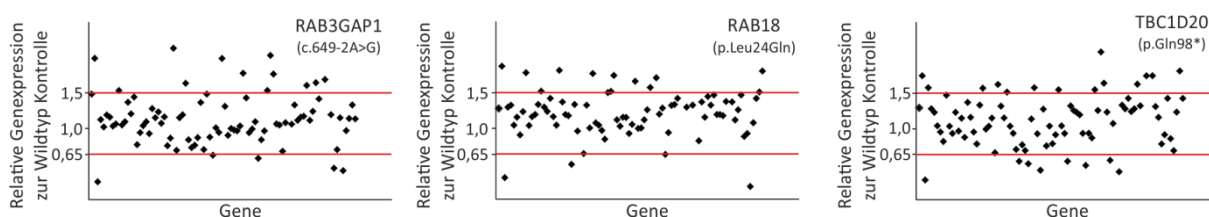


**Abbildung 32: Konfokale Aufnahmen von Autophagosomen in Warburg-Mikro-Syndrom Patientenzelllinien.** Die Zellen wurden mit DMSO und mit Bafilomycin A<sub>1</sub> behandelt. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Maßstabsskala = 50 µm.

### 3.5.2. Patientenzelle weisen eine veränderte Genexpression von Autophagie-relevanten Genen auf

Im Gegensatz zu der transienten genetischen Manipulation von RAB3GAP1/2, RAB18 und TBC1D20 wiesen die untersuchten WARBM Syndrom Patientenzellen keine veränderte autophagische Aktivität auf. Dies lässt den Schluss zu, dass der dauerhafte Verlust der Funktion von RAB3GAP1/2, RAB18 und TBC1D20 durch die Zelle kompensiert werden kann. Um Aufschluss über mögliche Anpassungen des Autophagienetzwerkes in den Patientenfibroblasten zu erhalten, wurde untersucht, ob Autophagie-relevante Gene eine veränderte Expression zeigen. Für diese Analyse wurde die *Human Autophagy Primer Library* von Biomol verwendet, die mit 88 Primern für Autophagie-relevante Gene und 8 Primern für Referenzgene versehen ist (siehe Anhang unter 8.2). Es zeigte sich, dass die meisten Gene keine Veränderung in ihrer Expression aufwiesen (Abb. 33). Allerdings konnte beobachtet werden, dass einige interessante Gene hochreguliert wurden, die den Verlust der WARBM-assoziierten Proteine erklären könnte (Abb. 34).

## Ergebnisse



**Abbildung 33: Analyse der relativen Expression Autophagie-relevanter Gene in WARBM Patientenzellen.** Die relative Veränderung der Genexpressionen unterschiedlicher Gene wurde mittels *Real Time PCR* im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle analysiert. Die Analyse wurde in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Alle Gene, welche sich ober bzw. unterhalb der roten Linien befinden, die eine 1,5-fache Regulation definieren wurden verstärkt bzw. vermindert exprimiert. n = 3

Zelllinie Gene	RAB18 (p.Leu24Gln)	TBC1D20 (p.Gln98*)	RAB3GAP1 (c.649-2A>G)
AMBRA1	↑	↑	↑
ATG2B	↑	↑	↑
ATG4D	↑	X	↑
APOL1	↓	↓	↓
DRAM	↑	X	↑
GABARAPL2	↑	↑	↑
LETM1	↑	X	↑
MAP1LC3	↓	↓	↓
RAPTOR	↑	↑	↑

**Abbildung 34: Zusammenfassung der regulierten Gene der WARBM Patientenfibroblasten.**

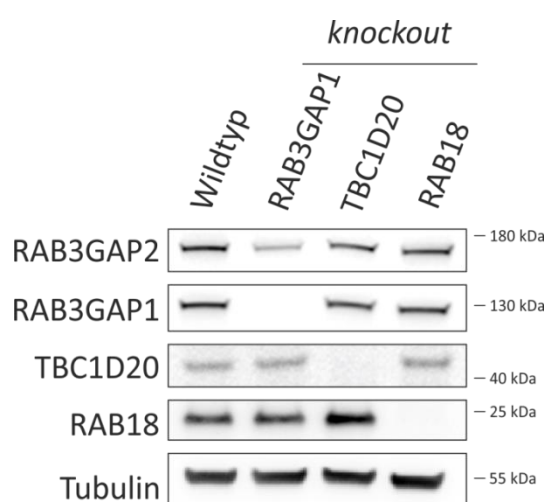
Die Untersuchung der zellulären autophagischen Aktivität in Patientenzelllinien des WARBM Syndroms zeigte, dass die Autophagie durch die *Loss-of-function* Mutationen in RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20 nicht beeinflusst wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine funktionelle Kompensation durch eine veränderte Expression von Autophagie-relevanten Genen, die durch die Analyse der *Human Autophagy Primer Library* aufgezeigt wurde.

### 3.6. HeLa *knockout* (KO) Zellen als Modellsystem für das WARBM Syndrom

Die WARBM Syndrom Patientenfibroblasten zeigten trotz des Funktionsverlusts von RAB3GAP1, RAB18 oder TBC1D20 keine sichtbare Veränderung der autophagischen Aktivität. Natürlich sollte diese interessante Erkenntnis weiter vertieft werden und insbesondere die Idee der funktionellen Kompensation weiter verfolgt werden, aber wie dargestellt, stehen die WARBM Syndrom Zellen nicht außerhalb Edinburghs zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde unter Verwendung des *CRISPR/Cas9* Systems stabile HeLa *knockout* (KO) Linien für RAB3GAP1 und RAB18 hergestellt. Die verwendeten HeLa TBC1D20 KO Zellen wurden von Dr. Mark Handley, Edinburgh, zur Verfügung gestellt.

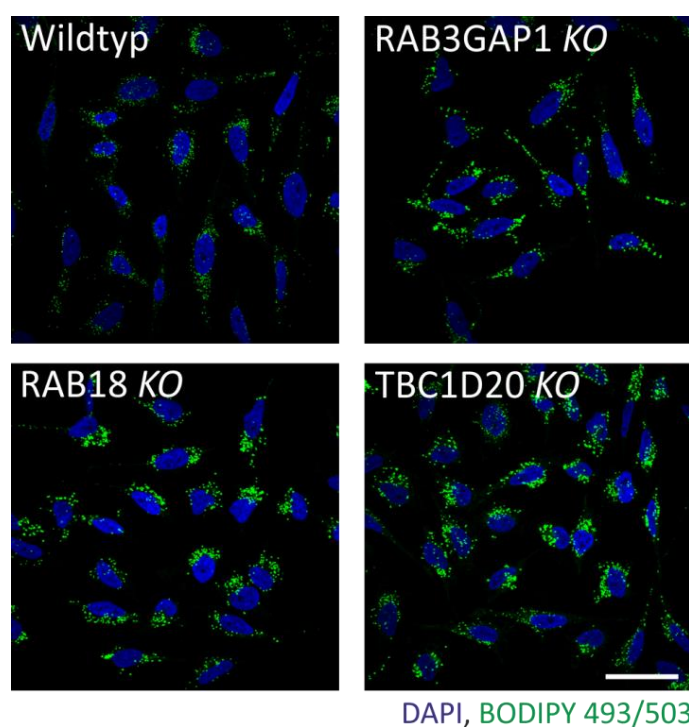
#### 3.6.1. HeLa KO Zellen ähneln den Patientenzellen des Warburg Mikro Syndroms

Da das WARBM Syndrom auf *loss-of-function* Mutationen beruht wurden HeLa KO Zellen für RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20 generiert, die als Modellsystem für detaillierte Untersuchung zellulärer Veränderungen dienen sollten. Der erfolgreiche KO in den Zellen wurde mittels Western Blot Analyse bestätigt (Abb. 35). Dabei wurde zusätzlich festgestellt, dass die Proteinspiegel von RAB18 in den TBC1D20 KO Linien erhöht waren (Abb. 35). Diese Beobachtung wurde auch bei der Untersuchung der Patientenzelllinien gemacht und durch Handley et al. publiziert (Handley et al. 2015). Zudem zeigte sich eine Verringerung der RAB3GAP2 Proteinspiegel in den RAB3GAP1 KO Zellen, was ebenfalls in Patientenzellen mit einer RAB3GAP1 Mutation beobachtet werden konnte und die funktionelle Verbindung beider Proteine im heterodimeren Komplex zeigt.



**Abbildung 35: Herstellung von HeLa *knockout* Zellen mittels *CRISPR/CAS9* System.** Repräsentativer Western Blot des *knockouts* der HeLa Zellen für RAB3GAP1, TBC1D20 und RAB18.

Im Weiteren sollten die *KO* Zelllinien als funktionelles WARBM Syndrom Modellzellsystem charakterisiert werden. Der bisher einzig beschriebene zelluläre Phänotyp in WARBM Syndrom Zellen betrifft die LDs. Diese Lipidspeicherorganellen treten in den Patientenfibroblasten vergrößert auf, was auch in einem WARBM Syndrom Mausmodell (*blind-sterile mouse*) beschrieben wurde (Liegel et al. 2013; Park et al. 2014). Daher wurden die LDs der *KO* Zelllinien untersucht und mit dem fluoreszierenden Lipidmarker BODIPY 493/503 angefärbt. Interessanterweise wurden in der Fluoreszenzmikroskopie vergrößerte LDs in allen drei *KO* Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Abb. 36). Somit wiesen die *KO* Linien eine Veränderung auf, die für das WARBM Syndrom typisch ist.



**Abbildung 36: Die Lipidtröpfchen in HeLa *KO*-Zellen sind vergrößert.** Repräsentative konfokale Aufnahmen von Lipidtröpfchen in HeLa *KO* Zellen für RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20 im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle. Die Lipidtröpfchen der Zellen wurden mit dem Lipidmarker BODIPY 493/503 angefärbt. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Maßstabsskala = 50  $\mu$ m.

**Die durch das *CRISPR/Cas9* System generierten HeLa *KO* Zellen für RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20 zeigten mit vergrößerten LDs den einzigen bislang beschriebenen zellulären Phänotyp. Dies deutet daraufhin, dass sie ein sinnvolles zelluläres WARBM Syndrom Krankheitsmodell darstellen.**

### 3.6.2. Analyse der Autophagie in HeLa *KO* Zellen

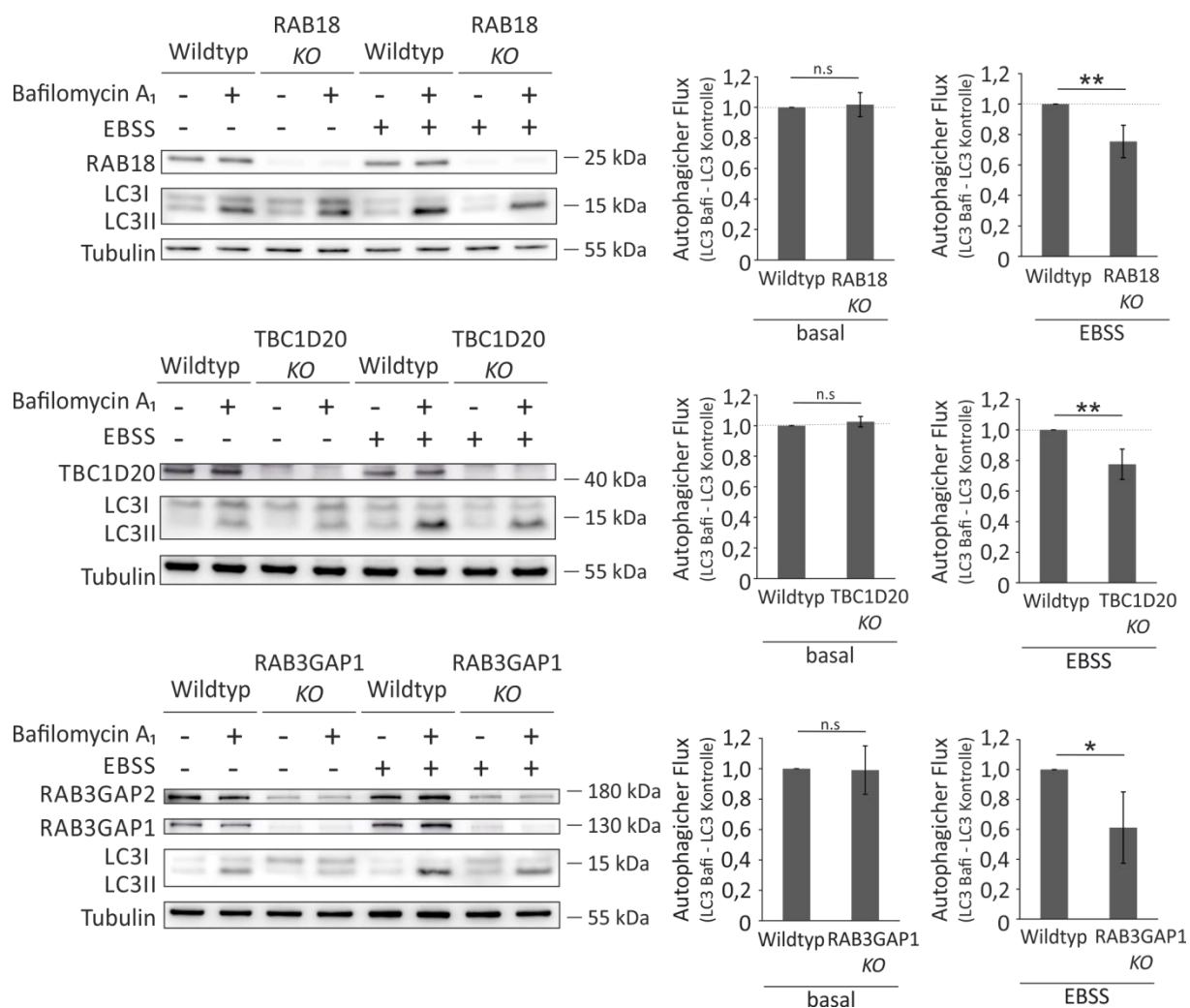
Der transiente *knockdown* oder die transiente Überexpression von RAB3GAP1/2, RAB18 und TBC1D20 zeigte, dass diese Proteine die Autophagie beeinflussen. Interessanterweise konnte diese Funktion in den WARBM Syndrom Patientenfibroblasten, in denen ein permanenter Funktionsverlust dieser Proteine vorliegt, nicht nachgewiesen werden. Die autophagische Aktivität war im Vergleich zu wildtypischen Fibroblasten unverändert und zeigte nicht die erwartete Verringerung.

Daher sollte im Weiteren die autophagische Aktivität in den HeLa *KO* Zellen untersucht werden, um abzugleichen, ob sie auch dort unverändert ist bzw. zu untersuchen, ob dieser Effekt auch nach der Induktion der Autophagie vorliegt.

Interessanterweise wurde, ähnlich wie in den *loss-of-function* Patientenzelllinien, bei der Untersuchung des Fluxes von LC3-II unter basalen Bedingungen kein Unterschied zwischen den *KO* Zelllinien und der wildtypischen Kontrolle festgestellt (Abb. 37). Die Autophagie war also auch in den permanent *KO* Linien unverändert, was den Erkenntnissen aus den Patientenfibroblasten entspricht. Zusätzlich wurde die autophagische Aktivität auch nach Induktion der Autophagie analysiert, um zu untersuchen, ob der *KO* von RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20 auf einen verstärkten autophagischen Flux auswirkt. Hierfür wurden die Zellen in ein Hungermedium überführt, was zu einer raschen Autophagieinduktion führte (Abb. 37).

Unter diesen Bedingungen wurde beobachtet, dass in den drei *KO* Zelllinien im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle keine Induktion der Autophagie auftrat und die autophagische Aktivität stark verringert war (Abb. 37). Dieses Ergebnis wurde auch nach Behandlung mit Rapamycin, eine weitere Methode zur Induktion der Autophagie, beobachtet (Daten nicht aufgeführt). Die Autophagie in den *KO* Zellen ist somit nicht induzierbar.

## Ergebnisse



**Abbildung 37: Analyse der autophagischen Aktivität in HeLa KO Zellen unter basalen Bedingungen und nach Induktion der Autophagie mittels Starvation.** Western Blot Analyse der Autophagie nach dem KO von RAB18, TBC1D20 und RAB3GAP1 im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle. Die Zellen wurden in Hungermedium (EBSS) überführt gleichzeitig mit DMSO oder Bafilomycin A<sub>1</sub> (+) behandelt. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Tubulin verwendet. Die statistische Auswertung des autophagischen Fluxes wurde mittels Subtraktion der nach Bafilomycin A<sub>1</sub> Behandlung erhaltenen LC3-II Bande und der DMSO behandelten LC3-II Bande ermittelt. \*p<0,5, \*\*p<0,01, n = 4, t-Test.

### 3.6.3. KO Zellen zeigen eine veränderte Expression von Autophagie-relevanten Genen

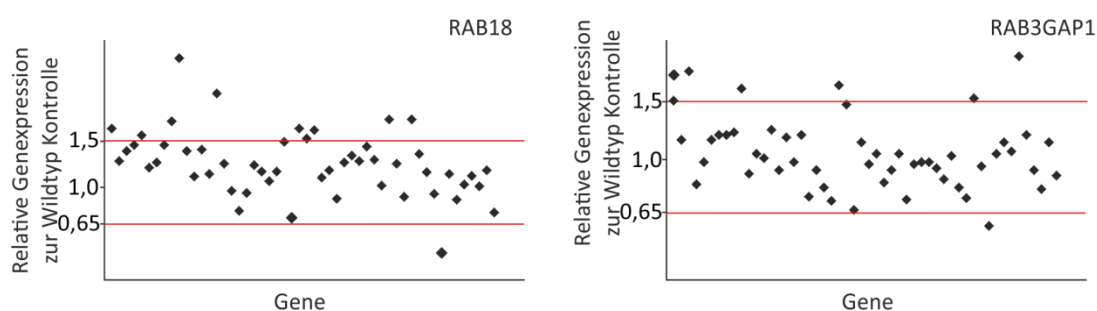
Die Analyse der RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20 KO Zellen demonstrierte, dass sie identische Eigenschaften wie WARBM Syndrom Patientenfibroblasten aufwiesen. Die Analyse der autophagischen Aktivität zeigte, dass der autophagische Flux in den HeLa KO Zellen unter basalen Bedingungen unverändert war. Erst die Induktion der Autophagie bewirkte einen reduzierten autophagischen Flux in den KO Zellen, sodass sich unter diesen Bedingungen einer erhöhten Autophagie der Verlust von RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20 auswirkte. Dies deutet daraufhin, dass der Verlust der WARBM-assoziierten Proteine unter basalen Bedingungen kompensiert werden kann, wodurch die autophagische Aktivität unverändert bleibt. Aufgrund dieser Überlegungen sollte, wie



## Ergebnisse

auch schon in den WARBM Syndrom Patientenfibroblasten, untersucht werden, ob wichtige Komponenten des Autophagienetzwerks oder von vesikulären Transportsystemen reguliert sind und dadurch der *KO* von RAB3GAP1 und RAB18 unter basalen Bedingungen kompensiert werden kann.

