



RAB3GAP1 und RAB3GAP2 (*RAB3 GTPase-activating Protein 1/2*) beeinflussen die Autophagie in *C. elegans* und humanen Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaft

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg Universität

Mainz

von

Natalie Spang

geboren am 06.04.1985 in Mainz

Mainz, 2015

Dekan: Prof. Dr. Hans Zischler

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 05. 2015

Danksagung

[Redacted text block containing multiple lines of obscured content]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Proteinhomöostase und ihre pathobiochemische Bedeutung.....	1
1.2. Molekulare Chaperone, Proteasom, Autophagie und Proteostase.....	2
1.2.1. Molekulare Chaperone.....	3
1.2.2. Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	4
1.2.3. Autophagie – ein Überblick.....	4
1.2.3.1. Makroautophagie.....	7
1.3. Grundlegende Funktionen von RAB GTPasen.....	11
1.3.1. RAB3 und RAB3GAP.....	14
1.4. FEZ1, FEZ2 und RAB3GAP.....	15
1.5. <i>C. elegans</i> als Modellorganismus.....	17
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1. Material.....	22
2.1.1. Geräte.....	22
2.1.2. Chemikalien und Kits.....	23
2.1.3. Puffer und Lösungen.....	24
2.1.4. Bakterienstämme.....	27
2.1.5. Nematoden.....	28
2.1.6. Zelllinien.....	28
2.1.7. Plasmide.....	28
2.1.8. siRNA – Zellkultur.....	29
2.1.9. Primer.....	29
2.1.10. Antikörper.....	31
2.2. Methoden.....	32
2.2.1. Mikrobiologische Methoden.....	32
2.2.1.1. Bakterienanzucht.....	32
2.2.1.2. Herstellen von bakteriellen Dauerkulturen.....	32
2.2.1.3. Transformation von Bakterien.....	32
2.2.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> -Methoden.....	32
2.2.2.1. Kultivierung.....	32
2.2.2.2. Bakterielle Starterkulturen.....	33
2.2.2.3. Herunterregulation von mRNA-Spiegeln mittels RNA-Interferenz.....	33
2.2.2.4. Synchronisierung einer <i>C. elegans</i> -Kultur mittels Eiablage.....	34
2.2.2.5. RNAi-vermittelte Proteostase-Analyse.....	34

2.2.2.6.	Aggregation im Polyglutamin-Wurm	35
2.2.2.7.	Paralyse-Prüfung.....	35
2.2.2.8.	Thioflavin S-Färbung	36
2.2.2.9.	Autophagie-Untersuchung mit GFP::LGG1-exprimierenden Würmern	36
2.2.3.	Zellbiologische Methoden.....	37
2.2.3.1.	Kultivierung von humanen Zellen	37
2.2.3.2.	Zelluläre Dauerkulturen	37
2.2.3.3.	Transiente Transfektionen.....	37
2.2.3.4.	Behandlung mit Bafilomycin A1 und Rapamycin.....	38
2.2.3.5.	Optische Darstellung von Autophagie in Zellen.....	38
2.2.3.6.	Co-Immunopräzipitation.....	39
2.2.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.2.4.1.	Proteinpräparation.....	40
2.2.4.2.	Proteinquantifizierung.....	40
2.2.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.2.4.4.	Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot	41
2.2.4.5.	Immunologischer Nachweis der Proteine.....	42
2.2.4.6.	Densitometrische Auswertung der Western Blots	42
2.2.4.7.	Analyse der autophagischen Aktivität.....	42
2.2.5.	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.5.1.	Primerdesign	43
2.2.5.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
2.2.5.3.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen	44
2.2.5.4.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
2.2.5.5.	Reverse Transkription / Synthese von cDNA.....	44
2.2.5.6.	Restriktionsverdau der DNA mit Restriktionsendonucleasen	45
2.2.5.7.	Ligation	45
2.2.5.8.	Plasmid-Präparation	45
2.2.5.9.	Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA	46
2.2.5.10.	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	46
2.2.5.11.	Quantitative Echtzeit- PCR	46
2.2.6.	Statistische Auswertung.....	47
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Die Aufklärung und Charakterisierung neuer Proteostase-beeinflussender Gene in <i>C. elegans</i>	48
3.1.1.	RNAi-vermittelte Proteostase-Analyse von Chromosom in <i>C. elegans</i> zeigt mögliche neue Modulatoren der Protein-Homöostase.....	48
3.1.2.	Weitere Charakterisierung der neuen Modulatoren der Proteostase	52

3.1.2.1.	Nähere Beschreibung der Proteostase-beeinflussenden Faktoren mittels Untersuchung von PolyQ::YFP-Aggregation in AM140	53
3.1.2.2.	Weitere Charakterisierung der identifizierten Gene mittels Paralyse-Untersuchung in CL2006.....	57
3.1.2.3.	Nähere Beschreibung der Proteostase-beeinflussenden Faktoren mittels Untersuchung der Aggregation von Thioflavin S-gefärbten A β 42-Aggregaten in CL2006	60
3.1.3.	Der RNAi-vermittelte Verlust von RBG-1 und RBG-2 inhibiert die Autophagie	62
3.1.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse im Wurmsystem	64
3.2.	Der RAB3GAP-Komplex im Säugersystem	65
3.2.1.	Die Herunterregulation von RAB3GAP1/2 hemmt die Autophagie.....	65
3.2.2.	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Herunterregulation von RAB3GAP1/2	68
3.2.3.	Die Überexpression von RAB3GAP1/2 fördert die Autophagie	72
3.2.4.	Die Effekte der RAB3GAPs auf die Autophagie sind unabhängig von der RAB GTPase RAB3.....	75
3.3.	Untersuchung der Interaktionen von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 mit anderen Proteinen	79
3.3.1.	Der RAB3GAP1/2-Komplex interagiert nicht mit einem der hier untersuchten Autophagie-Gene in der Co-Immunopräzipitation.....	79
3.3.2.	Die Co-Immunopräzipitation zeigt keine direkte Interaktion von FEZ1, FEZ2 und RAB3GAP1.....	79
3.3.3.	Die IP/MS-Analysen zeigten keine direkte Interaktion zwischen RAB3GAP1 und FEZ1	80
3.4.	Die Effekte von FEZ1 und FEZ2 auf die Autophagie im Vergleich zu den Veränderungen durch den RAB3GAP1/2-Komplex.....	82
4.	Diskussion	88
4.1.	Der RAB3GAP-Komplex beeinflusst die Autophagie in <i>C. elegans</i> und humanen Zellen	89
4.1.1.	Könnten die Erkenntnisse dieser Arbeit zu neuen therapeutischen Ansätzen im Micro- und Martsolf-Syndrom führen?	95
4.2.	Der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Autophagie ist unabhängig von RAB3, könnte aber über RAB18 vermittelt sein.....	97
4.3.	FEZ1 und FEZ2 haben antagonistische Effekte zu RAB3GAP1/2.....	99
4.4.	Die RNAi-vermittelte Proteostase-Analyse in <i>C. elegans</i> zeigt neue Modifikatoren der Proteostase	101
5.	Zusammenfassung	105
5.1.	Summary	106
6.	Literaturverzeichnis.....	107

7.	Anhang.....	I
7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
7.2.	Abbildungsverzeichnis	III
7.3.	Tabellenverzeichnis.....	V
7.4.	Auffällige RNAi-Klone aus der Hochdurchsatzanalyse des Chromosoms I in <i>C. elegans</i>	VI
7.5.	<i>Rbg-2</i> RNAi-Plasmid	XXI
7.6.	Liste der HCIPs der proteomischen Analyse	XXIII

1. Einleitung

1.1. Proteinhomöostase und ihre pathobiochemische Bedeutung

Eine bedeutende Herausforderung jeder Zelle ist die Aufrechterhaltung der Integrität und Funktionalität der Gesamtheit ihrer Proteine, des Proteoms. Das physiologische Gleichgewicht aus Synthese, Stabilität und Abbau der Proteine wird als Proteinhomöostase oder Proteostase bezeichnet (Lamb *et al.*, 2013). Sie ist essentiell, denn nur die Gewährleistung der Proteostase ermöglicht den korrekten Ablauf von Stoffwechselfvorgängen, weswegen sie auch unter sich verändernden Umweltbedingungen erhalten bleiben muss. Die Zelle nutzt ein komplexes Qualitätskontrollsystem, das für die korrekte Synthese, Faltung und den Umsatz von Proteinen verantwortlich ist, indem sie die Struktur der Proteine überprüft und fehlgefaltete oder beschädigte Proteine entfernt (Goldberg, 2003; Kubota, 2009). Dieses Proteinqualitätskontrollnetzwerk setzt sich aus molekularen Chaperonen, dem Ubiquitin-Proteasom-System und der Autophagie zusammen (Todde *et al.*, 2009; Hartl *et al.*, 2011).

In gealterten Zellen oder Organismen treten häufiger fehlgefaltete Proteine auf, was gleichzeitig ein Risikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen ist (Ryter *et al.*, 2014). Diese fehlgefalteten Proteine werden zusätzlich im Alter vermehrt zu Aggregaten akkumuliert (Boya *et al.*, 2013; Ryter *et al.*, 2014). Um diese aggregierten Proteine nachzuweisen, wurden in einer Studie die unlöslichen Proteine in *C. elegans* und *S. cerevisiae* analysiert. Interessanterweise wurde eine beträchtliche Überlappung zwischen den altersabhängigen unlöslichen Proteinen in Hefe und Wurm identifiziert (Boya *et al.*, 2013; Kirkin *et al.*, 2009; Deretic *et al.*, 2013). Einige dieser Proteine, die in *S. cerevisiae* und in *C. elegans* gefunden wurden, werden im Menschen mit Krankheiten assoziiert, deren Pathologien durch fehlgefaltete oder aggregierende Proteinen entstehen (Boya *et al.*, 2013). Jedoch ist unbekannt, ob die altersabhängige Akkumulation von unlöslichen Proteinen eine Ursache für zelluläre Dysfunktion bei der Alterung ist oder infolge der fortschreitenden Abnahme der Proteostase entsteht (Todde *et al.*, 2009).

Insbesondere neurodegenerative Krankheiten sind mit einer gestörten Proteinhomöostase und der damit verbundenen Akkumulation von beschädigten oder fehlgefalteten Proteinen assoziiert (Cajigas *et al.*, 2010; Morawe *et al.*, 2012). Proteinaggregation wird verbunden mit der Amyotrophen Lateralsklerose, der Alzheimer'schen Krankheit, der Huntington'schen Krankheit, der Parkinson'schen Krankheit, sowie alpha-Synucleinopathien wie Demenz mit Lewy Bodies und Multipler Systematrophie (Goedert und Spillantini, 2006; Nagai *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2003; Scherzinger *et al.*, 1997; Spillantini und Goedert, 2000). Um nur zwei Beispiele von Proteinen aufzuzeigen, die in solchen Erkrankungen akkumulieren und aggregieren können,

lässt sich einmal das Huntingtin der Huntington'sche Krankheit nennen, denn dieses krankhaft veränderte Protein aggregiert im Verlauf der Erkrankung zunehmend, oder bei der übertragbaren Spongiformen Enzephalopathie (Prionenkrankheit) werden die organischen Toxine (Prionen), die virusähnlichen Eigenschaften aufweisen, in Bündel akkumuliert (Arrasate *et al.*, 2004; Caughey und Lansbury, 2003).

Auch Erkrankungen, die nicht neurodegenerativ sind, wie die nichtneuropathische systemische Amyloidose werden mit Proteinaggregation in Verbindung gebracht (Chiti und Dobson, 2006). Diese große Anzahl an Krankheiten, die mit fehlgefalteten oder beschädigten Proteinen in Zusammenhang steht, zeigt wie wichtig der Erhalt der Proteostase für die einzelne Zelle und auch den gesamten Organismus ist.

1.2. Molekulare Chaperone, Proteasom, Autophagie und Proteostase

Das Qualitätskontrollsystem der Proteinhomöostase muss fehlgefaltete Proteine erkennen und für deren effektive Entfernung sorgen, um eine massive Aggregation zu verhindern (Kubota, 2009). Im zellulären Umfeld tragen neu-synthetisierte Proteine das Risiko sich aberrant zu falten, zu aggregieren und potenziell toxische Formen anzunehmen.

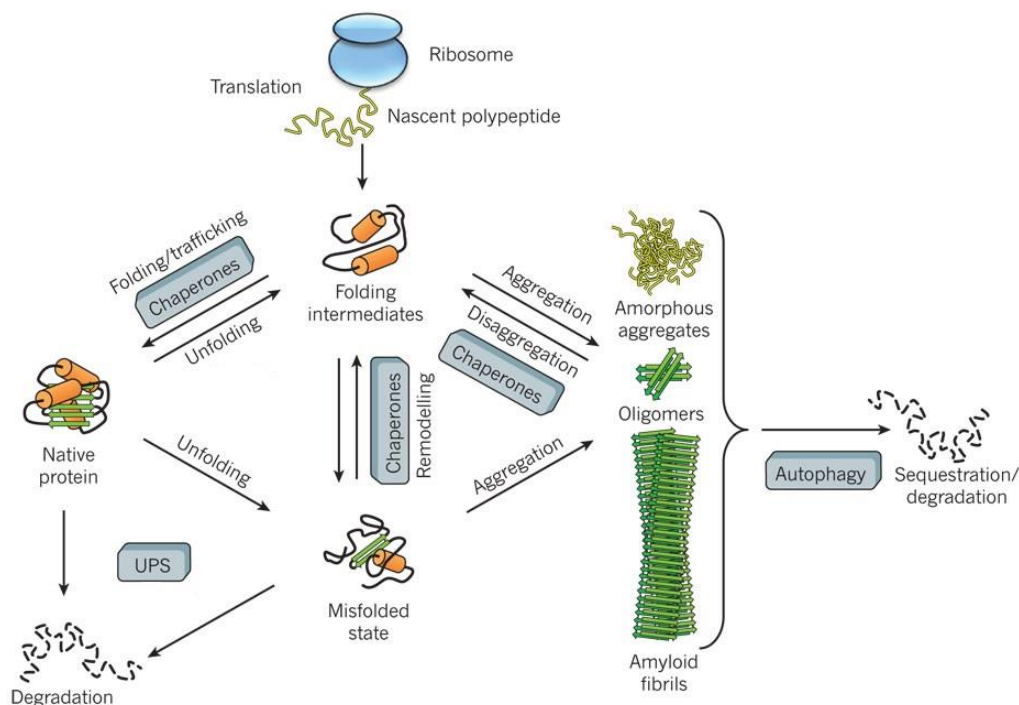


Abbildung 1: Molekulare Chaperone, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und Autophagie dienen zur Aufrechterhaltung der Proteostase und als die wichtigsten Komponenten für den Abbau von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen (Hartl *et al.*, 2011).

Das Proteostase-erhaltende Netzwerk (Abbildung 1) besteht aus mehreren hundert Proteinen, darunter Molekulare Chaperone, die die neugebildeten Proteine bei ihrer Faltung oder Rückfaltung unterstützen, oder dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und der Autophagie, die den Abbau irreversibel fehlgefalteter und aggregierter Proteine vermitteln (Powers *et al.*, 2009).

1.2.1. *Molekulare Chaperone*

Molekulare Chaperone nutzen effektive Mechanismen um Aggregation zu verhindern und effiziente Faltung zu fördern (Hartl *et al.*, 2011; Ouyang *et al.*, 2014). Somit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Proteinqualitätskontrolle und der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase (Lamb *et al.*, 2013). Viele kleine Proteine falten sich ohne andere Zellkomponenten oder Energieaufwand korrekt aufgrund ihrer Aminosäuresequenz (Dobson und Karplus, 1999). Die meisten Polypeptide aber brauchen molekulare Chaperone für eine effiziente Faltung (Hartl, 1996). Diese speziellen Proteine, unter ihnen Mitglieder der Hitzeschock-Protein(HSP)-Familie, bilden ein komplexes Chaperon-Netzwerk, das die korrekte Faltung und Rückfaltung von Proteinen unterstützt (Wang *et al.*, 2013; Altenhofer *et al.*, 2010). Die Mitglieder der HSP-Familien werden nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert, beispielsweise HSP40, HSP60, HSP70, HSP100 und kleine HSPs (*small HSPs*; (Hartl *et al.*, 2011).

Molekulare Chaperone spüren fehlgefaltete Proteine auf und führen sie dem Proteinabbau-system zu, wenn eine Faltung im denaturierten Zustand nicht mehr erreicht werden kann (Erich *et al.*, 2012). Dabei unterstützen Mitglieder der HSP70- und der HSP90-Familie, zusammen mit den Chaperoninen (HSP60) als molekulare multikomponente Komplexe die Faltung von Proteinen und werden durch ATP und andere Cofaktoren reguliert. Sie erkennen hydrophobe Aminosäuren, die bei nicht-nativen Proteinen freiliegen. Bei der Faltung können sie mit ATP-unabhängigen Chaperonen wie den kleinen HSPs, die als „Holdasen“ fungieren und die Reaktion abpuffern, kooperieren. Beispielsweise gehören zu der HSP70-Proteinfamilie das konstitutiv exprimierte HSC70 (*Heat Shock Cognate 71 kDa Protein*), auch bekannt als HSPA8 (*Heat Shock 70 kDa Protein 8*), und Stress-induzierte Formen. Der ATP-abhängige Reaktionszyklus von HSP70 wird durch Chaperone der HSP40(DnaJ)-Familie und *Nucleotide-Exchange Factors* reguliert (Kampinga und Craig, 2010; Mayer, 2010). Mitglieder der HSP-Familien sind eine Gruppe hochkonservierter homologer Proteine, beispielsweise findet sich ein HSP70-Ortholog auch in *C. elegans* mit der Bezeichnung HSP110 (Morley und Morimoto, 2004).

Akkumulieren trotz der Aktivität der Chaperone fehlgefaltete oder beschädigte Proteine, müssen diese effizient abgebaut werden. Der Zelle stehen dafür zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung, das Ubiquitin-Proteasom-System, sowie die Autophagie (Abbildung 1).

1.2.2. *Das Ubiquitin-Proteasom-System*

Der proteasomale Abbau ist ein wichtiger Faktor, um die Qualität intrazellulärer Proteine zu wahren und selektiv fehlgefaltete oder beschädigte Polypeptide zu degradieren. In eukaryotischen Zellen verhindert das UPS die Akkumulation von nicht-funktionellen und potentiell toxischen Proteinen (Jung *et al.*, 2009b). Dieser Prozess ist vor allem bei sich stark verändernden Umweltbedingungen essentiell. Zu diesen gehören Hitzestress oder oxidativer Stress. Aber auch bei einer Reihe von Krankheiten wie den bekannten neurodegenerativen Erkrankungen oder Mukoviszidose spielt der proteasomale Abbau eine große Rolle (Goldberg, 2003).

Das UPS ist für den Abbau von redundanten oder abnormalen, kurzlebigen Proteinen verantwortlich (Kipreos und Pagano, 2000). Der Proteinabbau durch UPS verläuft mehrstufig und findet in Gegenwart von Ubiquitin, drei Klassen von Enzymen und dem Proteasom statt. Anfangs wird das abzubauen Proteinsubstrat mit Ubiquitin markiert (Klionsky und Emr, 2000). Dies erfolgt über die kurz aufeinander folgenden katalytischen Funktionen von drei Enzymen, bezeichnet als E1, E2 und E3. Dies ist notwendig, um die richtige Polyubiquitinierung des Substrats zu gewährleisten (Martin *et al.*, 2005). Letztlich wird das ubiquitinierte Protein im Proteasom abgebaut. Das Proteasom ist ein proteolytischer Komplex, der sowohl im Zellkern als auch im Zytosol vorhanden ist. Es besteht aus einem hohlen zylindrischen Multienzymkern (20S-Einheit), der für den Abbau der Verbindungen verantwortlich ist und zwei zusätzlichen regulatorischen Einheiten, den *19S-Caps*, die beide die gleiche Struktur aus drei Untereinheiten haben und sich an den gegenüberliegenden Enden der 20S-Einheit befinden (Handley *et al.*, 2013; Deretic *et al.*, 2013).

Neben dem proteasomalen Abbau existiert in der Zelle noch der lysosomale Abbau mittels Autophagie. Der autophagosomale Abbau ist ein ubiquitärer Prozess zum Recycling fehlgefalteter Polypeptide, langlebiger Proteine, Makromolekülen und beschädigter oder alter Organellen (Klionsky *et al.*, 2007).

1.2.3. *Autophagie – ein Überblick*

Der Abbau mittels Autophagie ist ein hochkonservierter eukaryotischer Degradationsprozess bei dem Teile des Zytosols oder Organellen in Doppelmembranvesikeln (Autophagosomen) abgesondert werden, die dann mit degradativen Organellen (Lysosomen) für den Abbau und das Recycling der resultierenden Makromolekülen verschmelzen (Abbildung 2; Yang und Klionsky, 2009). Dieser Pfad kann durch viele Umwelteinflüsse stimuliert werden, darunter Nahrungs- oder Wachstumsfaktorenmangel, Hypoxie, reaktive Sauerstoffspezies, DNA-Schäden,

Proteinaggregation, geschädigte Organellen, oder intrazelluläre Pathogene. Stimulusabhängige und basale Signaltransduktionswege müssen aktiviert werden um die verschiedenen Phasen des autophagosomalen Abbaus zu koordinieren. Autophagie wird neben anderen zellulären Stressantworten stimuliert und ist eine zentrale Komponente der integrierten Stressantwort (Kroemer *et al.*, 2010).

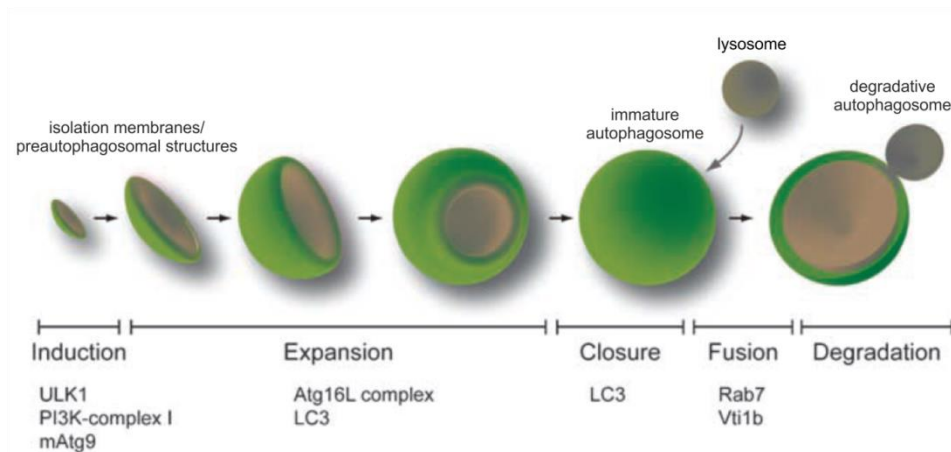


Abbildung 2: Schema des Autophagieweges in Säugerzellen am Beispiel der Makroautophagie (Longatti und Tooze, 2009).

Die Autophagie wurde das erste Mal in den 1960er Jahren beschrieben (De Duve und Wattiaux, 1966) und der spezifische Abbau mittels Autophagie wurde fast zehn Jahre später entdeckt (Bolender und Weibel, 1973). Die substratspezifische Autophagie baut nur selektiv ein Substrat ab und wird dann benannt nach ihrer abzubauenen Zellkomponente. Zum Beispiel beschreibt Xenophagie den Abbau von Bakterien und Viren, Aggrephagie baut aggregierte Proteine ab, Pexophagie entfernt Peroxisomen, und Mitophagie Mitochondrien (Johansen und Lamark, 2011; Kristensen *et al.*, 2008; Cuanalo-Contreras *et al.*, 2013). Später folgte die erste morphologische Beschreibung von Autophagie in *S. cerevisiae* (Takeshige *et al.*, 1992), und bis heute wurden die Vorgänge des autophagosomalen Abbaus am besten und sehr detailliert in der Hefe aufgeklärt (Stromhaug und Klionsky, 2001). In einem Hochdurchsatzanalys bei dem nach Autophagiemutanten gesucht wurde, wurden die ersten ATGs (*Autophagy-Related Genes*) entdeckt und bis heute sind über 30 essentielle Autophagie-Proteine beschrieben worden (Tsukada und Ohsumi, 1993; Klionsky *et al.*, 2003). Der Prozess der Autophagosomen-Bildung wird in Hefe und Säugerzellen durch hoch-konservierte Proteine vermittelt und somit ist dieser Vorgang bei beiden gleichartig. Die meisten der involvierten Proteine wurden als erstes in *S. cerevisiae* entdeckt (Longatti und Tooze, 2009). Die ersten der hochkonservierten ATGs, die im Säugersystem nachgewiesen werden konnten, waren ATG5 und ATG12 (Alers *et al.*, 2012; Mizushima *et al.*, 1998).

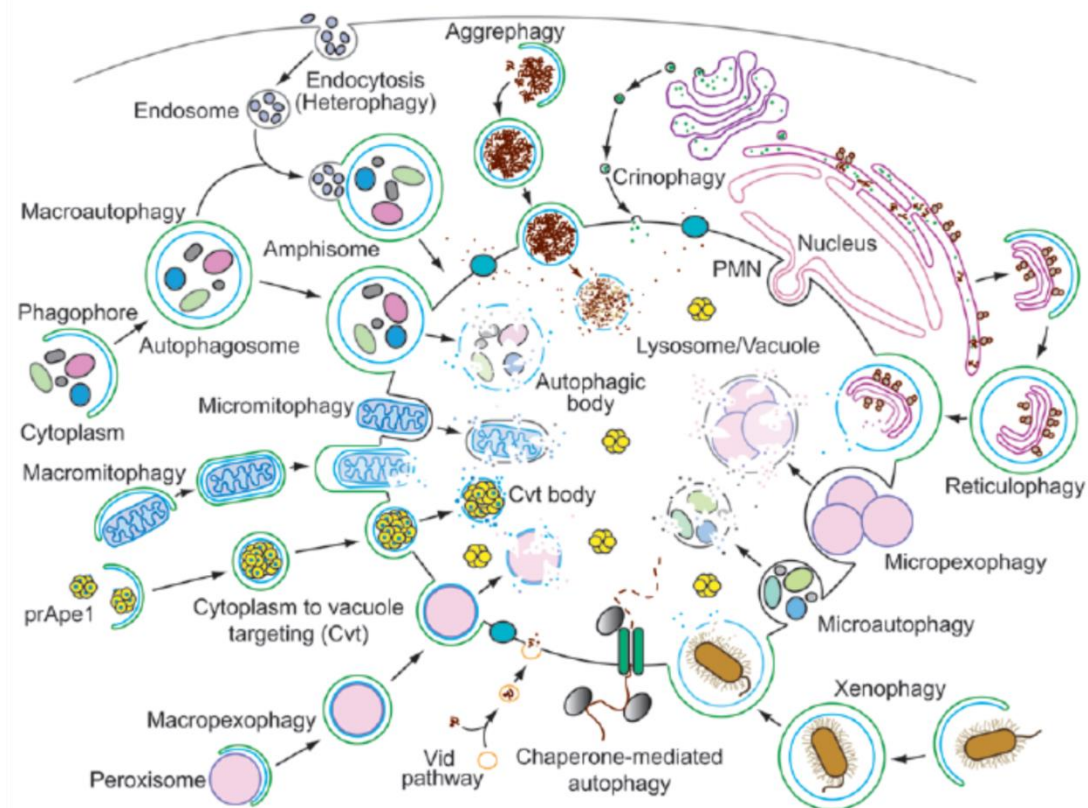


Abbildung 3: Eine schematische Darstellung der autophagosomalen Abbauwege mit den lysosomalen / vakuolären Systemen: das Modell zeigt Aspekte von Hefen und höheren Eukaryonten (Klionsky *et al.*, 2007).

Wie Abbildung 3 zeigt sind alle Prozesse bei denen man von Autophagie spricht vergleichsweise komplex vernetzt und oft nur schwer vollständig voneinander zu trennen. Man unterscheidet allgemein die Chaperon-vermittelte Autophagie, die Mikroautophagie und die Makroautophagie. Mikroautophagie ist ein Prozess, in dem Lysosomen direkt Teile des Zytoplasma für den Abbau aufnehmen. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie erkennen zytoplasmatische Chaperon-Proteine lösliche Proteine mit einer bestimmten Aminosäure-Sequenz und transportieren diese zu den Lysosomen. Makroautophagie ist ein Prozess, in dem eine nicht-selektive Aufnahme von zytoplasmatischem Material erfolgt, einschließlich Organellen, das abgebaut werden soll (Klionsky *et al.*, 2007). Dabei werden die Zellkomponenten mit einer Membran umschlossen, die anschließend als Vesikel mit den Lysosomen fusioniert um die Bestandteile zu degradieren (Girard und McPherson, 2008; Vilarino-Guell *et al.*, 2014). Zu den bisher beschriebenen Autophagiesubstraten gehören Proteinaggregate, Lipidtröpfchen, dysfunktionale Organellen und eindringende Krankheitserreger (Hubbard *et al.*, 2012). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit steht die Makroautophagie im Fokus der Untersuchungen.

Autophagie tritt nur im Zytoplasma auf und in den meisten Zellen läuft sie unter basalen Bedingungen bei einer niedrigen Aktivität ab. Unter ungünstigen Bedingungen wie

Nährstoffmangel, wird sie hochreguliert, wodurch die Zelle weiterhin mit Nährstoffen versorgt wird um die grundlegenden Zellaktivitäten aufrecht zu erhalten (Details siehe 1.2.3.1). Autophagie ist dann ein effektiver intrazellulärer Recycling-Mechanismus.

1.2.3.1. Makroautophagie

Die Makroautophagie, im Folgenden nun als Autophagie bezeichnet, unterteilt sich in vier Phasen: die Induktion, die Nukleation, die Elongation und die Degradation (Longatti und Tooze, 2009). Abbildung 4 zeigt die verschiedenen Phasen und deren Regulation mit beteiligten Proteinen im Detail.

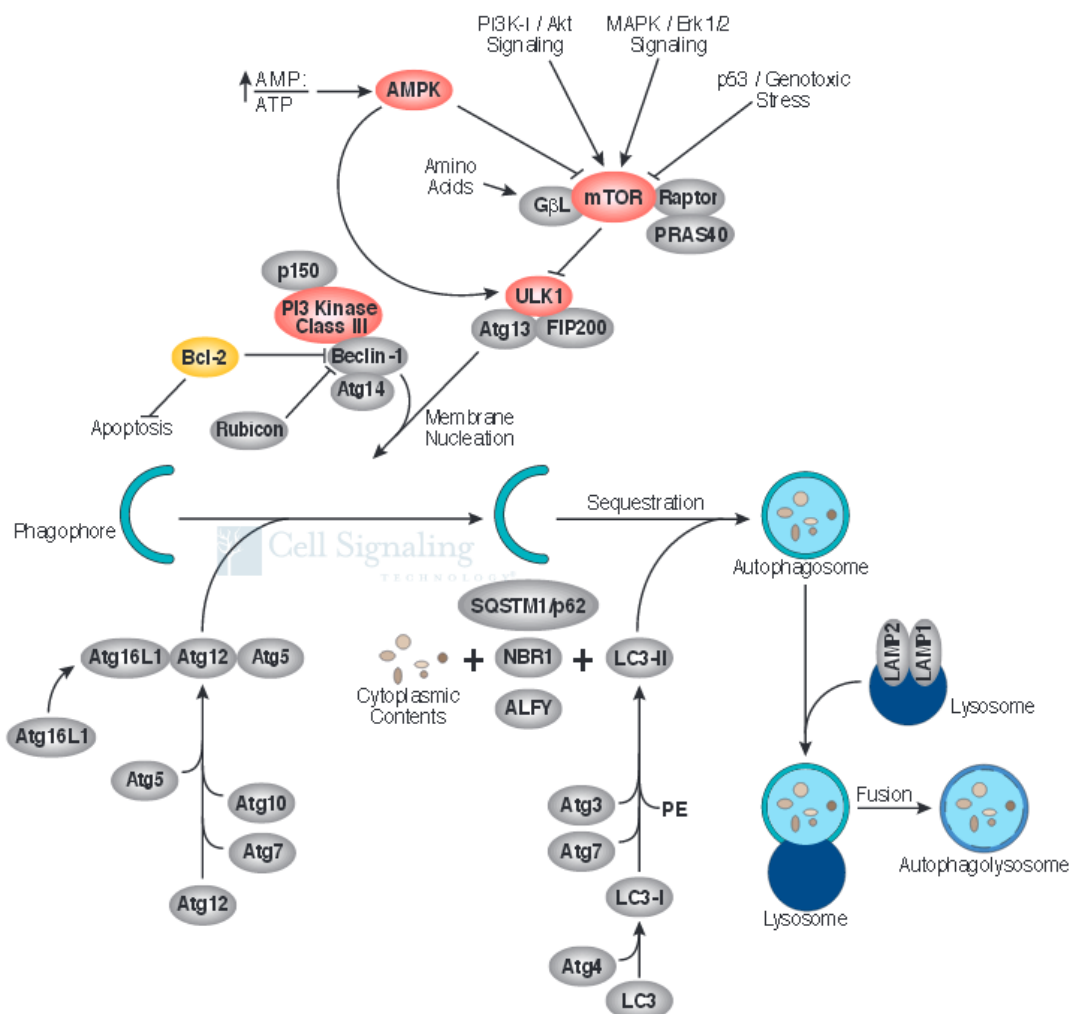


Abbildung 4: Illustration der Regulationswege sowie den Hauptphasen des makroautophagischen Abbaus (Quelle: *Cell signaling*, 2014 / Details siehe Text).

Induziert wird der autophagosomale Abbau bei sich verändernden Umweltbedingungen wie Nährstoffmangel oder zellulärem Stress (Kuma und Mizushima, 2010). mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) inhibiert bei normaler Nährstoffversorgung aktiv die Autophagie (Noda

und Ohsumi, 1998), kann aber durch AMPK (AMP-aktivierende Proteinkinase) inhibiert werden, die ein Sensor für den Energiegehalt der Zelle ist (Gwinn *et al.*, 2008). mTOR deaktiviert selbst den ULK-Komplex, der aus ULK1, ULK2 (*UNC-51-like kinase*), mATG13 (*Mammalian ATG13*), FIP200 (*Focal Adhesion Kinase Family Interacting Protein of 200kDa*) und ATG101 gebildet wird indem es diesen Komplex phosphoryliert. Wird die Autophagie durch Nährstoffmangel angeregt und mTOR deaktiviert, sind ULK1/2 aktiv und können ihrerseits mATG13 und FIP200 phosphorylieren und die Initiation einleiten (Jung *et al.*, 2009a).

Auf die Induktion folgt die Autophagieinitiation, ein komplexer Prozess, der in der Bildung von Autophagosomen resultiert (Funderburk *et al.*, 2010; Itakura *et al.*, 2008). Zunächst wird eine Isolationsmembran gebildet, deren Herkunft im Säuger noch umstritten ist. Als Donor der Doppelschicht-Membran kommen Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrium, Plasmamembran und andere Zellkompartimente in Frage (Hamasaki *et al.*, 2013; Ravikumar *et al.*, 2010a; Ravikumar *et al.*, 2010b).

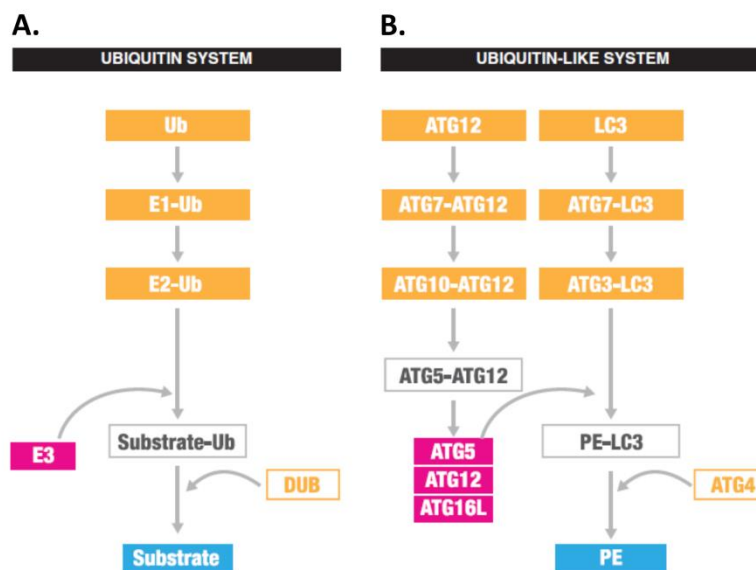


Abbildung 5: Zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme sind für die Autophagie erforderlich: **A.** Im Ubiquitin-System unterteilt sich die Ubiquitinierung in drei Schritte: Zuerst aktiviert Enzym E1 die Ubiquitin-Konjugation und vermittelt das aufgenommene Ubiquitin katalytisch an Enzym E2. Schließlich wird Ubiquitin mittels E3-Ligase auf ein Substratprotein übertragen. Die Entfernung des Ubiquitin wird durch ein deubiquitinierendes Enzym (DUB) katalysiert. **B.** Das ATG12- und das LC3-Konjugationssystem weisen funktionelle Ähnlichkeit mit dem Ubiquitin-System auf. Beide Systeme verwenden ein E1-ähnliches Enzym (ATG7) in der ersten Aktivierungsstufe. Danach werden die E2-ähnlichen Enzym-Konjugate gebildet indem ATG12 auf ATG10 bzw. LC3 auf ATG3 übertragen wird. Letztlich wird ATG12 an ATG5 abgegeben, das in einem Komplex mit ATG16L die E3-Ubiquitin-Ligase-Rolle übernimmt und den Austausch eines PE-Schwanzes (Phosphatidylethanolamin) gegen ATG3 katalysiert. ATG4 entfernt (entsprechend DUB) das LC3 vom PE (Shaid *et al.*, 2013).

Die Isolationsmembran wird zum reifen Autophagosom vergrößert, woran zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme, ATG12- und ATG8/LC3-Konjugationssystem, beteiligt sind (Abbildung 5; Geng und Klionsky, 2008). ATG12 wird durch ATG7, einem E1-Enzym, aktiviert und auf ATG10, einem E2-Enzym übertragen und letztendlich an ATG5 gebunden (Tanida *et al.*, 1999; Tanida *et al.*, 2001). Der ATG12-ATG5-Komplex verbindet sich mit ATG16L und kann nun die Expansion der Isolationsmembran vorantreiben (Mizushima *et al.*, 2003; Mizushima und Yoshimori, 2007). Im zweiten Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystem sind Proteine der ATG8-Familie die Schlüsselproteine. *Microtubule-associated Proteins 1A/1B Light Chain 3B* (MAP1LC3B oder LC3) wurde als erstes Mitglied dieser Familie entdeckt (Kabeya *et al.*, 2000). Alle Mitglieder sind essentiell für die Autophagie und haben die gleiche Struktur. Sie bestehen aus zwei α -Helices am N-terminalen Ende und einem Ubiquitin-ähnlichen Kern (Kabeya *et al.*, 2004; Weidberg *et al.*, 2010). Neben LC3 gehören zu dieser Proteingruppe GABARAP (*Gamma-Aminobutyric Acid Receptor-associated Protein*) und GATE16 (*Golgi-associated ATPase-enhancer of 16 kDa*; (Weidberg *et al.*, 2010). Mitglieder der ATG8-Proteinfamilie wie LC3 werden als Vorläuferproteine synthetisiert und durch die Cysteinprotease ATG4B am C-terminalen Ende geschnitten (Hemelaar *et al.*, 2003; Tanida *et al.*, 2004). Diese unlipidierte Form (ATG8-I) wird mit einem Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert und somit zu ATG8-II. Dabei wird ATG8 zunächst durch ATG7 (E1-Enzym) aktiviert und auf ATG3 (E2-Enzym) übertragen. Durch ATG5-ATG12-ATG16L (E3-Enzym) wird ATG3 durch den PE-Schwanz ausgetauscht und es entsteht lipidiertes ATG8-II (Kabeya *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 2004). Die Mitglieder der ATG8-Proteinfamilie sind während des ganzen Prozesses mit autophagosomalen Membranen assoziiert, sind dort für die Elongation und Reifung von Autophagosomen essentiell und sind letztlich Bestandteil des reifen Autophagosoms (Weidberg *et al.*, 2010).

Für die anschließende Degradation werden die Autophagosomen entlang der Mikrotubuli zu den Lysosomen transportiert, wo sie mit diesen fusionieren (Kimura *et al.*, 2008). Für diese Fusion werden weitere Proteine, wie z. B. ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Receptor*) und RAB7 (*Ras related in Brain*) (Atlashkin *et al.*, 2003; Filimonenko *et al.*, 2007; Jager *et al.*, 2004) benötigt. Das Protein UVRAG (*UV Radiation Resistance-associated Gene*) ist an der Reifung und der Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen beteiligt. UVRAG aktiviert Proteine der Klasse C VPS, das sind membranständige Proteine spezifisch für Vakuolen, und interagiert mit RAB7, wodurch dieses aktiviert wird. Die Aktivierung von RAB7 führt zur Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom, wodurch Autolysosomen entstehen (Liang *et al.*, 2008). Im Anschluss an die Fusion werden im Autolysosom die zytoplasmatischen Bestandteile, die dort eingeschlossen sind, durch lysosomale Hydrolasen abgebaut.

Der Abbau von Autophagiesubstraten wie Proteinen, Proteinaggregaten, Organellen und Bakterien mittels Autophagie kann durch Adapterproteine (Cargorezeptoren) selektiv verlaufen (Boyle und Randow, 2013; Johansen und Lamark, 2011). Dabei sind Cargorezeptoren entscheidend, die mit LC3 interagieren und über die spezifische Bindung von markierten Proteine oder Organellen die Einschleusung dieser Substrate in die Autophagie vermitteln (Johansen und Lamark, 2011; Shvets *et al.*, 2008). Bisher wurden folgende Cargorezeptoren beschrieben: *Sequestosome-1* (p62/SQSTM1 oder p62), NBR1 (*Neighbour of BRCA Gene 1*), NDP52 (*Nuclear Dot Protein 52 kDa*), CALCOCO2 (*Calcium-Binding and Coiled-Coil Domain-Containing Protein 2*) und Optineurin. p62/SQSTM1 beispielsweise besitzt eine UBA-Domäne (*Ubiquitin-associating Domain*) um ubiquitinierte Proteine zu binden (Kirkin *et al.*, 2009).

Als Bestandteil des Proteostase-Netzwerks hat die Autophagie weitreichende Effekte. Sie spielt eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel, da sie das Recycling von metabolischen Vorläufermolekülen aus dem Abbau von komplexen Molekülen steuert (Ryter *et al.*, 2014). Darüber hinaus kann sie viele verschiedene Funktionen in der zellulären Homöostase ausüben, darunter die Regulation der Organellen-Homöostase, des programmierten Zelltods, von Entzündungen, sowie von angeborener und erworbener Immunität (Boya *et al.*, 2013; Deretic *et al.*, 2013). Sie kann das Immunsystem nicht nur regulieren sondern sogar als Teil dieses gelten, da sie zur Abwehr von Pathogenen wie Bakterien und Viren beiträgt (Boyle und Randow, 2013; Kageyama *et al.*, 2011). Dieser Abbauweg hat aber auch eine funktionelle Rolle in der Adipozyten- und Skelettmuskeldifferenzierung, der Regulation der Nahrungsaufnahme, dem Abbau und Lagerung von Lipidtröpfchen und der physiologischen Reaktionen auf körperliches Training (Ryter *et al.*, 2014). Erhöhte Autophagie unterdrückt die Nekrose in einer Zelle und erhöht deren Lebenserwartung (Eisenberg *et al.*, 2009; Samara *et al.*, 2008). Gestörte oder dysfunktionale Autophagie kann pathologische Folgen bei Stoffwechselstörungen wie Diabetes, Glykogen-Speicher-Erkrankungen und Myopathien haben und wird darüber hinaus in Verbindung gebracht mit Insulinresistenz und Fettleibigkeit (Christian *et al.*, 2013; Ouyang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2014). Diese Funktionen und Effekte der Autophagie sind nur einige Beispiele und zeigen wie essentiell dieser Abbauweg ist.

Darüber hinaus ist der lysosomale Abbau mittels Autophagie eng mit dem intrazellulären Vesikeltransport vernetzt. Beispielsweise koordiniert das Beclin1-interagierende Protein ATG14L endozytotische Abläufe indem es mit dem SNARE-assoziierten Protein Snapin interagiert (Kim *et al.*, 2012). Dieser Vesikeltransport steht unter anderem unter der Kontrolle von RAB GTPasen und ihren regulatorischen Proteinen (Stenmark und Olkkonen, 2001). Wie schon erwähnt führt beispielsweise die Aktivierung von RAB7 zur Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom (Liang *et al.*, 2008).

1.3. Grundlegende Funktionen von RAB GTPasen

Der Membran- und Vesikeltransport, bei dem die Autophagie auch eine Rolle spielt, steht wie schon zuvor erwähnt, unter der Kontrolle von RAB GTPasen (Stenmark und Olkkonen, 2001). Diese gehören wie RAS und RHOS GTPasen zur Gruppe der kleinen GTPasen (*Small GTPases*; (Pochynyuk *et al.*, 2007) und bisher wurden in Säugern über 70 verschiedene RAB GTPasen entdeckt (Szatmari und Sass, 2014). Sie sind eine große Familie hochkonservierter Proteine in Säugerzellen (Chavrier *et al.*, 1990), dabei ist die Funktion der RAB-Proteine das Erkennen von Vesikeln und Organellen (Pfeffer, 2001; Zerial und McBride, 2001). Die richtige Sortierung und Anordnung von Membranen während des Vesikeltransport ist wichtig für die Zelle und den gesamten Organismus (Deneka *et al.*, 2003; Grosshans *et al.*, 2006; Hutagalung und Novick, 2011).

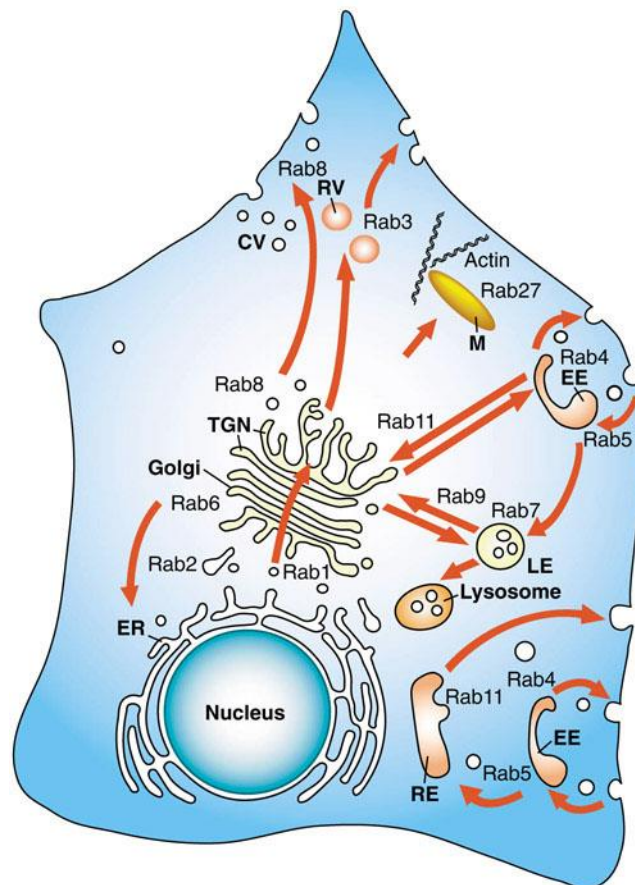


Abbildung 6: Intrazelluläre Vesikeltransportwege und die Lokalisierung von ausgewählten RABs: Endoplasmatisches Retikulum (ER), Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), sekretorischen Vesikel (CV), sekretorischen Granula/Vesikel (RV), Melanosomen (M), frühe Endosomen (EE), Recycling-Endosomen (RE), späte Endosomen (LE), (Stenmark und Olkkonen, 2001).

RAB GTPasen wurden das erste Mal in genetischen Analysen über Mutanten der Protein-Sekretion entdeckt (Novick *et al.*, 1980; Salminen und Novick, 1987) und in diesem Zusammenhang auch gleichzeitig der zyklische Mechanismus ihrer Aktivität beschrieben. Die Aktivierung und Inaktivierung der RAB-Proteine ist essentieller Bestandteil der Erkennung ankommender Vesikel (Bourne, 1988).

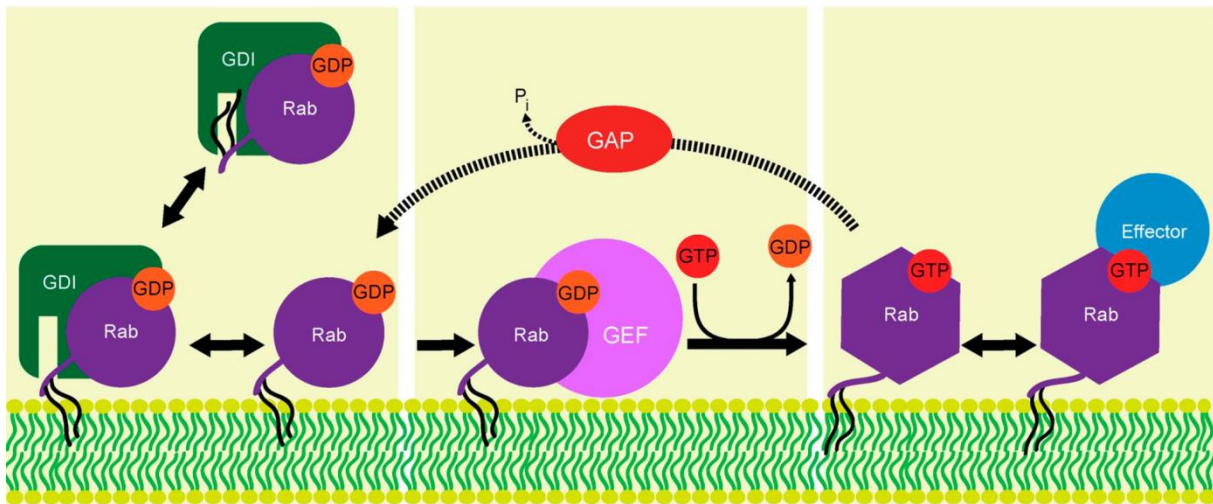


Abbildung 7: Der zyklische Verlauf der RAB-Aktivierung und Inaktivierung: Details siehe Text (Barr, 2013)

In Abbildung 7 ist ein einfaches Modell der Aktivierung von RAB GTPasen gezeigt. Das prenylierte RAB-Protein ist an das Chaperon GDI (*Guanine Nucleotide Displacement Inhibitor*) gebunden (Pylypenko *et al.*, 2006). Die Partitionierung der prenylierten Komponente zwischen der hydrophoben Tasche des GDI und der Membran-Doppelschicht erlaubt dem RAB-Protein schnell und reversibel mit der Membranoberfläche zu interagieren. Wenn die GDP-gebundene inaktive Form des RAB-Proteins auf sein GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*) trifft, löst sich das GDI, das GEF bindet und tauscht GDP durch GTP aus, wodurch das RAB-Protein aktiviert wird. Das GTP-gebundene aktive RAB-Protein kann nun spezifisch an seine Effektoren binden und seine biologische Aufgabe erfüllen. Die Bindung des GDI ist in diesem Zustand nicht möglich und das RAB-Protein kann an der Membran akkumulieren. Trifft das GTP-gebundene RAB-Protein auf sein GAP (*GTPase Activating Protein*), hydrolysiert dieses das GTP zu GDP und einem freien Phosphat und inaktiviert dadurch das RAB wieder, somit ist der Kreislauf geschlossen.

Die RAB GTPase-Familie kann neben ihrer Aufgabe als hochkonservierter Bestandteil der Vesikeltransportwege (Stenmark, 2009) auch noch andere Aufgaben erfüllen wie z. B. Ionenkanalregulation (Pochynyuk *et al.*, 2007). Auch muss ein RAB nicht nur eine Funktion erfüllen. So können RAB5 und RAB10 einerseits in der Endozytose und dem Recycling wirken,

andererseits neuronale Funktionen wie Vesikelausschüttung von Hormonen und trophischen Faktoren übernehmen (Sasidharan *et al.*, 2012).

Aufgrund ihrer großen Bedeutung für den intrazellulären Vesikeltransport ist es nicht überraschend, dass RAB Proteine auch die Autophagie unterstützen (Itoh *et al.*, 2008; Lipatova *et al.*, 2012; Longatti *et al.*, 2012; Popovic *et al.*, 2012). Es wurden beispielsweise Verbindungen zwischen ATG-Proteinen und RAB GTPasen beschrieben (Fukuda und Itoh, 2008). Dabei konnte gezeigt werden, dass ATG16L als Effektor von RAB33 wirken kann. Weitere Mitglieder der RAB-Familie und verwandter kleiner GTPasen, die an der Autophagie beteiligt sind, sind RAB9 bei der ATG5/ATG7-unabhängigen Autophagosomenbildung, RAB1 und RAB5 bei der Regulation der TORC1-Aktivität, RAB4, RAB8, RAB11 und RAB32 bei der Autophagosomenbildung und -reifung oder RAB7 und RAB24 (Chua *et al.*, 2011; Szatmari und Sass, 2014).

Darüber hinaus wurden verschiedene TBC(TRE2-BUB2-CDC16)-Domänen-haltige RABGAPs mit Autophagie assoziiert (Carroll *et al.*, 2013; Itoh *et al.*, 2008; Longatti *et al.*, 2012; Popovic *et al.*, 2012). RAB GTPase-aktivierende Proteine enthalten diese hoch konservierten TBC-Domäne um die Aktivität der RAB GTPasen über einen Dual-Finger-Mechanismus zu regulieren, denn zwei katalytischen Reste in trans-Formation spielen eine entscheidenden Rolle: ein Arginin-Finger, der analog zum katalytischen Zentrum von GAP-Proteinen der Ras- / Rho-Familie ist und ein Glutamin-Finger, der ebenfalls interagiert. Durch diesen Dual-Finger-Mechanismus der TBC-Domäne beschleunigen RAB GAPs die GTP-Hydrolyse und dabei scheint der exponierte Argininrest ein kritischer Faktor für diese katalytische Aktivität *in vitro* und *in vivo* zu sein (Pan *et al.*, 2006). TBC-Domänen sind vermutlich charakteristisch für RABGAPs, die mit mehr als einem RAB-Protein interagieren können und somit verschiedene Stoffwechselwege koordinieren (Frasa *et al.*, 2012).

In einer Protein-Protein-Interaktionsstudie wurden 14 dieser TBC-Domäne-enthaltenden RAB GAPs als direkte Interaktionspartner von ATG8-Modifikatoren identifiziert. Diese kolokalisierten ebenfalls mit LC3-positiven Autophagosomen. TBC1D5, eines der in dieser Analyse identifizierten RABGAPs, enthielt sogar zwei LIR-Motive. Unter basalen Bedingungen ist dieses Protein an Endosomen lokalisiert. Während induzierter Autophagie wurde TBC1D5 nicht mehr endosomal lokalisiert, sondern an LC3-positiven Autophagosomen. Vermutlich ist dieses RABGAP unter basalen Bedingungen am endozytischen Membrantransport beteiligt, während es bei induziertem Nährstoffmangel Teil der Autophagie-Maschinerie wird (Popovic *et al.*, 2012). Dies verdeutlicht den koordinativen Charakter einiger RABGAPs.

1.3.1. *RAB3 und RAB3GAP*

Die RAB GTPase RAB3 ist unter anderem in neuronalem Gewebe zu finden um dort für die korrekte Funktion der Präsynapsen zu sorgen (Star *et al.*, 2005) und spielt eine Rolle bei der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose (Oishi *et al.*, 1998). RAB3 hat mindestens vier Isoformen RAB3A, B, C und D, die ubiquitär zu finden sind. RAB3A ist das häufigste RAB-Protein im Gehirn und präsent in allen Synapsen. Durch die Bindung seines Effektors RIM spielt es eine kritische Rolle bei der Freisetzung von Neurotransmitter-Vesikeln (Li und Chin, 2003). RAB3A, B und C werden auch in endokrinem Gewebe exprimiert und RAB3B wird in hohen Spiegeln in der Hypophyse gebildet, wo es für die Gonadotropin-Ausschüttung mitverantwortlich ist (Tasaka *et al.*, 1998). Die RAB3A-Aktivität wird mit dem anterograden APP-Transport assoziiert (Szodorai *et al.*, 2009).

