



# **Funktionelle Charakterisierung des Proteins DNAJC13 in der Autophagie**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
angefertigt am Institut für Pathobiochemie  
vorgelegt von

**Joanna Maus**  
geboren am 31. Oktober 1985 in Wiesbaden

Mainz, Oktober 2018

Dekan: Prof. Dr. [REDACTED]

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. [REDACTED]

2. Berichterstatterin: PD Dr. [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung:

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich, Joanna Maus, die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, Oktober 2018

.....

Joanna Maus



„There are more things in heaven and earth, *Horatio*, than are dreamt of in your philosophy.“ (Hamlet, act 1, scene 5, *William Shakespeare*)



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Proteinhomöostase	1
1.1.1	Molekulare Chaperone	3
1.1.2	Proteindegradation	5
1.2	Die Makroautophagie	8
1.2.1	Initiation der Autophagie (1)	9
1.2.2	Autophagosomale Biogenese (2)	10
1.2.3	Vesikulärer Transport und lysosomale Fusion (3)	11
1.2.4	ATG8-Proteine und Autophagie-Rezeptoren determinieren die Selektivität der Autophagie	12
1.3	Konvergenzpunkte des autophagosomalen und des endosomalen Netzwerks	15
1.3.1	Rab-GTPasen	16
1.3.2	Der Retromer-Komplex	18
1.4	DNAJC13	21
1.5	Ziele der Dissertation	25
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODE</b>	<b>26</b>
2.1	Material	26
2.1.1	Geräte	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.2.1	Chemikalien	27
2.1.2.2	Oligonukleotide	29
2.1.2.3	Vektoren und Plasmide	30
2.1.2.4	Kits und Größenstandards	31
2.1.2.5	Enzyme, die unabhängig von Kits verwendet wurden	31
2.1.2.6	Antikörper	32
2.1.3	Organismen	33
2.2	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1	DNAJC13 Plasmide	33
2.2.2	Polymerasekettenreaktion	34
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.4	DNA-Extraktion	37
2.2.5	Restriktion	37
2.2.6	Ligation	39
2.2.7	Transformation von Bakterien	39

2.2.8	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	41
2.2.9	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA.....	41
2.2.10	Sequenzierung der DNA.....	41
2.3	Zellbiologische Methoden.....	42
2.3.1	HEK293-Zellen.....	42
2.3.2	Kryokonservierung und Kultivierung von Zellen.....	42
2.3.3	Transfektion von Zellen.....	43
2.3.4	BafilomycinA <sub>1</sub> -Behandlung.....	45
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	46
2.4.1	Immunfluoreszenzfärbung.....	46
2.4.2	Zellyse und Proteinpräparation.....	47
2.4.3	ATG8-GST Proteinreinigung und DNAJC13 Peptid Array.....	48
2.4.3.1	Proteinreinigung von rekombinantem ATG8-GST.....	48
2.4.3.2	DNAJC13 Peptid Array.....	49
2.4.4	Proteinquantifizierung nach der BCA-Methode.....	51
2.4.5	Co-Immunopräzipitation.....	51
2.4.6	Differentielle Fraktionierung.....	52
2.4.7	SDS-PAGE.....	53
2.4.8	Proteintransfer auf eine Trägermembran.....	54
2.4.9	Immundetektion Membran-gebundener Proteine.....	55
2.5	Statistik.....	56
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
3.1	Charakterisierung der DNAJ-Domäne von DNAJC13.....	57
3.1.1	Generierung und Untersuchung einer DNAJC13-DNAJ Expressions-Mutanten.....	57
3.1.2	Untersuchung des Einflusses der DNAJC13-DNAJ Mutante auf den autophagischen Flux.....	59
3.1.3	Subzelluläre Lokalisation der DNAJC13-DNAJ Mutante.....	60
3.2	Untersuchung der Interaktion von DNAJC13 mit ATG8-Proteinen.....	63
3.2.1	Untersuchung der Interaktion von DNAJC13 mit LC3B.....	63
3.2.2	Untersuchung der Interaktion von GST-ATG8 mit DNAJC13.....	64
3.2.3	Subzelluläre Lokalisation von DNAJC13 und ATG8.....	65
3.3	Charakterisierung putativer LIR-Motive von DNAJC13.....	67
3.3.1	Identifizierung von vier LIR-Motiven innerhalb von DNAJC13 mittels eines Peptid Arrays.....	67
3.3.2	Untersuchung der DNAJC13 Proteinstruktur via PONDR.....	70
3.3.3	Das DNAJC13-LIR4-Motiv ist homolog zum LIR-Motiv in FUNDC1.....	71



3.4	Charakterisierung der vier verschiedenen DNAJC13-LIR Mutanten.....	72
3.4.1	Untersuchung des Einflusses der DNAJC13-LIR1-4 Mutanten auf den autophagischen Flux.....	73
3.4.2	Subzelluläre Verteilung der DNAJC13-LIR Mutanten.....	75
3.5	Detaillierte Analyse des LIR-Motivs LIR4 von DNAJC13 .....	81
3.5.1	Generierung und Untersuchung der subzellulären Verteilung eines N- und C- terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukts sowie eines DNAJC13- $\Delta$ LIR4 Konstrukts.....	81
3.5.2	Generierung und Untersuchung der Subzelluläre Verteilung von C-terminal trunkierten DNAJC13-LIR4 Mutanten (TV1-3) und einer DNAJC13 <i>Triple</i> LIR Mutante (TM).....	83
3.5.3	Untersuchung des Einflusses der DNAJC13 Triple LIR Mutante TM sowie der C- terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte TV1-3 auf den autophagischen Flux...90	
3.5.4	Differentielle Fraktionierung der DNAJC13 Konstrukte TV1-3 sowie LIR4 .....	92
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>94</b>
4.1	Die DNAJ-Domäne von DNAJC13 bestimmt die Konformation des Proteins .....	95
4.2	DNAJC13 beeinflusst die Proteostase durch Regulation der Autophagie.....	97
4.2.1	DNAJC13 interagiert mit ATG8-Proteinen .....	97
4.2.2	DNAJC13 enthält vier LIR-Motive.....	99
4.2.3	Charakterisierung der vier LIR-Motive innerhalb von DNAJC13 .....	100
4.2.4	Das DNAJC13-LIR4-Motiv .....	104
4.2.5	Charakterisierung der verschieden mutierten und trunkierten DNAJC13-LIR4 Konstrukte.....	105
4.2.6	Die Konformation des multifunktionalen Proteins DNAJC13 .....	109
4.3	Ausblick.....	113
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung/Summary .....</b>	<b>114</b>
5.1	Zusammenfassung.....	114
5.2	Summary .....	115
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>133</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	133
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	135
7.3	Plasmidkarte und DNAJC13-Sequenz.....	137
7.4	Lebenslauf.....	140
7.5	Publikationsleistung.....	141
7.6	Danksagung.....	142



## 1 EINLEITUNG

Die Existenz von Leben und somit das Überleben eines einfachen, erstmals auf der Erde auftretenden Organismus trat nach Darwins Evolutionstheorie vor rund vier Milliarden Jahren auf. Im Laufe von Millionen und Milliarden Jahren entwickelten sich durch Endosymbiose dieser einfachen prokaryotischen Organismen komplexe eukaryotische Lebensformen (Endosymbiontentheorie), denen ein Zellkern mit der darin enthaltenen genetischen Erbinformation, der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA), gemeinsam ist. Die in der DNA enthaltenen Gene codieren für Proteine, welche als die komplexesten Funktionseinheiten einer jeden Zelle und somit eines jeden Organismus anzusehen sind. Um eine native, physiologische und auch interaktive Funktion von Proteinen zu gewährleisten, ist ein ausgeklügeltes Zusammenspiel vieler evolutionär hoch konservierter Proteine von essentieller Bedeutung.

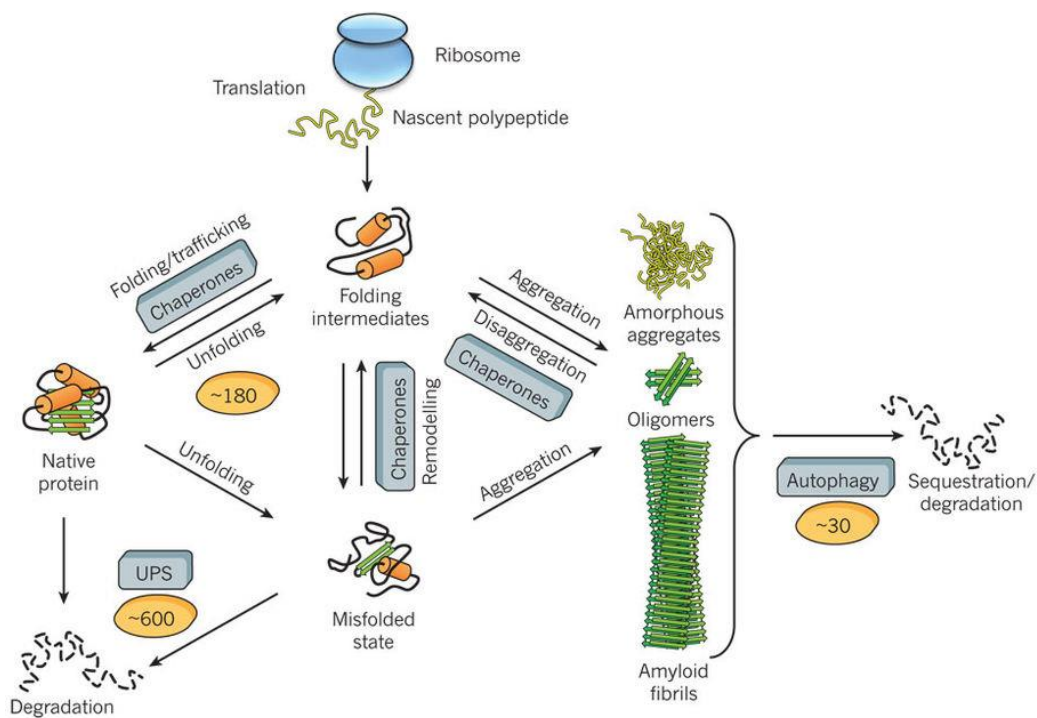
### 1.1 Proteinhomöostase

Die Proteinhomöostase, auch Proteostase genannt, beschreibt die physiologische Aufrechterhaltung eines funktionellen Gleichgewichtszustands aller in einer Zelle auftretenden Proteine. Die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, das Proteom, unterliegt einer permanenten Qualitätskontrolle; Proteinsynthese, Proteintransport, Proteinmodifikation und auch der Abbau von Proteinen wird von diesem evolutionär hoch konservierten Qualitätskontrollsystem streng kontrolliert und reguliert (Goldberg, 2003; Kubota, 2009). Ein komplexes Netzwerk aus molekularen Chaperonen stellt die erste wichtige Komponente des Qualitätskontrollsystems zur Aufrechterhaltung der Proteostase dar (Kim *et al.*, 2013). Sie stabilisieren einerseits neu synthetisierte Proteine und unterstützen aktiv deren Faltung sowie ihre Rückfaltung bei einer fehlerhaften Proteinkonformation, andererseits identifizieren sie stark fehlgefaltete Proteine und führen diese einer entsprechenden Abbaumaschinerie zu. Dabei wird zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und dem autophagolysosomalen Abbau unterschieden (**Abbildung 1**) (He and Klionsky, 2009; Morawe *et al.*, 2012).

Das Netzwerk von molekularen Chaperonen sowie die beiden Degradationsmaschinerien gewährleisten die korrekte Funktion von Proteinen und damit das Überleben einer Zelle. Ist eine Zelle anhaltenden Stressbedingungen, wie z.B. oxidativem Stress, ausgesetzt, kann es vermehrt zur Bildung von geschädigten Proteinen kommen. Geschädigte Proteine,

# 1 EINLEITUNG

welche nicht sofort durch das Qualitätskontrollsystem erfasst werden, zeigen eine Tendenz zur Akkumulation, wodurch das Überleben eines Organismus gefährdet sein kann. Der natürliche Alterungs-Prozess begünstigt solche Ablagerungen. Insbesondere Neurone zeigen eine Anfälligkeit gegenüber der Ablagerung solcher Proteinaggregate, die als Zeichen einer gestörten Proteostase angesehen werden und pathologisches Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit (*Alzheimer's disease, AD*), der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) oder der Parkinson-Krankheit (*Parkinson's disease, PD*) darstellen (Rubinsztein *et al.*, 2005; Rubinsztein, 2006; Martinez-Vicente and Cuervo, 2007; Levine and Kroemer, 2008; Mizushima *et al.*, 2008; Kern *et al.*, 2010; Hartl, Bracher and Hayer-Hartl, 2011; Morawe *et al.*, 2012). Diese neurodegenerativen Erkrankungen aber auch weitere Erkrankungen wie beispielsweise Arteriosklerose oder Diabetes mellitus, oder Infektions- und kardiovaskuläre Krankheiten, sind alle mit einer Akkumulation von Proteinen assoziiert und unterstreichen die besondere Bedeutung dieses Qualitätskontrollsystems für die Proteostase einer Zelle.



**Abbildung 1: Molekulares Netzwerk aus Chaperonen, dem UPS und der Autophagie zur Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase.** Molekulare Chaperone dienen der Faltung, dem Transport sowie der Assemblierung und Kompartimentierung von Proteinen. Sie erkennen auch geschädigte, amorphe Proteinaggregate und verhelfen ihnen zur Disaggregation oder führen diese einer der beiden Degradationsmaschinerien, dem UPS oder der Autophagie, zu (Hartl et al. 2011).

### 1.1.1 Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone dienen zusammen mit vielen Hilfsfaktoren, wie beispielsweise ihren Co-Chaperonen, der Faltung und Stabilisierung neu synthetisierter Proteine sowie deren Assemblierung, Kompartimentierung und intrazellulären Verteilung. Sie sind in der Lage fehlgefaltete Proteine anhand unstrukturierter, hydrophober Bereiche zu erkennen und diesen entweder durch Wechselwirkungen wieder in ihre korrekte, physiologische Konformation zurück zu verhelfen oder sie einem der Degradationswege, dem proteasomalen oder dem (autophago-) lysosomalen Abbauweg, zuzuführen (**Abbildung 1**).

Zu den wichtigsten Chaperonen gehören die evolutionär hoch konservierten, ubiquitär exprimierten Hitzeschockproteine (HSP), die entsprechend ihrer Sequenzhomologie sowie ihres Molekulargewichts in kleine HSPs (*small heat shock proteins*, sHSPs) sowie in DNAJ/HSP40, GroEL/HSP60, HSP70, HSP90 und Clp/HSP100 unterteilt werden (Pauli, Arrigo and Tissières, 1992; Frydman, 2001; Hartl, Bracher and Hayer-Hartl, 2011; Jee, 2016).