Für diese Untersuchungen wurde ein *qPCR Autophagy Array* erstellt, in dem 53 Primer für die wichtigsten Autophagie-relevanten Proteine, Proteine des vesikulären Transportes und die WARBM-assoziierten Proteine vorlagen (siehe Anhang unter 8.3 und 8.4). Die Ergebnisse dieser *qPCR* Analyse sind in Abb. 32 und Abb. 33 dargestellt. Interessanterweise zeigten sich einige regulierte Gene in den *KO* Zellen, die den Verlust der Proteine kompensieren könnten.



**Abbildung 38: *qPCR* Analyse Autophagie-relevanter Gene in RAB18 und RAB3GAP1 HeLa *KO* Zellen.** Die relative Veränderung der Genexpressionen unterschiedlicher Gene wurde mittels *Real Time PCR* im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle analysiert. Die Analyse wurde in drei (RAB18) bzw. zwei (RAB3GAP1) unabhängigen Versuchen durchgeführt. Alle Gene, welche sich ober bzw. unterhalb der roten Linien befinden, die eine 1,5-fache Regulation definieren wurden verstärkt bzw. vermindert exprimiert

Zelllinie Gene	RAB18 KO	RAB3GAP1 KO
ATG2B	↑	×
ATG4D	↑	×
ATG5	↑	↑
Atg12	↑	↑
ATG16L2	×	↑
CALCOCO2	↑	×
GABARAPL2	↑	×
MAP1LC3A	×	↑
LRRK1	↑	×
NBR1	↑	×
RAB26	×	↑
UVRAG	↑	×

**Abbildung 39: Zusammenfassung der regulierten Gene der *KO* Zelllinien.**

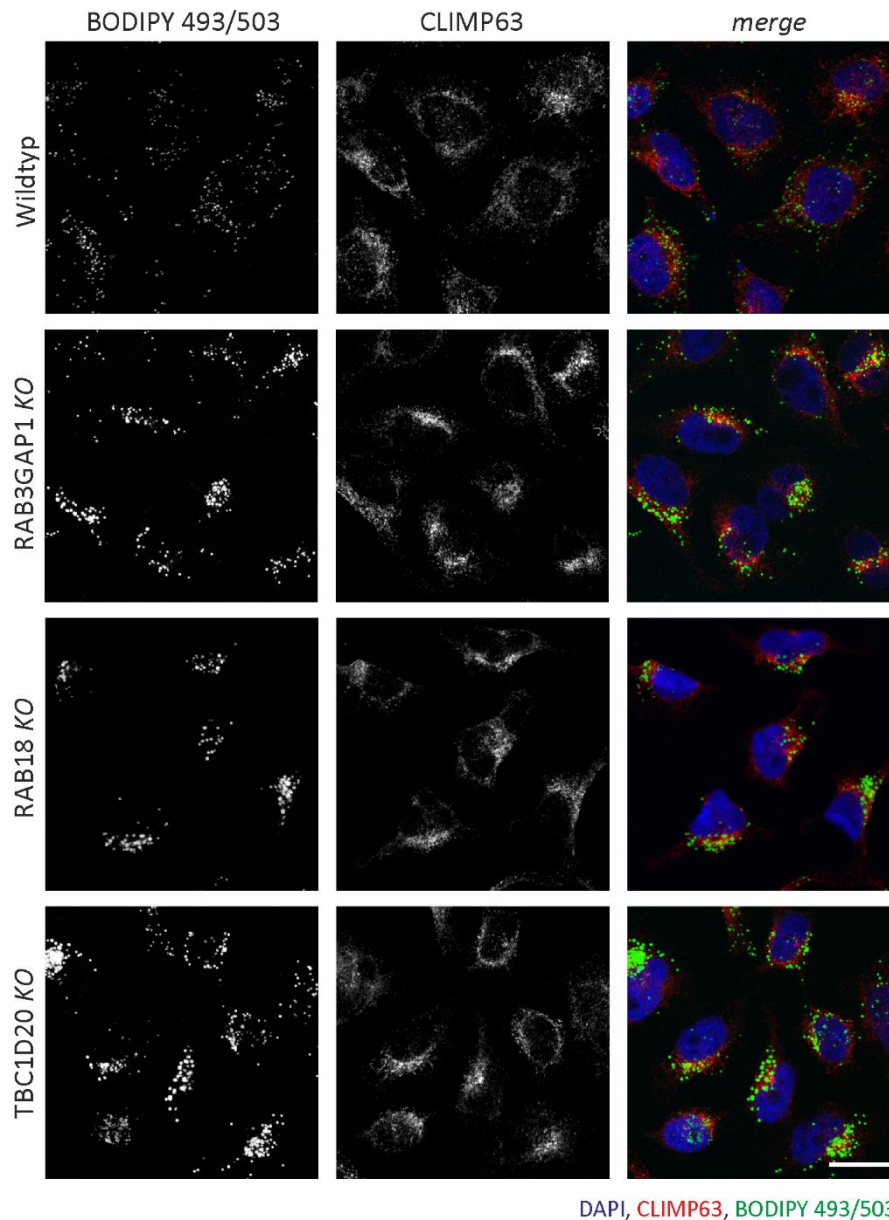
Wie in den WARBM Patientenzellen zeigten die RAB3GAP1, RAB18 und TBC1D20 *KO* Zelllinien keine Veränderung der Autophagie unter basalen Bedingungen. Interessanterweise konnte die Autophagie in den *KO* Zellen allerdings nicht mehr induziert werden und die autophagische Aktivität brach unter induktiven Bedingungen ein. Dies deutet auf einen kompensatorischen Mechanismus hin, der bewirkt, dass die Autophagie in den *KO* Zellen unter basalen Bedingungen praktisch unverändert abläuft. Interessanterweise war in den *KO* Zelllinien die Expression zahlreicher Gene reguliert, deren Proteine an der Bildung von Autophagosomen funktionell beteiligt sind. Dies könnte Teil der zellulären Kompensation sein.

#### **3.6.4. Die Mobilisierung von Fettsäuren aus LDs ist in den HeLa *KO* Zelllinien verringert**

LDs besitzen für den Lipidmetabolismus sowie für die Energieversorgung der Zelle eine wichtige Funktion. Darüber hinaus sind sie auch für die Biogenese von Membranen entscheidend (Guo et al. 2009).

In den HeLa *KO* Zellen wurde beobachtet, dass nicht nur die Größe der LDs im Vergleich zu wildtypischen Zellen verändert war, sondern dass sie auch eine veränderte Lokalisation aufwiesen und hauptsächlich perinukleär akkumulierten (Abb. 40).

Um diese Lokalisation am Zellkern genauer zu charakterisieren, wurden LDs und gleichzeitig das ER angefärbt und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei wurde deutlich, dass die großen LDs, die in hoher Zahl in den *KO* Zelllinien auftreten, eng mit dem ER assoziiert waren.



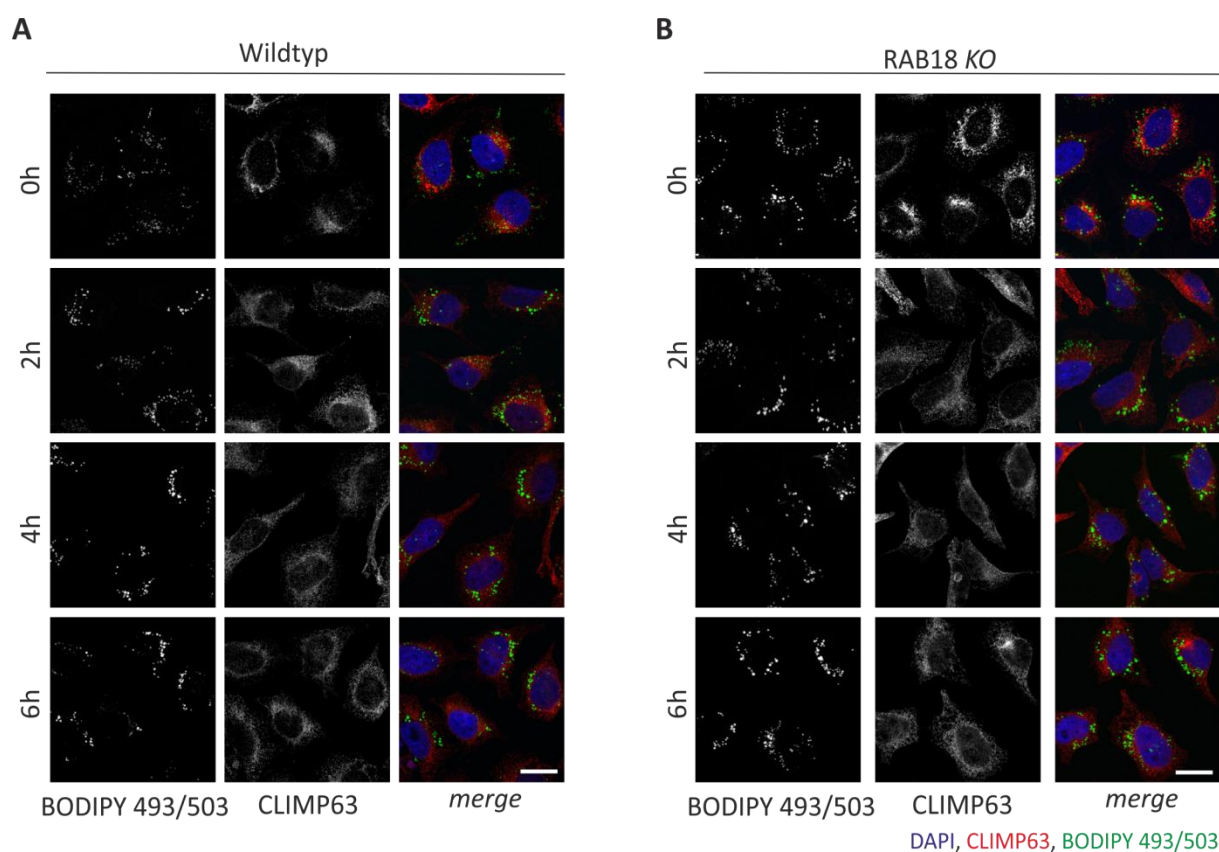
**Abbildung 40: Lokalisation von Lipidtröpfchen in den HeLa KO Zellen.** Repräsentative konfokale Aufnahme von Lipidtröpfchen und deren Lokalisation am ER. Die Lipidtröpfchen wurden mit dem Lipidmarker BODIPY 493/503 angefärbt und das ER mittels Antikörperfärbung (CLIMP63). Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Maßstabsskala = 20  $\mu\text{m}$ .

Es ist bekannt, dass sowohl die Biogenese als auch die Lipolyse der LDs am ER stattfindet (Martin und Parton 2006). Interessanterweise besitzt RAB18 eine Funktion für die Lipolyse am ER. Als *tethering* Protein stellt es die Verbindung zwischen ER und LDs her und reguliert so das „Entladen“ der Lipidtröpfchen am ER (Ozeki et al. 2005, Martin et al. 2005). Somit erklärt ein Verlust von RAB18, dass vergrößerte LDs am ER akkumulierten und durch ein Fehlen von RAB18 nicht mehr abgebaut werden konnten. Auch der Verlust von RAB3GAP1, einem RAB GEF für RAB18, führte dazu, dass die Funktion von RAB18 gestört wurde und so LDs nicht mehr abgebaut werden konnten und am ER akkumulierten. Derselbe Phänotyp wurde auch für die TBC1D20 KO Zellen beobachtet, allerdings konnte bisher noch keine funktionelle Beziehung von TBC1D20 zu RAB18 beschreiben werden.

## Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob die Mobilisierung von Fettsäuren aus den vergrößerten LDs in den *KO* Zelllinien tatsächlich gestört ist, wurden die Zellen in ein Hungermedium überführt welches weder Glucose, Aminosäuren oder Serum enthielt und die Migration bzw. der Gesamtspiegel der LDs im Vergleich zu Wildtypzellen untersucht.

In wildtypischen Zellen wurde beobachtet, dass durch die Nahrungsdepletion die LDs zeitabhängig zum ER wanderten. Nach 6 Stunden konnte zusätzlich beobachtet werden, dass der Gesamtspiegel an LDs deutlich reduziert zu sein schien (Abb. 41 A). Somit konnte durch den Nahrungsmangel der Zellen eine Mobilisation von Fettsäuren aus den Lipidtröpfchen beobachtet werden. In den untersuchten RAB18 *KO* Zellen lagen die LDs dagegen schon unter Kontrollbedingungen (0 h) am ER vor und zeigten weder in der Lokalisation noch in der Gesamtzahl einen Effekt durch das Hungermedium (Abb. 41 B). Somit führt der Verlust von RAB18 dazu, dass LDs nicht oder nur sehr gering über das ER „entladen“ werden können. Der Lipidhaushalt der *KO* Zellen ist somit gestört.



**Abbildung 41: Repräsentative konfokale Aufnahme der Lokalisation von Lipidtröpfchen.** HeLa Zellen wurden mit EBSS Medium für die angegebene Zeit behandelt. Das ER wurde mit CLIMP63 angefärbt und für die Färbung der Lipidtröpfchen wurde der Lipidmarker BODIPY 493/503 verwendet. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Maßstabsskala = 20  $\mu\text{m}$ .

## 4. Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 sind wichtige Komponenten des zellulären Vesikeltransports und der Lipidhomöostase. Interessanterweise führen *loss-of-function* Mutationen zu dem WARBM Syndrom, einer schwerwiegenden Entwicklungsstörung mit ausgeprägter Neuropathologie (Handley et al. 2013; Liegel et al. 2013). Ein zellulärer Mechanismus, der gemeinsam durch die WARBM-assoziierten Proteine gelenkt wird und möglicherweise für die Pathogenese verantwortlich ist, konnte bisher nicht identifiziert werden. Die nun in dieser Arbeit gezeigte Assoziation von RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 mit der Autophagie ordnet den Proteinen eine neue zelluläre Funktion zu. Neben der Verbindung mit der Autophagie wurde zudem gezeigt, dass die Proteine für die Erhaltung der zellulären Proteostase wichtig sind und die Integrität des Proteoms beeinflussen.

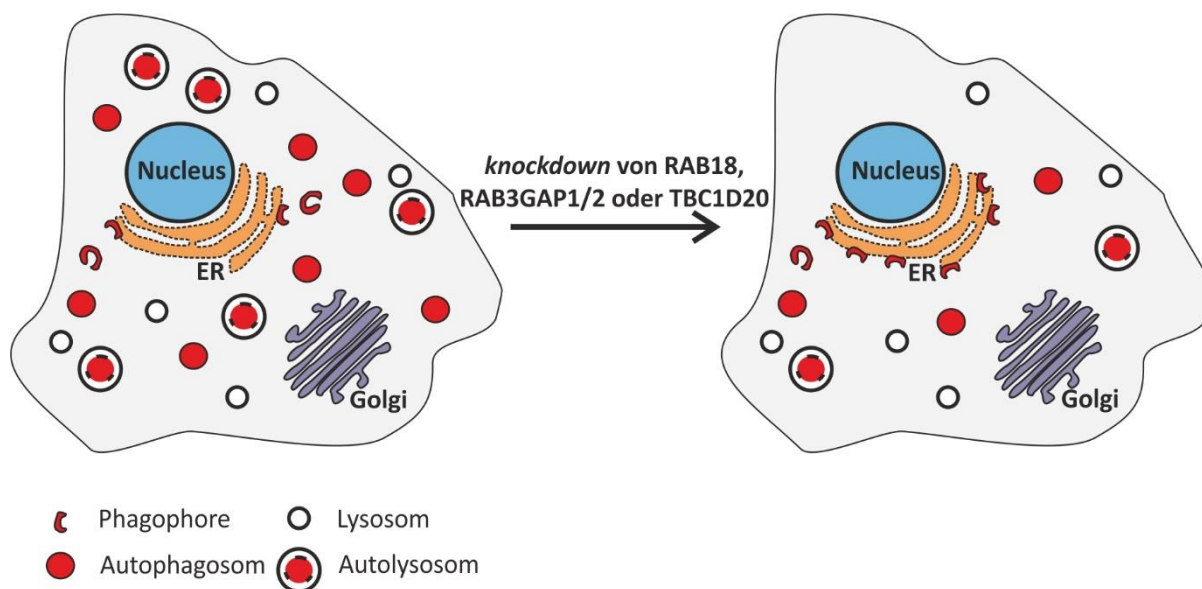
### 4.1. RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 sind positive Modulatoren der Autophagie und beeinflussen die Synthese von Autophagosomen

Die Autophagie ist ein hoch-konservierter eukaryotischer Prozess, der dem Abbau zytoplasmatischer Bestandteile wie Proteinen und Organellen dient (Mizushima und Komatsu 2011). Für das zelluläre Überleben ist die Autophagie von großer Bedeutung und eine Störung ist mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert (Levine und Kroemer 2008; Kroemer 2015).

In dieser Arbeit wurden die RAB GTPase RAB18, RAB3GAP1/2 und das RAB GAP TBC1D20 als neue Faktoren der Autophagie beschrieben. Der transiente *knockdown* der Proteine führte zu einer Verminderung des zellulären autophagischen Fluxes, wohingegen die Überexpression der Proteine die autophagische Aktivität steigerte. Dies demonstriert, dass RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 positive Modulatoren der Autophagie darstellen und ihre Aktivität den Abbau von Zellmaterial fördert, wodurch sie auch die zelluläre Proteostase beeinflussen. Die Modulation der Autophagie wurde sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Induktion beobachtet, was verdeutlicht, dass RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 von großer Bedeutung für den effizienten Ablauf der Autophagie sind. Tatsächlich wurden zahlreiche Proteine, die nicht direkt die Autophagie beeinflussen, erst nach Induktion als Modulatoren des Prozesses identifiziert (McKnight et al. 2012; Popovic et al. 2012).

Durch die Untersuchung der autophagischen Aktivität, der Gesamtzahl an Autophagosomen und prä-autophagosomalen Strukturen wurde gezeigt, dass sich die Reduktion der Autophagie nach *knockdown* von RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 durch die verringerte Synthese von autophagischen Vesikeln erklären lässt (Abb. 42). Insbesondere für RAB3GAP1/2 wurde demonstriert, dass die Proteine die

Elongation der Phagophore beeinflussen und diesen Vorgang modulieren. So konnte durch die siRNA-vermittelte Reduktion der RAB3GAP-Spiegel beobachtet werden, dass ATG5-positive prä-autophagosomale Strukturen (Phagophoren) in den Zellen akkumulieren, die nicht zu Autophagosomen reifen (Abb. 42).