RAB3GEF und RAB3GAP sind im Zusammenspiel mit Rabconnectin-3 für die korrekte Aktivierung und Inaktivierung von RAB3 zuständig (Kawabe *et al.*, 2003). RAB3GEF stimuliert die Umwandlung der GDP-gebundenen inaktiven Form zur GTP-gebundenen aktiven Form, während RAB3GAP die reverse Reaktion unterstützt (Oishi *et al.*, 1998). Das erste Mal wurde RAB3GAP in den 90er Jahren charakterisiert (Fukui *et al.*, 1997; Nagano *et al.*, 1998). Die in diesem Protein enthaltene RAB3GAP-Bindedomäne beinhaltet die *Switch I-Region* für die Bindung zu RAB3 und überschneidet sich mit der Rabphilin-Binde-Domäne (Clabecq *et al.*, 2000). RAB3GAP wurde bisher funktionell mit der RAB GTPase RAB3 beschrieben, was zur Namensgebung dieses GAPs führte (Sakane *et al.*, 2006) und ist zuständig für die synaptische Homöostase bei der Vesikelfreisetzung (Muller *et al.*, 2011). RAB3GAP kontrolliert die diese und ist mechanistisch zu einem späten Zeitpunkt der Vesikelausschüttung wirksam (Muller *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist RAB3GAP bisher das einzig bekannte RABGAP ohne die zuvor beschriebene TBC-Domäne (Frasa *et al.*, 2012).

In einem Mäusestamm konnte durch eine homozygote Mutation in der katalytischen Untereinheit von RAB3GAP1 dessen Funktion vollständig ausgeschaltet werden. Obwohl die Tiere kein intaktes RAB3GAP1 exprimierten, waren sie lebensfähig und fertil. Es konnten keine signifikanten Veränderungen in den Expressionsniveaus von RAB3A oder anderen synaptischen Proteinen beobachtet werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die GTP-gebundene Form von RAB3A im Gehirn akkumuliert und, dass die Ca^{2+} -abhängige Glutamatfreisetzung aus zerebrokortikalen Synaptosomen in den mutierten Mäusen gehemmt ist (Sakane *et al.*, 2006).

Bei Mutationen im Mensch führt die Verminderung oder der Ausfall des RAB3GAP-Komplexes zu Entwicklungsstörungen, die gekennzeichnet sind durch geistige Retardierung, Katarakte, kleinen Kopf und Hypogonadismus. Anfangs wurde die katalytische Untereinheit RAB3GAP1 im Zusammenhang mit dem Warburg-Syndrom beschrieben und die nichtkatalytische Untereinheit

RAB3GAP2 wurde zunächst nur mit dem Martsolf-Syndrom in Zusammenhang gebracht (Aligianis *et al.*, 2005; Aligianis *et al.*, 2006). Heute wird das gesamte Krankheitsbild unter dem Begriff Micro- und Martsolf-Syndrom zusammengefasst (Handley und Aligianis, 2012). Vermutlich entstehen die Pathologien durch eine fehlerhafte exozytotische Ausschüttung von okularen und neurologischen trophischen Faktoren (Aligianis *et al.*, 2005).

In einer neueren Studie wurden RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in einer Untersuchung über die Interaktionen innerhalb des Autophagienetzes entdeckt und dort mit der ATG8-Familie assoziiert (Behrends *et al.*, 2010). Da RAB3GAP1/2 an Vesikeltransport und Fusion beteiligt ist und Vesikeltransport ein wichtiger Bestandteil der Autophagie lässt sich nicht ausschließen, dass RAB3GAP weitere Funktionen als nur Neurotransmitter-Ausschüttung als Aufgabe hat.

1.4. FEZ1, FEZ2 und RAB3GAP

In *Yeast Two-Hybrid Assay*-Studien von humanen fötalen Gehirnen wurde eine Interaktion von FEZ1 mit RAB3GAP entdeckt (Orr und Zoghbi, 2007; Assmann *et al.*, 2006). FEZ1 gehört zur *Fasciculation and Elongation Protein Zeta*-Familie, diese wurde von Bloom und Horvitz durch genetische Analyse des *C. elegans*-Proteins UNC-76 entdeckt. Im Wurm hat UNC-76 eine strukturelle Rolle in der Bildung und der Aufrechterhaltung axonaler Bündel und überträgt Signale zur intrazellulären Maschinerie, die axonales Wachstum und Adhäsion reguliert. Es ist in Zellkörpern und Prozessen aller Nervenzellen während der Entwicklung zu finden (Bloom und Horvitz, 1997).

Das Säugerhomolog von UNC-76 FEZ1 hat viele Funktionen. Es steht z. B. in Wechselwirkung mit E4B, einer U-Box-Ubiquitin-Protein-Isopeptid-Ligase, mit C-Zeta, einer Proteinkinase, oder mit DISC1, dem Agnoprotein des menschlichen Polyomavirus JC-Virus. Agnoproteine sind Proteine, die nur von manchen Säugetier-Polyomaviren kodiert werden. Dieses zusätzliche Protein ist ein relativ kleines Polypeptid und übt mehrere Funktionen aus (Gerits und Moens, 2012). Darüber hinaus agieren FEZ1 und sein Paralog FEZ2 mit NEK1, einer Proteinkinase, die in polyzystischen Nierenerkrankung und DNA-Reparaturmechanismen in der G2 / M Phase des Zellzyklus beteiligt ist (Assmann *et al.*, 2006).

Die FEZ1-defiziente Maus zeigt keine offensichtliche abnormale Gehirnarhitektur, obwohl sie leichte Verhaltensstörungen, einschließlich eines Hyperlokomotionsphänotyp und eine erhöhte Reaktionsfähigkeit auf Psychostimulanzien aufweist (Su *et al.*, 2006).

Die homologen Proteine UNC-76, FEZ1 und FEZ2, besitzen in ihrem Aufbau eine konservierte Coiled-Coil-Region an ihrem C-terminalen Ende (Bloom und Horvitz, 1997; Fujita *et al.*, 2004;

Kuroda *et al.*, 1999). Coiled-Coil-Domänen können untereinander oligomerisieren und vermitteln Protein-Protein-Wechselwirkungen (Burkhard *et al.*, 2001; Strauss und Keller, 2008). FEZ2 kann im Säugersystem durch seine sehr ähnliche Struktur die Funktionen von FEZ1 übernehmen und eventuelle Effekte bei der Herunterregulation von FEZ1 kompensieren (Alborghetti *et al.*, 2011).

Darüber hinaus wirkt FEZ1 zusammen mit SCOC (*Short Coiled-Coil Protein*) und UVRAG im komplexen Netzwerk der Autophagie. SCOC interagiert mit FEZ1 und bildet einen trimerischen Komplex mit UVRAG. Dieser beeinflusst wiederum ULK1, das Einfluss auf die Autophagieinduktion hat, und Beclin1, das wiederum Teil dieser Induktion ist und auf die Membrannukleation des Autophagosoms wirkt. Dadurch wirkt FEZ1 als negativer Regulator der Autophagie (McKnight *et al.*, 2012).

1.5. *C. elegans* als Modellorganismus

Der Fadenwurm *C. elegans* ist als frei lebender Nematode aus der Gruppe der Rhabditiden im Boden gemäßiger Zonen weit verbreitet. Er wurde in den 1960er Jahren von Sydney Brenner als molekularbiologischer Modellorganismus eingeführt, der durch diese Arbeit auf dem Gebiet der „genetischen Regulation der Organentwicklung und des programmierten Zelltods“ zusammen mit H. Robert Horvitz und John E. Sulston den Nobelpreis für Medizin und Physiologie im Jahre 2002 erhielt (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/). *C. elegans* ist zur Klärung biologischer Fragestellungen geeignet, da er für die Forschung einzigartige und vorteilhafte Eigenschaften aufweist.

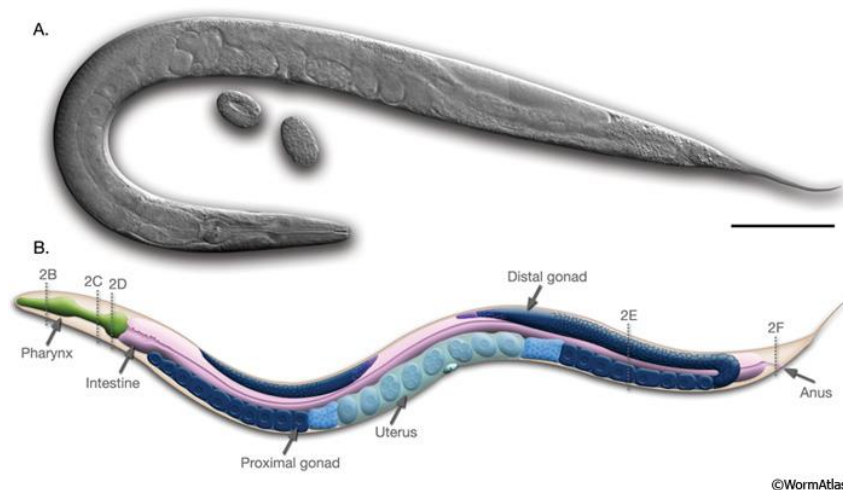


Abbildung 8: Anatomie von *C. elegans*
(<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>).

Der Wurm ist morphologisch und genetisch einfach organisiert (Abbildung 8). Er ernährt sich z.B. von Mikroorganismen und lässt sich durch seinen geringen Anspruch an seine Nahrung in großer Zahl auf Agarplatten, die mit Bakterien beschickt sind, kultivieren. Laborpopulationen bestehen unter normalen Kulturbedingungen fast ausschließlich aus Hermaphroditen, die sich durch Selbstbefruchtung vermehren und jeweils etwa 300 Nachkommen erzeugen. Dies ermöglicht die Generierung klonaler Populationen. Der Wurm zeichnet sich weiterhin durch Eutelie aus: Das Entwicklungsschicksal der einzelnen Zellen ist zu Beginn der Furchung festgelegt (Mosaikentwicklung). Ein Hermaphrodit weist 959 somatische Zellen auf, wovon insgesamt 302 das Nervensystem ausbilden (Hodgkin, 1988). Durch das Phänomen der Zellkonstanz ist das Schicksal jeder Zelle von ihrer Entstehung bis zu ihrer Position im adulten Wurm zeitlich und räumlich festgelegt, sodass sich definierte Zellgruppen leicht analysieren

lassen (Sulston und Horvitz, 1977). Erleichtert wird dies zusätzlich durch die Transparenz der Würmer und ihre Größe von etwa 1 mm.

C. elegans entwickelt sich in einer Generationszeit von drei Tagen (bei 20°C) aus einer befruchteten Eizelle über vier unterschiedliche Larvalstadien (L1-L4) zu einem adulten Wurm (Sulston und Horvitz, 1977). Unter ungünstigen Lebensbedingungen wie Nahrungsmangel kann der Entwicklungszyklus im L2-Stadium unterbrochen werden und es entstehen sogenannte Dauerlarven (Hu, 2007). Diese sind durch eine extrem verdickte Kutikula und einen reduzierten Stoffwechsel in der Lage bis zu mehreren Monaten unter ungünstigen Bedingungen zu überleben.

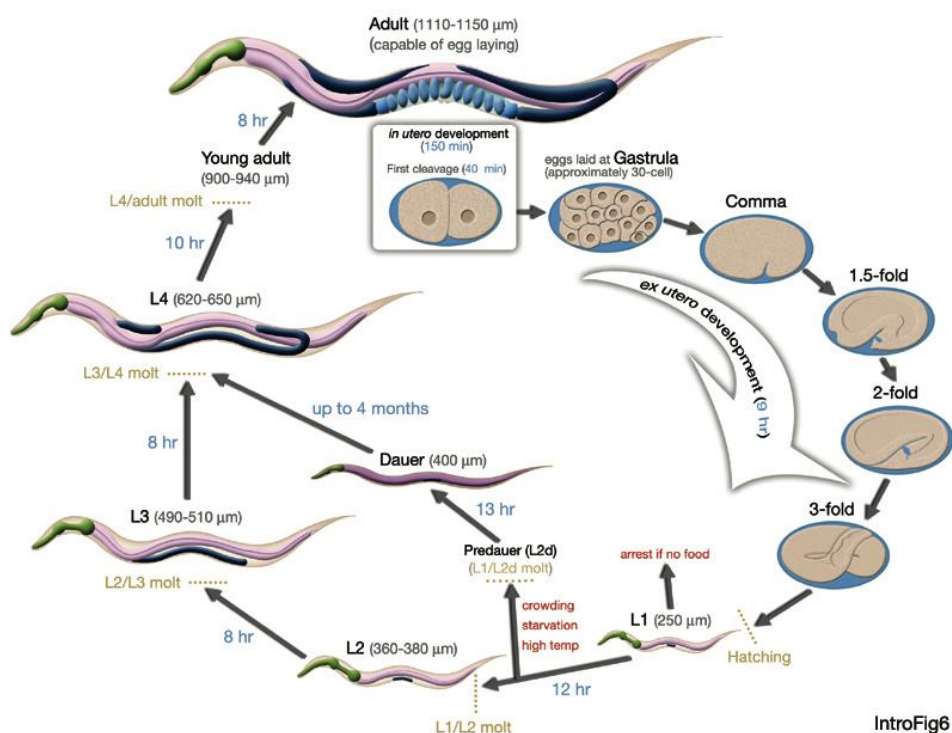


Abbildung 9: Lebenszyklus von *C. elegans*

(<http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/fig.s/IntroFIG6.jpg>).

Ein breites Spektrum molekularbiologischer Methoden ermöglicht die genetische Manipulation von *C. elegans*. Die US-amerikanischen Biologen Andrew Z. Fire und Craig C. Mello erhielten ihren Nobelpreis im Jahre 2006 ebenfalls für ihre Arbeiten an *C. elegans*. Andrew Z. Fire war Schüler von Sydney Brenner. Sie wurden mit dem Nobelpreis für Medizin für die Erforschung von RNA-Interferenz, ein Verfahren, mit dem sich Gene gezielt „ausschalten“ lassen, ausgezeichnet (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/).

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher Mechanismus von Eukaryoten um zielgerichtet Gene stummzuschalten (Abbildung 10). RNAi beruht auf einer Wechselwirkung kurzer Stücke

von RNA mit der mRNA unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe. Als Folge wird die mRNA in mehrere Bruchstücke gespalten und dadurch die genetische Information stummgeschaltet (Ahringer, 2006). *C. elegans* nutzt RNAi-Wege um kodierende Gene, Pseudogene, Transposons, und andere nicht-kodierenden RNAs zu beeinflussen. Neben mehreren hundert microRNAs produziert der Wurm Tausende von anderen kleinen RNAs, die durch die Bildung von dsRNA zum *Silencing*, also zur Stumm-Schaltung dieser homologen Gene führt (Billi *et al.*, 2014). Dies kann man sich zu nutze machen um künstlich Gene im Wurm stummzuschalten. Dazu exprimieren RNAi-Bakterien eine dsRNA mit einer bestimmten Sequenz. Durch Fütterung dieser Bakterien können spezifisch Gene mit der homologen Sequenz herunterreguliert werden (Kamath *et al.*, 2001).

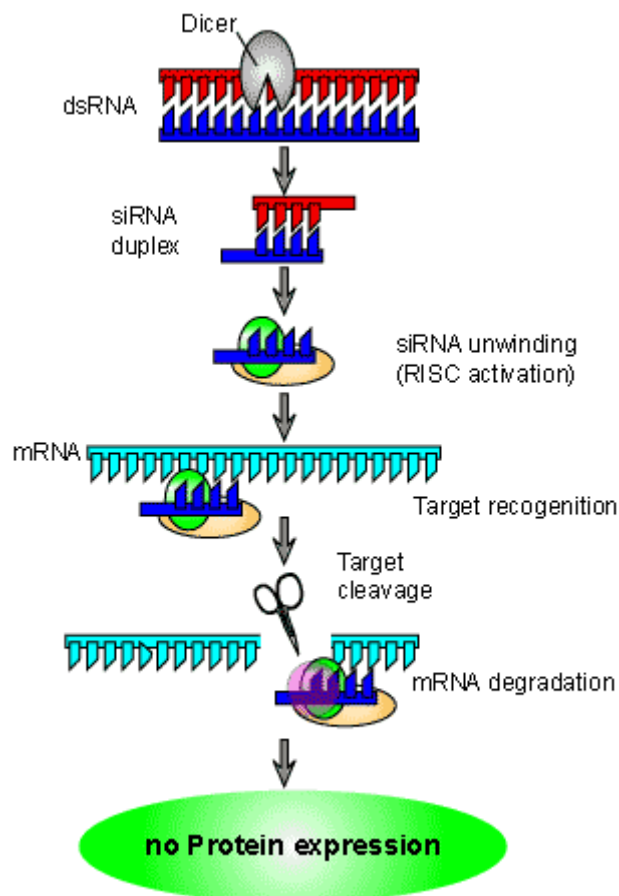


Abbildung 10: RNA-Interferenz (RNAi) ist ein komplexer molekularbiologischer Mechanismus, bei dem Gene stillgelegt werden (*Gene Silencing*): Doppelsträngige RNA (dsRNA), die entweder künstlich in die Zelle eingebracht wird oder aus einem viralen Angriff stammt, wird von dem Enzymkomplex *Dicer* in kurze RNA-Stücke (siRNA) zerlegt. Ein weiteres Enzym nimmt dann einen Strang der siRNA auf und bildet den *Risc*-Komplex (*RNAi-induced silencing complex*). Dieser bindet an den komplementären Abschnitt der mRNA und trennt diese auf. Anschließend wird die mRNA an dem komplementären Abschnitt vom *Risc*-Komplex zerschnitten. Die zerschnittene m-RNA ist sehr instabil und wird rasch abgebaut, die Expression eines spezifischen Gens ist damit unterbunden (Takeshita *et al.*, 2007).

C. elegans bietet neben dieser Methode noch viele andere Möglichkeiten als Modellorganismus in der Naturwissenschaft genutzt zu werden. Zum Beispiel lassen sich transgene Hermaphroditen über Mikroinjektion von DNA generieren oder Gene über chemische Mutagenese beeinflussen (Fire, 1986; Fire *et al.*, 1998). Der dritte mit *C. elegans* verbundene Nobelpreis wurde im Jahre 2008 vergeben, als der US-amerikanische Biologe Martin Chalfie zusammen mit Osamu Shimomura und Roger Y. Tsien den Nobelpreis für Chemie für die Einführung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in die biomedizinische Grundlagenforschung erhielt. Die Arbeiten von Martin Chalfie wurden ebenfalls an *C. elegans* durchgeführt. Auch Chalfie war 1977 zu dem Team um Sydney Brenner an der Universität Cambridge gestoßen (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/). *C. elegans* war darüber hinaus der erste Modellorganismus dessen Genom 1998 vollständig sequenziert wurde (Consortium, 1998).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es in einer RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse von Chromosom I in *C. elegans* Gene zu finden, die potenzielle Modulatoren der Proteinhomöostase sind, und diese näher zu untersuchen. Hierfür wurden mithilfe von RNA-Interferenz Gene in einem Luc::GFP-Reporterwurm herunterreguliert.

Potenzielle Modulatoren, die als interessante Kandidaten in der RNAi-vermittelte Proteostase-Analyse aufgefallen sind, wurden in verschiedenen Wurmsystemen auf weitere Effekte bezüglich der Proteostase untersucht. Letztlich sollte die Auswahl der Kandidaten auf eine kleine Zahl beschränkt und deren genauer Mechanismus innerhalb der Modifikation der Proteinstabilität charakterisiert werden. Zu diesen Experimenten gehörten Versuche, bei denen die Aggregation von PolyQ35::YFP im AM140-System, der Paralyse-Phänotyp und die Veränderung Thioflavin S-gefärbter Aggregate von A β 42 im CL2006-Wurmstamm und die Effekte auf die Autophagie mittels eines GFP::LGG1-Konstrukt analysiert wurden.

Das Augenmerk lag darin, die im Nematodensystem gefundenen Proteine im Anschluss an ihre Charakterisierung in *C. elegans* in das Säugersystem zu überführen und dort molekular und funktionell zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Geräte (soweit nicht anders angegeben)

<i>C. elegans</i>-Kultivierung	
Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss (Göttingen)
Inkubatoren	Thermo (Dreieich)
Life Science Mikroskop Olympus IX81	Olympus (Hamburg)
Modular Stereo Microscope for Fluorescent Imaging Leica MZ10 F	Leica Microsystem (Wetzlar)
Stereomikroskop SZ61	Olympus (Hamburg)
Zellbiologie	
Absaug-System VacuSafe	Integra (Fernwald)
Amaxa Nucleofector Maschine	Lonza (Wuppertal)
Inkubatoren	Binder (Tuttlingen)
Sterilbänke	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge: Multifuge 3 S-R	Heraeus (Hanau)
Proteinbiochemie	
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)
Sonifikator Micro Ultrasonic Cell Disrupter	Fisher (Schwerte)
Laserscanning-Mikroskop LSM 710	Zeiss (Göttingen)
LAS-3000 Intelligent Dark Box	Fuji (Düsseldorf)
XCell Sure Lock Western Blotting System (NuPage)	Invitrogen (Karlsruhe)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen

Molekularbiologie	
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)
Allgemeines	
Dampfsterilisator VarioClav	H+P (Oberschleißheim)
Kühlschränke 4 °C	Liebherr (Kirchdorf)
Mikrowellenofen	Progress (Nürnberg)
pH-Meter C6825	Schott (Mainz)
Spektrophotometer	Beckmann (München)
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich (Tuttlingen)

2.1.2. *Chemikalien und Kits*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Abcam (Cambridge, UK), Addgene (Cambridge, MA, USA), Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), BD Biosciences (San Jose, CA, USA), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Cell signaling Technology (Boston, MA, USA), Dianova GmbH (Hamburg, Deutschland), Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach, Deutschland), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland), A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg / Versbach, Deutschland), Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA), Jena Bioscience GmbH (Jena, Deutschland), LC Laboratories (Woburn, MA, USA), Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland), LSBio (Seattle, WA, USA), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland), MBL International Corporation (Woburn, MA, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Merck Millipore (Billerica, MA, USA), New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), neoLab (Heidelberg, Deutschland), Novus Biologicals (Littleton, CO, USA), PROGEN Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland), Promega Corporation ProteinTech Group (Madison, WI, USA), Roche (Basel, Schweiz), Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA), Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland), Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA), Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) und VWR International (Arlington Heights, IL, USA) bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Kits

Verwendung	Name	Firma
RNA-Isolation	Absolutely RNA Nanoprep Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Reverse Transkription	Omniscript RT Kit	Invitrogen / Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Polymerase Kettenreaktion	Omniscript RT Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Ligation	Rapid Ligation Kit	Roche (Basel, Schweiz)
DNA, RNA und Protein Aufreinigung	Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Plasmid-Präparation	Roti®-Prep Plasmid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Quantitative Real Time PCR	Sensi Mix SYBR & Fluorescent Kit	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)

2.1.3. *Puffer und Lösungen*

Tabelle 3: Bakteriennährmedien

LB-Medium <i>(Luria-Bertani medium)</i>	Trypton Hefeextrakt NaCl in bidest.-H ₂ O, pH 7.0 mit NaOH	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v)
LB-Agarplatten	LB-Medium Bacto-Agar	0,5 % (w/v)
Antibiotika Endkonzentrationen	Ampicillin Chloramphenicol Kanamycin Streptomycin Tetracyclin	100 µg/ml 25 µg/ml 50 µg/ml 100 µg/ml 12,5 µg/ml
SOC-Medium <i>(Super Optimal broth with Catabolite repression)</i>	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl KCl MgCl ₂ MgSO ₄ Glucose	2 % 0,5 % 10 mM 2,5 mM 10 mM 10 mM 20 mM

Tabelle 4: Puffer und Lösungen zur Benutzung in der *Caenorhabditis elegans*-Kultivierung

10x M9-Lösung	Na ₂ HPO ₄ , Anhydrat KH ₂ PO ₄ , Anhydrat NaCl NH ₄ Cl dH ₂ O	60 g 30 g 5 g 10 g ad 1000 ml
NGM-Platten <i>(nematode growth medium)</i>	NaCl Bacto-Pepton Bacto-Agar PPB (pH 6,0) CaCl ₂ MgSO ₄ Uracil Cholesterol Streptomycin	0,3% (w/v) 0,25% (w/v) 1.6% (w/v) 25 mM 1 mM 1 mM 200 µg/ml 500 µg/ml 100 µg/ml
RNAi-Platten	NaCl Bacto-Pepton Bacto-Agar PPB (pH 6,0) CaCl ₂ MgSO ₄ Uracil Cholesterol Ampicillin Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	0,3% (w/v) 0,25% (w/v) 1.6% (w/v) 25 mM 1 mM 1 mM 200 µg/ml 500 µg/ml 100 µg/ml 1 µM
2x Einfrierlösung	NaCl PPB (pH 6,0) Glycerin MgSO ₄	100 mM 50 mM 30% (v/v) 0,3 mM
Permeabilisierungslösung	B-Mercaptoethanol Triton X Tris-HCl (pH 7.4)	5% 1% 125mM
Phosphatgepufferte Salzlösung <i>(PBS = phosphate buffered saline)</i>	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (pH 7,4) dH ₂ O	8,0 g 0,2 g 1,42 g 0,27 g Add 1l

Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Benutzung in der Säugerzell-Kultivierung

Zellkulturmedium	DMEM	1x
	FBS	10%
	Natriumpyruvat	100 U/ml
	ABAM	100 µg/ml
Elektroporationspuffer	KCl	135 mM
	CaCl ₂	0.2 mM
	MgCl ₂	2 mM
	EGTA	5 mM
	HEPES (pH 7.5)	10 mM
	hitzeinaktiviertem FCS	25 %
3x Lysispuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	187,5 mM
	EDTA	3 mM
	SDS	6%
	Saccharose	30%
Eindeckmedium	P-Phenylendiamin	1 mg/ml (Endkonzentration)
	Glycerol	70 %
	PBS (pH 8,5)	1x
NP40 Lysispuffer (Co-IP)	Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	2 mM
	EGTA	1 mM
	NP40 (Igepal)	0,5 %

Tabelle 6: Puffer und Lösungen für biochemische Methoden

4x Ladepuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	200 mM
	SDS	4 % [w/v]
	Glycerin	40 % [v/v]
	Bromphenolblau	0,2 % [v/v]
	β-Mercaptoethanol	200 µl/ml
Polyacrylamidgele	Trenngel (12%):	
	40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2 ml
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
	SDS	0,4%
	dH ₂ O	4,5 ml
	10% APS	100 µl
	TEMED	10 µl
	Sammelgel (4%):	
	40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	0,75 ml
	0,6 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml
	SDS	0,4%
	dH ₂ O	6,5 ml
	10% APS	100 µl
	TEMED	10µl
1x SDS-Laufpuffer	Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

1x Transferpuffer	Tris-HCl (pH 8,3) Glycin Methanol	25 mM 192 mM 20% (v/v)
1x Ponceau S	Ponceau Trichloressigsäure	0,025% (w/v) 1% (w/v)
Blockierungspuffer	PBS Tween-20 Trockenmilchpulver	1x 0,05% (v/v) 5% (w/v)
PBS/Tween-20	PBS Tween-20	1x 0,05% (v/v)
10x PBS	NaCl Phosphate KCl (pH 7,4)	137 mM 12 mM 2,7 mM
ECl-Lösung:	Lösung A: Tris-HCl (pH 8,6) Luminol Lösung B: para-Hydroxycommarinsäure in DMSO Lösung C: H ₂ O ₂	0,1 M 0,025 % (w/v) 0,11 % (w/v) 30 %

Tabelle 7: Puffer für molekularbiologische Methoden

1x TAE Puffer	Tris pH 7,5 Borsäure EDTA	44,5 mM 45,5 mM 1 mM
----------------------	---------------------------------	----------------------------

2.1.4. *Bakterienstämme*

Tabelle 8: Namen und Genotypen der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5Q (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	supE44 .lacU169 (F80 lacI q Z .? 15) hsdR17 recA1 end A1 gyr A96 thi-1 rel A1
HB101 (CGC, Minnesota, USA)	F- Z (gpt-proA)62 leuB6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1 Z (mcrCmrr) rpsL20 (Str r) xyl-5 mtl-1 recA13
HT115 (Ahringer Lab RNAi library, Cambridge, UK)	F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10 (DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase) (IPTG-inducible T7 polymerase) (RNase III minus)

2.1.5. *Nematoden*

Tabelle 9: Namen und Genotypen der verwendeten Wurmlinien

Wurmlinie	Genotyp
N2	Wildtyp
AM140	Punc-54[Q35::YFP]
CL2006	dvIs2 [pCL12(Punc-54::hA β 42)/pRF4[rol-6 (su1006)]
GFP::LGG-1-Würmer	ex[Plgg-1::GFP::LGG-1]/pRF4[rol-6 (su1006)]
Luc::GFP-Würmer	Pmyo-3(Luc::GFP/pRF4 [rol-6 (su1006)])

2.1.6. *Zelllinien*

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
Humane embryonale Nierenzelle (<i>human embryonic kidney cells</i> = HEK293a)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

Hier wurden HEK-293a-Zellen verwendet, die seit Anfang der 1970er Jahre bestehen. Sie wurden als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (*Human Embryonic Kidney*) mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen (Ahringer, 2006).

2.1.7. *Plasmide*

Tabelle 11: Plasmide zur Expression des RNAi von *C. elegans* in *E. coli*

Plasmid	Merkmale
L4440 (empty Vector)	Fusionsprotein und Tags: T7p, T7p, lacZN, OriF1>>, OriF1<<; Bakterielle Resistenz: Ampicillin

Tabelle 12: Überexpression in humanen Zellen

Überexpression	Name
FEZ1-Plasmid	pCMV6-FEZ1-Myc
FEZ2- Plasmid	pCMV6-FEZ2-Myc
RAB3GAP1-Plasmid	pCI neo-Myc Rab3Gap p130
RAB3GAP2-Plasmid	pCI neo-Myc Rab3Gap p150

2.1.8. siRNA – Zellkultur

Tabelle 13: Verwendete siRNA in humanen Zellen

Name	Sequenz
ns_siRNA	5`- AUUCUCCGAACGUGUCA-3`
siFEZ1-1	5`-CAA CAA CUG GUC CUA UGA A-3`
siFEZ1-2	5`-CCA GUU ACA GAU CCA AGA G-3`
siFEZ2-1	5`-CAG CUG GAU AUG CAC UCA A-3`
siFEZ2-2	5`-GCU GGA UAU GCA CUC AAU C-3`
siRAB3A-1	5`-GCGCCAAGGACAACAUAUAA-3`
siRAB3A-2	5`-GGACAACAUAACGUCAAG-3`
siRAB3B-1	5`-GGAGAACAUCAGUGUAAGG-3`
siRAB3B-2	5`-AGGAGAACAUCAGUGUAAG-3`
siRAB3C-1	5`-GUACAAGAUUGGUCAACUC-3`
siRAB3C-2	5`-CAUUAUUGUCAAGCAGACA-3`
siRAB3D-1	5`-GGAGAACAUCAAUUGUGAAG-3`
siRAB3D-2	5`-CAUCGCCAAUCAGGAAUCC-3`
siRAB3GAP1a	5`-UCAGUACACUCACUUAUCA-3`
siRAB3GAP1b	5`-UCAUUCACCAGAUUACU-3`
siRAB3GAP2-1	5`-UGACUUGGCUCUGUUACUA-3`
siRAB3GAP2-2	5`-UGAACCACAAGAACCUGAA-3`

2.1.9. Primer

Tabelle 14: Quantitative Echtzeit-PCR-Primer in *C. elegans*

Aß42 for	5`-TGCAGAATTCCGACATGACT-3`
Aß42 rev	5`-CACCTTTGTTTTGAACCCACA-3`
rbg-1 for	5`-TGGCTCACGAGCTCAATATG-3`
rbg-1 rev	5`-GTGTTGCTGATTTGGGATT-3`
rbg-2 for	5`-CCGAGCAACAGAAAAGAAGG-3`
rbg-2 rev	5`-CACATCGGAAAAGCCAATTT-3`
rpl-21 for	5`-CCAGTCCCAGCTTTGAAGAG-3`
rpl-21 rev	5`-ACAATCTCGAAACGGAGTGG-3`
atg-7 for	5`-GCTGATCCTTCTCCTGTTGC-3`
atg-7 rev	5`-CTCCATCTGCTGAGCATTCA-3`
bec-1 for	5`-CAAAGAAGGCCAGATTCAGC-3`
bec-1 rev	5`-CTGGAGCATCAGATGGGAAT-3`

Tabelle 15: quantitative Echtzeit-PCR-Primer in humanen Zellen

fez1 for	5`-GTCCATGGAGGACCTCGTAA-3`
fez1 rev	5`-TGGATCCCTCCAGTCTTCTG-3`
fez2 for	5`-CTTGCTGCTTGTTCACCAC-3`
fez2 rev	5`-ACTGGAACCAGCAAAAGTGC-3`
p62/SQSTM-1 for	5`-GACTACGACTTGTGTAGCGTC-3`
p62/SQSTM-1 rev	5`-AGTGTCCGTGTTTCACCTTCC-3`
rab3gap-1 for	5`-AGCAGACCTGATAAGTGAGTGTA-3`
rab3gap-1 rev	5`-AGCAGACCTGATAAGTGAGTGTA-3`
rab3gap-2 for	5`-TGCTTGTCGAAATCAGGTAGC-3`
rab3gap-2 rev	5`-GACATGGCAGGTGGACTATTTT-3`
rpl19 for	5`-GAA ATC GCC AAT GCC AAC TC-3`
rpl19 rev	5`-TTC CTT GGT CTT AGA CCT GCG-3`
rab3A for	5`-ACTGGTCCACCCAGATCAAG-3`
rab3A rev	5`-CCACGTTCTGATGACACCAC-3`
rab3B for	5`-GAGAGGGTTGTTCCCACTGA-3`
rab3B rev	5`-AAAGGCCTGCCTTACACTGA-3`
rab3C for	5`-ATCTGCATTCGTCAGCACAG-3`
rab3C rev	5`-TGTATCTTTCCCTGGCCTGCT-3`
rab3D for	5`-TACTGTGGGCATCGATTTCA-3`
rab3D rev	5`-TCCTGATTGGCGATGTCATA-3`

Tabelle 16: Primer zur Klonierung von *rbg-2* in *C. elegans*

rbg-2 for	5`-ATTAGCGCCGCTGACTCAGCACGTTCCATCTTCTG-3`
rbg-2 rev	5`-TGCTGCTAGCTTAATTGGCTAAGCAGTGTCGTTG-3`

2.1.10. Antikörper

Tabelle 17: Antikörper für die Immunopräzipitationen und Western-Blot-Analysen:

Name	Hersteller
anti-Actin	A5060, Sigma Aldrich
Anti-ATG7 clone D12B11	8558, Cell Signaling
Anti-ATG3	3415, Cell Signaling
anti-FEZ1	HPA038490, Sigma Aldrich
anti-FEZ2	HPA035978, Sigma Aldrich
Anti-GABARAP	M135-3, MBL
anti-LC3B	L7543, Sigma Aldrich
anti-c Myc	631206, Clontech
anti-p62/SQSTM1	GP62-C, Progen
anti-RAB3GAP1	SAB4500914, Sigma Aldrich
anti-RAB3GAP2	HPA026273, Sigma Aldrich
anti-Tubulin clone DM1A	T9026, Sigma Aldrich

Alle HRP (*Horseradish peroxidase*)-konjugierten Zweitantikörper waren von Jackson Immunoresearch.

2.2. Methoden

2.2.1. *Mikrobiologische Methoden*

Alle für die Kultivierung von Bakterien genutzten Puffer und Lösungen finden sich in Tabelle 3. Die genutzten Bakterienstämme lassen sich in Tabelle 8 finden.

2.2.1.1. *Bakterienanzucht*

Bakterien wurden in LB-Medium, das mit den benötigten Antibiotika supplementiert war, als Flüssig- beziehungsweise Plattenkultur über Nacht herangezogen.

2.2.1.2. *Herstellen von bakteriellen Dauerkulturen*

Klone oder bakterielle Wirtsstämme können über einen längeren Zeitraum bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Dazu wurde ein Klon in 3 ml Flüssigkultur herangezogen und bei Erreichen des exponentiellen Wachstums ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$) wurden 900 μl Bakteriensuspension entnommen und mit 90 μl DMSO in einem Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

2.2.1.3. *Transformation von Bakterien*

Ein 25 μl -Aliquot von DH5 α -Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und anschließend mit 50-300 ng Plasmid-DNA oder 5 μl Ligationsansatz versetzt. Nach einer 15- bis 30-minütigen Inkubationszeit erfolgte ein Hitzeschock von 42°C für 30 sec. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis abkühlen lassen und anschließend mit 250 μl SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden 50 bis 125 μl der Bakteriensuspension auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2. *Caenorhabditis elegans-Methoden*

Alle für die Kultivierung von *C. elegans* benötigten Puffer und Lösungen finden sich in Tabelle 4. Die genutzten Wurmstämme lassen sich in Tabelle 9 finden.

2.2.2.1. *Kultivierung*

Die verwendeten *C. elegans* stammen aus dem „*Caenorhabditis Genetics Center*“ und wurden unter Standardbedingungen (Sasidharan *et al.*, 2012; Stiernagle, 1999) auf NGM (*nematode growth medium*)-Platten kultiviert, die mit einem Rasen von *E. coli* HB101 beimpft worden sind. Die Würmer wurden bei 15 oder 20°C kultiviert und mit einem ausgeglühten Platin-Draht oder

durch Ausschneiden kleiner Agar-Quadrate unter Verwendung eines ausgeglühten Skalpell von Platte zu Platte transferiert.

2.2.2.2. **Bakterielle Starterkulturen**

C. elegans wurde unter monoxenischen Bedingungen kultiviert, wobei der *E. coli*-Stamm HB101 als Nahrungsquelle verwendet worden ist. Dieser Stamm ist uraciluxotroph, was gewährleistet, dass sein Wachstum auf den verwendeten NGM-Platten limitiert blieb. HB101 Bakterien wurden auf LB/Streptomycin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und in 100 ml LB/Streptomycin bei 37°C herangezogen. Dabei wurde auf Schütteln verzichtet, um eine optimale Dichte der Bakterienkultur zu erreichen. Sowohl die ausgestrichene Platte als auch die Flüssigkultur wurden bei 4°C gelagert und waren bis zu 4 Wochen verwendbar. Mit dieser Starterkultur konnten nun die NGM-Platten beschickt werden.

2.2.2.3. **Herunterregulation von mRNA-Spiegeln mittels RNA-Interferenz**

RNAi-Bakterien exprimieren eine dsRNA mit einer bestimmten Sequenz. In *C. elegans* können durch Fütterung dieser Bakterien spezifisch Gene mit der homologen Sequenz herunterreguliert werden (Kamath *et al.*, 2001). Diese sogenannte RNA-Interferenz (RNAi) beruht auf einer Wechselwirkung kurzer Fragmente von RNA mit der spezifischen mRNA von *C. elegans* unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe. Als Folge wird die mRNA in mehrere Bruchstücke gespalten und die zu übertragende Information wird zerstört oder eine Translation in ein Protein verhindert (Ahringer, 2006).

Hier wurden RNAi Bakterien des *E. coli*-Stammes HT115, die spezifische dsRNA exprimieren, genutzt. Diese stammen aus der „Ahringer Lab RNAi library“ mit der sich jedes Gen aus *C. elegans* herunterregulieren lässt (Fraser *et al.*, 2000; Kamath *et al.*, 2003; Kamath *et al.*, 2001). Die Bakterienkulturen lagen in gefrorener Form in 96-Well-Schalen auf -80°C vor und wurden zur Benutzung auf LB-Platten mit Ampicillin und Streptomycin kultiviert.

Die Herunterregulation im Wurm erfolgte auf dafür vorgesehenen RNAi-Platten, die mit Ampicillin und Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) versetzt waren. Das IPTG aktiviert den *lavUV5*-Promoter, der für die Transkription der T7-Polymerase verantwortlich ist und somit die RNA-Interferenz aktiviert.

Hierfür wurde ein Bakterienklon von HT115, dessen L4440-Vector die gewünschte Sequenz enthält, zuerst in LB/Ampicillin/Streptomycin-Flüssigmedium bis zum Erreichen des exponentiellen Wachstums ($OD_{600nm} = 0,6$) auf dem Schüttler bei 37°C kultiviert und

anschließend abzentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend in M9-Puffer mit 1 μM IPTG resuspendiert und auf RNAi-Platten ausgesät. Nachdem der Bakterienrasen auf den Platten abgetrocknet war, konnten darauf die Würmer behandelt werden.

2.2.2.4. *Synchronisierung einer C. elegans-Kultur mittels Eiablage*

Um eine vergleichbare und gleichaltrige Population von *C. elegans* zu erhalten, wurde die Zeit der Eiablage beschränkt. Hierfür wurden L4-Larven von *C. elegans* auf RNAi-Platten transferiert und für 24 h bis zum Erreichen des Adultstadiums auf diesen Platten belassen, in dieser Zeit begannen diese Muttertiere auch mit der Eiablage. Die eierlegenden Würmer wurden nun auf frische RNAi-Platten überführt und dort 2 bis 6 Stunden belassen bis sich die gewünschte Anzahl an Eiern auf der Platte befand. Die daraus schlüpfenden Larven entwickelten sich anschließend zu einer synchronisierten Wurmpopulation.

2.2.2.5. *RNAi-vermittelte Proteostase-Analyse*

Das Ziel dieser RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse war es alle Gene des Chromosoms I von *C. elegans* mittels der RNAi-Bakterien der „Ahringer Lab RNAi library“ herunter zu regulieren und deren Effekte auf die Proteinstabilität im Wurm zu untersuchen. Hierfür wurde ein Wurmmodell genutzt, das stabil Luc::GFP im Hautmuskelschlauch exprimiert (Luc = Luziferase). Durch Hitzestress wird dieses Protein denaturiert, was im Mikroskop als Aggregate sichtbar wird. Durch Herunterregulation eines Gens kann man diese Aggregation beeinflussen (Kern *et al.*, 2010).

Die Behandlung durch RNA-Interferenz begann bereits bei den Muttertieren im L4-Stadium. Als Negativ-Kontrolle dienten RNAi-Bakterien, die nur einen Leervektor beinhalten (eV = empty Vector). Als Positivkontrolle wurde HSP110, ein Hitzeschockprotein dessen Herunterregulation zu einer beschleunigten Aggregation im Hitzestress führt, genutzt. Die Würmer wurden zur Eiablage im Adultstadium auf neue Platten gesetzt und die daraus entstehenden Nachkommen verblieben bis zum Hitzestress auf diesen Platten. Nach 48 h befanden sich die Tiere im L3-Stadium und wurden kontrolliert für 1 bis 2 h bei $37,5 \pm 1^\circ\text{C}$ gestresst. Regelmäßig wurde die Aggregation der Kontrollen unter dem Mikroskop überprüft. Die Negativ-Kontrolle eV sollte noch keine Aggregate zeigen, die Positivkontrolle HSP110 hingegen musste die ersten Aggregate zeigen. Die anderen Tiere, die mit RNAi der zu untersuchenden Genen behandelt waren, wurden daran abgeglichen.

2.2.2.6. *Aggregation im Polyglutamin-Wurm*

Würmer aus dem AM140-Stamm exprimieren unter einem *unc-54*-Promoter ein Polypeptid mit 35 Glutamin (Q35 = Polyglutamin), das an gelb-fluoreszierendes Protein (YFP = *yellow fluorescent protein*) gebunden ist. Im Menschen führt die Aggregation von Polyglutamin zur Huntington-Krankheit (Orr und Zoghbi, 2007; Shoulson und Young, 2011). Mit fortschreitendem Alter von *C. elegans* aggregiert dieses Polypeptid auch im Wurm, dies lässt sich unter dem Mikroskop als gelb-fluoreszierende Aggregate im Hautmuskelschlauch erkennen. Durch Ausschalten gewisser Gene mittels RNAi lässt sich diese Aggregation verschlechtern oder verbessern.

Gene aus *C. elegans*, die in der zuvor beschriebenen Hochdurchsatzanalyse auffällig und von erhöhtem Interesse waren, wurden nun in diesem Wurmstamm mittels RNA-Interferenz ausgeschaltet. Die Behandlung erfolgte bei 20°C. Die Herunterregulation mittels RNAi begann schon bei den Muttertieren während diese sich noch im L4-Stadium befanden. Nach einem Tag wurden die Muttertiere zur Eiablage auf neue RNAi-Platten umgesetzt. Auf diesen Platten verblieben die Nachkommen bis zu ihrem L4-Stadium, danach wurden die Würmer täglich auf neue RNAi-Bedingungen transferiert. Am dritten Tag Adultstadium war die Aggregation des Polyglutamin am besten zu beobachten und die Stärke der Aggregation konnte unter dem Mikroskop beurteilt und von den Würmern konnte mittels Life Science Mikroskop Olympus IX81 Aufnahmen gemacht werden.

2.2.2.7. *Paralyse-Prüfung*

Tiere des *C. elegans*-Stamm CL2006 exprimieren humanes Beta-Amyloid 42 (A β 42) in ihrem Hautmuskelschlauch, was mit fortschreitendem Alter des Wurms zu einem Paralyse-Phänotyp führt bei dem sich letztlich nur noch die Kopfreion bewegt (Cohen *et al.*, 2010). Durch RNAi lässt sich dieser Phänotyp verschlimmern oder verbessern, wobei die Würmer dadurch früher oder später paralysieren.

Die Synchronisation der Wurmpopulation erfolgte wie zuvor beschrieben über eine kontrollierte Eiablage. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Würmer auf 15°C kultiviert. Als Kontrolle dienten eV-Bakterien. Für die Kontroll-Bedingungen und jede Behandlung wurden je drei RNAi-Platten mit jeweils etwa 25 Würmern eingesetzt. Sobald diese das L4-Stadium erreicht hatten wurden sie täglich auf neue RNAi-Platten transferiert und ab dem ersten Tag adult wurden die Tiere auf Paralyse hin untersucht. Als paralysiert galten Würmer, die noch am leben sind, aber den Rest des Körpers nicht mehr bewegen können. Dazu wurden sie mit einem Platindraht berührt, wobei nicht paralysierte Würmer den Körper von diesem Reiz wegbewegten, während

paralysierte, noch lebende Würmer nur noch mit ihrer „Nase“ zuckten. Tote, veränderte (vorstehende Vulva = *protruding vulva*, Würmer mit Legenot = *bag of worms*) oder verschwundene Würmer wurden aus der Statistik (Gesamtpopulation) entfernt. Die Kontrolle der Paralyse erfolgte täglich bis zum zwölften Tag des Erwachsenseins. Jedes Einzelexperiment wurde sechs Mal durchgeführt.

2.2.2.8. **Thioflavin S-Färbung**

Die zuvor erwähnten Beta-Amyloid 42-Aggregate des CL2006-Wurmstamms lassen sich mittels Thioflavin S-Färbung unter dem Mikroskop sichtbar machen (Morita *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006). Dazu wurden die Würmer genauso behandelt wie bei der Paralyse-Kontrolle (2.2.2.7), allerdings entnahm man am dritten Tag adult die gewünschte Anzahl Tiere und überführte sie für 24 h bei 4°C in 4% Paraformaldehyde-PBS. Danach wurden diese Würmer für weitere 24 h bei 4°C in Permeabilisierungslösung inkubiert. Die Tiere wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit 0.125% Thioflavin S (Sigma) in 50% Ethanol für 2 min gefärbt und mit 50% Ethanol für 2 min gewaschen. Danach wurde das Ethanol mit M9 ausgewaschen und die Würmer konnten mikroskopiert werden. Hierfür wurden die Tiere auf 3%-Agarose-Plättchen auf Objektträger überführt. Fluoreszenz-Bilder wurden mittels konfokaler Mikroskopie mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM710 aufgenommen. Hierfür wurden gestaffelte Aufnahmen der Kopfreion des Wurmes bei 40facher Vergrößerung, einer Anregung bei 458 nm und Emission zwischen 470 und 490 nm gemacht. Anschließend wurden die gestaffelten Bilder mit ImageJ zusammengeführt und die Aggregate pro Kopfreion in jedem Tier ausgezählt. Die Mikroskopie erfolgte in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens zehn Würmern.

2.2.2.9. **Autophagie-Untersuchung mit GFP::*LGG1*-exprimierenden Würmern**

In diesem Experiment wurde ein Wurmstamm genutzt, der extrachromosomal GFP-markiertes LGG1 exprimiert. LGG1 entspricht dem humanen ATG8 (LC3, GABARAP oder GATE-16 Familie) und ist ein Autophagie-Marker. Autophagie lässt sich durch Hungern induzieren, dadurch lassen sich GFP-positive punktförmige Areale in den Saumzellen von *C. elegans* beobachten, die präautophagosomale und autophagosomale Strukturen darstellen (Melendez *et al.*, 2003).

Da das GFP::*LGG-1* nur extrachromosomal im Wurm exprimiert wird, zeigen nicht alle Tiere diesen Phänotyp. Allerdings ist er mit einem Roller-Phänotyp gekoppelt, was die Selektion erleichtert. Alle „rollenden“ Würmer besitzen auch den Autophagie-Marker.

Die Behandlung mittels RNAi der Würmer erfolgte im L4-Stadium der Muttertiere. Beim Erreichen des L4-Stadiums wurden die Nachkommen als Kontrolltiere auf frische RNAi-Platten

transferiert oder auf nahezu bakterienfreie RNAi-Platten umgesetzt um die Autophagie über Hungern über Nacht zu stimulieren. Ganz bakterienfrei sollten die Platten nicht sein, da die Würmer sonst zu sehr aushungern und nicht mehr mikroskopierbar sind. Daher wurden beim Umsetzen der Würmer immer wenige Bakterien mittransferiert. Nachdem die Würmer über Nacht auf Kontroll- oder Hungerbedingungen gehalten wurden, konnten sie mikroskopiert werden. Zur Quantifizierung wurden für 20 Würmer pro Wurm zwei bis drei Saumzellen aufgenommen und anschließend wurden die punktförmigen fluoreszierenden Areale pro Zelle gezählt. Verglichen wurde die Induktion der Autophagie, also die Vermehrung der autophagosomalen Strukturen von mit Bakterien versorgten Würmern und Würmern ohne Nahrung. Als Negativkontrolle diente eV und als Positivkontrolle Beclin 1, ein kanonischer Faktor der Autophagie.

2.2.3. *Zellbiologische Methoden*

Alle in der Zellbiologie verwendeten Puffer und Lösungen finden sich in Tabelle 5.

2.2.3.1. *Kultivierung von humanen Zellen*

Adhärente HEK293a-Zellen wurden in Zellkulturmedium in geeigneten Zellkulturschalen ausplattiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer Kohlenstoffdioxid-Konzentration von 5%. Um die Zellen zu passagieren, wurden sie unter Verwendung von 1x Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und in geeigneten Zellmengen auf neue Schalen ausplattiert.

2.2.3.2. *Zelluläre Dauerkulturen*

Für die langfristige Aufbewahrung wurden humane Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden subkonfluente Zellen von den Zellkulturschalen trypsiniert, durch milde Zentrifugation pelletiert und anschließend in Kulturmedium, supplementiert mit 10% DMSO, resuspendiert. In einer Isopropanol-haltigen Einfrierbox wurden 1 ml Zellsuspension bei -80 °C langsam in einem Kryogefäß eingefroren und nach 6 bis 8 h in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3.3. *Transiente Transfektionen*

Für die transiente Transfektion mit Plasmiden oder small interfering RNA (siRNA) wurde die Elektroporationstechnik angewendet. Mittels Plasmiden können Gene überexprimiert und mittels siRNA herunterreguliert werden.

siRNA-Oligonukleotide wurden über MWG Eurofins bezogen und entworfen (siehe Tabelle 13). Die siRNAs wurden in 1x siMAX Universal Buffer (2 µg/µl) gelöst und bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Plasmide finden sich in

Tabelle 12.

Zur Elektroporation wurden etwa 70% konfluente Zellen mittels 1x Trypsin/EDTA von der Schale gelöst, abzentrifugiert und anschließend wurde die gewünschte Anzahl Zellen in 400 µl Elektroporationspuffer mit 15-20 µg siRNA oder Plasmid gelöst und in eine Elektroporationsküvette (4 mm, Sigma) überführt. Mithilfe eines Amaxa©-Elektroporators wurden die Zellen nach Gebrauchsanleitung des Geräts elektroporiert und anschließend für 5 min ruhen gelassen, um den Eintritt des Transgens in die Zelle durch die permeabilisierte Zellmembran zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen mit Zellmedium auf Schalen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach 48 h konnten die Zellen weiterverarbeitet und / oder behandelt werden.

2.2.3.4. **Behandlung mit Bafilomycin A1 und Rapamycin**

Bafilomycin A1 ist ein toxisches makrolides Antibiotikum, das aus *Streptomyces griseus* stammt und als spezifischer Inhibitor von vakuolären H⁺-ATPase wirkt. In Zellen verhindert es die Ansäuerung der autophagosomalen Strukturen. Somit können diese nicht abgebaut werden und laufen im Zytoplasma auf. Dies kann zur Bestimmung des autophagischen Fluxes genutzt werden (siehe 2.2.4.7). Rapamycin ist ein Aktivator der Autophagie und stammt aus dem Streptomyzeten *Streptomyces hygroscopicus*. Es blockiert mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und hebt somit dessen Autophagie-hemmende Wirkung auf.

HEK293a-Zellen können 48 h nach Elektroporation behandelt werden. Hierfür wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und dann wurde zu den Zellen Medium gegeben, dass 1 µM Bafilomycin A1 und / oder 10 µM Rapamycin oder die gleiche Menge DMSO als Kontrolle enthielt. Nach 4 h Inkubationszeit konnten die Zellen geerntet werden.

2.2.3.5. **Optische Darstellung von Autophagie in Zellen**

Der Zellstamm HEK293a ptfLC3 exprimiert LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta*), das GFP und RFP gekoppelt ist. Hierdurch lassen sich autophagosomale Strukturen in der Zelle beobachten. LC3 wird an ein sich bildendes Autophagosom rekrutiert und somit fluoreszieren diese grün und rot. Verschmilzt dieses anschließend mit einem Lysosom zu einem Autolysosom und der pH-Wert im Inneren sinkt, wird das grüne GFP zerstört und zurück bleiben nur rote punktförmige Strukturen. Somit lassen sich (Prä)Autophagosomen im Mittel als

gelbe Punkte und Autolysosomen als rote Punkte darstellen. Dies kann man nutzen um Veränderungen der Autophagie wie etwa nach Transfektionen oder anderen Behandlungen zu beobachten.

HEK293 a ptfLC3 wurden nach transienter Transfektion mit RAB3GAP siRNA auf Deckgläsern in 1,55 cm Schalen unter Standardbedingungen kultiviert. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit nonsense siRNA transfiziert wurden. Nach 48 h konnten die Zellen behandelt werden.

Als vorbereitender Schritt zum Eindeckeln wurden die Zellen zunächst zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 25 min mit 3,5 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde dreimal 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 von Farbstoff zu gewährleisten. Nach weiteren vier Waschschritten mit 1x PBS wurden die Deckgläser mit 1:100 DAPI für 10 min inkubiert um die Zellkerne anzufärben. Anschließend wurde noch zwei weitere Male mit 1 x PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit einer Pinzette aus den Schalen entnommen und mit Eindeckmedium auf einen Objektträger überführt, mit Nagellack versiegelt und bei -20°C gelagert.

Die Aufnahmen der HEK293 a ptfLC3 erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM710 und die nachfolgende Bearbeitung der Bilder erfolgte mit den Bildbearbeitungsprogrammen ImageJ und Photoshop CS 5.1. (Adobe).