Die zytosolische HSP70-Proteinfamilie gehört zu den am besten untersuchten Chaperonen, deren Mitglieder in eine konstitutiv exprimierte Form (HSC70) und eine durch verschiedenster Stressoren induzierbare Form (HSP70) untergliedert werden. Strukturell besteht HSC70/HSP70 aus einer C-terminal gelegenen Substrat-Bindedomäne an die beispielsweise Proteinaggregate binden und einer N-terminal gelegenen ATPase-Domäne. Die zyklische Substratbindung und -freisetzung erfolgt immer in Abhängigkeit von ATP-Bindung, Hydrolyse sowie Nukleotid-Austausch und wird durch entsprechende Co-Chaperone reguliert (Mayer and Bukau, 2005).

Die Stimulation der HSP70 ATPase-Aktivität wird durch die Bindung der charakteristischen DNAJ-Domäne von DNAJ/HSP40-Proteinen an HSP70 vermittelt (Qiu *et al.*, 2006). Die Proteinfamilie der HSP40 Co-Chaperone, im Bakterium DnaJ genannt, wird ihrer Struktur nach in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt: DNAJA, DNAJB und DNAJC. Generell enthalten alle DNAJ Proteine die evolutionär konservierte, 70 Aminosäuren große DNAJ-Domäne. Die DNAJA-Familie enthält außerdem eine G/F-reiche Domäne (Glycin/Phenylalanin-reiche Domäne), eine Zink-Finger-Domäne sowie eine Cystein-reiche Region, während letztere nicht innerhalb der B-Familie vorkommt (Qiu *et al.*, 2006). Die DNAJC-Familie stellt eine Ausnahme dar. Sie enthält lediglich die DNAJ-Domäne (Hasegawa *et al.*, 2018). Die Vielfalt an HSP40-Proteinen ist enorm. So wurden

## 1 EINLEITUNG

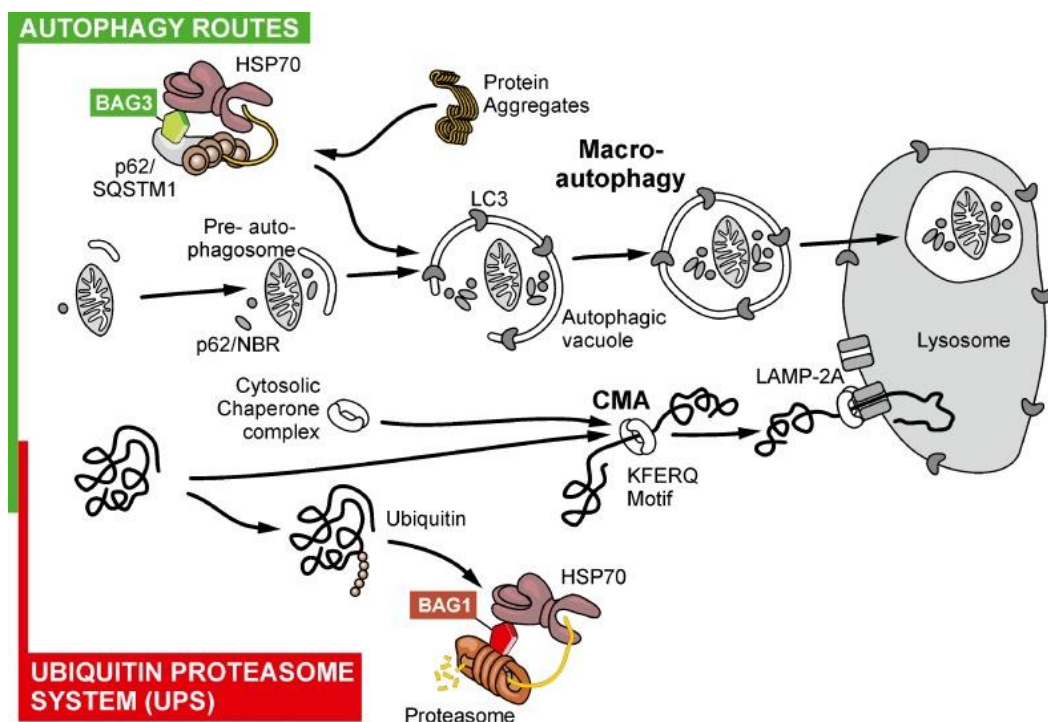
beispielsweise für den Menschen bereits 41 DNAJ/HSP40-Proteine beschrieben, welche mit 11 Mitgliedern der HSP70-Familie interagieren können. Auf diese Weise wird die Bildung potentieller kombinatorischer Chaperon-Komplexe ermöglicht (Kampinga and Craig, 2011; Gorenberg and Chandra, 2017).

Die DNAJ/HSP40-Proteinfamilie erhält in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit in der Forschung. Neueste Untersuchungen zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen mutierten Mitgliedern der DNAJ-Proteinfamilie und der familiären PD (Gorenberg and Chandra, 2017; Puschmann, 2017; Hasegawa *et al.*, 2018). Hierzu gehören beispielsweise die Mutationen-tragenden Proteine DNAJC6, DNAJC12 und DNAJC13 (Edvardson *et al.*, 2012; Vilariño-Güell *et al.*, 2014; Anikster *et al.*, 2017; Straniero *et al.*, 2017).

Neben den DNAJ/HSP40-Proteinen zählen die sogenannten Nukleotid-Austausch-Faktoren (*nucleotid exchange factors, NEFs*) zu den wichtigsten Co-Chaperonen von HSP70. Ein Beispiel für diese sogenannten NEFs sind die BAG- (*BCL2-associated athanogene*) Proteine BAG1-BAG6. Charakteristisch für diese Proteinfamilie ist ihre hoch konservierte, C-terminal gelegene BAG-Domäne, über die diese mit HSP70 interagieren können. Untersuchungen in unserem Labor haben gezeigt, dass das in jungen Fibroblasten verstärkt exprimierte Co-Chaperon BAG1 zum einen HSP70 und zum anderen direkt, über eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (*ubiquitin-like (UBL) domain*), an das Proteasom bindet. Dadurch übernimmt BAG1 eine essentielle Rolle beim Transfer ubiquitiniertes, zum Abbau bestimmter Proteine via UPS. Während des zellulären Alterungs-Prozesses findet eine Verschiebung bzw. Erhöhung des Expressionsniveaus von BAG1 zu BAG3 statt wodurch verstärkt die BAG3-vermittelte autophagolysosomale Route zur Proteindegradation eingeschlagen wird (Gamerding *et al.*, 2009; Behl, 2011; Stürner and Behl, 2017). Dieser alters- sowie oxidative Stress abhängige, molekulare *Switch* des Expressionslevels von BAG1 hin zu BAG3 und somit eine Verschiebung des gewählten Degradationsweges von UPS zur Autophagie, verdeutlicht die Verknüpfung von molekularen Chaperonen und ihren Co-Chaperonen mit den beiden Degradationswegen (**Abbildung 2**).

### 1.1.2 Proteindegradation

Proteine werden degradiert, wenn sie beispielsweise ihre intrinsische Halbwertszeit erreicht haben oder durch extrinsische Faktoren wie Stress ihre native Struktur verloren haben und somit fehlgefaltet vorliegen. Molekulare Chaperone erkennen solche fehlgefalteten Proteine aufgrund exponierter hydrophober Seitenketten und verhelfen ihnen in ihre native Konformation zurück. Sollen Proteine jedoch aufgrund der in- sowie extrinsischen Faktoren abgebaut werden, bedient sich die eukaryotische Zelle zweier proteolytischer Degradationsmaschinerien (**Abbildung 2**). Das UPS dient dabei vor allem der Degradation kurzlebiger Proteine bzw. dem normalen Protein-*Turnover*, wohingegen durch die Autophagie vorzugsweise langlebige Proteine, ganze Organellen, Proteinaggregate oder sogar Pathogene abgebaut werden können (Klionsky and Codogno, 2013).



**Abbildung 2: Überblick über die Degradationsmaschinerien: Autophagie und UPS.** Proteine die für den Abbau über das UPS bestimmt sind, werden anhand eines Ubiquitinierungsmusters von molekularen Chaperonen und ihren Co-Chaperonen erkannt und dem Proteasom zugeführt und abgebaut. Mit einer KFERQ-Sequenz gekennzeichnete Proteine werden über den Weg der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA) durch das Lysosom degradiert. Zellorganellen und fehlgefaltete Proteine werden in Autophagosomen eingeschlossen und nach Fusion mit dem Lysosom abgebaut (Morawe *et al.*, 2012).

## 1 EINLEITUNG

Proteine, deren Degradation über das UPS vermittelt wird, müssen dafür durch eine E1-, E2- und E3-Enzymkaskade ubiquitiniert werden. Ein aktivierendes Enzym (E1), ein konjugierendes Enzym (E2) und eine Ubiquitin-Ligase (E3) addieren dabei stufenweise Ubiquitinmoleküle auf das abzubauen Protein. Somit entsprechend für den Abbau durch das UPS markiert, können diese Proteine durch das Proteasom identifiziert, gebunden und schließlich abgebaut werden (Ciechanover, 1998; Hershko and Ciechanover, 1998; Ravid and Hochstrasser, 2008). Das sogenannte 26S-Proteasom setzt sich aus einem 20S-Kernkomplex und zwei, den Kernkomplex flankierenden, regulatorischen 19S-Komplexeinheiten zusammen. Die beiden regulatorischen 19S-Komplexeinheiten dienen der Erkennung, der Bindung und der Entfaltung ubiquitiniertes Proteine und leiten diese in den zylinderartigen Hohlkörper des 20S-Kernkomplexes weiter, welcher sich durch die im Inneren lokalisierten proteolytisch aktiven Zentren auszeichnet. Darin werden ihre Substrate proteolytisch gespalten und als einzelne Aminosäuren der Zelle zurückgeführt (Wolf and Hilt, 2004; Amm, Sommer and Wolf, 2014).

Die Autophagie stellt einen hoch konservierten und basal ablaufenden Degradationsprozess dar, bei dem zytoplasmatische Substrate durch lysosomale Hydrolasen degradiert werden. Die Abbauprodukte werden dann zur Nährstoffmangel- ausgleichender Wiederverwertung der Zelle bereitgestellt (Yorimitsu and Klionsky, 2005; Parzych and Klionsky, 2014).

Obwohl der Prozess der lysosomalen Proteindegredation ursprünglich durch den belgischen Biochemiker und Zellforscher Christian de Duve 1966 im Säuger entdeckt (de Duve *et al.*, 1955; Novikoff *et al.*, 1956; Clark, 1957; de Duve and Wattiaux, 1966), gelang Yoshinori Ohsumi Anfang der 1990er Jahre der Durchbruch für das molekulare Verständnis der Autophagie im Modellorganismus *Saccharomyce cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Die Forschergruppe um Ohsumi identifizierte das erste Autophagie-Gen *apg1* (*APG*, *AutoPhaGy*) mittels eines genetischen *Screens*, in dem nach Autophagie-Mutanten gesucht wurde (Tsukada and Ohsumi, 1993; Klionsky, 2012). Ihre weiterführenden Forschungsergebnisse über Autophagie-Gene und -Proteine halfen, die Kaskade von Proteinen und Proteinkomplexen des Autophagie-Prozesses zu entschlüsseln. Ohsumi wurde im Jahr 2016 für diese wissenschaftliche Leistung der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen. Bereits 2003 wurde eine einheitliche Nomenklatur für Autophagie-Gene und deren Proteine basierend auf dem Akronym ATG – „*AuTophaGy*-



## 1 EINLEITUNG

*related*“ eingeführt (Klionsky, 2012; Klionsky and Codogno, 2013). Von den aktuell beschriebenen 38 essentiellen ATG-Proteinen in *S. cerevisiae* ist etwa die Hälfte auch im humanen System konserviert (Wild, McEwan and Dikic, 2014). Mizushima identifizierte die ersten Autophagie-Gene *atg5* und *atg12* im Säuger und zeigte erstmals, dass die Maschinerie der Autophagie ein von *S. cerevisiae* bis zum Säuger konservierter Prozess ist (Mizushima *et al.*, 1998). Kurze Zeit später wurde das Säuger-Homolog von ATG8, MAP1LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*, MAP1-LC3, LC3), gefunden. Es erwies sich, dass LC3 an autophagosomalen Membranen lokalisiert, wodurch es als Marker dieser Strukturen fungiert. Hierdurch ergab sich der Vorteil, dass es über biochemische als auch bildgebenden Verfahren zur maßgeblichen Aufklärung des autophagischen Prozesses verwendet werden konnte (Kabeya, 2000).