**Abbildung 42:** Der Verlust von RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 führt zu einer verringerten Synthese von Autophagosomen.

Die Autophagie kann als ein Vesikeltransportsystem verstanden werden, da vesikuläre Autophagosomen gebildet und kontrolliert zu Lysosomen transportiert werden. RAB GTPasen und RAB GAPs bzw. RAB GEFs sind entscheidende Faktoren, die den Transport von Vesikeln regulieren und koordinieren und dabei einen effizienten Ablauf garantieren (Frasa et al. 2012; Cherfils und Zeghouf 2013). Im Zusammenhang mit der Autophagie wurden RAB GTPasen und RAB GAPs mit der Synthese von Autophagosomen, dem Transport der Autophagosomen und der Fusion mit Lysosomen assoziiert (Szatmári und Sass 2014; Kern et al. 2015). RAB GTPasen fungieren nach einem zyklischen Prinzip und sind von der Hydrolyse von GTP abhängig (Cherfils und Zeghouf 2013; Novick 2016). Da die Hydrolyseaktivität der RAB GTPasen selbst sehr gering ist, wird dieser Prozess durch RAB GAPs beschleunigt (Cherfils und Zeghouf 2013). Interessanterweise wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Modulation der Autophagie durch RAB18 von RAB3GAP1/2 abhängig ist und andersherum, dass RAB18 notwendig für den Effekt der RAB3GAPs auf die Autophagie ist. Dies legt nahe, dass RAB3GAP1/2 in diesem Prozess als Regulatoren von RAB18 wirken.

Durch *knockdown* Studien von RAB3 wurde gezeigt, dass diese für den RAB3GAP-Komplex namensgebende RAB GTPase keinen Einfluss auf die Autophagie hat und somit für die Autophagiemodulation durch die RAB3GAPs keine Bedeutung besitzt. Interessanterweise wurde aber

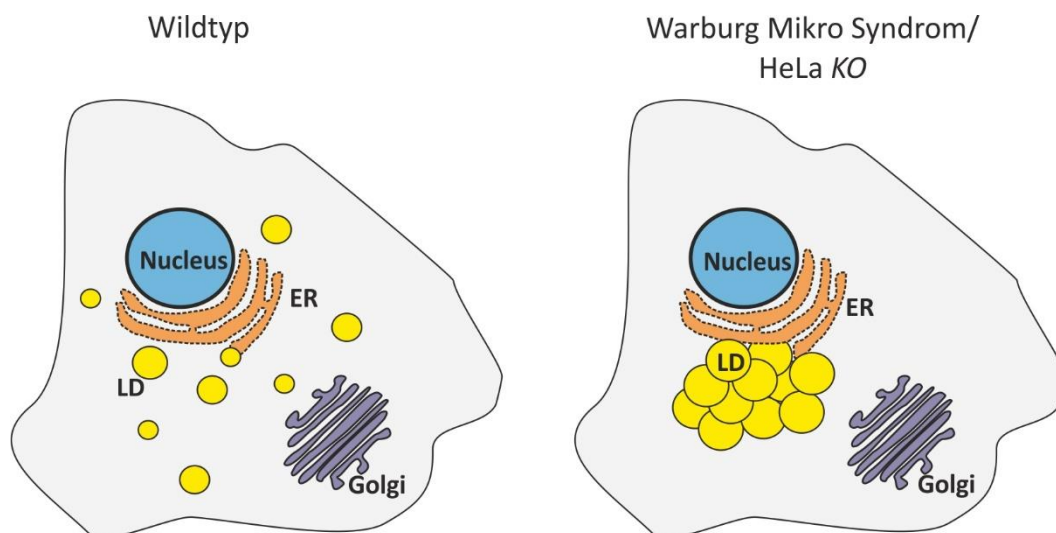
auch gezeigt, dass eine GAP-inaktive Mutante von RAB3GAP1, RAB3GAP1(R728A), ihren Einfluss auf die Autophagie verliert. Somit scheint die GAP-Aktivität von RAB3GAP1 für die Modulation der Autophagie entscheidend zu sein. Durch die Arbeitsgruppe von Francis Barr wurden die RAB3GAPs kürzlich als RAB GEFs von RAB18 charakterisiert (Gerondopoulos et al. 2014). RAB GEFs sind Regulatoren der RAB GTPasen, die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren und damit RAB GTPasen aktivieren. In dieser Arbeit wurde eine funktionelle Verbindung von RAB18 und RAB3GAP1/2 bei der Beeinflussung der Autophagie identifiziert und gezeigt, dass diese stimulierend war. Daher ist anzunehmen, dass die RAB3GAPs als RAB GEFs auf RAB18 wirken und die Modulation der Autophagie durch die RAB GTPase vermitteln. Bis heute wurde, neben der klar definierten GAP-Domäne in RAB3GAP1, allerdings keine GEF-Domäne identifiziert. Durch die Untersuchung der GAP-inaktiven Mutante wurde aber deutlich, dass auch die GEF-Aktivität von dieser Region abhängig sein muss.

Der RAB3GAP-Komplex ist sehr untypisch, denn er besitzt als einziges bekanntes RAB GAP keine GAP-spezifische TBC-Domäne (Clabecq et al. 2000). Darüber hinaus besteht der Komplex als einziges RAB GAP aus zwei Untereinheiten, RAB3GAP1 und RAB3GAP2, die insgesamt die beachtliche Masse von 280 kDa aufweisen. Aufgrund dieser Besonderheiten scheint es möglich, dass der RAB3GAP-Komplex tatsächlich sowohl eine RAB GAP als auch eine RAB GEF Funktion besitzt. Es wurde gezeigt, dass für die RAB GEF Funktion des RAB3GAP-Komplexes beide Untereinheiten in Frage kommen (Gerondopoulos et al. 2014), wohingegen die RAB GAP Aktivität allein in RAB3GAP1 zu finden ist (Clabecq et al. 2000). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass sich die GEF-Domäne über beide Untereinheiten erstreckt. Ihre exakte Identifikation ist Bestandteil zukünftiger Untersuchungen.

Durch die Charakterisierung von RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 als positive Modulatoren der Autophagie stellt sich die Frage, an welcher Stelle und auf welche Weise die Proteine die Autophagie beeinflussen. Die Autophagie ist ein komplexer und dynamischer Prozess, weshalb es für die Zelle eine große Herausforderung darstellt, unter wechselnden und im Extremfall induktiven Bedingungen genügend Lipide und Membranen für die Synthese von Autophagosomen zur Verfügung zu stellen ohne dabei andere Vesikeltransportsysteme zu beeinflussen. Der genaue Ursprung der Lipide für die autophagosomale Biogenese ist nicht eindeutig geklärt, aber für das ER, den Golgi, Mitochondrien, die Plasmamembran und auch LDs wurde beschrieben, dass sie potentielle Membran- und Lipidquellen darstellen (Hailey et al. 2010; Ravikumar et al. 2010; Tooze und Yoshimori 2010; Yen et al. 2010; Dupont et al. 2014). Zudem wurde gezeigt, dass die Membranquellen in einer hierarchischen Kaskade je nach Bedingungen variieren und unterschiedliche Organellen als Quelle für die Bildung der Autophagosomen dienen können (Puri et al. 2013). Allerdings wurden bisher noch keine Proteine in der autophagosomalen Membran gefunden, die auf bestimmte Kompartimente hindeuten (McEwan und Dikic 2010). Die Autophagosomen könnten also auch *de novo* am ER gebildet werden. Hierbei sollen vor allem LDs eine große Rolle spielen, die Fettsäuren für die Membransynthese zur Verfügung

stellen. So wurde gezeigt, dass LDs für die Synthese von Autophagosomen wichtig sind und durch ein Fehlen dieser der Abbau über die Autophagie gestört wird (Dupont et al. 2014; Deretic 2015; Shpilka und Elazar 2015). Shpilka *et al.* demonstrierten, dass der Kontakt zwischen LDs und ER essentiell für die effiziente Synthese von Autophagosomen ist und identifizierten Lipasen, welche die Mobilisierung von Neutralfetten aus LDs in das ER unterstützen (Shpilka et al. 2015). Auch in Säugerzellen konnte dieser Mechanismus der Lipidbereitstellung gezeigt werden. Hierbei wurde die Phospholipase PNPLA5 (*patatin like phospholipase domain containing 5*) entdeckt und ihre Bedeutung für die Elongation der Phagophore beschrieben (Dupont et al. 2014).

Fettsäuren werden aus LDs mobilisiert und im ER in Lipide umgewandelt, die dann für die Elongation der Phagophore zur Verfügung stehen (Girardi et al. 2011). Interessanterweise ist RAB18 funktionell eng mit dem Metabolismus von LDs assoziiert und stellt ein Bindeglied zwischen den Lipidspeicherorganellen und dem ER dar (Martin et al. 2005; Ozeki et al. 2005; Pulido et al. 2011). In dieser Arbeit wurden auch RAB3GAP1/2 an LDs lokalisiert und ko-lokalisierten dort mit Proteinen der Atg8 Familie. Daher vermuten wir einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Autophagiemodulation durch RAB18, RAB3GAP1/2 und den LDs. Dieser Zusammenhang wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der bislang einzig beschriebene zelluläre Phänotyp von WARBM Patientenfibroblasten vergrößerte LDs sind (Liegel et al. 2013). Dieser auffällige Phänotyp wurde auch in dem für diese Arbeit generierten zellulären Krankheitsmodell, den HeLa *KO* Zellen gezeigt. In diesen Zellen lagen ebenfalls vergrößerte LDs vor, die am ER akkumulierten (Abb. 43).

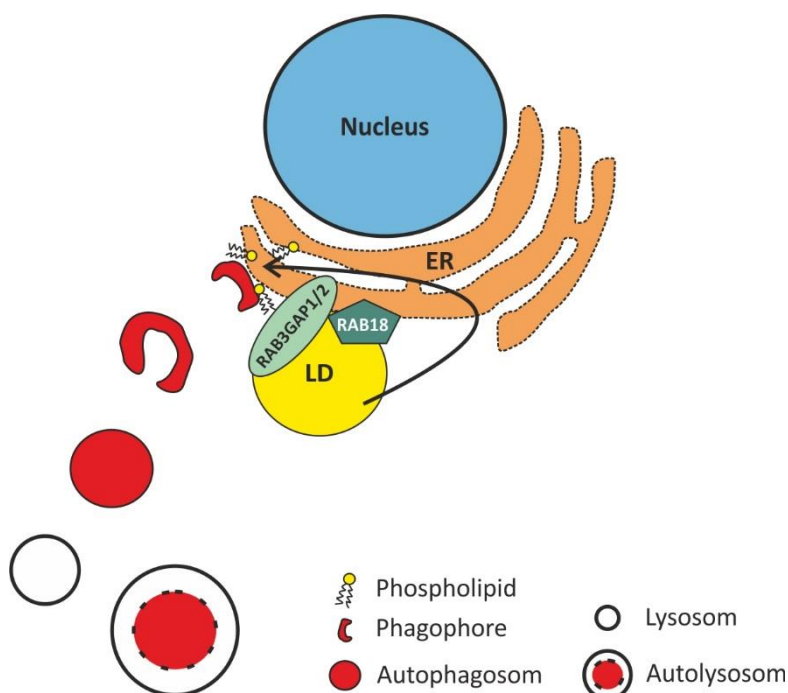


**Abbildung 43:** Schematische Darstellung der Lipidtröpfchen einer WARBM Zelle bzw. HeLa *KO* Zelle im Vergleich zu einer wildtypischen Zelle.

Wir vermuten, dass durch den Funktionsverlust bzw. *KO* von RAB18 die Mobilisierung von Fettsäuren aus den LDs gestört ist und diese deswegen vergrößert am ER akkumulieren.



Die Kontaktstelle zwischen LDs und ER ist von besonderer Bedeutung für die Entstehung und den Abbau der LDs und die RAB GTPase RAB18 stellt als *tethering* Protein den Kontakt zwischen beiden her. Interessanterweise ist die Lokalisation von RAB18 an LDs von der Aktivität der RAB GTPase abhängig (Martin et al. 2005; Ozeki et al. 2005). Nur die aktive GTP-gebundene Form von RAB18 bindet an LDs und RAB3GAP1/2 sind, als RAB GEFs, womöglich entscheidend für diesen Prozess. Somit würde RAB18 (stimuliert durch die RAB3GAPs) die Bereitstellung von Lipiden, die für den effizienten Ablauf der autophagosomalen Biogenese notwendig ist, maßgeblich beeinflussen. Dies ist in Abbildung 44 schematisch dargestellt. Wir gehen davon aus, dass RAB3GAP1/2 die RAB GTPase RAB18 aktiviert und dadurch für die Rekrutierung von RAB18 an die LDs verantwortlich ist. RAB18 könnte so den Kontakt zwischen LDs und ER herstellen und die Bereitstellung von Fettsäuren positiv unterstützen. Die Fettsäuren werden anschließend im ER zu Lipiden umgewandelt und in die Neusynthese von autophagosomalen Membranen eingespeist (Abb. 44). Der Verlust von RAB18 führt folglich zu einer Verhinderung dieses Fettsäuretransfers was sich negativ auf die Effizienz der Biogenese von Autophagosomen auswirkt und gleichzeitig den auffälligen LD-Phänotyp in WARBM Patientenfibroblasten und den HeLa *KO* Zellen erklären würde.



**Abbildung 44:** RAB18 und RAB3GAP1/2 regulieren den Fettsäuretransfer zwischen LDs und dem ER und beeinflussen dadurch die Elongation der Phagophore.

TBC1D20 wird bei dieser Hypothese für die Autophagiemodulation durch RAB18 und RAB3GAP1/2 nicht berücksichtigt, da das Protein durch die Arbeitsgruppe von D.J. Sidjanin mit der Synthese von

Autophagosomen assoziiert wurde und gezeigt wurde, dass dies über die RAB GTPase RAB1 vermittelt wird (Sidjanin et al. 2016). Wir gehen also davon aus, dass die Funktion von TBC1D20 für die Autophagie nicht über RAB18 vermittelt ist.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 erstmals als positive Modulatoren der Autophagie beschrieben werden. Die autophagische Aktivität der Zelle wurde durch den Verlust bzw. die Überexpression der Proteine moduliert und mechanistisch mit der Beeinflussung der autophagosomalen Biogenese verbunden. Interessanterweise führen *loss-of-function* Mutationen in den untersuchten Proteinen zum WARBM Syndrom, einer schwerwiegenden Entwicklungsstörung. Patientenfibroblasten dieses Syndroms sowie die generierten HeLa *KO* Zellen zeigten denselben auffälligen zellulären Phänotyp vergrößerter LDs (Handley et al. 2013; Liegel et al. 2013). Daher besteht die Möglichkeit, dass der Umsatz dieser Lipidspeicherorganellen durch den Verlust der Proteine gestört ist. Auf dieser Annahme beruht die Hypothese, dass RAB18 und die RAB3GAPs die Bereitstellung von Fettsäuren aus LDs regulieren und durch diesen Prozess die Synthese von Autophagosomen beeinflussen. Die WARBM-assoziierten Proteine RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 wurden also in dieser Arbeit mit der Autophagie, der Proteostase und dem Lipidmetabolismus assoziiert, deren Störung auf einen klaren pathobiochemischen Mechanismus der Entstehung des WARBM Syndroms hindeutet. Die detaillierte Untersuchung dieses Zusammenhanges wird zukünftig ein besseres Verständnis der zellulären Veränderung in WARBM Syndrom Patienten ermöglichen.

#### **4.2. Der RAB3GAP-Komplex: Ein besonderes RAB GAP mit neuronaler Funktion**

In dieser Arbeit wurden RAB3GAP1/2 intensiv bearbeitet, da diese im Vorfeld in Studien mit *C. elegans* und in humanen Fibroblasten mit der Autophagie und Proteostase assoziiert wurden (Feldmann 2013; Spang, Feldmann et al. 2014). Durch diese Arbeit wurden Details über die Wirkungsweise der RAB3GAPs aufgeklärt. Der RAB3GAP-Komplex ist, wie in 4.1 bereits dargestellt, kein gewöhnliches RAB GAP und soll im Folgenden genauer betrachtet werden.

RAB3GAP1 und RAB3GAP2 bilden als einziges RAB GAP einen heterodimeren Komplex, in dem RAB3GAP1 die katalytisch aktive Domäne aufweist und RAB3GAP2 regulative Funktion besitzt (Fukui et al. 1997; Nagano et al. 1998). Interessanterweise weist der RAB3GAP-Komplex keine GAP-spezifische TBC-Domäne auf, die ansonsten in allen bekannten RAB GAPs vorliegt (Pan et al. 2006; Gavriljuk et al. 2012; Frasa et al. 2012). Diese Domäne ist circa 200 Aminosäuren lang, wobei zwei Aminosäuren, Arginin und Glutamin, für die katalytische Aktivität verantwortlich sind (Pan et al. 2006; Barr und Lambright 2010). Interessanterweise befindet sich auch in der katalytischen Untereinheit RAB3GAP1 eine GAP-Domäne, die sich aber grundlegend von der TBC-Domäne unterscheidet. Jedoch

wurde auch für RAB3GAP1 ein bestimmtes Arginin identifiziert, dass für die katalytische Aktivität verantwortlich ist (Clabecq et al. 2000).

Die molekulare Funktion von RAB GAPs besteht darin, die Hydrolyse von GTP zu stimulieren und somit die Inaktivierung von RAB GTPasen zu regulieren. Aus diesem Grund sind sie wichtige Faktoren des zellulären Vesikeltransports (Frasa et al. 2012; Novick 2016). Für viele RAB GAP Proteine wurde gezeigt, dass sie an mehreren zellulären Funktionen beteiligt sind, die sie durch die Regulation unterschiedlicher RAB GTPasen modulieren (Barr und Lambright 2010; Fukuda 2011; Frasa et al. 2012). Der RAB3GAP-Komplex allerdings wurde bisher als einziges RAB GAP allein mit der Regulation der RAB GTPase RAB3 assoziiert (Fukui et al. 1997) und angenommen, dass dieser Komplex aufgrund der fehlenden TBC-Domäne keine weiteren zellulären Prozesse kontrolliert (Barr und Lambright 2010).