2.2.3.6. *Co-Immunopräzipitation*

Eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) ist eine biochemische Methode, bei der mittels eines Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung konzentriert wird. Beim Herunterziehen sollen dabei mit dem Antigen interagierende Proteine ebenfalls aufkonzentriert werden. Somit lassen sich Protein-Interaktionen nachvollziehen.

Es wurden dafür eine 15cm-Schale HEK293a-Zellen, die mindestens zu 70% konfluent war, benötigt. Die Zellen wurden auf Eis verarbeitet, mit kaltem 1x PBS gewaschen und mit NP40-Lysispuffer (HEK-Zellen 1000 µl / Schale, IMR90 300 µl / Schale) versetzt. Mit einem Zellschaber werden die Zellen zunächst nur angekratzt und dann 15 min auf Eis inkubiert. Danach konnten die Zellen vollständig geerntet und in ein „*Low Retention*“-Inkubationsgefäß überführt werden. In zwei milden Zentrifugationsschritten (1000 g, 10 min, 4°C) wurden nicht benötigte Zellreste pelletiert. Vom Überstand wurde die Protein-Konzentration bestimmt. Für den Versuch wurden 1000 µg Protein eingesetzt und auf 1 ml mit NP40-Lysispuffer aufgefüllt. Um die Reinheit des

Proteinlysats zu erhöhen und somit die Unspezifität zu erniedrigen wurde das Lysat für 1 h bei 4°C mit 25 µl „Pierce Protein A/G Magnetic Beads“ (Thermo Scientific) unter Rotieren vorinkubiert. Danach wurde das Lysat von den magnetischen Kügelchen befreit und entweder mit 1 µg Primärantikörper oder 1 µg korrespondierendem Immunglobulin G-Antikörper versetzt und wieder für 1 h bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Anschließend werden die Proben auf frische, gewaschene magnetische Kügelchen pipettiert und wieder für 1 h bei 4°C unter Rotieren reagieren gelassen. Nun können mithilfe des magnetischen Probenständers die *Pierce Protein A/G Magnetic Beads*“ gesammelt und der Überstand verworfen werden. Nachdem drei Mal mit NP40-Lysispuffer gewaschen wurden, wurden die magnetischen Kügelchen in 20 µl 2x SDS-Ladepuffer resuspendiert. Die Inkubation erfolgte bei Immunglobulin G-Antikörpern, die von Maus oder Meerschweinchen stammen bei 99°C für 5 min unter mäßigem Schütteln und bei Immunglobulin G-Antikörpern, die vom Kaninchen stammten bei Raumtemperatur für 10 min und maximalem Schütteln. Zum Pelletieren wird bei höchster Stufe und Raumtemperatur für eine Minute abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 15 µl abgenommen und konnten nun auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden.

2.2.4. **Proteinbiochemische Methoden**

Alle in der Proteinbiochemie verwendeten Puffer und Lösungen finden sich in Tabelle 6.

2.2.4.1. **Proteinpräparation**

Zum Ernten von Säugerzellen wurde stets 1x Lysispuffer verwendet, der hierfür durch Verdünnung mit H₂O frisch hergestellt und zusätzlich stets mit Proteinaseinhibitor (*protease inhibitor cocktail* (PIC; 1:100; Sigma Aldrich) versetzt wurde. Subkonfluente Säugerzellen wurden mit kaltem 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von 1x Lysispuffer mechanisch mithilfe eines Zellschabers von den Zellkulturschalen geschabt. Die Lysate wurden kurz sonifiziert und anschließend für 5 min bei 99 °C inkubiert. Die Lagerung der Proteinpräparate erfolgte bei -80°C.

2.2.4.2. **Proteinquantifizierung**

Die Proteinkonzentration wurde nach der BCA (Bicichinon-Säure)-Methode ermittelt und das Protokoll wie vom Hersteller (BioRad) beschrieben durchgeführt. Durch die Komplexbildung der Proteine mit Cu²⁺ 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. Es wurde immer eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.4.3. ***SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese***

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die von Laemmli beschriebene Methode der denaturierenden SDS-PAGE eingesetzt (Laemmli, 1970). Hierzu wurden entweder selbstgegossene Gele unter Verwendung der Miniblot-Kammer der Firma BioRad (Herts, Großbritannien) oder 4-12% NuPage Bis-Tris-Gradientengele im NuPage System der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Die Proteinproben wurden zunächst mit 1x Ladepuffer versetzt und 2 min bei 99°C inkubiert. Die beiden Agentien β -Mercaptoethanol und SDS, die im Ladepuffer enthalten waren, sowie das Aufkochen bei 99°C denaturieren die Proteine. Zusätzlich erhalten die Proteine durch die Bindung von SDS eine negative Ladung. Somit erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von ihrer Eigenladung. Als Proteingrößenstandard wurde „*Page Ruler Prestained Protein Ladder*“ (Fermentas, Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingespannt und diese wurde mit ihrem dazugehörigen Laufpuffer 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.

2.2.4.4. ***Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot***

Durch den Western Blot werden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine mittels eines elektrischen Feldes 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 Blotting-Kammer eingespannt. Die Blotkammer wurde mit 1x Transferpuffer befüllt und die Übertragung der Proteine erfolgte bei 30 V über Nacht.

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran etwa 30 sec in eine Ponceau S-Färbelösung gelegt und anschließend mit dH₂O gewaschen. Durch die reversible Bindung des Ponceau S an die Proteinbanden konnte die Qualität des Transfers überprüft werden.

2.2.4.5. *Immunologischer Nachweis der Proteine*

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte ihr immunologischer Nachweis: Dazu wurde die Nitrocellulosemembran zunächst unter Schütteln für 1-2 h in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C. Die Antikörper wurden in PBS/Tween-20 mit 0,02 % Natriumazid angesetzt. Danach wurde die Membran dreimal für je 15 min mit PBS/Tween-20 gewaschen und anschließend für 1-2 h mit einem geeigneten sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS/Tween-20 erfolgte die Nachweisreaktion mit Hilfe einer ECL-Lösung. Hierfür wurde die Membran mit ECL-Lösung (1000 µl Lösung A, 100 µl Lösung B und 1 µl Lösung C) benetzt. Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit der LAS-3000 Intelligent Dark Box der Firma Fuji aufgenommen.

2.2.4.6. *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 der Zytoskelettproteine Tubulin oder Aktin dienten dabei als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinladung und wurde als Referenz in die Auswertungen der Banden einbezogen.

2.2.4.7. *Analyse der autophagischen Aktivität*

Die Bestimmung des autophagischen Fluxes ist eine etablierte Möglichkeit die autophagische Aktivität der Zelle zu untersuchen (Behl, 2011). In dieser Arbeit wurde der autophagische Flux der Autophagie-Substrate p62/SQSTM1, einem Cargorezeptor, und LC3-II, der lipidierten Form von LC3, ermittelt (Mizushima und Yoshimori, 2007). Beides sind Substrate des autophagosomalen Abbaus. Blockiert man mithilfe von Bafilomycin A1 die Ansäuerung der Lysosomen und somit den autophagosomalen Abbau, akkumulieren beide Proteine. Durch die Differenz zwischen den Proteinmengen unbehandelter und mit Bafilomycin A1-behandelter Zellen kann der autophagische Flux ermittelt werden, der die Aktivität der der Autophagie in

einem bestimmten Zeitraum beschreibt (Yamamoto *et al.*, 1998). Hierzu wurden nach Ermittlung der optischen Bandenintensität die Bande nach Bafilomycin A1 Behandlung mit der unbehandelten Kontrolle subtrahiert und somit der autophagische Flux ermittelt.

2.2.5. *Molekularbiologische Methoden*

2.2.5.1. *Primerdesign*

Primer, die zum Nachweis eines bestimmten Gens benötigt wurden, wurden mithilfe des Internetprogramms Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) entwickelt. Selbst entworfene Primer wurden mithilfe der beiden Internet-Werkzeuge Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx>) und Oligo Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) auf ihre wichtigsten Parameter hin untersucht. Zum Schluss wurde mittels BLAST-Werkzeug der NCBI-Internetseite (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nochmals überprüft, ob die entwickelten Oligo-Nukleotide wirklich nur das gewünschte Gen amplifizieren. Wenn die entstandenen Primer komplett kontrolliert waren, wurden sie über New England Biolabs GmbH geordert.

2.2.5.2. *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um Nukleinsäuren *in vitro* zu vervielfältigen. Dieser Prozess wird durch die hitzestabile Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) katalysiert oder im Falle von Klonierungen durch die korrekturlesende Phusion High-Fidelity DNA- Polymerase (NEB).

Die PCR wurde unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt: ein PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt 1-5 ng Plasmid-DNA, 10 ng genomischer DNA oder 1 µl cDNA, jeweils 15 pmol „sense“ und „antisense“ Primer, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, jeweils 0,5 µl 10 mM dNTPs, MgCl₂ in einer Endkonzentration von 1 mM sowie 0,5 U Taq- oder Phusion-Polymerase. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt: zum Denaturieren der Doppelstränge wurde die DNA für 5 min bei 95°C inkubiert. Es folgte die Primerhybridisierung (30-45 sec) bei einer Primer-spezifischen Temperatur, im Idealfall liegt diese Temperatur um 60°C. Nach dem Anlagerungsschritt wurde die Temperatur für die Elongation auf 72°C erhöht. Die Extensionszeit ergab sich aus der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Generell wurden für die Taq-Polymerase 60 sec und für die Phusion-Polymerase 30 sec pro 1000 bp verwendet. Im nächsten Schritt wurde erneut für 10-45 sec bei 95°C inkubiert, um DNA wieder für die folgende

Primeranlagerung in ihre Einzelstränge zu denaturieren. Insgesamt wurden je nach Anwendung 20-35 Zyklen durchgeführt. Zuletzt erfolgte eine fünfminütige Endextension bei 72°C, um teilweise synthetisierter DNA-Stränge zu vervollständigen.

2.2.5.3. **Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen**

RNA ist im Vergleich zu DNA anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse, weswegen das Arbeiten mit RNA ein höheres Maß an Sterilität und Sorgfalt verlangt. Daher wurde auch stets mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem, bidestilliertem Wasser gearbeitet. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation eines Histidinrestes im aktiven Zentrum.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das „*Absolutely RNA Nanoprep Kit*“ von Agilent Technologies verwendet und wie vom Hersteller vorgesehen vorgegangen. Eine zusätzliche 15-minütige Behandlung mit DNasen bei 37 °C verringerte die Gefahr von DNA-Kontaminationen.

2.2.5.4. **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. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde durch das Lambert-Beer Gesetz ermittelt.

2.2.5.5. **Reverse Transkription / Synthese von cDNA**

Zur Durchführung der Reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) wurde das „*Omniscript RT Kit*“ von Qiagen verwendet. Mit diesem konnten spezifisch RNA-Sequenzen in cDNA umgeschrieben werden.

Gesamt-RNA (~1000 ng) wurde mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Der Reaktionsansatz wurde anschließend sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der RNA-Moleküle zu verhindern. Zum gleichen Ansatz wurden 2 µl 10x Puffer, 2 µl 5 mM dNTPs, 2 µl 10 µmol Oligo-dT15-Primer, und 4 U Reverse Transkriptase aus dem Kit und zusätzlich 0,25 µl RNase-Inhibitor (40 U, Promega) in einem Endvolumen von 20 µl gegeben. Eine Kontrolle, die keine Reverse Transkriptase enthielt, wurde zum Nachweis auf Kontamination mit DNA mitgeführt (Mock). Der Ansatz wurde 60 min bei 37 °C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5.6. **Restriktionsverdau der DNA mit Restriktionsendonucleasen**

DNA wird mit Restriktionsendonucleasen (Restriktionsenzymen) geschnitten, um Plasmide zu linearisieren, Vektoren und Inserts zur Ligation vorzubereiten oder Klone zu selektieren.

Hier wurden standardmäßig Restriktionsenzyme von NEB mit ihren dazugehörigen Reaktionspuffern verwendet. Pro μg DNA oder weniger, wird eine Unit Restriktionsenzym eingesetzt und mit 1x geeignetem Reaktionspuffer versehen. Falls es für die Reaktion eines Enzyms notwendig war, wurde entsprechend 1x BSA zugegeben (NEB). Die Inkubation erfolgte für mindestens 4 h bei einer für die Enzymaktivität optimalen Temperatur, diese betrug meist 37°C .

2.2.5.7. **Ligation**

Unter Ligation versteht man die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA- oder RNA-Segmente an ihren Enden. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäuresegmente mit Hilfe des Enzyms Ligase durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Mithilfe dieser Technik lassen sich Vektoren und Inserts zu einem funktionsfähigen Plasmid verbinden.

Hier wurde das „*Rapid DNA Ligation Kit*“ (Roche) verwendet. Dazu wurden $150\ \mu\text{g}$ Insert-DNA und $50\ \mu\text{g}$ Vektor-DNA mit 1x Dilutic Puffer auf $10\ \mu\text{l}$ aufgefüllt und mit $10\ \mu\text{l}$ Ligationspuffer und $1\ \mu\text{l}$ Ligase versetzt. Die Reaktion erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss folgte eine Hitzeschock-Transformation von DH5Q Bakterien (siehe 2.2.1.3).

2.2.5.8. **Plasmid-Präparation**

Um Plasmide verwenden zu können, werden diese mithilfe von Bakterien vermehrt und müssen dann anschließend wieder aus diesen extrahiert werden.

Ein Bakterienklon, der das gewünschte Plasmid enthält, wurde über Nacht in 3 ml LB-Medium, supplementiert mit einem geeigneten Antibiotikum, angezogen. Durch Zentrifugation wurden die Bakterien pelletiert und die Plasmide unter Verwendung des „*Roti®-Prep Plasmid*“ Kits (Roth) nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration und Reinheit der Präparation wurde photometrisch quantifiziert und das isolierte Plasmid bei $-20\ ^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.5.9. *Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA*

DNA lässt sich aufgrund ihrer negativen Ladung in Agarosegelen elektrophoretisch auftrennen und analysieren. Dabei wurden je nach Größe des erwarteten Fragments Gele mit 1 bis 2% Agarosegehalt verwendet.

Zur Herstellung der Agarosegele wurde die gewünschte Menge Agarose (w/v) mit 1x TAE Puffer (Tabelle 7) versehen. Nach kurzem Aufkochen wurden 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml) hinzugegeben. Dieser DNA-interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff ermöglicht die spätere Visualisierung der DNA nach Anregung mit UV-Licht. Die aufzutrennende DNA wurde vor dem Auftrag auf das Gel mit 1x „*Mass Ruler Loading Dye*“ (Fermentas) versehen. Dadurch wird einerseits die Dichte der DNA-Lösung erhöht, um ein Absinken in die Geltaschen zu ermöglichen, und andererseits eine Visualisierung der Wanderung im Gel gewährleistet, da der Auftragspuffer Bromphenolblau enthält, das etwa auf Höhe eines 500 bp DNA-Fragments migriert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen in bp wurden 8 µl des „*Mass Ruler DNA Ladder Mix*“ (Fermentas) als Marker aufgetragen. Die Gele wurden unter UV-Beleuchtung (254-366 nm) fotografiert.

2.2.5.10. *Präparative Agarose-Gelelektrophorese*

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese wird zum Isolieren bestimmter DNA-Fragmente aus zum Beispiel PCR-Ansätzen genutzt. Die DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht (312 nm) mit einem Skalpell herausgeschnitten. Eine zu hohe UV-Belastung zerstört DNA, daher sollte möglichst schnell gearbeitet werden. Das isolierte Fragment wurde aus der Agarose mittels „*Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up*“ (Macherey-Nagel) wie beschrieben eluiert.

2.2.5.11. *Quantitative Echtzeit-PCR*

Zur Quantifizierung der Genexpression bestimmter Gene in Säugerzellen und Nematoden auf mRNA-Ebene wurden quantitative Echtzeit-PCRs durchgeführt. Das Endvolumen der PCR betrug 25 µl und enthielt neben der zu untersuchenden cDNA 12,5 µl „*Sensi Mix SYBR*“-PCR Reagenzmischung aus dem „*Fluorescent Kit*“ der Firma Biorad sowie 100 pmol der zugehörigen Primer (Tabelle 14 und Tabelle 15). Die PCR-Reagenzmischung enthielt 2x PCR-Puffer, dNTPs sowie die Taq-Polymerase. Die PCR wurde im iQ Real-Time-PCR Thermozykler (Biorad) durchgeführt. Die PCR Bedingungen waren hierbei vergleichbar mit denen der konventionellen PCR. Aus den Amplifikationskurven wurde derjenige Zyklus („Threshold Cycle“ Ct) ermittelt,

nach dem die Amplifikation des PCR-Produkts in die exponentielle Phase überging. Unter Verwendung geeigneter Referenzgene wurde der ΔC_t -Wert ermittelt.

2.2.6. *Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SigmaStat (SYSTAT). Alle Ergebnisse wurden mittels t-Test oder One Way Anova auf Signifikanz geprüft. Das Signifikanzniveau lag bei 5 %. Angegeben wurden Signifikanzen als * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ und *** $P \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1. Die Aufklärung und Charakterisierung neuer Proteostase-beeinflussender Gene in *C. elegans*

3.1.1. RNAi-vermittelte Proteostase-Analyse von Chromosom in *C. elegans* zeigt mögliche neue Modulatoren der Protein-Homöostase

C. elegans ist seit den 1960er Jahren ein häufig genutzter Modellorganismus zur Untersuchung zahlreicher molekularbiologischer Fragestellungen und bietet viele Vorteile in der Forschung vor allem durch die relativ einfache Möglichkeit der genetischen Manipulation. Hier wurde dieser Nematode genutzt, um in einer Proteostase-Analyse nahezu alle Gene von Chromosom I durch RNA-Interferenz nacheinander auszuschalten, und den Einfluss dieses Verlusts auf die Stabilität von Proteinen zu untersuchen.

Um Stärke und Umfang von Aggregation in einem Modellorganismus sichtbar zu machen und somit auf die Qualität des Proteostaseeinflusses schließen zu können, wurde eine Wurmlinie verwendet, die Luc::GFP unter der Kontrolle eines Muskelpromotors exprimiert ($P_{myo-3}::Luc::GFP$, Abbildung 11).

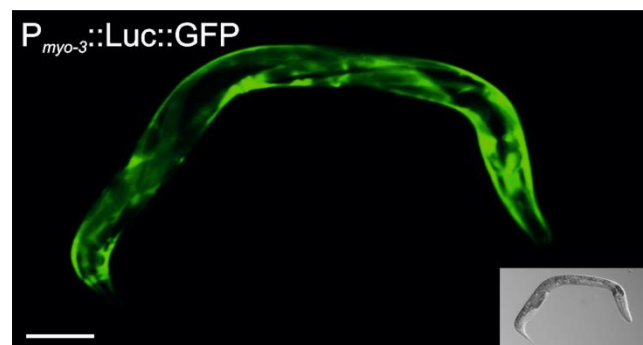


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Nematoden *C. elegans* mit Luc::GFP-Expression in Muskelzellen (Kern *et al.*, 2010).

Diese Würmer zeigen eine klare Korrelation zwischen der Stabilität von Luc::GFP und der Aktivität zellulärer Faktoren zur Erhaltung der Proteostase (Kern *et al.*, 2010). Somit konnte dieser *C. elegans*-Stamm im Verlauf dieser Arbeit als Modellorganismus genutzt werden, um die Proteinstabilität nach Herunterregulation bestimmter Gene durch RNAi zu untersuchen. Für die RNA-Interferenz wurden die Bakterienklone der „*Caenorhabditis elegans* RNAi feeding library“, die von der Julie Ahringer Gruppe am Wellcome CRC Institute (University of Cambridge,

Cambridge, Großbritannien) generiert wurden, genutzt (Fraser *et al.*, 2000; Kamath *et al.*, 2003; Kamath *et al.*, 2001).

Bei der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse des Chromosoms I und ausgewählter, weiterer Klone in *C. elegans* wurden die getesteten Gene in Bezug zu einer Negativkontrolle (Leervektor / eV = *empty Vector*) und der Positivkontrolle HSP110 (Hitzeschockprotein 110) bezüglich ihrer Aggregation von Luc::GFP untersucht. Die entsprechenden Gene wurden herunterreguliert und die Würmer nach Hitzestress fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 12).

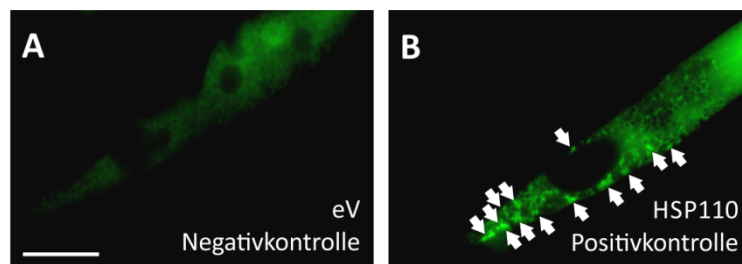


Abbildung 12: Mikroskopische Aufnahmen von *C. elegans*, die Luc::GFP im Muskel exprimieren, nach Hitzeschock (weiße Pfeile = Aggregate, Maßstab = 50 µm): **A.** Es zeigte sich keine Aggregation von Luc::GFP in der eV-Kontrolle. **B.** Das Konstrukt aggregierte nach Herunterregulation von HSP110 mittels RNAi.

Insgesamt wurden hier 2680 RNAi-Klone untersucht. Im ersten Durchgang waren 435 RNAi-Klone auffällig bezüglich einer veränderten Proteinaggregation. Die identifizierten Klone wurden nochmals getestet, wonach letztlich 359 Kandidaten als mögliche Modulatoren der Proteostase bestätigt wurden.

Während alle auffälligen Klone nochmals in einem zweiten Durchgang kontrolliert wurden, wurden auch von den negativen Klonen Stichproben genommen. Hierbei waren 6,67 % als falsch negativ bewertet (Abbildung 14 B). Diese Analyse diente dazu die Stringenz der Untersuchung nochmals zu validieren. Da nur ein geringer Prozentsatz der Stichproben falsch negativ bewertet wurde, konnte die von uns im Labor etablierte manuelle Hochdurchsatzanalyse als relativ zuverlässig eingestuft werden.

1	RNA-Bibl.	Anmerkungen	Säuger-Homo.	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
2	I-1-A10	M01D7.1; <i>F-box protein</i>	Nein	ubiquitination		Proteostase
3	I-1-B17	W05F2.4; Isoform F of Proteoglycan 4	Ja		Schmierung innerhalb gelenkiger Ver	Strukturproteine
4	I-1-C01	F53G12.6 (spe-8); Isoform 2 of Tyrosine-prote	Ja	Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, Spermat	Tyrosin-Protein Kinase; Aktin-Zytosk	Signaltransduktion
5	I-1-C16	W03F11.5 (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktio
6	I-1-D05	K03E5.1 (neto-1); Isoform of Neuropilin and to	Ja	<i>NETO (Neuropilin and Tolloid-like) homoi</i>	Modulatorische Untereinheit des neu	Signaltransduktion
7	I-1-D16	E01A2.10 (poml-3); serum paraoxonase/aryles	Ja	PON (paraoxonase) and MEC-6 Like	Antwort auf oxidativen Stress	Oxidativer Stress / E
8	I-1-D20	E01A2.4 (let-504); NF-kappa-B-activating prote	Ja	Progression des mittleren Larvenstadium	Transkriptions-Repressor	Genexpression
9	I-1-E02	F23C8.5; Isoform 1 of Electron transfer flavopi	Ja		spezifischer Elektronenakzeptor für i	Oxidativer Stress / E
10	I-1-E07	R119.1 (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktio
11	I-1-E08	F23C8.8; Isoform 1 of Serine/threonine-protei	Ja		Zellpolarität und Dynamik der Mikrot	Signaltransduktion
12	I-1-E09	R119.2; Isoform 1 of Probable Xaa-Pro amino	Ja		Freisetzung von N-terminalen Amino	Posttranslationale P
13	I-1-E19	R119.7 (rnp-8); <i>RNP (RRM RNA binding domai</i>	Nein	<i>RNP (RRM RNA binding domain) containi</i>		Genexpression
14	I-1-E20	C55C2.2 (ssp-19); <i>Sperm Specific family, class</i>	Nein			Unbekannte Funktio
15	I-1-F01	T28F2.7 (acd-5); Isoform 1 of Amiloride-sensit	Ja	Säureempfindliches Degenerin	Kationen-Kanal mit hoher Affinität fü	Kanal- und Transpor
16	I-1-F03	T28F2.8 (col-51); Collagen alpha-1(I) chain	Ja	Kutikulakollagen	spezifisch für Knorpelgewebe	Strukturproteine
17	I-1-F11	D1037.4 (rab-8); Ras-related protein Rab-8B	Ja	Rab verwandtee Protein der Ras-GTPase	Schlüsselregulatoren des intrazellulä	Signaltransduktion
18	I-1-G13	F56A6.2 (hum-7); Isoform 2 of Myosin-Ixa	Ja	unkonventionelle schwere Kette des Myc	Myosine sind Aktin-basierte Motor-n	Signaltransduktion
19	I-1-G16	Y23H5A.4 (spe-47); <i>defective Spermatogenesi</i>	Nein	Einziges <i>C. elegans</i> Homolog des Säugetier-Typ-II-Melanom-Antigen		Unbekannte Funktio
20	I-1-G24	F40E3.2 (mage-1); Melanoma-associated anti	Ja		hemmt die Zellzyklus-Progression un	Zellzykluskontrolle
21	I-1-H03	T12F5.3 (glh-4); Isoform 1 of Probable ATP-de	Ja	mögliche Keimbahn-RNA-Helikase	Mögliche Funktion bei Keimzellentwi	Genexpression
22	I-1-H10	R12E2.15; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktio
23	I-1-H12	C18E3.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktio
24	I-1-H17	C32E8.1; E3 ubiquitin-protein ligase TRIM23	Ja		E3 ubiquitin-protein ligase	Proteostase
25	I-1-H18	C18E3.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktio
26	I-1-H21	C32E8.3; Tubulin polymerization-promoting pr	Ja		Mikrotubulbündel-Bildung	Strukturproteine
27	I-1-H24	C18E3.7 (ppw-1); Isoform 2 of Protein argona	Ja	PAZ (PIWI/Argonaut/Zwille) / PIWI-Dom	RNA-vermitteltes Gen-Silencing (RNA	Genexpression
28	I-1-I11	Y95B8A.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktio
29	I-1-I20	F32B5.8 (cpz-1); Cathepsin Z	Ja	Homolog von Cathepsin z-like Cystein-Pr	Carboxy-monopeptidase / Carboxy-E	Posttranslationale P
30	I-1-I23	Y95B8A.8; Isoform 1 of Zinc finger RNA-bindin	Ja		möglicherweise an posttranskription	Genexpression

Abbildung 13: Ausschnitt aus der Excel-Tabelle der auffälligen RNAi-Klone aus der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse.

Alle RNAi-Klone, die die Aggregation von Luc::GFP positiv oder negativ beeinflussten, wurden in einer Tabelle katalogisiert (Abbildung 13). Anschließend wurden Sequenzbezeichnung und Name unter Anmerkungen hinzugefügt. Mittels der Online-Datenbank www.wormbase.org wurde ermittelt, ob es ein Säugerortholog zum entsprechenden *C. elegans*-Gen gibt und welche Funktionen im Wurm bekannt sind. Mittels der Protein-Datenbank www.uniprot.org wurden die Funktionen des Säugerhomologs ermittelt. Um diese Auswertung abzuschließen wurden die Klone, falls ihre Funktion bekannt war, in eine von neun verschiedenen funktionellen Gruppen eingeordnet. Die vollständige Liste aller gefundenen Modulatoren findet sich im Anhang (siehe 7.4)

Identifizierte Gene, die ein Säugerhomolog aufwiesen, waren besonders interessant, da sie in späteren Studien auch ins Säugersystem übertragen werden könnten. Tatsächlich wiesen 251 der gefundenen Kandidaten ein bekanntes Säugerhomolog auf (70,90 %, Abbildung 14 A). RNAi-Klone, deren kodierten Proteine eine bekannte Funktion hatten, waren wiederum von Interesse, da sie sich zumeist einem bestimmten Stoffwechselweg zuordnen ließen. Dabei hatten 69,49 % aller identifizierten Klone eine bekannte Funktion Diese unterteilten sich in neun verschiedene funktionelle Gruppen. Die größte Gruppe stellten Gene / Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt waren (25,61 %). Einen geringeren Anteil bildeten Gene / Proteine, die mit der Genexpression assoziiert wurden (23,17 %), weil sie Teil von Transkription, mRNA-Prozessierung oder der Proteinbiosynthese sind. Gene / Proteine der posttranslationalen

Protein-Modifikation (15,04 %) und Strukturproteine (12,20 %) waren häufig vertreten. Kleinere Gruppen bildeten Kanal- und Transportproteine (8,94 %), Gene der Proteostase (6,91 %), der Zellzyklus-Kontrolle (3,66 %) oder der DNA-Reparatur bzw. Replikation (2,03 %). Auffällig war, dass nur ein ganz geringer Teil der gefundenen Kandidaten laut Literatur an der Proteostase beteiligt ist (6,91 %).

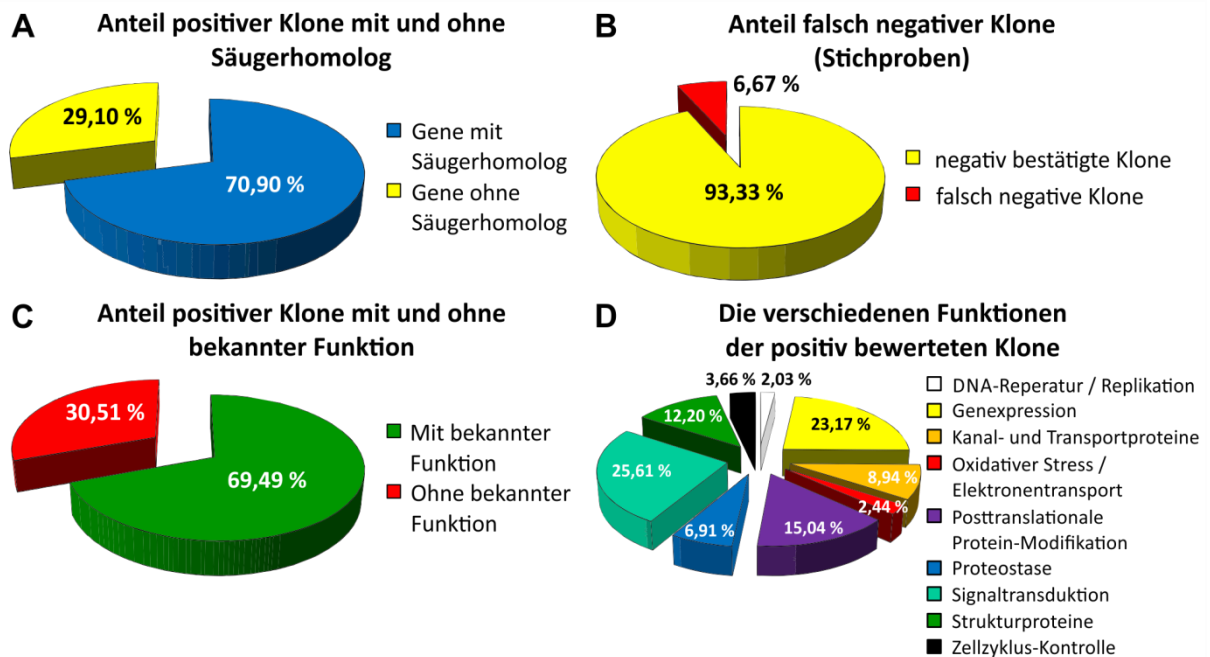


Abbildung 14: Auswertung der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse in *C. elegans*: **A.** Anteil positiver Klone mit und ohne Säugerhomolog (n = 359). **B.** Anteil falsch negativer Klone (Stichprobe, n = 90). **C.** Anteil positiver Klone mit und ohne bekannter Funktion (n = 359). **D.** Die verschiedenen Funktionen der positiv bewerteten Klone (n = 246).

Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass nicht jedes Gen, das in der Hochdurchsatz-RNAi-Analyse gefunden wurde, auch wirklich einen direkten Einfluss auf die Stabilität von Proteinen haben muss. Schaltet man ein essentielles Gen durch RNAi aus, hat dies schwerwiegende Folgen für die Physiologie des Wurms, was auch sekundär und damit indirekt die Aggregation von Proteinen beeinflussen kann. Diese falsch-positiven Treffer galt es in nachfolgenden Studien auszuschließen.

3.1.2. Weitere Charakterisierung der neuen Modulatoren der Proteostase

Um neue Modifikatoren der Proteinstabilität aus der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse zu bestätigen und näher zu charakterisieren, wurden bestimmte Kandidaten ausgewählt und in anderen Wurmmodellen, in denen sich Einflüsse auf die Proteostase beobachten lassen, herunterreguliert, um dort den Einfluss dieser Manipulation zu untersuchen (Abbildung 15).

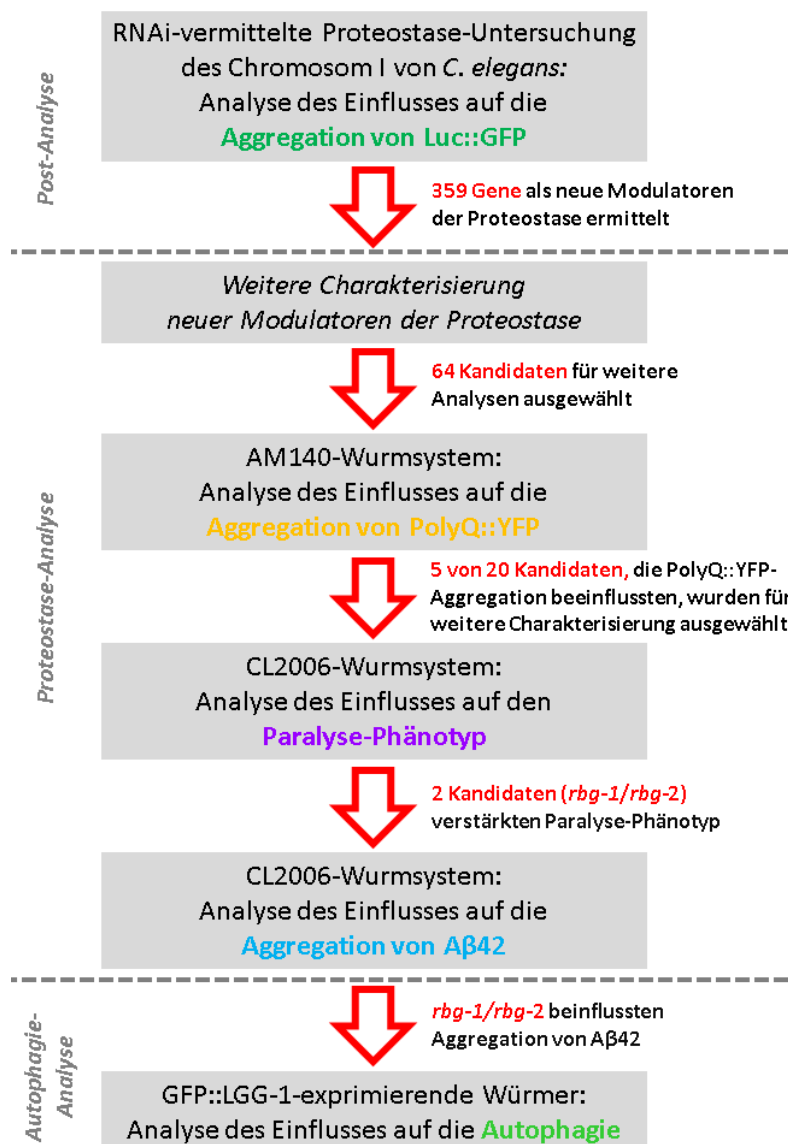


Abbildung 15: Diagramm der näheren Charakterisierung ausgewählter neuer Modulatoren der Proteinstabilität in verschiedenen *C. elegans*-Modellsystemen.

3.1.2.1. *Nähere Beschreibung der Proteostase-beeinflussenden Faktoren mittels Untersuchung von PolyQ::YFP-Aggregation in AM140*

Um die aus der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse ausgewählten Kandidaten näher zu charakterisieren, wurden diese in einem Polyglutamin(PolyQ)-Wurmmodell (AM140-Stamm) untersucht. Dieser Wurmstamm exprimiert ein Polypeptid von 35 Glutaminresten, das an gelb-fluoreszierendes Protein fusioniert ist (P_{unc-54}::Q35::YFP). Dieses Konstrukt aggregiert altersabhängig in den Muskelzellen und kann durch eine veränderte Proteostase im Aggregationsgrad verändert werden. Während Luc::GFP schon allein durch den Hitzestress aggregieren kann und somit ein zweiter Stressfaktor einen viel geringeren Einfluss braucht, um die Aggregation von Luc::GFP zu beeinflussen, ist das PolyQ-Reporterprotein nicht so einfach in seiner Aggregation zu beeinträchtigen, da PolyQ erst im Laufe der Zeit durch die Alterung des Wurms aggregiert (Morley *et al.*, 2002). Gene / Proteine, die hier eine Veränderung der Aggregation von PolyQ::YFP verursachten, bestätigten den Einfluss der ausgewählten Kandidaten auf die Proteostase.

Zusätzlich zu Klonen, die durch die Hochdurchsatz-RNAi-Analyse gefunden wurden, wurden hier weitere Gene untersucht. Die ausgewählten Gene aus der Hochdurchsatzanalyse und die zusätzlichen Kandidaten wurden im AM140-Wurmsystem nacheinander mittels RNAi ausgeschaltet und anschließend wurde die Veränderung der Aggregation von PolyQ35::YFP nach jeder Herunterregulation fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 16). Jeder RNAi-Kandidat wurde dabei mit eV als Negativkontrolle abgeglichen. Tabelle 18 zeigt die hier untersuchten RNAi-Klone von Chromosom I, deren Ergebnisse aus der vorrangegangenen Analyse und der Zusammenfassung nach zwei Durchgängen im AM140-Wurmsystem. Rot markierte Kandidaten waren in dieser Analyse auffällig.

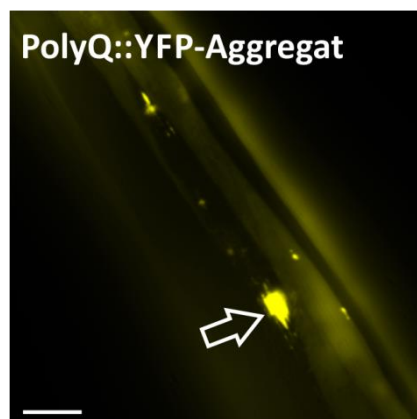


Abbildung 16: AM140-Würmer exprimieren ein Polypeptid von 35 Glutaminresten, das an gelb-fluoreszierendes Protein fusioniert ist: Fluoreszenz-Aufnahme einer Muskelzelle, PolyQ35::YFP aggregiert altersabhängig im Wurm (weißer Pfeil, Maßstab = 10 µm).

Tabelle 18: Im AM140-Wurmsystem untersuchte RNAi-Klone des Chromosom I
(+ = Verstärkung der Aggregation, / = keine Effekte, - = Verminderung der Aggregation)

RNAi-Bibliothek	Bezeichnung	Ergebnisse aus RNAi-Hochdurchsatzanalyse	Ergebnisse aus Analyse von PolyQ::YFP
I-1-D05	K03E5.1	+	/
I-1-D16	E01A2.10	++	-
I-1-E08	F23C8.8	+	/
I-1-H03	glh-4	+	/
I-1-H17	C32E8.1	++	/
I-1-H21	C32E8.3	+	/
I-1-H24	ppw-1	±	+?
I-1-H24	ppw-1	±	/
I-1-I20	cpz-1	++	+
I-1-I23	Y95B8A.7	-	+
I-1-L23	C50F2.1	+++	-
I-1-M23	gsa-1	++	/
I-1-P01	T20F5.6	/	±
I-1-P03	T20F5.7	++	±
I-2-C23	C44E4.5	++	/
I-2-F14	C06A5.8	/	++
I-2-F16	C06A5.9	/	+/-
I-2-G02	fnm-1	+	/
I-2-I02	B0261.6	+	-
I-2-M21	F28B3.1	+	/
I-2-N08	chn-1	++	+
I-2-O01	F28B3.4	+	+
I-2-P02	T08B2.5	+	/
I-3-D06	wdr-23	+	+
I-3-E16	gpc-2	+	/
I-3-F12	rlbp-1	+	+
I-3-G16	E02D9.1	+	+
I-3-J18	eat-5	+	/
I-3-J22	F13G3.10	+	/
I-3-K10	C55B7.10	+	/
I-3-L09	F55D12.2	+	/
I-3-L10	F52A8.6	+	±
I-3-N16	rbg-2	-	+
I-3-O01	F57B10.9	+	/
I-3-O03	dad-1	+	±
I-3-P10	dod-18	+	+
I-3-P12	C54G4.7	+	/
I-4-A08	R05D11.6	++	/
I-4-A15	rme-8	+	++
I-4-A22	cfim-1	+	±
I-4-B01	F36F2.3	/	
I-4-B04	C36F7.2	+	/
I-4-C03	ins-18	+	?
I-4-D01	snx-3	±	?
I-4-G22	tin-13	+	/
I-4-I02	hlh-16	+	/
I-4-J11	lin-41	+	+
I-4-K09	F02E9.7	+	
I-4-K10	F29D10.2	/	+
I-4-L01	F16A11.1	/	/
I-4-L09	C17E4.3	/	/
I-4-L12	hrdl-1	+	±
I-4-L15	C17E4.6	+	/
I-4-L21	nkb-1	+	/
I-4-M01	unc-120	+	±
I-4-M14	unc-29	±	±
I-4-O01	K02B12.6	+?	/
I-5-A07	T24D1.2	/	/
I-5-A09	T24D1.3	/	±
I-5-B08	aars-2	+	+

Im ersten Durchgang wurde für 31 der 64 untersuchten Kandidaten gezeigt, dass diese die Aggregation von PolyQ::YFP beeinflussten. In der Wiederholung verblieben noch 20 Klone als auffällig. Von diesen 20 Kandidaten wurden fünf ausgewählt, die näher charakterisiert werden sollten, da sie eine interessante Funktion und / oder eine andere bemerkenswerte Eigenschaft aufwiesen (Abbildung 17): PON2 / *poml-3* (*PON [paraoxonase] and MEC- 6 Like*), B0061.6 (unbekannte Funktion), *rbg-1* (*RAB GAP Related 1*), *rbg-2* (*RAB GAP Related 2*), und FHAD1 (*Forkhead-associated [FHA] Phosphopeptide Binding Domain-Homolog*).

Die Herunterregulation von PON2 / *poml-3* und B0261.6 verringerten die Aggregation von PolyQ::YFP im Vergleich zu eV (nicht gezeigt). *Rbg-1* und *rbg-2* erhöhten die Anzahl der Aggregate des Konstrukts (Abbildung 17). FHAD1 zeigte den deutlichsten Einfluss, was durch die sehr starke Akkumulation von Aggregaten deutlich wurde (nicht gezeigt).

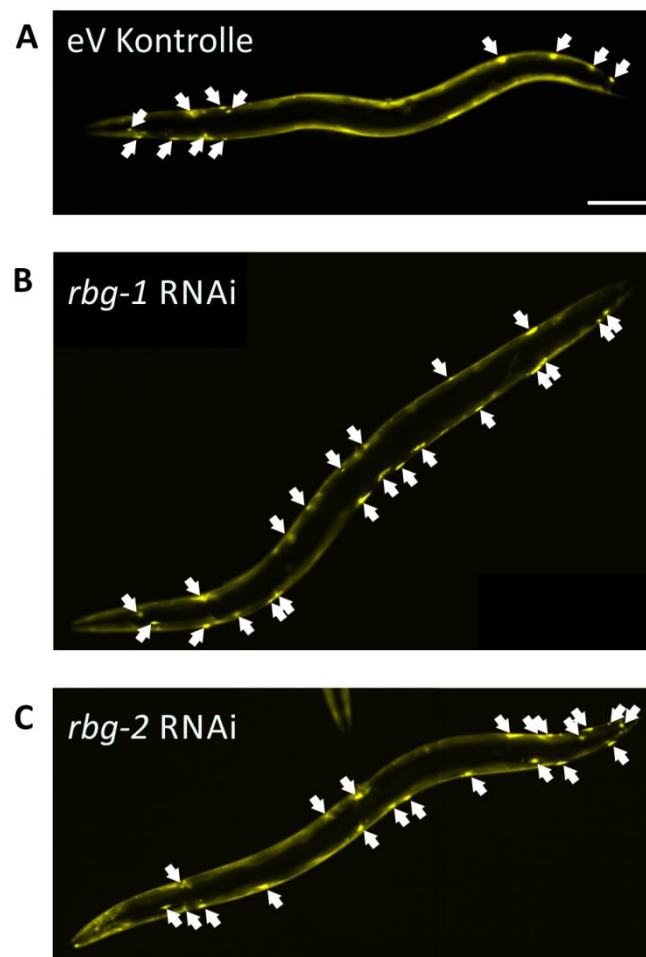


Abbildung 17: Veränderte Aggregation von PolyQ35::YFP nach Herunterregulation verschiedener Gene mittels RNAi (weiße Pfeile = Aggregate, Maßstab = 100 μ m):
A. eV-Kontrolle **B. + C.** Herunterregulation von *rbg-1* und *rbg-2* erhöhten die Anzahl von Aggregaten.

Tabelle 19: Nähere Charakterisierung ausgewählter RNAi-Klone, die die Aggregation von PolyQ35::YFP nach Herunterregulation beeinflussten

Nummer (Ahringer-Bibliothek)	Gen	Name	Wormbase.org	Uniprot.org	Quellen	Gruppe
I-1D16	E01A2.10	<i>PON [Paraoxonase] and MEC- 6 Like (poml-3) /</i> humanes Homolog PON2 (<i>Serum Paraoxonase / Arylesterase 2 Isoform 1</i>)	http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00077701?query=E01A2.10#04-9e16df8-10-e1	http://www.uniprot.org/uniprot/Q15165	(Balch <i>et al.</i> , 2008; Hetz, 2013; Kikis <i>et al.</i> , 2010; Peters <i>et al.</i> , 2012)	Oxidativer Stress / Elektronentransport
I-2I02	B0261.6	-	http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00015094?query=b0261.6#04-9e16df87a-10-e1	wurmspezifisch	-	-
X-6P08 (Chromosom X)	F20D1.6	<i>RAB GAP Related 1 (rbg-1)</i>	http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00004317?query=rbg-1#04-9e16df8-10-e1	http://www.uniprot.org/uniprot/Q15042	-	-
I-3-N16	T22C1.10	<i>RAB GAP Related 2 (rbg-2)</i>	http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00004318?query=rbg-2#04-9e16df8-10-e1	http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H2M9	-	Signaltransduktion
II-1A17 (Chromosom II)	C01B12.8	Humanes Homolog FHAD1 <i>Forkhead-associated (FHA) Phosphopeptide Binding Domain 1 (FHAD1)</i>	http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00015291?query=C01B12.8#04-9e16df8-10-e1	http://www.uniprot.org/uniprot/B1AJZ9	(Carlsson und Mahlapuu, 2002; Durocher und Jackson, 2002; Durocher <i>et al.</i> , 2000; Kaufmann und Knochel, 1996; Schroder und Kaufman, 2005)	-

Die Homologe der getesteten Gene und ihre Funktion sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Von besonderem Interesse waren dabei *rbg-1* und *rbg-2* (*RAB GAP Related 1+2*). *Rbg-1* mit der Sequenz X-6P08 findet sich auf dem X-Chromosom. Das *rbg-2*-Gen T22C1.10 ist auf Chromosom I lokalisiert. Das *rbg-1*-Säugerhomolog *Isoform 1 of RAB3 GTPase-activating Protein Catalytic Subunit* ist die regulatorische Untereinheit eines GTPase-aktivierenden Proteins, das spezifisch RAB GTPasen der RAB3-Unterfamilie reguliert. Das humane Ortholog von *rbg-2* ist *RAB3 GTPase-activating Protein Non-catalytic Subunit* und bildet die nicht-katalytische Untereinheit dieses RAB3GAP-Komplexes.

Da das in der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse genutzte RNAi-Plasmid von *rbg-2* aus der Ahringer-Bibliothek zu Beginn dieser Arbeit zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen in verschiedenen Experimenten führte und die Einflüsse nicht stringent nachvollziehbar waren, wurde ein neues RNAi-Plasmid kloniert (siehe 7.5). Die verstärkte Aggregation von PolyQ::YFP wurde mit diesem neuen Klon bestätigt und alle weiteren Experimente wurden anschließend mit diesem Plasmid durchgeführt.

Die Herunterregulation von PON2 / *poml-3*, FHAD1, B0261.6, *rbg-1* und *rbg-2* mittels RNAi hatte somit Einfluss auf die Hitzestress-vermittelte Aggregation von Luc::GFP in der Proteostase-Analyse und führte im AM140-Wurmsystem zu einer veränderten Aggregation von PolyQ::YFP. Im Folgenden sollen diese fünf Kandidaten im A β 42-exprimierenden Wurmstamm CL2006 näher charakterisiert werden.

3.1.2.2. **Weitere Charakterisierung der identifizierten Gene mittels Paralyse-Untersuchung in CL2006**

Um PON2 / *poml-3*, FHAD1, B0261.6, *rbg-1* und *rbg-2* weiter bezüglich ihrer Beeinflussung der Proteostase zu charakterisieren, wurde die Herunterregulation dieser Gene im CL2006-Wurmsystem betrachtet. Würmer dieses *C. elegans*-Stammes exprimieren humanes Beta-Amyloid 42 in ihrem Hautmuskelschlauch (P_{unc-54}::A β 42), das mit zunehmenden Alter oligomerisiert und aggregiert. Diese A β 42-Aggregate wirken im Muskel des Wurms toxisch und das führt nach einer gewissen Lebensspanne zu einem Paralyse-Phänotyp bei dem sich letztlich nur noch die Kopfreion bewegt (Cohen *et al.*, 2010). Durch eine Veränderung der Proteostase lassen sich die Aggregation von A β 42 und der Paralyse-Phänotyp beeinflussen. Die Würmer wurden nach Vollendung der Larvalentwicklung täglich auf Paralyse untersucht. An Tag 12 endete diese Analyse, da ab diesem Alter erste Alterserscheinungen auftreten, die keine Differenzierung zwischen RNAi-Effekt und altersrelevanten Veränderungen mehr zulassen.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Paralyse-Experimente mit PON2 / *poml-3*, FHAD1, B0261.6, *rbg-1* und *rbg-2*. Der RNAi-vermittelte Verlust von FHAD1 besaß keinen Einfluss auf die Paralyse im Vergleich zu den Kontrollwürmern (Abbildung 18 A). Die Herunterregulation von PON2 / *poml-3* führte zu einer interessanten Auswirkung auf den Paralyse-Phänotyp. In den ersten Tagen wurde die Paralyserate im Vergleich zu eV-behandelten Würmern zunächst verbessert, später allerdings paralyisierten die Würmer sehr rasch, sodass am Ende kein positiver Effekt beobachtet wurde (Abbildung 18 A). Die Herunterregulation mittels RNAi von B0261.6 verbesserte den Phänotyp der CL2006-Würmer über den gesamten Verlauf des Experiments (Abbildung 18 A). Auch zuvor konnte beim Verlust von B0261.6 eine geringere Aggregation von Luc::GFP und PolyQ::YFP festgestellt werden. Allerdings kann hier noch keine Aussage über einen Mechanismus gemacht werden, da über das Gen im Wurm noch nichts bekannt ist und auch bisher noch kein Säugerhomolog gefunden wurde. Somit bietet sich dieses Gen für zukünftige Untersuchungen seiner Funktion und seiner Wirkung auf die Proteostase an.

Die Paralyse-Experimente mit PON2 / *poml-3*, FHAD1 und B0261.6 wurden bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Im Verlauf der Experimente zeigte sich allerdings, dass bei dieser Temperatur viele Würmer aus der Gesamtpopulation entfernt werden mussten, da diese zahlreiche Phänotypen neben der Paralyse entwickelten. Die Expression von A β 42 im Hautmuskelschlauch stört die Fähigkeit Eier abzulegen, da auch die Muskeln der Geschlechtsorgane und des Eilege-Apparats von der Paralyse betroffen sind. Viele Würmer zeigten eine „*Protruding Vulva*“, bei der sich die weiblichen Geschlechtsorgane nach außen stülpen oder starben an einem „*Bag of Worms*“. Dabei können die betroffenen Muttertiere die Eier nicht legen und die Nachkommen schlüpfen noch im Körper. Ab einer gewissen Größe der Larven stirbt das Muttertier. Wird das Paralyse-Experiment allerdings bei einer Temperatur von nur 15°C durchgeführt, beschränken sich diese für die Analyse problematischen Phänotypen wie „*Protruding Vulva*“ und „*Bag of Worms*“ auf einen weitaus geringeren Anteil der untersuchten Wurmpopulation.

Der RNAi-vermittelte Verlust von *rbg-1* zeigte einen verstärkten Paralyse-Phänotyp, ab Tag acht war dieser Effekt signifikant (Abbildung 18 B). Auch die Herunterregulation von *rbg-2* erhöhte den prozentualen Anteil paralysierter Würmer, allerdings weniger stark als *rbg-1*, denn erst ab Tag zehn waren hier die Effekte signifikant (Abbildung 18 C). Die erhöhte Paralyserate nach RBG-1 und RBG-2-Verlust ist ein indirekter Hinweis, dass die Aggregation des humanen A β 42 im Hautmuskelschlauchs dieses Wurmstamms verstärkt wurde. Im folgenden Experiment soll gezeigt werden, dass die Herunterregulation von *rbg-1* und *rbg-2* zu mehr A β 42-Aggregaten führt.