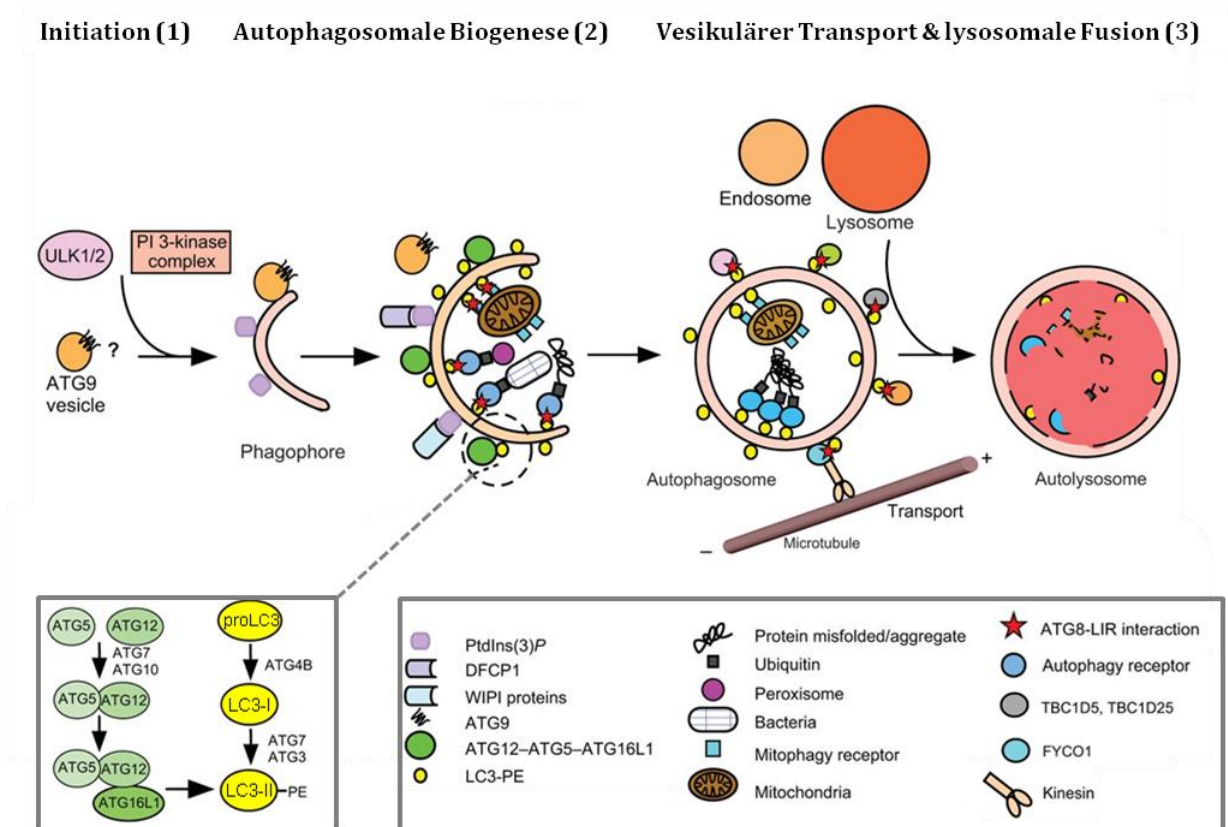
So ist heute bekannt, dass die Autophagie ein streng regulierter und hoch konservierter, basal ablaufender Prozess der Zelle ist, welcher durch verschiedene Stressoren wie Nährstoffmangel, zellulären Stress, reaktive Sauerstoffspezies, Pathogene und fehlgefaltete Proteine stimuliert wird (Mizushima, 2007). Anhand der Vielfältigkeit ihrer Induktoren und mit einhergehend der Vielzahl an ihren Substraten, lässt sich die Autophagie in drei große Hauptgruppen einteilen: die Makroautophagie (siehe 1.2), die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperon-mediated autophagy*, CMA).

Die CMA ist definiert als der selektive Abbau von löslichen, mit der Aminosäuresequenz KFERQ markierten Proteinen im Lysosom. Das Chaperon HSP70 erkennt diese Proteine über diese Erkennungssequenz, transportiert sie zum Lysosom und bindet dort an den lysosomalen Membran-Rezeptor LAMP2A (*lysosomal membrane-associated receptor 2A*). Die Bindung induziert eine Oligomerisierung des Rezeptors, gefolgt von der Translokation des abzubauenen Proteins in das Innere des Lysosoms (**Abbildung 2**) (Arias and Cuervo, 2011; Kaushik and Cuervo, 2012).

Bei der Mikroautophagie werden abzubauenende Substrate nicht selektiv, direkt durch lysosomale Membranen eingeschlossen (Invagination) und degradiert. Obwohl die Mikroautophagie im Säuger als eine eigene Form, die konstitutiv aktiv am Umsatz langlebiger Proteine beteiligt ist, angesehen wird, fehlt bis heute das Verständnis für den Mechanismus sowie die Regulation über die Auswahl der Substrate (Mijaljica, Prescott and Devenish, 2011).

## 1.2 Die Makroautophagie

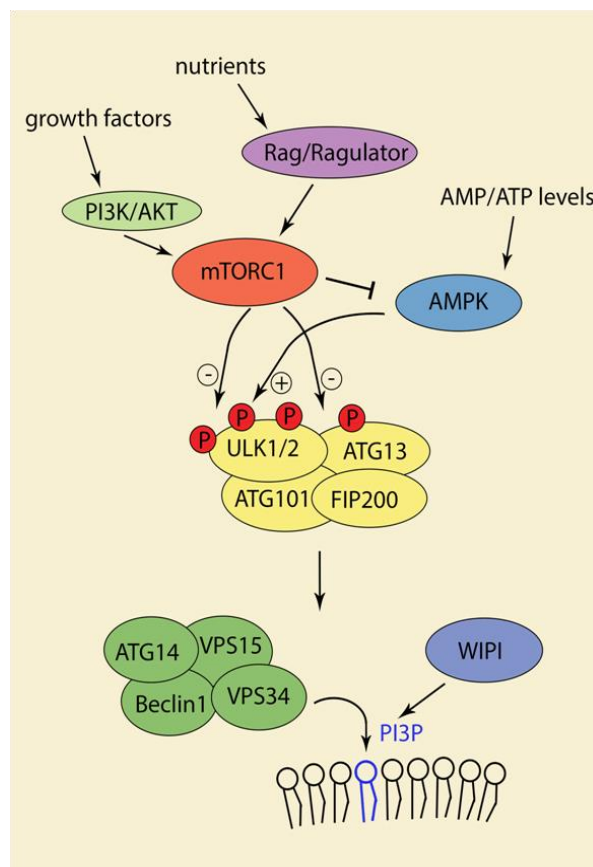
Die Makroautophagie, von hier an vereinfacht nur Autophagie genannt, ist als ein hoch dynamischer Degradationsprozess definiert, bei dem Initial eine vesikuläre Doppelmembran, die sogenannte Phagophore, gebildet wird. Diese vermag abzubauenendes Material wie langlebige Proteine, Proteinaggregate, ganze Zellorganellen oder Pathogene abzugrenzen. Nachdem die Phagophore vollständig um das abzubauenende Material verlängert wurde, entsteht das reife Autophagosom. Dieses fusioniert mit dem Lysosom zu einem Autophagolysosom, in dem schließlich durch lysosomale Hydrolasen die Substrate degradiert werden (Mizushima, 2007; Mizushima and Komatsu, 2011; Khaminets, Behl and Dikic, 2016). Autophagie findet in allen eukaryotischen Zellen basal statt und kann durch verschiedene physiologische Stressoren wie beispielsweise Nährstoffmangel induziert werden. Der molekulare Mechanismus lässt sich in drei Teile gliedern: Initiation der Autophagie (1), Autophagosomale Biogenese (2) und Vesikulärer Transport und lysosomale Fusion (3) (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des selektiven Autophagie-Prozesses.** (verändert nach Birgisdottir and Johansen 2013).

### 1.2.1 Initiation der Autophagie (1)

Die zwei wichtigsten Regulatoren der Autophagie sind der evolutionär hoch konservierte Proteinkomplex mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), der die Autophagie negativ reguliert, sowie der zelluläre Energiesensor AMPK (*adenosine-monophosphate (AMP) -activating protein kinase*), der die Autophagie positiv reguliert. Ist die Zelle keinerlei Stress oder Nährstoffentzug ausgesetzt, inhibiert eine Untereinheit des mTORC1-Komplexes, die Serin/Threonin-Kinase mTOR, aktiv die Autophagie (Noda and Ohsumi, 1998). Aktiviertes mTOR interagiert hierzu mit ATG13, FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*), ATG101 sowie dem ULK (*UNC-51-like kinase*) -Komplex, bestehend aus ULK1 und ULK2, und bewirkt die Phosphorylierung des gesamten mTORC1-Komplexes. Bei einem niedrigen Energieniveau der Zelle wird mTORC1 kaskadenartig durch AMPK deaktiviert, was zur Dissoziation von mTOR vom mTORC1-Komplex führt. Durch De-Phosphorylierung und Phosphorylierung der verschiedenen Komponenten des Komplexes wird die Autophagie positiv stimuliert (**Abbildung 4**) (Gwinn *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009).



**Abbildung 4: Die Regulation der Autophagie als Reaktion auf Nährstoffe.** (Menzies *et al.*, 2017)

## 1.2.2 Autophagosomale Biogenese (2)

Die autophagosomale Biogenese wird über einen PI3K (Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase) -Komplex vermittelt, welcher sich aus Beclin1, ATG14, Ambra1 und VPS34 (PI3K) zusammensetzt und maßgeblich bei der Bildung von PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphat) an der Phagophore beteiligt ist, die auch als Isolationsmembran oder Vorläufer-Autophagosom bezeichnet wird. In *S. cerevisiae* ist der Ort der Initiation definiert als PAS (*phagophore assembly site*). Im Säuger konnte gezeigt werden, dass einer der Orte, an dem die autophagosomale Biogenese initiiert wird (Omegasom), am oder in der Nähe des endoplasmatischen Retikulums (ER) liegt (Axe *et al.*, 2008; Tooze and Yoshimori, 2010; Mizushima and Komatsu, 2011). Weiter steht zur Diskussion, dass die benötigten Membranen auch von anderen Organellen wie von dem Golgi-Apparat (trans-Golgi-Netzwerk (TGN)), von Mitochondrien, von der Plasmamembran oder von ATG9-Membranvesikeln stammen (Young, 2006; Glick, Barth and Macleod, 2010; Ravikumar *et al.*, 2010; Ravikumar, Moreau and Rubinsztein, 2010; Tooze and Yoshimori, 2010; Hamasaki *et al.*, 2013; Mercer, Gubas and Tooze, 2018; Sørensen *et al.*, 2018). Der PI3K-Komplex bzw. die VPS34 Kinase treibt die autophagosomale Biogenese weiter an, indem sie die Generierung von PI3P katalysiert. PI3P ist eine wichtige Komponente der autophagosomalen Membran, da ihm eine Schlüsselfunktion bei der Rekrutierung weiterer Signalmoleküle wie DFCP1 (*double FYVE-containing protein 1*) und WIPI (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting*) zukommt. Diese wiederum rekrutieren für die Elongation der naszierenden Phagophore obligate ATGs, woraus sich die Abfolge zweier voneinander abhängigen Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystemen, dem ATG12- und dem ATG8/LC3-System, ergibt. Der 800 kDa große ATG5-ATG12-ATG16L-Komplex entsteht unter Reaktion mit ATG7 sowie ATG10 und steuert die Prozessierung des ATG8/LC3-Konjugationssystems. Die stufenweise Konjugation von Proteinen der Ubiquitin-ähnlichen ATG8/LC3-Familie an die entstehende autophagosomale Membran ist von essentieller Bedeutung. Ihre Prozessierung verläuft kaskadenartig, indem ATG4B, eine Cysteinprotease, proLC3 posttranslational und C-terminal spaltet; dabei entsteht nicht-lipidiertes zytosolisches LC3-I (Hemelaar *et al.*, 2003; Tanida, Ueno and Kominami, 2004). ATG7 aktiviert LC3-I und überträgt es auf ATG3. Dieses wird schließlich unter Steuerung des ATG12-ATG5-ATG16L-Komplexes durch kovalente Verknüpfung mit Phosphatidylethanolamin erneut lipidiert (**Abbildung 3**) (Kabeya, 2004; Tanida, Ueno and Kominami, 2004; Shaid *et al.*, 2013). Das hierdurch entstandene LC3-II (LC3-PE) ist

## 1 EINLEITUNG

sowohl in der inneren als auch in der äußeren autophagosomalen Membran integriert und stellt das einzig bekannte Protein dar, das spezifisch mit Autophagosomen assoziiert. LC3-II fungiert, wenn es im Inneren des heranreifenden Autophagosoms lokalisiert ist, als Andockstelle für selektive Autophagie-Rezeptoren wie beispielsweise p62/SQSTM1 (sequestosome-1), FUNDC1 (*FUN14 domain containing 1*) oder NBR1 (*neighbour of BRCA gene 1*). Diese Rezeptoren vermitteln die Selektivität der Autophagie (**Abbildung 5**) (Xie and Klionsky, 2007; Rogov *et al.*, 2014). An der äußeren Membran lokalisiertes LC3-II fördert zudem das Wachstum der Phagophore zu einem reifen Autophagosomen, indem es die Anbindung und laterale Hemifusion weiterer Membranen begünstigt (Nakatogawa, Ichimura and Ohsumi, 2007; Mizushima, Yoshimori and Ohsumi, 2011; Weidberg *et al.*, 2011). Entscheidend ist hierbei auch die Bereitstellung von Membranen. Dabei nehmen ATG9-Membranvesikel eine essentielle Rolle ein. Sie werden im Hungerzustand der Zelle *de novo* generiert, haben eine Größe von ~30-60 nm und enthalten rund 30 ATG9-Moleküle (Reggiori and Tooze, 2012). ATG9 ist ein hoch konserviertes Transmembranprotein und kommt ubiquitär in mehrzelligen Organismen vor. Als ein Schlüsselregulator der Autophagie (Induktion) stellt es Membranen zur Bildung der Phagophore bereit, ohne allerdings selbst mit der Membran eines reifen Autophagosoms assoziiert zu sein (**Abbildung 3**) (Mari *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2012).

### 1.2.3 Vesikulärer Transport und lysosomale Fusion (3)

Am Prozess des vesikulären Transports sowie der lysosomalen Fusion sind viele verschiedene Proteine und Proteinkomplexe beteiligt. Beispielsweise fungiert an der äußeren Seite des heranwachsenden Autophagosoms lokalisiertes LC3-II als ein Anker, über den LC3-bindende Proteine die Reifung und den Transport von Autophagosomen entlang des Mikrotubuli-Netzwerks und schließlich die Fusion mit dem Lysosom vermitteln (**Abbildung 3**) (Birgisdottir and Johansen, 2013; Rogov *et al.*, 2014; Stolz, Ernst and Dikic, 2014). Weitere an diesen Transport- und Fusions-Prozessen beteiligte Proteine sind die Rab (*Ras related in brain*)-Proteine zusammen mit ihren oberhalb der Kaskade wirkenden Aktivatoren (RABGAPs und RABGEFs), ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) und SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) (Atlashkin *et al.*, 2003; Jager, 2004; Filimonenko *et al.*, 2007; Kern,

Dikic and Behl, 2015). Der autophagosomale und der endosomale Vesikeltransport konvergieren in vielerlei Hinsicht (siehe 1.3).

### 1.2.4 ATG8-Proteine und Autophagie-Rezeptoren determinieren die Selektivität der Autophagie

Lange Zeit nahm man an, dass die Autophagie einen basalen, selektiven Degradationsprozess darstellt, welcher durch Nährstoffmangel induziert wird und sich über den zufälligen Einschluss und Degradation zytosolischen Materials definiert. Mit der Entdeckung von spezifischen Autophagie-Rezeptoren gelang es die Autophagie als einen selektiven Prozess zu verstehen und entsprechend des jeweiligen Substrates in beispielsweise die Mitophagie (Mitochondrien), Retikulophagie (Teile des ERs), Aggrephagie (Proteinaggregate) oder Xenophagie (Pathogene) zu unterteilen (**Abbildung 5**) (Rogov *et al.*, 2014; Khaminets, Behl and Dikic, 2016). Die Selektivität wird durch spezifische Autophagie-Rezeptoren vermittelt, welche einerseits das zum Abbau markierte Substrat und andererseits autophagosomale Membranen respektive ATG8/LC3-II erkennen und miteinander verbindet (Khaminets, Behl and Dikic, 2016).