RAB3 ist ein wichtiger Faktor des synaptischen Vesikeltransports und vermittelt somit die neuronale Neurotransmitter- und Neurohormonfreisetzung (Sudhof 2004; Sakane et al. 2006). Die Bedeutung der RAB3GAPs für RAB3 und die Neurotransmission wurde unter anderem in der RAB3GAP1 *KO* Maus untersucht (Sakane et al. 2006). Der Verlust von RAB3GAP1 resultiert in der Akkumulation von GTP-gebundenen RAB3 an der Plasmamembran der Synapse, wodurch der synaptische Vesikelkreislauf gestört wird (Sakane et al. 2006). Auch in *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass RAB3GAP wichtig für die neuronale Homöostase ist und diese nach einem *knockout* gestört ist (Muller et al. 2011).

Der RAB3GAP-Komplex wurde also ursprünglich mit der Regulation von RAB3 in Verbindung gebracht und ihm dadurch eine rein neuronale Funktion zugeschrieben. Erst durch diese Arbeit wurden die RAB3GAPs mit weiteren zellulären Funktionen assoziiert und gezeigt, dass die Proteine den autophagischen Abbau über die Stimulation der RAB GTPase RAB18 beeinflussen (Feldmann et al. 2017). Interessanterweise stimulieren RAB3GAP1/2 die Aktivität von RAB18 als RAB GEF (Gerondopoulos et al. 2014). Die RAB3GAPs sind somit die ersten beschriebenen Proteine, die sowohl eine GAP- als auch eine GEF-Funktion besitzen. Bisher konnten drei konservierte GEF-Domänen beschrieben werden, die VPS9-Domäne, die DENN-Domäne und die SEC2-Domäne (Carney et al. 2006; Barr und Lambright 2010; Marat et al. 2011). Neben diesen drei GEF-Domänen gibt es zudem noch ein weiteres GEF, den TRAPP-Komplex (Carney et al. 2006; Barrowman et al. 2010; Barr und Lambright 2010; Marat et al. 2011). Bis heute ist es allerdings noch nicht gelungen, die GEF-Domäne in RAB3GAP1/2 zu charakterisieren und ihre genaue Identifikation bedarf weiterer Untersuchungen.

Anders als es im Feld lange vermittelt wurde besitzt also auch der RAB3GAP-Komplex ein breiteres Funktionsspektrum. Dieser Zusammenhang wurde durch die, parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Interaktomstudien von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 gezeigt (Spang, Feldmann et al. 2014). Das Interaktom von RAB3GAP1 und auch RAB3GAP2 zeigte interessante Interaktionspartner auf. Dazu gehörte unter anderem DNAJC13, welches bisher als Bestandteil des Retromer-Komplexes beschrieben wurde und funktionell mit dem retrograden Transport am frühen Endosom assoziiert

wurde (Popoff et al. 2009; Shi et al. 2009). Interessanterweise wurde DNAJC13 kürzlich direkt mit der Autophagie und der zellulären Proteostase in Verbindung gebracht (Besemer et al. 2017, unter Begutachtung).

Das Funktionsspektrum der RAB3GAPs umfasst nun also unter anderem die Inaktivierung von RAB3 und damit die Regulation des synaptischen Vesikeltransports und zudem die Aktivierung von RAB18 und die Stimulation der Autophagie bzw. die Erhaltung der Proteostase. Interessanterweise sind insbesondere altersassoziierte neurodegenerative Erkrankungen mit der starken Akkumulation von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen verbunden (Ross und Poirier 2004). Zudem sind gealterte Neurone durch eine veränderte Neurotransmission wie auch eine reduzierte autophagische Aktivität gekennzeichnet (Riddle 2007; Bishop et al. 2010). Die RAB3GAPs stellen Faktoren dar, die diese Prozesse beeinflussen und sind somit ein attraktives Ziel, um diese zu modulieren und möglicherweise während der Zellalterung zu stabilisieren. Interessanterweise wurde in primären Neuronen gezeigt, dass Autophagosomen am distalen Ende gebildet und anschließend zum Soma transportiert werden wo sie mit Lysosomen verschmelzen und abgebaut werden (Maday et al. 2012). In der Synapse könnten die RAB3GAPs daher sowohl für die Synthese der Autophagosomen, vermittelt über RAB18, als auch die Neurotransmitterfreisetzung, vermittelt über RAB3, regulieren und somit die Autophagie als auch die neuronale Homöostase beeinflussen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass RAB3GAP1/2 einen außergewöhnlichen Proteinkomplex bilden, der sowohl ein RAB GAP als auch ein RAB GEF für unterschiedliche RAB GTPasen darstellt. Zusätzlich verbinden die RAB3GAP1/2 durch ihre Beeinflussung der Neurotransmission als auch der Autophagie zwei wichtige Aufgaben in neuronalen Zellen miteinander. Dies impliziert, dass die RAB3GAPs für die Funktionalität von Neuronen von großer Bedeutung sind und könnte die stark neurologische Ausprägung des WARBM Syndroms erklären.

#### **4.3. *Loss-of-function* Mutationen von RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 beeinflussen die Autophagie: Auswirkung auf das Warburg Mikro Syndrom**

Das WARBM Syndrom ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Entwicklungsstörung, welche unter anderem durch schwerwiegende Gehirnfehlbildungen, eine gestörte neurologische Entwicklung und mentale Retardation gekennzeichnet ist (Handley et al. 2013). Als ursächlich wurden zuerst *loss-of-function* Mutationen in RAB3GAP1 und RAB3GAP2 beschrieben (Aligianis et al. 2005; Aligianis et al. 2006; Morris-Rosendahl et al. 2010; Borck et al. 2011) und später auch Mutationen in RAB18 und

TBC1D20 entdeckt (Bem et al. 2011; Liegel et al. 2013). Interessanterweise sind die Phänotypen der vier mutierten Gene klinisch nicht zu unterscheiden, was daraufhin deutet, dass alle vier Proteine denselben zellulären Prozess beeinflussen. Erst durch die hier vorgelegte Arbeit konnte für RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 eine erstmals gemeinsame zelluläre Funktion beschrieben und die Proteine mit der Modulation der Autophagie und der Proteostase verbunden werden. Der bis zu diesem Zeitpunkt einzige identifizierte zelluläre Phänotyp des WARBM Syndroms, ist die Akkumulation vergrößerter LDs, die interessanterweise auch in den von uns generierten HeLa *KO* Zellen beobachtet wurden. Dies unterstützt die Bedeutung der *KO* Zellen als ein zelluläres Krankheitsmodell des WARBM Syndroms.

LDs sind essentielle Bestandteile des zellulären Lipidhaushalts und dienen der Zelle nicht nur als Speicherorganell, sondern sind zudem wichtig für den Lipidmetabolismus, für die Energieversorgung der Zelle, aber auch für die Biogenese von Membranen (Murphy 2001). Ihr Metabolismus wird maßgeblich durch RAB18 beeinflusst, wobei aktives RAB18 für den Umsatz der LDs am ER während der Lipolyse verantwortlich ist. Dies konnte durch eine spezifische Rekrutierung von RAB18 an bestimmten LDs als Antwort auf eine Stimulation der Lipolyse beobachtet werden (Martin et al. 2005; Ozeki et al. 2005). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LDs während Nahrungsmangel zum ER migrieren, wo Fettsäuren rekrutiert werden und der Zelle als Energiequelle dienen. Interessanterweise akkumulierten die LDs in den RAB18 *KO* Zellen schon unter basalen Bedingungen am ER und konnten auch während der Nahrungsdepletion nicht abgebaut werden. Dies verdeutlicht die Bedeutung von RAB18 für den Umsatz der LDs während der Lipolyse und zeigt, dass durch einen Verlust die Mobilisierung von Fettsäuren aus LDs gestört ist.

Auch für das RAB GAP TBC1D20 konnte eine Verbindung zu LDs gezeigt werden. So vermittelt TBC1D20 durch eine Interaktion mit dem Lipidtröpfchen-assoziierten NS5A die Hepatitis C-Virusreplikation. Hierbei wurde die RAB GTPase RAB1 als regulierender Faktor beschrieben (Sklan et al. 2007; Nevo-Yassaf et al. 2012). Wir können also davon ausgehen, dass TBC1D20 den Lipidmetabolismus über die RAB GTPase RAB1 beeinflusst. Der LD-Phänotyp in WARBM Syndrom Patientenfibroblasten mit einer Mutation in TBC1D20 und den TBC1D20 *KO* Zellen beruht somit sehr wahrscheinlich auf einer gestörten RAB1 Funktion und nicht auf einer Beeinträchtigung der RAB GTPase RAB18.

Die Modulation der Autophagie durch RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 erfolgt vermutlich durch die Mobilisierung von Fettsäuren aus LDs, wodurch sie die Elongation der Phagophore fördern. Der Einfluss der Proteine auf die autophagische Aktivität wurde in dieser Arbeit durch eine transiente genetische Manipulation gezeigt. Die verringerten Proteinspiegel von RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20 führten zu einer Verringerung der autophagischen Aktivität. Durch die Assoziation von *loss-of-function* Mutationen dieser Proteine mit dem WARBM Syndrom, sollte untersucht werden, ob auch in Patientenzellen und HeLa *KO* Zellen eine Veränderung des autophagischen Abbaus vorliegt.

Erstaunlicherweise war die Autophagie unter basalen Bedingungen in den untersuchten Zellen nicht verändert. Erst durch die Induktion der Autophagie wurde eine Veränderung der autophagischen Aktivität in den HeLa *KO* Zellen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen unter basalen Bedingungen den dauerhaften Verlust der Proteine ohne Einbußen für die Autophagie kompensieren können. Erst durch die verstärkte autophagische Aktivität nach Induktion und dem damit verbundenen erhöhten Lipid- und Membranbedarf kommt es zu einer Beeinträchtigung des autophagischen Abbaus. Unter induktiven Bedingungen kann anscheinend der Bedarf an Lipiden, die für die Elongation der Phagophore benötigt werden, nicht mehr ausreichend von der Zelle gedeckt werden, was zu einer Reduktion der autophagischen Aktivität führt. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass die Zelle den Verlust von RAB18 und die damit verbundene Beeinträchtigung der Autophagie unter basalen Bedingungen kompensiert.

Die Untersuchung Autophagie-relevanter Gene, als mögliche kompensatorische Antwort, zeigte, dass einige interessante Veränderungen in den Patientenzellen und den HeLa *KO* Zellen vorlagen. So wurden vor allem Gene hochreguliert, die für Proteine codieren, welche für die autophagosomale Biogenese essentiell sind. Zu diesen Faktoren zählt z. B. ATG2B, welches sowohl mit der Bildung von Autophagosomen als auch mit dem Lipidmetabolismus assoziiert ist (Velikkakath et al. 2012; Pfisterer et al. 2014). Die Funktion von ATG2B liegt also genau dort, wo auch die WARBM-assoziierten Proteine funktionell eingeordnet werden können. Eine Erhöhung der ATG2B Expression könnte ein möglicher Versuch sein, den Verlust der Proteine unter basalen Bedingungen zu kompensieren. Ein kompensatorischer Mechanismus muss die Bereitstellung von Lipiden und Membranen ermöglichen und es wäre denkbar, dass dies über andere Organellen und Kompartimente bewerkstelligt wird. Dieser Zusammenhang soll in zukünftigen Studien analysiert und dabei auch die Frage untersucht werden, ob andere Vesikeltransportwege durch den Funktionsverlust der WARBM Proteine beeinträchtigt sind.

Unter basalen Bedingungen ist die Autophagie in WARBM Zellkultursystemen nicht verändert. Wie sich dies in der *in vivo* Situation im Patienten in unterschiedlichen Zelltypen verhält, ist soweit ungeklärt. Sollte die Autophagie reduziert sein oder im Verlauf der Pathogenese einbrechen, hat dies zusätzlich eine Auswirkung auf die zelluläre Proteostase, denn wie wir zeigen konnten wird diese durch den Verlust der WARBM Syndrom Proteine beeinträchtigt. Ob ubiquitinierte Proteine bzw. Proteinaggregate in den Fibroblasten der Patienten auftreten ist nicht bekannt und würde auf eine Störung der Proteostase hindeuten.

Zusammenfassend wurde durch die Untersuchung der Patientenfibroblasten und der HeLa *KO* Zellen gezeigt, dass der Funktionsverlust von RAB18, RAB3GAP1 und TBC1D20 keinen Einfluss auf die basale Autophagie besitzt. Dies könnte womöglich durch einen kompensatorischen Mechanismus erklärt

werden, der dafür verantwortlich sein muss, dass Lipide und Membranen aus anderen Quellen zur Verfügung gestellt werden. Die Hochregulation von wichtigen Genen für die autophagosomale Biogenese unterstützt dann die Effizienz der Autophagosomensynthese. Allerdings reicht diese kompensatorische Wirkung nach der Induktion der Autophagie nicht aus und der autophagische Abbau wird gestört. Der exakte Mechanismus wurde allerdings noch nicht eindeutig aufgeklärt. Auch ist nicht klar, ob durch die gestörte RAB18 Funktion und der damit verbundenen Beeinträchtigung des Lipidmetabolismus andere Vesikeltransportwege gestört sind, die dann die Pathogenese des WARBM Syndroms beeinflussen.

#### **4.4. Die Bedeutung von RAB18 und RAB3GAP1/2 für die zelluläre Proteostase**

RAB18 und RAB3GAP1 konnten in dieser Arbeit erstmals mit der Modulation der Autophagie in Verbindung gebracht werden und wurden zudem als neue Faktoren des Proteostasenetzes charakterisiert (Spang, Feldmann et al. 2014; Feldmann et al. 2017). In einer gesunden Zelle ist das Verhältnis von Proteinsynthese, -faltung und -abbau im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht wird als Proteinhomeostase, oder kurz Proteostase, bezeichnet und ist von großer Bedeutung für das zelluläre Überleben. Die Aufrechterhaltung der Proteostase wird durch ein komplexes Netzwerk reguliert, welches molekulare Chaperone und zwei proteolytische Abbausysteme, das Ubiquitin-Proteasom-System und die Autophagie, umfasst (Morimoto und Cuervo 2014). Durch eine Störung dieses Netzwerks kann es zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine und geschädigter Organellen kommen, was die Bildung schädlicher Aggregate in der Zelle maßgeblich fördert (Hartl et al. 2011). Neben der Alterung von Zellen sind eine Vielzahl von altersabhängigen Krankheiten wie Krebs-, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und neurodegenerative Krankheiten durch eine veränderte Proteostase charakterisiert. Viele neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, ALS oder auch Chorea Huntington wurden mit einer gestörten Autophagie und der damit einhergehenden Beeinträchtigung des zellulären Proteostasenetzes verbunden. Dies resultiert in der Akkumulation und Aggregation von krankheitsassoziierten Proteinen (Chen et al. 2012; Lynch-Day et al. 2012; Lee et al. 2015; Martin et al. 2015). Die Untersuchung von neuronalen ATG5 KO Mäusen zeigt, dass die Störung der Autophagie zu einer starken Akkumulation von Proteinaggregaten führt und dass dies die neuronale Funktion beeinflusst und schließlich den neuronalen Zelltod bewirkt (Hara et al. 2006). Auch der KO von ATG7 in Nervenzellen resultiert in der Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen und als Folge dessen eine Degeneration der Neuronen (Komatsu et al. 2006).

Die Autophagie ist, als wichtige Säule des Proteostasenetzes, mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Proteostase. Da RAB18 und RAB3GAP1/2 als positive Modulatoren der

Autophagie beschrieben wurden, beeinflussen sie die Proteostase und die Integrität des Proteoms im Ganzen. Bereits in einem siRNA-Screen in *C. elegans* wurde das RAB3GAP1 Ortholog *RBG-1* als ein Bestandteil des zellulären Proteostasenetzwerks identifiziert. Genauer wurde gezeigt, dass die Funktion von *RBG-1* durch eine Modulation der Autophagie erfolgt (Spang, Feldmann et al. 2014).

Um den Einfluss der RAB3GAPs und RAB18 auf die Proteinhomöostase auch im Säugersystem zu analysieren, wurde diese durch verschiedene Behandlungen herausgefordert.

Zuerst wurde der Einfluss der RAB3GAPs auf die zelluläre Proteostase durch die Expression mutanter SOD1 untersucht. Mutante SOD1 besitzt eine hohe Aggregationstendenz und ist mit der Entstehung der ALS verbunden (Cao et al. 2008). Tatsächlich bewirkte die Reduktion der RAB3GAP-Spiegel eine verstärkte Aggregation des mutanten Proteins. Aufgrund der gestörten Autophagie kann die aggregierte Form nach dem Verlust von RAB3GAP1/2 nicht mehr effizient abgebaut werden und akkumuliert daraufhin in der Zelle. Somit wurde erstmalig gezeigt, dass die RAB3GAPs ein Bestandteil des zellulären Proteostasenetzwerks sind und die Stabilität zytoplasmatischer Proteine beeinflussen.

Der Einfluss von RAB18 auf die Proteostase wurde durch die Expression einer zytosolischen Form des Prion Proteins (cytoPrP) und durch Canavanin untersucht.

Das Prion Protein ist mit einer Gruppe von übertragbaren neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Creutzfeldt-Jakob Krankheit, assoziiert (Head und Ironside 2012). Ein Kennzeichen dieser Krankheit ist die Umwandlung des Prion Proteins (PrP<sup>C</sup>) in eine fehlgefaltete Form (PrP<sup>Sc</sup>), welche für die Entstehung von Proteinaggregaten verantwortlich ist und Neurodegeneration bewirkt (Aguzzi und Polymenidou 2004). Canavanin ist ein Aminosäure-Analogon von Arginin und wird anstelle dessen während der Translation in das Protein eingebaut, woraus eine Fehlfaltung der Proteine resultiert. Die fehlgefalteten Proteine werden durch Ubiquitin für den Abbau markiert und tendieren zur Aggregation (Ishida et al. 2013).

Die Expression von cytoPrP sowie die Behandlung mit Canavanin bewirkte eine verstärkte Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen. Die Überexpression von cytoPrP führte zudem zu einer Steigerung der autophagischen Aktivität. Die Zelle reagiert somit auf den erhöhten proteotoxischen Stress mit der Verstärkung der Autophagie, um den Abbau fehlgefalteter Proteine zu beschleunigen. Der gleichzeitige *knockdown* von RAB18 verhindert diese Hochregulation und bewirkt eine vermehrte Akkumulation ubiquitinerter Proteine. Somit konnte auch für RAB18 gezeigt werden, dass die RAB GTPase Bestandteil des zellulären Proteostasenetzwerk ist und durch die Modulation des Proteinabbaus die Integrität des Proteoms beeinflusst.