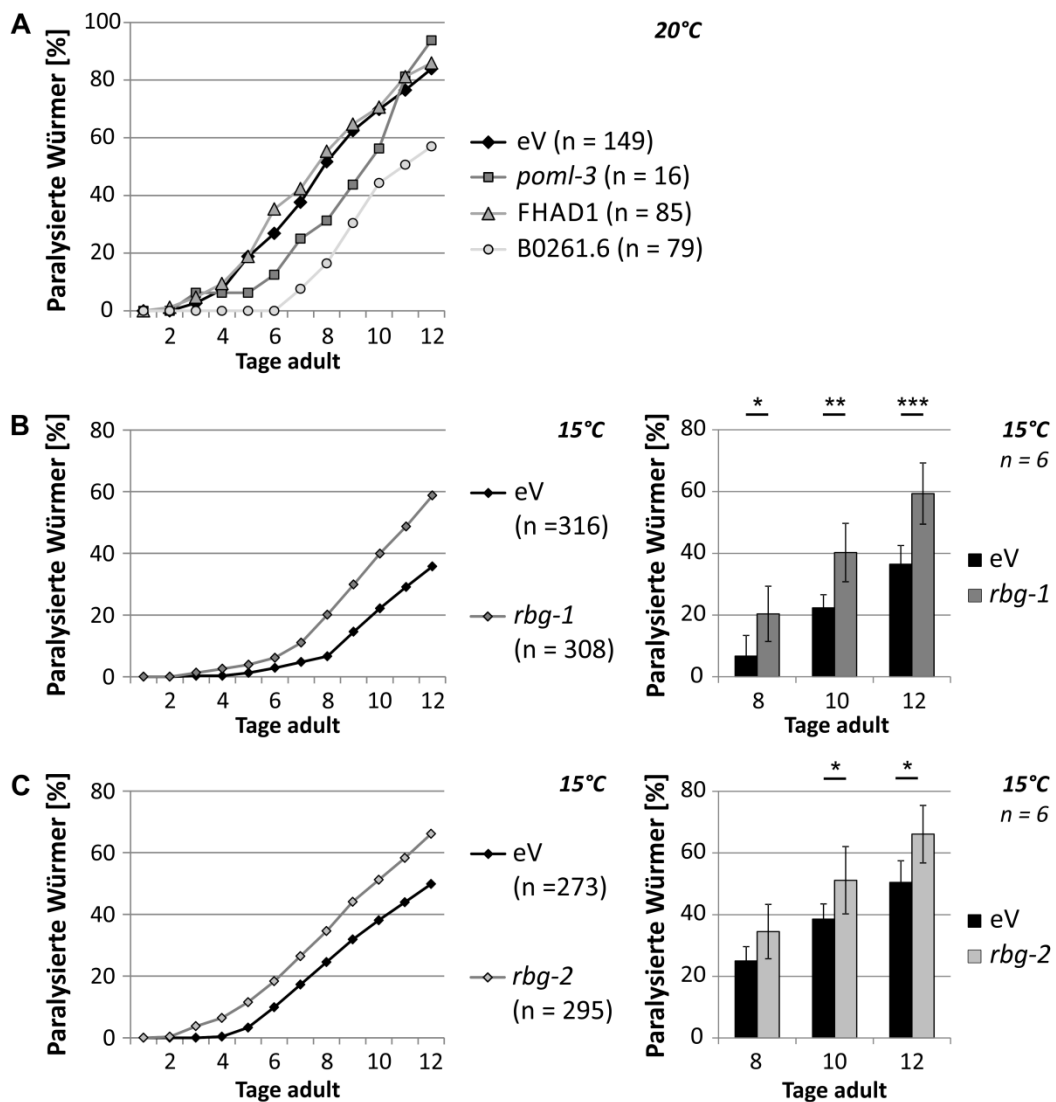


Abbildung 18: Neue Modulatoren der Proteostase verändern die Paralyse von CL2006-Würmern: A β 42-Aggregation im Muskel von CL2006-Würmern führt zu einem Paralyse-Phänotyp (Versuche bei 15°C und 20°C). **A.** Im Vergleich zur eV-Kontrolle zeigte FHAD1-Verlust keinen Effekt auf die Paralyse (n = 85). Die Herunterregulation von PON2 / *poml-3* zeigte erst eine Verbesserung dieses Phänotyps, die Werte näherten sich dann aber wieder dem Niveau der Kontrolle an (n = 16). B0261.6-Verlust erniedrigte den prozentualen Anteil paralyzierter Würmer (n = 79). **B.** Die Herunterregulation mittels RNAi von *rbg-1* zeigte einen verstärkten Paralyse-Phänotyp während einer Versuchsdauer von 12 Tagen (eV: n = 316, *rbg-1*: n = 308). Ab Tag 8 war die Verstärkung der Paralyse signifikant (n = 6; * P \leq 0,05, ** P \leq 0,01 und *** P \leq 0,01, *One Way Anova*). **C.** Der Verlust von RBG-2 zeigte ebenfalls eine erhöhte Paralyse, allerdings waren diese Effekte nicht ganz so stark wie bei *rbg-1* im Verlauf von 12 Tagen (eV: n = 273, *rbg-2*: n = 295). Der Unterschied in der Paralyserate zwischen eV und RBG-2-Verlust war erst ab Tag 10 signifikant (n = 6, * P \leq 0,05, *One Way Anova*).

3.1.2.3. *Nähere Beschreibung der Proteostase-beeinflussenden Faktoren mittels Untersuchung der Aggregation von Thioflavin S-gefärbten A β 42-Aggregaten in CL2006*

Der RNAi-vermittelte Verlust von RBG-1 und RBG-2 beschleunigte die Paralyse der A β 42-exprimierenden Würmer. Um diesen Einfluss mit der Zahl der A β 42-Aggregate zu korrelieren, können diese mit Thioflavin S gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden (Morita *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006).

Abbildung 19 A zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines repräsentativen drei Tage adulten Wurms nach eV-Kontrollbehandlung. Die Kopfreion wurde als definierter Bereich bestimmt und die Anzahl der Aggregate, die sich darin befand, ermittelt (weißer Kasten). Die Herunterregulation von *rbg-1* und *rbg-2* vermehrt die Anzahl der A β 42-Aggregate im Vergleich zu den eV-Kontrollwürmern (Abbildung 19 B + C). Dies wurde auch in der Positivkontrolle *atg-7* nachgewiesen. ATG-7 ist ein essentielles Protein der Autophagie und zeigt die katalytische Aktivität einer E1-Ubiquitin-Ligase (Tanida *et al.*, 1999; Tanida *et al.*, 2001).

Um auszuschließen, dass die verstärkte Akkumulation von Thioflavin S-positiven Aggregaten und die daraus resultierende veränderte Paralyserate nach Verlust von RBG-1 / RBG-2 durch erhöhte A β 42-Spiegel verursacht wurden, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt und gezeigt, dass die Expression von A β 42 durch die Manipulation mittels RNAi nicht beeinflusst wurde (Abbildung 19 D). Die erfolgreiche Herunterregulation von *rbg-1*, *rbg-2* und *atg-7* wurde ebenfalls mittels RT-PCR-Analyse bestätigt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der RNAi-vermittelte Verlust von RBG-1 und RBG-2 die Aggregation von Luc::GFP nach Hitzestress und die altersabhängige Aggregation von PolyQ::YFP verstärkt. Darüber hinaus zeigen A β 42-exprimierende Würmer nach Herunterregulation von *rbg-1* und *rbg-2* früher eine Paralyse als die Kontrollwürmer, was auf eine geförderte Aggregation dieses Amyloid zurückzuführen ist. Anschließend soll nun gezeigt werden durch welchen Mechanismus der Verlust dieser beiden Gene / Proteine zu einer veränderten Proteostase führt.

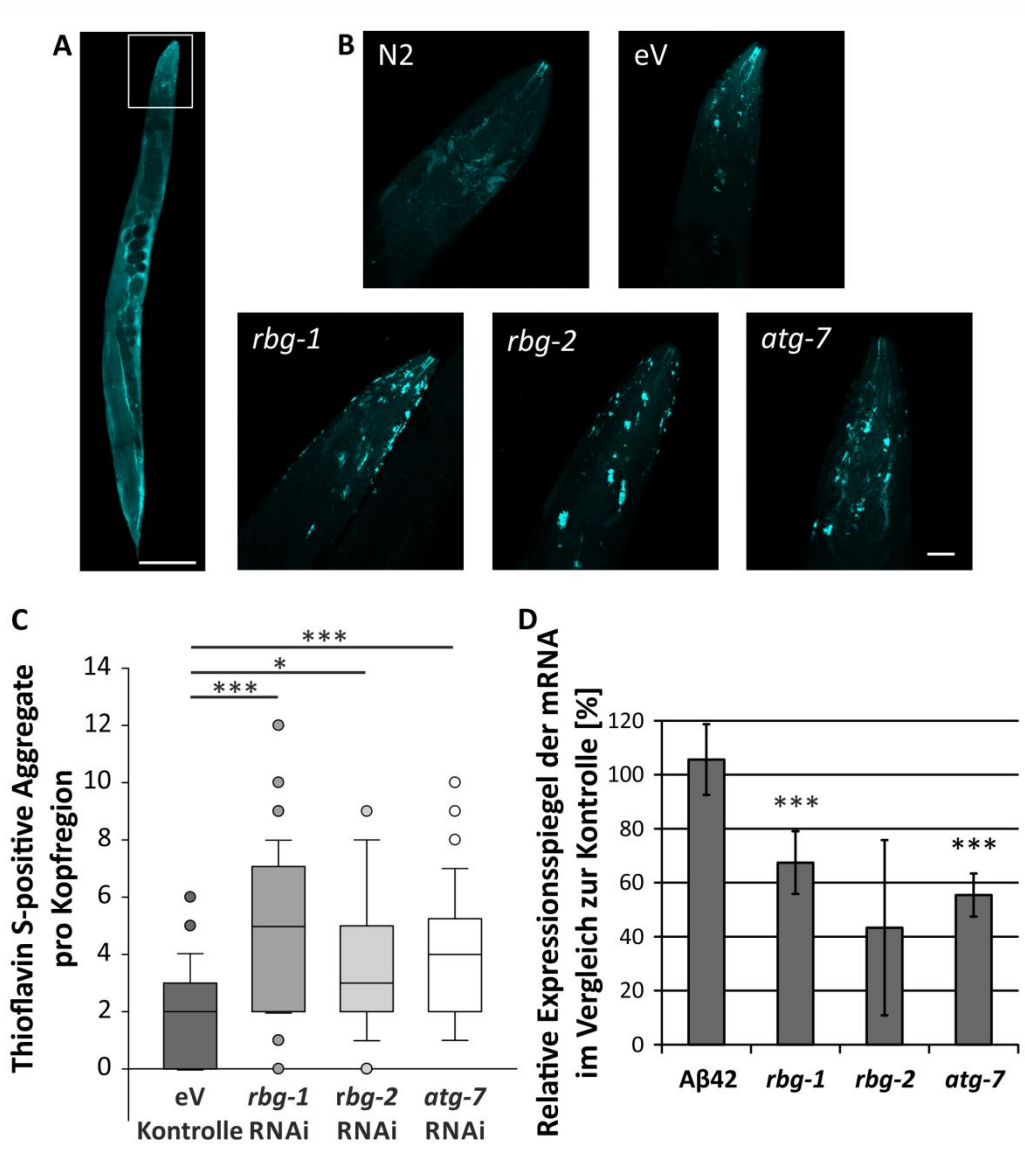


Abbildung 19: RNAi-vermittelter RBG-1 und RBG-2-Verlust fördert die Aggregation von Aβ42 in CL2006-Würmern: Aβ42-Aggregate, die sich in den Muskeln des Wurmstammes CL2006 bilden, wurden mit Thioflavin S-Färbung fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. **A.** Aufnahme eines drei Tage adulten repräsentativen CL2006-Wurms nach eV-Behandlung: Kopffregion stellt Bereich der Auswertung dar (weißer Kasten, Maßstab = 100 μm). **B.** Aufnahmen des definierten Analyse-Bereichs: N2-Wildtyp-Würmer dienen zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrunds. CL2006-Würmer nach eV-Behandlung dienen als Negativkontrolle. Die Aβ42-Aggregation wurde durch *rbg-1* und *rbg-2* Herunterregulation verstärkt. Der RNAi-vermittelte Verlust von ATG-7 diente als Positivkontrolle (Maßstab = 20 μm). **C.** *rbg-1* und *rbg-2* Herunterregulation erhöhte die Anzahl der Aggregate in der Kopffregion im Vergleich zu eV signifikant, dabei wirkte der RNAi-vermittelte Verlust von RBG-1 stärker als der von RBG-2. Die Herunterregulation von *atg-7* diente als Positivkontrolle (eV: n = 42, *rbg-1*: n = 45, *rbg-2*: n = 35, *atg-7*: n = 34; * P ≤ 0,05 und *** P ≤ 0,001, *t*-Test) **D.** RT-PCR-Analysen zeigten, dass die Herunterregulation der untersuchten Proteine keinen Einfluss auf die Expression von Aβ42 bewirkte (n = 3, Mittelwert ± Stabw) und dass die Spiegel der untersuchten Gene nach RNAi-Behandlung herunterreguliert waren (*rbg-1*: n = 4, *rbg-2*: n = 2, *atg-7*: n = 3, *** P ≤ 0,001, *t*-Test).

3.1.3. *Der RNAi-vermittelte Verlust von RBG-1 und RBG-2 inhibiert die Autophagie*

Nachdem gezeigt war, dass der Verlust von RBG-1 und RBG-2 die Aggregation von Proteinen verstärkt, sollte nun geklärt werden auf welchem Weg RBG-1 und RBG-2 die Proteostase beeinflussen. Interessanterweise wurden die Säugerhomologe RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in einer Analyse des autophagischen Netzwerks mit der Autophagie verbunden (Behrends *et al.*, 2010), sodass hier auch gezielt der Einfluss von RBG-1 und RBG-2 auf diesen intrazellulären Abbauweg untersucht wurde. Dazu wurde ein Wurmstamm verwendet, der ein GFP::LGG-1 exprimiert. LGG-1 ist das *C. elegans*-Ortholog von MAP1LC3 und ein Mitglied der ATG8-Proteinfamilie. Das Konstrukt erlaubt die Beobachtung von (prä)autophagosomalen Strukturen, da Mitglieder der ATG8-Proteinfamilie mit autophagosomalen Membranen assoziiert sind und diese hier durch ihre Markierung mit GFP fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. In den an der Oberfläche des Wurms gelegenen Saumzellen lassen sich durch dieses GFP::LGG-1-Konstrukt punktförmige (prä)autophagosomale Strukturen untersuchen (Melendez *et al.*, 2003).

Diese GFP::LGG-1-exprimierenden Würmer wurden nach RNAi-vermitteltem Verlust von RBG-1 und RBG-2 im letzten Larvenstadium entweder auf Kontroll-Agarplatten mit Bakterien (+Bakterien) oder über Nacht auf nahezu bakterienfreie Platten (-Bakterien, siehe Methoden 2.2.2.9) überführt (Abbildung 20). Auf den Platten, die nahezu ohne Bakterien waren, wurde somit über Nacht bei den Würmern Hunger induziert. Unter eV-Kontrollbedingungen wurde die Autophagie-Maschinerie durch diesen Hunger aktiviert und ließ sich in Form von (prä)autophagosomalen Strukturen beobachten (Abbildung 20 A). In *rbg-1* und *rbg-2* Herunterregulation mittels RNAi konnte diese Induktion der Autophagie nicht beobachtet werden. Die Zahl der (Prä)Autophagosomen in diesen Zellen ähnelte der Anzahl in den Kontrollzellen, die nicht gehungert hatten. *Bec-1* diente als Positivkontrolle. BECLIN-1 ist ein kanonischer Faktor der Autophagie (Funderburk *et al.*, 2010; Itakura *et al.*, 2008). Somit wurde gezeigt, dass die Herunterregulation von *rbg-1* und *rbg-2* die Proteostase durch eine verringerte Autophagie störte. Die Induktion dieses Abbauweges bleibt nach RNAi-vermittelter Herunterregulation der hier untersuchten Gene aus.

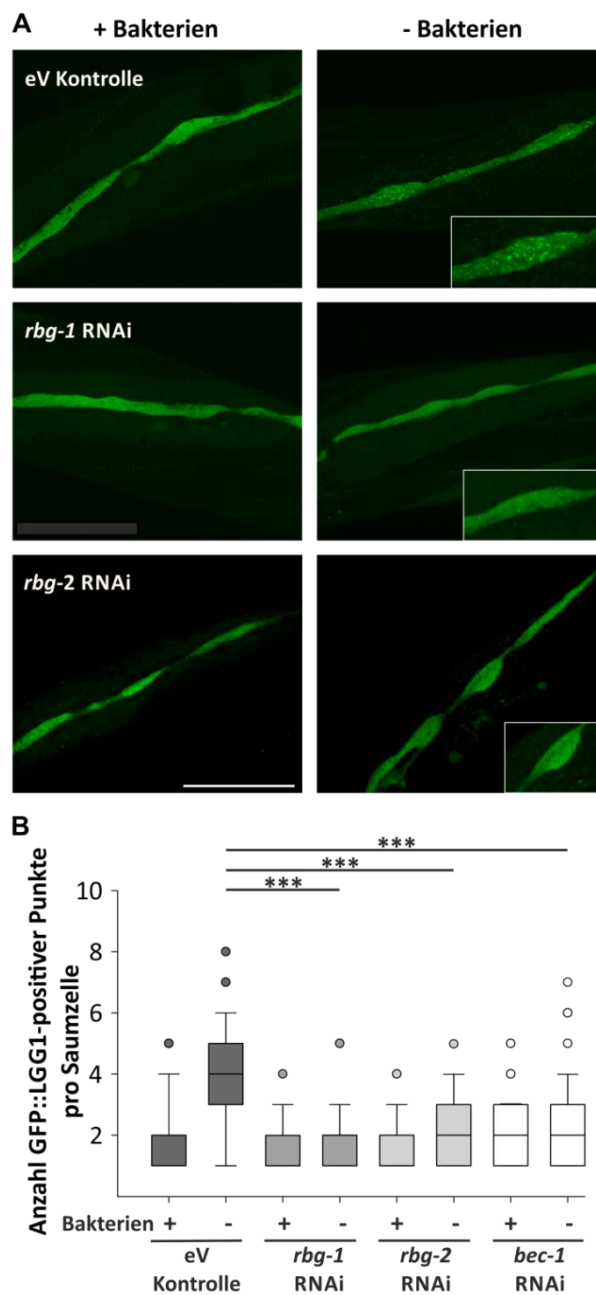


Abbildung 20: RNAi-vermittelter Verlust von RBG-1 und RBG-2 stört die Autophagie: In GFP::LGG-1-exprimierenden Würmer lassen sich (prä)autophagosomale Strukturen fluoreszenzmikroskopisch in Saumzellen darstellen. **A.** Waren die Würmer mit Nahrung gut versorgt, ließen sich keine Unterschiede in der Anzahl der (prä)autophagosomalen Strukturen in den untersuchten Zellen erkennen [+Bakterien]. Hungerten die Würmer über Nacht auf nahezu bakterienfreien Agarplatten bildeten sich bei der eV-Kontrolle vermehrt (Prä)Autophagosomen, bei *rbg-1* und *rbg-2* Herunterregulation blieb diese Vermehrung aus [-Bakterien], (Maßstab = 50 µm). **B.** Die Anzahl der GFP::LGG-1-positiven Punkte pro Saumzelle erhöhte sich nach Hunger über Nacht in der eV-Kontrolle. Diese Zunahme zeigte sich nicht beim RNAi-vermittelten Verlust von RBG-1 und RBG-2. Als Positivkontrolle diente *bec-1*-Herunterregulation. Die Unterschiede zwischen eV und *rbg-1*, *rbg-2* bzw. *bec-1* RNAi-Behandlung waren signifikant (eV: n = 58/64, *rbg-1*: n = 38/41, *rbg-2*: n = 33/40, *bec-1*: n = 48/42; *** P ≤ 0,001).

3.1.4. *Zusammenfassung der Ergebnisse im Wurmsystem*

Mit einer RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse in *C. elegans* wurden neue Modifikatoren der Proteinstabilität identifiziert und eine Auswahl dieser Faktoren wurde in verschiedenen Wurmstämmen auf ihren Einfluss auf die altersabhängige Aggregation von PolyQ35::YFP, die Effekte auf den Paralyse-Phänotyp in CL2006-Würmern und die Veränderung der Aggregation von Thioflavin S-gefärbten A β 42 untersucht. Der Verlust von RBG-1 und RBG-2 zeigte in diesen Experimenten eine veränderte Proteostase. Diese Beeinflussung des Proteostasenetzes konnte mithilfe eines Wurmstamms, der ein GFP::LGG-1-Reporter exprimiert, auf eine Störung der Autophagie zurückgeführt werden. Somit konnten *rbg-1* und *rbg-2* als neue Faktoren der Proteostase und der Autophagie identifiziert werden. Diese Erkenntnisse wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit in das Säugersystem übertragen.

3.2. Der RAB3GAP-Komplex im Säugersystem

Die RNAi-vermittelte Proteostase-Analyse in *C. elegans* führte zu der Identifikation von RBG-1 und RBG-2 als neue Faktoren der Proteostase und der Autophagie. Das humane Ortholog von RBG-1 ist RAB3GAP1 und das Ortholog von RBG-2 ist RAB3GAP2. Beide Untereinheiten bilden zusammen den heterodimeren *RAB3 GTPase-activating Protein*-Komplex, von dem bekannt ist, dass er die Umwandlung der GTP-gebundenen aktiven Form zur GDP-gebundenen inaktiven Form der RAB GTPase RAB3 stimuliert (Aligianis *et al.*, 2005; Aligianis *et al.*, 2006). Im Folgenden wurden nun die neuen Erkenntnisse aus *C. elegans* ins Säugersystem übertragen. Hierfür wurden RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in humanen Zellen herunterreguliert oder überexprimiert und die dadurch verursachten Veränderungen in der Autophagie untersucht. Für die folgenden Experimente wurden zwei verschiedene Zellsysteme verwendet, nämlich klonale, menschliche, embryonale Nieren-Zellen (*Human Embryonic Kidney 293 Cells* = HEK293a (Graham *et al.*, 1977)), sowie primäre, menschliche, fetale Lungen-Myofibroblasten (IMR90-Zellen; (Alborghetti *et al.*, 2010)).

3.2.1. Die Herunterregulation von RAB3GAP1/2 hemmt die Autophagie

Die Herunterregulation der Komponenten des heterodimeren RAB3GAP-Komplexes via RNAi zeigte Einfluss auf die Autophagie in Westernblot-Analysen von HEK293a-Zellen (Abbildung 21). In den Einzelherunterregulationen von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 akkumulierte mehr unlipidiertes LC3-I als in der Nonsense-Kontrolle (Abbildung 21 A+C). Der autophagische Flux von p62/SQSTM1 und LC3-II war allerdings nur geringfügig verändert, wenn jeweils nur RAB3GAP1 oder RAB3GAP2 herunterreguliert wurde. Die Herunterregulation der einzelnen Komponenten zeigte somit eine gestörte LC3-I-Lipidierung, allerdings resultierte dies nicht in einer gestörten autophagosomalen Biogenese.

Erst die Manipulation beider Komponenten RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte eine gestörte Autophagie. Beeinflusste man RAB3GAP1 und RAB3GAP2 gemeinsam (Abbildung 21 B) zeigte sich mehr LC3-I und zusätzlich eine gestörte autophagische Aktivität, die sich an dem verringerten autophagischen Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 zeigte (Abbildung 21 D). Da nur die Herunterregulation beider Komponenten des heterodimeren RAB3GAP-Komplexes eine veränderte Autophagie zeigte, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch die Autophagie durch Doppelherunterregulation von RAB3GAP1/2 untersucht.

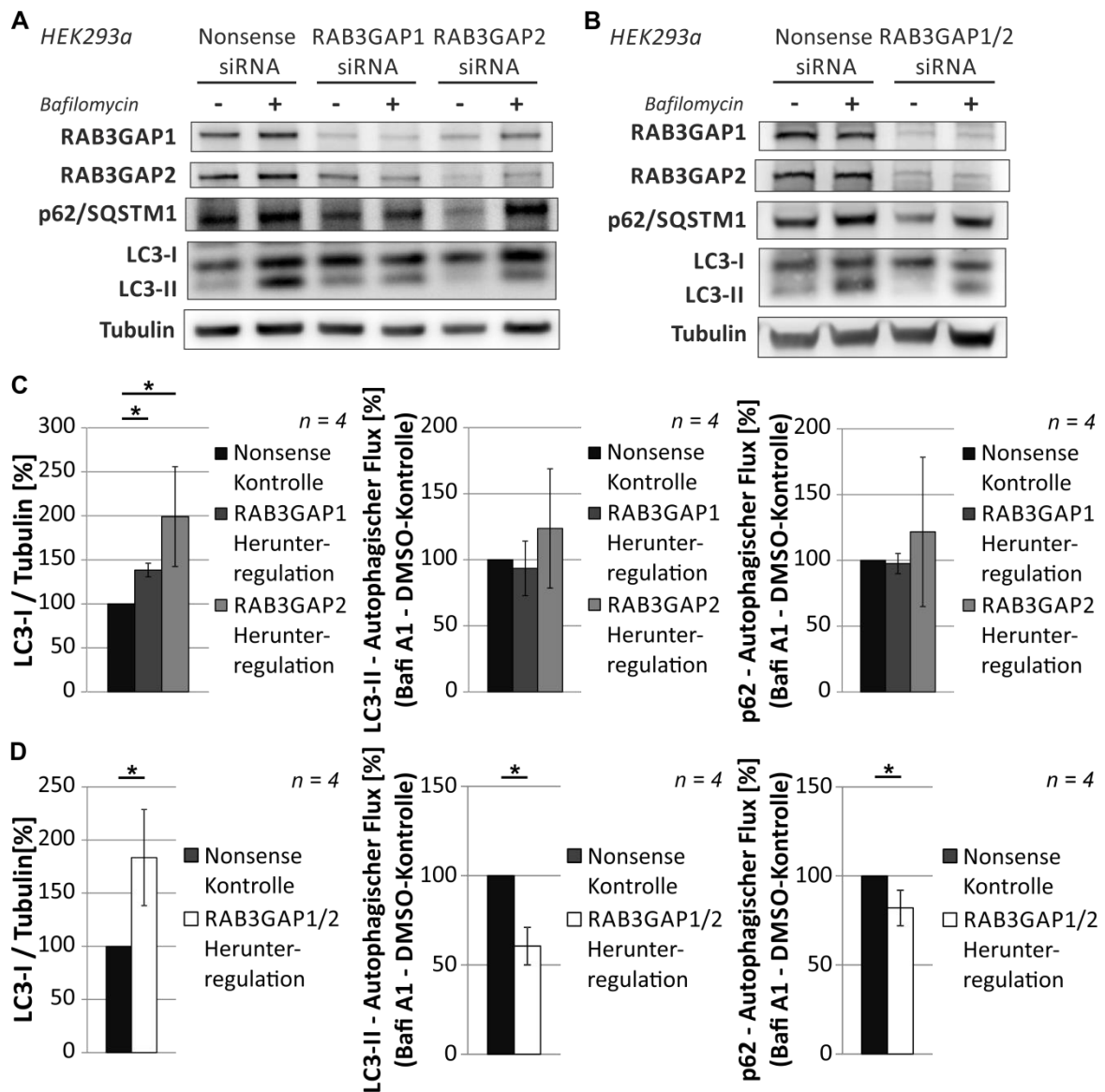


Abbildung 21: Herunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen, die mit der angegebenen siRNA transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Tubulin diente als Ladekontrolle): **A.** Immunoblot-Analyse nach Einzelherunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2: Es ließ sich eine erhöhte Akkumulation von LC3-I im Vergleich zur Kontrolle beobachten. **B.** Immunoblot-Analyse nach Doppelherunterregulation von RAB3GAP1/2: Es konnte eine Akkumulation von LC3-II beobachten werden und der autophagische Flux von p62/SQSTM1 und LC3-II war deutlich verringert nach RAB3GAP1/2-Herunterregulation. **C.** Statistische Auswertung der Einzelherunterregulationen von RAB3GAP1 und RAB3GAP2: die Menge an LC3-I/Tubulin war signifikant erhöht, aber der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 war nicht verändert nach Herunterregulation (Statistik: n = 4; Mittelwert ± Stabw; * P ≤ 0,05; t-test). **D.** Statistische Auswertung der Doppelherunterregulation von RAB3GAP1/2: die Menge an LC3-I/Tubulin war signifikant erhöht und der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 war signifikant verringert in der Herunterregulation von RAB3GAP1/2 (Statistik: n = 4; Mittelwert ± Stabw; * P ≤ 0,05; t-test).

Auch in humanen, primären IMR90-Fibroblasten waren die in der klonalen Linie gezeigten Effekte zu beobachten (Abbildung 22). In der Immunoblot-Analyse war nach Doppelherunterregulation von RABGAP1/2 die Akkumulation von unlipidiertem LC3-I deutlich erkennbar (Abbildung 22 A+B). Auch der verminderte autophagische Flux von p62/SQSTM1 und LC3-II war in IMR90-Fibroblasten zu sehen (Abbildung 22 C+D). Die Herunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in IMR90-Zellen bestätigt die Ergebnisse aus den klonalen HEK293a-Zellen. Die Herunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in klonalen HEK293a-Zellen und in primären IMR90-Fibroblasten stört die autophagosomale Biogenese.

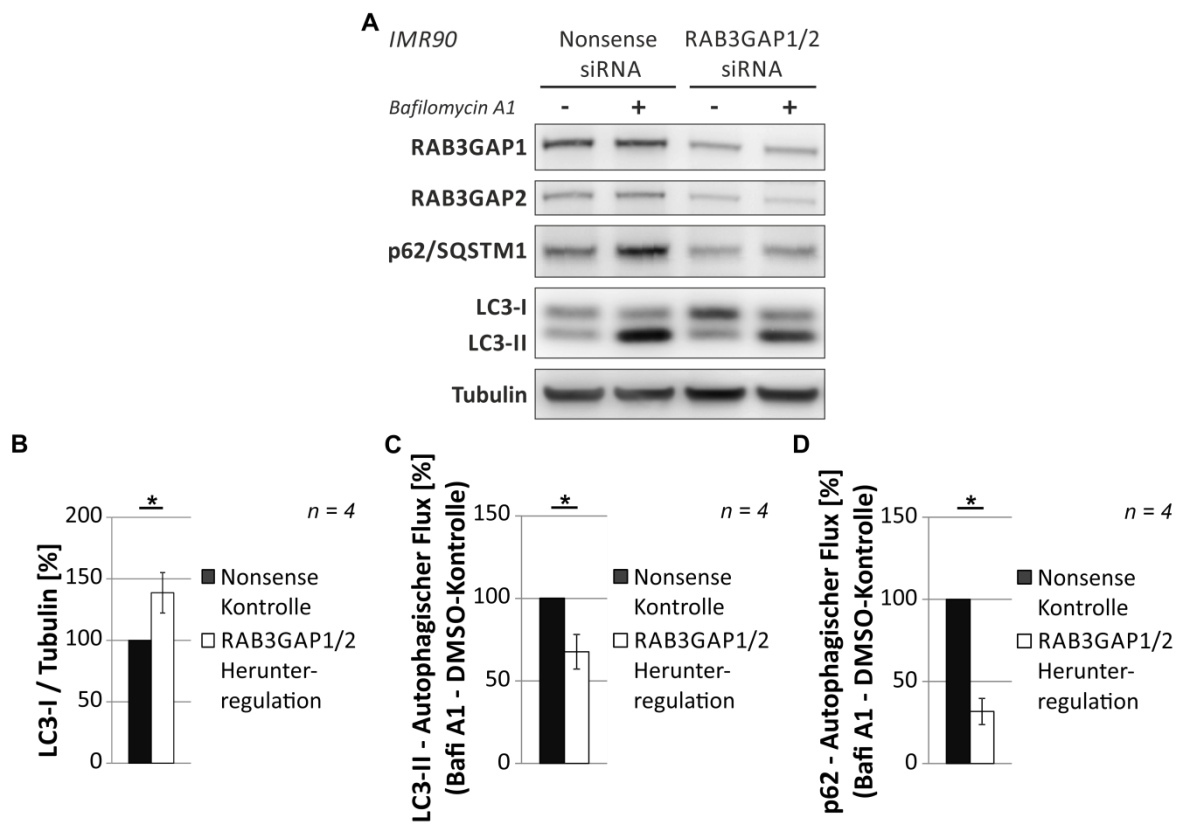


Abbildung 22: Herunterregulation von RAB3GAP1/2 zeigte Effekte auf die Autophagie in IMR90-Zellen, die mit der angegebenen siRNA transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Tubulin diente als Ladekontrolle; *Quelle:* Spang, Feldmann *et al.* 2014): **A.** Immunoblot-Analyse nach Doppelherunterregulation von RAB3GAP1/2: Es ließ sich eine Akkumulation von LC3-I beobachten und der autophagische Flux von p62/SQSTM1 und LC3-II war deutlich vermindert nach Herunterregulation. **B.-D.** Statistische Auswertung der Doppelherunterregulation von RAB3GAP1/2: die Menge an LC3-I/Tubulin war signifikant erhöht und der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 war vermindert im Vergleich zur Kontrolle (Statistik: n = 4; Mittelwert ± Stabw; * P ≤ 0,05; *t-test*).

3.2.2. *Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Herunterregulation von RAB3GAP1/2*

In Western-Blot-Analysen zeichnete sich die Herunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 durch eine Akkumulation von unlipidiertem LC3-I und einem verminderten autophagischen Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 aus. Im Folgenden sollen diese Effekte fluoreszenzmikroskopisch in HEK293a- und IMR90-Zellen dargestellt werden.

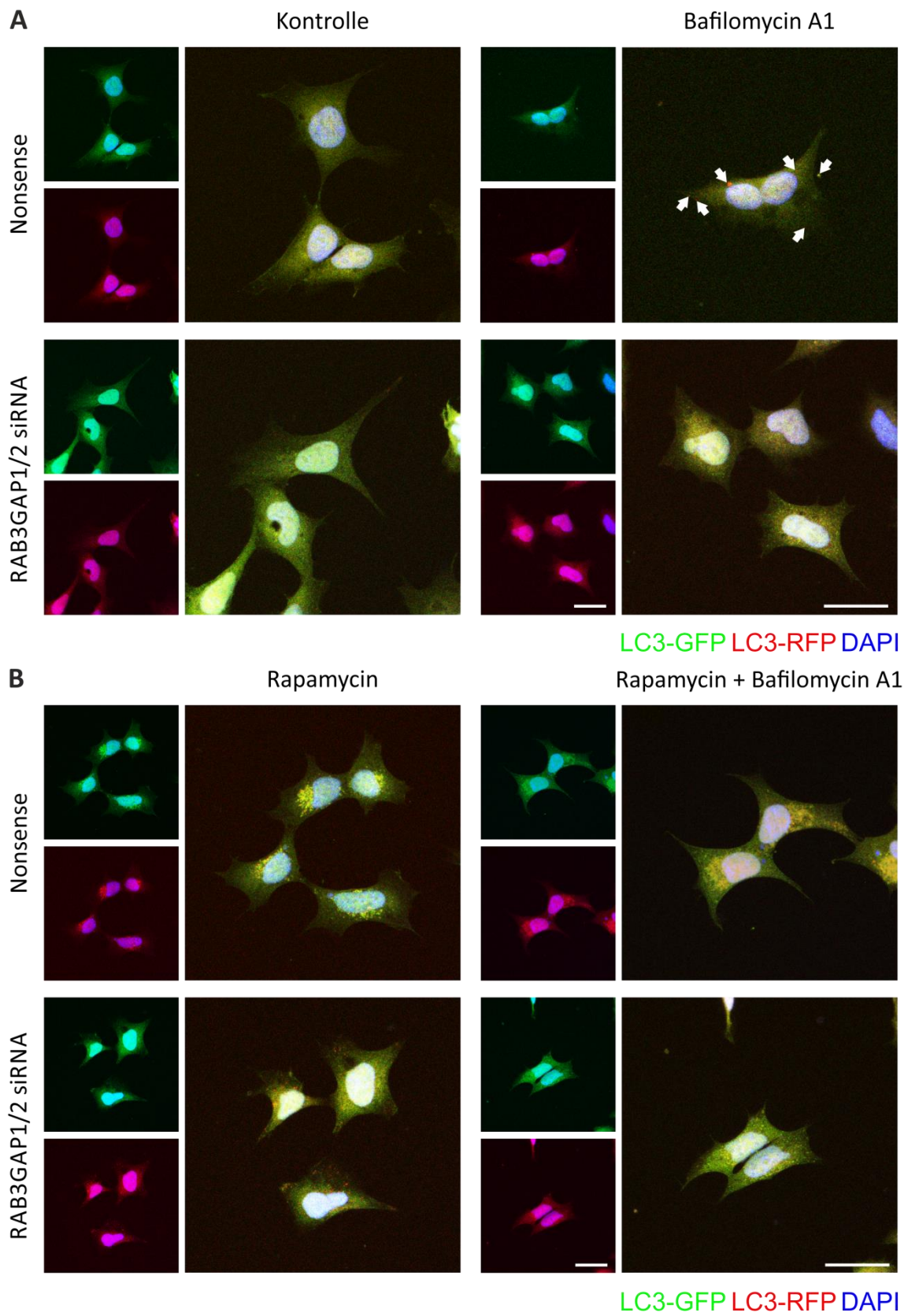
Die hier verwendeten klonalen HEK293a-Zellen tragen stabil ein ptfLC3-Plasmid und exprimieren ein GFP- und RFP-gekoppeltes LC3. Dadurch lassen sich Autophagosomen als farbige punktförmige Strukturen darstellen. Im neutralen Milieu des Zytoplasmas erscheinen autophagosomale Strukturen durch beide Farbstoffe in gelber Farbe. Verschmelzen die Autophagosomen mit Lysosomen wird das weniger stabile GFP durch das saure Milieu zerstört weswegen Autolysosomen als rote Strukturen zu erkennen sind. Während im HEK293a-System mit stabil transfizierten Zellen gearbeitet wurde, wurden in Fibroblasten autophagosomale Strukturen durch Immunfärbung sichtbar gemacht um die Autophagie zu untersuchen. LC3 wurde mit Dylight488-Farbstoff grün und p62/SQSTM1 mit Cy5-Farbstoff rot markiert. Autophagosomale Strukturen ließen sich somit in diesen Zellen als rote und somit LC3-markierte oder grüne und somit p62/SQSTM1-gekoppelte punktförmige Strukturen darstellen.

Unter basalen Bedingungen erschienen die Nonsense- und die RAB3GAP1/2 siRNA-transfizierten HEK293a- und IMR90-Zellen gleich und zeigten wenige bis keine Autophagosomen (Abbildung 23 A / Abbildung 24 A). Nach Bafilomycin A1-Behandlung zeigten sich in den Nonsense-Zellen mehr autophagosomale Strukturen als farbige Punkte. Dieser Effekt blieb bei den Zellen, in denen RAB3GAP1/2 herunterreguliert war, aus. Hier liefen durch die Bafilomycin A1-Behandlung keine autophagosomalen Strukturen auf. Die autophagosomale Biogenese war durch RAB3GAP1/2-Herunterregulation gestört.

Um die Autophagie pharmalogisch zu induzieren wurde Rapamycin eingesetzt. Dieses Agens ist ein Aktivator der Autophagie, denn es blockiert mTOR und hebt somit dessen Autophagie-hemmende Wirkung auf. Die Nonsense-transfizierten klonalen und primären Zellen zeigten durch die Rapamycin-Behandlung eine erhöhte Bildung von Autophagosomen (Abbildung 23 B / Abbildung 24 B). Diese akkumulierten durch die Behandlung mit Bafilomycin A1. Nach Induktion der Autophagie mittels Rapamycin konnten in der Herunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 weniger autophagosomale Strukturen beobachtet werden als in den Kontrollzellen. Auch eine Bafilomycin A1-Behandlung konnte kaum eine erhöhte Bildung von Autophagosomen in den Rapamycin-behandelten Zellen nach RAB3GAP1/2-Herunterregulation bewirken.

Sowohl die konfokale Mikroskopie von ptfLC3-HEK293a-Zellen als auch die Immunfärbung von IMR90-Fibroblasten zeigten unter basalen und Rapamycin-induzierten Bedingungen weniger Autophagosomen als in den Nonsense-behandelten Zellen, was darauf schließen lässt, dass die autophagosomale Biogenese gestört war. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse aus den Western-Blot-Analysen, in denen durch die Herunterregulation von RAB3GAP1/2 die autophagosomale Biogenese ebenfalls gehemmt war, was sich an einem verminderten Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 zeigte. Im weiteren Verlauf soll nun gezeigt werden, wie sich eine erhöhte Menge von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 im Vergleich zum Verlust dieser beiden Proteine verhält.

Abbildung 23 (folgende Seite): Konfokale Aufnahmen von HEK293a-Zellen, die stabil das ptfLC3-Plasmid tragen und dadurch GFP- und RFP-gekoppeltes LC3 exprimieren: Herunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte Effekte auf die Autophagie in diesen Zellen, die mit der angegebenen siRNA transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (Kontrolle), mit Bafilomycin A1 und/oder mit Rapamycin behandelt wurden (DAPI diente zur Nuclei-Färbung, Maßstab = 50 μm). **A.** Bei den unbehandelten Kontrollzellen ließen sich sowohl bei der Nonsense- als auch bei der RAB3GAP1/2 - Transfektion keine punktförmigen autophagosomalen Strukturen beobachten. Nach Bafilomycin A1-Behandlung ließen sich rote und gelbe Autophagosomen in der Nonsense-Kontrolle beobachten (weiße Pfeile). Dieser Effekt trat in der Herunterregulation nicht auf. **B.** Induziert man die Autophagie mithilfe von Rapamycin ließen sich in der Nonsense-Kontrolle viele rote und gelbe punktförmige Strukturen beobachten. Nach Bafilomycin A1-Behandlung wurden diese Autophagosomen vermehrt. Nach Rapamycin-Behandlung zeigten sich in der RAB3GAP1/2-Herunterregulation in HEK293a viel weniger autophagosomale Strukturen als in den Nonsense-Zellen. Auch durch zusätzliche Manipulation mit Bafilomycin A1 akkumulierten weniger Autophagosomen in den RAB3GAP1/2 siRNA-behandelten Zellen.



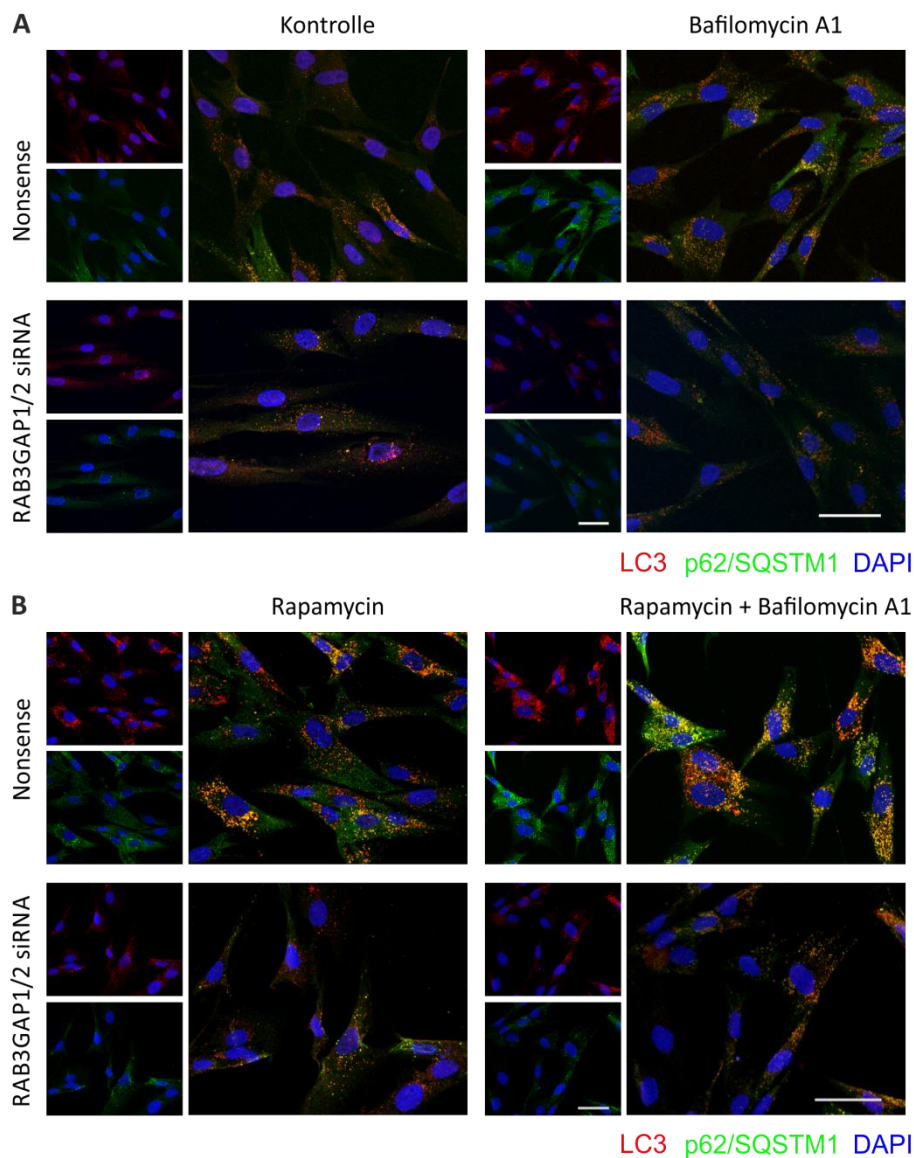


Abbildung 24: Konfokale Aufnahmen von LC3- und p62/SQSTM1-Immunfärbung in IMR90-Fibroblasten: Herunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte Effekte auf die Autophagie in diesen Zellen, die mit der angegebenen siRNA manipuliert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (Kontrolle), mit Bafilomycin A1 und/oder Rapamycin behandelt wurden (DAPI diente zur Nuclei-Färbung, Maßstab = 50 µm; Primärantikörperfärbung = anti-LC3 und anti- p62/SQSTM1 / Sekundärantikörper = Dylight488 (grün) und Cy5 (rot); *Quelle:* Spang, Feldmann *et al.* 2014). **A.** Bei den unbehandelten Kontrollzellen ließen sich sowohl bei der Nonsense- als auch bei der RAB3GAP1/2-Herunterregulation punktförmigen autophagosomale Strukturen beobachten. Nach Bafilomycin A1-Behandlung vermehrten sich diese in den Nonsense-Kontroll-Zellen während sich dieser Effekt nach RAB3GAP1/2-Herunterregulation nicht beobachten ließ. **B.** Induziert man die Autophagie mithilfe von Rapamycin akkumulierten in der Nonsense-Kontrolle viele Autophagosomen. Nach Bafilomycin A1-Behandlung wurden diese Strukturen vermehrt. Bei den RAB3GAP1/2 siRNA-behandelten Fibroblasten zeigten sich nach Rapamycin-Behandlung viel weniger autophagosomale Strukturen als in den Nonsense-Zellen. Auch durch zusätzliche Manipulation mit Bafilomycin A1 akkumulierten viel weniger Autophagosomen in den RAB3GAP1/2 siRNA-transfizierten Zellen als in den Kontrollzellen.

3.2.3. *Die Überexpression von RAB3GAP1/2 fördert die Autophagie*

Der Verlust von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 führte in Western-Blot-Analysen und Fluoreszenzmikroskopie zu einer gestörten autophagosomalen Biogenese. Um diesen Einfluss auf die Autophagie durch RAB3GAP1/2 zu bestätigen, wurde zusätzlich zu der siRNA-vermittelten Herunterregulation auch die Überexpression beider Komponenten mithilfe von Plasmiden näher betrachtet.

In den klonalen HEK293a-Zellen konnte in einzelnen Experimenten nach Einzelüberexpression ein Einfluss auf die Autophagie beobachtet werden (Abbildung 25 A), dieser Einfluss war aber wie bei der Herunterregulation über mehrere Versuche nicht nachzuweisen (Abbildung 25 C). Erst die Überexpression beider Untereinheiten des RAB3GAP-Komplexes zeigte eine Erhöhung des autophagischen Fluxes von p62/SQSTM1 und LC3-II im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (Abbildung 25 B+D). Dies konnte man in dieser Zelllinie allerdings nur schwach erkennen. Um diese Tendenz der veränderten Autophagie in den HEK293a-Zellen zu bestätigen, wurde die Überexpression von RAB3GAP1/2 auch in IMR90-Fibroblasten untersucht.

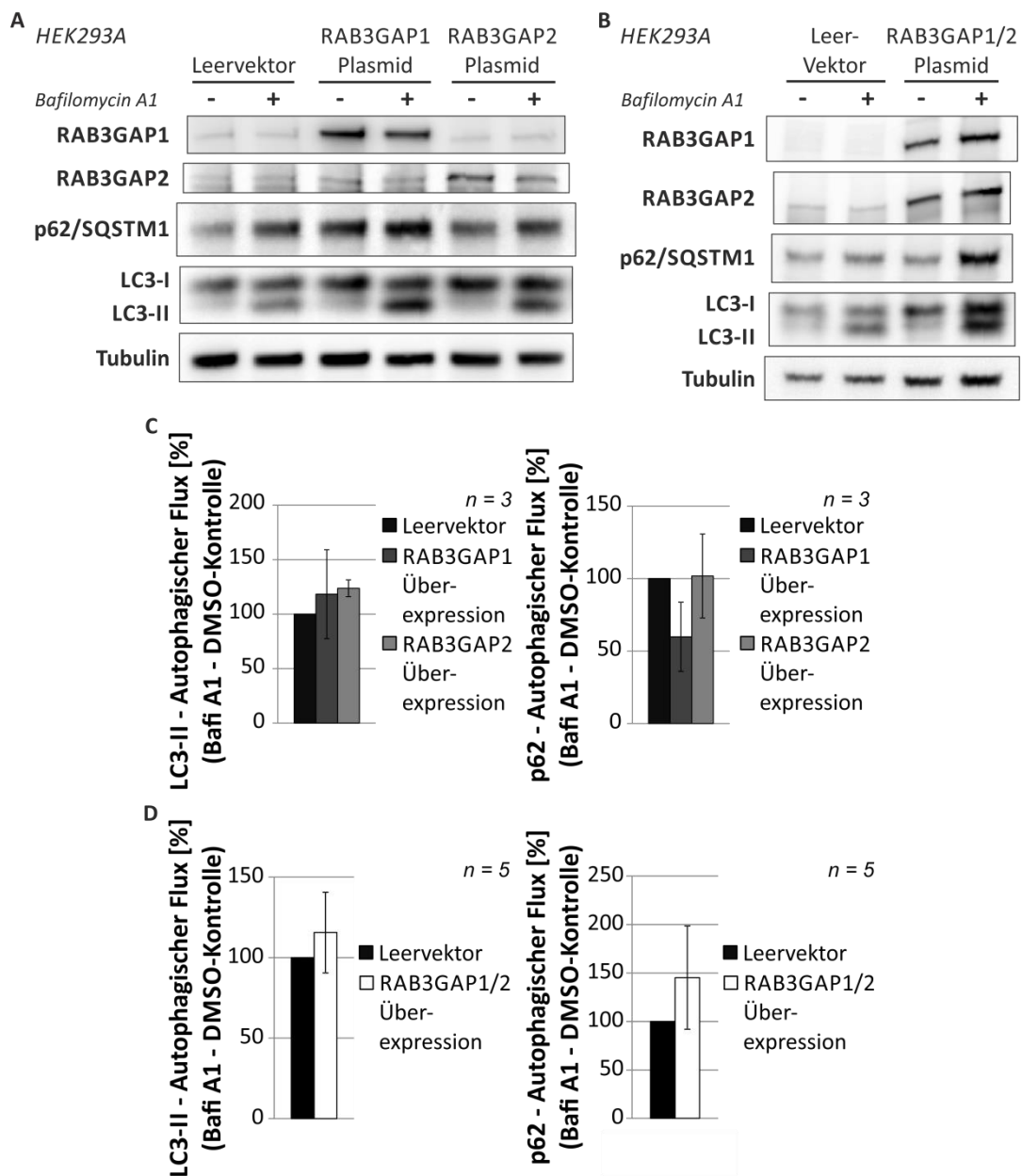


Abbildung 25: Überexpression von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen, die mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Tubulin diente als Ladekontrolle): **A.** Immunoblot-Analyse nach Einzelüberexpression von RAB3GAP1 und RAB3GAP2: Der Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 wirkte verändert nach Einzelherunterregulation im Vergleich zur Kontrolle. **B.** Immunoblot-Analyse nach Doppelüberexpression von RAB3GAP1/2: Der autophagische Flux von p62/SQSTM1 und LC3-II war erhöht nach Doppelherunterregulation im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle. **C.** Statistische Auswertung der Einzelüberexpression von RAB3GAP1 und RAB3GAP2: Es zeigte sich kein Effekt nach Einzelherunterregulation (Statistik: $n = 3$; Mittelwert \pm Stabw; t -test). **D.** Statistische Auswertung der Doppelüberexpression von RAB3GAP1/2: der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 war in der Tendenz nach Plasmid-Transfektion erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Statistik: $n = 5$; Mittelwert \pm Stabw; t -test).

In den primären IMR90-Fibroblasten zeigte sich eine deutliche Erhöhung des autophagischen Fluxes von p62/SQSTM1 und LC3-II nach Überexpression von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in der Immunoblot-Analyse im Vergleich zur Leervektor-Transfektion (Abbildung 26, A+B). Dies bestätigt die tendenziellen Effekte aus den HEK293a-Zellen. Die Überexpression von RAB3GAP1/2 fördert die autophagosomale Biogenese und zeigt somit den reziproken Effekt zur Herunterregulation von RAB3GAP1/2. Der RAB3GAP-Komplex ist ein positiver Regulator der Autophagie.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass RAB3GAP1 und RAB3GAP2 die autophagosomale Biogenese und somit den autophagischen Flux fördern, bleibt nun offen über welche Mechanismen RAB3GAP1/2 in der Autophagie wirken.

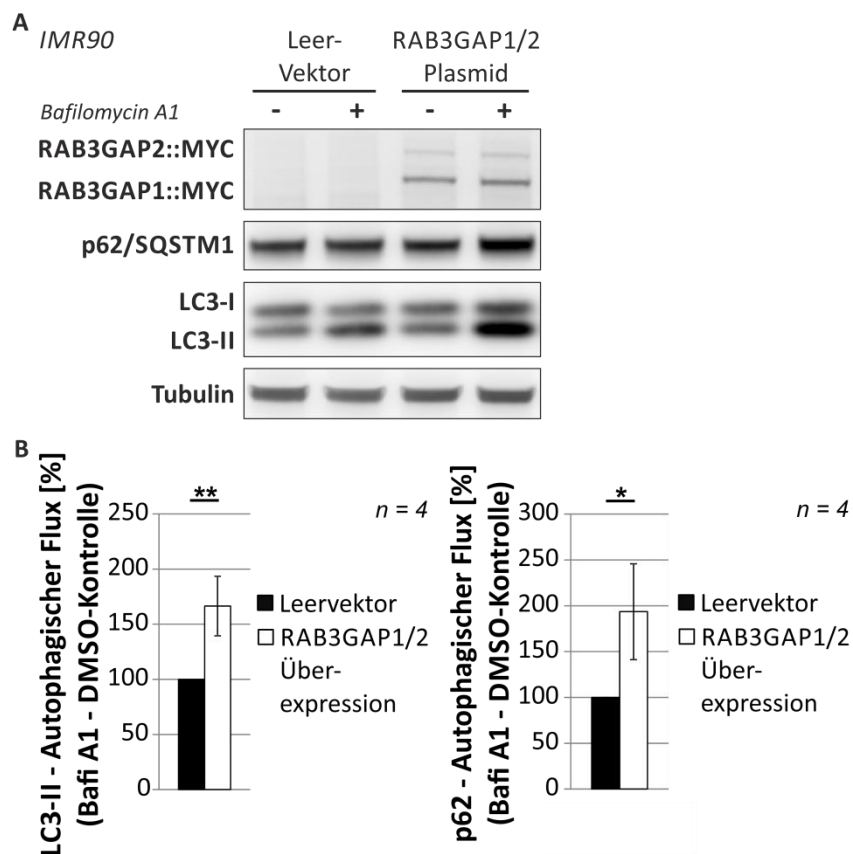


Abbildung 26: Überexpression von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte Effekte auf die Autophagie in IMR90-Fibroblasten, die mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Tubulin diente als Ladekontrolle; *Quelle:* Spang, Feldmann *et al.* 2014):

A. Immunoblot-Analyse nach Doppelüberexpression von RAB3GAP1/2: Der Flux von p62/SQSTM1 und LC3-II war deutlich erhöht im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle.