Die Gene der ATG8-Familie kodieren Proteine, welche eine Ubiquitin-ähnliche Struktur aufweisen; sie setzen sich aus zwei N-terminalen  $\alpha$ -Helices und einem Ubiquitin-ähnlichen Kern zusammen (Paz, Elazar and Fass, 2000; Sugawara *et al.*, 2004; Shpilka *et al.*, 2011). Während in *S. cerevisiae* nur ein einziges ATG8-Gen vorkommt, gibt es sechs orthologe Vertreter im Säuger, welche für sieben ATG8-Varianten kodieren: LC3A (mit zwei Spleiß-Varianten), LC3B und LC3C aus der LC3-Familie sowie GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 aus der GABARAP-Familie ( *$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) - receptor-associated proteins, GABARAP*) (Shpilka *et al.*, 2011; Weidberg *et al.*, 2011). Die Mitglieder der ATG8-Familie werden ubiquitär exprimiert und sind essentielle Komponenten innerhalb des autophagosomalen Prozesses. In lipidierter Form (LC3-II/LC3-PE) sind sie kovalent an die autophagosomale Membran gebunden und fungieren auf der Innenseite als Anker für Autophagie-Rezeptoren, auf der Außenseite lokalisiert fördern sie das Wachstum der heranreifenden Phagophore sowie den Transport des reifen Autophagosoms (Nakatogawa, Ichimura and Ohsumi, 2007; Weidberg *et al.*, 2011). Autophagie-Rezeptoren erkennen ihre Substrate anhand von Proteinfehlfaltungen oder posttranslationalen Modifikationen wie beispielsweise Ubiquitinierung und Acetylierung

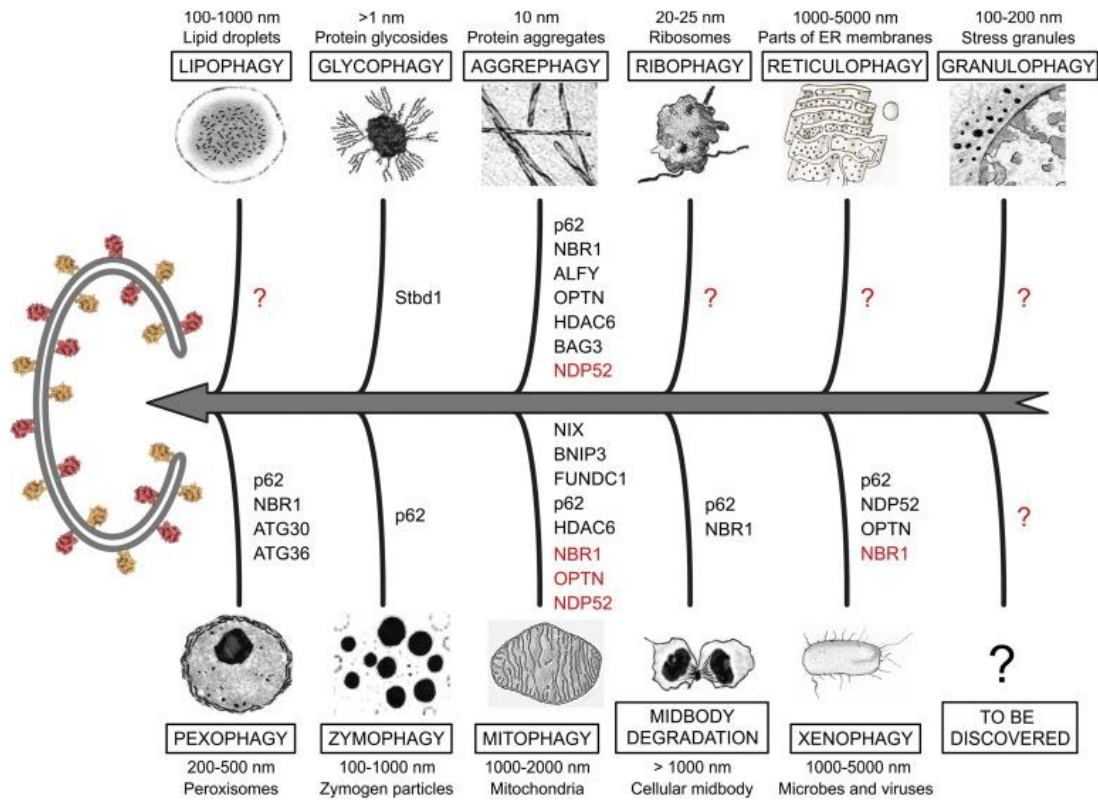
## 1 EINLEITUNG

(Jeong *et al.*, 2009; Cha-Molstad *et al.*, 2015). Der bis heute am besten charakterisierte Autophagie-Rezeptor ist das zu dem *S. cerevisiae* ATG19 homologe p62, welches über eine C-terminal lokalisierte Ubiquitin-Bindedomäne (*Ub-binding domain*, UBD) ubiquitinierte Proteine binden kann. Eine N-terminal gelegene PB1-Domäne befähigt den Rezeptor zur Oligomerisierung, die die Bildung von Autophagosomen fördert (Kirkin and Dikic, 2007; Johansen and Lamark, 2011).

Das für den autophagischen Prozess entscheidende Kriterium eines Autophagie-Rezeptors ist das sogenannte LIR (*LC3-interacting region*) -Motiv, über welches die Bindung an LC3-II bzw. ATG8-Proteine vermittelt wird (Johansen and Lamark, 2011). Mithilfe analytischer Verfahren und instrumenteller Methoden wie die Röntgenkristallographie oder die Kernspinresonanzspektroskopie gelang es, die aus vier Aminosäuren bestehende lineare Kernsequenz eines LIR-Motivs [WFY]XX[LIV] (W=Tryptophan, F=Phenylalanin, Y=Tyrosin, L=Leucin, I=Isoleucin, V=Valin, X=jede beliebige Aminosäure) sowie die Relevanz von sauren Aminosäuren (E=Glutamat, D=Aspartat, S=Serin oder T=Threonin) in ihrer Umgebung zu identifizieren (Pankiv *et al.*, 2007; Ichimura, Kumanomidou, *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2008; Popelka and Klionsky, 2015b).

Neben p62 konnten bereits viele weitere Autophagie-Rezeptoren sowohl in *S. cerevisiae* als auch im Säuger wie beispielsweise BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*), FUNDC1 oder NBR1 identifiziert werden (**Abbildung 5**) (Rogov *et al.*, 2014).

# 1 EINLEITUNG



**Abbildung 5: Diversität selektiver Autophagie-Rezeptoren der Säugetier-Zelle.** Die verschiedenen Formen der selektiven Autophagie (Lipophagie, Glykophagie, Aggrephagie, Ribophagie usw.) resultieren aus der spezifischen Erkennung und dem Abbau entsprechender Substrate durch Autophagie-Rezeptoren. Etablierte (schwarz) und mutmaßliche (rot) sowie für die jeweiligen Prozesse noch nicht identifizierte (?) selektive Autophagie-Rezeptoren sind abgebildet (Rogov *et al.*, 2014).

Das LIR-Motiv ist nicht per se auf Autophagie-Rezeptoren beschränkt. Mithilfe einer Proteom-Analyse des autophagischen Interaktoms, gekoppelt mit *in vitro* Interaktions-Studien, konnten bereits viele weitere LIR-Motiv-tragende Proteine identifiziert werden, welche mit ATG8-Proteinen interagieren (Behrends *et al.*, 2010). So wurden z.B. funktionelle LIR-Motive in sogenannten Adaptor-Proteinen beschrieben, welche die Reifung von Autophagosomen oder deren Transport entlang des Mikrotubuli-Netzwerks regulieren. Dazu gehört der Rab7-Effektor FYCO1 (*FYVE and coiled-coil (CC) domain-containing protein 1*), welcher über sein LIR-Motiv an LC3-II und über eine zentral gelegene Kinesin-ähnliche Bindestelle an das Mikrotubuli-Netzwerk bindet und somit den Transport von Autophagosomen vermittelt (**Abbildung 3**) (Pankiv *et al.*, 2010; Alemu *et al.*, 2012). Die TBC-Domäne-enthaltenden GTPase-aktivierenden Proteine TBC1D5 und TBC1D25 (*TBC1 domain family member 5/25*) stellen weitere Faktoren dar, die über ihre LIR-Motive mit ATG8-Mitgliedern interagieren und darüber weitere Autophagie-relevante Proteine wie ULK1, ATG16L oder ATG9 rekrutieren (Popovic *et al.* 2012; Popovic and Dikic 2014).



### 1.3 Konvergenzpunkte des autophagosomalen und des endosomalen

#### Netzwerks

Die intrazelluläre Kompartimentierung stellt ein hoch dynamisches Netzwerk von ineinander übergehenden Abschnürungen dar (Maxfield and McGraw, 2004; Bird, Trapani and Villadangos, 2009). Dieses wird als endosomales Netzwerk bezeichnet und besteht aus membranumschlossenen Vesikeln (Endosomen), welche zum einen der Abgrenzung einzelner Reaktionsräume und zum anderen der Aufnahme (Endozytose), der Abgabe (Exozytose) sowie dem Transport von Molekülen wie Proteinen und Lipiden innerhalb der Zelle dient (Zhang *et al.*, 2016). Jedes membranumschlossene Kompartiment besteht aus einem charakteristischen Proteinsortiment, wodurch es sich beispielsweise in frühe, späte und Recycling-Endosomen sowie Lysosomen einteilen lässt (Huotari and Helenius, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

Ein ganz wesentlicher Konvergenzpunkt des autophagosomalen und des endosomalen Netzwerks bildet demnach das finale Kompartiment, in dem die proteolytische Degradation von sowohl autophagosomalen als auch endosomalen Substraten stattfindet: das Lysosom (de Duve and Wattiaux, 1966; Luzio, Pryor and Bright, 2007). Lysosomen bestehen wie alle Kompartimente aus einem charakteristischen Proteinsortiment: Lysosomale Hydrolasen (Proteasen, Lipasen, Glykosidasen) dienen der Degradation sequestrierter Moleküle; V-ATPase-gesteuerte Protonenpumpen regulieren den pH-Wert; Transporter und Permeasen gewährleisten die Aufnahme und Wiederfreisetzung degradierter Komponenten (Singh and Cuervo, 2011). Auf diese Weise werden die Lysosomen zum einen mit proteolytischen Komponenten über das endosomale Netzwerk versorgt und zum anderen vermitteln sie den Abbau aufgenommener Substrate. Ohne effizient arbeitende Lysosomen ist der autophagische Degradationsprozess gestört. Für einen effizienten autophagischen Flux ist daher ein funktionales endosomales Netzwerk unerlässlich (Lamb, Dooley and Tooze, 2013). Dieses streng regulierte Netzwerk ist außerdem an der Bereitstellung von Lipiden und Membranen, welche für die Bildung der Phagophore und für die Reifung des Autophagosoms essentiell sind, beteiligt (Tooze and Yoshimori, 2010; Mercer, Gubas and Tooze, 2018).

Bei der Bildung von Membranvesikeln sind Proteine wie Clathrin und Clathrin-Adaptoren von besonderer Bedeutung. Sie sind Schlüsselmoleküle innerhalb des Prozesses der

## 1 EINLEITUNG

Clathrin-vermittelten Endozytose und für die Formierung von Vesikeln an der Plasmamembran sowie an bestimmten intrazellulären Kompartimenten maßgeblich verantwortlich (Smith and Pearse, 1999; Kirchhausen, Owen and Harrison, 2014). Clathrin ist ein Vesikel-Hüllprotein und besteht aus drei schweren und drei leichten Ketten, die sich zu einem Triskelion, also einem aus zweimal drei Proteinuntereinheiten zusammengesetzten Strukturkomplex, anordnen (Ungewickell and Branton, 1981). Durch die Bindung an ihre Adaptoren erzeugen solche Clathrin-Komplexe eine Krümmung der anliegenden Membran. Die Clathrin-Adaptoren selbst vermitteln den Zielort und somit eine Sortierung der Fracht (Hirst and Robinson, 1998; Boehm and Bonifacino, 2001). Hat sich ein Membranvesikel vollständig abgeschnürt, wird die Clathrin-Hülle beispielsweise durch das DNAJ/HSP40-Protein Auxilin (DNAJC6) entfernt und der Vesikel steht für den intrazellulären Transport bereit (Ungewickell *et al.*, 1995; Greener *et al.*, 2001; Lemmon, 2001; Boettner, Chi and Lemmon, 2012).

Sowohl der Transport des Autophagosoms und anderer Membranvesikel zur Zielmembran, als auch ihre Fusion mit dieser, ist in großem Maße von Proteinklassen der klassischen Vesikeltransportwege abhängig. In diese Prozesse sind neben Clathrin-Proteinen und Rab-GTPasen auch der Retromer-Komplex involviert (Seaman, 2012).

### 1.3.1 Rab-GTPasen

Der intrazelluläre Vesikeltransport ist sowohl für das endosomale als auch für das autophagosomale Netzwerk von essentieller Bedeutung. Eine Gruppe von kleinen Rab-GTPasen, die zu den G-Proteinen (*guanine nucleotide binding proteins*) gehören, gewährleisten dabei den Transport der Vesikel entlang des Aktin- und Tubulin-Netzwerks (Pfeffer, 1994; Stenmark and Olkkonen, 2001; Kern, Dikic and Behl, 2015). Vorgänge wie die Vesikelbildung, das Andocken und die Fusion der Vesikel mit der Zielmembran werden ebenfalls durch Rab-GTPasen reguliert (Martinez and Goud, 1998; Schimmöller, Simon and Pfeffert, 1998; Takai, Sasaki and Matozaki, 2001; Frasa *et al.*, 2012). Beim Menschen wurden bereits über 60 Rab-Proteine identifiziert, welche durch ihre spezifische, subzelluläre Lokalisation charakterisiert sind. Ihnen konnte eine wichtige Funktion bei der intrazellulären Sortierung und dem Transport von Vesikeln zugeschrieben werden (Hutagalung and Novick, 2011). Aufgrund dieser Funktion wurden

## 1 EINLEITUNG

viele Rab-Proteine inklusive ihrer Regulatoren auch mit autophagischen Prozessen assoziiert (Chua, Gan and Tang, 2011; Ao, Zou and Wu, 2014; Feldmann *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017). Neben ihrer Funktion im Vesikeltransport vom ER zum TGN ist beispielsweise der Rab-GTPase Rab1 auch eine wichtige Funktion bei der Biogenese der Phagophore zugeschrieben worden (Amaya, Fader and Colombo, 2015). Rab5 ist zusätzlich zu seiner Funktion am Transport früher Endosomen auch bei der Synthese sowie der Schließung von Autophagosomen beteiligt (Hutagalung and Novick, 2011; Zhou *et al.*, 2017).