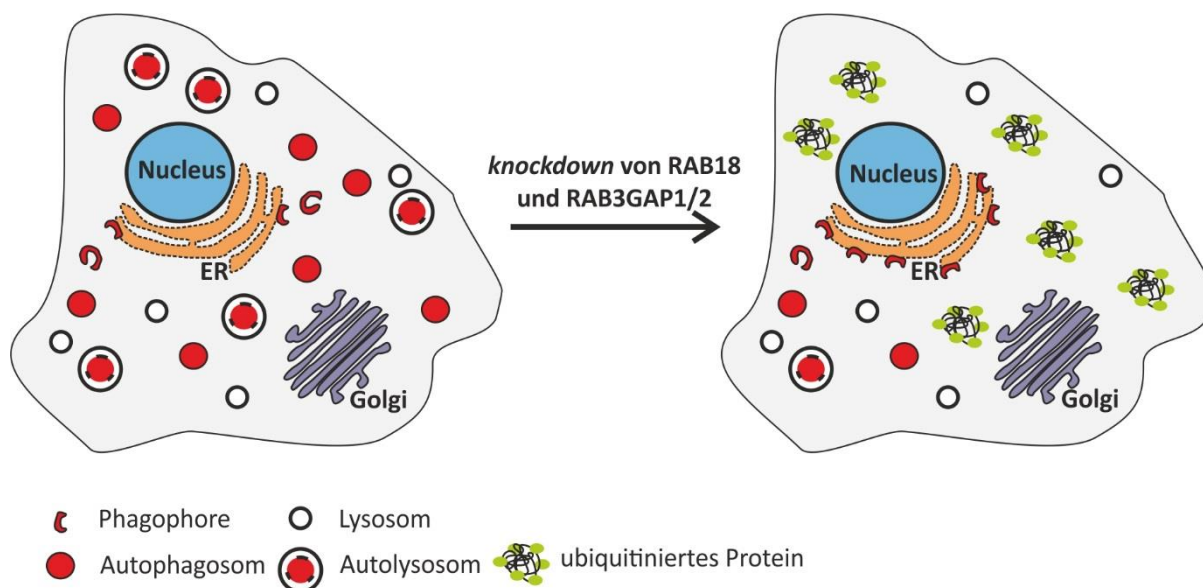


Abbildung 45: Schematische Darstellung des Einflusses von RAB18 und dem RAB3GAP-Komplex auf die Proteostase.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass RAB18 und RAB3GAP1/2 einen positiven Einfluss auf die Autophagie besitzen, wodurch sie auch die zelluläre Proteostase modulieren. Die Effizienz des zellulären Proteostasennetzwerks ist essentiell für das Überleben der Zelle. Eine Störung wurde mit zahlreichen pathologischen Bedingungen assoziiert. Der Funktionsverlust von RAB18 und RAB3GAP1/2 könnte daher eine generelle Rolle für die Ausprägung von Erkrankungen spielen, die durch Störungen der Proteostase charakterisiert sind. Tatsächlich führt eine Mutation in diesen Proteinen zum WARBM Syndrom, welches unter anderem durch schwere neurologische Störungen charakterisiert ist.

#### **4.5. Ausblick**

Die Autophagie ist für die Homöostase und somit für die Vitalität und Funktionalität der Zelle von großer Bedeutung. Eine Störung kann schwerwiegende Auswirkungen haben und wurde bereits mit vielen Erkrankungen assoziiert, dazu gehören Krebserkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen und auch der Alterungsprozess selbst (Choi et al. 2013; Kroemer 2015). Die Aufklärung des genauen Mechanismus der Autophagie und das Zusammenspiel der daran beteiligten Komponenten sind für die Entwicklung möglicher Therapieansätze sehr bedeutsam.

In dieser Arbeit wurden die WARBM-assoziierten Proteine, RAB18, RAB3GAP1/2 und TBC1D20, erstmalig funktionell mit der Autophagie verbunden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass RAB18 und die RAB3GAPs die Elongation der Phagophore beeinflussen, indem sie die Bereitstellung von Fettsäuren aus LDs unterstützen. Durch die Assoziation der WARBM-assoziierten Proteine mit dem Lipidmetabolismus, könnten neben der autophagosomalen Biogenese, noch weitere wichtige Prozesse in der Zelle von einem Funktionsverlust dieser Proteine betroffen sein. Die Störung des Lipidmetabolismus beeinflusst nicht nur die Synthese von Autophagosomen, sondern auch weitere Vesikeltransportwege der Zelle. Eine Störung der Lipidbereitstellung könnte somit weitere Hinweise auf den schwerwiegenden Phänotyp des WARBM Syndroms ermöglichen. Schon früher wurde eine mögliche gestörte synaptische Aktivität mit der Entstehung des Syndroms diskutiert. Eine genauere Aufklärung weiterer Vesikeltransportwege könnte somit ein Hinweis auf weitere mögliche Ursachen dieses schwerwiegenden Phänotyps geben.

## 5. Zusammenfassung

Die Makroautophagie ist ein konservierter, hoch-dynamischer Prozess, durch den Proteine und Organellen in Autophagosomen, eine vesikuläre Doppelmembran, eingeschlossen und kontrolliert zum Lysosom transportiert und dort abgebaut werden.

Ein wichtiger Bestandteil der Autophagie ist die Dynamik von Membranen und Lipiden, welche für den Aufbau der Autophagosomen benötigt werden. Aufgrund dessen ist der Abbauweg der Autophagie stark mit dem intrazellulären Vesikeltransport verbunden. Mitverantwortlich für einen reibungslosen Ablauf des zellulären Vesikeltransport sind Proteine der RAB GTPasen und deren Regulatoren, die RAB GAPs und RAB GEFs. Bisher wurden schon viele RAB Proteine und auch GAPs und GEFs mit dem autophagosomalen Abbau assoziiert und gezeigt, dass diese Proteine die Autophagie sowohl indirekt als auch direkt beeinflussen können.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass die RAB3GAPs, RAB18 und TBC1D20, positive Modulatoren der Autophagie sind und damit auch die zelluläre Proteostase beeinflussen. So führt ein *knockdown* der Proteine zu einer verringerten Autophagie in der Zelle wohingegen die Überexpression der Proteine zu einer Erhöhung der autophagosomalen Aktivität führt.

Die Funktion der Proteine für die autophagosomale Biogenese und die Assoziation der Proteine mit Lipidtröpfchen in der Zelle, könnte darauf hindeuten, dass sie den Lipidtransfer und die Fettsäure Bereitstellung über das ER für die Membranbiogenese regulieren. Somit führt eine Störung der Proteinfunktion zu einer veränderten Biogenese von Membranen.

Das Warburg Mikro Syndrom (WARBM) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung die durch schwerwiegende Augenfehlbildung, mentale Störungen und Gehirnfehlbildungen charakterisiert ist. Mutationen in wichtigen Proteinen des Vesikeltransportes, RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB18 und TBC1D20 führen zu einem Funktionsverlust dieser Proteine und lösen das Syndrom aus. Ein zellulärer Mechanismus, welcher diesen schwerwiegenden Phänotyp erklären würde, wurde bisher noch nicht gefunden. Eine Störung des autophagosomalen Abbaus könnte ein möglicher Aspekt dieser Erkrankung sein.

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurden die WARBM-assoziierten Proteine erstmals funktionell mit dem Prozess der Autophagie in Verbindung gebracht. Die Funktion der Proteine als positive Modulatoren der Autophagie und ihre Funktion für den zellulären Lipidmetabolismus, deuten darauf hin, dass ihre Rolle für die Bereitstellung von Lipiden für die Membranbiogenese auch den autophagischen Prozess moduliert.

## 6. Summary

Macroautophagy is a highly conserved cellular degradation process in which cytoplasmic proteins and organelles are sequestered in autophagic vesicles, so-called autophagosomes, and are delivered to lysosomes. This process is of fundamental importance for cellular protein homeostasis (proteostasis) and its deterioration is linked to multiple diseases and aging.

The dynamics and efficiency of autophagy is dependent on the adequate supply of lipids and membranes for autophagosome formation and is associated with the intracellular vesicle transport system. RAB GTPases, RAB GAPs, and RAB GEFs are important regulators for the intracellular vesicle transport and numerous vesicular transport proteins have been associated with the process of autophagy.

Here, we show that RAB3GAP1/2, RAB18, and TBC1D20 are positive modulators of autophagy. In primary human fibroblasts the knockdown of the proteins results in a decreased autophagic activity, while its overexpression enhances the degradative pathway. Moreover, the knockdown of the proteins deteriorates proteostasis.

The function of the proteins for autophagosomal biogenesis and the association of the proteins with the cellular lipid metabolism might suggest that the proteins regulate the lipid transfer and the fatty acid supply via the ER for membrane biogenesis. Thus, a disturbance of the protein function leads to an altered membrane biogenesis.

Importantly, loss-of-function mutations in genes coding for RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB18, and TBC1D20 are causative for the Warburg Micro syndrome (WARBM), an autosomal recessive disorder that is characterized by severe developmental disturbances as well as eye and brain abnormalities. Mutations in any of the disease-related genes results in indistinguishable clinical phenotypes. A cellular mechanism which would explain the WARBM-phenotype has not yet been found, but a disruption of the autophagosomal degradation could be a possible aspect of this syndrome.

Thus, it can be postulated that the WARBM proteins, which are functionally associated with the cellular lipid metabolism and autophagosomal biogenesis, representing a novel link in the highly complex lipid acquisition machinery of autophagosome formation.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aguzzi, Adriano; Polymenidou, Magdalini (2004): Mammalian Prion Biology. In: *Cell* 116 (2), S. 313–327. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)01031-6.
- Aligianis, Irene A.; Johnson, Colin A.; Gissen, Paul; Chen, Dongrong; Hampshire, Daniel; Hoffmann, Katrin et al. (2005): Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. In: *Nat Genet* 37 (3), S. 221–224. DOI: 10.1038/ng1517.
- Aligianis, Irene A.; Morgan, Neil V.; Mione, Marina; Johnson, Colin A.; Rosser, Elisabeth; Hennekam, Raoul C. et al. (2006): Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsolf syndrome. In: *American journal of human genetics* 78 (4), S. 702–707. DOI: 10.1086/502681.
- Amaya, Celina; Fader, Claudio Marcelo; Colombo, María Isabel (2015): Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. In: *FEBS letters* 589 (22), S. 3343–3353. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.09.021.
- Asahina, Miki; Endoh, Yusaku; Matsubayashi, Tomoko; Fukuda, Tokiko; Ogata, Tsutomu (2016): Novel RAB3GAP1 compound heterozygous mutations in Japanese siblings with Warburg Micro syndrome. In: *Brain & development* 38 (3), S. 337–340. DOI: 10.1016/j.braindev.2015.09.006.
- Banerjee, Rebecca; Beal, M. Flint; Thomas, Bobby (2010): Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications. In: *Trends in neurosciences* 33 (12), S. 541–549. DOI: 10.1016/j.tins.2010.09.001.
- Barr, Francis; Lambright, David G. (2010): Rab GEFs and GAPs. In: *Current opinion in cell biology* 22 (4), S. 461–470. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.04.007.
- Barrowman, Jemima; Bhandari, Deepali; Reinisch, Karin; Ferro-Novick, Susan (2010): TRAPP complexes in membrane traffic. Convergence through a common Rab. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (11), S. 759–763. DOI: 10.1038/nrm2999.
- Behl, Christian (2011): BAG3 and friends: co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. In: *Autophagy* 7 (7), S. 795–798. DOI: 10.4161/auto.7.7.15844.
- Behl, Christian (2016): Breaking BAG. The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. In: *Trends in pharmacological sciences* 37 (8), S. 672–688. DOI: 10.1016/j.tips.2016.04.007.
- Bem, Danai; Yoshimura, Shin-Ichiro; Nunes-Bastos, Ricardo; Bond, Frances C.; Kurian, Manju A.; Rahman, Fatima et al. (2011): Loss-of-function mutations in RAB18 cause Warburg micro syndrome. In: *American journal of human genetics* 88 (4), S. 499–507. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.03.012.
- Besemer, Anna; Maus, Joanna; Freese, Christian; Nalbach, Karsten; Hilchen, Christian; Koziollek-Drechsler, Ingrid et al. (2017): Receptor-mediated endocytosis 8 (RME8) is a new component of the proteostasis network and modulates autophagy. *Autophagy*; unter Begutachtung.
- Biazik, Joanna; Ylä-Anttila, Päivi; Vihinen, Helena; Jokitalo, Eija; Eskelinen, Eeva-Liisa (2015): Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. In: *Autophagy* 11 (3), S. 439–451. DOI: 10.1080/15548627.2015.1017178.
- Bishop, Nicholas A.; Lu, Tao; Yankner, Bruce A. (2010): Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. In: *Nature* 464 (7288), S. 529–535. DOI: 10.1038/nature08983.

- Borck, Guntram; Wunram, Heidrun; Steiert, Angela; Volk, Alexander E.; Korber, Friederike; Roters, Sigrid et al. (2011): A homozygous RAB3GAP2 mutation causes Warburg Micro syndrome. In: *Human genetics* 129 (1), S. 45–50. DOI: 10.1007/s00439-010-0896-2.
- Boyle, Keith B.; Randow, Felix (2013): The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. In: *Current opinion in microbiology* 16 (3), S. 339–348. DOI: 10.1016/j.mib.2013.03.010.
- Cao, Xiaohang; Antonyuk, Svetlana V.; Seetharaman, Sai V.; Whitson, Lisa J.; Taylor, Alexander B.; Holloway, Stephen P. et al. (2008): Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (23), S. 16169–16177. DOI: 10.1074/jbc.M801522200.
- Carney, Darren S.; Davies, Brian A.; Horazdovsky, Bruce F. (2006): Vps9 domain-containing proteins. Activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. In: *Trends in cell biology* 16 (1), S. 27–35. DOI: 10.1016/j.tcb.2005.11.001.
- Carpanini, Sarah M.; McKie, Lisa; Thomson, Derek; Wright, Ann K.; Gordon, Sarah L.; Roche, Sarah L. et al. (2014): A novel mouse model of Warburg Micro syndrome reveals roles for RAB18 in eye development and organisation of the neuronal cytoskeleton. In: *Disease models & mechanisms* 7 (6), S. 711–722. DOI: 10.1242/dmm.015222.
- Chen, Sheng; Zhang, Xiaojie; Song, Lin; Le, Weidong (2012): Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 22 (1), S. 110–116. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2011.00546.x.
- Cherfils, Jacqueline; Zeghouf, Mahel (2013): Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. In: *Physiological reviews* 93 (1), S. 269–309. DOI: 10.1152/physrev.00003.2012.
- Choi, Augustine M. K.; Ryter, Stefan W.; Levine, Beth (2013): Autophagy in human health and disease. In: *The New England journal of medicine* 368 (7), S. 651–662. DOI: 10.1056/NEJMra1205406.
- Choudhary, Vineet; Ojha, Namrata; Golden, Andy; Prinz, William A. (2015): A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. In: *The Journal of cell biology* 211 (2), S. 261–271. DOI: 10.1083/jcb.201505067.
- Chua, Christelle En Lin; Gan, Bin Qi; Tang, Bor Luen (2011): Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68 (20), S. 3349–3358. DOI: 10.1007/s00018-011-0748-9.
- Chua, Christelle En Lin; Tang, Bor Luen (2015): Role of Rab GTPases and their interacting proteins in mediating metabolic signalling and regulation. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (12), S. 2289–2304. DOI: 10.1007/s00018-015-1862-x.
- Clabecq, A.; Henry, J. P.; Darchen, F. (2000): Biochemical characterization of Rab3-GTPase-activating protein reveals a mechanism similar to that of Ras-GAP. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (41), S. 31786–31791. DOI: 10.1074/jbc.M003705200.
- Cuervo, Ana Maria; Stefanis, Leonidas; Fredenburg, Ross; Lansbury, Peter T.; Sulzer, David (2004): Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. In: *Science (New York, N.Y.)* 305 (5688), S. 1292–1295. DOI: 10.1126/science.1101738.

- Dansako, Hiromichi; Hiramoto, Hiroki; Ikeda, Masanori; Wakita, Takaji; Kato, Nobuyuki (2014): Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. In: *Virology* 462-463, S. 166–174. DOI: 10.1016/j.virol.2014.05.017.
- Dejgaard, Selma Y.; Murshid, Ayesha; Erman, Aysegul; Kizilay, Ozge; Verbich, David; Lodge, Robert et al. (2008): Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 16), S. 2768–2781. DOI: 10.1242/jcs.021808.
- Deretic, Vojo (2015): Autophagosomes and lipid droplets: no longer just chewing the fat. In: *The EMBO journal* 34 (16), S. 2111–2113. DOI: 10.15252/embj.201592087.
- Dupont, Nicolas; Chauhan, Santosh; Arko-Mensah, John; Castillo, Eliseo F.; Masedunskas, Andrius; Weigert, Roberto et al. (2014): Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis. In: *Current biology : CB* 24 (6), S. 609–620. DOI: 10.1016/j.cub.2014.02.008.
- Duve, C. de; Wattiaux, R. (1966): Functions of lysosomes. In: *Annual review of physiology* 28, S. 435–492. DOI: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251.
- Elias, Marek; Brighouse, Andrew; Gabernet-Castello, Carme; Field, Mark C.; Dacks, Joel B. (2012): Sculpting the endomembrane system in deep time. High resolution phylogenetics of Rab GTPases. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 10), S. 2500–2508. DOI: 10.1242/jcs.101378.
- Faitar, Silviu L.; Sossey-Alaoui, Khalid; Ranalli, Tamara A.; Cowell, John K. (2006): EVI5 protein associates with the INCENP-aurora B kinase-survivin chromosomal passenger complex and is involved in the completion of cytokinesis. In: *Experimental cell research* 312 (12), S. 2325–2335. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.03.032.
- Feldmann, Anne (2013): Der RAB3GAP-Komplex beeinflusst frühe Schritte der basalen Makroautophagie. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz. Pathobiochemie.
- Feldmann, Anne; Bekbulat, Fazilet; Huesmann, Heike; Ulbrich, Sarah; Tatzelt, Jorg; Behl, Christian; Kern, Andreas (2017): The RAB GTPase RAB18 modulates macroautophagy and proteostasis. In: *Biochemical and biophysical research communications* 486 (3), S. 738–743. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.112.
- Frasa, Marieke A. M.; Koessmeier, Katja T.; Ahmadian, M. Reza; Braga, Vania M. M. (2012): Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (2), S. 67–73. DOI: 10.1038/nrm3267.
- Fukuda, Mitsunori (2011): TBC proteins. GAPs for mammalian small GTPase Rab? In: *Bioscience reports* 31 (3), S. 159–168. DOI: 10.1042/BSR20100112.
- Fukui, K.; Sasaki, T.; Imazumi, K.; Matsuura, Y.; Nakanishi, H.; Takai, Y. (1997): Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (8), S. 4655–4658.
- Gamerding, Martin; Hajieva, Parvana; Kaya, A. Murat; Wolfrum, Uwe; Hartl, F. Ulrich; Behl, Christian (2009): Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. In: *The EMBO journal* 28 (7), S. 889–901. DOI: 10.1038/emboj.2009.29.
- Ganley, Ian G.; Du Lam, H.; Wang, Junru; Ding, Xiaojun; Chen, She; Jiang, Xuejun (2009): ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (18), S. 12297–12305. DOI: 10.1074/jbc.M900573200.