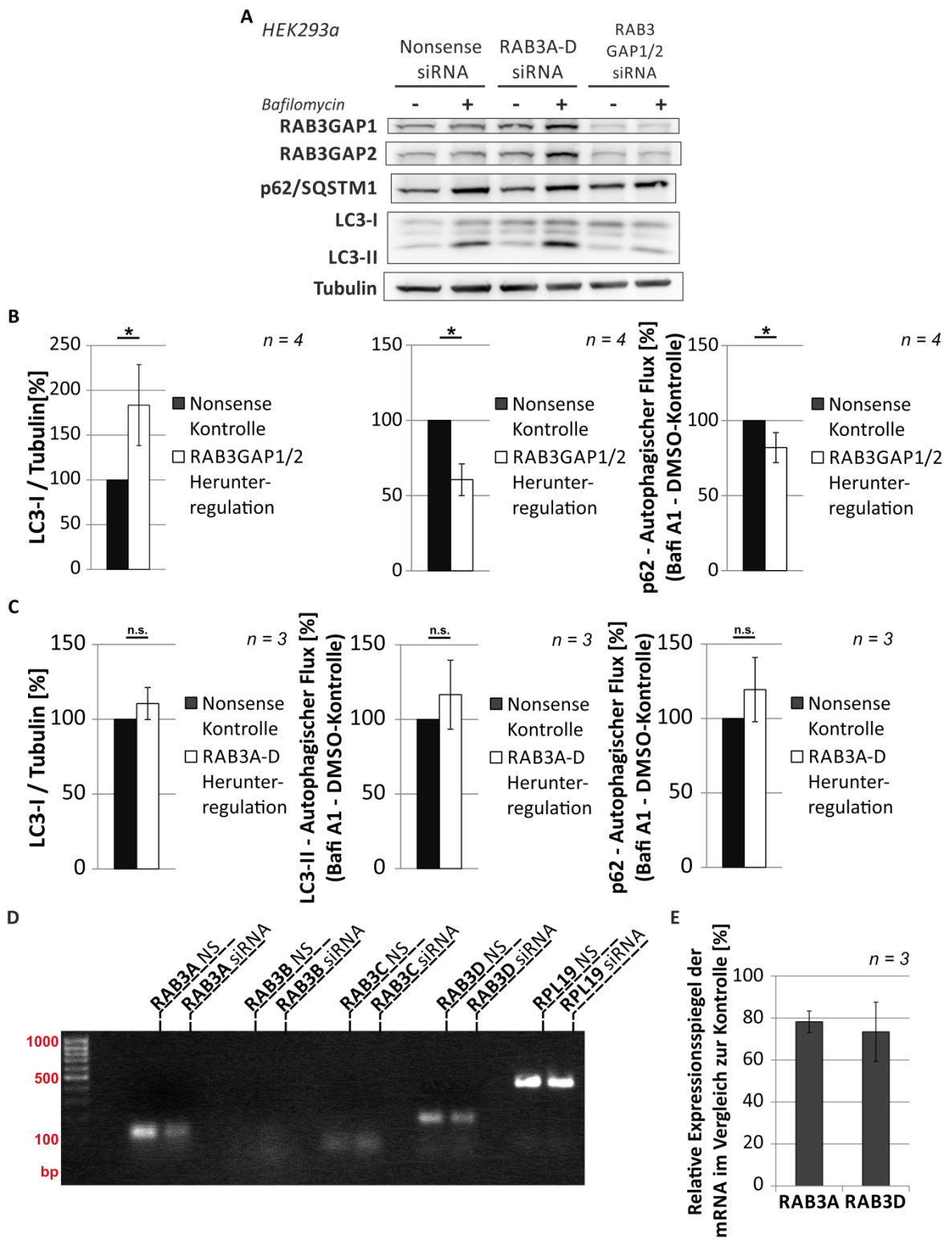
B. Statistische Auswertung der Doppelüberexpression von RAB3GAP1/2: der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 war im Mittel nach Überexpression signifikant erhöht, (Statistik: n = 4; Mittelwert ± Stabw; * P ≤ 0,05 und ** P ≤ 0,01; *t-test*)

3.2.4. *Die Effekte der RAB3GAPs auf die Autophagie sind unabhängig von der RAB GTPase RAB3*

Bisher wurde der RAB3GAP-Komplex (wie sich auch bereits aus der Namensgebung erschließt) mit der Regulation der GTPase RAB3 und der Neurotransmitter-Ausschüttung an neuronalen Synapsen assoziiert (Muller *et al.*, 2011; Sakane *et al.*, 2006). Um zu analysieren, ob der Einfluss auf die Autophagie von RAB3GAP1/2 über RAB3 vermittelt wird, wurde die Auswirkung der RAB3-Herunterregulation auf die Autophagie untersucht. RAB3 hat mindestens vier verschiedene Isoformen, die sich in ihrer Funktion kompensieren können (Schluter *et al.*, 2006; Schluter *et al.*, 2004). Um diese kompensatorischen Effekte zu verhindern wurden RAB3A, B, C und D gleichzeitig mithilfe von siRNA herunterreguliert.

Die RAB3A-D siRNA-Transfektion zeigte in HEK293a-Zellen keine veränderte Lipidierung von LC3 und auch keinen Einfluss auf den autophagischen Flux von LC3 oder p62/SQSTM1 (Abbildung 27 A). Die RAB3A-D Herunterregulation hatte hier somit keine Effekte auf die Autophagie und ähnelte der Nonsense-Kontrolle. Die Doppelherunterregulation von RAB3GAP1 und RA3GAP2 zeigte im Immunoblot, wie zuvor beschrieben, eine Akkumulation von LC3-I und eine Verminderung des autophagischen Fluxes von p62/SQSTM1 und LC3-II.

Abbildung 27 (folgende Seite): Herunterregulation von RAB3A-D zeigte keine Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen, die mit der angegebenen siRNA transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Tubulin diente als Ladekontrolle): **A.** Immunoblot-Analyse nach Herunterregulation von RAB3A-D und RAB3GAP1/2: Die RAB3A-D siRNA-Transfektion zeigte keine Effekte auf die Lipidierung von LC3 oder den autophagischen Flux von LC3-II und p62/SQSTM1, während die RAB3GAP1/2 Herunterregulation eine gestörte Lipidierung von LC3 und einen erniedrigten autophagischen Flux von p62/SQSTM1 und LC3-II im Vergleich zur Nonsense-Kontrolle zeigt. **B.** Statistische Auswertung der Herunterregulation von RAB3GAP1/2: LC3-I akkumulierte und der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 war nach RAB3GAP1/2-Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle vermindert (Statistik: n = 4; Mittelwert ± Stabw; * P ≤ 0,05; *t-test*). **C.** Statistische Auswertung der Herunterregulation von RAB3A-D: die Lipidierung von LC3-I, und der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 waren im Vergleich zur Kontrolle nach RAB3A-D siRNA-Behandlung nicht verändert (Statistik: n = 3; Mittelwert ± Stabw; n.s. = nicht signifikant; *t-test*). **C.** Agarosegel einer PCR von HEK293a-cDNA nach Nonsense- (NS) und RAB3A-D siRNA-Transfektion (siRNA), RPL19 diente als Ladekontrolle: RAB3A war die am meisten exprimierte RAB3-Isoform in HEK293a und ihr Spiegel konnte in der Herunterregulation deutlich gesenkt werden. In geringerer Menge war RAB3D nachzuweisen, aber auch hier konnte eine Herunterregulation nachgewiesen werden. HEK293a-Zellen exprimieren kein RAB3B und RAB3C. **D.** qPCR-Analyse der Expression von RAB3A und RAB3D: Die Expressionsspiegel der mRNA von RAB3A und RAB3D waren nach Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle in drei unabhängigen Experimenten vermindert (Statistik: n = 3, Mittelwert ± Stabw).



Zum Nachweis der erfolgreichen Reduktion der RAB3-Isoformen durch siRNA-Transfektion wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. In einer Agarosegel-Elektrophorese nach einer PCR zum Nachweis von RAB3A, B, C und D konnten in HEK293a-Zellen nur RAB3A und RAB3D und deren Herunterregulation nachgewiesen werden (Abbildung 27 C). Diese klonale Zelllinie exprimiert somit nur zwei Isoformen von RAB3. Um den genauen Umfang der Reduktion von RAB3A und RAB3D zu bestimmen, wurden deren Spiegel nach Herunterregulation mittels quantitativer PCR-Analysen ermittelt. Hier konnten die verminderten Mengen der mRNA-Spiegel von RAB3A und RAB3D bestätigt werden (Abbildung 27 D).

Die Herunterregulation von RAB3A-D zeigte in HEK293a-Zellen keinen Effekt auf die Autophagie. Im Folgenden wurde dieses Experiment in IMR90-Fibroblasten durchgeführt. Auch die RAB3A-D siRNA-Transfektion in IMR90-Fibroblasten zeigte keine veränderte Lipidierung von LC3 oder einen Einfluss auf den autophagischen Flux von LC3-II oder p62/SQSTM1 in der Immunoblot-Analyse im Vergleich zur Nonsense-Kontrolle (Abbildung 28 A+C). IMR90-Zellen exprimieren vier Isoformen A-D von RAB3. Diese konnten durch siRNA-Behandlung in ihren mRNA-Spiegeln im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert werden (Abbildung 28 B).

Die Herunterregulation von RAB3A-D mittels siRNA zeigte somit in HEK293a-Zellen und in IMR90-Fibroblasten keinen Effekt auf die Prozessierung von LC3 und die autophagosomale Biogenese. Die Wirkung von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 auf die Autophagie wird nach Erkenntnissen aus diesen Experimente nicht über die GTPase RAB3 vermittelt.

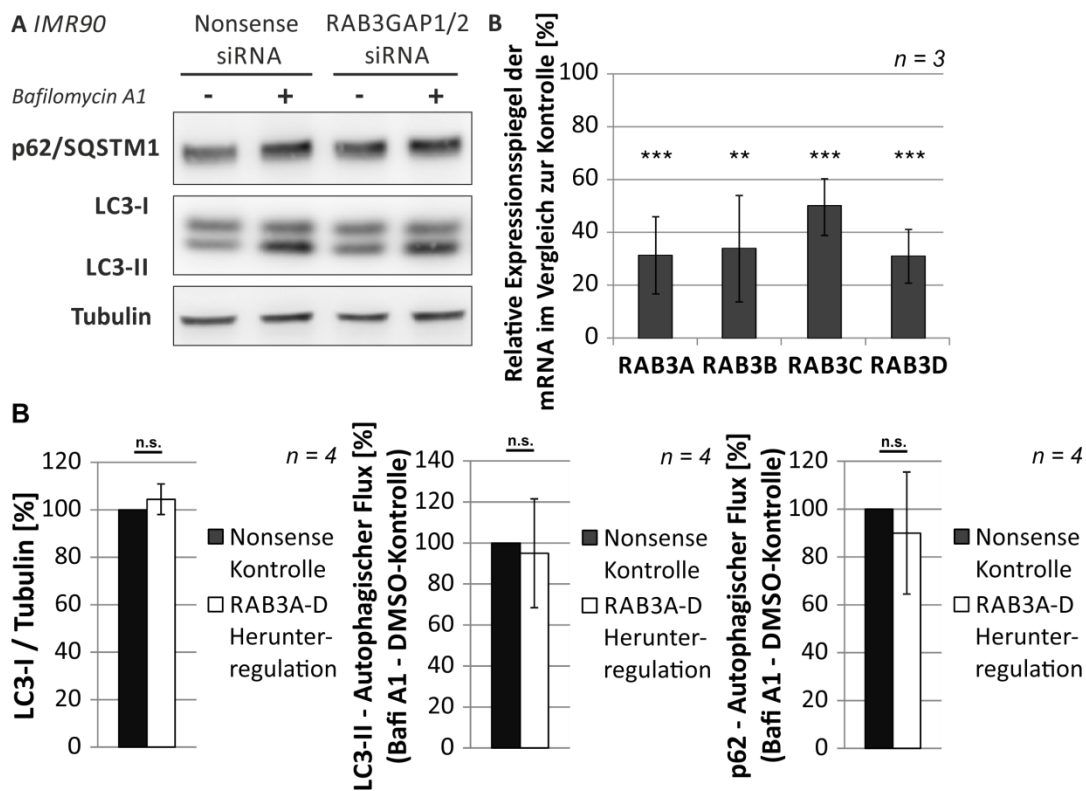


Abbildung 28: Herunterregulation von RAB3A-D zeigte keine Effekte auf die Autophagie in IMR90-Fibroblasten, die mit der angegebenen siRNA transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Tubulin diente als Ladekontrolle; *Quelle:* Spang, Feldmann *et al.* 2014): **A.** Immunoblot-Analyse nach Herunterregulation von RAB3: Die RAB3A-D siRNA-Transfektion zeigte keine Effekte auf LC3 und p62 im Vergleich zur Nonsense-Kontrolle. **B.** qPCR-Analyse der Expression von RAB3A, B, C und D: Die Expressionsspiegel der mRNA von RAB3A-D waren nach Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle in drei unabhängigen Experimenten signifikant vermindert (Statistik: n = 3; Mittelwert ± Stabw; P ** ≤ 0,01 und P *** ≤ 0,001; *t-test*). **C.** Statistische Auswertung der Herunterregulation von RAB3A-D: die Menge an LC3-I und der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 waren im Mittel nach RAB3A-D siRNA-Behandlung nicht verändert (Statistik: n = 4; Mittelwert ± Stabw; n.s. = nicht signifikant; *t-test*).

3.3. Untersuchung der Interaktionen von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 mit anderen Proteinen

Bisher konnte gezeigt werden, dass die RAB3GAPs neue Faktoren des Autophagienetzwerkes darstellen. In *Yeast Two-Hybrid*-Studien von humanen fötalen Gehirnen wurde eine Interaktion von FEZ1 mit RAB3GAP entdeckt (Assmann *et al.*, 2006; Orr und Zoghbi, 2007). Darüber hinaus wirkt FEZ1 zusammen mit SCOC und UVRAG in der Autophagie-Maschinerie. SCOC interagiert mit FEZ1 und bildet einen trimerischen Komplex mit UVRAG. Dieser beeinflusst wiederum ULK1 und Beclin1 und dadurch wirkt FEZ1 als negativer Regulator der Autophagie (McKnight *et al.*, 2012). Im Weiteren sollte daher untersucht werden, ob RAB3GAP1 oder RAB3GAP2 direkte Proteininteraktionen mit Faktoren der Autophagie oder auch FEZ1 oder dessen Paralog FEZ2 eingehen.

3.3.1. Der RAB3GAP1/2-Komplex interagiert nicht mit einem der hier untersuchten Autophagie-Gene in der Co-Immunopräzipitation

In Vorversuchen der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) wurden RAB3GAP1::MYC und RAB3GAP2::MYC in klonalen HEK293a-Zellen überexprimiert und anschließend wurde mit den Antikörpern für RAB3GAP1, RAB3GAP2 und c-MYC die entsprechenden Antigene präzipitiert. In der Immunoblot-Analyse wurden diese Proben nach Interaktionen mit geläufigen Autophagie-Proteinen untersucht (Daten nicht gezeigt).

Es konnten hier keine Proteininteraktionen mit LC3, p62/SQSTM1, ATG7, ATG3 oder GABARAP beobachtet werden, obwohl RAB3GAP1 und RAB3GAP2 schon als Interaktionspartner mit Mitglieder der ATG8-Proteinfamilie beschrieben wurden (Behrends *et al.*, 2010). ATG3 und ATG7 sind an der Prozessierung von LC3 beteiligt und GABARAP ist neben LC3 ein weiteres Mitglied der ATG8-Protein-Familie (Weidberg *et al.*, 2010).

3.3.2. Die Co-Immunopräzipitation zeigte keine direkte Interaktion von FEZ1, FEZ2 und RAB3GAP1

Da schon eine Proteininteraktion von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 mit FEZ1 in einem anderen Zellmodell beschrieben wurde, wurden des Weiteren Co-IPs zwischen FEZ1, FEZ2, RAB3GAP1 und RAB3GAP2 durchgeführt um diese Interaktion auch im hier eingesetzten Zellmodell nachzuweisen (Assmann *et al.*, 2006; Orr und Zoghbi, 2007).

Nach Überexpression von RAB3GAP1::MYC und RAB3GAP2::MYC und dem *Pull Down* mit FEZ1- und FEZ2-Antikörper konnte aber keine Proteininteraktion gezeigt werden (Daten nicht

gezeigt). Aus dem gleichen Zelllysate wurden mit dem c-MYC-Antikörper Proteine präzipitiert. Aber auch hier war keine Interaktion mit FEZ1 oder FEZ2 nachzuweisen.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde auch der umgekehrte Versuchsaufbau gewählt indem FEZ1::MYC und FEZ2::MYC überexprimiert wurden und der *Pull Down* mit RAB3GAP1-Antikörper durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Doch auch in diesen Co-IPs konnten keine Interaktionen zwischen RAB3GAP1 und FEZ1 oder FEZ2 nachgewiesen werden.

In der Co-Immunoprecipitation konnte keine direkte Proteininteraktion zwischen RAB3GAP1/2 und FEZ1 oder FEZ2 festgestellt werden. Um diese Interaktionsstudien zu ergänzen, wurden IP/MS-Analysen, die in Kooperation mit Christian Behrends (Institut für Biochemie II der Goethe-Universität, Frankfurt am Main) durchgeführt wurden, angefügt (siehe Ergebnisse 3.3.3).

3.3.3. **Die IP/MS-Analysen zeigten keine direkte Interaktion zwischen RAB3GAP1 und FEZ1**

Für die Interaktions-Analysen [Christian Behrends (Institut für Biochemie II der Goethe-Universität, Frankfurt am Main)] wurden FEZ1, RAB3GAP1 und RAB3GAP2 als FLAG-Hämagglutinin(HA)-Fusionsproteine in HEK293a-Zellen exprimiert. Die eluierten anti-HA-Komplexe wurden trypsinisiert und mittels Massenspektrometer analysiert. Anschließend wurden die Kandidaten mit der höchsten Interaktions-Wahrscheinlichkeit über das Programm *ComPASS* identifiziert (Behrends *et al.*, 2010; Sowa *et al.*, 2009).

Auch diese IP/MS-Analyse zeigte keine direkte Interaktion zwischen RAB3GAP1/2 und FEZ1. Für RAB3GAP1/2 konnten Interaktionspartner wie RFWD2, weitere COP-Proteine oder C11ORF2 identifiziert werden, während für FEZ1 SCOC nachgewiesen wurde. Diese Proteine wurden zuvor schon mit Autophagie in Verbindung gebracht (Claerhout *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2013; McKnight *et al.*, 2012; Perez-Victoria *et al.*, 2010).

Das Protein DNAJC13/RME8, das eine Rolle in der endosomalen Membransortierung spielt, wurde als gemeinsamer Interaktionspartner von RAB3GAP1 und FEZ1 identifiziert (Urrea *et al.*, 2013).

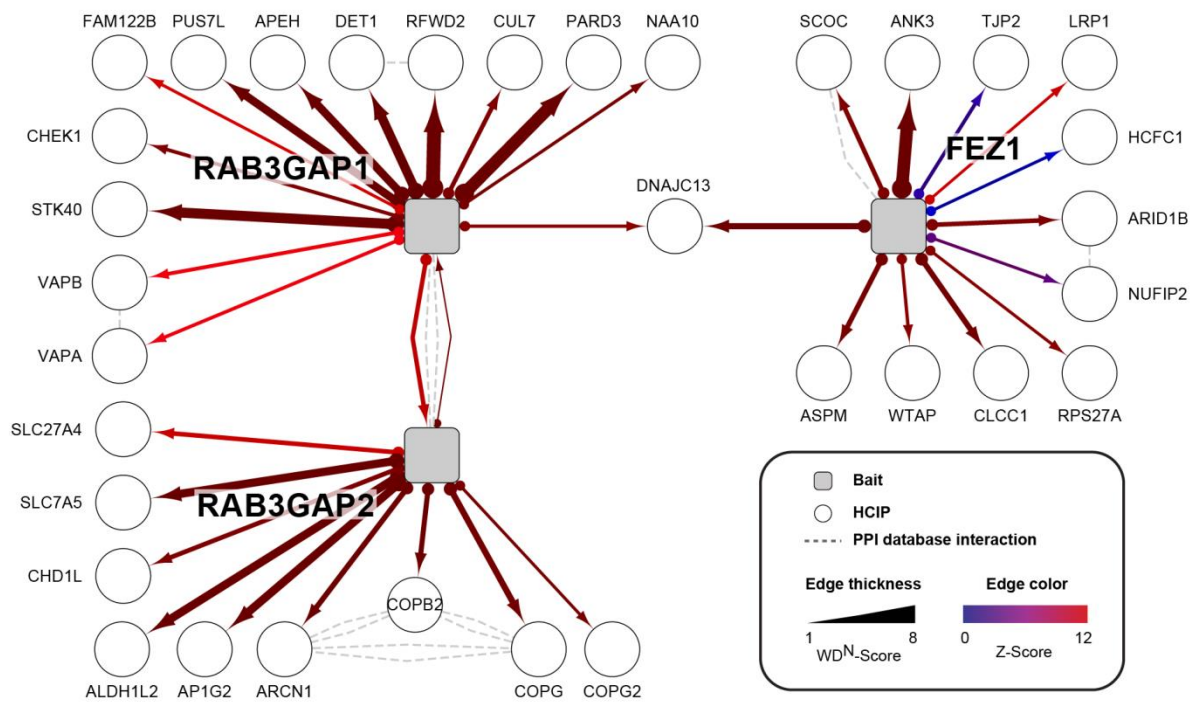


Abbildung 29: Proteom-Analyse von FEZ1, RAB3GAP1 und RAB3GAP2 (Quelle: Spang, Feldmann *et al.*, 2014): Das kombinierte Schema zeigt die in der Analyse identifizierten möglichen Interaktionspartner (HCIP). Bait-Proteine wurden als Flag-Hämagglutinin (HA)-Fusionsproteine in HEK293a-Zellen exprimiert. Proteine, die in den Anti-HA-Immunkomplexen eluiert wurden, wurden durch Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert und als HCIPs von CompPASS identifiziert.

GABARAP und GABARAPL1, zwei Mitglieder der ATG8-Protein-Familie, wurden als mögliche Interaktionskandidaten für die RAB3GAPs identifiziert, konnten aber den strengen Ausschlussverfahren, die diese Methode vorgibt und die für jedes Experiment statistisch neu ermittelt werden, nicht standhalten (Sowa *et al.*, 2009). In einer vorangegangenen Analyse konnte eine Interaktion der RAB3GAPs mit ATG8-Proteinen gezeigt werden (Behrends *et al.*, 2010). Dort wurden aber ATG8-Proteine als Bait genutzt und dadurch war die Interaktion vermutlich stärker.

Eine Liste aller gefundenen möglichen Interaktionspartner (HCIP) und deren strenge, von CompPASS festgelegten Ausschlusskriterien (Scores) finden sich im Anhang (siehe 7.6).

So wie in der Co-Immunopräzipitation konnte auch in der IP/MS-Analyse keine direkte Interaktion zwischen RAB3GAP1 oder RAB3GAP2 zu FEZ1 nachgewiesen werden.

3.4. Die Effekte von FEZ1 und FEZ2 auf die Autophagie im Vergleich zu den Veränderungen durch den RAB3GAP1/2-Komplex

Da weder in den Co-Immunopräzipitationen noch in der IP/MS-Analysen eine direkte Interaktion von RAB3GAP1/2 und FEZ1/2 festgestellt werden konnte, wurden im Weiteren die Effekte von RAB3GAP1/2 im Vergleich zu FEZ1 und FEZ2 untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass RAB3GAP1/2 als positive Regulatoren der Autophagie wirken. FEZ1 wurde hingegen als ein negativer Regulator der Autophagie beschrieben, was hier bestätigt werden sollte (McKnight *et al.*, 2012). Das FEZ1-Homolog FEZ2 kann im Säugersystem durch seine sehr ähnliche Struktur die Funktionen von FEZ1 übernehmen und eventuelle Auswirkungen bei der Herunterregulation oder Überexpression von FEZ1 kompensieren (Alborghetti *et al.*, 2011). Daher war es naheliegend den Einfluss von FEZ1 und auch FEZ2 auf die Autophagie zu bestimmen und diese Erkenntnisse mit denen der Manipulation von RAB3GAP1/2 zu vergleichen.

Die Funktion von FEZ1 als negativer Regulator konnte hier bestätigt werden, denn FEZ1-Herunterregulation erhöht den autophagischen Flux von LC3-II, während die FEZ1-Überexpression diesen in der Tendenz verringerte (Abbildung 30 A+B / Abbildung 31 A+B). Zusätzlich zeigte FEZ2 den gleichen Einfluss auf die Autophagie, denn FEZ2-Herunterregulation förderte die Autophagie und FEZ2-Überexpression hemmte den autophagischen Flux von LC3-II tendenziell. Hier konnte FEZ2 somit ebenfalls als negativer Regulator der Autophagie beschrieben werden.

Der größte Einfluss auf die Autophagie konnte aber durch eine Doppelmanipulation erreicht werden. Die Herunterregulation von FEZ1 und FEZ2 gemeinsam erhöhte den autophagosomalen Flux von LC3-II und die Doppelüberexpression von FEZ1/2 hatte sogar noch einen größeren Einfluss als die Manipulation von nur einem FEZ-Protein (Abbildung 30 C+D / Abbildung 31 C+D). Die beiden Homologe FEZ1 und FEZ2 können offensichtlich durch ihre sehr ähnliche Struktur auch ihre Funktionen in der Autophagie gegenseitig kompensieren, was hier in der Überexpression von nur einem FEZ-Protein gezeigt wurde. Erst eine Doppelüberexpression verminderte den autophagischen Flux von LC3-II in HEK293A-Zellen signifikant.

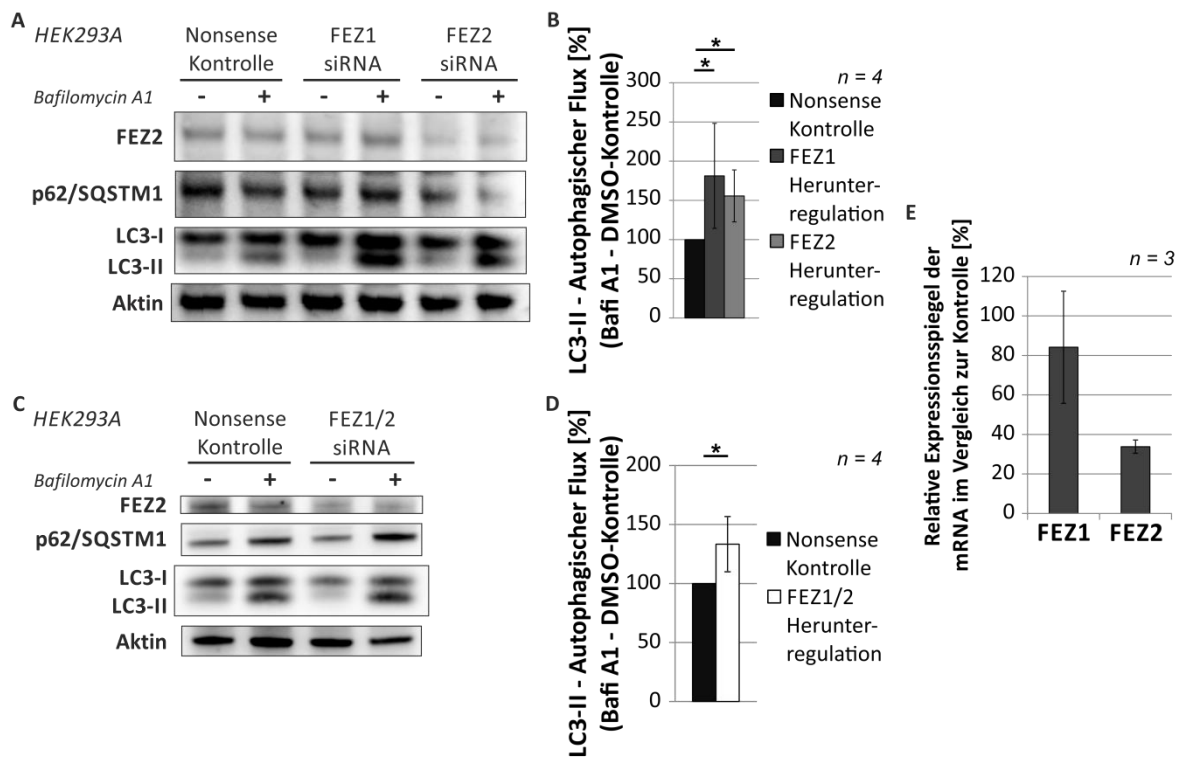


Abbildung 30: Herunterregulation von FEZ1 und FEZ2 zeigte Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen, die mit der angegebenen siRNA transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Aktin diente als Ladekontrolle): **A.** Immunoblot-Analyse nach Einzelherunterregulation von FEZ1 und FEZ2: Die FEZ1- und FEZ2-Herunterregulation zeigte einen starken Einfluss auf den autophagischen Flux von LC3-II im Vergleich zur Nonsense-Kontrolle. **B.** Statistische Auswertung der Einzelherunterregulation von FEZ1 und FEZ2: der autophagische Flux von LC3-II war in beiden Herunterregulationen signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Statistik: $n = 4$; Mittelwert \pm Stabw; $P^* \leq 0,05$; t -test). **C.** Immunoblot-Analyse nach Doppelherunterregulation von FEZ1/2: Die FEZ1 und FEZ2 siRNA-Transfektion zeigte eine starke Erhöhung des autophagischen Flux von LC3 im Vergleich zur Nonsense-Kontrolle **D.** Statistische Auswertung der Doppelherunterregulation von FEZ1/2: der autophagische Flux von LC3-II war signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Statistik: $n = 4$; Mittelwert \pm Stabw; $P^* \leq 0,05$; t -test). **E.** qPCR-Analyse der Expression von FEZ1 und FEZ2: Die Expressionsspiegel der mRNA von FEZ1 und FEZ2 waren nach Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle vermindert (Statistik: $n = 3$; Mittelwert \pm SEM; t -test)

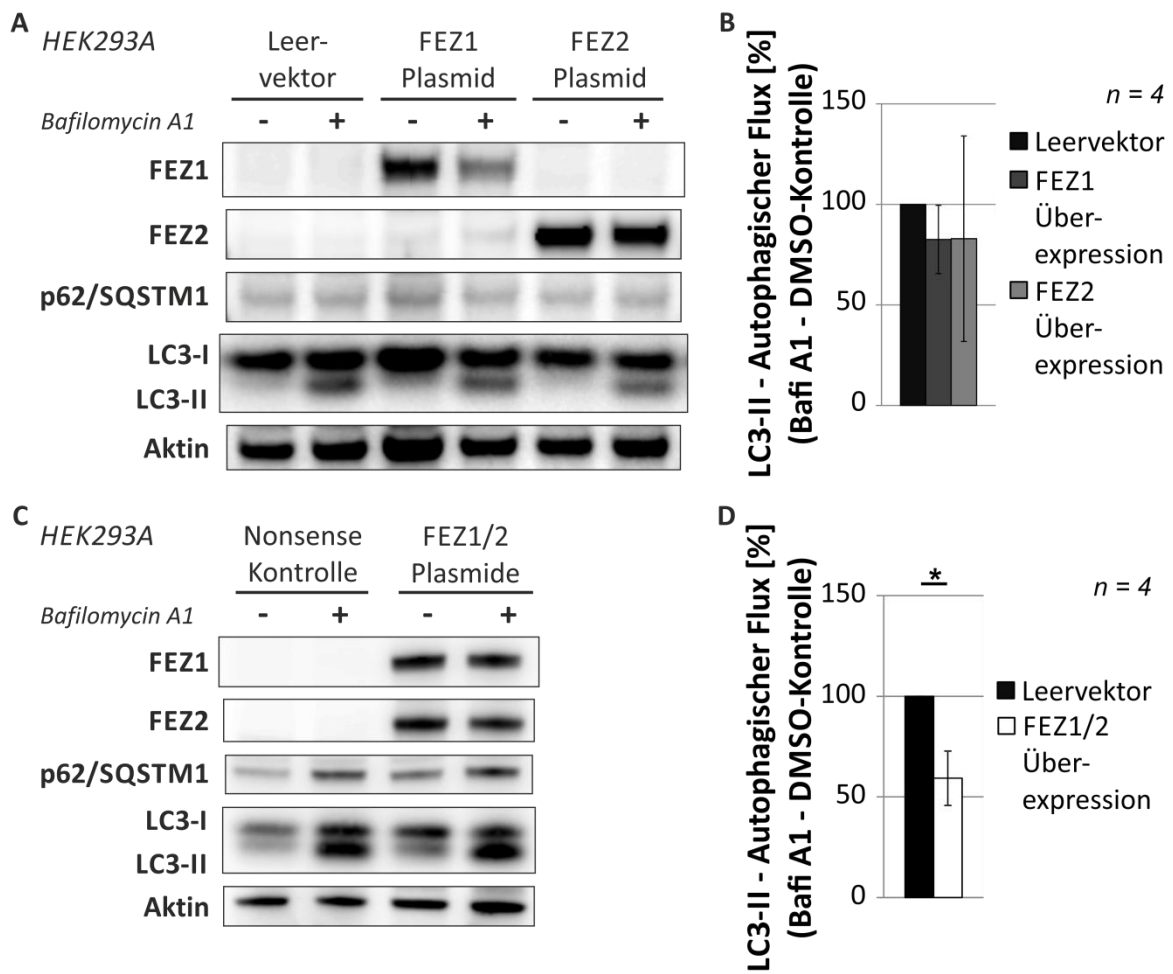


Abbildung 31: Überexpression von FEZ1 und FEZ2 zeigte Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen, die mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Aktin diente als Ladekontrolle): **A.** Immunoblot-Analyse nach Einzelüberexpression von FEZ1 und FEZ2: Die FEZ1- und FEZ2-Plasmid-Transfektion zeigte einen geringen Einfluss auf den autophagischen Flux von LC3 im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle. **B.** Statistische Auswertung der Einzelüberexpression von FEZ1 und FEZ2: der autophagische Flux von LC3-II war nach FEZ1- und FEZ2-Plasmid-Transfektion tendenziell vermindert (Statistik: n = 4; Mittelwert ± Stabw; *t-test*). **C.** Immunoblot-Analyse nach Doppelüberexpression von FEZ1/2: Die FEZ1 und FEZ2 Plasmid-Transfektion einen starken Einfluß auf den autophagischen Flux von LC3-II im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle **D.** Statistische Auswertung der Doppelüberexpression von FEZ1/2: der autophagische Flux von LC3-II war signifikant vermindert (Statistik: n = 4; Mittelwert ± Stabw; $P^* \leq 0,05$; *t-test*).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die Effekte auf die Autophagie auch in IMR90-Zellen validiert. Um hier die kompensatorischen Effekte zwischen FEZ1 und FEZ2 gänzlich auszuschließen, wurden in den primären Zellen alle weiteren Versuche unter den Bedingungen der Doppelherunterregulation durchgeführt. Zusätzlich wurde diese Manipulation mit dem Einfluss von RAB3GAP1/2 verglichen.

In den primären IMR90-Fibroblasten konnte in der Herunterregulation von FEZ1 und FEZ2 der gleiche Einfluss wie in den klonalen HEK293a-Zellen beobachtet werden (Abbildung 32). Der autophagische Flux von LC3-II war signifikant erhöht. Die Herunterregulation des RAB3GAP1/2-Komplexes führte, wie schon zuvor gezeigt, zum gegenteiligen Effekt und verminderte diesen Flux signifikant. FEZ1/2 und RAB3GAP1/2 wirken in ihrer Funktion antagonistisch.

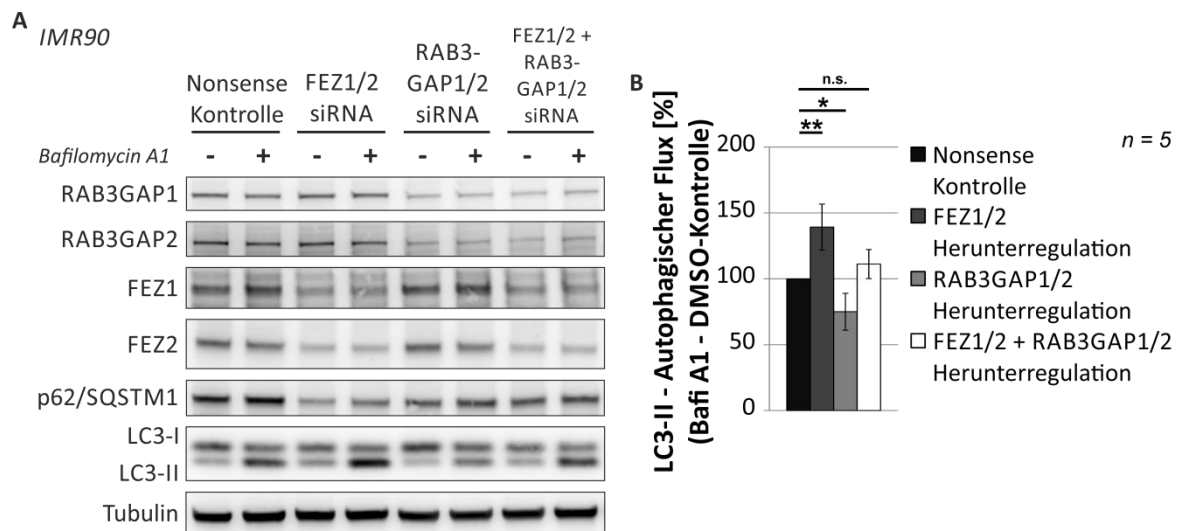


Abbildung 32: Herunterregulation von FEZ1/2 und RAB3GAP1/2 zeigte Effekte auf die Autophagie in IMR90-Fibroblasten, die mit der angegebenen siRNA transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Tubulin diente als Ladekontrolle) [Quelle: Spang, Feldmann *et al.* 2014]: **A.** Immunoblot-Analyse nach Herunterregulation der angegebenen Proteine: Die FEZ1/2 siRNA-Transfektion zeigte eine starke Erhöhung des LC3-II-Fluxes. Die RAB3GAP1/2 Herunterregulation verminderte diesen Flux. Bei der Behandlung mit der siRNA aller Komponenten wirkte die Akkumulation von LC3-II wieder wie bei der Nonsense-Kontrolle. **B.** Statistische Auswertung der Herunterregulation von FEZ1/2, RAB3GAP1/2 und FEZ1/2 + RAB3GAP1/2: Die FEZ1/2 siRNA-Transfektion zeigte über fünf unabhängige Experimente eine starke Erhöhung des autophagosomalen Fluxes von LC3-II. Die Herunterregulation von RAB3GAP1/2 verminderte diesen Flux. Die Transfektion aller Komponenten gemeinsam zeigten keinen Effekt im Vergleich zur Nonsense-Kontrolle (Statistik: n = 5; Mittelwert ± Stabw; n.s = nicht signifikant, P * ≤ 0,05 und P ** ≤ 0,01; *t-test*).

Darüber hinaus konnte in diesem Zellsystem gezeigt werden, dass sich diese Einflüsse gegenseitig aufheben, wenn alle vier Komponenten gemeinsam in den Zellen in ihrer Expression vermindert sind. Werden FEZ1, FEZ2, RAB3GAP1 und RAB2GAP2 gleichzeitig herunterreguliert, beobachtet man den gleichen autophagischen Flux von LC3-II wie in der Nonsense-Kontrolle.

Zusätzlich zu den Herunterregulationsanalysen wurde auch die Überexpression von FEZ1 und FEZ2 in IMR90-Zellen untersucht und mit der Überexpression von RAB3GAP1/2 verglichen. Die Überexpression von FEZ1/2 vermindert in primären Fibroblasten den autophagischen Flux von LC3-II, während, wie schon beschrieben, die RAB3GAP1/2-Überexpression diesen Flux erhöht (Abbildung 33). FEZ1/2-Überexpression hemmt die Autophagie, während die RAB3GAP1/2-Überexpression diesen Abbauweg fördert. Werden aber alle Komponenten gemeinsam überexprimiert kompensieren sich die beobachteten Effekte und der autophagische Flux von LC3-II verhält sich wieder wie in der Leervektor-Kontrolle.

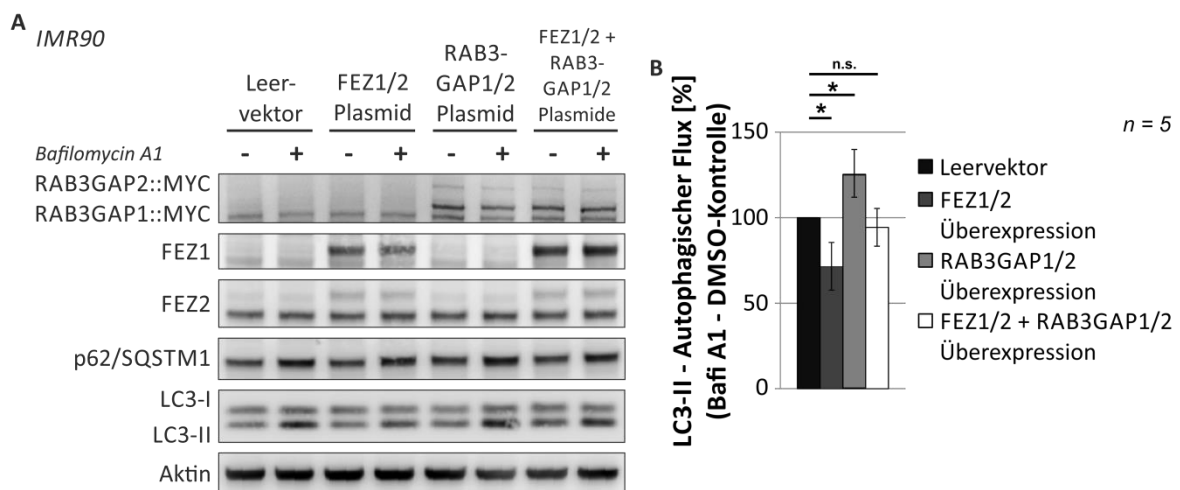


Abbildung 33: Überexpression von FEZ1/2 und RAB3GAP1/2 zeigte Effekte auf die Autophagie in IMR90-Fibroblasten, die mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden und nach 48 h für 4 h mit DMSO (-) oder mit Bafilomycin A1 (+) behandelt wurden (Tubulin dient als Ladekontrolle; *Quelle:* Spang, Feldmann *et al.* 2014):

A. Immunoblot-Analyse nach Überexpression der angegebenen Proteine: Die FEZ1/2-Plasmid-Transfektion zeigte eine starke Verminderung des autophagischen Fluxes von LC3-II. Die RAB3GAP1/2-Überexpression erhöhte diesen Flux. Bei der Überexpression aller Komponenten wirkte die Akkumulation von LC3-II wieder wie bei der Leervektor-Kontrolle. **B.** Statistische Auswertung der Herunterregulation von FEZ1/2, RAB3GAP1/2 und FEZ1/2 + RAB3GAP1/2: Die FEZ1/2-Plasmid-Transfektion zeigte über fünf unabhängige Experimente eine Verminderung des autophagosomalen Fluxes von LC3-II. Die Überexpression von RAB3GAP1/2 erhöhte diesen Flux. Die Transfektion aller Komponenten gemeinsam zeigten keinen Effekt im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (Statistik: n = 5; Mittelwert ± Stabw; P * ≤ 0,05; t-test).

Zusammenfassend wurde hier gezeigt, dass RAB3GAP1 und RAB3GAP2 positive Regulatoren der Autophagie sind, und FEZ1 und FEZ2 negativ auf diesen Abbauweg wirken. Da in vorangegangenen Experimenten keine direkte Protein-Interaktion von RAB3GAP1/2 und FEZ1/2 festgestellt werden konnte, wurde untersucht, ob die Einflüsse von RAB3GAP1, RAB3GAP2, FEZ1 und FEZ2 auf die Autophagie einen funktionellen Zusammenhang besitzen. Dazu wurden diese Proteine gemeinsam in humanen Zellen überexprimiert oder herunterreguliert. Interessanterweise hoben sich die Effekte gegenseitig auf, wenn die Proteinmengen aller vier Komponenten FEZ1, FEZ2, RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in der Zelle erhöht oder erniedrigt waren. Dies zeigt eine funktionelle Verbindung, da bei gleichzeitiger Manipulation aller Komponenten die Aktivität der Autophagie, gemessen am autophagischen Flux von LC3-II, wieder auf den Niveau der Kontrollen war. Das FEZ1 und FEZ2 die Effekte von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 auf den autophagischen Flux ausbalancieren und dies auch in die andere Richtung funktioniert, steigert die Relevanz des hier untersuchten RAB3GAP-Komplexes und festigt seine Rolle in der Autophagie.

4. Diskussion

Die Autophagie ist ein eukaryotischer Stoffwechselweg, der intrazelluläre Komponenten wie Proteine und Organellen gezielt aus dem Zytosol entfernt (Yang und Klionsky, 2009). Die Initiation dieses Abbauweges ist gekennzeichnet durch die Bildung einer Vorläuferstruktur mit Doppelmembran, die als Isolationsmembran bezeichnet wird. Diese expandiert zu einem Vesikel, der das Autophagiesubstrat einschließt und dann als Autophagosom bezeichnet wird. Das Autophagosom wird kontrolliert zu Lysosomen transportiert und verschmilzt mit diesen zum Autolysosom, worin die Bestandteile abgebaut werden und Aminosäuren und Lipide wieder regeneriert werden (Mizushima *et al.*, 2008).

Die Generierung der Isolationsmembran und die Reifung der Autophagosomen sind abhängig von einer koordinierten und effizienten Membrandynamik und einem gut funktionierendem Vesikeltransport. RAB GTPasen und ihre regulatorischen Proteine wie die RABGAPs spielen eine wichtige Rolle im Membrantransport und sind hochkonservierte Bestandteile des zellulären Vesikeltransports (Deneka *et al.*, 2003; Grosshans *et al.*, 2006; Stenmark, 2009). Aufgrund ihrer Bedeutung gibt es zahlreiche RAB GTPasen und RABGAPs, die Bestandteil der Autophagie sind und dort eine Rolle im Vesikel- und Membrantransport spielen (Fukuda und Itoh, 2008). So konnte gezeigt werden, dass z.B. ATG16L als Effektor von RAB33 wirken kann. Weitere Mitglieder der RAB-Familie, die an der Bildung der Autophagosomen und deren Reifung beteiligt sind, sind neben einigen anderen RAB9 bei der ATG5/ATG7-unabhängigen Autophagosomenbildung oder RAB5, RAB24 und RAB7 (Chua *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurden verschiedene TBC-Domänen-haltige RABGAPs mit der Autophagie assoziiert (Carroll *et al.*, 2013; Itoh *et al.*, 2008; Longatti *et al.*, 2012; Popovic *et al.*, 2012). TBC-Protein-Domänen vermitteln die Inaktivierung von RAB Proteinen und scheinen charakteristisch für RABGAPs zu sein, die mit mehr als einem RAB-Protein interagieren können und somit verschiedene Stoffwechselwege koordinieren (Frasa *et al.*, 2012).

Die Autophagie spielt beim Abbau von fehlgefalteten oder beschädigten Proteinen mit zunehmendem Alter eines Organismus eine immer größere Rolle. Zu diesem Zeitpunkt sind Zellen und Gewebe anfälliger für fehlgefaltete Proteine und Aggregate zu bilden (Boya *et al.*, 2013; Ryter *et al.*, 2014). Diese aggregierten oder ubiquitinierten Proteine müssen in alten Zellen somit verstärkt durch Autophagie abgebaut werden (Gamerding *et al.*, 2009; Morawe *et al.*, 2012). Hierbei spielen Proteine der *Bcl-2 Associated Athanogene* (BAG)-Familie für die selektive Autophagie eine bedeutende Rolle. In der alten Zelle und durch erhöhten zellulären Stress wird BAG3 vermehrt exprimiert, was dazu führt, dass der Abbau mittels Autophagie gefördert wird.

BAG1 hingegen, ein Protein welches den Proteinabbau mittels Proteasom fördert, wird im Alter vermindert exprimiert (Behl, 2011; Gamerdinger *et al.*, 2009).

Als Teil des komplexen Netzwerks, das die Homöostase des Proteoms aufrechterhält, unterstützt die Autophagie die Proteinstabilität. Diese ist für jede Zelle essentiell und nur durch ihre Aufrechterhaltung können alle Stoffwechselfvorgänge korrekt ablaufen und die Gesundheit eines Organismus erhalten bleiben. Daher muss sie auch unter sich verändernden Bedingungen gewährleistet sein und eine gestörte Proteostase sowie die damit verbundene Akkumulation von beschädigten oder fehlgefalteten Proteinen spielen in vielen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Krankheiten, eine Rolle (Cajigas *et al.*, 2010; Morawe *et al.*, 2012). Proteinaggregation wird verbunden mit Amyotropher Lateralsklerose, Alzheimer, Huntington, Parkinson und alpha-Synucleinopathien wie Demenz mit Lewy Bodies und Multipler Systematrophie (Goedert und Spillantini, 2006; Nagai *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2003; Scherzinger *et al.*, 1997; Spillantini und Goedert, 2000). Auch Erkrankungen, die nicht neurodegenerativ sind, wie die nichtneuropathische systemische Amyloidose werden mit Proteinaggregation in Verbindung gebracht (Chiti und Dobson, 2006).

Die große Anzahl an Krankheiten, die mit fehlgefalteten oder beschädigten Proteinen in Zusammenhang steht, zeigt wie wichtig der Erhalt der Proteostase für die einzelne Zelle und auch den gesamten Organismus ist. Bis heute sind vielzählige Mechanismen und Faktoren dieser Erkrankungen nicht vollständig oder gar nicht geklärt. Als Teil der komplexen Maschinerie, die diese Proteinhomöostase aufrechterhält, ist die Autophagie ein essentieller Abbauweg.

4.1. Der RAB3GAP-Komplex beeinflusst die Autophagie in C. elegans und humanen Zellen

In dieser Arbeit wurden ausgehend von einer RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse in *C. elegans* *rbg-1* und *rbg-2* als neue Faktoren der zellulären Proteostase gefunden, die im Weiteren im Säugerzellsystem mit der Autophagie und molekular mit der Bildung von Autophagosomen assoziiert wurden.

Um die Stärke und den Umfang von Aggregation in einer Hochdurchsatzanalyse in einem Modellorganismus sichtbar machen zu können, wurde in einer vorangegangenen Arbeit ein transgener *C. elegans*-Stamm generiert, der Luc::GFP, einen Proteinfaltungsreporter unter der Kontrolle eines Muskelpromotors, trägt, welcher nach Hitzestress aggregiert und Auskunft über die Qualität des Proteostase-Netzwerks gibt (Kern *et al.*, 2010). Dieser Wurmstamm wurde in einer RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse mit dem Ziel neue Faktoren der Proteostase zu

entdecken, genutzt. Bisher wurde das Chromosom I sowie weitere ausgewählte Kandidaten analysiert. Dabei wurden unter diesen Genen zahlreiche auffällige RNAi-Klone entdeckt, die die Aggregation von Luc::GFP beeinflussten. Hierzu gehörten *rbg-1* und *rbg-2* (siehe Ergebnisse 3.1.1). Diese möglichen Modulatoren der Proteostase wurden in dieser Arbeit näher charakterisiert. Der Verlust von RBG-1 und RBG-2 beeinflusste neben der Aggregation von Luc::GFP auch in weiteren Experimenten die Aggregation von PolyQ35::YFP, den Paralyse-Phänotyp von CL2006-Würmern und die Akkumulation Thioflavin S-gefärbter A β 42-Aggregate (siehe Ergebnisse 3.1.2.1 bis 3.1.2.3). Das komplexe System, das die Proteostase aufrecht erhält, besteht unter anderem aus molekularen Chaperonen, dem UPS und der Autophagie (Hartl *et al.*, 2011). Wird einer dieser Faktoren gestört, ist das gesamte Proteom nicht mehr im Gleichgewicht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Proteostase durch den Verlust bzw. die Reduktion von RBG-1 und RBG-2 gestört wurde. Um zu überprüfen welche Komponente des Proteostase-Netzwerks durch RBG-1 / RBG-2 beeinflusst wird, wurden diese Gene in einem Wurmstamm, der ein GFP::LGG1-Konstrukt exprimiert, herunterreguliert (Melendez *et al.*, 2003). LGG1 ist ein Mitglied der ATG8-Proteinfamilie und das LC3-Homolog in *C. elegans* und wirkt somit als Schlüsselprotein in der Autophagie. Dadurch, dass im GFP::LGG1-Reporterwurm die Bildung von (prä)autophagosomalen Strukturen gestört war und diese Effekte denen der Herunterregulation von *bec-1*, einem wichtigen Regulator der Autophagie, glichen, wurde gezeigt, dass die beiden untersuchten Proteine in der Autophagie wirken und dadurch die Proteostase stören können (siehe Ergebnisse 3.1.3).

Im Weiteren wurde die Bedeutung beider RGBs im Säugersystem untersucht. Die Säugerhomologe RAB3GAP1 und RAB3GAP2 bilden zusammen den TBC-freien Proteinkomplex RAB3GAP. RAB3GAP1 ist die katalytische und RAB3GAP2 die nicht-katalytische Untereinheit dieses heterodimeren Komplexes (Fukui *et al.*, 1997). Hier konnte gezeigt werden, dass beide positive Modulatoren der Autophagie darstellen (Abbildung 34). Die Manipulation von einer Untereinheit zeigte nur einen geringen Einfluss auf die Autophagie, veränderte man allerdings die Spiegel beider Untereinheiten des Komplexes gleichzeitig wurde die Autophagie in klonalen HEK293a-Zellen und primären IMR90-Fibroblasten stark verändert. Durch Verringerung von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 akkumulierte unlipidiertes LC3, was auf eine gestörte autophagosomale Biogenese hinweist und was eine verringerte autophagische Aktivität zur Folge hatte (siehe Ergebnisse 3.2.1). Die Beeinflussung der autophagischen Biogenese durch die RAB3GAPs wird durch die Untersuchung von ATG3 und ATG16L1 unterstützt, die in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls durchgeführt wurde, und die ebenfalls eine Akkumulation von LC3-I und eine verminderten Aktivität der Autophagie ergab (Spang, Feldmann *et al.*, 2014). Diese beiden Proteine sind bekannte Faktoren der LC3-Lipidierung und Autophagosomenreifung

(Shaid *et al.*, 2013). Umgekehrt bewirkte die verstärkte Expression von RAB3GAP1/2 eine erhöhte autophagische Aktivität (siehe Ergebnisse 3.2.3).

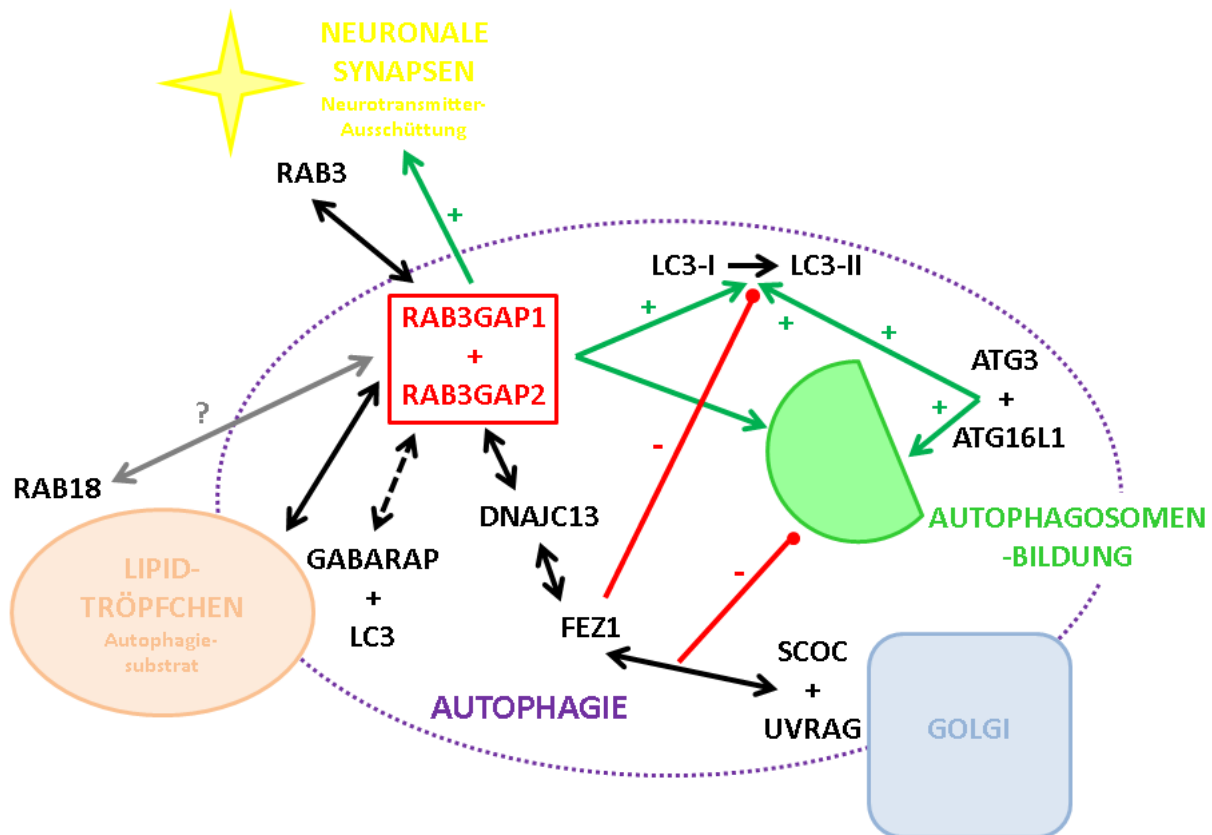


Abbildung 34: Übersichtsbild über die Funktionen von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 im Säugersystem: der heterodimere Komplex, der sich aus diesen beiden Untereinheiten bildet, spielt eine Rolle an neuronalen Synapsen und hat Einfluss auf die Autophagie (schwarze, durchgehende Pfeile = Interaktion / Wechselwirkung; schwarze, gestrichelte Pfeile = Co-Lokalisation; graue Pfeile = mögliche Interaktion; grüne Pfeile = Förderung; rote Pfeile = Hemmung)

Neben der Akkumulation von LC3-I wurde zudem in unserer Arbeitsgruppe in Fibroblasten gezeigt, dass auch die Konjugation von GABARAP nach dem Verlust von RAB3GAP1/2 gestört war (Spang, Feldmann *et al.* 2014). GABARAP ist neben LC3 ein weiteres Mitglied der ATG8-Proteinfamilie. Offenbar sind RAB3GAP1/2 für die effiziente Lipidierung von ATG8-Familienmitgliedern notwendig und beeinflussen somit die Bildung von Autophagosomen. Dies wurde durch die Immunfärbungen der endogenen Autophagosomen in IMR90-Fibroblasten bestätigt, die nach RAB3GAP-siRNA-Behandlung verringerte Mengen an LC3- und p62/SQSTM1-positiven Vesikeln zeigten (siehe Ergebnisse 3.2.2).