Alle Rab-Proteine unterliegen einem GTPase-Zyklus, der durch RABGAPs (*GTPase activating protein*, GAP) und RABGEFs (*Guanine nucleotide exchange factor*, GEF) reguliert wird. GEFs katalysieren den Austausch von GDP gegen GTP und sorgen für eine Aktivierung der Rab-Proteine, während GAPs durch GTP-Hydrolyse diese wieder inaktivieren (Barr and Lambright, 2010; Mizuno-Yamasaki, Rivera-Molina and Novick, 2012). Rab-GTPasen wirken also immer im Komplex mit ihren Aktivatoren (GEFs) und Deaktivatoren (GAPs) sowie ihren nachgeschalteten Effektoren (Zhou *et al.*, 2017). Ein Effektor von beispielsweise Rab33 ist ATG16L, welches eine essentielle Rolle bei der Bildung und Reifung von Phagophoren spielt (Itoh *et al.*, 2008).

Neben den Rab-Proteinen sind auch RABGAP-Proteine in das Autophagie-Netzwerk eingebunden. Hierzu gehören z.B., wie bereits oben erwähnt, die TBC-Domäne- und LIR-Motiv-enthaltenden GTPase-aktivierenden Proteine TBC1D5 und TBC1D25 (Popovic *et al.*, 2012; Popovic and Dikic, 2014). Auch der die GTPase-deaktivierende RAB3GAP-Komplex wurde im Rahmen von zwei unabhängigen Studien mit dem Autophagie-Netzwerk assoziiert (Spang *et al.*, 2014). Dieser setzt sich aus der katalytischen GAP1- und der nicht-katalytischen GAP2-Untereinheit zusammen (Fukui *et al.*, 1997; Wada *et al.*, 1997). Ursprünglich wurde er als ein heterodimerer Komplex beschrieben, der gemeinsam mit RAB3GEF die Aktivität der Rab-GTPase Rab3 reguliert (Oishi *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2001) und dadurch eine zentrale Position bei der Neurohormon- und Neurotransmitterausschüttung sowie in der synaptischen Homöostase einnimmt (Sakane *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2011). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der RAB3GAP-Komplex innerhalb der autophagosomalen Biogenese eine Rolle spielt und einen positiven Modulator der Autophagie darstellt (Spang *et al.*, 2014). Ebenso stellt die Rab-GTPase Rab18 einen positiven Modulator des Autophagie-Netzwerks dar, wobei auch ihre

Aktivität durch den, in diesem Prozess vermutlich als GEF wirkenden, RAB3GAP-Komplex reguliert wird (Feldmann *et al.*, 2017).

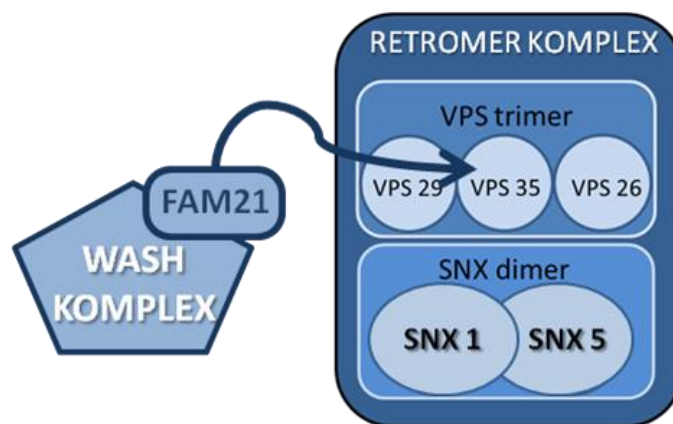
### 1.3.2 Der Retromer-Komplex

Der Retromer ist ein konservierter, heteropentamerer Protein-Komplex (Koumandou *et al.*, 2011; Seaman, 2012), welcher die Sortierung und den retrograden Transport von mehr als 150 Membranproteinen reguliert (Steinberg *et al.*, 2013; Burd and Cullen, 2014). Er nimmt somit eine zentrale Position innerhalb des endosomalen Vesikeltransports ein (Li *et al.*, 2016). Der retrograde Transport geht immer von frühen Endosomen aus und kann drei Transportrichtungen bzw. Zielorte anstreben: den Rücktransport endozytierter Membranproteine zum TGN (Endosom → TGN) (Bonifacino and Rojas, 2006; Johannes and Popoff, 2008), das Recycling zurück zur Plasmamembran (PM; Endosom → PM) (Temkin *et al.*, 2011) oder den Transport über multi-vesikuläre späte Endosomen hin zum Lysosom (Cullen and Korswagen, 2012). In allen Eukaryoten wird der retrograde Transport immer vom Retromer-Komplex vermittelt (Maxfield and McGraw, 2004; Hsu, Bai and Li, 2012; Seaman, 2012; Li *et al.*, 2016). Bei den retrograd transportierten Membranproteinen (Frachtmolekülen) handelt es sich insbesondere um Rezeptoren, wie beispielsweise den M6PR (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor), den LDLR (*Low-Density-Lipoprotein Receptor*), den EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) oder den TfR (Transferrin-Rezeptor) (Arighi *et al.*, 2004; Maxfield and McGraw, 2004; Li *et al.*, 2016), die alle einem Zyklus von Liganden-Bindung und anschließender Wiederfreisetzung ihrer Liganden an ihrem Bestimmungsort unterliegen. Der membranständige M6PR gehört zu den am besten untersuchten Frachtmolekülen des Retromers (Griffiths *et al.*, 1988; Arighi *et al.*, 2004). Im TGN gebildete, für das Lysosom bestimmte Hydrolasen binden über ihre Mannose-6-Phosphat-Markierung an den Rezeptor und werden mittels Clathrin-vermittelter Endozytose zu den frühen Endosomen transportiert (Gruenberg, 2001). In diesem hoch dynamischen Netzwerk reifen letztere weiter zu späten Endosomen heran, in denen aufgrund abnehmender pH-Bedingungen die Liganden von ihren Rezeptoren dissoziieren und zur lysosomalen Biogenese beitragen (Seaman, 2004). Während der Reifung dieser Sortiervesikel, kommt es zu Ausstülpungen der Endosomenmembranen; dort greift der Retromer-Komplex (Van Weering and Cullen, 2014). Innerhalb dieses Prozesses vermittelt der Retromer-Komplex die ordnungsgemäße Sortierung sowie den

## 1 EINLEITUNG

retrograden Transport des Membran-gebundenen Rezeptors zurück zum TGN und ermöglicht, dass dieser erneut seinem Zyklus folgen kann (Fusek and Vetvicka, 2005; Damen *et al.*, 2006).

Der Retromer-Komplex setzt sich aus zwei dynamisch miteinander assoziierten Unterkomplexen zusammen, dem SNX (*Sorting nexin*) -Dimer (SNX1 oder SNX2 dimerisiert mit SNX5 oder SNX6) und dem VPS (*Vacuolar protein sorting*) -Trimer (VPS26, VPS29 und VPS35) (**Abbildung 6**) (Seaman, 2004, 2012, 2015; Wassmer *et al.*, 2006; Bonifacino and Hurley, 2008; Collins, 2008; Van Weering and Cullen, 2014).



**Abbildung 6: Überblick über den Retromer-Komplex.** Das SNX-Dimer sowie das VPS-Trimer stellen die beiden Hauptkomponenten des Retromer-Komplexes dar. Sie dienen der Ausbildung tubulärer Strukturen sowie der Selektion der Frachtmoleküle. Der WASH-Komplex ermöglicht als eine weitere akzessorische Komponente des Retromers die Ausbildung des filamentösen Aktin-Netzwerks. FAM21 verbindet den WASH- mit dem Retromer-Komplex.

Das SNX-Dimer fördert die Bindung an die endosomale Membran; dies führt schließlich zur Ausstülpung tubulärer Strukturen (Carlton *et al.*, 2004; Van Weering *et al.*, 2012). Diese Bindung wird durch die für Proteine der SNX-Familie charakteristische, spezifische PX (*Phox homology*) -Domäne sowie durch die BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) -Domäne vermittelt. Mittels dieser Domänen binden SNX-Proteine an Phosphatidylinositole (PI) wie PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphat) (integriert in Membranen) von frühen Endosomen (Cullen, 2008; Teasdale and Collins, 2012) oder an PI(3,5)P2 (Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat) von späten Endosomen (Cozier *et al.*, 2002) und determinieren dadurch die Spezifität des Retromers. Aufgrund weiterer Domänen lässt

## 1 EINLEITUNG

sich die SNX-Familie in fünf Untergruppen einteilen, von denen drei mit dem Retromer assoziieren können (Cullen, 2008; Teasdale and Collins, 2012).

Das VPS-Trimer dient der Selektion der Frachtmoleküle (*Cargos*), weshalb es auch als *cargo-selective complex* (CSC) bezeichnet wird (Seaman, McCaffery and Emr, 1998; Nothwehr, Ha and Bruinsma, 2000; Norwood *et al.*, 2011). Die Bindung an das zu transportierende Frachtmolekül erfolgt über VPS35 und VPS26 (Seaman, 2012). Der CSC per se besitzt keine intrinsische Aktivität um an Membranen zu binden, stattdessen erfolgt die Assoziation über das SNX (1 oder 2 und 5 oder 6) -Dimer. Es konnte gezeigt werden, dass weitere Mitglieder der SNX-Proteinfamilie (z.B.: SNX3, SNX17 und SNX27) als Frachtmolekül-Adaptoren für eine spezifische Funktionalität des Retromers sorgen (Burd and Cullen, 2014). Allerdings kann der CSC auch SNX-unabhängig wirken, indem beispielsweise die aktive Rab-GTPase Rab7 (Rab7-GTP; ein Marker für späte Endosomen), an die VPS35-Untereinheit bindet und darüber die Assoziation des CSCs an späte endosomale Membranen vermittelt (Nakada-Tsukui, 2005; Rojas *et al.*, 2008; Seaman *et al.*, 2009; T.-T. Liu *et al.*, 2012; Zelazny *et al.*, 2013). Diese Bindung respektive die Rab7-Aktivität wird wiederum durch das GAP-Protein TBC1D5 reguliert, das (selbst an VPS29 bindet und) durch GTP-Hydrolyse Rab7 (Rab7-GDP) inhibiert und somit die Assoziation des CSCs an endosomale Membranen löst (Seaman *et al.*, 2009; Priya *et al.*, 2015). Wie bereits erwähnt, wurde TBC1D5 aufgrund seiner zwei LIR-Motive bereits mit dem autophagischen Netzwerk assoziiert (Popovic *et al.*, 2012; Popovic and Dikic, 2014). Untersuchungen haben gezeigt, dass unter Autophagie-induzierenden Bedingungen TBC1D5 mit der Phagophore interagiert. Daher könnte eine kompetitive Bindung von TBC1D5 an CSC oder LC3 dazu dienen, zwischen den beiden Netzwerken (endosomal und autophagosomal) zu vermitteln (Burd and Cullen, 2014; Popovic and Dikic, 2014).

Ein weiterer akzessorischer Proteinkomplex, welcher vom Retromer-Komplex bzw. vom CSC rekrutiert wird, ist der WASH (*Wiskott-Aldrich Protein and SCAR Homolog*) -Komplex. Die Aufgabe dieses Komplexes besteht darin, ein verzweigtes Netzwerk aus Aktin-Filamenten entlang der Endosomen-Membran zu generieren, wodurch Mikrodomänen entstehen, in welchen sich Retromer-Komplexe mit ihren spezifischen Frachtmolekülen anreichern (Puthenveedu *et al.*, 2010; Derivery *et al.*, 2012; Freeman, Hesketh and Seaman, 2014). Die Ausbildung des filamentösen Aktin-Netzwerks bewerkstelligt der WASH-Komplex gemeinsam mit aktiven Arp2/3 (*Actin-related protein2/3*) auf der zytosolischen Seite der endosomalen Membran (Derivery *et al.*, 2009, 2012; Gomez and

Billadeau, 2009). Interessanterweise wurde der WASH-Komplex bereits auch mit dem autophagischen Netzwerk in Verbindung gebracht. Allerdings wird der WASH-Komplex einerseits als ein positiver Regulator (Xia *et al.*, 2013), andererseits auch als ein Beclin-1-vermittelter negativer Regulator (Zavodszky, Seaman and Rubinsztein, 2014) der Autophagie beschrieben. Der WASH-Komplex per se ist ein pentameres Protein, bestehend aus KIAA1033 (SWIP (*strumpellin and WASH-interacting protein*)), Strumpellin, WASH1, CCDC53 (*coiled-coiled domain containing 53*) und FAM21 (*Fat Facets in mouse21*) (Derivery *et al.*, 2009; Gomez and Billadeau, 2009). FAM21 vermittelt dabei die Bindung einerseits zum Retromer, andererseits auch zu dem akzessorischen Protein DNAJC13, für welches bereits auch eine Interaktion mit SNX1 beschrieben wurde (Popoff *et al.*, 2009; Freeman, Hesketh and Seaman, 2014).

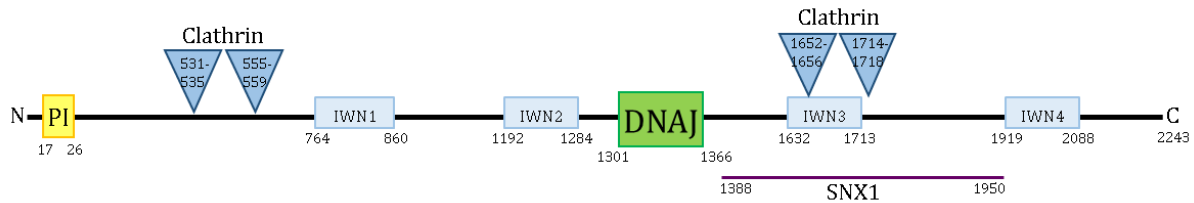
### 1.4 DNAJC13

DNAJC13 (*DNAJ homolog subfamily C member 13*) ist das humane Ortholog von RME-8 (*receptor-mediated endocytosis 8*) aus *C. elegans* und Mitglied der DNAJ/HSP40-Proteinfamilie. Es handelt sich hier um ein evolutionär hoch konserviertes Gen/Protein, welches mit Ausnahme von *S. cerevisiae* sowohl in Pflanzen als auch im ganzen Tierreich vorkommt und ubiquitär exprimiert wird (Zhang, Grant and Hirsh, 2001; Chang, Hull and Mellman, 2004).