- Gavriljuk, Konstantin; Gazdag, Emerich-Mihai; Itzen, Aymelt; Kotting, Carsten; Goody, Roger S.; Gerwert, Klaus (2012): Catalytic mechanism of a mammalian Rab.RabGAP complex in atomic detail. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (52), S. 21348–21353. DOI: 10.1073/pnas.1214431110.
- Geng, Jiefei; Klionsky, Daniel J. (2008): The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. In: *EMBO reports* 9 (9), S. 859–864. DOI: 10.1038/embor.2008.163.
- Gerondopoulos, Andreas; Bastos, Ricardo Nunes; Yoshimura, Shin-Ichiro; Anderson, Rachel; Carpanini, Sarah; Aligianis, Irene et al. (2014): Rab18 and a Rab18 GEF complex are required for normal ER structure. In: *The Journal of cell biology* 205 (5), S. 707–720. DOI: 10.1083/jcb.201403026.
- Girardi, J. P.; Pereira, L.; Bakovic, M. (2011): De novo synthesis of phospholipids is coupled with autophagosome formation. In: *Medical hypotheses* 77 (6), S. 1083–1087. DOI: 10.1016/j.mehy.2011.09.008.
- Glick, Danielle; Barth, Sandra; Macleod, Kay F. (2010): Autophagy: cellular and molecular mechanisms. In: *The Journal of pathology* 221 (1), S. 3–12. DOI: 10.1002/path.2697.
- Gomez-Suaga, Patricia; Paillusson, Sebastien; Stoica, Radu; Noble, Wendy; Hanger, Diane P.; Miller, Christopher C. J. (2017): The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. In: *Current biology : CB* 27 (3), S. 371–385. DOI: 10.1016/j.cub.2016.12.038.
- Gronemeyer, Thomas; Wiese, Sebastian; Grinhagens, Soren; Schollenberger, Lukas; Satyagraha, Ari; Huber, Lukas A. et al. (2013): Localization of Rab proteins to peroxisomes. A proteomics and immunofluorescence study. In: *FEBS letters* 587 (4), S. 328–338. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.12.025.
- Guo, Yi; Cordes, Kimberly R.; Farese, Robert V., JR; Walther, Tobias C. (2009): Lipid droplets at a glance. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 6), S. 749–752. DOI: 10.1242/jcs.037630.
- Gutierrez, Maximiliano G.; Munafo, Daniela B.; Beron, Walter; Colombo, Maria I. (2004): Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 13), S. 2687–2697. DOI: 10.1242/jcs.01114.
- Gwinn, Dana M.; Shackelford, David B.; Egan, Daniel F.; Mihaylova, Maria M.; Mery, Annabelle; Vasquez, Debbie S. et al. (2008): AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. In: *Molecular cell* 30 (2), S. 214–226. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.03.003.
- Haas, Alexander K.; Yoshimura, Shin-Ichiro; Stephens, David J.; Preisinger, Christian; Fuchs, Evelyn; Barr, Francis A. (2007): Analysis of GTPase-activating proteins. Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. In: *Journal of cell science* 120 (Pt 17), S. 2997–3010. DOI: 10.1242/jcs.014225.
- Hailey, Dale W.; Rambold, Angelika S.; Satpute-Krishnan, Prasanna; Mitra, Kasturi; Sougrat, Rachid; Kim, Peter K.; Lippincott-Schwartz, Jennifer (2010): Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. In: *Cell* 141 (4), S. 656–667. DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.009.
- Handley, Mark T.; Carpanini, Sarah M.; Mali, Girish R.; Sidjanin, Duska J.; Aligianis, Irene A.; Jackson, Ian J.; FitzPatrick, David R. (2015): Warburg Micro syndrome is caused by RAB18 deficiency or dysregulation. In: *Open biology* 5 (6), S. 150047. DOI: 10.1098/rsob.150047.



- Handley, Mark T.; Morris-Rosendahl, Deborah J.; Brown, Stephen; Macdonald, Fiona; Hardy, Carol; Bem, Danai et al. (2013): Mutation spectrum in RAB3GAP1, RAB3GAP2, and RAB18 and genotype-phenotype correlations in warburg micro syndrome and Martsolf syndrome. In: *Human mutation* 34 (5), S. 686–696. DOI: 10.1002/humu.22296.
- Hara, Taichi; Nakamura, Kenji; Matsui, Makoto; Yamamoto, Akitsugu; Nakahara, Yohko; Suzuki-Migishima, Rika et al. (2006): Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. In: *Nature* 441 (7095), S. 885–889. DOI: 10.1038/nature04724.
- Hartl, F. Ulrich; Bracher, Andreas; Hayer-Hartl, Manajit (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. In: *Nature* 475 (7356), S. 324–332. DOI: 10.1038/nature10317.
- Head, M. W.; Ironside, J. W. (2012): Review. Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 38 (4), S. 296–310. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2012.01265.x.
- Hipp, Mark S.; Park, Sae-Hun; Hartl, F. Ulrich (2014): Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. In: *Trends in cell biology* 24 (9), S. 506–514. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.05.003.
- Husnjak, Koraljka; Dikic, Ivan (2012): Ubiquitin-binding proteins. Decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. In: *Annual review of biochemistry* 81, S. 291–322. DOI: 10.1146/annurev-biochem-051810-094654.
- Imagawa, Eri; Fukai, Ryoko; Behnam, Mahdiyeh; Goyal, Manisha; Nouri, Narges; Nakashima, Mitsuko et al. (2015): Two novel homozygous RAB3GAP1 mutations cause Warburg micro syndrome. In: *Human genome variation* 2, S. 15034. DOI: 10.1038/hgv.2015.34.
- Imamura, Minako; Inoguchi, Toyoshi; Ikuyama, Shoichiro; Taniguchi, Susumu; Kobayashi, Kuniyoshi; Nakashima, Naoki; Nawata, Hajime (2002): ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283 (4), E775-83. DOI: 10.1152/ajpendo.00040.2002.
- Ishida, Yojiro; Park, Jung-Ho; Mao, Lili; Yamaguchi, Yoshihiro; Inouye, Masayori (2013): Replacement of all arginine residues with canavanine in MazF-bs mRNA interferase changes its specificity. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (11), S. 7564–7571. DOI: 10.1074/jbc.M112.434969.
- Itoh, Takashi; Kanno, Eiko; Uemura, Takefumi; Waguri, Satoshi; Fukuda, Mitsunori (2011): OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. In: *The Journal of cell biology* 192 (5), S. 839–853. DOI: 10.1083/jcb.201008107.
- Jager, Stefanie; Bucci, Cecilia; Tanida, Isei; Ueno, Takashi; Kominami, Eiki; Saftig, Paul; Eskelinen, Eeva-Liisa (2004): Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 20), S. 4837–4848. DOI: 10.1242/jcs.01370.
- Kakuta, Soichiro; Yamamoto, Hayashi; Negishi, Lumi; Kondo-Kakuta, Chika; Hayashi, Nobuhiro; Ohsumi, Yoshinori (2012): Atg9 vesicles recruit vesicle-tethering proteins Trs85 and Ypt1 to the autophagosome formation site. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (53), S. 44261–44269. DOI: 10.1074/jbc.M112.411454.
- Kaushik, Susmita; Cuervo, Ana Maria (2012): Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. In: *Trends in cell biology* 22 (8), S. 407–417. DOI: 10.1016/j.tcb.2012.05.006.

- Kern, Andreas; Dikic, Ivan; Behl, Christian (2015): The integration of autophagy and cellular trafficking pathways via RAB GAPs. In: *Autophagy* 11 (12), S. 2393–2397. DOI: 10.1080/15548627.2015.1110668.
- Khaminets, Aliaksandr; Behl, Christian; Dikic, Ivan (2016): Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. In: *Trends in cell biology* 26 (1), S. 6–16. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.08.010.
- Kimura, Shunsuke; Noda, Takeshi; Yoshimori, Tamotsu (2008): Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. In: *Cell structure and function* 33 (1), S. 109–122.
- Klopper, Tobias H.; Kienle, Nickias; Fasshauer, Dirk; Munro, Sean (2012): Untangling the evolution of Rab G proteins. Implications of a comprehensive genomic analysis. In: *BMC biology* 10, S. 71. DOI: 10.1186/1741-7007-10-71.
- Komatsu, Masaaki; Waguri, Satoshi; Chiba, Tomoki; Murata, Shigeo; Iwata, Jun-ichi; Tanida, Isei et al. (2006): Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. In: *Nature* 441 (7095), S. 880–884. DOI: 10.1038/nature04723.
- Kroemer, Guido (2015): Autophagy. A druggable process that is deregulated in aging and human disease. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (1), S. 1–4. DOI: 10.1172/JCI78652.
- Kuma, Akiko; Mizushima, Noboru (2010): Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. In: *Seminars in cell & developmental biology* 21 (7), S. 683–690. DOI: 10.1016/j.semcd.2010.03.002.
- Lamb, Christopher A.; Nuhlen, Stefanie; Judith, Delphine; Frith, David; Snijders, Ambrosius P.; Behrends, Christian; Tooze, Sharon A. (2016): TBC1D14 regulates autophagy via the TRAPP complex and ATG9 traffic. In: *The EMBO journal* 35 (3), S. 281–301. DOI: 10.15252/embj.201592695.
- Landry, Jonathan J. M.; Pyl, Paul Theodor; Rausch, Tobias; Zichner, Thomas; Tekkedil, Manu M.; Stutz, Adrian M. et al. (2013): The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. In: *G3 (Bethesda, Md.)* 3 (8), S. 1213–1224. DOI: 10.1534/g3.113.005777.
- Lee, Jae Keun; Shin, Jin Hee; Lee, Ji Eun; Choi, Eui-Ju (2015): Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1852 (11), S. 2517–2524. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.08.005.
- Levine, Beth; Kroemer, Guido (2008): Autophagy in the pathogenesis of disease. In: *Cell* 132 (1), S. 27–42. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Li, Chunman; Luo, Xiaomin; Zhao, Shan; Siu, Gavin Ky; Liang, Yongheng; Chan, Hsiao Chang et al. (2017): COPI-TRAPP II activates Rab18 and regulates its lipid droplet association. In: *The EMBO journal* 36 (4), S. 441–457. DOI: 10.15252/embj.201694866.
- Li, Wen-wen; Li, Jian; Bao, Jin-ku (2012): Microautophagy: lesser-known self-eating. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69 (7), S. 1125–1136. DOI: 10.1007/s00018-011-0865-5.
- Liegel, Ryan P.; Handley, Mark T.; Ronchetti, Adam; Brown, Stephen; Langemeyer, Lars; Linford, Andrea et al. (2013): Loss-of-function mutations in TBC1D20 cause cataracts and male infertility in blind sterile mice and Warburg micro syndrome in humans. In: *American journal of human genetics* 93 (6), S. 1001–1014. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.10.011.

- Lynch-Day, Melinda A.; Mao, Kai; Wang, Ke; Zhao, Mantong; Klionsky, Daniel J. (2012): The role of autophagy in Parkinson's disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (4), a009357. DOI: 10.1101/cshperspect.a009357.
- Lynch-Day, Molly A.; Bhandari, Deepali; Menon, Shekar; Huang, Ju; Cai, Huaqing; Bartholomew, Clinton R. et al. (2010): Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPPIII, to the phagophore to promote autophagy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (17), S. 7811–7816. DOI: 10.1073/pnas.1000063107.
- Maday, Sandra; Wallace, Karen E.; Holzbaur, Erika L. F. (2012): Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. In: *The Journal of cell biology* 196 (4), S. 407–417. DOI: 10.1083/jcb.201106120.
- Marat, Andrea L.; Dokainish, Hatem; McPherson, Peter S. (2011): DENN domain proteins. Regulators of Rab GTPases. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (16), S. 13791–13800. DOI: 10.1074/jbc.R110.217067.
- Mari, Muriel; Griffith, Janice; Rieter, Ester; Krishnappa, Lakshmi; Klionsky, Daniel J.; Reggiori, Fulvio (2010): An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. In: *The Journal of cell biology* 190 (6), S. 1005–1022. DOI: 10.1083/jcb.200912089.
- Martin, Dale D. O.; Ladha, Safia; Ehrnhoefer, Dagmar E.; Hayden, Michael R. (2015): Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. In: *Trends in neurosciences* 38 (1), S. 26–35. DOI: 10.1016/j.tins.2014.09.003.
- Martin, Sally; Driessen, Kim; Nixon, Susan J.; Zerial, Marino; Parton, Robert G. (2005): Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (51), S. 42325–42335. DOI: 10.1074/jbc.M506651200.
- Martin, Sally; Parton, Robert G. (2005): Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. In: *Seminars in cell & developmental biology* 16 (2), S. 163–174. DOI: 10.1016/j.semcd.2005.01.007.
- Martin, Sally; Parton, Robert G. (2006): Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 7 (5), S. 373–378. DOI: 10.1038/nrm1912.
- Martinez-Vicente, Marta; Tallozy, Zsolt; Kaushik, Susmita; Massey, Ashish C.; Mazzulli, Joseph; Mosharov, Eugene V. et al. (2008): Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (2), S. 777–788. DOI: 10.1172/JCI32806.
- McEwan, David G.; Dikic, Ivan (2010): Not all autophagy membranes are created equal. In: *Cell* 141 (4), S. 564–566. DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.030.
- McKnight, Nicole C.; Jefferies, Harold B. J.; Alemu, Endalkachew A.; Saunders, Rebecca E.; Howell, Michael; Johansen, Terje; Tooze, Sharon A. (2012): Genome-wide siRNA screen reveals amino acid starvation-induced autophagy requires SCOC and WAC. In: *The EMBO journal* 31 (8), S. 1931–1946. DOI: 10.1038/emboj.2012.36.
- Mhlanga-Mutangadura, Tendai; Johnson, Gary S.; Schnabel, Robert D.; Taylor, Jeremy F.; Johnson, Gayle C.; Katz, Martin L. et al. (2016): A mutation in the Warburg syndrome gene, RAB3GAP1, causes a similar syndrome with polyneuropathy and neuronal vacuolation in Black Russian Terrier dogs. In: *Neurobiology of disease* 86, S. 75–85. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.11.016.

- Mitra, Shreya; Cheng, Kwai W.; Mills, Gordon B. (2011): Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders. In: *Seminars in cell & developmental biology* 22 (1), S. 57–68. DOI: 10.1016/j.semcdb.2010.12.005.
- Mizushima, Noboru (2007): Autophagy. Process and function. In: *Genes & development* 21 (22), S. 2861–2873. DOI: 10.1101/gad.1599207.
- Mizushima, Noboru; Komatsu, Masaaki (2011): Autophagy: renovation of cells and tissues. In: *Cell* 147 (4), S. 728–741. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Mizushima, Noboru; Kuma, Akiko; Kobayashi, Yoshinori; Yamamoto, Akitsugu; Matsubae, Masami; Takao, Toshifumi et al. (2003a): Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. In: *Journal of cell science* 116 (Pt 9), S. 1679–1688.
- Mizushima, Noboru; Yoshimori, Tamotsu (2007): How to interpret LC3 immunoblotting. In: *Autophagy* 3 (6), S. 542–545.
- Mizushima, Noboru; Yoshimori, Tamotsu; Ohsumi, Yoshinori (2003b): Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 35 (5), S. 553–561.
- Mizushima, Noboru; Yoshimori, Tamotsu; Ohsumi, Yoshinori (2011): The role of Atg proteins in autophagosome formation. In: *Annual review of cell and developmental biology* 27, S. 107–132. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- Mochizuki, Yasuhiro; Ohashi, Riuko; Kawamura, Takeshi; Iwanari, Hiroko; Kodama, Tatsuhiko; Naito, Makoto; Hamakubo, Takao (2013): Phosphatidylinositol 3-phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is regulated by small GTPase Rab1B in the early secretory and autophagic pathways. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (2), S. 1009–1021. DOI: 10.1074/jbc.M112.395087.
- Morawe, Tobias; Hiebel, Christof; Kern, Andreas; Behl, Christian (2012): Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. In: *Molecular neurobiology* 46 (1), S. 41–54. DOI: 10.1007/s12035-012-8246-0.
- Morimoto, Richard I.; Cuervo, Ana Maria (2014): Proteostasis and the aging proteome in health and disease. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 69 Suppl 1, S. 8. DOI: 10.1093/gerona/glu049.
- Morris-Rosendahl, Deborah J.; Segel, Reeval; Born, A. Peter; Conrad, Christoph; Loeys, Bart; Brooks, Susan Sklower et al. (2010): New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. In: *European journal of human genetics : EJHG* 18 (10), S. 1100–1106. DOI: 10.1038/ejhg.2010.79.
- Mosesson, Yaron; Mills, Gordon B.; Yarden, Yosef (2008): Derailed endocytosis. An emerging feature of cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 8 (11), S. 835–850. DOI: 10.1038/nrc2521.
- Muller, Martin; Pym, Edward C. G.; Tong, Amy; Davis, Graeme W. (2011): Rab3-GAP controls the progression of synaptic homeostasis at a late stage of vesicle release. In: *Neuron* 69 (4), S. 749–762. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.01.025.
- Murphy, D. J. (2001): The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. In: *Progress in lipid research* 40 (5), S. 325–438.