Die detaillierte Funktion der lipidierten ATG8-Familienmitglieder ist unklar, aber in einer ATG3-Knockout-Maus, wobei ATG3 als E2-Enzym-ähnliches Protein bei der ATG8-Lipidierung fungiert, wurde die Akkumulation unreifer autophagosomalen Vorläuferstrukturen nachgewiesen (Fujita

et al., 2008; Sou *et al.*, 2008). Dies deutet darauf hin, dass die ATG8-PE-Konjugation eine Voraussetzung für Autophagosom-Reifung ist und verschiedene ATG8-Familienmitglieder scheinen einzelne Schritte der Autophagosomenbildung zu beeinflussen (Weidberg *et al.*, 2010). Dieser Prozess ist in hohem Maße von einer ausreichenden Membranverfügbarkeit abhängig und die RAB3GAPs könnten die Übertragung von Lipiden zu der sich bildenden Isolationsmembran unterstützen. Mehrere RABGAPs, die mit LC3 interagieren, wurden bereits als Modulatoren der Initiation der Autophagie beschrieben und kürzlich wurden RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in einem ATG8-Interaktom proteinbiochemisch nachgewiesen (Behrends *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2008; Longatti *et al.*, 2012; Popovic *et al.*, 2012). Diese Assoziation des RAB3GAP-Komplexes mit Mitgliedern der ATG8-Protein-Familie wird unterstützt durch GABARAB und GABARAPL1 als schwache Interaktionspartner von RAB3GAP1/2 in der hier gezeigten IP/MS-Analyse, die in Kooperation mit Christian Behrends (Institut für Biochemie II der Goethe-Universität, Frankfurt am Main) durchgeführt wurde (siehe Anhang 7.6).

Des Weiteren konnte durch Anne Feldmann eine Co-Lokalisation von RAB3GAP1 mit LC3 oder GABARAP in IMR90-Fibroblasten gezeigt werden, wobei eine erhebliche Menge aller drei Proteine an Lipidtröpfchen co-lokalisierte (Spang, Feldmann *et al.*, 2014). LC3 und anderen Autophagie-verwandte Proteine sind dort vorhanden um die zellulären Lipidspeicher als Autophagiesubstrate nutzen zu können (Singh *et al.*, 2009). Dabei wird der Metabolismus von Lipidtröpfchen hauptsächlich über Autophagie reguliert, was die Lokalisation von LC3 an diesem Organell erklärt (Velikkakath *et al.*, 2012). Ein weiterer Zusammenhang zwischen autophagischer Aktivität und Lipiden zeigt sich bei der Bildung der Isolationsmembran. Hier werden Phospholipide für die Ausdehnung und Neubildung der autophagosomalen Membran benötigt. Die Entstehung und die Herkunft der Membranlipide der Isolationsmembran sind noch umstritten. Als Donor der Doppelschicht-Membran kommen Endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrium, Plasmamembran und andere Zellkompartimente in Frage und auch die Bildung der Membran *de novo* ist möglich (Hamasaki *et al.*, 2013; Ravikumar *et al.*, 2010a; Ravikumar *et al.*, 2010b; Girardi *et al.*, 2011). Beispielsweise wird am ER die Biosynthese der Doppelmembran-bildenden Phospholipide aus Lipiden erhöht, wenn die Induktion der Autophagie gefördert wird (Girardi *et al.*, 2011). Der Transport von Lipiden zu dem Ort der Autophagosomenbildung benötigt ein streng koordiniertes Membran- und Vesikeltransportsystem und steht unter anderem unter der Kontrolle von RAB GTPasen und ihren regulatorischen Enzymen wie den RABGAPs (Stenmark und Olkkonen, 2001). Die RAB3GAPs könnten somit die Übertragung von Lipiden zu der sich bildenden Isolationsmembran unterstützen.

Diese Erkenntnisse werden nicht nur durch die Akkumulation von LC3-I und den verminderten autophagischen Flux nach Herunterregulation von RAB3GAP1/2 in Western-Blot-Analysen, sondern auch durch Ergebnisse in der konfokalen Mikroskopie gestützt. Die Untersuchungen von ptfLC3-HEK293a-Zellen und Immunfärbungen von IMR90-Fibroblasten bestätigte, dass die Bildung von autophagosomalen Strukturen gestört war (siehe Ergebnisse 3.2.2). Eine Behandlung mit Bafilomycin A1 zeigte in den Kontrollzellen eine starke Akkumulation der Autophagosomen, das nach RAB3GAP1/2-Herunterregulation gar nicht bis minimal auftrat. Die Bildung dieser vesikulären Strukturen wurde durch die verminderten Spiegel von RAB3GAP1/2 gestört, was durch eine gehemmte Übertragung von Lipiden vermittelt werden kann. Dies unterstützt die wahrscheinliche Funktion von RAB3GAP1 und RAB3GAP2, die den Membrantransport zu sich bildenden Autophagosomen koordinieren.

Die Erkenntnisse der Herunterregulation von RAB3GAP1/2 wurde durch die Überexpression beider Komponenten des RAB3GAP-Komplexes bestätigt (siehe Ergebnisse 3.2.3). Erhöhte Spiegel von RAB3GAP1/2 bewirkte in HEK293a-Zellen und IMR90-Fibroblasten verstärkte autophagische Aktivität, gemessen am Substratflux von p62/SQSTM1 und LC3-II. Während also durch verringerte Spiegel von RAB3GAP1/2 der Transport von Lipiden zu dem Ort der Autophagosomenbildung gestört sein könnte und sich dadurch nur wenige autophagosomale Strukturen bilden, könnte die Überexpression der RAB3GAPs den Membran- und Vesikeltransport und somit die Bereitstellung dieser Membrankomponenten erheblich fördern, was den beobachteten erhöhten autophagischen Flux erklären würde.

Interessanterweise kann dieses RABGAP in der Autophagie wirken ohne eine TBC-Domäne zu besitzen. Wie schon zuvor beschrieben sind im Säuger einige TBC-Domänen-haltige RABGAPs mit dem autophagosomalen Abbau verbunden worden (Carroll *et al.*, 2013; Itoh *et al.*, 2008; Longatti *et al.*, 2012; Popovic *et al.*, 2012). Proteine enthalten diese hoch konservierten TBC-Domäne um die Aktivität der RAB GTPasen über einen Dual-Finger-Mechanismus zu regulieren, dabei spielen zwei katalytischen Reste in trans-Formation eine entscheidenden Rolle: ein Arginin-Finger, der analog zum katalytischen Zentrum von GAP-Proteinen der Ras- / Rho-Familie ist und ein Glutamin-Finger, der ebenfalls bei der Reaktion eine Rolle spielt. Durch diesen Dual-Finger-Mechanismus der TBC-Domäne beschleunigen RABGAPs die GTP-Hydrolyse und dabei scheint der exponierte Argininrest ein kritischer Faktor für die katalytische Aktivität *in vitro* und *in vivo* zu sein (Pan *et al.*, 2006). TBC-Domänen sind vermutlich charakteristisch für RABGAPs, die mit mehr als einem RAB-Protein interagieren können und somit verschiedene Stoffwechselwege koordinieren. Bisher wurde davon ausgegangen, dass diese TBC-Domäne essentiell ist, damit ein RABGAP in der Autophagie wirken kann (Frasa *et al.*, 2012). Der RAB3GAP-Komplex ist das erste RABGAP ohne TBC-Domäne, das mit Autophagie in Verbindung

gebracht wurde. Diese Domäne scheint somit nicht essentiell für die Beteiligung am autophagosomalen Abbau, denn es konnte gezeigt werden, dass das TBC-Domänen-freie RAB3GAP einen Einfluss auf die Initiation und die Aktivität der Autophagie.

Während hier gezeigt werden konnte, dass RAB3GAP1 und RAB3GAP2 positive Modulatoren der Autophagie sind und die Autophagosomenbildung beeinflussen, wurde der RAB3GAP1/2 bisher nur mit der Regulation der RAB GTPase RAB3 und der Neurotransmitter-Ausschüttung an neuronalen Synapsen assoziiert (Muller *et al.*, 2011; Sakane *et al.*, 2006). Dabei unterstützen die RAB3GAPs die synaptische Homöostase und sind mechanistisch zu einem späten Zeitpunkt der Vesikelausschüttung wirksam (Muller *et al.*, 2011). Durch den Knock Out von RAB3GAP1 akkumuliert die GTP-gebundene Form von RAB3A im Gehirn und die Ca²⁺-abhängige Glutamatfreisetzung aus zerebrokortikalen Synaptosomen ist gehemmt (Sakane *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob der Einfluss der RAB3GAPs auf Autophagie auch über diese RAB GTPase vermittelt wird, wurden die Auswirkungen einer RAB3-Herunterregulation auf die Autophagie untersucht (siehe Ergebnisse 3.2.4). Es konnte keine Veränderung der LC3-Lipidierung und auch kein Einfluss auf die Autophagie-Aktivität festgestellt werden, was vermuten lässt, dass die Wirkung der RAB3GAPs nicht über RAB3 vermittelt wird (siehe Diskussion 4.2). Allerdings konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität von RAB3GAP essentiell für die Rolle in der Autophagie ist (Spang, Feldmann *et al.*, 2014). Dazu wurde ein Arginin (R) der GAP-Domäne durch ein Alanin (A) ausgetauscht, was zu einer starken Verminderung der GTPase-aktivierenden Aktivität führt (Clabecq *et al.*, 2000). Die Expression des mutierten RAB3GAP1 (R728A) zusammen mit dem Wildtyp-RAB3GAP2 verhindert die erhöhte Aktivität der Autophagie, die sonst bei der Überexpression der beiden Wildtyp RAB3GAPs beobachtet wurde. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der GTPase-aktivierende Aktivität des RAB3GAP1 für ihren Einfluss auf Autophagie, und zeigt, dass dieser Effekt vermutlich durch eine bisher unbekannte RAB GTPase vermittelt wird. Ein möglicher Kandidat ist die RAB GTPase RAB18, denn Mutationen in RAB3GAP1, RAB3GAP2 und RAB18 wurden mit dem Warburg Micro Syndrom und dem Martsolf Syndrom assoziiert (Handley *et al.*, 2013). RAB18 könnte somit die RAB GTPase für RAB3GAP1/2 in der Autophagie sein (siehe Diskussion 4.2).

Um die Funktion der RAB3GAPs in der Autophagie näher zu charakterisieren, wurden im Weiteren mögliche Interaktionspartner dieser Proteine gesucht. In *Yeast Two-Hybrid*-Studien von humanen fötalen Gehirnen wurde eine Interaktion von FEZ1 mit den RAB3GAPs entdeckt (Assmann *et al.*, 2006; Orr und Zoghbi, 2007). In dieser Arbeit konnte weder in den Co-Immunopräzipitationen, noch in der IP/MS-Analyse, die in Kooperation mit Christian Behrends (Institut für Biochemie II der Goethe-Universität, Frankfurt am Main) durchgeführt

wurden, eine direkte Interaktion von RAB3GAP1, RAB3GAP2 und FEZ1 festgestellt werden (siehe 3.3). Allerdings ist in dieser proteomischen Analyse das Protein *Dnaj* (*Hsp40*) *Homolog, Subfamily C, Member 13* (DNAJC13) als direkte Verbindung zwischen RAB3GAP1 und FEZ1 festgestellt worden. In Untersuchungen bei denen die Effekte von RAB3GAP1/2 und FEZ1/2 auf die Autophagie verglichen wurden, konnte gezeigt werden, dass die Doppelherunterregulation von FEZ1 und seines Paralogs FEZ2 gemeinsam eine Erhöhung der Autophagie bewirkte, während deren Überexpression den reziproken Effekt hatte. Die Manipulation des RAB3GAP1/2-Komplexes führt zu antagonistischen Ergebnissen. Interessanterweise hoben sich diese Effekte gegenseitig auf, wenn die Proteinmengen aller vier Komponenten FEZ1, FEZ2, RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in der Zelle erhöht oder erniedrigt waren (siehe Diskussion 4.3). Diese funktionelle Korrelation von RAB3GAP1/2 und FEZ1/2 bestärkt die Rolle der RAB3GAPs innerhalb des Autophagie-Netzwerkes.

Ausgehend von der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse des Chromosoms I in *C. elegans*, die zur Identifizierung von RBG-1 / RBG-2 als neue Faktoren der Proteostase bzw. der Autophagie führten, wurden in dieser Arbeit RAB3GAP1 und RAB3GAP2 als positive Modulatoren der Autophagie charakterisiert. Die Herunterregulation von RAB3GAP1/2 vermindert die autophagosomale Biogenese, während in der Überexpression die autophagische Aktivität erhöht wird. Der TBC-Domänen-freie RAB3GAP1/2-Komplex moduliert die Initiation der Autophagie und hat somit Auswirkungen auf intrazelluläre Proteinaggregation. Neben der bekannten Modulation der synaptischen Homöostase konnte RAB3GAP1/2 in das Autophagie-Netzwerk integriert werden und sein Funktionsspektrum auf Autophagie und Proteostase erweitert werden.

4.1.1. Könnten die Erkenntnisse dieser Arbeit zu neuen therapeutischen Ansätzen im Micro- und Martsolf-Syndrom führen?

Mutationen in den hier untersuchten Komponenten des RAB3GAP-Komplexes verursachen ein bekanntes Krankheitsbild, das mit schweren Schäden an Gehirn und Augen, und endokrinen Störungen einhergeht (Aligianis *et al.*, 2005; Aligianis *et al.*, 2006). Dieses Krankheitsbild wird unter dem Begriff Micro- und Martsolf-Syndrom oder Warburg-Micro-Syndrom zusammengefasst (Handley und Aligianis, 2012). Bisher wurde vermutet, dass die Pathologien durch eine fehlerhafte exozytotische Ausschüttung von okularen und neurologischen trophischen Faktoren verursacht wird, da RAB3GAP1/2 bisher nur mit RAB3 assoziiert wurde (siehe Diskussion 4.2; (Aligianis *et al.*, 2005). Zusätzlich wurden RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in dieser Arbeit mit dem autophagosomalen Abbauweg in Verbindung gebracht. Diese Erkenntnisse könnten zu neuen therapeutischen Ansätzen dieser Erkrankungen führen.

In einem Mäusestamm konnte durch eine homozygote Mutation in der katalytischen Untereinheit RAB3GAP1 dessen Funktion vollständig ausgeschaltet werden. Obwohl die Tiere kein intaktes RAB3GAP1 exprimierten, waren sie lebensfähig und fertil. Es konnten keine signifikanten Veränderungen in den Expressionsniveaus von RAB3A oder anderen synaptischen Proteinen beobachtet werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die GTP-gebundene Form von RAB3A im Gehirn akkumuliert und, dass die Ca^{2+} -abhängigen Glutamatfreisetzung aus zerebrokortikalen Synaptosomen in den mutierten Mäusen gehemmt ist (Sakane *et al.*, 2006).

Vor kurzem hat sich gezeigt, dass neben anderen Warburg-Micro-Syndrom-assoziierten Proteinen, mutantes RAB3GAP1 die Größe von Lipidtröpfchen beeinflusst (Liegel *et al.*, 2013). Zusätzlich zeichnet sich ein Mausmodell dieser Erkrankung durch einen veränderten Fettstoffwechsel aus (Carpanini *et al.*, 2014). Die Lokalisierung von RAB3GAP1 an diesen Organellen weist nun auf eine funktionelle Verbindung zwischen RAB3GAPs, Autophagie und dem Metabolismus von Lipidtröpfchen hin und bietet einen möglichen molekularen Weg, der für den Lipidtröpfchen-Phänotyp des Warburg-Micro-Syndrom verantwortlich sein könnte.

Neben dem gestörten Metabolismus von Lipidtröpfchen zeigt das Warburg-Micro-Syndrom auch neurodegenerative Störungen. Dabei ist Proteinaggregation ein Risikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen und entsteht durch eine gestörte Proteostase (Goedert und Spillantini, 2006; Nagai *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2003; Scherzinger *et al.*, 1997; Spillantini und Goedert, 2000). Neben molekularen Chaperonen und dem UPS, ist die Autophagie ein zentraler Teil, der die Proteostase aufrecht erhält. Hier konnte im Modellorganismus gezeigt werden, dass der Einfluss von RAB3GAP1 / RBG-1 und RAB3GAP2 / RBG-2 auf die Autophagie ausreichend ist um die Proteinaggregation zu erhöhen (Hartl *et al.*, 2011). Denn eine gestörte Autophagie beeinflusst die Proteostase und eine daraus resultierende Anhäufung von missgefalteten Proteinen erhöht das Risiko Proteinaggregate auszubilden (Ryter *et al.*, 2014). Die gestörte Autophagie kann somit ein Grund für die Entstehung der Neurodegeneration im Warburg-Micro-Syndrom sein, da die Mutationen von RAB3GAP1/2 dazu führen, dass dieser Proteinkomplex seine Rolle in der Proteostase nicht mehr wahrnehmen kann. Diese Erkenntnis wird durch die Tatsache gestützt, dass auch die Mutation von RAB18, die als mögliche RAB GTPase von RAB3GAP1/2 in der Autophagie gilt, ebenfalls zum gleichen Krankheitsbild führt (Handley und Aligianis, 2012).

Um zu neuen therapeutischen Ansätzen zu gelangen kann untersucht werden, ob das beschriebene Krankheitsbild des Warburg-Micro-Syndroms auf eine gestörte Proteostase, die durch eine gehemmte Autophagie verursacht wird, zurückzuführen ist und entsprechend können durch die gewonnenen Erkenntnisse neue Behandlungsmöglichkeiten entwickelt

werden. Zusätzlich zeigt der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Proteostase über die Autophagie weitere Erkenntnisse zum Verständnis des komplexen System, dass die Proteinstabilität aufrecht erhält, und kann vielleicht auch zur Aufklärung weiterer Krankheiten, die mit fehlgefalteten oder geschädigten Proteinen in Verbindung stehen, seinen Beitrag leisten.

4.2. Der Einfluss von RAB3GAP1/2 auf die Autophagie ist unabhängig von RAB3, könnte aber über RAB18 vermittelt sein

Bisher wurde der RAB3GAP1/2-Komplex nur mit der Regulation der GTPase RAB3 und der Neurotransmitter-Ausschüttung an neuronalen Synapsen assoziiert (Muller *et al.*, 2011; Sakane *et al.*, 2006). Um zu erörtern ob der Einfluss des RAB3GAP-Komplexes über RAB3 erfolgt, wurde diese RAB GTPase in Säugerzellen herunterreguliert und der Einfluss auf die Autophagie biochemisch untersucht (siehe Ergebnisse 3.2.4).

RAB3 besitzt mindestens vier verschiedene Isoformen A bis D (Tasaka *et al.*, 1998). Diese können sich in ihrer Funktion kompensieren (Schluter *et al.*, 2006; Schluter *et al.*, 2004; Tasaka *et al.*, 1998). Um dies zu verhindern wurden alle Isoformen zugleich herunterreguliert. Die RAB3A-D siRNA-Transfektion hatte weder in HEK293a-Zellen noch in den IMR90-Fibroblasten einen Einfluss auf Autophagie. Die Lipidierung von LC3 und auch die autophagische Aktivität, gemessen am Flux von p62/SQSTM1 und LC3-II waren im Vergleich zu Kontrolle nicht verändert. Dies zeigt, dass die Beeinflussung der Autophagie durch die RAB3GAPs nicht durch RAB3 vermittelt werden kann.

Da die funktionellen Eigenschaften von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 bisher nur mit RAB3 assoziiert wurde, bleibt nun offen wie der Komplex aus beiden Untereinheiten in der Autophagie genau wirken kann. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die enzymatische Aktivität von RAB3GAP1/2 essentiell für seine Rolle in der Autophagie ist, da eine GAP-inaktive Mutante von RAB3GAP1 im Vergleich zum Wildtyp RAB3GAP1 keinen Einfluss auf die Autophagie zeigte. (Spang, Feldmann *et al.*; 2014). Dies unterstreicht die Notwendigkeit der GTPase-aktivierenden Funktion des RAB3GAP1 für ihren Einfluss auf Autophagie, und zeigt, dass dieser Effekt vermutlich durch eine bisher unbekannte RAB GTPase vermittelt wird. Ein vielversprechender Kandidat für die Rolle der RAB GTPase in der Autophagie ist RAB18. Denn RAB3GAP1 und RAB3GAP2 führen bei Mutationen zum Micro und Martsolf-Syndrom (Aligianis *et al.*, 2005; Aligianis *et al.*, 2006) und vor kurzer Zeit wurde auch die GTPase RAB18 mit diesem Krankheitsbild in Verbindung gebracht (Groll *et al.*, 1997; Handley und Aligianis, 2012; Hartmann-Petersen *et al.*, 2003).

RAB18 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein mit besonders hoher Expression im Gehirn und wurde zuerst als endosomales Protein in Epithelzellen von Niere und Darm der Maus beschrieben (Lutcke *et al.*, 1994). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass RAB18 eine weitreichende intrazelluläre Verteilung hat. Es ist im Golgi-Komplex, am ER, an Lipidtröpfchen und im Zytosol von verschiedenen Zelltypen lokalisiert (Dejgaard *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Im Gehirn wurde RAB18 in Verbindung mit synaptischen Vesikeln isoliert und an sekretorischen Granula in neuroendokrinen Zellen beobachtet und spielt dort eine kritische Rolle bei der Augenentwicklung und der Neurodegeneration (Bem *et al.*, 2011; Takamori *et al.*, 2006; Vazquez-Martinez *et al.*, 2007).

In einer kürzlich erschienenen Untersuchung wurde eine funktionelle Korrelation und eine Co-Lokalisation von RAB3GAP1/2 und RAB18 gezeigt (Gerondopoulos *et al.*, 2014). Hier konnte der RAB3GAP Komplex als das spezifische RAB18GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*) identifiziert werden, wobei RABGEFs die reverse Reaktion von RABGAPs steuern und somit zum Austausch von GDP zu GTP an der RAB GTPase führen. Der RAB3GAP-Komplex lokalisiert am ER und ist für die korrekte Ausrichtung von RAB18 am ER notwendig. In der Abwesenheit von RAB3GAP oder RAB18 ist die Struktur des ER gestört, somit sind RAB18 und der RAB3GAP-Komplex für die normale ER-Struktur erforderlich.

Die Lokalisation von RAB18 an Lipidtröpfchen und seine Assoziation mit dem Fettstoffwechsel sind weitere Hinweise, dass der hier untersuchte RAB3GAP-Komplex mit RAB18 in der Autophagie wirkt, da RAB3GAP mit LC3 oder GABARAP ebenfalls an Lipidtröpfchen lokalisiert sind (Crews, 2003); Spang, Feldmann *et al.*, 2014). LC3 und anderen Autophagie-verwandte Proteine sind dort vorhanden um die zellulären Lipidspeicher als Autophagie-Substrate nutzen zu können und der Metabolismus von Lipidtröpfchen wird hauptsächlich über Autophagie und somit vielleicht über RAB18 und RAB3GAP reguliert (Singh *et al.*, 2009; Velikkakath *et al.*, 2012). Zusätzlich gab es in unserer Arbeitsgruppe die ersten Hinweise, dass RAB18 ebenfalls einen Effekt auf die Autophagie hat (siehe Bachelorarbeit Ariane Kroell). Um die funktionelle Verbindung von RAB3GAP1/2 und RAB18 näher zu validieren, wurden die Effekte auf die Autophagie bei der Herunterregulation und der Überexpression des RAB3GAP-Komplexes mit denen durch Beeinflussung von RAB18 verglichen wie es in dieser Arbeit mit RAB3 und FEZ1/2 gemacht wurden. Dies konnte in ersten Versuchen zeigen, dass die RAB18-Beeinflussung den gleichen Effekt auf die Initiation der Autophagie und den autophagosomalen Flux hat wie die Manipulation von RAB3GAP1/2. Diese Erkenntnisse werden im Moment näher betrachtet. Die RAB GTPase RAB18 könnte somit zusammen mit RAB3GAP an Lipidtröpfchen in der Autophagie wirken.

Darüber hinaus wird im Moment analysiert, ob beide Proteine RAB18 und RAB3GAP direkt interagieren. In der Studie über den Erhalt der normalen ER-Struktur wurde bisher eine Co-Lokalisation beschrieben und RAB3GAP als RAB18GEF beschrieben (Gerondopoulos *et al.*, 2014). Eine direkte Interaktion kann nur mithilfe eines "In Vitro Binding Assays" nachgewiesen werden, da RAB GTPasen und ihre regulatorischen Proteine keine feste Bindung eingehen, wenn sie aufeinander wirken. Hierfür können Co-Immunopräzipitationen mit Guanosin-5-O-(3-thio)triphosphat (GTPS) durchgeführt werden. Durch seine Veränderung verbindet GTPS RAB GTPasen und ihre RABGAPs stabil (Itoh *et al.*, 2008), und somit könnte mit diesem Interaktionsnachweis die funktionelle Verbindung zwischen RAB3GAP und RAB18 bestätigt werden.

4.3. FEZ1 und FEZ2 haben antagonistische Effekte zu RAB3GAP1/2

Um die Funktion von RAB3GAP1/2 in der Autophagie näher zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit nach möglichen Interaktionspartnern gesucht. Wie schon zuvor erwähnt wurde in *Yeast Two-Hybrid*-Studien von humanen fötalen Gehirnen eine Interaktion von FEZ1 mit RAB3GAP entdeckt (Assmann *et al.*, 2006; Orr und Zoghbi, 2007). Im Säugersystem wirkt FEZ1 zusammen mit SCOC und UVRAG in der Autophagie und reguliert diese negativ (McKnight *et al.*, 2012). Bisher wurde sein Homolog FEZ2 nicht direkt mit Autophagie beschrieben, aber in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es den gleichen hemmenden Effekt auf diesen Abbauweg ausübt (siehe Ergebnisse 3.4). Reguliert man FEZ2 in humanen Zellen herunter wird die Autophagie signifikant erhöht, während seine Überexpression zu einer Verminderung des autophagischen Fluxes von LC3-II führt. Es ist bekannt, dass FEZ2 bei der normalen Bündelung und Ausdehnung im Axon die gleiche Funktion wie FEZ1 ausübt und somit das Funktionsspektrum der FEZ-Homologe überlappt (Alborghetti *et al.*, 2011). Hier konnte gezeigt werden, dass FEZ2 auch bezogen auf die Autophagie die gleiche Aktivität wie FEZ1 aufweist.

In dieser Arbeit konnte weder in den Co-Immunopräzipitationen, noch in der IP/MS-Analyse, die in Kooperation mit Christian Behrends (Institut für Biochemie II der Goethe-Universität, Frankfurt am Main) durchgeführt wurden, eine direkte Protein-Protein-Interaktion von RAB3GAP1, RAB3GAP2, FEZ1 und FEZ2 festgestellt werden (siehe Ergebnisse 3.3). Für den RAB3GAP-Komplex konnten Interaktionspartner wie *Ring Finger And WD Repeat Domain 2* (RFWD2), weitere COP-Proteine oder *Chromosome 11 Open Reading Frame 2* (C11ORF2) identifiziert werden, während für FEZ1 SCOC nachgewiesen wurde. Diese Proteine wurden zuvor schon mit der Autophagie in Verbindung gebracht (Claerhout *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2013; McKnight *et al.*, 2012; Perez-Victoria *et al.*, 2010). RFWD2, auch bekannt als COP-Protein *Coatomer-Komplex I* (COP1), eine E3-Ubiquitin-Ligase, wurde in Krebszellen entdeckt, wo es

essentiell für die Autophagie ist. Die Herunterregulation von COP1 verringert das Überleben der Zelle und beeinträchtigt die produktive Autophagie nach ER-Stress. Darüber hinaus ist dieser Coatomer-Komplex in vielen Krebszellen hochreguliert und eine Hemmung von COP1 könnte den Zelltod von Krebszellen fördern, wenn die Apoptose gestört ist (Claerhout *et al.*, 2012). Die Rolle dieser E3-Ubiquitin-Ligase COP1 im autophagosomalen Abbau wird bestärkt durch die Tatsache, dass es als Interaktionspartner von FIP200, einem essentiellen Regulator der Autophagie im Säuger identifiziert wurde (Kobayashi *et al.*, 2013). Als Bestandteil des *Golgi-Associated Retrograde Protein*(GARP)-Komplexes spielt C11ORF2, auch bekannt als *Vacuolar Protein Sorting 51 Homolog* (VPS51P), an dem retrograden Transport von frühen und späten Endosomen zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) eine entscheidende Rolle. Eine Herunterregulation der GARP-Untereinheiten beeinträchtigt das TGN, die Sortierung lysosomaler Enzyme, den endosomalen Cholesterin-Transport und auch die Autophagie (Perez-Victoria *et al.*, 2010). Die Interaktion der RAB3GAPs mit COP1 / RFWD2 und VPS51P / C11ORF2 unterstützt die Rolle des RAB3GAP-Komplexes im autophagosomalen Netzwerk und könnte zu weiteren Erkenntnissen führen durch welche Mechanismen RAB3GAP1/2 ihre Funktion ausführen.

Während keine direkte Interaktion von RAB3GAP1/2 und FEZ1 in der IP/MS-Analyse nachgewiesen werden konnte, ist allerdings in dieser proteomischen Analyse das Protein *DnaJ* (*Hsp40*) *Homolog, Subfamily C, Member 13* (DNAJC13) als direkte Verbindung zwischen RAB3GAP1 und FEZ1 festgestellt worden. Das *C. elegans*-Ortholog RME-8 (*Receptor-Mediated Endocytosis 8*) war auffällig in der Hochdurchsatzanalyse von Chromosom I und im Wurm wurden bei Herunterregulation von RME-8 endozytische Defekte festgestellt (Urrea *et al.*, 2013). Das Säugerhomolog DNAJC13 weist die DnaJ-Domäne auf und spielt eine Rolle in der endosomalen Membransortierung (Urrea *et al.*, 2013). Sein Hauptbindungspartner ist das ubiquitär exprimierte Chaperon HSC70. DNAJC13 / RME-8 hat Funktionen im intrazellulären Transport, wird mit RAB5 assoziiert und seine DnaJ-Domäne spielt vermutlich eine Rolle für die Funktion der Co-Chaperone auf Endosomen (Frydman, 2001; Urrea *et al.*, 2013). Durch seine Interaktion mit FEZ1 und RAB3GAP1 könnte es interessant für weitere Untersuchungen sein.

Da keine direkte Interaktion von RAB3GAP1/2 und FEZ1 festgestellt werden konnte, wurde untersucht, ob die Effekte von RAB3GAP1/2 und FEZ1/2 einen funktionellen Zusammenhang besitzen (siehe Ergebnisse 3.4). Dazu wurden diese Proteine gemeinsam in primären Fibroblasten überexprimiert oder herunterreguliert. Interessanterweise hoben sich die Effekte gegenseitig auf, wenn die Proteinmengen aller vier Komponenten FEZ1, FEZ2, RAB3GAP1 und RAB3GAP2 in der Zelle erhöht oder erniedrigt waren. Dies zeigt eine funktionelle Verbindung,

da bei gleichzeitiger Manipulation aller Komponenten die Autophagie wieder auf den Niveau der Kontrollen war.

Das FEZ1 und FEZ2 die Effekte des RAB3GAP-Komplexes auf den autophagischen Flux ausbalancieren und dies auch in die andere Richtung funktioniert, steigert die Relevanz des hier untersuchten Komplexes und festigt seine Rolle in der Autophagie. FEZ1 bildet zusammen mit SCOC und UVRAG, einen trimerischen Komplex (Abbildung 34) und dieser wiederum reguliert ULK1 und Beclin1, zwei Gene der Initiation der Autophagie, negativ. Somit wirkt FEZ1 auf die Autophagosomenbildung (McKnight *et al.*, 2012). Währenddessen beeinflussen RAB3GAP1/2 als positive Regulatoren die Initiation der Autophagie. RAB3GAP wirkt ebenfalls auf die Autophagosomenbildung, stört die LC3-Lipidierung und verhält sich ähnlich wie ATG3 und ATG16L1. Dieser Einfluss auf die Initiation und die Aktivität der Autophagie hängt höchstwahrscheinlich mit seiner Rolle im Vesikeltransport zusammen. Der Transport von Membranen von anderen Zellorganellen zum sich bildenden Autophagosom oder auch die Bereitstellung von Phospholipiden benötigt einen gut koordinierten Membran- und Vesikeltransport, der unter der Kontrolle von RAB GTPasen und ihren regulatorischen Enzymen wie den RAB GAPs steht (Stenmark und Olkkonen, 2001). Die RAB3GAPs koordinieren vermutlich die Übertragung von Lipiden zur sich bildenden Isolationsmembran, was wiederum auch die gestörte Lipidierung von LC3-I erklärt, die nur an autophagischen Membranen stattfinden kann (siehe Diskussion 4.1).

Der funktionelle Zusammenhang von FEZ1/2 und RAB3GAP1/2 als negative bzw. positive Regulatoren der Autophagie bestätigt die Rolle der Untereinheiten des hier untersuchten RAB3GAP-Komplexes in der Autophagie und unterstreicht nochmals seine Funktion in frühen Schritten der Autophagie bei der Autophagosomenbildung.

4.4. Die RNAi-vermittelte Proteostase-Analyse in C. elegans zeigt neue Modifikatoren der Proteostase

In dieser Arbeit wurden neue Modifikatoren der Proteostase mithilfe der RNAi-Analyse von Genen des Chromosoms I und ausgewählter weiterer Gene aus *C. elegans* gefunden. Um eine Störung der Proteostase untersuchen zu können, wurde in einer vorangegangenen Arbeit ein transgener *C. elegans*-Stamm generiert, der ein Luc::GFP-Konstrukt unter der Kontrolle eines Muskelpromotors trägt (Kern *et al.*, 2010). Dieses Reporterprotein aggregiert unter Hitzestress-Bedingungen und nach der schadhafte Manipulation des Proteostase-Netzwerks. Somit konnte dieser *C. elegans*-Stamm im Verlauf dieser Arbeit als Modellorganismus genutzt werden um die Proteinstabilität nach Herunterregulation definierter Gene durch RNA-Interferenz

fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Dabei wurden die Bakterienklone der „*Caenorhabditis elegans* RNAi feeding library“, die von der Gruppe um Julie Ahringer am Wellcome CRC Institute (University of Cambridge, Cambridge, Großbritannien) generiert wurden, genutzt (Fraser *et al.*, 2000; Kamath *et al.*, 2003; Kamath *et al.*, 2001). Diese „Bibliothek“ bietet RNAi-Klone für nahezu jedes Gen in *C. elegans* und ist somit ein biochemisches Werkzeug um durch Herunterregulation mittels RNA-Interferenz neue Modulatoren der Proteostase zu identifizieren (siehe Ergebnisse 3.1).

Das zelluläre Protein-Qualitätskontrollsystem muss fehlgefaltete Proteine erkennen und für deren effektive Entfernung sorgen um eine Störung der Proteostase zu verhindern (Kubota, 2009). Im zellulären Umfeld tragen Proteine das Risiko sich aberrant zu falten, zu aggregieren und potenziell toxische Formen anzunehmen. Um dies zu vermeiden bilden Chaperone die erste Instanz der Proteinkontrolle. Sie nutzen effektive Mechanismen um Aggregation zu verhindern, die Faltung effizient zu fördern und spüren fehlgefaltete Proteine auf und führen sie dem Proteinabbau-System zu, wenn eine native Faltung nicht mehr erzielt werden kann (Erlich *et al.*, 2012; Hartl *et al.*, 2011; Ouyang *et al.*, 2014). Für den Abbau fehlgefalteter Proteine stehen der Zelle zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung, das UPS und die Autophagie. Beim Proteinabbau durch das UPS werden ubiquitinierte Proteine im Proteasom degradiert (Klionsky und Emr, 2000). Bei der Autophagie werden Substrate zum Lysosom transportiert und dort abgebaut (Girard und McPherson, 2008; Vilarino-Guell *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit wurden nun neue, bisher unbekannte Regulatoren des komplexen Proteostase-Netzwerkes identifiziert. Durch die Analyse der Luc::GFP-Aggregation nach Herunterregulation von insgesamt 2680 Genen wurden 359 neue Kandidaten entdeckt, deren Proteinprodukte die Proteostase beeinflussen. Ein geringer Anteil der identifizierten Gene kodiert für Proteine, die zuvor mit Proteininstabilität in Verbindung gebracht wurden (6,91 %). Proteine, die in Zusammenhang mit DNA-Reparatur / Replikation (2,03 %), Oxidativem Stress / Elektronentransport (2,44 %) und Zellzyklus-Kontrolle (3,66 %) gebracht wurden, waren nur zu einem geringen Anteil vertreten. Einen etwas größeren Anteil bildeten die funktionellen Gruppen Genexpression (23,17 %), Posttranslationale Protein-Modifikation (15,04 %), Kanal- und Transportproteine (8,94 %) und Signaltransduktion (25,61 %) finden.

Wie diese Arbeit zeigt, hat die RNAi-Analyse von Genen des Chromosoms I von *C. elegans* ein großes Potenzial neue Modifikatoren der Proteinhomöostase zu finden, die vielleicht einen Beitrag zur Erforschung vieler Erkrankungen leisten könnten. Alle Modifikatoren der Proteostase wurden in einem zweiten Analyse-Durchgang nochmals auf ihren Einfluss auf Luc::GFP untersucht und nur 6,67 % erwiesen sich als Falsch-Positiv im ersten Durchgang. Dieser geringe Anteil bestätigt die Qualität der Hochdurchsatz-RNAi-Analyse.

Die Untersuchung der Aggregation von PolyQ35::YFP ergab, dass einige der in der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse gefundenen Kandidaten großes Potenzial hatten auch hier die Aggregation zu beeinflussen. Das hier untersuchte Polyglutamin-Reporterprotein ist nicht so einfach in seiner Aggregation zu beeinflussen wie Luc::GFP, da PolyQ nur durch die Alterung des Wurms aggregiert, was durch einen zweiten Stressor schwierig zu beeinflussen ist, während Luc::GFP schon allein durch den Hitzestress aggregieren kann und somit ein zweiter Stressfaktor einen viel geringeren Einfluss braucht (Morley *et al.*, 2002). In den Experimenten mit PolyQ::YFP wurden trotzdem einige danach unbeachtete mögliche Modulatoren der Proteostase bestätigt. Vor allem das Gen B0261.6 bleibt weiterhin ein interessanter Kandidat, dessen Funktion näher geklärt werden könnte. Durch seine Verringerung der Aggregation nach Herunterregulation verhält es sich vielleicht ähnlich wie MOAG-4 / SERF, ein Regulator der altersabhängigen Proteotoxizität, das die Bildung von kompakten Polyglutamin-Intermediaten unterdrückt, die für die Bildung von kompakten Polyglutamin-Aggregaten verantwortlich sind (van Ham *et al.*, 2010). Um weitere Modulatoren der Proteostase zu validieren, könnte mit jedem auffälligen Klon genauso verfahren werden wie mit *rbg-1* und *rbg-2* in dieser Arbeit.

Darüber hinaus arbeitet Anna Besemer, eine weitere Doktorandin unseres Instituts, erfolgreich mit Kandidaten aus dieser Analyse und erforscht im Säugersystem mithilfe der humanen Homologen weitere mögliche Modulatoren der Proteostase.

Allerdings muss dabei natürlich immer berücksichtigt werden, dass es wahrscheinlich auch falsch positive Kandidaten gibt. Denn reguliert man eine essentielle Komponente des Proteoms der Zelle herunter, ist die zelluläre Homöostase gestört, was wiederum auf die Proteostase wirkt. Somit müssen nicht alle identifizierten Kandidaten tatsächlich primäre Komponenten des Proteostase-Netzwerks darstellen. Darüber hinaus konnten in diesem Ansatz keine Gene erfasst werden, deren Herunterregulation schwerwiegende Phänotypen während der Larvalentwicklung bewirkten, da die Analysen im letzten Larvalstadium durchgeführt wurden und solche Störungen die Aggregation in den Würmern schon vor diesem Entwicklungsstadium nicht analysierbar machen (Lee *et al.*, 2004).

Diese Arbeit zeigt welches Potenzial die hier durchgeführte RNAi-vermittelte Hochdurchsatz-Analyse hat um neue bisher unbekannte Modulatoren der Proteostase aufzuzeigen. Neben den wenigen Genen, die in dieser Arbeit und in unserer Arbeitsgruppe untersucht wurden, gibt es mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit noch viele, die bislang nicht mit der Aufrechterhaltung der Proteostase in Verbindung gebracht wurden, aber doch Teil dieses komplexen Zusammenspiels sind.

5. Zusammenfassung

Die Proteinhomöostase wird in der Zelle von drei Stoffwechselwegen reguliert: den molekularen Chaperonen, dem Ubiquitin-Proteasom-System und dem autophagosomalen Abbauweg. Die (Makro)Autophagie verpackt und transportiert zytosolische Komponenten in Autophagosomen zu den Lysosomen, wo sie abgebaut werden. Eine Störung dieses Abbauwegs wirkt auf die Proteostase.

In dieser Dissertation wurde *C. elegans* als Modellorganismus zur Erforschung von Proteininstabilität genutzt. In einer RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse von Chromosom I und ausgewählter zusätzlicher Gene wurde ein Wurmstamm, der ein Luc::GFP-Konstrukt im Muskel exprimiert, genutzt. Dieses Reporterprotein aggregiert unter Hitzestressbedingungen und diese Aggregation kann durch Modulatoren der Proteostase beeinflusst werden. Dabei wurden mögliche neue Faktoren der Proteinhomöostase entdeckt. Durch weitere Experimente bei denen die Aggregation von PolyQ35::YFP im AM140-System, der Paralyse-Phänotyp und die Akkumulation Thioflavin S-gefärbter Aggregate von A β 42 im CL2006-Wurmstamm und die Effekte auf die Autophagie mittels eines GFP::LGG1-Konstrukt analysiert wurden, konnten *rbg-1* und *rbg-2* als neue Modulatoren der Proteinhomöostase, insbesondere der Autophagie, identifiziert werden.

Im Säuger bilden beide Orthologe dieser Gene, RAB3GAP1 und RAB3GAP2 den heterodimeren RAB3GAP-Komplex, der bisher nur bekannt war für die Stimulation der Umwandlung der GTP-gebundenen aktiven Form zur GDP-gebundenen inaktiven Form der RAB GTPase RAB3. In Immunoblot-Analysen und mikroskopischen Darstellungen im Säugersystem konnte gezeigt werden, dass die Effekte auf die Proteostase über den autophagosomalen Abbauweg wirken. RAB3GAP1/2 wirken als positive Stimulatoren, wenn die Lipidierung von LC3-I und der autophagische Flux von LC3-II und p62/SQSTM1 betrachtet werden. Diese Effekte werden aber nicht über die RAB GTPase RAB3 vermittelt. Die Proteine FEZ1 und FEZ2 haben einen antagonistischen Effekt auf die Autophagie und wenn alle vier Komponenten RAB3GAP1, RAB3GAP2, FEZ1 und FEZ2 zusammen herunter- oder hochreguliert werden, heben sich diese Effekte auf. In Co-Immunopräzipitationen und proteomischen Analysen konnte keine direkte Interaktion zwischen dem RAB3GAP-Komplex und FEZ1/2 oder zu anderen Autophagie-Genen nachgewiesen werden.

Hier konnte der RAB3GAP-Komplex funktionell mit Proteostase und Autophagie in *C. elegans* und Säugerzellen assoziiert werden. Dieser Komplex zeigt Einflüsse auf die autophagosomale Biogenese indem sie die Proteostase und die Bildung von (prä)autophagosomalen Strukturen in *C. elegans* und die Lipidierung von LC3 und damit den autophagischen Flux der Autophagiesubstrate LC3-II und p62/SQSTM1 in Säugerzellen beeinflusst. Darüber hinaus wirkt RAB3GAP der komplexen Autophagie-Unterdrückung durch FEZ1 und FEZ2 entgegen. Somit konnte gezeigt werden, dass RAB3GAP als neuartiger Faktor auf die autophagosomale Biogenese und somit auf die Proteostase wirkt.

5.1. Summary

Protein homeostasis in living cells is regulated by three metabolic pathways: molecular chaperones, the ubiquitin-proteasome system, and the autophagosomal degradation pathway. (Macro)Autophagy sequesters and transports cytosolic cargo in autophagosomes to lysosomes, where the cytosolic components are degraded. A disorder of this catabolic pathway affects proteostasis.

In this dissertation *C. elegans* has been used as a model organism for the study of protein stability. In a RNAi-mediated proteostasis analysis of chromosome I and selected additional genes using a worm strain expressing a Luc::GFP construct in muscle cells should be found new modulators of protein stability. This reporter protein aggregates under heat stress conditions and this aggregation may be affected by these modulators. These possible new factors of protein homeostasis were discovered by further experiments. In this studies the aggregation of PolyQ35::YFP in *C. elegans* AM140 system, the paralysis phenotype and accumulation of thioflavin S-stained aggregates of A β 42 in CL2006-worms, and the effects on autophagy using a GFP::LGG1 were analyzed. These investigations were able to identify *rbg-1* and *rbg-2* as new modulators of protein homeostasis, and in particular of autophagy.

The mammalian orthologs of these genes (RAB3GAP1 and RAB3GAP2) form the heterodimeric complex RAB3GAP, which was previously known for the stimulation of the conversion of the active GTP-bound form to the inactive GDP-bound form of the RAB GTPase RAB3. Both proteins could be further investigated in the mammalian system using immunoblot analysis and microscopic illustrations. It was shown that the effects on the proteostasis were mediated by the autophagosomal degradation pathway. If the lipidation of LC3-I and the autophagic flux of LC3-II and p62/SQSTM1 be considered, RAB3GAP1/2 act as positive stimulators on autophagy. These effects are not mediated by the RAB GTPase RAB3. Moreover, this work analyzed RAB3GAP1/2 in relation to the previously reported suppressive autophagy modulators FEZ1 and FEZ2 and demonstrate that both reciprocally regulate autophagy. It was shown no direct interaction between the RAB3GAP complex and FEZ1/2 or other autophagy genes in co-immunoprecipitation and proteomic analyzes.

Here the RAB3GAP complex could be functionally associated with proteostasis and autophagy in *C. elegans* and mammalian cells. *Rbg-1* and *rbg-2* shows effects on the autophagosomal biogenesis by impact on proteostasis and formation of (pre) autophagosomal structures in *C. elegans*, and RAB3GAP1/2 in mammalian cells affects the lipidation of LC3 and thereby the autophagic flux of the autophagic substrates LC3-II and p62/SQSTM1. In addition RAB3GAP counteracts the complex autophagy suppression by FEZ1 and FEZ2. In conclusion, this dissertation identifies RAB3GAP1/2 as novel conserved factors of the autophagy and proteostasis network.

6. Literaturverzeichnis

- Ahringer, J. (2006) Reverse genetics. Wormbook, ed. The C. elegans Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.47.1, <http://wormbook.org>.
- Alborghetti, M. R., Furlan, A. S. and Kobarg, J. (2011) FEZ2 has acquired additional protein interaction partners relative to FEZ1: functional and evolutionary implications. *PLoS one*, 6, e17426.
- Alborghetti, M. R., Furlan, A. S., Silva, J. C., Paes Leme, A. F., Torriani, I. C. and Kobarg, J. (2010) Human FEZ1 protein forms a disulfide bond mediated dimer: implications for cargo transport. *J Proteome Res*, 9, 4595-4603.
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S. and Stork, B. (2012) The incredible ULKs. *Cell Commun Signal*, 10, 7.
- Aligianis, I. A., Johnson, C. A., Gissen, P., Chen, D., Hampshire, D., Hoffmann, K., Maina, E. N., Morgan, N. V., Tee, L., Morton, J., Ainsworth, J. R., Horn, D., Rosser, E., Cole, T. R., Stolte-Dijkstra, I., Fieggen, K., Clayton-Smith, J., Megarbane, A., Shield, J. P., Newbury-Ecob, R., Dobyns, W. B., Graham, J. M., Jr., Kjaer, K. W., Warburg, M., Bond, J., Trembath, R. C., Harris, L. W., Takai, Y., Mundlos, S., Tannahill, D., Woods, C. G. and Maher, E. R. (2005) Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nat Genet*, 37, 221-223.
- Aligianis, I. A., Morgan, N. V., Mione, M., Johnson, C. A., Rosser, E., Hennekam, R. C., Adams, G., Trembath, R. C., Pilz, D. T., Stoodley, N., Moore, A. T., Wilson, S. and Maher, E. R. (2006) Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsolf syndrome. *American journal of human genetics*, 78, 702-707.
- Altenhofer, S., Witte, I., Teiber, J. F., Wilgenbus, P., Pautz, A., Li, H., Daiber, A., Witan, H., Clement, A. M., Forstermann, U. and Horke, S. (2010) One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *The Journal of biological chemistry*, 285, 24398-24403.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R. and Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431, 805-810.
- Assmann, E. M., Alborghetti, M. R., Camargo, M. E. and Kobarg, J. (2006) FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *The Journal of biological chemistry*, 281, 9869-9881.
- Atlashkin, V., Kreykenbohm, V., Eskelinen, E. L., Wenzel, D., Fayyazi, A. and Fischer von Mollard, G. (2003) Deletion of the SNARE *vti1b* in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Molecular and cellular biology*, 23, 5198-5207.
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. and Kelly, J. W. (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319, 916-919.
- Barr, F. A. (2013) Review series: Rab GTPases and membrane identity: causal or inconsequential? *The Journal of cell biology*, 202, 191-199.
- Behl, C. (2011) BAG3 and friends: co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy*, 7, 795-798.
- Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P. and Harper, J. W. (2010) Network organization of the human autophagy system. *Nature*, 466, 68-76.
- Bem, D., Yoshimura, S., Nunes-Bastos, R., Bond, F. C., Kurian, M. A., Rahman, F., Handley, M. T., Hadzhiev, Y., Masood, I., Straatman-Iwanowska, A. A., Cullinane, A. R., McNeill, A., Pasha, S. S., Kirby, G. A., Foster, K., Ahmed, Z., Morton, J. E., Williams, D., Graham, J. M., Dobyns, W. B., Burglen, L., Ainsworth, J. R., Gissen, P., Muller, F., Maher, E. R., Barr, F. A. and Aligianis, I. A. (2011) Loss-of-function mutations in RAB18 cause Warburg micro syndrome. *American journal of human genetics*, 88, 499-507.
- Billi, A. C., Fischer, S. E. and Kim, J. K. (2014) Endogenous RNAi pathways in C. elegans. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-49.

- Bloom, L. and Horvitz, H. R. (1997) The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 3414-3419.
- Bolender, R. P. and Weibel, E. R. (1973) A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment. *The Journal of cell biology*, 56, 746-761.
- Bourne, H. R. (1988) Do GTPases direct membrane traffic in secretion? *Cell*, 53, 669-671.
- Boya, P., Reggiori, F. and Codogno, P. (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology*, 15, 713-720.
- Boyle, K. B. and Randow, F. (2013) The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Current opinion in microbiology*, 16, 339-348.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. and Strelkov, S. V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in cell biology*, 11, 82-88.
- Cajigas, I. J., Will, T. and Schuman, E. M. (2010) Protein homeostasis and synaptic plasticity. *The EMBO journal*, 29, 2746-2752.
- Carlsson, P. and Mahlapuu, M. (2002) Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol*, 250, 1-23.
- Carpanini, S. M., McKie, L., Thomson, D., Wright, A. K., Gordon, S. L., Roche, S. L., Handley, M. T., Morrison, H., Brownstein, D., Wishart, T. M., Cousin, M. A., Gillingwater, T. H., Aligianis, I. A. and Jackson, I. J. (2014) A novel mouse model of Warburg Micro syndrome reveals roles for RAB18 in eye development and organisation of the neuronal cytoskeleton. *Disease models & mechanisms*, 7, 711-722.
- Carroll, B., Mohd-Naim, N., Maximiano, F., Frasa, M. A., McCormack, J., Finelli, M., Thoresen, S. B., Perdios, L., Daigaku, R., Francis, R. E., Futter, C., Dikic, I. and Braga, V. M. (2013) The TBC/RabGAP Armus coordinates Rac1 and Rab7 functions during autophagy. *Developmental cell*, 25, 15-28.
- Caughey, B. and Lansbury, P. T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annual review of neuroscience*, 26, 267-298.
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. and Zerial, M. (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, 62, 317-329.
- Chiti, F. and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry*, 75, 333-366.
- Choi, J., Jo, M., Lee, E., Kim, H. J. and Choi, D. (2014) Differential induction of autophagy by mTOR is associated with abnormal apoptosis in ovarian endometriotic cysts. *Molecular human reproduction*, 20, 309-317.
- Christian, P., Sacco, J. and Adeli, K. (2013) Autophagy: Emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control. *Biochimica et biophysica acta*, 1831, 819-824.
- Chua, C. E., Gan, B. Q. and Tang, B. L. (2011) Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68, 3349-3358.
- Clabecq, A., Henry, J. P. and Darchen, F. (2000) Biochemical characterization of Rab3-GTPase-activating protein reveals a mechanism similar to that of Ras-GAP. *The Journal of biological chemistry*, 275, 31786-31791.
- Claerhout, S., Dutta, B., Bossuyt, W., Zhang, F., Nguyen-Charles, C., Dennison, J. B., Yu, Q., Yu, S., Balazsi, G., Lu, Y. and Mills, G. B. (2012) Abortive autophagy induces endoplasmic reticulum stress and cell death in cancer cells. *PloS one*, 7, e39400.
- Cohen, E., Du, D., Joyce, D., Kapernick, E. A., Volovik, Y., Kelly, J. W. and Dillin, A. (2010) Temporal requirements of insulin/IGF-1 signaling for proteotoxicity protection. *Aging Cell*, 9, 126-134.