Im humanen Genom codiert das auf Chromosom 3 liegende und aus 53 Exons bestehende *dnajc13*-Gen für ein 2243 Aminosäuren langes und ca. 230 kDa großes Protein. DNAJC13 verfügt über eine 70 Aminosäuren große DNAJ-Domäne und vier IWN (I=Isoleucin, W=Tryptophan, N=Asparagin) -Domänen mit bisher unbekannter Funktion (Zhang, Grant and Hirsh, 2001; Chang, Hull and Mellman, 2004; Girard *et al.*, 2005; Fujibayashi *et al.*, 2008). Des Weiteren trägt es ein N-terminal gelegenes PI3P-Bindemotiv, mit dem es mit Membranen assoziiert (Fujibayashi *et al.*, 2008; Xhabija and Vacratsis, 2015), sowie vier homologe Sequenzbereiche zur potentiellen Bindung an schwere Ketten von Clathrin (Girard *et al.* 2005). Neben HSP70 wurden bereits weitere Interaktionspartner von DNAJC13 identifiziert, beispielsweise FAM21 oder SNX1 (Popoff *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009; Freeman, Hesketh and Seaman, 2014). Dabei interagiert FAM21, eine Komponente des WASH-Komplexes, mit dem N-terminalen Bereich von DNAJC13 (Freeman, Hesketh and Seaman, 2014) und die Retromer-Untereinheit SNX1 bindet innerhalb eines Bereichs

## 1 EINLEITUNG

von knapp 600 Aminosäuren C-terminal der DNAJ-Domäne gelegen an DNAJC13 (**Abbildung 7**) (Popoff *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009).



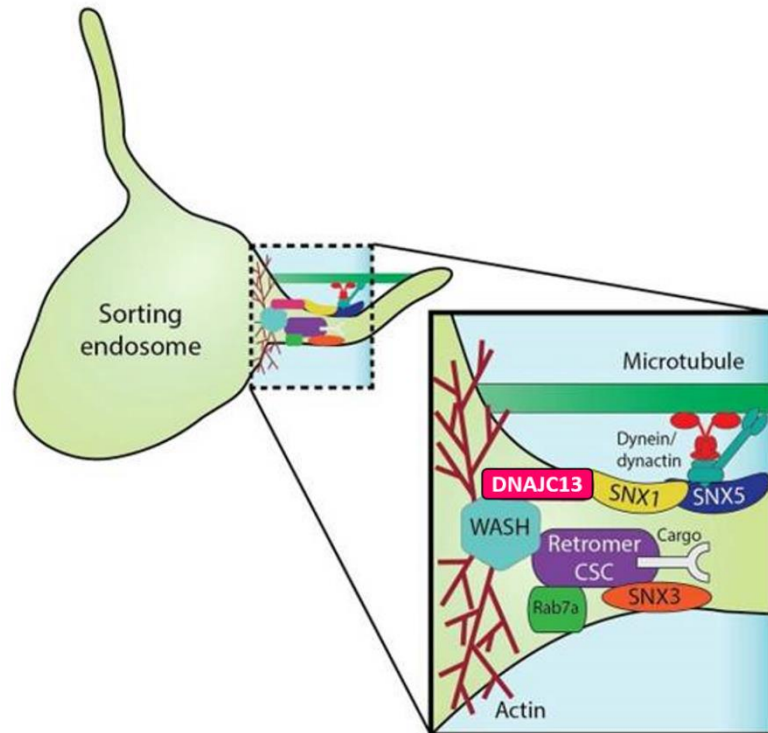
**Abbildung 7: Proteinstruktur von DNAJC13.** Das 2243 Aminosäuren lange, rund 230 kDa große Protein weist eine zentral gelegene DNAJ-Domäne, vier sich wiederholende IWN-Sequenzen sowie eine N-terminal gelegene PI-Domäne auf. Des Weiteren verfügt DNAJC13 über vier homologe Sequenzbereiche zur potentiellen Bindung an die schweren Ketten von Clathrin. Der Sequenzbereich, mit dem SNX1 interagiert, wird durch den farbigen Balken angedeutet.

DNAJC13 wurde erstmals im Jahr 2001 von Zhang *et al.* in einem *Screen* in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) zur Identifikation von Mutanten, deren Oozyten eine gestörte Endozytose von Dotter-Proteinen zeigten, gefunden und funktionell mit dem Prozess der Endozytose in Verbindung gebracht (Zhang, Grant and Hirsh, 2001). Drei Jahre später beobachteten Chang *et al.*, dass RME-8 mit HSP70 interagiert und vermutlich die Clathrin-vermittelte Endozytose in *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) beeinflusst (Chang, Hull and Mellman, 2004). Erste Hinweise zur funktionellen Einordnung von DNAJC13 ergaben die Untersuchungen im humanen Zellsystem von Girard *et al.* im Jahr 2005. Sie fanden anhand endosomaler Marker heraus, dass DNAJC13 partiell mit frühen Endosomen und dem TGN, nicht aber mit späten Endosomen oder dem Lysosom kolokalisiert (Girard *et al.*, 2005; Fujibayashi *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Studie wurde dem Protein DNAJC13 eine essentielle Rolle beim Transport des M6PR zwischen dem TGN und frühen Endosomen zugeschrieben (Girard *et al.*, 2005). DNAJC13 erfüllt ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Sortierung des EGFRs an Endosomen (Girard *et al.*, 2005; Girard and McPherson, 2008). 2009 wurde in *C. elegans* und in Säugerzellen auf molekularer Ebene gezeigt, dass RME-8/DNAJC13 nicht am Prozess der Endozytose per se, sondern durch Bindung an den Retromer-Komplex (bzw. SNX1) am retrograden Transport beteiligt ist (Popoff *et al.*, 2009). DNAJC13 nimmt somit eine funktionelle Rolle bei der Rückgewinnung von Frachtmolekülen wie dem M6P- oder dem *Wntless*-Rezeptor sowie bei der Sortierung und dem Recycling von EGFR und Transferrin ein (Girard *et al.*, 2005;



## 1 EINLEITUNG

Girard and McPherson, 2008; Popoff *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009). Als Interaktionspartner von SNX1, einer Komponente des SNX-Dimers, und FAM21, einer Komponente des Aktin-Netzwerk-bildenden WASH-Komplexes, ist DNAJC13 als funktioneller Mediator beschrieben. Dadurch stellt DNAJC13 sicher, dass der WASH-Komplex und das SNX-Dimer, an ihrem Zielort, an dem Retromer-vermittelte Proteinsortierung und Transport stattfindet, aktiv werden können (**Abbildung 8**) (Freeman, Hesketh and Seaman, 2014; Hasegawa *et al.*, 2018).



**Abbildung 8: Ein Modell für die Rolle von DNAJC13 als Interaktionspartner von WASH und SNX1 im Prozess des retrograden Transports.** DNAJC13 verbindet das SNX-Dimer und den WASH-Komplex und reguliert somit die Ausbildung tubulärer Strukturen innerhalb der Retromer-vermittelten endosomalen Proteinsortierung (verändert nach Freeman *et al.*, 2014).

Interessanterweise beobachtete die Arbeitsgruppe von Matthew J. Farrer erstmals im Jahr 2014, dass eine Punktmutation (N855S) in DNAJC13 in einem kausalen Zusammenhang mit einer familiären Form der PD steht (Vilariño-Güell *et al.*, 2014; Gustavsson *et al.*, 2015). Eine neueste Studie lieferte weitere Hinweise, dass die humane DNAJC13-N855S-Mutante funktionell mit der PD in Zusammenhang gebracht werden kann. Die N855S-Mutante vermag endosomale Sortierprozesse negativ zu beeinflussen, indem beispielsweise das Recycling von Transferrin, EGF/EGFR oder  $\alpha$ -Synuklein beeinträchtigt war. Dies könnte durch eine fehlerhafte Kooperation von N855S-DNAJC13 mit dem WASH-Komplex und entsprechend einer gestörten Ausbildung des Aktin-

## 1 EINLEITUNG

Netzwerks zu erklären sein (Hasegawa *et al.*, 2018; Yoshida *et al.*, 2018). DNAJC13 wurde bereits mit mehreren im Zusammenhang mit der PD beschriebenen Proteinen funktionell in Verbindung gebracht. Dazu gehören die Retromer-Komponente VPS35 (indirekte Verbindung über SNX1) oder die Proteinkinase LRRK2 (*Leucin-rich repeat kinase 2*; direkte Interaktion) (Zavodszky *et al.*, 2013; Perrett, Alexopoulou and Tofaris, 2015). Auch wurde DNAJC13 ebenso mit dem neuronalen Netzwerk assoziiert. Beispielsweise wurde es im Zusammenhang mit der synaptischen Skalierung, dem Recycling von AMPA-Rezeptoren, die als eine Untergruppe der ionotropen Glutamat-Rezeptoren zu den am weit verbreitetsten Neurotransmitter-Rezeptoren des zentralen Nervensystems gehören, oder dem Notch-Rezeptor beschrieben (Zhang *et al.*, 2012; Gomez-Lamarca *et al.*, 2015; Schanzenbächer *et al.*, 2016 bzw. persönliche Korrespondenz mit Erin Schuman).

Schon im Jahr 2011 wurde DNAJC13 mit dem autophagischen Prozess assoziiert; Ruck *et al.* fanden einen funktionellen Zusammenhang zwischen RME-8 und Beclin-1, eine Schlüsselkomponente der autophagosomalen Biogenese (Ruck *et al.*, 2011). Diese Untersuchungen in *C. elegans* zeigten, dass das Fehlen von Beclin-1 u.a. auch zu einem defekten retrograden Transport vom Endosomen zum TGN und zu erniedrigten Spiegeln von RME-8 führt (Ruck *et al.*, 2011). Dieser funktionelle Zusammenhang zwischen RME-8 und Beclin-1 könnte darauf hindeuten, dass RME-8/DNAJC13 möglicherweise, neben seiner Rolle in der Endozytose und insbesondere im retrograden Transport zum TGN und zur PM, eine weitere Rolle innerhalb des autophagosomalen Netzwerks einnimmt.

Unsere Arbeitsgruppe bewies erstmals, dass DNAJC13 einen positiven Modulator der Autophagie darstellt (Besemer *et al.*, in Begutachtung). In einem funktionellen *C. elegans* Screen zur Identifikation von Proteostase-Regulatoren erwies sich DNAJC13 als ein interessanter Kandidat. In *C. elegans* sowie im humanen Zellmodell konnte gezeigt werden, dass nach Depletion von DNAJC13 zur Aggregation neigende Proteine wie Amyloid- $\beta$  42, mutante Varianten der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) oder  $\alpha$ -Synuklein verstärkt aggregieren und akkumulieren. Klassische Überexpressions- und Depletions-Experimente unter basalen als auch Autophagie-induzierenden Bedingungen verdeutlichten, dass DNAJC13 den autophagischen Flux positiv moduliert und ihm somit neben seiner Funktion im endosomalen Netzwerk eine weitere Funktion innerhalb der Autophagie zukommt. Weitere Analysen lieferten Hinweise, dass DNAJC13 möglicherweise bei der Bildung der Phagophore oder deren Reifung von Bedeutung sein könnte: Nach Depletion von DNAJC13 konnte eine veränderte subzelluläre ATG9-

Verteilung sowie eine verminderte Lokalisation von ATG9 an autophagosomalen Strukturen beobachtet werden. Zudem deutet eine partielle Kolo­kalisierung mit LC3 auf eine Assoziation von DNAJC13 mit der Phagophore hin. Welche Funktion DNAJC13 innerhalb des Autophagie-Prozesses erfüllt und welchem molekularen Mechanismus von DNAJC13 dieser Funktion zugrunde liegt, ist Bestandteil derzeitiger Forschung und dieser Dissertation.

### **1.5 Ziele der Dissertation**

Das DNAJ/HSP40 Protein DNAJC13 wurde in unserer Arbeitsgruppe als ein positiver Modulator der Proteinhomöostase bzw. der Autophagie identifiziert (Besemer, in Begutachtung). Welche genaue Rolle DNAJC13 allerdings innerhalb des autophagischen Prozesses einnimmt, blieb bisher weitestgehend ungeklärt und sollte im Rahmen dieser Dissertation detaillierter untersucht werden.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es somit zunächst, die Lokalisation von DNAJC13 an der Phagophore bzw. dem Autophagosom zu untersuchen. Dazu sollten immunfluoreszenzbasierte Lokalisationsstudien mit den ATG8-Familienmitgliedern LC3B und GABARAP im humanen Zellsystem angefertigt und analysiert werden. Biochemische Interaktionsstudien zur Analyse einer physikalischen Interaktion von DNAJC13 mit ATG8-Familienmitgliedern sollten Hinweise für ein besseres Verständnis der Rolle von DNAJC13 im autophagischen Prozess liefern.

Im Falle einer Interaktion von DNAJC13 mit ATG8-Proteinen, sollte ein Peptid Array zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen in diesem Zusammenhang Aufschluss über die Art des Bindemotivs (LIR-Motiv) von DNAJC13 an ATG8-Proteine erbringen. Zur Aufklärung der Funktionalität der identifizierten LIR-Motive sollten verschieden trunkierte oder Mutationen-tragende Konstrukte von DNAJC13 generiert werden und anschließend mittels Immunfluoreszenzstudien sowie klassischen Überexpressionsexperimenten im Hinblick auf den autophagischen Flux analysiert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODE

### 2.1 Material

Im Folgenden sind alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Organismen aufgelistet.