- Nagano, F.; Sasaki, T.; Fukui, K.; Asakura, T.; Imazumi, K.; Takai, Y. (1998): Molecular Cloning and Characterization of the Noncatalytic Subunit of the Rab3 Subfamily-specific GTPase-activating Protein. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (38), S. 24781–24785. DOI: 10.1074/jbc.273.38.24781.
- Nakamura, Noriko; Akashi, Tomohiro; Taneda, Tsuya; Kogo, Hiroshi; Kikuchi, Akihiko; Fujimoto, Toyoshi (2004): ADRP is dissociated from lipid droplets by ARF1-dependent mechanism. In: *Biochemical and biophysical research communications* 322 (3), S. 957–965. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.08.010.
- Nakamura, Noriko; Fujimoto, Toyoshi (2003): Adipose differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets. In: *Biochemical and biophysical research communications* 306 (2), S. 333–338.
- Nakatogawa, Hitoshi; Suzuki, Kuninori; Kamada, Yoshiaki; Ohsumi, Yoshinori (2009): Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (7), S. 458–467. DOI: 10.1038/nrm2708.
- Nevo-Yassaf, Inbar; Yaffe, Yakey; Asher, Meital; Ravid, Orly; Eizenberg, Sharon; Henis, Yoav I. et al. (2012): Role for TBC1D20 and Rab1 in hepatitis C virus replication via interaction with lipid droplet-bound nonstructural protein 5A. In: *Journal of virology* 86 (12), S. 6491–6502. DOI: 10.1128/JVI.00496-12.
- Noda, T.; Ohsumi, Y. (1998): Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (7), S. 3963–3966.
- Novick, Peter (2016): Regulation of membrane traffic by Rab GEF and GAP cascades. In: *Small GTPases* 7 (4), S. 252–256. DOI: 10.1080/21541248.2016.1213781.
- Obara, Keisuke; Sekito, Takayuki; Niimi, Kaori; Ohsumi, Yoshinori (2008): The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (35), S. 23972–23980. DOI: 10.1074/jbc.M803180200.
- Ozeki, Shintaro; Cheng, Jinglei; Tauchi-Sato, Kumi; Hatano, Naoya; Taniguchi, Hisaaki; Fujimoto, Toyoshi (2005): Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 12), S. 2601–2611. DOI: 10.1242/jcs.02401.
- Pan, Xiaojing; Eathiraj, Sudharshan; Munson, Mary; Lambright, David G. (2006): TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. In: *Nature* 442 (7100), S. 303–306. DOI: 10.1038/nature04847.
- Park, Anna Kyunglim; Liegel, Ryan P.; Ronchetti, Adam; Ebert, Allison D.; Geurts, Aron; Sidjanin, Duska J. (2014): Targeted disruption of Tbc1d20 with zinc-finger nucleases causes cataracts and testicular abnormalities in mice. In: *BMC genetics* 15, S. 135. DOI: 10.1186/s12863-014-0135-2.
- Pfisterer, Simon G.; Bakula, Daniela; Frickey, Tancred; Cezanne, Alice; Brigger, Daniel; Tschan, Mario P. et al. (2014): Lipid droplet and early autophagosomal membrane targeting of Atg2A and Atg14L in human tumor cells. In: *Journal of lipid research* 55 (7), S. 1267–1278. DOI: 10.1194/jlr.M046359.
- Picker-Minh, Sylvie; Busche, Andreas; Hartmann, Britta; Spors, Birgit; Klopocki, Eva; Hubner, Christoph et al. (2014): Large homozygous RAB3GAP1 gene microdeletion causes Warburg micro syndrome 1. In: *Orphanet journal of rare diseases* 9, S. 113. DOI: 10.1186/s13023-014-0113-9.

- Ploegh, Hidde L. (2007): A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. In: *Nature* 448 (7152), S. 435–438. DOI: 10.1038/nature06004.
- Popoff, Vincent; Mardones, Gonzalo A.; Bai, Siau-Kun; Chambon, Valerie; Tenza, Daniele; Burgos, Patricia V. et al. (2009): Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10 (12), S. 1868–1880. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2009.00993.x.
- Popovic, Doris; Akutsu, Masato; Novak, Ivana; Harper, J. Wade; Behrends, Christian; Dikic, Ivan (2012): Rab GTPase-activating proteins in autophagy. Regulation of endocytic and autophagy pathways by direct binding to human ATG8 modifiers. In: *Molecular and cellular biology* 32 (9), S. 1733–1744. DOI: 10.1128/MCB.06717-11.
- Popovic, Doris; Dikic, Ivan (2014): TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. In: *EMBO reports* 15 (4), S. 392–401. DOI: 10.1002/embr.201337995.
- Popovic, Doris; Vucic, Domagoj; Dikic, Ivan (2014): Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. In: *Nature medicine* 20 (11), S. 1242–1253. DOI: 10.1038/nm.3739.
- Proikas-Cezanne, Tassula; Ruckerbauer, Sabine; Stierhof, York-Dieter; Berg, Carolin; Nordheim, Alfred (2007): Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. In: *FEBS letters* 581 (18), S. 3396–3404. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.06.040.
- Pulido, Marina R.; Diaz-Ruiz, Alberto; Jimenez-Gomez, Yolanda; Garcia-Navarro, Socorro; Gracia-Navarro, Francisco; Tinahones, Francisco et al. (2011): Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. In: *PLoS one* 6 (7), S. e22931. DOI: 10.1371/journal.pone.0022931.
- Puri, Claudia; Renna, Maurizio; Bento, Carla F.; Moreau, Kevin; Rubinsztein, David C. (2013): Diverse autophagosomal membrane sources coalesce in recycling endosomes. In: *Cell* 154 (6), S. 1285–1299. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.044.
- Ravikumar, Brinda; Imarisio, Sara; Sarkar, Sovan; O'Kane, Cahir J.; Rubinsztein, David C. (2008): Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 10), S. 1649–1660. DOI: 10.1242/jcs.025726.
- Ravikumar, Brinda; Moreau, Kevin; Rubinsztein, David C. (2010): Plasma membrane helps autophagosomes grow. In: *Autophagy* 6 (8), S. 1184–1186. DOI: 10.4161/auto.6.8.13428.
- Reggiori, Fulvio; Shintani, Takahiro; Nair, Usha; Klionsky, Daniel J. (2005): Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. In: *Autophagy* 1 (2), S. 101–109.
- Reumann, Sigrun; Voitsekhovskaja, Olga; Lillo, Cathrine (2010): From signal transduction to autophagy of plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. In: *Protoplasma* 247 (3-4), S. 233–256. DOI: 10.1007/s00709-010-0190-0.
- Riddle, David R. (Hg.) (2007): Brain aging. Models, methods, and mechanisms. Boca Raton, Fla. u.a: CRC Press (Frontiers in neuroscience). Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=frbrainage>.
- Ross, Christopher A.; Poirier, Michelle A. (2004): Protein aggregation and neurodegenerative disease. In: *Nature medicine* 10 Suppl, S10-7. DOI: 10.1038/nm1066.

- Saitoh, Tatsuya; Fujita, Naonobu; Jang, Myoung Ho; Uematsu, Satoshi; Yang, Bo-Gie; Satoh, Takashi et al. (2008): Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. In: *Nature* 456 (7219), S. 264–268. DOI: 10.1038/nature07383.
- Sakane, Ayuko; Manabe, Shinji; Ishizaki, Hiroyoshi; Tanaka-Okamoto, Miki; Kiyokage, Emi; Toida, Kazunori et al. (2006): Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (26), S. 10029–10034. DOI: 10.1073/pnas.0600304103.
- Salloum, Shadi; Wang, Hongliang; Ferguson, Charles; Parton, Robert G.; Tai, Andrew W. (2013): Rab18 binds to hepatitis C virus NS5A and promotes interaction between sites of viral replication and lipid droplets. In: *PLoS pathogens* 9 (8), e1003513. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003513.
- Schluter, Oliver M.; Khvotchev, Mikhail; Jahn, Reinhard; Sudhof, Thomas C. (2002): Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (43), S. 40919–40929. DOI: 10.1074/jbc.M203704200.
- Schrader, Michael; Godinho, Luis F.; Costello, Joseph L.; Islinger, Markus (2015): The different facets of organelle interplay—an overview of organelle interactions. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 3, S. 56. DOI: 10.3389/fcell.2015.00056.
- Shang, Libin; Chen, She; Du, Fenghe; Li, Shen; Zhao, Liping; Wang, Xiaodong (2011): Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12), S. 4788–4793. DOI: 10.1073/pnas.1100844108.
- Shi, Anbing; Sun, Lin; Banerjee, Riju; Tobin, Michael; Zhang, Yinhua; Grant, Barth D. (2009): Regulation of endosomal clathrin and retromer-mediated endosome to Golgi retrograde transport by the J-domain protein RME-8. In: *The EMBO journal* 28 (21), S. 3290–3302. DOI: 10.1038/emboj.2009.272.
- Shpilka, Tomer; Elazar, Zvulun (2015): Lipid droplets regulate autophagosome biogenesis. In: *Autophagy* 11 (11), S. 2130–2131. DOI: 10.1080/15548627.2015.1093719.
- Shpilka, Tomer; Weidberg, Hilla; Pietrokovski, Shmuel; Elazar, Zvulun (2011): Atg8. An autophagy-related ubiquitin-like protein family. In: *Genome biology* 12 (7), S. 226. DOI: 10.1186/gb-2011-12-7-226.
- Shpilka, Tomer; Welter, Evelyn; Borovsky, Noam; Amar, Nira; Mari, Muriel; Reggiori, Fulvio; Elazar, Zvulun (2015): Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. In: *The EMBO journal* 34 (16), S. 2117–2131. DOI: 10.15252/embj.201490315.
- Sidjanin, D. J.; Park, Anna K.; Ronchetti, Adam; Martins, Jamaria; Jackson, William T. (2016): TBC1D20 mediates autophagy as a key regulator of autophagosome maturation. In: *Autophagy* 12 (10), S. 1759–1775. DOI: 10.1080/15548627.2016.1199300.
- Singh, Rajat; Kaushik, Susmita; Wang, Yongjun; Xiang, Youqing; Novak, Inna; Komatsu, Masaaki et al. (2009): Autophagy regulates lipid metabolism. In: *Nature* 458 (7242), S. 1131–1135. DOI: 10.1038/nature07976.

- Sklan, Ella H.; Serrano, Ramon L.; Einav, Shirith; Pfeffer, Suzanne R.; Lambright, David G.; Glenn, Jeffrey S. (2007): TBC1D20 is a Rab1 GTPase-activating protein that mediates hepatitis C virus replication. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (50), S. 36354–36361. DOI: 10.1074/jbc.M705221200.
- Sou, Yu-shin; Waguri, Satoshi; Iwata, Jun-ichi; Ueno, Takashi; Fujimura, Tsutomu; Hara, Taichi et al. (2008): The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. In: *Molecular biology of the cell* 19 (11), S. 4762–4775. DOI: 10.1091/mbc.E08-03-0309.
- Spang, Natalie (2015): RAB3GAP1 und RAB3GAP2 (RAB3 GTPase-activating Protein 1/2) beeinflussen die Autophagie in *C. elegans* und humanen Zellen. Doktorarbeit. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz. Institut für Pathobiochemie.
- Spang, Natalie; Feldmann, Anne; Huesmann, Heike; Bekbulat, Fazilet; Schmitt, Verena; Hiebel, Christof et al. (2014): RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy. In: *Autophagy* 10 (12), S. 2297–2309. DOI: 10.4161/15548627.2014.994359.
- Stenmark, Harald (2009): Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (8), S. 513–525. DOI: 10.1038/nrm2728.
- Stolz, Alexandra; Ernst, Andreas; Dikic, Ivan (2014): Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. In: *Nature cell biology* 16 (6), S. 495–501. DOI: 10.1038/ncb2979.
- Stürner, Elisabeth; Behl, Christian (2017): The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 10, S. 177. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00177.
- Sudhof, Thomas C. (2004): The synaptic vesicle cycle. In: *Annual review of neuroscience* 27, S. 509–547. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.
- Szatmári, Zsuzsanna; Sass, Miklós (2014): The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators. A review. In: *Autophagy* 10 (7), S. 1154–1166. DOI: 10.4161/auto.29395.
- Tang, Wei-Chun; Lin, Ren-Jye; Liao, Ching-Len; Lin, Yi-Ling (2014): Rab18 facilitates dengue virus infection by targeting fatty acid synthase to sites of viral replication. In: *Journal of virology* 88 (12), S. 6793–6804. DOI: 10.1128/JVI.00045-14.
- Tanida, I.; Mizushima, N.; Kiyooka, M.; Ohsumi, M.; Ueno, T.; Ohsumi, Y.; Kominami, E. (1999): Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. In: *Molecular biology of the cell* 10 (5), S. 1367–1379.
- Tanida, I.; Tanida-Miyake, E.; Ueno, T.; Kominami, E. (2001): The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (3), S. 1701–1706. DOI: 10.1074/jbc.C000752200.
- Tanida, Isei; Tanida-Miyake, Emiko; Komatsu, Masaaki; Ueno, Takashi; Kominami, Eiki (2002): Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (16), S. 13739–13744. DOI: 10.1074/jbc.M200385200.
- Tanida, Isei; Ueno, Takashi; Kominami, Eiki (2004): LC3 conjugation system in mammalian autophagy. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (12), S. 2503–2518. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.05.009.



- Tooze, Sharon A.; Yoshimori, Tamotsu (2010): The origin of the autophagosomal membrane. In: *Nature cell biology* 12 (9), S. 831–835. DOI: 10.1038/ncb0910-831.
- Tsukada, M.; Ohsumi, Y. (1993): Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEBS letters* 333 (1-2), S. 169–174.
- Vazquez-Martinez, Rafael; Malagon, Maria M. (2011): Rab proteins and the secretory pathway. The case of rab18 in neuroendocrine cells. In: *Frontiers in endocrinology* 2, S. 1. DOI: 10.3389/fendo.2011.00001.
- Velikkakath, Anoop Kumar G.; Nishimura, Taki; Oita, Eiko; Ishihara, Naotada; Mizushima, Noboru (2012): Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. In: *Molecular biology of the cell* 23 (5), S. 896–909. DOI: 10.1091/mbc.E11-09-0785.
- Vogiatzi, Tereza; Xilouri, Maria; Vekrellis, Kostas; Stefanis, Leonidas (2008): Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (35), S. 23542–23556. DOI: 10.1074/jbc.M801992200.
- Walther, Tobias C.; Farese, Robert V., JR (2009): The life of lipid droplets. In: *Biochimica et biophysica acta* 1791 (6), S. 459–466. DOI: 10.1016/j.bbali.2008.10.009.
- Weidberg, Hilla; Shvets, Elena; Elazar, Zvulun (2011): Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. In: *Annual review of biochemistry* 80, S. 125–156. DOI: 10.1146/annurev-biochem-052709-094552.
- Wiedmer, Michaela; Oevermann, Anna; Borer-Germann, Stephanie E.; Gorgas, Daniela; Shelton, G. Diane; Drogemuller, Michaela et al. (2015): A RAB3GAP1 SINE Insertion in Alaskan Huskies with Polyneuropathy, Ocular Abnormalities, and Neuronal Vacuolation (POANV) Resembling Human Warburg Micro Syndrome 1 (WARBM1). In: *G3 (Bethesda, Md.)* 6 (2), S. 255–262. DOI: 10.1534/g3.115.022707.
- Yadav, Rajesh Singh; Tiwari, Neeraj Kumar (2014): Lipid integration in neurodegeneration. An overview of Alzheimer's disease. In: *Molecular neurobiology* 50 (1), S. 168–176. DOI: 10.1007/s12035-014-8661-5.
- Yamamoto, A.; Tagawa, Y.; Yoshimori, T.; Moriyama, Y.; Masaki, R.; Tashiro, Y. (1998): Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. In: *Cell structure and function* 23 (1), S. 33–42.
- Yamamoto, Hayashi; Kakuta, Soichiro; Watanabe, Tomonobu M.; Kitamura, Akira; Sekito, Takayuki; Kondo-Kakuta, Chika et al. (2012): Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. In: *The Journal of cell biology* 198 (2), S. 219–233. DOI: 10.1083/jcb.201202061.
- Yen, Wei-Lien; Shintani, Takahiro; Nair, Usha; Cao, Yang; Richardson, Brian C.; Li, Zhijian et al. (2010): The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. In: *The Journal of cell biology* 188 (1), S. 101–114. DOI: 10.1083/jcb.200904075.
- Young, Andrew R. J.; Chan, Edmond Y. W.; Hu, Xiao Wen; Köchl, Robert; Crawshaw, Samuel G.; High, Stephen et al. (2006): Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 18), S. 3888–3900. DOI: 10.1242/jcs.03172.

Yu, Zhong-Qiu; Ni, Tao; Hong, Bing; Wang, Hai-Yan; Jiang, Fen-Jun; Zou, Shenshen et al. (2012): Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. In: *Autophagy* 8 (6), S. 883–892. DOI: 10.4161/auto.19652.