- Consortium, C. e. S. (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282, 2012-2018.
- Crews, C. M. (2003) Feeding the machine: mechanisms of proteasome-catalyzed degradation of ubiquitinated proteins. *Current opinion in chemical biology*, 7, 534-539.
- Cuanalo-Contreras, K., Mukherjee, A. and Soto, C. (2013) Role of Protein Misfolding and Proteostasis Deficiency in Protein Misfolding Diseases and Aging. *International journal of cell biology*, 2013, 638083.
- De Duve, C. and Wattiaux, R. (1966) Functions of lysosomes. *Annual review of physiology*, 28, 435-492.
- Dejgaard, S. Y., Murshid, A., Erman, A., Kizilay, O., Verbich, D., Lodge, R., Dejgaard, K., Ly-Hartig, T. B., Pepperkok, R., Simpson, J. C. and Presley, J. F. (2008) Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. *Journal of cell science*, 121, 2768-2781.
- Deneka, M., Neeft, M. and van der Sluijs, P. (2003) Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 38, 121-142.
- Deretic, V., Saitoh, T. and Akira, S. (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology*, 13, 722-737.
- Dobson, C. M. and Karplus, M. (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Current opinion in structural biology*, 9, 92-101.
- Durocher, D. and Jackson, S. P. (2002) The FHA domain. *FEBS letters*, 513, 58-66.
- Durocher, D., Taylor, I. A., Sarbassova, D., Haire, L. F., Westcott, S. L., Jackson, S. P., Smerdon, S. J. and Yaffe, M. B. (2000) The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Molecular cell*, 6, 1169-1182.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Buttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Breitenbach, M., Grubeck-Loebenstien, B., Herker, E., Fahrenkrog, B., Frohlich, K. U., Sinner, F., Tavernarakis, N., Minois, N., Kroemer, G. and Madeo, F. (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature cell biology*, 11, 1305-1314.
- Erlich, P. M., Lunetta, K. L., Cupples, L. A., Abraham, C. R., Green, R. C., Baldwin, C. T. and Farrer, L. A. (2012) Serum paraoxonase activity is associated with variants in the PON gene cluster and risk of Alzheimer disease. *Neurobiology of aging*, 33, 1015 e1017-1023.
- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E. M., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H. and Simonsen, A. (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *The Journal of cell biology*, 179, 485-500.
- Fire, A. (1986) Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, 5, 2673-2680.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.
- Frasa, M. A., Koessmeier, K. T., Ahmadian, M. R. and Braga, V. M. (2012) Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13, 67-73.
- Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J. (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408, 325-330.
- Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, 70, 603-647.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T. and Yoshimori, T. (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell*, 19, 2092-2100.

- Fujita, T., Ikuta, J., Hamada, J., Okajima, T., Tatematsu, K., Tanizawa, K. and Kuroda, S. (2004) Identification of a tissue-non-specific homologue of axonal fasciculation and elongation protein zeta-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 313, 738-744.
- Fukuda, M. and Itoh, T. (2008) Direct link between Atg protein and small GTPase Rab: Atg16L functions as a potential Rab33 effector in mammals. *Autophagy*, 4, 824-826.
- Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matsuura, Y., Nakanishi, H. and Takai, Y. (1997) Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *The Journal of biological chemistry*, 272, 4655-4658.
- Funderburk, S. F., Wang, Q. J. and Yue, Z. (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in cell biology*, 20, 355-362.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U. and Behl, C. (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO journal*, 28, 889-901.
- Geng, J. and Klionsky, D. J. (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO reports*, 9, 859-864.
- Gerits, N. and Moens, U. (2012) Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology*, 432, 316-326.
- Gerondopoulos, A., Bastos, R. N., Yoshimura, S., Anderson, R., Carpanini, S., Aligianis, I., Handley, M. T. and Barr, F. A. (2014) Rab18 and a Rab18 GEF complex are required for normal ER structure. *The Journal of cell biology*, 205, 707-720.
- Girard, M. and McPherson, P. S. (2008) RME-8 regulates trafficking of the epidermal growth factor receptor. *FEBS letters*, 582, 961-966.
- Girardi, J. P., Pereira, L. and Bakovic, M. (2011) De novo synthesis of phospholipids is coupled with autophagosome formation. *Medical hypotheses*, 77, 1083-1087.
- Goedert, M. and Spillantini, M. G. (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science*, 314, 777-781.
- Goldberg, A. L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426, 895-899.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36, 59-74.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 386, 463-471.
- Grosshans, B. L., Ortiz, D. and Novick, P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 11821-11827.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*, 30, 214-226.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A. and Yoshimori, T. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495, 389-393.
- Handley, M. T. and Aligianis, I. A. (2012) RAB3GAP1, RAB3GAP2 and RAB18: disease genes in Micro and Martsolf syndromes. *Biochemical Society transactions*, 40, 1394-1397.
- Handley, M. T., Morris-Rosendahl, D. J., Brown, S., Macdonald, F., Hardy, C., Bem, D., Carpanini, S. M., Borck, G., Martorell, L., Izzi, C., Faravelli, F., Accorsi, P., Pinelli, L., Basel-Vanagaite, L., Peretz, G., Abdel-Salam, G. M., Zaki, M. S., Jansen, A., Mowat, D., Glass, I., Stewart, H., Mancini, G., Lederer, D., Roscioli, T., Giuliano, F., Plomp, A. S., Rolfs, A., Graham, J. M., Seemanova, E., Poo, P., Garcia-Cazorla, A., Edery, P., Jackson, I. J., Maher, E. R. and Aligianis, I. A. (2013) Mutation spectrum in RAB3GAP1, RAB3GAP2, and RAB18 and genotype-phenotype correlations in warburg micro syndrome and Martsolf syndrome. *Human mutation*, 34, 686-696.
- Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-579.

- Hartl, F. U., Bracher, A. and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475, 324-332.
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M. and Gordon, C. (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends in biochemical sciences*, 28, 26-31.
- Hemelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M. and Ploegh, H. L. (2003) A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *The Journal of biological chemistry*, 278, 51841-51850.
- Hetz, C. (2013) The biological meaning of the UPR. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14, 404.
- Hodgkin, J. (1988) Sexual Dimorphism and Sex Determination. In: Wood, W.B. *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hu, P. J. (2007) Dauer. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.144.1, <http://www.wormbook.org>.
- Hubbard, V. M., Valdor, R., Macian, F. and Cuervo, A. M. (2012) Selective autophagy in the maintenance of cellular homeostasis in aging organisms. *Biogerontology*, 13, 21-35.
- Hutagalung, A. H. and Novick, P. J. (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews*, 91, 119-149.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K. and Mizushima, N. (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell*, 19, 5360-5372.
- Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T. and Fukuda, M. (2008) Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Molecular biology of the cell*, 19, 2916-2925.
- Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P. and Eskelinen, E. L. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science*, 117, 4837-4848.
- Johansen, T. and Lamark, T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7, 279-296.
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M. and Kim, D. H. (2009a) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*, 20, 1992-2003.
- Jung, T., Catalgol, B. and Grune, T. (2009b) The proteasomal system. *Molecular aspects of medicine*, 30, 191-296.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO journal*, 19, 5720-5728.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of cell science*, 117, 2805-2812.
- Kageyama, S., Omori, H., Saitoh, T., Sone, T., Guan, J. L., Akira, S., Imamoto, F., Noda, T. and Yoshimori, T. (2011) The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella. *Molecular biology of the cell*, 22, 2290-2300.
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D. P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 421, 231-237.
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G. and Ahringer, J. (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology*, 2, RESEARCH0002.
- Kampinga, H. H. and Craig, E. A. (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11, 579-592.
- Kaufmann, E. and Knochel, W. (1996) Five years on the wings of fork head. *Mech Dev*, 57, 3-20.

- Kawabe, H., Sakisaka, T., Yasumi, M., Shingai, T., Izumi, G., Nagano, F., Deguchi-Tawarada, M., Takeuchi, M., Nakanishi, H. and Takai, Y. (2003) A novel rabconnectin-3-binding protein that directly binds a GDP/GTP exchange protein for Rab3A small G protein implicated in Ca(2+)-dependent exocytosis of neurotransmitter. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 8, 537-546.
- Kern, A., Ackermann, B., Clement, A. M., Duerk, H. and Behl, C. (2010) HSF1-controlled and age-associated chaperone capacity in neurons and muscle cells of *C. elegans*. *PloS one*, 5, e8568.
- Kikis, E. A., Gidalevitz, T. and Morimoto, R. I. (2010) Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Advances in experimental medicine and biology*, 694, 138-159.
- Kim, H. J., Zhong, Q., Sheng, Z. H., Yoshimori, T., Liang, C. and Jung, J. U. (2012) Beclin-1-interacting autophagy protein Atg14L targets the SNARE-associated protein Snapin to coordinate endocytic trafficking. *Journal of cell science*, 125, 4740-4750.
- Kimura, S., Noda, T. and Yoshimori, T. (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell structure and function*, 33, 109-122.
- Kipreos, E. T. and Pagano, M. (2000) The F-box protein family. *Genome biology*, 1, REVIEWS3002.
- Kirkin, V., Lamark, T., Johansen, T. and Dikic, I. (2009) NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy*, 5, 732-733.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. and Ohsumi, Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell*, 5, 539-545.
- Klionsky, D. J., Cuervo, A. M., Dunn, W. A., Jr., Levine, B., van der Klei, I. and Seglen, P. O. (2007) How shall I eat thee? *Autophagy*, 3, 413-416.
- Klionsky, D. J. and Emr, S. D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290, 1717-1721.
- Kobayashi, S., Yoneda-Kato, N., Itahara, N., Yoshida, A. and Kato, J. Y. (2013) The COP1 E3-ligase interacts with FIP200, a key regulator of mammalian autophagy. *BMC biochemistry*, 14, 1.
- Kristensen, A. R., Schandorff, S., Hoyer-Hansen, M., Nielsen, M. O., Jaattela, M., Dengjel, J. and Andersen, J. S. (2008) Ordered organelle degradation during starvation-induced autophagy. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 7, 2419-2428.
- Kroemer, G., Marino, G. and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, 40, 280-293.
- Kubota, H. (2009) Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. *J Biochem*, 146, 609-616.
- Kuma, A. and Mizushima, N. (2010) Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*, 21, 683-690.
- Kuroda, S., Nakagawa, N., Tokunaga, C., Tatematsu, K. and Tanizawa, K. (1999) Mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* UNC-76 protein involved in axonal outgrowth is a protein kinase C zeta-interacting protein. *The Journal of cell biology*, 144, 403-411.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamb, C. A., Yoshimori, T. and Tooze, S. A. (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14, 759-774.
- Lee, S. J., Yook, J. S., Han, S. M. and Koo, H. S. (2004) A Werner syndrome protein homolog affects *C. elegans* development, growth rate, life span and sensitivity to DNA damage by acting at a DNA damage checkpoint. *Development*, 131, 2565-2575.
- Li, L. and Chin, L. S. (2003) The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60, 942-960.

- Liang, C., Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C. and Jung, J. U. (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology*, 10, 776-787.
- Liegel, R. P., Handley, M. T., Ronchetti, A., Brown, S., Langemeyer, L., Linford, A., Chang, B., Morris-Rosendahl, D. J., Carpanini, S., Posmyk, R., Harthill, V., Sheridan, E., Abdel-Salam, G. M., Terhal, P. A., Faravelli, F., Accorsi, P., Giordano, L., Pinelli, L., Hartmann, B., Ebert, A. D., Barr, F. A., Aligianis, I. A. and Sidjanin, D. J. (2013) Loss-of-function mutations in TBC1D20 cause cataracts and male infertility in blind sterile mice and Warburg micro syndrome in humans. *American journal of human genetics*, 93, 1001-1014.
- Lipatova, Z., Belogortseva, N., Zhang, X. Q., Kim, J., Taussig, D. and Segev, N. (2012) Regulation of selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6981-6986.
- Longatti, A., Lamb, C. A., Razi, M., Yoshimura, S., Barr, F. A. and Tooze, S. A. (2012) TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *The Journal of cell biology*, 197, 659-675.
- Longatti, A. and Tooze, S. A. (2009) Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell death and differentiation*, 16, 956-965.
- Lutcke, A., Parton, R. G., Murphy, C., Olkkonen, V. M., Dupree, P., Valencia, A., Simons, K. and Zerial, M. (1994) Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression. *Journal of cell science*, 107 (Pt 12), 3437-3448.
- Martin, S., Driessen, K., Nixon, S. J., Zerial, M. and Parton, R. G. (2005) Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *The Journal of biological chemistry*, 280, 42325-42335.
- Mayer, M. P. (2010) Gymnastics of molecular chaperones. *Molecular cell*, 39, 321-331.
- McKnight, N. C., Jefferies, H. B., Alemu, E. A., Saunders, R. E., Howell, M., Johansen, T. and Tooze, S. A. (2012) Genome-wide siRNA screen reveals amino acid starvation-induced autophagy requires SCOC and WAC. *The EMBO journal*, 31, 1931-1946.
- Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., Hall, D. H. and Levine, B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, 301, 1387-1391.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science*, 116, 1679-1688.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. and Klionsky, D. J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 1069-1075.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 273, 33889-33892.
- Mizushima, N. and Yoshimori, T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3, 542-545.
- Morawe, T., Hiebel, C., Kern, A. and Behl, C. (2012) Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 46, 41-54.
- Morita, M., Osoda, K., Yamazaki, M., Shirai, F., Matsuoka, N., Arakawa, H. and Nishimura, S. (2009) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on Abeta deposition in Abeta(1-42) transgenic *C. elegans*. *Brain Res*, 1295, 186-191.
- Morley, J. F., Brignull, H. R., Weyers, J. J. and Morimoto, R. I. (2002) The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10417-10422.

- Morley, J. F. and Morimoto, R. I. (2004) Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Molecular biology of the cell*, 15, 657-664.
- Muller, M., Pym, E. C., Tong, A. and Davis, G. W. (2011) Rab3-GAP controls the progression of synaptic homeostasis at a late stage of vesicle release. *Neuron*, 69, 749-762.
- Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H. and Toda, T. (2007) A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nature structural & molecular biology*, 14, 332-340.
- Nagano, F., Sasaki, T., Fukui, K., Asakura, T., Imazumi, K. and Takai, Y. (1998) Molecular cloning and characterization of the noncatalytic subunit of the Rab3 subfamily-specific GTPase-activating protein. *The Journal of biological chemistry*, 273, 24781-24785.
- Noda, T. and Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 273, 3963-3966.
- Novick, P., Field, C. and Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21, 205-215.
- Oishi, H., Sasaki, T., Nagano, F., Ikeda, W., Ohya, T., Wada, M., Ide, N., Nakanishi, H. and Takai, Y. (1998) Localization of the Rab3 small G protein regulators in nerve terminals and their involvement in Ca²⁺-dependent exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 273, 34580-34585.
- Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y. (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annual review of neuroscience*, 30, 575-621.
- Ouyang, C., You, J. and Xie, Z. (2014) The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 71, 71-80.
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H. and Fujimoto, T. (2005) Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *Journal of cell science*, 118, 2601-2611.
- Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M. and Lambright, D. G. (2006) TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature*, 442, 303-306.
- Perez-Victoria, F. J., Schindler, C., Magadan, J. G., Mardones, G. A., Delevoe, C., Romao, M., Raposo, G. and Bonifacio, J. S. (2010) Ang2/fat-free is a conserved subunit of the Golgi-associated retrograde protein complex. *Molecular biology of cell*, 21, 3386-3395.
- Peters, T. W., Rardin, M. J., Czerwiec, G., Evani, U. S., Reis-Rodrigues, P., Lithgow, G. J., Mooney, S. D., Gibson, B. W. and Hughes, R. E. (2012) Tor1 regulates protein solubility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 23, 4679-4688.
- Pfeffer, S. R. (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends in cell biology*, 11, 487-491.
- Pochynyuk, O., Stockand, J. D. and Staruschenko, A. (2007) Ion channel regulation by Ras, Rho, and Rab small GTPases. *Exp Biol Med (Maywood)*, 232, 1258-1265.
- Popovic, D., Akutsu, M., Novak, I., Harper, J. W., Behrends, C. and Dikic, I. (2012) Rab GTPase-activating proteins in autophagy: regulation of endocytic and autophagy pathways by direct binding to human ATG8 modifiers. *Molecular and cellular biology*, 32, 1733-1744.
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W. and Balch, W. E. (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual review of biochemistry*, 78, 959-991.
- Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B. E., Thomae, N. H., Constantinescu, A. T., Brunsveld, L., Watzke, A., Waldmann, H., Goody, R. S. and Alexandrov, K. (2006) Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *The EMBO journal*, 25, 13-23.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. and Rubinsztein, D. C. (2010a) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology*, 12, 747-757.
- Ravikumar, B., Moreau, K. and Rubinsztein, D. C. (2010b) Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*, 6, 1184-1186.

- Ryter, S. W., Koo, J. K. and Choi, A. M. (2014) Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 17, 329-337.
- Sakane, A., Manabe, S., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Kiyokage, E., Toida, K., Yoshida, T., Miyoshi, J., Kamiya, H., Takai, Y. and Sasaki, T. (2006) Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 10029-10034.
- Salminen, A. and Novick, P. J. (1987) A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell*, 49, 527-538.
- Samara, C., Syntichaki, P. and Tavernarakis, N. (2008) Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell death and differentiation*, 15, 105-112.
- Sanchez, I., Mahlke, C. and Yuan, J. (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature*, 421, 373-379.
- Sasidharan, N., Sumakovic, M., Hannemann, M., Hegermann, J., Liewald, J. F., Olendrowitz, C., Koenig, S., Grant, B. D., Rizzoli, S. O., Gottschalk, A. and Eimer, S. (2012) RAB-5 and RAB-10 cooperate to regulate neuropeptide release in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 18944-18949.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrach, H. and Wanker, E. E. (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, 90, 549-558.
- Schluter, O. M., Basu, J., Sudhof, T. C. and Rosenmund, C. (2006) Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26, 1239-1246.
- Schluter, O. M., Schmitz, F., Jahn, R., Rosenmund, C. and Sudhof, T. C. (2004) A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24, 6629-6637.
- Schroder, M. and Kaufman, R. J. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutation research*, 569, 29-63.
- Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H. and Dikic, I. (2013) Ubiquitination and selective autophagy. *Cell death and differentiation*, 20, 21-30.
- Shoulson, I. and Young, A. B. (2011) Milestones in huntington disease. *Mov Disord*, 26, 1127-1133.
- Shvets, E., Fass, E., Scherz-Shouval, R. and Elazar, Z. (2008) The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *Journal of cell science*, 121, 2685-2695.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M. and Czaja, M. J. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458, 1131-1135.
- Sou, Y. S., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. and Komatsu, M. (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Molecular biology of the cell*, 19, 4762-4775.
- Sowa, M. E., Bennett, E. J., Gygi, S. P. and Harper, J. W. (2009) Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*, 138, 389-403.
- Spang, N., Feldmann, A., Huesmann, H., Bekbulat, F., Schmitt, V., Hiebel, C., Koziollek-Drechsler, I., Clement, A. M., Moosmann, B., Jung, J., Behrends, C., Dikic, I., Kern, A. and Behl, C. (2014) RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy. *Autophagy*, 0.
- Spillantini, M. G. and Goedert, M. (2000) The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920, 16-27.
- Star, E. N., Newton, A. J. and Murthy, V. N. (2005) Real-time imaging of Rab3a and Rab5a reveals differential roles in presynaptic function. *The Journal of physiology*, 569, 103-117.

- Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10, 513-525.
- Stenmark, H. and Olkkonen, V. M. (2001) The Rab GTPase family. *Genome biology*, 2, REVIEWS3007.
- Stiernagle, T. (1999) Maintenance of *C. elegans*. *Wormbook*, ed. The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.
- Strauss, H. M. and Keller, S. (2008) Pharmacological interference with protein-protein interactions mediated by coiled-coil motifs. *Handbook of experimental pharmacology*, 461-482.
- Stromhaug, P. E. and Klionsky, D. J. (2001) Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic*, 2, 524-531.
- Su, C. W., Tharin, S., Jin, Y., Wightman, B., Spector, M., Meili, D., Tsung, N., Rhiner, C., Bourikas, D., Stoeckli, E., Garriga, G., Horvitz, H. R. and Hengartner, M. O. (2006) The short coiled-coil domain-containing protein UNC-69 cooperates with UNC-76 to regulate axonal outgrowth and normal presynaptic organization in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of biology*, 5, 9.
- Sulston, J. E. and Horvitz, H. R. (1977) Post-Embryonic Cell Lineages of Nematode, *Caenorhabditis-Elegans*. *Dev Biol*, 56, 110-156.
- Szatmari, Z. and Sass, M. (2014) The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: A review. *Autophagy*, 10, 1154-1166.
- Szodorai, A., Kuan, Y. H., Hunzelmann, S., Engel, U., Sakane, A., Sasaki, T., Takai, Y., Kirsch, J., Muller, U., Beyreuther, K., Brady, S., Morfini, G. and Kins, S. (2009) APP anterograde transport requires Rab3A GTPase activity for assembly of the transport vesicle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29, 14534-14544.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F. and Jahn, R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127, 831-846.
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of cell biology*, 119, 301-311.
- Takeshita, D., Zenno, S., Lee, W. C., Nagata, K., Saigo, K. and Tanokura, M. (2007) Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer. *Journal of molecular biology*, 374, 106-120.
- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y. and Kominami, E. (1999) Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Molecular biology of the cell*, 10, 1367-1379.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T. and 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. *The Journal of biological chemistry*, 276, 1701-1706.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36, 2503-2518.
- Tasaka, K., Masumoto, N., Mizuki, J., Ikebuchi, Y., Ohmichi, M., Kurachi, H., Miyake, A. and Murata, Y. (1998) Rab3B is essential for GnRH-induced gonadotrophin release from anterior pituitary cells. *J Endocrinol*, 157, 267-274.
- Todde, V., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J. (2009) Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1792, 3-13.
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 333, 169-174.
- Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D. and Hetz, C. (2013) When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et biophysica acta*, 1833, 3507-3517.

- van Ham, T. J., Holmberg, M. A., van der Goot, A. T., Teuling, E., Garcia-Arencibia, M., Kim, H. E., Du, D., Thijssen, K. L., Wiersma, M., Burggraaff, R., van Bergeijk, P., van Rheenen, J., Jerre van Veluw, G., Hofstra, R. M., Rubinsztein, D. C. and Nollen, E. A. (2010) Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell*, 142, 601-612.
- Vazquez-Martinez, R., Cruz-Garcia, D., Duran-Prado, M., Peinado, J. R., Castano, J. P. and Malagon, M. M. (2007) Rab18 inhibits secretory activity in neuroendocrine cells by interacting with secretory granules. *Traffic*, 8, 867-882.
- Velikkakath, A. K., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N. and Mizushima, N. (2012) Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Molecular biology of the cell*, 23, 896-909.
- Vilarino-Guell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J., Yu, I., Encarnacion, M., Munsie, L. N., Tapia, L., Gustavsson, E. K., Chou, P., Tatarnikov, I., Evans, D. M., Pishotta, F. T., Volta, M., Beccano-Kelly, D., Thompson, C., Lin, M. K., Sherman, H. E., Han, H. J., Guenther, B. L., Wasserman, W. W., Bernard, V., Ross, C. J., Appel-Cresswell, S., Stoessl, A. J., Robinson, C. A., Dickson, D. W., Ross, O. A., Wszolek, Z. K., Aasly, J. O., Wu, R. M., Hentati, F., Gibson, R. A., McPherson, P. S., Girard, M., Rajput, M., Rajput, A. H. and Farrer, M. J. (2014) DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Human molecular genetics*, 23, 1794-1801.
- Wang, Y., Li, Y. B., Yin, J. J., Wang, Y., Zhu, L. B., Xie, G. Y. and Pan, S. H. (2013) Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes. *Autophagy*, 9, 272-277.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V. and Elazar, Z. (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO journal*, 29, 1792-1802.
- Wu, Y., Wu, Z., Butko, P., Christen, Y., Lambert, M. P., Klein, W. L., Link, C. D. and Luo, Y. (2006) Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26, 13102-13113.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R. and 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. *Cell structure and function*, 23, 33-42.
- Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 335, 1-32.
- Zerial, M. and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2, 107-117.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β -Peptid
A β 42	Spezifizierung von A β bezüglich seiner Gesamtzahl von Aminosäuren
ATG3 / ATG7	<i>Autophagy-related protein 3 / Autophagy-related protein 7</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles' medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
eV	Leervektor (<i>empty Vector</i>)
FEZ1	<i>Fasciculation and elongation protein zeta-1</i>
FEZ2	<i>Fasciculation and elongation protein zeta-2</i>
FBS	Fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
g	Erdbeschleunigung, g = 9,81 m/s ²
GABARAP	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>
GFP	Grünfluoreszierendes Protein (<i>green fluorescence protein</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
HEK293a	Humane embryonale Nierenzelle (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HSP110	<i>Heat shock protein 110</i>
IMR-90	Primäre humane Fibroblasten
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
L1-L4	Larvalstadium 1 bis 4 von <i>C. elegans</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC3/ATG8	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 (MAP1LC3)</i>
LGG-1	ATG8 (LC3, GABARAP oder GATE-16 Familie) in <i>C. elegans</i>
Luc	Luziferase
min	Minute
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NGM-Platten	Agarplatten zur Kultivierung von <i>C. elegans</i> (<i>nematode growth medium</i>)
p62/SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Q35	Polypeptid mit 35 Glutamin / Polyglutamin
RAB3	<i>Ras-related protein Rab-3</i>
RFP	Rotfluoreszierendes Protein (<i>red fluorescence protein</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RAB3GAP1 / rbg-1	<i>Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit</i>
RAB3-GAP2 / rbg-2	<i>Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit</i>
RPL21	<i>60S ribosomal protein L21</i>
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
sec	Sekunde
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOC-Medium	komplexes Bakteriennährmedium (<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>)
U	Einheit (<i>unit</i>)
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Chaperone, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und Autophagie dienen zur Aufrechterhaltung der Proteostase und als die wichtigsten Komponenten für den Abbau von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen	2
Abbildung 2: Schema des Autophagieweges in Säugerzellen am Beispiel der Makroautophagie... ..	5
Abbildung 3: Eine schematische Darstellung der autophagosomalen Abbauwege mit den lysosomalen / vakuolären Systemen: das Modell zeigt Aspekte von Hefen und höheren Eukaryonten.....	6
Abbildung 4: Illustration der Regulationswege sowie den Hauptphasen des makroautophagischen Abbaus.....	7
Abbildung 5: Zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme sind für die Autophagie erforderlich.....	8
Abbildung 6: Intrazelluläre Vesikeltransportwege und die Lokalisierung von ausgewählten RABs	11
Abbildung 7: Der zyklische Verlauf der RAB-Aktivierung und Inaktivierung.....	12
Abbildung 8: Anatomie von <i>C. elegans</i>	17
Abbildung 9: Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	18
Abbildung 10: RNA-Interferenz (RNAi) ist ein komplexer molekularbiologischer Mechanismus, bei dem Gene stillgelegt werden (<i>Gene Silencing</i>).....	19
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Nematoden <i>C. elegans</i> mit Luc::GFP-Expression in Muskelzellen.....	48
Abbildung 12: Mikroskopische Aufnahmen von <i>C. elegans</i> , die Luc::GFP im Muskel exprimieren, nach Hitzeschock.....	49
Abbildung 13: Ausschnitt aus der Excel-Tabelle der auffälligen RNAi-Klone aus der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse.....	50
Abbildung 14: Auswertung der RNAi-vermittelten Proteostase-Analyse in <i>C. elegans</i>	51
Abbildung 15: Diagramm der näheren Charakterisierung ausgewählter neuer Modulatoren der Proteinstabilität in verschiedenen <i>C. elegans</i> -Modellsystemen.	52
Abbildung 16: AM140-Würmer exprimieren ein Polypeptid von 35 Glutaminresten, das an gelb-fluoreszierendes Protein fusioniert ist.	53
Abbildung 17: Veränderte Aggregation von PolyQ35::YFP nach Herunterregulation verschiedener Gene mittels RNAi.....	55

Abbildung 18: Neue Modulatoren der Proteostase verändern die Paralyse von CL2006-Würmern: A β 42-Aggregation im Muskel von CL2006-Würmern führt zu einem Paralyse-Phänotyp.....	59
Abbildung 19: RNAi-vermittelter RBG-1 und RBG-2-Verlust fördert die Aggregation von A β 42 in CL2006-Würmern.....	61
Abbildung 20: RNAi-vermittelter Verlust von RBG-1 und RBG-2 stört die Autophagie.....	63
Abbildung 21: Herunterregulation von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen.....	66
Abbildung 22: Herunterregulation von RAB3GAP1/2 zeigte Effekte auf die Autophagie in IMR90-Zellen.....	67
Abbildung 23 (folgende Seite): Konfokale Aufnahmen von HEK293a-Zellen, die stabil das ptfLC3-Plasmid tragen und dadurch GFP- und RFP-gekoppeltes LC3 exprimieren.....	69
Abbildung 24: Konfokale Aufnahmen von LC3- und p62/SQSTM1-Immunfärbung in IMR90-Fibroblasten.....	71
Abbildung 25: Überexpression von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen.....	73
Abbildung 26: Überexpression von RAB3GAP1 und RAB3GAP2 zeigte Effekte auf die Autophagie in IMR90-Fibroblasten.....	74
Abbildung 27 (folgende Seite): Herunterregulation von RAB3A-D zeigte keine Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen.....	75
Abbildung 28: Herunterregulation von RAB3A-D zeigte keine Effekte auf die Autophagie in IMR90-Fibroblasten.....	78
Abbildung 29: Proteom-Analyse von FEZ1, RAB3GAP1 und RAB3GAP2.....	81
Abbildung 30: Herunterregulation von FEZ1 und FEZ2 zeigte Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen.....	83
Abbildung 31: Überexpression von FEZ1 und FEZ2 zeigte Effekte auf die Autophagie in HEK293a-Zellen.....	84
Abbildung 32: Herunterregulation von FEZ1/2 und RAB3GAP1/2 zeigte Effekte auf die Autophagie in IMR90-Fibroblasten.....	85
Abbildung 33: Überexpression von FEZ1/2 und RAB3GAP1/2 zeigte Effekte auf die Autophagie in IMR90-Fibroblasten.....	86
Abbildung 34: Übersichtsbild über die Funktionen von RA3GAP1 und RAB3GAP2 im Säugersystem.....	91

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Geräte	22
Tabelle 2: Verwendete Kits	24
Tabelle 3: Bakteriennährmedien	24
Tabelle 4: Puffer und Lösungen zur Benutzung in der <i>Caenorhabditis elegans</i> -Kultivierung.....	25
Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Benutzung in der Säugerzell-Kultivierung	26
Tabelle 6: Puffer und Lösungen für biochemische Methoden	26
Tabelle 7: Puffer für molekularbiologische Methoden	27
Tabelle 8: Namen und Genotypen der verwendeten Bakterienstämme	27
Tabelle 9: Namen und Genotypen der verwendeten Wurmlinien.....	28
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien	28
Tabelle 11: Plasmide zur Expression des RNAi von <i>C. elegans</i> in <i>E. coli</i>	28
Tabelle 12: Überexpression in humanen Zellen.....	28
Tabelle 13: Verwendete siRNA in humanen Zellen.....	29
Tabelle 14: Quantitative Echtzeit-PCR-Primer in <i>C. elegans</i>	29
Tabelle 15: quantitative Echtzeit-PCR-Primer in humanen Zellen	30
Tabelle 16: Primer zur Klonierung von <i>rbg-2</i> in <i>C. elegans</i>	30
Tabelle 17: Antikörper für die Immunopräzipitationen und Western-Blot-Analysen:	31
Tabelle 18: Im AM140-Wurmsystem untersuchte RNAi-Klone des Chromosom I.....	54
Tabelle 19: Nähere Charakterisierung ausgewählter RNAi-Klone, die die Aggregation von PolyQ35::YFP nach Herunterregulation beeinflussten	56

7.4. Auffällige RNAi-Klone aus der Hochdurchsatzanalyse des Chromosoms I in *C. elegans*

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-1-A10	M01D7.1; <i>F-box protein</i>	Nein	Ubiquitinierung		Proteostase
I-1-B17	W05F2.4; Proteoglycan 4	Ja		Schmierung innerhalb gelenkiger Verbindungen	Strukturproteine
I-1-C01	F53G12.6 (<i>spe-8</i>); Tyrosine-protein kinase Fer	Ja	<i>defective Spermatogenesis</i> : Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, Spermatogenese	Tyrosin-Protein Kinase; Aktin-Zytoskelett, Mikrotubuli, Lamellipodien-Bildung, u.a.	Signaltransduktion
I-1-C16	W03F11.5 (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-D05	K03E5.1 (<i>neto-1</i>); Neuropilin and tolloid-like protein 2	Ja	<i>NETO (Neuropilin and Tolloid-like) homolog</i>	Modulatorische Untereinheit des neuronalen Kainat-sensitive Glutamat-Rezeptoren	Signaltransduktion
I-1-D16	E01A2.10 (<i>poml-3</i>); serum paraoxonase/arylesterase 2	Ja	<i>PON (paraoxonase) and MEC-6 Like</i>	Antwort auf oxidativen Stress	Oxidativer Stress / Elektronentransport
I-1-D20	E01A2.4 (<i>let-504</i>); NF-kappa-B-activating protein	Ja	<i>Lethal-504: Progression des mittleren Larvenstadiums</i>	Transkriptions-Repressor	Genexpression
I-1-E02	F23C8.5; Electron transfer flavoprotein subunit beta	Ja		spezifischer Elektronenakzeptor für mehrere Dehydrogenasen	Elektronentransport
I-1-E07	R119.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-E08	F23C8.8; Serine/threonine-protein kinase MARK1	Ja		Zellpolarität und Dynamik der Mikrotubuli	Signaltransduktion
I-1-E09	R119.2; Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3	Ja		Freisetzung von N-terminalen Aminosäuren	Post-translationale Modifikation
I-1-E19	R119.7 (<i>rnp-8</i>); <i>RNP (RRM RNA binding domain) containing</i>	Nein	<i>RNP (RRM RNA binding domain) containing</i>		Genexpression
I-1-E20	C55C2.2 (<i>ssp-19</i>); <i>Sperm Specific family, class P</i>	Nein	<i>Sperm Specific family, class P</i>		Unbekannte Funktion
I-1-F01	T28F2.7 (<i>acd-5</i>); Amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal	Ja	<i>Acid-sensitive Degenerin</i>	Kationen-Kanal mit hoher Affinität für Natrium	Kanal- und Transportproteine
I-1-F03	T28F2.8 (<i>col-51</i>); Collagen alpha-1(I) chain	Ja	<i>Collagen</i> : Kutikulakollagen	spezifisch für Knorpelgewebe	Strukturproteine
I-1-F11	D1037.4 (<i>rab-8</i>); Ras-related protein Rab-8B	Ja	<i>RAB family</i> : Rab verwandtes Protein der Ras-GTPase-Superfamilie	Schlüsselregulatoren des intrazellulären Membrantransports	Signaltransduktion
I-1-G13	F56A6.2 (<i>hum-7</i>); Myosin-IXa	Ja	<i>Heavy chain, Unconventional Myosin</i> : unkonventionelle schwere Kette des Myosins	Myosine sind Aktin-basierte Motor-Moleküle mit ATPase-Aktivität; intrazelluläre Bewegung	Signaltransduktion
I-1-G16	Y23H5A.4 (<i>spe-47</i>); <i>defective Spermatogenesis</i>	Nein	<i>defective Spermatogenesis</i>		Unbekannte Funktion
I-1-G24	F40E3.2 (<i>mage-1</i>); Melanoma-associated antigen	Ja	<i>Melanoma-Associated- antigen Homolog</i> : Einziges <i>C. elegans</i> Homolog des Säuger-Typl-Melanom-Antigens	hemmt die Zellzyklus-Progression und die Zellvermehrung	Zellzykluskontrolle
I-1-H03	T12F5.3 (<i>glh-4</i>); Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4	Ja	<i>Germ Line Helicase</i> : mögliche Keimbahn-RNA-Helikase	Mögliche Funktion bei Keimzellentwicklung und Beweglichkeit der Spermien	Genexpression
I-1-H10	R12E2.15; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-H12	C18E3.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-H17	C32E8.1; E3 ubiquitin-protein ligase TRIM23	Ja		E3 ubiquitin-protein Ligase	Proteostase
I-1-H18	C18E3.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-H21	C32E8.3; Tubulin polymerization-promoting protein family member 2	Ja		Mikrotubulibündel-Bildung	Strukturproteine

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-1-H24	C18E3.7 (ppw-1); Protein argonaute-3	Ja	PAZ/PIWI domain-containing: PAZ (PIWI/Argonaut/Zwille) / PIWI-Domänen- Protein	RNA-vermitteltes Gen-Silencing (RNAi)	Genexpression
I-1-I11	Y95B8A.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-I20	F32B5.8 (cpz-1); Cathepsin Z	Ja	Cathepsin Z: Homolog von Cathepsin z-like Cystein-Protease	Carboxy-monopeptidase / Carboxy-Dipeptidaseaktivität	Protein-Modifikation
Y95B8A.8	Y95B8A.8; Zinc finger RNA-binding protein 2	Ja		möglicherweise an posttranskriptionaler Verarbeitung beteiligt (mRNA-Spleißen)	Genexpression
I-1-J06	C43E11.1 (acin-1); apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus isoform 2	Ja	Acinus homolog: induziert apoptotische Chromatin-Kondensation	Spleißen	Genexpression
I-1-J11	C32E8.10 (unc-11); Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	Ja	Uncoordinated: Clathrin-Adapterprotein AP180, das in der Clathrin-vermittelte Endozytose fungiert	rekrutiert Clathrin und Adapterprotein-Komplex 2 (AP2) zu Membranen und Vesikeln	Signaltransduktion
I-1-J23	F53F10.5 (npp-11); Mucin-5AC	Ja	Nuclear Pore Complex Protein	Gel-bildendes Glykoprotein von Magen- und Atemwege (Schleimhaut)	Strukturproteine
I-1-J24	C43E11.10 (cdc-6); Cell division control protein 6 homolog	Ja	Cell Division Cycle related: Homolog eines CDC6, Hefe: Beginn der DNA-Replikation	Initiierung der DNA-Replikation: Checkpoint, DNA-Replikation abgeschlossen bevor Mitose	DNA-Reparatur/Replikation
I-1-K02	W03D8.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-K05	Y95B8A.10 (pde-6); High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A	Ja	3'-5'-cAMP-Phosphodiesterase: homolog zu der PDE8-Enzymfamilie in Säugern	Hydrolysiert das second messenger cAMP	Signaltransduktion
I-1-K08	W03D8.6 (itx-1); Isoform 1 of Contactin-associated protein-like 2	Ja	Intestinal Neurexin-like: Caspr Proteine gehören zur Superfamilie der Neurexine; Zell-Zell-Kontakten	Erregungsleitung von Nervenimpulsen in markhaltigen Nervenfasern	Strukturproteine
I-1-K11	Y95B8A.6; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekanntes Protein
I-1-K18	W10C8.1 (ccb-2); voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-4	Ja	Calcium Channel, Beta subunit: Beta-Untereinheit eines spannungsabhängigen Kalziumkanals	Erhöhung des maximalen Kalzium-Stroms; G-Protein-Hemmung u.a.	Signaltransduktion
I-1-L06	Y47D9A.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-L23	C50F2.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-M23	R06A10.2 (gsa-1); Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	Ja	G protein, Subunit Alpha: G-alpha-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins; L1: Bewegung / Eiablage	Moduliert Transmembransignalsysteme; hormonelle Regulation der Adenylatcyclase	Signaltransduktion
I-1-M24	K09H9.3 (col-49); Collagen alpha-1(V) chain	Ja	Kutikulakollagen	spezifisch für Knorpelgewebe	Strukturproteine
I-1-N04	ZK973.8; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-N07	C50F2.5; Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 20 (Mus musculus)	Ja		Signalübertragung von der Zelloberfläche zum Zellkern	Signaltransduktion
I-1-N08; I-1-N10; I-1-N12	ZK973.6 (anc-1); Nesprin-1	Ja	abnormal nuclear Anchorage: Positionierung der Kerne und Mitochondrien innerhalb des Zytoskeletts	Verbindungsnetz zwischen Organellen und Aktin-Zytoskeletts (subzelluläre räumliche Organisation)	Strukturproteine
I-1-O01	R06A10.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-O04	K09H9.5; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-O06	K09H9.6 (lpd-6); Suppressor of SWI4 1 homolog	Ja	Lipid Depleted: rRNA-bindendes Protein, ortholog zu Drosophila Peter Pan und S. cerevisiae SSF1 SSF2	Rolle im Zellwachstum	Genexpression
I-1-O14	W01B11.1; (unbekanntes Protein)	Nein	Nucleolar protein implicated in ribosome biogenesis (S. cerevisiae)		Unbekannte Funktion

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-1-O19	Y92H12BR.8 (mrpl-15); 39S ribosomal protein L15, mitochondrial	Ja	Mitochondrial Ribosomal Protein, Large: Großes mitochondriales ribosomales Protein	39S ribosomales Protein L15, mitochondrial	Genexpression
I-1-O20	W01B11.5 (pqn-72); Mucin-2	Ja	Prion-like-(Q/N-rich)- domain-bearing protein: Glutamin / Asparagin (Q / N)-reiche ("Prion")-Domäne	bedeckt die Epithelien von Darm, Atemwegen und anderen Schleimhäuten	Strukturproteine
I-1-O22	W01B11.6; (unbekanntes Enzym)	Nein	Zytoplasmatisches Isoenzym des Thioredoxin-Systems (<i>S. cerevisiae</i>) oxidative/reduktiver Stress		Oxidativer Stress / Elektronentransport
I-1-P13	F47B3.2; Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	Ja		Moduliert Signale der Tyrosin-phosphorylierten Zelloberflächenrezeptoren	Signaltransduktion
I-1-P15	F47B3.3; Plasmolipin	Ja		Scheint an der Myelinisierung beteiligt, könnte auch im Ionentransport beteiligt sein	Signaltransduktion
I-1-P20	C41D11.6; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-1-P23	F47B3.7; cDNA FLJ60320, similar to Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	Ja		Signalübertragung von der Zelloberfläche zum Zellkern	Signaltransduktion
I-1-P24	C41D7.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-B01	F27C1.13; Oxygen-regulated protein 1	Ja		Mikrotubuli-assoziiertes Protein, reguliert die Stabilität und Länge der Mikrotubuli	Signaltransduktion
I-2-B04	C34G6.2 (tyr-4); Tyrosinase	Ja	Tyrosinase	kupferhaltige Oxidase, zur Bildung von Pigmenten wie Melanin u.a. Polyphenol-verb.	Signaltransduktion
I-2-B10	C34G6.5 (cdc-7); Cell division cycle 7-related protein kinase	Ja	Cell Division Cycle related: Zellzyklus/-teilung	unterdrückt Phosphorylierung kritischer Substrate, (G1/S-Phasenübergang / DNA-Repl.)	Zellzykluskontrolle
I-2-C13	D1007.15; Uncharacterized protein KIAA0195	Ja			Unbekannte Funktion
I-2-C20	Y110A7A.16 (elpc-1); Elongator complex protein 1	Ja	Elongator complex Protein Component: Ortholog zu Inhibitor von Kappa- Light-Polypeptidgens-Verstärker	Untereinheit des RNA-Polymerase II Elongator Komplex	Genexpression
I-2-C22	Y110A7A.13 (chp-1); Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	Ja	CHORD Protein: zwei CHORD Domänen; embryonale Polarität, Keimbahn-entwicklung, Vulva-Entwicklung	mögliches Co-Chaperon von HSP90 über NOD1	Proteostase
I-2-C23	C44E4.5; Isoform 1 of NudC domain-containing protein 1	Ja		Immunsystem / Chronisches myeloisches Leukämie Tumorantigen 66	Unbekannte Funktion
I-2-D07	F59A3.5 (rpa-3); replication protein A homolog	Nein	Replication Protein A homolog: Ortholog einer Replikationsprotein A (RPA)-Untereinheit		Genexpression
I-2-E13	B0041.5; (Unbekanntes Protein)	Ja	Transmembrantransporter; ähnlich F5-Unterfamilie der SLC35F5-Proteine (Nukleotid-Zucker-Transporter)	nicht charakterisiertes Protein	Kanal- und Transportproteine
I-2-E14	Y110A7A.8 (prp-31); U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	Ja	yeast PRP (splicing factor) related; Ortholog des menschlichen Gen U4/U6	prä-mRNA-Spleißen; Bildung des tri-snRNP U4/U5/U6 Komplex, Bausteine Spleißosoms	Genexpression
I-2-E19	T04D1.2; (unbekanntes Protein)	Nein	enthält eine F-Box; Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Homologen des Hefe SKP-1p u.a.		Signaltransduktion
I-2-F05	M01E11.1; Protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase	Ja		Katalysiert die posttranslationale Methylierung von isoprenylierten C-terminalen Cystein-Resten	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-F18	C06A5.10; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-F20	B0025.1 (vps-34); Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	Ja	related to yeast Vacuolar Protein Sorting factor: Ortholog des PI-3-K VPS34 in <i>S. cerevisiae</i> ; Endocytose	Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die PtdIns (4,5) P2 zu PIP3 phosphoryliert	Signaltransduktion
I-2-G02	F56A3.1 (fncm-1); FANCM (Fanconi anemia complex component M homolog)	Nein	FANCM (Fanconi anemia complex component M homolog)		Unbekannte Funktion

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-2-G03	W09C3.2; 52 kDa protein	Ja		pre-mRNA processing factor 38B	Genexpression
I-2-G05	W09C3.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-G07	W09C3.4; DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC6	Ja		DNA-abhängige RNA-Polymerase	Genexpression
I-2-G08	F56A3.4 (spd-5); Centromere-associated protein E / Early endosome antigen 1	Ja	<i>Spindle Defective</i> : Coiled-Coil-Domänen; Centrosomen-Reifung, Symmetrie, pronukleäre Migration, u.a.	Chromosomalen Stabilität durch Stabilisierung der Mikrotubuli am Kinetochor	Zellzykluskontrolle
I-2-G14	C32E12.3 (osr-1); osmotic stress resistant	Nein	<i>Osmotic Stress Resistant</i>		Unbekannte Funktion
I-2-H01	F46F11.4 (ubl-5); Ubiquitin-like protein 5	Ja	Ubiquitin-artiges Protein ortholog zu menschlichem Ubiquitin-artigem Protein UBL5	Ubiquitin-Konjugationsweg	Proteostase
I-2-H04	C27A12.3 (tag-146); zinc finger protein 551	Ja	<i>Temporarily Assigned Gene name</i>	Transkriptionsregulation	Genexpression
I-2-H23	F55F8.4 (cir-1); Corepressor interacting with RBPJ 1	Ja	Kernprotein homolog zu Säuger CIR (Co-Repressor-Komplex, der mit CBF1 bei Säugern assoziiert)	Kann Spleißstellen auswählen während alternativem Spleißen, Transkription	Genexpression
I-2-I02	B0261.6; (unbekanntes Protein)	Ja	längere Lebensdauer	Konserviertes hypothetisches Protein	Unbekannte Funktion
I-2-I09	C10H11.10 (kca-1); kinesin cargo adaptor	Nein	<i>Kinesin Cargo Adaptor</i>		Zellzykluskontrolle
I-2-I10	C01G8.3 (dhs-1); Retinol dehydrogenase 14	Ja	Dehydrogenase, Kurze Kette	Zeigt eine oxidoreduktive katalytische Aktivität gegen Retinoide	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-I15	M04F3.3; Tau-tubulin kinase 1	Ja		Serin- / Threonin-Kinase, die als Schlüsselregulator der Zilium-Biogenese / -Abbau	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-I16	C01G8.6 (hpo-32); Hypersensitive to Pore-forming toxin	Ja	<i>Hypersensitive to Pore-forming toxin</i>	nicht charakterisiertes Protein	Unbekannte Funktion
I-2-I19	M04F3.5; I-BAR domain-containing protein	Ja	I-BAR-Domäne-enhaltendes Protein, Bildung von Tubuli in Plasmamembran	nicht charakterisiertes Protein	Strukturproteine
I-2-I09	F55F8.6 (mff-2); mitochondrial fission factor	Nein	<i>Mitochondrial Fission Factor</i>		Signaltransduktion
I-2-J10	T27A3.1; Nicht charakterisiertes Protein / AUCH Huntingtin-associated protein 1	Ja	Ortholog des menschlichen TRAK1, HAP1 und Trak2 und des Drosophila MILTON	<i>Huntingtin-associated protein-interacting protein</i> : Austausch GDP durch GTP in Rho-GTPase-Familie	Signaltransduktion
I-2-J12	T27A3.2 (usp-5); Isoform Long of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	Ja	<i>Ubiquitin Specific Protease</i>	Ubiquitin-Protein oder Polyubiquitin-Hydrolase	Proteostase
I-2-J20	T27A3.6; Molybdopterin synthase catalytic subunit	Ja	ortholog dem menschlichen Gen Molybdän-Cofaktor-Synthese-Gen 2 (MOCS2)	katalysiert die Umwandlung von Vorläufer-Z in Molybdopterin	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-K06	F48C1.5; DET1- and DDB1-associated protein 1	Ja	ortholog zu DDA1	wahrscheinlich Ubiquitinierung und anschließende proteasomalen Abbau von Zielproteinen	Proteostase
I-2-K09	F57C9.3 (glo-2); gut granule loss	Nein	gut granule loss		Unbekannte Funktion
I-2-K12	F48C1.8; Protein FAM98A	Ja	cDNA FLJ52744, sehr ähnlich zu Protein FAM98A	alternatives Spleißen	Genexpression
I-2-K18	F55A12.3 (ppk-1); Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-1 alpha	Ja	PIP Kinase (<i>phosphatidylinositol-4-phosphate 5' kinase</i>)	Katalysiert die Phosphorylierung von PtdIns4P zu PtdIns (4,5) P2	Signaltransduktion
I-2-K23	C01F4.2 (rga-6); cDNA FLJ55566, sehr ähnlich Rho-GTPase-aktivierendes Protein 6	Ja	<i>Rho GTPase Activating protein</i>	<i>Rho GTPase-activating protein 6</i> : GTPase Aktivator für die Rho-GTPasen	Signaltransduktion
I-2-K24	F55A12.6; Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Ja		prä-mRNA-Verarbeitung	Genexpression
I-2-L01	C04F1.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-2-L07	F56H1.1 (che-14); Protein dispatched homolog 1	Ja	mit einer Sterin-Sensing-Domäne, ähnlich wie <i>Drosophila</i> und Säugetieren <i>Dispatched</i>	Freisetzung und extrazelluläre Anhäufung von Hedgehog-Proteinen / Produktion des Hh-Signal	Signaltransduktion
I-2-L11	F56H1.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-L19	T22E7.2 (dhc-11); Mögliche Palmitoyltransferase ZDHHC11	Ja	<i>DHHC-types zinc finger protein</i>	Palmitoyl-CoA + [Protein]-L-Cystein = [Protein]-S-Palmitoyl-L-Cystein + CoA.	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-L22	T09B4.5; Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Ja	<i>RNA binding protein</i> (Fragment) und Serine/arginine repetitive matrix protein 2 in <i>H. sapiens</i>	prä-mRNA-Verarbeitung	Genexpression
I-2-M05	F25F8.2 (glc-2); Glycine receptor subunit alpha-3	Ja	Beta-Untereinheit eines Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals	Neurotransmitter-gesteuerter Ionenkanal	Kanal- und Transportproteine
I-2-M13	F21F3.4; Uncharacterized protein C18orf63	Ja			Unbekannte Funktion
I-2-M16	C24A11.5; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-M21	F28B3.1; disco-interacting protein 2 homolog A	Ja		wahrscheinlich Positionierung von Axonen und Strukturierung im Zentralnervensystem	Unbekannte Funktion
I-2-N04	T09B4.8; Alanine-glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial	Ja		L-Serin + Pyruvat = 3-Hydroxypyruvat + L-Alanin	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-N08	T09B4.10 (chn-1); E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	Ja	<i>C-term of Hsp70-interacting protein</i> (CHIP family): Ubiquitin-E4-Kettenverlängerungsfaktor	E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, die fehlgefaltete Chaperon-Substrate zu proteasomalen Abbau führt	Proteostase
I-2-N10	T05E7.1; Acyl-coenzyme A thioesterase 4	Ja		Acyl-CoA-Thioesterasen: katalysieren Hydrolyse von Acyl-CoAs in freie Fettsäure und Coenzym A	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-N17	C32F10.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-N21	C32F10.6 (nhr-2); cDNA FLJ59338, highly similar to Retinoic acid receptor gamma-2	Ja	<i>Nuclear Hormone Receptor family: embryonale Lebensfähigkeit und Morphogenese</i>	Transkriptionsregulation	Genexpression
I-2-N22	T08B2.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-O01	F28B3.4; Disco-interacting protein 2 homolog A	Ja	Ortholog von DIP2A, B und C	Axon-Platzierung und Strukturierung des zentralen Nervensystems	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-O08	F27C1.2; High affinity copper uptake protein 1	Ja		hoch-affiner Sättigungs-Kupfer-Kupfer-Transporter (Nahrungsaufnahme)	Kanal- und Transportproteine
I-2-O11	W03G9.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-O15	W03G9.4 (app-1); Xaa-Pro aminopeptidase 1	Ja	Aminopeptidase P	Abbau von Bradykinin: Entfernung von vorletzten Prolyl-Rest vom N-Terminus von Peptiden	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-O24	F27C1.11; Dentin sialophosphoprotein	Ja		Dentinogenese: Calcium-Bindung, Mineralisation von Dentin-Matrix Kollagen, Kristall-Größe/Form	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-2-P02	T08B2.5; RNA-binding protein 5	Ja		Komponente des Spliceosoms-A-Komplexes	Genexpression
I-2-P03	F33D11.1; LIM domain-binding protein 3	Ja		Adapter in quergestreifter Muskulatur von Kinase C-vermittelten Signalaar-Proteinen zu Zytoskelett	Strukturproteine
I-2-P05	F33D11.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-2-P11	F33D11.5 (twk-47); <i>TWiK family of potassium channels</i>	Nein	<i>TWiK family of potassium channels</i>		Kanal- und Transportproteine
I-2-P23	F33D11.11 (vpr-1); Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	Ja	<i>VAP (VAMP-associated protein) Related: Transmembran-Protein</i>	Endoplasmatischen Retikulum: Unfolded Protein Response (UPR) / Calcium-Homöostase-Regulation	Proteostase