#### 2.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Agarosegelkammer	Biometra, Göttingen
Axiovert Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
Bakterienschüttler	Biotek
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Feinwaage TE 153S	Satorius, Göttingen
Fusion-SL 3500.WL	Peqlab, Erlangen
Heizblöcke	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Dreieich
<i>Laserscanning</i> -Mikroskop (LSM710)	Zeiss, Göttingen
<i>TCS SPE confocal</i> -Mikroskop	Leica, Wetzlar
Mikrotiterplatten-Lesegerät, Multiskan RC	Thermo Fischer Scientific, Dreieich
Miniblot-Kammern, Mini protean III Western Blotting	BioRad, München
Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
Nassblot-Kammer, Mini-Trans-Blot-Cell-System	BioRad, München
Netzteil, PowerPac Basic	BioRad, München
Nucleofector 2b Lonza Elektroporator	Lonza, Köln
NuPAGE-System, Mini-PROTEAN® 3 Cell	BioRad, München
PCR DNA Biometra Gradient	Biometra, Göttingen
pH-Meter CG825V	Schott, Mainz
Plattformschüttler, Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Rotator	Snijders Scientific, Tilbur (Holland)
Scanner Epson Perfection 2400 Photo	Epson, Meerbusch
Schüttelinkubator NB-205V	N-Biotek, Bucheon (Korea )
Sonifikator, Sonicator Ultrasonic Processor UP50H	Hielscher, Teltow
Spektralphotometer, Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen
Stereomikroskop CKX 41/CKX 31	Olympus, Hamburg
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC-5B Superspeed	Thermo Fischer Dreieich
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

### 2.1.2.1 Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco, Detroit (USA)
BafilomycinA <sub>1</sub> (BafA <sub>1</sub> )	LC Laboratories, Woburn (USA)
Benzaminblau	Roth, Karlsruhe
Biozym LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Pierce, Bonn
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Hamburg
Chloroquine	Sigma-Aldrich, Hamburg
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid-hydrat (DAPI)	Calbiochem, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt
Ethylendiammintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ficoll®	Sigma-Aldrich, Hamburg
Fötale Kälberserum (FCS, <i>fetal calf serum</i> )	Invitrogen, Karlsruhe
γ-L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (Glutathion)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Hamburg
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Hamburg

## 2 MATERIAL UND METHODE

---

Lambda Protein Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
Luminol	Sigma-Aldrich, Hambrug
Magermilchpulver	Swissmilk, Bern (Schweiz)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumessigsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
ρ-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco, Karlsruhe
Poly-L-Ornithin (PLO)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Hamburg
Proteinaseinhibitor Cocktail Complete Mini	Roche, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Slide-A-Lyzer™ Dialyse Kassette	ThermoFischer Sientific, Dreieich
<i>Sodium</i> dodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
<i>Sodium</i> pyruvat	Gibco, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tetramethyldiamin (TEMED)	BioRad, München
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Hamburg

---

### 2.1.2.2 Oligonukleotide

Im Folgenden sind alle verwendeten siRNAs sowie Primer für Klonierungen und Sequenzierungen aufgelistet.

Name	Sequenz (5' → 3')
for.Primer DNAJC13-LIR1 (159)	AGTATACAAAATCCTCCTTGATAATCTGAGGCATCTACAG CTCCTTCAATATTTCTATAGTCATAGGAACA
rev.Primer DNAJC13-LIR1 (159)	TGTTCCATGACTATAGAAATATTGAAGGAGCTGTAGAT GCCTCAGATTATCAAGGAGGATTTTGTATACT
for.Primer DNAJC13-LIR2 (818)	TTAATTTCCCTCTGCCGCGCACTCAGCTTTAACCTCAAAC CATGGTGGTTCCAGG
rev.Primer DNAJC13-LIR2 (818)	CCTGGAACCACCATGAGTTTGAGGTTAAAGCTGAGTGCGC GGCAGAGGAAATTA
for.Primer DNAJC13-LIR3 (1188)	AAAGCCTCAGAAGCCTTTTCAGGTTTATAATTTTCTAAGT ACA
rev.Primer DNAJC13-LIR3 (1188)	TGTTACTTAGAAAATTATGAACCTGAAAAGGCTTCTGAG GCTTTTCTAGGAGAATTTGATACTCCAGAAGC
for.Primer DNAJC13-LIR4 (1298)	CTATGATGTCAATAGATGATGCTGCTGAAGTGCTAATCT GCCTCAAGGACAGGGAC
rev.Primer DNAJC13-LIR4 (1298)	GTCCCTGTCCTTGAGGCAGATTAGCCACTTCAGCAGCATC ATCTATTGACATCATAG
for.Primer DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C	CGCGGTACCATGCTTGGGCACATTCTACC
rev.Primer DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C	CGCGGATCCGCCAAGTATTGGGCCTGC
for.Primer DNAJC13- $\Delta$ LIR4	GATGTCAATAGATGATGCTAATCTGCCTCAAGGACAGG
rev.Primer DNAJC13- $\Delta$ LIR4	CCTGTCCTTGAGGCAGATTAGCATCATCTATTGACATC
for.Primer DNAJC13-KpnI+ATG (TV1, TV2)	CGCGGTACCATGAACATAATTAGG
rev.Primer DNAJC13-TV1	CGCGGATCCGCATCTATTGACATCATAGGTG
rev.Primer DNAJC13-TV2	CGCGGATCCGCGGTCCCTGTCCTTGAG
for.Primer DNAJC13-DNAJ	GACTTGCACAAAAGTACCAGCCGTATAAGAATCCAGA
rev.Primer DNAJC13 DNAJ	TCTGGATTCTTATCAGGCTGGTACTTTTGTGCAAGTC
seq.Primer Bos- <i>forward</i>	TTGGAGTACGTCGTCTTTAGG
seq.Primer Bos- <i>reverse</i>	TTCGGGAGTCAAACCATGTC
seq.Primer DNAJC13-B	TTTGGAAGTAACTCCAGGAGG
seq.Primer DNAJC13-C	GTTTGCTGGATGGAGTAAGAG
seq.Primer DNAJC13-D	CATGTGGATCATGGGACTGGTG
seq.Primer DNAJC13-E	TATTGATGCACTGGAGGGATAG
seq.Primer DNAJC13-F	AAGCCGAGCTACAGTACCAC
seq.Primer DNAJC13-FG	GGCTTTCAAGTCAGAAGAG
seq.Primer DNAJC13-G	ACAATGGAAACTTCAGATGACCTC
seq.Primer DNAJC13-H	CATGCTGACACCCTATGTTGC
seq.Primer DNAJC13-J	ACATCTAACCAAGACTGTGTCAAC
seq.Primer DNAJC13-K	AGCTCCTAGAGAAGAACAATCC
seq.Primer DNAJC13-L	GTCACAAACAGCAGGATACCTC

## 2.1.2.3 Vektoren und Plasmide

Name	Hersteller
pEFBos:Leervektor	*
pEFBos: DNAJC13-WT-Flag	*
pEFBos:DNAJC13-WT-Fragment-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-LIR1-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-LIR2-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-LIR3-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-LIR4-Flag	**
pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ LIR4-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-LIR4-Fragment-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-DNAJ-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-DNAJ-Fragment-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-TM-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-TV1-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-TV2-Flag	**
pEFBos:DNAJC13-TV3-Flag	**
pEGFP-LC3	Addgene, Teddington (UK)

\*Die Plasmide wurde freundlicherweise von Dr. Anna Besemer (Institut für Pathobiochemie, Gutenberg Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. \*\*Alle weiteren pEFBos:DNAJC13 Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit wie unter 2.2.1 DNAJC13 Plasmide beschrieben generiert.



**2.1.2.4 Kits und Größenstandards**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce, Bonn
<i>JetStar Maxi Kit</i>	Genomed, Bad Oeynhausen
<i>Größenmarker, MassRuler</i>	Fermentas, St. Leon-Rot (Frankreich)
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin® Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot (Frankreich)
<i>QIAquick® Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis</i>	Agilent, Waldbronn
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche, Mannheim

**2.1.2.5 Enzyme, die unabhängig von Kits verwendet wurden**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
BamHI-HF	New Engand BioLabs, Frankfurt
Klenow DNA-Polymerase	New Engand BioLabs, Frankfurt
KpnI-HF	New Engand BioLabs, Frankfurt
NdeI	New Engand BioLabs, Frankfurt
NheI	New Engand BioLabs, Frankfurt
NruI	New Engand BioLabs, Frankfurt
<i>Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase</i>	New Engand BioLabs, Frankfurt
SAP („shrimp alkaline phosphatase“)	New Engand BioLabs, Frankfurt
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
XbaI	New Engand BioLabs, Frankfurt

### 2.1.2.6 Antikörper

#### Primär-Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
ATG9	Kaninchen	Abcam
DNAJC13	Kaninchen	*
Flag	Kaninchen	Invitrogen
Flag	Maus	Sigma-Aldrich, Hambrug
GABARAP	Kaninchen	Abcam
GST-HRP	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Hambrug
LC3B (I+II)	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Hambrug
p62	Meerschwein	PROGENE, Heidelberg
SNX1	Maus	BD Transduction Laboratories
VPS35	Ziege	LSBio

\*Der Antikörper gegen DNAJC13 wurde freundlicher Weise von Prof. Peter McPhersons, Neurologisches Institut und Krankenhaus Montreal (Kanada), zur Verfügung gestellt. Die Ansätze der Primärantikörper wurden durch Zugabe von 0,1 %igem Natriumazid länger haltbar gemacht und somit mehrmals verwendet.

#### Sekundär-Antikörper

Antigen	Konjugation	Wirtsspezies	Firma
$\alpha$ -Kaninchen	HRP	Esel	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Kaninchen	Cy3	Esel	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Kaninchen	Alexa Fluor 448	Esel	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Maus	HRP	Esel	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Maus	Cy3	Esel	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Meerschwein	HRP	Esel	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Meerschwein	Cy5	Esel	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Schaf	Cy3	Esel	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Ziege	Cy3	Esel	Dianova, Hamburg

### 2.1.3 Organismen

Name	Hersteller
<b>Prokaryotische Organismen</b>	
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) DH5 $\alpha$ , chemisch-kompetent	New England BioLabs, Frankfurt
Rosetta™(DE3)-Zellen ( <i>E. coli</i> )	(Novagen) Merck, Darmstadt
<b>Eukaryotische Organismen</b>	
HEK293A-Zellen	American Type Culture Collection, Manassas (USA)
HEK293T-Zellen	American Type Culture Collection, Manassas (USA)

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 DNAJC13 Plasmide

Das DNAJC13 Plasmid, welches wildtypisches DNAJC13 als Fusionsprotein mit Flag im pEFBos Vektor enthält, wurde freundlicher Weise von Dr. Anna Sophie Besemer (Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Zur funktionellen Untersuchung verschieden trunkierter DNAJC13 Expressionskonstrukte (2.1.2.3 Vektoren und Plasmide) wurden diese mittels molekularbiologischer Methoden generiert. Weiterhin wurden zur funktionellen Untersuchung DNAJC13 Punkt- als auch Deletionsmutanten (2.1.2.3 Vektoren und Plasmide) mit dem Kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Agilent) entsprechend den Angaben des Herstellers generiert. Für Klonierungen verwendete Primer sind unter 2.1.2.2 Oligonukleotide aufgelistet.

### 2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine von Kjell Kleppe in den 1970er Jahren entwickelte *in-vitro*-Methode, welche der gezielten exponentiellen Amplifizierung von DNA-Abschnitten dient (Kleppe *et al.*, 1971; Mullis *et al.*, 1986). Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert aus Desoxynukleosidtriphosphaten neue DNA-Abschnitte welche komplementär zu einem vorgegebenen Matrizenstrang vorliegen.

Grundlegend gliedert sich eine PCR in drei, sich zyklisch wiederholende, Reaktionsschritte. Das initiale Erhitzen einer doppelsträngigen Matrizen-DNA dient deren Denaturierung, woraufhin es durch kontrolliertes Abkühlen zur Primeranlagerung kommt. Diese selektiv hybridisierenden Primer flankieren den DNA-Abschnitt, sodass die DNA-Polymerase diesen Bereich spezifisch amplifizieren kann. Die wiederholte Abfolge von diesem Zyklus führt zur milliardenfachen Akkumulation von Kopien dieser DNA-Sequenz.

Zur Amplifizierung der in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte wurden die entsprechenden Primerpaare mithilfe des Programms *OligoFactory* (Holliston, USA) entworfen (siehe 2.1.2.2 Oligonukleotide und von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen. Die Temperatur zur Anlagerung der Primer an seinen Matrizenstrang richtet sich nach der Länge sowie der Sequenz des Primers per se und wurde für jede PCR individuell eingestellt.

Je nach Art der PCR wurde die *Phusion-High-Fidelity* oder die *Taq* (*Thermus aquaticus*) Polymerase eingesetzt. Die *Phusion-High-Fidelity* Polymerase besitzt eine intrinsische Korrekturlesefähigkeit sowie eine verbesserte Prozessivität, d.h. sie arbeitet mit einer Synthesegeschwindigkeit von 1000 bp/30 s. Die *Taq* Polymerase hingegen besitzt keine 3'→5' Exonukleaseaktivität und somit keine Korrekturlesefähigkeit. Ihre Prozessivität lag bei 1000 bp/60 s. Diese kam zum Einsatz, wenn keine sequenzexakten DNA-Amplifikate wie in einer Kolonie PCR (siehe Abschnitt Kolonie PCR) entstehen mussten. Die gewählte Zeitspanne zur Elongation der DNA ist zum einen von der Basenlänge des entsprechenden Gens als auch von der Extensionszeit der Polymerase abhängig.

**Tabelle 1:** PCR Programmierung

	<i>Phusion</i> Polymerase	<i>Taq</i> Polymerase
1. Initiale Denaturierung der DNA	98 °C, 30 s	95 °C, 5 min
2. Denaturierung der DNA	98°C, 10 s	95 °C, 30 s
3. Anlagerung der Primer	°C - dem jeweiligen Primerpaar entsprechend, 30 s	
4. Elongation der DNA	72 °C, s – entsprechend der Basenlänge des Amplifikats 34 Zyklen von Schritt 2 -4	
5. Finale Elongation	72 °C, 5 min	72 °C, 2 min → ∞ bei 4 °C

**Präparative PCR**

Die DNA-Amplifikate, welche für eine Klonierung verwendet werden sollten, wurden mittels einer präparativen PCR generiert. Dabei kam die *Phusion-High-Fidelity* Polymerase aufgrund ihrer intrinsischen Korrekturlesefähigkeit zum Einsatz, um eine minimale Fehlerrate bei der DNA-Amplifikation gewährleisten zu können. Die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die DNA-Amplifikate wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese) ihrer Größe nach aufgetrennt und somit isoliert (2.2.4 DNA-Extraktion).

Eine präparative PCR wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Tabelle 2:** Reaktionsansatz einer präparativen PCR

Reagenz	Volumen / Menge
5x HF-Puffer	10 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
5`-forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5-1 µl
3`-reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5-1 µl
Template-DNA	10-100 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl
<i>Phusion-High-Fidelity</i> Polymerase (2Units/µl)	0,3 µl

### Kolonie PCR

Eine Kolonie PCR dient der Überprüfung, ob bei einer Klonierung ein gewünschtes DNA-Amplifikat oder -Fragment in den Ziel-Vektor integriert wurde. Nach erfolgreicher Transformation (2.2.7 Transformation von Bakterien) wurden die einzelnen Bakterienkolonien in 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, davon wurden 8 µl in eine Minipräparation (2.2.8 Plasmidpräparation aus Bakterien) und 2 µl in die Kolonie PCR eingesetzt (Tabelle 3). DNA-Amplifikate wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese) ihrer Größe nach aufgetrennt, mit UV-Licht sichtbar gemacht und analysiert.