Zoppino, Felipe Carlos Martin; Militello, Rodrigo Damian; Slavin, Ileana; Alvarez, Cecilia; Colombo, Maria I. (2010): Autophagosome formation depends on the small GTPase Rab1 and functional ER exit sites. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (9), S. 1246–1261. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2010.01086.x.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ADRAP	<i>Adipocyte differentiation-related protein</i>
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPK	AdenosinmonophosphateActivated Protein Kinase
ATG	<i>Autophagy related gens</i>
ATP	Adenosintriphosphat
A $\beta$ 42	Amyloid $\beta$ 42
B2M	Beta-2-Microglobulin
BAG	<i>Bcl-2 associated athanogene</i>
CALCOCO/NDP52	<i>Nuclear dot protein 52 kDa</i>
CLIMP	<i>Cytoskeleton-linking membrane protein of 63 kDa</i>
CMA	<i>Chaperone mediated autophagy</i>
COPI	<i>Coat protein complex I</i>
cytPrP	<i>Cytosolic Prion Protein</i>
DENN	<i>Differentially expressed in normal and neoplastic cells</i>
DFCP1	<i>Double FYVE domain-containing protein 1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAJC13	<i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13</i>
DPH	1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene
ER	endoplasmatischem Retikulum
FIT	<i>Fat storage-inducing transmembrane protein</i>
GABARAP	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>
GAP	<i>GTPase activating proteins</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GOLGA2	Golgin A2
GTP	Guanosintriphosphat
HA	<i>Hemagglutinin</i>
HSC70	<i>Heat shock cognate 70kDa protein</i>
KO	<i>knockout</i>
LAMP2A	<i>Lysosom-associated membrane protein 2A</i>
LD	Lipidtröpfchen ( <i>Lipid Droplet</i> )
LIR	<i>LC3 interacting region</i>
MAP1LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain</i>
MEF	Mous embrionic fibroblasts
mTOR	<i>Mechanistic target of Rapamycin</i>
NBR1	<i>Neighbor of BRCA1 gene 1</i>
nons	<i>nonsense</i>
NS5A	<i>Nonstructural protein 5A</i>
OPTN1	Optineurin
PAS	<i>Phagophore assembly site</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamine

PLIN2	Peripilin 2
PNPLA5	<i>Patatin like phospholipase domain containing 5</i>
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
RAB	<i>Ras-related in brain</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
Sec2	
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOD1	Superoxiddismutase 1
SQSTM1	<i>Sequestome 1</i>
TBC	Tre-2, Bub2 und Cdc16
TRAPP	<i>Transport protein particle</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VAPA	<i>Vesicle-associated membrane protein-associated protein A</i>
VAPB	<i>Vesicle-associated membrane protein-associated protein B</i>
VPS9	<i>Vacuolar protein sorting 9</i>
WARBM	Warburg-Micro-Syndrom
WIPI	<i>WD repeat protein interacting with phosphoinositides</i>

## 8.2. Primerliste der Human Autophagy Primer Library

Well	Symbol	Name	Well	Symbol	Name
A1	AKT1S1	<i>AKT1 substrate 1 (proline-rich)</i>	E1	LAMP2	<i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i>
A2	AMBRA1	<i>Autophagy/beclin-1 regulator 1</i>	E2	LAMP3	<i>Lysosomal-associated membrane protein 3</i>
A3	APOL1	<i>Apolipoprotein L, 1</i>	E3	LETM1	<i>Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1</i>
A4	ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>	E4	LETM2	<i>Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 2</i>
A5	ATG10	<i>ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae)</i>	E5	MAP1LC3A	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha</i>
A6	ATG12	<i>ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae)</i>	E6	MAP1LC3B	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta</i>
A7	ATG16L1	<i>ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)</i>	E7	MAP1LC3B2	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta 2</i>
A8	ATG16L2	<i>ATG16 autophagy related 16-like 2 (S. cerevisiae)</i>	E8	MAP1LC3C	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma</i>

## Anhang

Well	Symbol	Name	Well	Symbol	Name
A9	ATG2A	<i>ATG2 autophagy related 2 homolog A (S. cerevisiae)</i>	E9	MCL1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)</i>
A10	ATG2B	<i>ATG2 autophagy related 2 homolog B (S. cerevisiae)</i>	E10	PIK3C3	<i>Phosphoinositide-3-kinase, class 3</i>
A11	ATG3	<i>ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)</i>	E11	PIK3R4	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4</i>
A12	ATG4A	<i>ATG4 autophagy related 4 homolog A (S. cerevisiae)</i>	E12	PPM1K	<i>Protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)</i>
B1	ATG4B	<i>ATG4 autophagy related 4 homolog B (S. cerevisiae)</i>	F1	RAPTOR	<i>Raptor</i>
B2	ATG4C	<i>ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)</i>	F2	RASD1	<i>RAS, dexamethasone-induced 1</i>
B3	ATG4D	<i>ATG4 autophagy related 4 homolog D (S. cerevisiae)</i>	F3	RB1CC1	<i>RB1-inducible coiled-coil 1</i>
B4	ATG5	<i>ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)</i>	F4	RGS19	<i>Regulator of G-protein signaling 19</i>
B5	ATG7	<i>ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae)</i>	F5	RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
B6	ATG9A	<i>ATG9 autophagy related 9 homolog A (S. cerevisiae)</i>	F6	SEC16A	<i>SEC16 homolog A (S. cerevisiae)</i>
B7	BARKOR	<i>BARKOR (KIAA0831)</i>	F7	SEC16B	<i>SEC16 homolog B (S. cerevisiae)</i>
B8	BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>	F8	SEC23A	<i>Sec23 homolog A (S. cerevisiae)</i>
B9	BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	F9	SEC23B	<i>Sec23 homolog B (S. cerevisiae)</i>
B10	BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>	F10	SEC24A	<i>SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)</i>
B11	BECLIN1	<i>Beclin1</i>	F11	SEC24B	<i>SEC24 related gene family, member B (S. cerevisiae)</i>
B12	BECN1L1	<i>Becn1L1</i>	F12	SEC24C	<i>SEC24 related gene family, member C (S. cerevisiae)</i>

## Anhang

Well	Symbol	Name	Well	Symbol	Name
C1	BIRC5	<i>Effector cell peptidase receptor 1</i>	G1	SEC24D	<i>SEC24 related gene family, member D (S. cerevisiae)</i>
C2	BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>	G2	SH3GLB1	<i>SH3-domain GRB2-like endophilin B1</i>
C3	DDIT3	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>	G3	SH3GLB2	<i>SH3-domain GRB2-like endophilin B2</i>
C4	DRAM	<i>Damage-regulated autophagy modulator</i>	G4	SNX30	<i>Sorting nexin family member 30</i>
C5	EIF4EBP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>	G5	SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
C6	EIF4EBP2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2</i>	G6	TP53	<i>Tumor protein p53</i>
C7	EIF4G1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1</i>	G7	TP73	<i>Tumor protein p73</i>
C8	EPS15L1	<i>Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1</i>	G8	TPR	<i>Translocated promoter region (to activated MET oncogene)</i>
C9	FKBP15	<i>FK506 binding protein 15, 133kDa</i>	G9	ULK1	<i>Unc-51-like kinase 1 (C. elegans)</i>
C10	FRAP1	<i>FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1</i>	G10	ULK2	<i>Unc-51-like kinase 2 (C. elegans)</i>
C11	FRS2	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>	G11	ULK3	<i>Unc-51-like kinase 3 (C. elegans)</i>
C12	FRS3	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 3</i>	G12	ULK4	<i>Unc-51-like kinase 4 (C. elegans)</i>
D1	GABARAP	<i>GABA(A) receptor-associated protein</i>	H1	UVRAG	<i>UV radiation resistance associated gene</i>
D2	GABARAPL1	<i>GABA(A) receptor-associated protein like 1</i>	H2	WDR45L	<i>WDR45-like</i>
D3	GABARAPL2	<i>GABA(A) receptor-associated protein-like 2</i>	H3	WIPI1	<i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1</i>
D4	GBL	<i>G protein beta subunit-like</i>	H4	WIPI2	<i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2</i>

## Anhang

Well	Symbol	Name	Well	Symbol	Name
D5	GFI1B	<i>Growth factor independent 1B transcription repressor</i>	H5	Actb	<i>Actin, beta</i>
D6	GNAI3	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3</i>	H6	B2m	<i>Beta-2-microglobulin</i>
D7	GPSM1	<i>G-protein signaling modulator 1 (AGS3-like, C. elegans)</i>	H7	Gapd	<i>Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase</i>
D8	GPSM2	<i>G-protein signaling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)</i>	H8	Gusb	<i>Glucuronidase, beta</i>
D9	GPSM3	<i>G-protein signaling modulator 3 (AGS3-like, C. elegans)</i>	H9	Hprt1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
D10	HIF1A	<i>Hypoxia inducible factor 1, alpha</i>	H10	Pgk1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>
D11	HSPA5	<i>Heat shock 70kDa protein 5</i>	H11	Ppia	<i>Peptidylprolyl isomerase A</i>
D12	LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>	H12	Rpl13a	<i>Ribosomal protein L13a</i>

## 8.3. Primersequenzen Autophagy Array

Primer	Sequenz
<i>ampk/PRKAA1 for</i>	5'-CCTCAAGCTTTTCAGGCATC-3'
<i>ampk/PRKAA1 rev</i>	5'-TTTCATCCAGCCTTCCATTC-3'
<i>atg-2A for</i>	5'-AAGTACTTCTGCCCCAGGT-3'
<i>atg-2A rev</i>	5'-TCTCCAGGGATCACCATCT-3'
<i>atg-2B for</i>	5'-AGCTGGCATGAGCAGATTTT-3'
<i>atg-2B rev</i>	5'-GTGCACAGCTCCAAAGATGA-3'
<i>atg-3 for</i>	5'-GATGGCGGATGGGTAGATACA-3'
<i>atg-3 rev</i>	5'-TCTTCACATAGTGCTGAGCAATC-3'
<i>atg-4B for</i>	5'-ATGGACGCAGCTACTCTGAC-3'
<i>atg-4B rev</i>	5'-TTTTCTACCCAGTATCCAAACGG-3'
<i>atg-4C for</i>	5'-GTTGAAGAAGCAAGGCATCC-3'
<i>atg-4C rev</i>	5'-TCGGTGTGGTTCTTTCTCC-3'
<i>atg-4D for</i>	5'-AAGGCAGGTGACTGGTATGG-3'
<i>atg-4D rev</i>	5'-ACAGACTTCCACTCGGCTGT-3'
<i>Atg-5 for</i>	5'-TTCGAGATGTGTGGTTTGG-3'
<i>Atg-5 rev</i>	5'-ATGGTTCTGCTTCCCTTCA-3'
<i>atg-7 for</i>	5'-TGGAACAAGCAGCAAATGAG-3'
<i>atg-7 rev</i>	5'-AGACAGAGGGCAGGATAGCA-3'
<i>atg-9A for</i>	5'-GTCAGCTGCGTGGACTATGA-3'
<i>atg-9A rev</i>	5'-GACTTGAGCAGGCAAAAAGG-3'
<i>atg-12 for</i>	5'-TAGAGCGAACACGAACCATCC-3'

## Anhang

Primer	Sequenz
<i>atg-12 rev</i>	5'-CACTGCCAAAACACTCATAGAGA-3'
<i>atg-14 for</i>	5'-AGCAGACCTTGAGGAGTCCA-3'
<i>atg-14 rev</i>	5'-CCACAGACTGGGAAGGGATA-3'
<i>atg-16L1 for</i>	5'-ATGCGCGGATTGTCTCAGG-3'
<i>atg-16L1 rev</i>	5'-GTCCACTCATTACACATTGCTCT-3'
<i>atg-16L2 for</i>	5'-TCTGAGGTCAATGCTGTTTCG-3'
<i>atg-16L2 rev</i>	5'-AGGGGTCAAAGTCCACACTG-3'
<i>b2m for</i>	5'-GTGCTCGCGCTACTCTCTCT-3'
<i>b2m rev</i>	5'-TCTCTGCTGGATGACGTGAG-3'
<i>beclin1 for</i>	5'-AGGTTGAGAAAGGCGAGACA-3'
<i>beclin1 rev</i>	5'-GCTTTTGTCCACTGCTCCTC-3'
<i>gabap for</i>	5'-AGAAGAGCATCCGTTTCGAGA-3'
<i>gabap rev</i>	5'-GAGCTTTGGGAGCCTTTTCT-3'
<i>gabapL1 for</i>	5'-GGTCCCCGTGATTGTAGAGA-3'
<i>gabapL1 rev</i>	5'-GGAGGGATGGTGTGTTGAC-3'
<i>gabapL2 for</i>	5'-AAATATCCCGACAGGGTTC-3'
<i>gabapL2 rev</i>	5'-CAGGAAGATCGCCTTTTCAG-3'
<i>lamp1 for</i>	5'-CTGCCTTAAAGCTGCCAAC-3'
<i>lamp1 rev</i>	5'-TGTTCTCGTCCAGCAGACAC-3'
<i>lamp2 for</i>	5'-AATGCCACTTGCCTTTATGC-3'
<i>lamp2 rev</i>	5'-CAGTGCCATGGTCTGAAATG-3'
<i>lamp3 for</i>	5'-CCCCACCAGCTCATACAAC-3'
<i>lamp3 rev</i>	5'-CTGGAAGGGTGGTCTGGTTA-3'
<i>map1lc-3A for</i>	5'-CATGAGCGAGTTGGTCAAGA-3'
<i>map1lc-3A rev</i>	5'-CTCGTCTTCTCCTGCTCGT-3'
<i>map1lc-3B for</i>	5'-CTGTTGGTGAACGGACACAG-3'
<i>map1lc-3B rev</i>	5'-CTGGGAGGCATAGACCATGT-3'
<i>map1lc-3C for</i>	5'-CGGAAGCCTTTACTTGCTG-3'
<i>map1lc-3C rev</i>	5'-GTCTGTCTCAAGGCTGCTC-3'
<i>mtor for</i>	5'-CCTGCCACTGAGAGATGACA-3'
<i>mtor rev</i>	5'-TCCGGCTGCTGTAGCTTATT-3'
<i>nbr-1 for</i>	5'-GTTGCTGCCTCTGCATACAA-3'
<i>nbr-1 rev</i>	5'-TTTCTTCAGCAGCCGTAGGT-3'
<i>ndp-52/calco2 for</i>	5'-GTGGAAGACAACCCGTGAGT-3'
<i>ndp-52/calco2 rev</i>	5'-TTCTGGACGGAATTGGAAAG-3'
<i>p62/SQSTM-1 for</i>	5'-GTGGTAGGAACCCGCTACAA-3'
<i>p62/SQSTM-1 rev</i>	5'-GAGAAGCCCTCAGACAGGTG-3'
<i>rab7A for</i>	5'-CTGACCAAAGGAGGTGATGGT-3'
<i>rab7A rev</i>	5'-GTAGAAGGCCACACCGAGAG-3'
<i>rab11A for</i>	5'-AGCAAGAGCACCATTGGAGT-3'
<i>rab11A rev</i>	5'-CCCTGCTGTGTCCATATCT-3'
<i>rab18 for</i>	5'-CTGAAATTTGCACGAAAGCA-3'
<i>rab18 rev</i>	5'-CACAGTCCAGGGGTCTGAAT-3'
<i>rab3gap-1for</i>	5'-CTGACCGAAGGGATCATTGT-3'
<i>rab3gap-1 rev</i>	5'-CCTTTTCGACGGCAAATTTA-3'
<i>rab3gap-2 for</i>	5'-TGAGAATGGTGTGCTCTTGC-3'
<i>rab3gap-2rev</i>	5'-TGATTTTCGACAAGCACGAAG-3'
<i>rpl-19 for</i>	5'-GAAATCGCCAATGCCAACTC-3'
<i>rpl-19 rev</i>	5'-TTCCTTGGTCTTAGACCTGCG-3'
<i>tbc1d20 for</i>	5'-CACCAGGCTCTGAACAGTGA-3'
<i>tbc1d20 rev</i>	5'-CATTGGCATTGACATTGAGG-3'
<i>ulk1 for</i>	5'-CAGAACTACCAGCGCATTGA-3'
<i>ulk1 rev</i>	5'-TCCACCCAGAGACATCTCC-3'
<i>ulk2 for</i>	5'-TTTGGTGCCACACAACATCT-3'
<i>ulk2 rev</i>	5'-GGAAGTGGAAATTGGTGCTGT-3'



## Anhang

Primer	Sequenz
<i>ulk3 for</i>	5'-CAGGATTCTGCCTGAGAAGG-3'
<i>ulk3 rev</i>	5'-ATGTGTTGTGCGAAACCAAA-3'
<i>uvrag for</i>	5'-GCACCTAGCCAAGAACAAG-3'
<i>uvrag rev</i>	5'-AGCTTCTGAGACTGGGTGGA-3'
<i>vapa for</i>	5'-TGAGCAGCATCAACAACACA-3'
<i>vapa rev</i>	5'-TGTTTTGGCATAGGTCCAT-3'
<i>vapb for</i>	5'-TGTTTGAATTGCCAGCAGAG-3'
<i>vapb rev</i>	5'-GCCTCTGAACTTCACCTTGC-3'
<i>wipi1 for</i>	5'-CCAGACCCAGTGCATCTTCA-3'
<i>wipi1 rev</i>	5'-TCATGACTGCTTCGTTTTGC-3'
<i>wipi2 for</i>	5'-CTCTCAGACTGCCCTTAG-3'
<i>wipi2 rev</i>	5'-ACCCAGGTCGTCTGTGTAGG-3'

8.4. Pipettierschema *Autophagy Array*

Platte1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LC3a	ULK1	UVRAG	TRAPP	Alsin	VAPA	LC3a	ULK1	UVRAG	TRAPP	Alsin	VAPA
B	LC3a	ULK1	UVRAG	TRAPP	Allsin	VAPA	LC3a	ULK1	UVRAG	TRAPP	Allsin	VAPA
C	LC3b	ULK2	WIPI1	RAB33b	LRRK1	VAPB	LC3b	ULK2	WIPI1	RAB33b	LRRK1	VAPB
D	LC3b	ULK2	WIPI1	RAB33b	LRRK1	VAPB	LC3b	ULK2	WIPI1	RAB33b	LRRK1	VAPB
E	LC3c	ULK3	WIPI2	RAB11	TBC1D14	rpl19	LC3c	ULK3	WIPI2	RAB11	TBC1D14	rpl19
F	LC3c	ULK3	WIPI2	RAB11	TBC1D14	rpl19	LC3c	ULK3	WIPI2	RAB11	TBC1D14	rpl19
G	NBR1	NDP52	RAB1	TBC1D25	TBC1D5	b2m	NBR1	NDP52	RAB1	TBC1D25	TBC1D5	b2m
H	NBR1	NDP52	RAB1	TBC1D25	TBC1D5	b2m	NBR1	NDP52	RAB1	TBC1D25	TBC1D5	b2m

Platte2)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATG12	ATG2b	ATG4d	Beclin1	LAMP1	p62	ATG12	ATG2b	ATG4d	Beclin1	LAMP1	p62
B	ATG12	ATG2b	ATG4d	Beclin1	LAMP1	p62	ATG12	ATG2b	ATG4d	Beclin1	LAMP1	p62
C	ATG16L1	ATG3	ATG5	GABARAP	LAMP2	mTor	ATG16L1	ATG3	ATG5	GABARAP	LAMP2	mTor
D	ATG16L1	ATG3	ATG5	GABARAP	LAMP2	mTor	ATG16L1	ATG3	ATG5	GABARAP	LAMP2	mTor
E	ATG16L2	ATG4b	ATG7	GABARAPL	LAMP3	rpl19	ATG16L2	ATG4b	ATG7	GABARAPL	LAMP3	rpl19
F	ATG16L2	ATG4b	Atg7	GABARAPL	LAMP3	rpl19	ATG16L2	ATG4b	Atg7	GABARAPL	LAMP3	rpl19
G	ATG2a	ATG4c	ATG9a	GABARAPL	AMPK	b2m	ATG2a	ATG4c	ATG9a	GABARAPL	AMPK	b2m
H	ATG2a	ATG4c	ATG9a	GABARAPL	AMPK	b2m	ATG2a	ATG4c	ATG9a	GABARAPL	AMPK	b2m

## Anhang

## Paltte3)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RAB18	RME8	RAB26	RAB18	RME8		RAB18	RME8	RAB26	RAB18	RME8	
B	RAB18	RME8	RAB26	RAB18	RME8		RAB18	RME8	RAB26	RAB18	RME8	
C	TBC1D20	RAB5	rpl19	TBC1D20	rpl19		TBC1D20	RAB5	rpl19	TBC1D20	rpl19	
D	TBC1D20	RAB5	rpl19	TBC1D20	rpl19		TBC1D20	RAB5	rpl19	TBC1D20	rpl19	
E	RAB3GAP1	RAB7	b2m	RAB3GAP1	b2m		RAB3GAP1	RAB7	b2m	RAB3GAP1	b2m	
F	RAB3GAP1	RAB7	b2m	RAB3GAP1	b2m		RAB3GAP1	RAB7	b2m	RAB3GAP1	b2m	
G	RAB3GAP2	RAB24		RAB3GAP2			RAB3GAP2	RAB24		RAB3GAP2		
H	RAB3GAP2	RAB24		RAB3GAP2			RAB3GAP2	RAB24		RAB3GAP2		