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-3-A01	C48E7.5 (cof-2); Gliomedin	Ja	<i>Colmedin (collagen plus olfactomedin) family</i>	Rolle bei der Bildung der Ranvier'schen Schnürringe entlang myelinisierter Axone	Signaltransduktion
I-3-A03	C48E7.6; Chondroitin sulfate proteoglycan 4	Ja		Zellproliferation und Migration der Endothelzellen; mikrovaskuläre Beweglichkeit in Morphogenese	Signaltransduktion
I-3-A05	C48E7.7; (unbekanntes Protein)	Nein	Homolog von Protein der Srp1p/Tip1p-Familie von Serin-Alanin-reichen Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>		Unbekannte Funktion
I-3-A09	C48E7.9 (twk-37); Potassium channel subfamily K member 3	Ja	<i>TWIK family of potassium channels</i>	pH-abhängiges, spannungs-insensitives Hintergrund-Kaliumkanalprotein	Kanal- und Transportproteine
I-3-A13	C10G11.2 (srh-50); <i>Serpentine Receptor, class H</i>	Nein	<i>Serpentine Receptor, class H</i>		Signaltransduktion
I-3-A18	ZC581.6 (try-7); 43 kDa protein / <i>AUCH</i> : Isoform 2 of Transmembrane protease serine 11A	Ja	<i>Trypsin-like protease</i>	Zelluläre Seneszenz; Überexpression hemmt Zellwachstum / induziert G1-Zellzyklusarrest	Zellzykluskontrolle
I-3-A19	C10G11.5 (pnk-1); PcDNA FLJ56439, highly similar to Pantothenate kinase 4	Ja	<i>Pantothenate Kinase</i>	Pantothenate kinase 4: physiologische Regulation der intrazellulären CoA-Konzentration	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-A23	C10G11.7; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-B03	F22D6.6 (ekl-1); <i>Enhancer of Ksr-1 Lethality</i>	Nein	<i>Enhancer of Ksr-1 Lethality</i>		Unbekannte Funktion
I-3-B08	T25G3.2 (chs-1); Hyaluronan synthase 1	Ja	Chitinsynthase, paralog zu CHS-2	Katalysiert Addition von GlcNAc- oder GlcUA-Monosacchariden zum e Hyaluronsäure-Polymer	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-B12	T25G3.4; Isoform 1 of Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	Ja	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, paralog zu Y50E8A.6 und ortholog zu menschlichen GPD2	sn-Glycerol 3-Phosphat + NAD+ = Glyceronphosphat + NADH.	Signaltransduktion
I-3-B18	D2030.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-C05	C10G11.10; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-C09	F26B1.2; Uncharacterized protein / <i>AUCH</i> : poly(rC)-binding protein 2 Isoform a, b, g und e	Ja		<i>Integrator complex subunit 6</i> : snRNA U1- und U2-Transkription und ihre Verarbeitung	Genexpression
I-3-C10	T23B3.3 (rmd-5); Regulator of microtubule dynamics protein 2	Ja	<i>Regulator of Microtubule Dynamics</i>	Interagiert mit Mikrotubuli	Strukturproteine
I-3-C15	F26B1.5; Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit	Ja		Mikrotubuli, spleißosomaler snRNP, Apoptose, DNA-Reparatur, TNFalpha-Signalweg, u.a.	Signaltransduktion
I-3-C20	W02D3.2 (dhod-1); Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	Ja	<i>Dihydroorotate Dehydrogenase</i>	Umwandlung von Dihydroorotatdehydrogenase zu Orotat mit Chinon als Elektronenakzeptor	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-C21	K04F10.1; Spinocerebellar ataxia type 1 protein (Ataxin-1)	Ja	Homolog zu SCA1, das bei Mutation zu spinocerebellären Ataxie 1 führt	Chromatin-Bindungsfaktor, Notch-Signalweg / CBF1 Korepressor; HEY-Promotor-Bindung; u.a.	Genexpression
I-3-C23	K04F10.2; Uncharacterized protein KIAA0556	Ja			Unbekannte Funktion
I-3-C24	W02D3.4; Transmembrane protein 144	Ja			Unbekannte Funktion
I-3-D01	H37N21 (hpo-11); cDNA FLJ54186, highly similar to Nuclear receptor-binding protein	Ja	<i>Hypersensitive to Pore-forming toxin</i>	Verkehr zwischen endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat (durch Rho-GTPasen)	Signaltransduktion
I-3-D03	H37N21 (hpo-11); cDNA FLJ54186, highly similar to Nuclear receptor-binding protein	Ja	<i>Hypersensitive to Pore-forming toxin</i>	Verkehr zwischen endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat (durch Rho-GTPasen)	Signaltransduktion
I-3-D06	D2030.9 (wdr-23); DDB1- and CUL4-associated factor 11	Ja	<i>WD Repeat protein</i> : WDR-23 in CUL-4/DDB-1 Ubiquitin-Ligase-Komplex	Substrat Rezeptor für CUL4 DDB1-E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Komplex	Proteostase
I-3-D11	K07G5.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-3-D13	K07G5.5; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-D16	F26A3.2 (ncbp-2); Nuclear cap-binding protein subunit 2	Ja	<i>Nuclear Cap Binding Protein</i> : Ortholog zu CBP20 Untereinheit des Kernkappenbindungskomplexes	Bestandteil des CAP-Bindungskomplexes (CBC), Co-Transkription des 5'-Cap des pre-mRNAs	Genexpression
I-3-D19	M05B5.3; 24 kDa protein / <i>AUCH</i> : neurofilament heavy polypeptide	Ja		Neurofilamente enthalten üblicherweise drei Filamentproteinen: L, M und H	Strukturproteine
I-3-D21	M05B5.4; Group XV phospholipase A2	Ja	Ortholog des humanen Gens Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase	Transacylase und Calcium-unabhängige Phospholipase A2-Aktivität	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-E02	T22G5.6 (ibp-8); Fatty acid-binding protein, heart	Ja	kleine intrazelluläre Fettsäure-bindendes Protein	intrazellulärer Transport von langkettigen Fettsäuren und deren Acyl-CoA-Ester	Kanal- und Transportproteine
I-3-E03	K04F10.4 (bli-4); Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	Ja	<i>Blistered cuticle</i> : Serin Endoproteasen der KEX2/subtilisin Klasse	Endoproteaseaktivität innerhalb des konstitutiven sekretorischen Weges	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-E10	W02D3.9 (unc-37); Transducin-like enhancer protein 1	Ja	<i>Uncoordinated</i> : Transducin-like WD-Repeat-Protein ortholog zu <i>Drosophila</i> Groucho	Transkriptions Ko-Repressor, der eine Reihe von Transkriptionsfaktoren bindet	Genexpression
I-3-E12	W02D3.10 (fnci-1); Uncharacterized conserved protein / <i>AUCH</i> : Fanconi anemia group I protein	Ja	<i>FANCI (Fanconi anemia complex component I) homolog</i>	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und DNA-Interstrang-Quer Links (ICL)	DNA-Reparatur/Replikation
I-3-E16	F08B6.2 (gpc-2); Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-13	Ja	<i>G Protein, Gamma subunit</i> : mitotische Spindel-Positionierung/-Orientierung (embryonale Teilung)	Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) Modulator verschiedener Transmembransignale	Signaltransduktion
I-3-F01	M05B5.6 (trpa-2); 104 kDa protein / <i>AUCH</i> : Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1	Ja	<i>TRPA cation channel homolog</i>	Nichtselektiver, spannungsunabhängiger Kationenkanal; Natrium- und Calcium-Ionen-Einstrom in Reaktion auf oxidativen Stress	Kanal- und Transportproteine
I-3-F08	T23G11.3 (gld-1); Protein quaking	Ja	<i>Defective in Germ Line Development</i> : Mitose/Meiose-Entscheidung in Keimbahn; Spermatogenese	Regelung von prä-mRNA-Spleißen, mRNA-Export, Stabilität der mRNA- und Protein-Übersetzung	Genexpression
I-3-F12	T23G11.5 (rlbp-1); RalA-binding protein 1	Ja	<i>Ral Binding Protein</i>	Hydrolyse von GTP zu RAC1 und CDC42; ATP-abhängigen Transport von DNP-SG und DOX; ATP-abhängiger Transport von Glutathion-Konjugaten u.a.	Kanal- und Transportproteine
I-3-F16	T23G11.7; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-F22	F27D4.1; Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Ja	Ortholog des menschlichen Gens Elektronentransfer-Flavoprotein, ALPHA-Polypeptid (ETF _A)	überträgt die Elektronen auf die Hauptatmungskette im Mitochondrium	Oxidativer Stress / Elektronentransport
I-3-G01	ZC328.4 (san-1); Mitotic checkpoint serine/threonine protein kinase	Ja	<i>Suspended Aimation (anoxia-induced) defective</i>	mitotischer Checkpoint	Zellzykluskontrolle
I-3-G06	C37A2.4 (cye-1); G1/S-specific cyclin-E1	Ja	<i>Cyclin E</i> : mitotischer Zellzyklus während der Embryonalentwickl., Larven und Keimbahn-Entwicklung	Wesentlich für die Kontrolle des Zellzyklus bei G1 / S (Start)-Übergangs	Zellzykluskontrolle
I-3-G08	C37A2.5 (pqn-21); Forkhead box protein P2	Ja	<i>Prion-like-(Q/N-rich)- domain-bearing protein</i> : enthält Glutamin / Asparagin (Q / N)-reiche ("Prion")-Domäne	Transkriptions-Repressor, die in der Spezifizierung und Differenzierung von Lungenepithel eine Rolle spielt	Genexpression
I-3-G12	C37A2.7; 60S acidic ribosomal protein P2	Ja		Spielt eine wichtige Rolle beim Elongationsschritt der Proteinsynthese	Genexpression
I-3-G16	E02D9.1; dual specificity mitogen-activated protein kinase 5	Ja		Serin / Threonin-Kinase, wesentlicher Bestandteil des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs	Signaltransduktion
I-3-G20	K02F2.1 (dpf-3); 110 kDa protein / <i>AUCH</i> : Dipeptidyl peptidase 4	Ja	<i>Dipeptidyl Peptidase Four (IV) family</i>	Zelloberflächen-Glycoprotein-Rezeptor: Signal für die T-Zell-Rezeptor (TCR)-vermittelte T-Zellaktivierung	Signaltransduktion
I-3-G21	T23H2.4 (mam-8); MAM (<i>Meprin, A5-protein, PTPmu</i>) domain protein	Nein	<i>MAM (Meprin, A5-protein, PTPmu) domain protein</i>		Unbekannte Funktion

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-3-G23	T23H2.5 (rab-10); Ras-related protein Rab-10	Ja	<i>RAB family: Rab-GTPase, ein Mitglied der Ras-Superfamilie der kleinen GTPase</i>	Schlüsselregulatoren des intrazellulären Membrantransports	Signaltransduktion
I-3-H01	R06C7.3 (dhp-1); Dihydropyrimidinase	Ja	Dihydropyrimidinase: Homolog des menschlichen Gens DPYS, das bei Mutation zu Dihydropyrimidinuria führt	5,6-Dihydrouracil + H ₂ O = 3-Ureidopropanoat	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-H06	F27D4.6; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-H15	R06C7.10 (myo-1); Myosin-3	Ja	<i>Myosin heavy chain structural genes</i>	Muskelkontraktion	Strukturproteine
I-3-H17	F21C3.1 (twk-1); Potassium channel subfamily K member 1	Ja	<i>TWIK family of potassium channels</i>	Schwacher, nach innen gleichgerichteter Kaliumkanal	Kanal- und Transportproteine
I-3-H18	D2005.2 (nlp-8); neuropeptide-like protein	Nein	<i>Neuropeptide-Like Protein</i>		Unbekannte Funktion
I-3-H20	D2005.3; Programmed cell death protein 5	Ja		Prozess der Apoptose	Unbekannte Funktion
I-3-H22	D2005.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-H23	F21C3.4 (rde-2); required for RNAi	Nein	<i>RNAi Defective: funktionelles Silencing der chromosomalen Loci von Transgenen (Cosuppression)</i>		Genexpression
I-3-I02	K02F2.4 (ulp-5); Sentrin-specific protease 7	Ja	<i>Ubiquitin-Like Protease</i>	Protease, die SUMO2 und SUMO3 von Zielproteine dekonjugiert, aber nicht SUMO1 (Ubl Konjugationsweg)	Proteostase
I-3-I03	K06A5.1; Uncharacterized protein / AUCH: Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Ja		prä-mRNA-Spleißen	Genexpression
I-3-I04	K02F2.5; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-I08	T21G5.1; Tyrosine-protein kinase Fer	Ja		Tyrosin-Proteinkinase, stromabwärts von Wachstumsfaktor-Zelloberflächenrezeptoren	Signaltransduktion
I-3-I15	K06A5.8 (nmt-1); WD repeat-containing protein 47	Ja	<i>Nemitin (neuronal enriched MAP interacting protein) homolog</i>	interagiert mit MAP1S (über WD repeats)	Strukturproteine
I-3-I18	C48B6.2; U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	Ja		Komponente des 60-80S-U3 kleinen nukleolären Ribonucleoprotein (U3 snoRNP)	Genexpression
I-3-I21	C55B7.3; Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	Ja		Protein-Tyrosin-Phosphatase: negativer Regulator der Oligodendrozyten-Vorläuferproliferation	Signaltransduktion
I-3-J02	F21C3.6; Caldesmon	Ja		Aktin- und Myosin-Bindungsprotein; Actomyosin-Wechselwirkungen	Strukturproteine
I-3-J05	F30F8.2 (glna-3); Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	Ja	Glutaminase	Glutaminabbau (Niere); Säure-Base-Homöostase; Pegel des Neurotransmitters Glutamat (Gehirn)	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-J18	F13G3.8 (eat-5); Innexin / Eating: abnormal pharyngeal pumping	Nein	<i>Eating (abnormal pharyngeal pumping): Innexin, exprimiert in Rachenmuskellgruppen PM4 und PM5</i>		Strukturproteine
I-3-J20	F13G3.9 (mif-3); 14 kDa protein / AUCH: D-dopachrome decarboxylase	Ja	<i>MIF (Macrophage migration Inhibitory Factor) related</i>	Tautomerisierung von D-Dopachrom mit Decarboxylierung zu 5,6-Dihydroxyindol (DHI)	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-J22	F13G3.10 Huntingtin-interacting protein K	Ja		Chaperon-ähnliche Aktivität; verhindert Polyglutamine(polyQ)-Aggregation von HTT	Proteostase
I-3-K07	C48B6.9; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-K10	C55B7.10; Uncharacterized protein / AUCH: Casein kinase I	Ja		Wnt-Signaling	Signaltransduktion
I-3-K11	T10B11.2; Ceramide kinase	Ja		katalysiert die Phosphorylierung von Ceramid zu Ceramid-1-phosphat	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-K12	F52A8.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-3-L08	F52A8.5; Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	Ja	ortholog zu menschlichen Gen <i>Glycine Cleavage System Protein H</i> , bei Mutation Glycin-Enzephalopathie	Glycin-Spaltsystem: katalysiert den Abbau von Glycin	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-L09	F55D12.2; Uncharacterized protein / AUCH: Kalirin	Ja		Austausch von GDP durch GTP; Aktiviert spezifisch Rho-GTPase-Familie	Signaltransduktion
I-3-L10	F52A8.6; NF-kappa-B inhibitor-interacting Ras-like protein 1	Ja		wichtiger Regulator von NF-kappa-B-Aktivität (Verhinderung des Abbaus von NF-k-B-Inhibitor beta)	Signaltransduktion
I-3-L15	F55D12.5; Mucin-2	Ja		Kleidet die Epithelien von Darm, Atemwegen und anderen Schleimhaut-Organen aus	Strukturproteine
I-3-L20	F07A5.5 (sue-1); Synaptotagmin-4	Ja	<i>Suppressor of Elongation defect</i>	Vesikeltransport und Exozytose	Signaltransduktion
I-3-L21	F20G4.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-M04	C30F12.1; cDNA FLJ55575 / AUCH: Probable ribonuclease ZC3H12 A, B oder D	Ja		Kann als RNase funktionieren und reguliert die Pegel der Ziel-RNA-Spezies	Genexpression
I-3-M16	C30F12.7 (idhg-2); Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial	Ja	<i>Isocitrate Dehydrogenase Gamma</i> : Untereinheit einer NAD +-abhängigen Isocitratdehydrogenase	Isocitrat + NAD+ = 2-Oxoglutarat + CO2 + NADH	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-M19	F57B10.6 (xpg-1); DNA repair protein complementing XP-G cells	Ja	<i>XPG (Xeroderma Pigmentosum group G) DNA repair gene homolog</i>	Einzelstrang-Struktur-spezifische DNA-Endonuklease in der DNA-Reparatur	DNA-Reparatur/Replikation
I-3-N03	C15A11.1 (col-35); Uncharacterized protein / AUCH: Collagen alpha-1(II) chain	Ja	Kollagen	Typ-II-Kollagen ist spezifisch für Knorpelgewebe	Strukturproteine
I-3-N11	C15A11.5 (col-7); Collagen alpha-1(V) chain	Ja	Kollagen-Superfamilie mit Kollagen-Tripelhelix Wiederholungen	Mitglied der Gruppe-I-Kollagene (fibrillenbildendes Kollagen)	Strukturproteine
I-3-N12	T22C1.8; Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2	Ja		dephosphoryliert Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen und Nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen	Signaltransduktion
I-3-N16	T22C1.10 (rbg-2); Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	Ja	<i>Rab GAP related</i>	Regulatorische Untereinheit eines GTPase-aktivierendes Protein, spezifisch für Rab3 Unterfamilie	Signaltransduktion
I-3-O01	F57B10.9; Spartin	Ja	ortholog zu menschlichen Gen Spartin	Kann in endosomalem Trafficking, oder Dynamik der Mikrotubuli, oder beidem verwickelt sein	Signaltransduktion
I-3-O02	F15C11.1 (sem-4); Uncharacterized protein / AUCH: cDNA FLJ58537, similar Sal-like protein 2	Ja	<i>Sex Muscle abnormal</i> : Entwicklung der Zellen in neuronalen, mesodermalen und Vulva-Zelllinien	Möglicher Transkriptionsfaktor	Genexpression
I-3-O03	F57B10.10 (dad-1); Dolichyl-Diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit	Ja	<i>DAD (Defender against Apoptotic Death) homolog</i>	Untereinheit des N-Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplex	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-3-O08	W01A8.2; hypothetical protein LOC123207	Ja			Unbekannte Funktion
I-3-O11	F48A9.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-O15	D2092.1; Multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1	Ja		Kalzium-vermittelte Signalübertragung	Signaltransduktion
I-3-O19	D2092.3 (acr-11); Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7	Ja	<i>Acetylcholine Receptor</i> : Homolog einer alphetyp-nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor-Untereinheit	Acetylcholinbindung: Öffnen eines ionenleitenden Kanal durch Plasmamembran	Kanal- und Transportproteine
I-3-O23	D2092.5 (maco-1); Macoilin	Ja	<i>Macoilin homolog</i> : am Aufbau oder Transport von Ionenkanälen oder Ionenkanal-Regulatoren beteiligt	<i>Macoilin</i> : Entwicklung des Gehirns	Kanal- und Transportproteine
I-3-O24	F22D6.4 (nduf-6); NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	Ja	<i>NADH Ubiquinone Oxidoreductase Fe-S Protein</i> : oxidative Phosphorylierung	Core-Untereinheit der mitochondrialen Atmungskette NADH-Dehydrogenase (Komplex I)	Oxidativer Stress / Elektronentransport
I-3-P01	T28F4.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-3-P03	T28F4.2 (asic-2 Amiloride-sensitive sodium channel subunit alpha)	Ja	<i>Acid-sensing/Amiloride- Sensitive Ion Channel family</i>	Elektrodiffusion des luminalen Natrium durch die apikale Membran von Epithelzellen	Kanal- und Transportproteine
I-3-P05	T28F4.3; Receptor-type tyrosine-protein phosphatase epsilon	Ja		Insulin-Rezeptor (IR)-Signalisierung in der Skelettmuskulatur	Signaltransduktion
I-3-P10	C54G4.6 (dod-18); N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein	Ja	<i>Downstream Of DAF-16 (regulated by DAF-16): unterdrückt in daf-2-Mutanten und induziert in daf-16-M.</i>	unbekannt	Unbekannte Funktion
I-3-P11	T28F4.6;(unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-3-P12	C54G4.7; 49 kDa protein / <i>AUCH</i> : Uncharacterized protein C4orf29	Ja			Unbekannte Funktion
I-3-P17	C26C6.3 (nas-36); Tolloid-like protein 1	Ja	<i>Nematode Astacin Protease</i>	Protease, die Prokollagen C-Propeptide wie Chordin, Pro-Lysil und Pro-Biglycan oxidiert	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-A05	K04G2.7; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-A08	R05D11.6; (unbekannte Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-A12	R05D11.8 (edc-3); <i>Yeast Enhancer of Decapping Homolog</i>	Nein	<i>Yeast Enhancer of Decapping Homolog</i>		Unbekannte Funktion
I-4-A14	F43G9.1(idha-1 Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial)	Ja	<i>Isocitrate Dehydrogenase Alpha: alpha-Untereinheit von einer NAD +-abhängigen Isocitratdehydrogenase</i>	Isocitrat + NAD+ = 2-Oxoglutarat + CO2 + NADH.	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-A15	F18C12.2 (rme-8); DnaJ homolog subfamily C member 13	Ja	<i>Receptor Mediated Endocytosis: Endozytose und Pinozytose</i>	Vesikeltransport	Kanal- und Transportproteine
I-4-A21	C09H6.2 (lin-10); amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 2	Ja	<i>abnormal cell lineage: homolog zu Säugetier Munc-interagierendes Protein</i>	Funktion bei synaptischer Vesikel-Exozytose durch Bindung an STXBP1	Kanal- und Transportproteine
I-4-A22	F43G9.5 (cfim-1); Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	Ja	<i>Cleavage Factor IM (CFIM) homolog: NUDIX Hydrolase, die DHC-1 inhibiert</i>	Schlüsselrolle in der prä-mRNA-3'-Verarbeitung	Genexpression
I-4-A23	C09H6.3 (mau-2); MAU2 chromatid cohesion factor homolog	Ja	<i>Maternally Affected Uncoordination: mitotischen Chromos.segregation und zelluläre/axonale Migration</i>	Interphase / Prometaphase	Zellzykluskontrolle
I-4-B02	C36F7.1 (irx-1); Iroquois-class homeodomain protein IRX-3	Ja	<i>Iroquois Subclass of Homeobox: Transkriptionsregulation</i>	Transkriptionsregulation	Genexpression
I-4-B04	C36F7.2 (swah-1); Uncharacterized protein / <i>AUCH</i> : Putative ankyrin repeat domain-containing protein 30B-like	Ja	<i>SoWAH (Drosophila) homolog</i>		Unbekannte Funktion
I-4-B09	C31H5.3 (acr-19); Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7	Ja	<i>Acetylcholine Receptor</i>	Acetylcholinbindung: Öffnen eines ionenleitenden Kanal durch Plasmamembran	Kanal- und Transportproteine
I-4-B12	F42H11.1; Collagen alpha-2(XI) chain	Ja		wichtige Rolle in Fibrillogenese durch Steuerung des seitliche Wachstum von Kollagen II-Fibrillen	Strukturproteine
I-4-C01	T28B8.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-C03	T28B8.2 (ins-18); <i>Insulin Related</i>	Nein	<i>Insulin Related: Insulin / IGF-ähnliche Peptide</i>		Unbekannte Funktion
I-4-C06	F43G9.9 (cpn-1); Transgelin-3	Ja	<i>Calponin</i>	Negative Regulation der Transkription von RNA-Polymerase II-Promotor	Genexpression
I-4-C08	F43G9.10 (mfap-1); Microfibrillar-associated protein 1	ja	<i>Microfibrillar-Associated Protein Homolog: reguliert alternatives Spleißen</i>	Komponenten der Elastin-Mikrofibrillen; extrazelluläre Matrix-Organisation	Strukturproteine

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-4-C10	F43G9.11 (ces-1); Transcriptional repressor scratch 1	Ja	Cell Death Specification: C2H2-Typ-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor	Transkriptions-Repressor (E-Box-Motiv); neuronale Differenzierung	Genexpression
I-4-C12	F43G9.12; GC-rich sequence DNA-binding factor 1	Ja		unterdrückt Transkription; an prä-mRNA-Spleißen beteiligt	Genexpression
I-4-C19	T02E1.5 (dhs-3); Epidermal retinol dehydrogenase 2	Ja	Dehydrogenases, Short Chain	Oxidative und reduktive Richtung; Oxidiert all-trans-Retinol in all-trans-Retinaldehyd	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-D02	K07A1.6; (unbekanntes Protein)	Nein	vermeintlicher abgesonderter TIL-Domain-Protease-Inhibitor		Unbekannte Funktion
I-4-D11	ZK858.1 (gld-4); Uncharacterized protein / AUCH: Poly(A) RNA polymerase GLD2	Ja	Defective in Germ Line Development: nicht-kanonische Poly (A)-Polymerase	Zytoplasmatische Poly(A)-RNA-Polymerase: Poly (A)-Schwanz	Genexpression
I-4-D18	T05F1.1 (nra-2); Nicalin	Ja	Nicotinic Receptor Associated	Entgegen Nodal-Signalisierung	Signaltransduktion
I-4-D24	T05F1.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-E04	K07A12.3 (asg-1); ATP synthase subunit G, mitochondrial	Ja	ATP Synthase G Homolog: Protonen-Translokation-F0-ATP-Synthase-Komplex-Untereinheit G	produziert ATP aus ADP in Gegenwart eines Protonen-Gradienten über die Membran	Kanal- und Transportproteine
I-4-E08	K07A12.5; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-E10	K07A12.6 (hot-5); Homolog of Odr-2 (Two)	Nein	Homolog of Odr-2 (Two): Mitglied der Ly-6-Superfamilie von GPI-verknüpften Signalproteinen		Signaltransduktion
I-4-E11	ZK265.4 (ceh-8); Retinal homeobox protein Rx	Ja	C. Elegans Homeobox: Homeodomänen-Protein der Klasse Q50; ortholog zu Rx-Homöobox (Mensch)	wichtige Rolle bei der Entstehung des Auges	Genexpression
I-4-E14	F39H11.2 (tlf-1); TATA-box-binding protein	Ja	TBP-Like Factor: TATA-Bindungsprotein(TBP)-ähnlicher Faktor	Transkriptionsfaktor: Aktivierung von eukaryotischen Genen (RNA-Polymerase II)	Genexpression
I-4-E19	ZK265.8 (cutl-8); Cuticlin-Like	Nein	Cuticlin-Like		Unbekannte Funktion
I-4-F06	T05F1.7; Uncharacterized protein / AUCH: Girdin	Ja		wichtiger Modulator des AKT-mTOR-Signalwegs	Signaltransduktion
I-4-F12	T05F1.10 (dhs-4); Epidermal retinol dehydrogenase 2	Ja	Dehydrogenases, Short Chain	Aktiv sowohl in oxidativer und reduktiver Richtung; Oxidiert all-trans-Retinol in all-trans-Retinaldehyd	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-F15	F25H5.7; tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 3 isoform 6	Ja		Verbindung zwischen Membran und Zytoskelett; Tyrosin-Phosphatase-Aktivität	Zellzykluskontrolle
I-4-F18	C03D6.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-F19	F25H5.1 (lim-9); Four and a half LIM domains protein 2	Ja	LIM domain family	Verknüpfung von verschiedenen Signalwege zu Transkriptionsregulation	Genexpression
I-4-F22	C03D6.4 (npp-14); Nuclear pore complex protein Nup214	Ja	Nuclear Pore Complex Protein: nukleozytoplasmatischen Transport	Andockstelle des Rezeptor-vermittelten Import von Substraten in den Kernporenkomplex	Kanal- und Transportproteine
I-4-G01	T01G9.3 (dma-1); Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	Ja	Dendrite Morphology Abnormal	Protein-Komplexen, Rezeptor-Ligand-Bindungen oder Zelladhäsion	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-G11	F52B5.2; Serine/threonine-protein kinase MAK	Ja		Regulierung der "Ciliary"-Länge und für die langfristige Überleben von Photorezeptoren	Genexpression
I-4-G22	DY3.1 (tin-13); Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	Ja	Transport to Inner Mitochondrial Membrane (yeast TIM)	Mitochondriales intermembranöses Chaperon; Import und Einfügen von Multi-Pass-Transmembranproteine	Kanal- und Transportproteine
I-4-G23	C34B7.2; Polyphosphoinositide phosphatase	Ja		Synthese und Umsatz von Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat (PtdIns (3,5) P2)	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-H11	F14B4.2; Hexokinase-2	Ja	Hexokinase	ATP + D-Hexose = ADP + D-Hexose 6-Phosphat	Posttranslationale Protein-Modifikation

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-4-H13	F14B4.3 (rpoa-2); DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2	Ja	RNA Polymerase I (A) subunit	DNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert die Transkription von DNA in RNA	Genexpression
I-4-H24	C04F12.10 (fce-1); CAAX prenyl protease 1 homolog	Ja	Farnesylated-Proteins Converting Enzyme (FACE) Family: post-translationalle Prozessierung von Proteinen	Entfernt proteolytisch die drei C-terminalen Reste von farnesylierten Proteinen	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-I02	DY3.3 (hlh-16); Class E basic helix-loop-helix protein 23	Ja	Helix Loop Helix	Transkriptionsrepressor	Genexpression
I-4-I03	F16D3.1 (tba-5); Tubulin alpha-1B chain	Ja	Tubulin, Alpha: Mikrotubuli-Komponente	Hauptbestandteil von Mikrotubuli	Strukturproteine
I-4-I12	F36A2.1 (cids-2); cDNA FLJ54323 / AUCH: Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2	Ja	Pol II C-terminal Interaction Domain Suppressor	Assoziiert mit RNA-Polymerase-II-Komplex	Genexpression
I-4-J02	C16C2.1 (ceh-5); Ventral anterior homeobox 1	Ja	C. Elegans Homeobox: ähnlich wie das menschliche ventral anterior Homöo-Box2-Gen	Transkriptionsfaktor, dorsoventraler Spezifikation des Vorderhirns	Genexpression
I-4-J05	F26H9.8 (uggt-2); UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 2	Ja	UDP-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase: ER; Qualitätskontrolle Glycoproteinfaltung	Erkennt Glykoproteine mit geringfügigen Mängeln (Rückfaltung oder Abbau)	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-J06	C16C2.3 (ocrl-1); Type II inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase	Ja	OCRL (Lowe's Oculocerebrorenal Syndrome Protein) Homolog: Inositol-1,4,5-trisphosphat-5-Phosphatase	Hydrolysiert PtIns(4,5)P2 und Signalmolekül PtIns(1,4,5)P3 und moduliert zelluläre Signale	Signaltransduktion
I-4-J11	C12C8.3 (lin-41); Tripartite motif-containing protein 71 (E3 ubiquitin-protein ligase TRIM71)	Ja	Abnormal Cell Lineage: RBCC (Ringfinger-B-Box-Coiled-Coil)-Protein, Mitglied der NHL-Familie von Proteinen ist	E3-Ubiquitin-Protein-Ligase: microRNAs(miRNAs)-Maschinerie; fördert embryonalen Stammzellen	Genexpression
I-4-K09	F02E9.7; Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	Ja		In Osteopontin- / Bonesialoprotein-Dephosphorylierung beteiligt	Signaltransduktion
I-4-K15	F10D11.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-K16	F29D10.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-K18	F29D10.4 (hum-1); Unconventional myosin-I	Ja	Heavy chain, Unconventional Myosin: eng mit der Unterklasse amoeboid Myosin I verwandt	Aktin-basiertes Motor-Molekül (ATPase-Aktivität); Unkonventionelle Myosine: intrazelluläre Bewegungen	Strukturproteine
I-4-L04	F26E4.7; Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	Ja	Homolog zu humanem BIGH3, Mutation führt zu "Groenouw Granular Dystrophie Typ 1"	bindet an Typ I, II und IV Kollagene (Zell-Kollagen-Wechselwirkung); im Knorpel Ersatzknochenbildung	Strukturproteine
I-4-L10	F26E4.10 (drsh-1); Ribonuclease 3	Ja	Ortholog of Drosophila Drosha Gene: RNase III-Ribonuklease, ortholog zu Drosophila/Mensch Drosha	Ribonuclease III (ds)RNA-spezifischen Endoribonuklease, erster Schritt von microRNA(miRNA)-Biogenese	Genexpression
I-4-L11	C17E4.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-L12	F26E4.11 (hrdl-1); E3 ubiquitin-protein ligase AMFR	Ja	HRD-Like (E3 ubiquitin ligase related)	E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, Polyubiquitinierung von z.B. CD3D, CYP3A4, CFTR und APOB (proteasomaler Abbau)	Proteostase
I-4-L14	F26E4.12 (gpx-1); Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	Ja	Glutathione Peroxidase: Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase	Schützt die Zellen gegen Peroxidation der Membranlipide und Zelltod	Oxidativer Stress / Elektronentransport
I-4-L15	C17E4.6; Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog	Ja		Könnte eine DNA-bindende Transkriptionsregulator oder in Chromatin-Modifikatin/Umbau beteiligt sein	Genexpression
I-4-L21	C17E4.9 (nkb-1); Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	Ja	Na+/K+ ATPase, Beta subunit	nicht-katalytische Komponente des aktiven Enzyms: Hydrolyse von ATP	Kanal- und Transportproteine
I-4-L22	F35C12.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-M01	D1081.2 (unc-120); Serum response factor;	Ja	Uncoordinated: MADS-Box-Familie von Transkriptionsfaktoren	SRF ist ein Transkriptionsfaktor, der an Serum-Response-Element (SRE) bindet	Genexpression

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-4-M02	F55H12.3; Neurogenic locus notch homolog protein 3	Ja		Rezeptor für Membran-gebundene Liganden Jagged1, Jagged2 und Delta1 um Zellschicksal zu regulieren	Signaltransduktion
I-4-M03	D1081.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-M09	D1081.6; Lymphocyte antigen 6D	Ja		Spezifikation von Lymphozyten zwischen B- und T-Zell-Entwicklung	Signaltransduktion
I-4-M14	T08G11.5 (unc-29); Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-4	Ja	<i>Uncoordinated</i> : Nicht-alpha-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR)	Ionenleitender Kanal durch die Plasmamembran; durchlässig für Natriumionen	Kanal- und Transportproteine
I-4-M17	K02B12.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-M24	F53B6.6 (cutl-7); Cuticlin-Like	Nein	<i>Cuticlin-Like</i>		Strukturproteine
I-4-N01	C17E4.11; Endothelin-converting enzyme 2	Ja		Konvertiert Big-Endothelin-1 zu Endothelin-1	Signaltransduktion
I-4-N09	F46A9.4 (skr-2); S-phase kinase-associated protein 1	Ja	<i>SKP1 Related (ubiquitin ligase complex component)</i> : Ubiquitin-vermittelter Proteinabbau	SCF (SKP1-CUL1-F-Box-Protein) Ubiquitin-Ligase-Komplex, Ubiquitinierung von Proteinen in Zellzyklusprogression, Signaltransduktion und Transkription	Proteostase
I-4-N17	F30A10.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-N21	F30A10.4; β -1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3	Ja		Glycosyltransferase, die alle bekannten Mucin-Beta 6-N-Acetylglucosaminiden synthetisiert	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-4-N22	F52F12.1 (oct-1); Solute carrier family 22 member 5	Ja	<i>Organic Cation Transporter</i> : Transport des prototypisch organischen Kation Tetraethylammonium	Natrium-Ionen-abhängiger, hoch-affiner Carnitin-Transporter	Kanal- und Transportproteine
I-4-N23	F30A10.5 (stl-1); Stomatin-like protein 2, mitochondrial	Ja	<i>Stomatin-Like</i>	Mitochondriales Protein, das wahrscheinlich die Biogenese und die Aktivität der Mitochondrien reguliert	Signaltransduktion
I-4-O01	K02B12.6; DNA damage-responsive protein	Nein	<i>DNA damage-responsive protein in Hefe</i>		Unbekannte Funktion
I-4-O02	F53B6.7; Ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein A	Ja	Histidin-Phosphatase-Superfamilie; orthologen zu <i>Bombix mori</i> EVP und Mensch STS1 und UBASH3A	Interferiert mit CBL-vermittelter Herunterregulation/ Abbau von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	Signaltransduktion
I-4-O11	M04C7.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-O16	F32H2.7; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-P09	F30A10.10 (usp-48); Isoform 2 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	Ja	<i>Ubiquitin Specific Protease</i>	Erkennt und hydrolysiert die Peptidbindung am C-terminalen Gly von Ubiquitin	Proteostase
I-4-P11	C41G7.1 (smn-1); SMN-delta7 of Survival motor neuron protein	Ja	<i>SMN (Human Survival Motor Neuron Gene) Homolog</i> : SMN-Mutationen führen zu spinaler Muskelatrophie	SMN-Komplex: Katalysator bei Montage von kleinen Kern-Ribonukleoproteine (snRNPs); Spleißosom	Genexpression
I-4-P14	Y106G6A.2 (epg-8); <i>Ectopic P Granules</i>	Nein	<i>Ectopic P Granules</i> : Autophagie; Regulierung des Abbau autophagischer Substrate / Lokalisierung von LGG-1		Proteostase
I-4-P15	C41G7.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-4-P19	C41G7.5 (ahr-1); Aryl hydrocarbon receptor	Ja	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Related</i> : Liganden-aktivierter basischer Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor	Liganden-aktivierter Transkriptionsaktivator	Genexpression
I-4-P22	Y106G6A.5 (dsbn-1); <i>Dysbindin (Dystrobrevin-Binding Protein) Homolog</i>	Nein	<i>Dysbindin (Dystrobrevin-Binding Protein) Homolog</i>		Unbekannte Funktion
I-5-A02	Y106G6H.4 (madf-10); <i>MADF Domain Transcription Factor</i>	Nein	<i>MADF Domain Transcription Factor</i>		Unbekannte Funktion
I-5-A10	Y106G6H.8; UPF0451 protein C17orf61	Ja			Unbekannte Funktion
I-5-A16	Y106G6H.12 (duo-3); Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 29	Ja	<i>Deubiquitylating with USP/UBP and OTU domains</i>	Thiol-abhängige Hydrolyse von Ester-, Thioester-, Amid-, Peptid- und Isopeptidbind. am C-terminalen Gly von Ub.	Proteostase

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-5-A17	T23D8.3; (unbekanntes Protein)	Ja	Ortholog zu Hefe und Mensch LTV1, das DHC-1 in vivo hemmt		Unbekannte Funktion
I-5-B05	Y44E3A.4; SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	Ja		Adapter-Protein bei der Regulierung verschiedener Signalwege	Signaltransduktion
I-5-B06	F28H1.2 (cpn-3); 24 kDa protein / AUCH: Calponin-1	Ja	Calponin	Dünnes Filament-assoziiertes Protein: Regulation und Modulation der Kontraktion der glatten Muskulatur	Strukturproteine
I-5-B07	Y44E3A.4; SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	Ja		Adapter-Protein bei der Regulierung verschiedener Signalwege	Signaltransduktion
I-5-B08	F28H1.3 (aars-2); Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	Ja	Alanyl Amino-acyl tRNA Synthetase: Bindung von Alanin an seine zugehörigen tRNA / Proteinbiosynthese	Alanin-tRNA Ligase: Katalysiert die Bindung von Alanin an tRNA	Genexpression
I-5-B14	F55C7.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-B15	W05F2.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-B20	F55C7.7 (unc-73); Triple functional domain protein	Ja	Uncoordinated: Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GNEF)	Fördert den Austausch von GDP durch GTP	Signaltransduktion
I-5-B24	C09D1.2 (clec-89); Lymphocyte antigen 75	Ja	C-type Lectin	Endozytischer Rezeptor	Signaltransduktion
I-5-C12	F37D6.7; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-C24	F59C6.6 (nlp-4); neuropeptide-like proteins	Nein	Neuropeptide-Like Protein		Unbekannte Funktion
I-5-D01	F49D11.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-D03	F49D11.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-D06	K08C9.7; Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	Ja		DNA-Schadensantwort	DNA-Reparatur/Replikation
I-5-D08	F32B4.1; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-D18	F32B4.6; Abhydrolase domain-containing protein 11	Ja		Mutation führt zu "Williams-Beuren Syndrom"	Posttranslationale Protein-Modifikation
I-5-D19	Y95D11A.2; "pseudo gene"	Nein	"Pseudo gene"		Unbekannte Funktion
I-5-D20	F32B4.4; Scaffold attachment factor B1	Ja		Bindung S/MAR-DNA; Bildung eines 'transkriptomalen' Komplexes (Transkription/RNA-Prozessierung)	Genexpression
I-5-D23	Y52B11A.1 (spe-38); Defective Spermatogenesis	Nein	Defective Spermatogenesis: Four-Pass-Transmembranprotein		Unbekannte Funktion
I-5-E10	F25H2.1 (tli-1); Toll interacting protein variant (Fragment)	Ja	Tolip homolog	Komponente des Signalweges von IL-1 und den Toll-like-Rezeptoren	Signaltransduktion
I-5-E16	F25H2.4; UPF0172 protein FAM158A = ER membrane protein complex subunit 9	Ja		Komponente des ER-Membran-Protein-Komplexes	Unbekannte Funktion
I-5-E22	F25H2.7; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-E24	F25H2.8 (ubc-25); Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q2	Ja	Ubiquitin Conjugating enzyme	Akzeptiert Ubiquitin von E1-Komplex und katalysiert seine kovalente Bindung an andere Proteine	Proteostase
I-5-F01	Y52B11A.2; Protein IMPACT	Ja		Translationsregulator: konstant hohe Translation unter Aminosäuremangel	Genexpression
I-5-F02	F15D3.2 (clec-101); C-type Lectin	Nein	C-type Lectin		Unbekannte Funktion
I-5-F04	F15D3.4; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-F05	Y52B11A.4; GTP-binding protein REM 1	Ja		Fördert Endothelzellen-Keimung und Aktin-Zytoskelett-Reorganisation	Signaltransduktion

RNA-Bibliothek	Anmerkungen	Säuger-Homolog	Funktion laut Wormbase.org	Funktion laut Uniprot.org	Gruppe
I-5-F06	F15D3.5; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-F08	F15D3.6; Protein slowmo homolog 2	Ja			Unbekannte Funktion
I-5-F09	Y52B11A.7 (mltn-2); Keratin-associated protein 4-2	Ja	<i>Mlt-Ten (mlt-10) related</i>	Haarkeratin-assoziiertes Protein	Strukturproteine
I-5-F14	F15D3.9; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-F22	C17D12.3; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion
I-5-F23	Y52B11B.2; (unbekanntes Protein)	Nein			Unbekannte Funktion

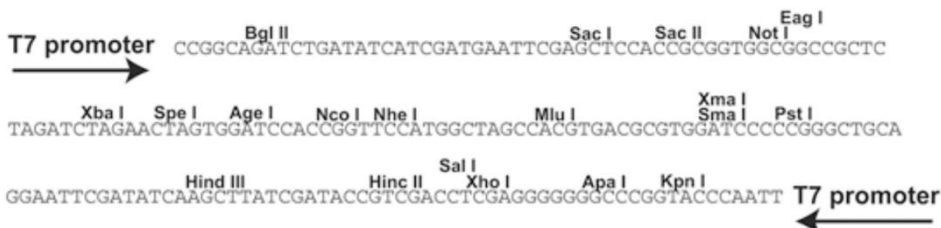
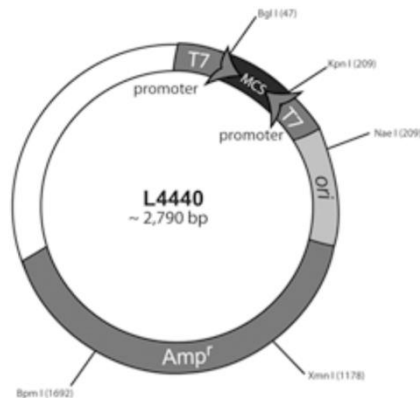
7.5. *Rbg-2* RNAi-Plasmid

A *rbg-2*: gespligte mRNA

```

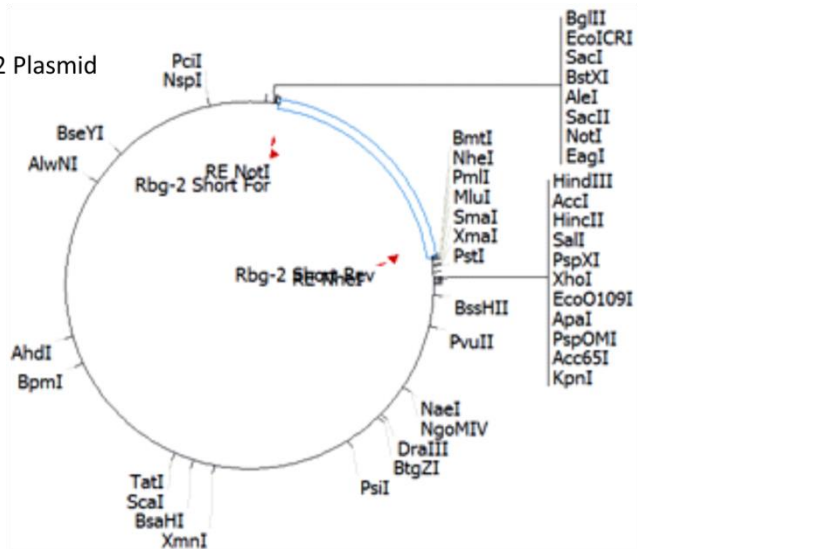
ATGTCGGTGACTCCGGTCAATTTGGAGGCATACTGTGCAGTTAGTGATGAGGTTGCCAAGCAGGTTAAAAAGTATTTGCTCGGAGATTTCCGAG
AAGAGTCAAAGTTCGAACGAAAAAAGCTCTGAGAGCTCTGATGGCAGCGAGACGCAATTCCTGCGAGCAACAGAAAAAGGAAAAATGTGGAAAG
GTGGGACGATTGGGGTGATAAAGAAAGAGGGCCCGCAGAGAATTCATTAGAATCTGACGAACTCTATACGAAATGGCTTTCCGATGTGATTT
AAAAACATATTCTGATGCAGAGTATCTTTGTCACTTGGGAATCAAGATTGTTGTGCTACGGAAGCCCCAGATGAGCCGGTCTACAAAAATAGT
TTGCAAAACATATATAGAAGGAGATCCGATAAGCAATGAAATCAGACCTTCATCTATATTTGGACTTCTAATGTTCCGACACATTGAACTTCTCGAT
TCAATTAATTTGCTCTGGGACTCTTGACGGTCAATGTTTATTTCTTACCGAACAAGGAAACAATGCTCTATTTCCGATCGATTTTCAATATTTGAAAC
AGTTAAATAGCTTGCAATTTGAAGTTGAAAACTGGTCAAACTTCAATGTTGGTTTTCCACAAAGGATTCTTCATGATTAATCCAATTTCACTCAAA
CAGTTCTTATCAAGCGAAGGTTTTGATAGCAAAATGCGAAAAACAGTGAACAAAATATCAGAATCAATTGAACTTCAATCAGAACTTCTTGCTC
CGGATATTAAGGAAAAATAATTCACGTGATATTCACAGGCTTTCATAAACCATCAACTTTGGAAACAATACATCTCAGCATCGTATGATTCATTTAT
GCAAAAGTTGAAAAACATCACTTCCACTTTACTCAACATTATGTTTACAACAGAAAAAGAAATTTGAGTCTTTGTATGGCAGCATCGAGAAGAG
CAAGATAAGCTTATAGATGACGTCATTAATATGAAAACTCTGGTCCCTTCTGGAAATCGAAAAATTTTGGTATTTCTACGGAACTGCTC
GAATCGCATCACATAGAGATCTGCTGTACATGCACCGACTAGAAGTATAATTATGGAGACAAGAGTGGCACAAAATGTGTCGAGATCTCCTGAT
TGTCATATGTTGCAGTAACGATCGTATGCGCCAGAGTCTTGTAAATGATATAGCATCCCGTCAAGTAGTTTTGATCTTCAAAGGATATCGAGAT
GCATCAATATCATGGGTATCAGTTACTGAAGATGATCGTGTGCACAGTTTTGACTATATTTGACCGAGAAGGTCGCTTCTGGAAGTTTTGGACT
GTATTTGGAAATGTTCCGGTATGTGCTCAGCACGTTCCATCTTCTGAATGTAATGTGGTCACTGGTGGAGAGAATAAAATGTTGTGGCCGAT
GTCACGTTTCATACCGATTCAAACCTATTTTTATTGATGAAAAAGGAGAATTTTCATCGAATGCTCTCACCATTCCATTTGGCACTCACAAGTAGATCA
CGTCAAGATCAACATGATCATTACTTTTGAACAACCTTGAGAATACGAAAACTGGCGGAGAAGATTGGTTTTCAAACTTTTCTGATCTTAAAAAT
GGCAGCATCCAGGAAAAACAACATTTCAAAATGCTTTCACAACCTTATCAACTGCTGAAGAAGCTCATCAATTCATCGCAAGAATTCGAAGTATTCCAA
CATCAGCTCTTTAGGAGATCTTCCAAATCTGCTGAAAAATCAATTTGGAATCTATGCAAGAAGCTTAGCAGAAAACAAAGCCACAGTTGGAGAGT
ACGATGATAAGGATACTTCAAATATAAATTTGGATTCGATAGTCGAGAGAATTTTGAATGTCATATGCAAGAAGTTGGTGAAGAAGCCGATATG
TTAAATGATAGTGAAGTGATGAAAGTTGGAGAATGGCTGAAAATATGTGGATTTGCTCAAGAGGATATTGATGTTTTTTCAGAGCATTGGTCAG
AAAAACAACGACTGCTTAGCCAACTGATATTTGGACCATTTTTGGATCTTCGAGATAGACGAATACTATGATACTGACTGGAGAAAAATTC
CAGTAAAACGGAAAAATATCGTTAAATATTTCTATATGAGATTTGAAAAGACAACACACATCGATTTGGAGAATATTCATAGAATAGTGGAA
ATGTTTCTGAATTTGGAGAATCTGAACTGGAATACTGGAACAAGTTGATCAAATGGCAATGGATTGAAAGATGACCTTTGGAAATGATATT
ATTATCTATTTGTTGGTGTGCAAGGATACAAATCAGAAATTTGAAAGGAAACGACGAGGATGAAAGTTGAAATGATCATGATCTGGAAGAGGA
AGATGAAAAGAATAAAAACAATTTGATGAATGGGATGCTATATCACCAGAAGCTGAACATCTCGATTTGATTAATGTTTACATTGTTTCACT
TGCTCAATCCCTCTTAAAAGACGATTGCAATATTTGAGAAATTTCTGATGTTGTCGAAGAATGACTCTTATAAGAGAAAAATGTCGCAAAATG
GATCGTATCCACTCCAATCGACACAGATACAATTGAAAAATATTTCCACGTGATCCAAAGTGAATACTAGCTGAAAAAGGAAATGAGGAAGATC
GTCGAAAACAATGATAATGATTTCCGGATGACAAAAGAGTGGTTATACAGAGAATGATCAAATTTCCACGTGTTTTGAGCAGCATCTTG
TTGTTGCTGATGTGCTGGGAGATGATGTCACAAATGGTTCGGCGAAAAAGATGACAAATTTTCTATATCAAGGATTGACAGCGCTTCCACGC
AATCAATTTGTGATCCAAAGACTCGTCAAGGAACTGCACTTATATGGGATAAATTCATTTTCATGTTTTCCAATCAATTTGAAATAGTGTGA
AAAGACGGTGCAGCAGCCGAAAGCAAGGAAACGAAAAAGAAATCGTTTTGGAGAAGTAAAACAGAAAGAAATTTCTAATGGAATGTTAAAA
GTTTTTGAAGTTCTCATGATTTCTGTTGAGACATGCCACCACCGATTGATTTTAAACAAGATTGCTTGTGCGAGATGGCGAGCTCTTTCTGCT
GCTCACCTGCATCAATCCAAACTGCTTATCGTCAAGATCAATTCGCAATCCTTGTCTCACGCCAACCTTGTCAATTTTCACTGGTGTCCATCATC
AACACCTGGCTCTTCTCTGACTACAACAACTGGAACCTCGTTCCATCTTTCAGCAATTTAATCTGTGTAACGGAATCGAGCATTCTTTG
CTTCACTGATTCACATCCACTCATTCCATTGGATCGAGTCGATGATGCTACAATGGAGAAACGACACGCTTTTTGTTAAAGTTGCAGAAACG
GAAGTATGGAAGAACGACGATTGGCTAGACATTTAGAAATGGAATGAAACTGACAGTCAATGAAATTTGTTTCTGTCAGCAAGCATTATCGTCTTC
CGTCTTGGCAATGATCAAGATCCTTGGAACTTGATCTTGTGTTCCGGACGATCGATCAGCAGTTGCACTGGCAGGTGTTCTTGTCTGTAGA
CTTATTCAACTGCAAAATGAAGCGAAACAAACGATACAGTACTGCTCATTCTCAATCCTATGTGCACCTGCTGGGGAAGAAGCTGCTGTTAGAG
CTTTATGAAAACCTCCAGATGATCCTTTAGTCGACAGTAAATCCAAAACTGGAAAGATGCAGTTACATCACTTGGAAAGCTGGAACCTCGGTA
CCACAATCGCGCAGGCCCATTCATTTGTCGAATGAATGATATTGCCAACTATATTTCCGAGCTCAGTGGGTGAATAATTGA
    
```

B L4440-Plasmid



C

L4440-RBG2 Plasmid



D

L4440-RBG2 Insert



7.6. Liste der HCIPs der proteomischen Analyse

Bait	GeneID	Symbol	Ave.APSM	WDN_Score	Z_Score	Ratio	Found_In	Indi_APSM	Description_From_Search_Database
RAB3GAP2	25782	RAB3GAP2	259	10,22	10,56	5/114	2	255.262	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit
RAB3GAP2	22930	RAB3GAP1	60	7,61	10,47	3/114	2	57,62	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit
RAB3GAP2	9276	COPB2	26	2,28	10,48	11/114	2	26,26	Coatomer subunit beta'
RAB3GAP2	372	ARCN1	19	2,42	10,49	8/114	2	20,17	Coatomer subunit delta
RAB3GAP2	22820	COPG	18	2,85	10,28	5/114	2	20,15	Coatomer subunit gamma
RAB3GAP2	26958	COPG2	12	1,13	10,17	11/114	2	12,11	Coatomer subunit gamma-2
RAB3GAP2	160428	ALDH1L2	3	3,93	10,61	1/114	2	3,2	Aldehyde dehydrogenase family 1 member L2, mitochondrial
RAB3GAP2	8140	SLC7A5	3	3,93	10,61	1/114	2	3,2	Large neutral amino acids transporter small subunit 1
RAB3GAP2	8906	AP1G2	3	3,93	10,61	1/114	2	3,3	AP-1 complex subunit gamma-like 2
RAB3GAP2	9557	CHD1L	3	1,96	9,87	2/114	2	3,2	Isoform 2 of Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like
RAB3GAP2	10999	SLC27A4	3	1,96	7,38	2/114	2	3,2	Long-chain fatty acid transport protein 4
RAB3GAP1	22930	RAB3GAP1	454	21,84	10,58	3/114	2	476.431	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit
RAB3GAP1	56288	PARD3	19	6,12	10,57	2/114	2	19,18	Isoform 9 of Partitioning defective 3 homolog
RAB3GAP1	25782	RAB3GAP2	19	1,93	7,82	5/114	2	22,15	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit
RAB3GAP1	9217	VAPB	19	1,59	5,12	8/114	2	17,21	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C
RAB3GAP1	9218	VAPA	18	1,42	5,1	8/114	2	20,15	Isoform 2 of Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
RAB3GAP1	64326	RFWD2	10	6,99	10,54	1/114	2	10,9	E3 ubiquitin-protein ligase RFWD2
RAB3GAP1	8260	NAA10	7	1,2	10,13	6/114	2	8,5	N-alpha-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit

RAB3GAP1	83931	STK40	5	4,95	10,55	1/114	2	4,5	Isoform 4 of Serine/threonine-protein kinase 40
RAB3GAP1	55070	DET1	4	4,42	10,7	1/114	2	3,5	DET1 homolog
RAB3GAP1	1111	CHEK1	4	1,47	9,88	3/114	2	3,4	Serine/threonine-protein kinase Chk1
RAB3GAP1	159090	FAM122B	4	1,11	6,96	4/114	2	5,3	Isoform 2 of Protein FAM122B
RAB3GAP1	83448	PUS7L	3	3,83	10,61	1/114	2	2,3	Pseudouridylate synthase 7 homolog-like protein
RAB3GAP1	327	APEH	3	3,83	10,61	1/114	2	3,2	Acylamino-acid-releasing enzyme
RAB3GAP1	9820	CUL7	3	1,92	9,87	2/114	2	3,3	Cullin-7
RAB3GAP1	23317	DNAJC13	3	1,28	9,55	3/114	2	4,2	DnaJ homolog subfamily C member 13
FEZ1	9638	FEZ1	12	7,78	10,62	1/114	2	9,14	Fasciculation and elongation protein zeta-1
FEZ1	23317	DNAJC13	9	2,83	10,47	3/114	2	7,11	DnaJ homolog subfamily C member 13
FEZ1	288	ANK3	8	6,36	10,57	1/114	2	9,6	Ankyrin-3
FEZ1	4035	LRP1	8	1,04	7,31	7/114	2	9,6	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1
FEZ1	9414	TJP2	6	1,44	0,98	9/114	2	7,4	Isoform C1 of Tight junction protein ZO-2
FEZ1	23155	CLCC1	5	2,51	10,31	2/114	2	5,4	Isoform 2 of Chloride channel CLIC-like protein 1
FEZ1	23061	TBC1D9B	5	1	6,59	5/114	2	4,5	Isoform 2 of TBC1 domain family member 9B
FEZ1	6233	RPS27A	4	2,25	10,15	2/114	2	3,4	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
FEZ1	259266	ASPM	4	1,12	9,61	4/114	2	4,3	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein
FEZ1	57492	ARID1B	3	1,95	9,87	2/114	2	2,3	Isoform 2 of AT-rich interactive domain-containing protein 1B
FEZ1	60592	SCOC	3	1,95	9,87	2/114	2	3,3	Isoform 2 of Short coiled-coil protein
FEZ1	9589	WTAP	3	1,3	9,55	3/114	2	2,3	Pre-mRNA-splicing regulator WTAP
FEZ1	3054	HCFC1	3	1,1	0,01	11/114	2	1,4	Isoform 2 of Host cell factor 1
FEZ1	57532	NUFIP2	3	1,1	2,06	4/114	2	4,2	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

Schulbildung

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

Praktika

[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]

Hochschulstudium

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Poster

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Publikationen

[Redacted]

Nebentätigkeiten

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Berufserfahrung

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den 18. Januar 2015

.....

Natalie Spang