Eine Kolonie PCR wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Tabelle 3:** Reaktionsansatz einer Kolonie PCR

Reagenz	Volumen / Menge
10x Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
5`- <i>forward</i> -Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
3`- <i>reverse</i> -Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Bakteriensuspension	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei macht man sich ein elektrisches Feld innerhalb eines mit definierter Porengröße vorliegenden Agarosegels zunutze, in dem sich lineare DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennen. Aufgrund einer negativen Nettoladung der DNA-Moleküle wandern diese von der Kathode zur Anode. Die dabei zurückgelegte Strecke ist umgekehrt proportional zur

## 2 MATERIAL UND METHODE

Größe der DNA-Fragmente, sodass sich kleine Fragmente schneller bewegen und eine weitere Strecke im Gel zurücklegen als große.

Zur Herstellung der Gele wurde 0,5 % Agarose in TEA-Puffer (Tris-EDTA-Essigsäure-Puffer) aufgekocht und mit einem Tropfen Ethidiumbromid-Lösung (0,7 mg/ml) versetzt. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, welcher die Visualisierung der DNA durch ultraviolettes Licht ermöglicht. Nach dem Aushärten des Gels wurden die DNA-Amplifikate der PCR mit Probenpuffer versetzt und gegen ein DNA-Größenstandart (*MassRuler*, Fermentas) aufgetragen. In einer mit TEA-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer wurden die amplifizierten DNA-Fragmente bei ~70 V aufgetrennt und anschließend unter energiearmen UV-Licht der Wellenlänge 366 nm visualisiert.

### **1x TAE-Puffer:**

40 mM Tris  
20 mM Natriumessigsäure  
1 mM EDTA

### **Probenpuffer:**

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
50 % [v/v] Ficoll®  
0,006 % [w/v] Bromphenolblau

### **2.2.4 DNA-Extraktion**

Zur Isolierung der DNA-Amplifikate aus dem Agarosegel wurde dieses mit einem Spatel aus dem Gel ausgeschnitten. Aus diesem Ausschnitt konnte die DNA mittels QIAquick® Gel Extraction Kit gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert werden. Schließlich wurden die aufgereinigten DNA Konstrukte in 20 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.5 Restriktion**

Der Einsatz verschiedener Restriktionsenzyme ermöglicht eine Vielfalt an Generierungen unterschiedlicher Plasmide. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen mit der Fähigkeit bestimmte DNA-Sequenzen (Restriktionsschnittstellen) zu erkennen und zu schneiden.

## 2 MATERIAL UND METHODE

Zur Generierung gleicher Restriktionsschnittstell-Enden von DNA-Amplifikat als auch Ziel-Vektor wurden diese entsprechend mit den gleichen Restriktionsenzymen nach Vorgabe der vom Hersteller gegebenen Bedingungen restringiert. Sollte der Ziel-Vektor schließlich in eine Ligation eingesetzt werden, dann wurde er zusätzlich einer SAP-Behandlung (*shrimp alkaline phosphatase*) unterzogen. Alkalische Phosphatase bewirkt eine Dephosphorylierung der entstehenden 5'-Enden und verhindert somit eine Re-Ligation der Vektor-DNA.

Im Falle einer Test-Restriktion wurde die restringierte DNA auf ihre Größe gelelektrophoretisch (2.2.3 Agarosegelelektrophorese) analysiert und nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Tabelle 4:** Reaktionsansatz einer Test-Restriktion

Reagenz	DNA
10x <i>CutSmart</i> Puffer	2 µl
DNA gelöst in ddH <sub>2</sub> O	100 ng
Restriktionsenzyme	µl – der Aktivität der Enzyme entsprechend → 1 h 30 min, 37 °C → gelelektrophoretische Analyse (2.2.3 Agarosegelelektrophorese)

Sollte die DNA in eine Ligation (2.2.6 Ligation) eingesetzt werden, wurde diese zuvor mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit aufgereinigt (2.2.4 DNA-Extraktion).

**Tabelle 5:** Reaktionsansatz der Restriktion von Ziel-Vektor und DNA-Amplifikat

	Ziel-Vektor	DNA-Amplifikat
10x <i>CutSmart</i> Puffer	3 µl	3 µl
DNA gelöst in ddH <sub>2</sub> O	4 µg	18 µl Eluat aus DNA-Extraktion
Restriktionsenzyme	µl – der Aktivität der Enzyme entsprechend → 1 h 30 min, 37 °C	µl – der Aktivität der Enzyme entsprechend → 1 h 30 min, 37 °C → Extraktion der DNA (2.2.4 DNA-Extraktion)



---

SAP (1Unit/ $\mu$ l)	1,5 $\mu$ l
	→ 20 min, 37 °C
	→ Extraktion der DNA
	(2.2.4 DNA-Extraktion)

---

### 2.2.6 Ligation

Für die enzymkatalysierte Ligation der jeweiligen DNA-Amplifikate und der Vektor-DNA wurde die fünffache molare Menge an DNA-Fragment gegenüber 25 ng Vektor-DNA eingesetzt, welche sich aus folgender Berechnung ergab:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125 * \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Die entsprechenden Mengen an DNA-Fragment und Vektor-DNA wurden unter Verwendung des *T4 DNA Ligation Kits* (Roche, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers bei 16 °C über Nacht inkubiert und anschließend in Bakterien transformiert (2.2.7 Transformation von Bakterien).

### 2.2.7 Transformation von Bakterien

Die Transformation ist eine Form des Gentransfers bei Prokaryoten, bei der freie DNA von Organismen aufgenommen wird. Dieses Phänomen wurde genutzt, um die von den transformationskompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien des Stamms DH5 $\alpha$  aufgenommene DNA zu vervielfältigen.

Dafür wurden 25-50  $\mu$ l Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA versetzt. Stammt die Plasmid-DNA aus einer Maxipräparation wurden 1-2  $\mu$ l eingesetzt, hingegen wurden bis zu 4-10  $\mu$ l eingesetzt, wenn die DNA aus einer Ligation stammt. Nach 30-minütiger Inkubation der Bakterien-Suspension auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s welcher zur Schließung der porösen Bakterienmembran führt. Bakterien wurden anschließend in 400  $\mu$ l SOC-Medium (*Super Optimal Broth with Catabolic*

## 2 MATERIAL UND METHODE

*Repression*) bei 37 °C auf dem Schüttler kultiviert. Nach einer einstündigen Inkubation wurden 250 µl der transformierten Bakterien auf vorgewärmte Antibiotika-haltige LB (*lysogeny broth*) Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht für etwa 16 h kultiviert.

Aufgrund der im Plasmid enthaltenden Resistenz gegen ein entsprechendes Antibiotikum konnten nur die Bakterien wachsen, die erfolgreich transformiert wurden.

Um transfizierte Bakterien-Klone zu identifizieren, wurde von einer Auswahl an Bakterien-Kolonien eine Minipräparation (2.2.8 Plasmidpräparation aus Bakterien) mit anschließender Test-Restriktion (2.2.5 Restriktion) durchgeführt. Die bei der Restriktion entstandenen DNA-Sequenzen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese) ihrer Größe nach aufgetrennt und mit UV-Licht visualisiert.

### **Proteinreinigung**

Wenn transfizierte Bakterien-Klone hingegen ein gewünschtes Protein, codiert durch die aufgenommene Plasmid-DNA, exprimieren sollten, mussten diese Bakterien-Klone zunächst in 500 ml Antibiotika-haltigem LB Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert werden. Wenn die Kultur eine optische Dichte (OD) von 0,6-0,8 (600 nm) erreicht hatte, wurde diese für weitere 4 h bei 37 °C mit 400 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) behandelt. IPTG ist ein Galactose-Thioglycosid (*S*-Glycosid), welches die Expression der aufgenommenen Plasmid-DNA induziert. Schließlich wurde die Kultur für 20 min bei 6000 rpm und 4 °C pelletiert und das gewünschte Expressionskonstrukt aufgereinigt (2.4.3.1 Proteinaufreinigung).

### **SOC-Medium (pH 7,0):**

2 % [w/v] Bacto-Trypton

0,5 % [w/v] Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCL

10 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

10 mM MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

20 mM Glukose

in ddH<sub>2</sub>O

### **LB-Medium (pH 7,5):**

1 % [w/v] Bacto-Trypton

0,5 % [w/v] Hefeextrakt

1 % [w/v] NaCl

### **Antibiotikum-haltiger LB-Agar:**

1 % [w/v] Bacto-Trypton

0,5 % [w/v] Hefeextrakt

1 % [w/v] NaCl

1,5 % [w/v] Bacto-Agar

100 µg/ml (Endkonzentration) Antibiotikum

### **2.2.8 Plasmidpräparation aus Bakterien**

Für die Isolierung des Plasmids aus Bakterienlösung wurde für eine 4 ml-Kultur (Minipräparation) das *NucleoSpin® Plasmid Kit* (Macherey-Nagel) und für eine 200 ml-Kultur (Midipräparation) das *JetStar Maxi Kit* (Genomed) oder das *PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit* (Invitrogen) verwendet. Alle Angaben der Hersteller wurden dabei befolgt und die isolierte DNA in 30-40 µl (Minipräparation) bzw. in 200-300 µl (Midipräparation) autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA**

Die Konzentration der DNA wurde mit dem *Nanodrop 1000* bei 260-280 nm spektrophotometrisch bestimmt.

### **2.2.10 Sequenzierung der DNA**

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde von dem Biotech-Unternehmen Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt und Sequenzrohdaten mithilfe des Programms CmSuite9 (*Scientific and Educational Software*, Denver, USA) gegen entsprechende Vektorkarten abgeglichen und ausgewertet.

### 2.3 Zellbiologische Methoden

#### 2.3.1 HEK293-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden für zellbiologische Versuche HEK293-Zelllinien verwendet. Bei der HEK293-Zelllinie (HEK, *human embryonic kidney*) handelt es sich um eine immortalisierte humane Zelllinie, welche sich von embryonalen Nierenzellen ableitet (Shein and Enders, 1962). HEK293T-Zellen stammen von HEK293A-Zellen ab und unterscheiden sich von diesen durch ein zusätzliches SV40 T-Antigen, welches die Replikation von Plasmiden ermöglicht, die ein *SV40 origin of replication* tragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit HEK293-Zellen des Stammes A sowie des Stammes T gearbeitet. Aufgrund einer weitaus höheren Transfektionseffizienz der Expressionsplasmide in HEK293T- gegenüber HEK293A-Zellen, wurden HEK293T für proteinbiochemische Analysen verwendet. Immunfluoreszenzfärbungen wurden wegen ihres insgesamt etwas größeren Zellkörpers entsprechend in HEK293A-Zellen angefertigt. Die Transfektionseffizienz fiel in diesen Zellen sehr gering aus.

#### 2.3.2 Kryokonservierung und Kultivierung von Zellen

Die verwendete Zelllinie wurde in Kryobehältern in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt. Diese Art der Aufbewahrung nennt sich Kryokonservierung und beschreibt das Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff, ohne dabei deren Vitalität zu zerstören. Die Kultivierung von konfluenten HEK293-Zellen erfolgte in 10 cm großen Kulturschalen in einem auf 37 °C eingestellten Inkubator (Thermo Scientific, HERACell 240i; CO<sub>2</sub>-Inkubator) mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre. Zellen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen, mit 1 ml der Proteinase Trypsin (1x Trypsinlösung) inkubiert und von der Schale gelöst. Die Zellsuspension wurde bei 311 g 4 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml Kompletmedium resuspendiert. Um Zellen in einer definierten Konfluenz zu halten wurde zunächst die Lebendzellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer und folgender Formel bestimmt:

## 2 MATERIAL UND METHODE

$$\text{Lebendzellzahl pro ml} = \frac{\Sigma \text{ aller gezählten Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4_{(\text{Zellen pro ml})}}{4_{(\text{Anzahl der Quadranten})}}$$

Mit der ermittelten Lebendzellzahl ließen sich Zellen stets in einer Dichte von 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> kultivieren. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Zellen verwendet, welche für 3 bis 28 Passagen kultiviert wurden. Alle für die Kultivierung der Zellen benötigten Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt.

### **Komplettmedium HEK293-Zellen:**

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

10 % [v/v] aktives FCS

1 % [v/v] Natriumpyruvat

1 % Antibiotika/ Antimykotika

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

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **2.3.3 Transfektion von Zellen**

Unter Transfektion versteht man allgemein das Einschleusen von fremdem genetischem Material, wie z.B. Plasmide oder siRNA, in eukaryotische Zellen. Diese von Graham 1973 entwickelte Methode sorgt dafür, dass möglichst viel genetisches Material in die Zelle und weiter in den Zellkern eindringt, ohne dabei ein großes Absterben jener Zellen zu bewirken (Graham and van der Eb, 1973). Aufgrund vieler verschiedener Typen von Zellen wurden im Laufe der Jahre verschiedene Transfektionsmethoden entwickelt.

### **Calcium-Phosphat-Präzipitation**

Eine in dieser Arbeit angewandte Methode ist die Calcium-Phosphat-Präzipitation (Graham and van der Eb, 1973). Calciumchlorid, Natriumphosphat sowie das eingesetzte genetische Material bilden zusammen einen feinkörnigen Niederschlag an ausfallendem

## 2 MATERIAL UND METHODE

Calciumphosphat mit daran gebundener DNA. Diese feinen DNA-haltigen Präzipitate werden vermutlich mittels Endozytose von den Zielzellen aufgenommen.

Für eine am Vortag mit 50 %iger Zellkonfluenz kultivierte 60 cm<sup>2</sup> Zellschale wurde eine einfache Transfektionslösung hergestellt. Diese bestand aus 420 µl ddH<sub>2</sub>O, 60 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> und 10 µg DNA sowie 480 µl 2x HBS-Puffer, welcher unter vorsichtigem Schütteln der Lösung tropfenweise beigemischt wurde. Transfektionsansätze für 60 - 70 % konfluente Zellen auf 2 cm<sup>2</sup> großen Deckgläsern wurden der Fläche entsprechend im Volumen angepasst. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung dem Nährmedium der Zellen zugegeben.

### **2x HBS-Puffer (pH 7,2):**

280 mM NaCl

50 mM Hepes

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### **Elektroporation**

Eine weitere in dieser Arbeit angewandte Methode zur transienten Transfektion von Zellen ist die sogenannte Elektroporation. Dabei sorgen kurze elektrische Impulse für eine Permeabilisierung von Zellmembranen, sodass siRNAs und Plasmide vermutlich durch Diffusion aus der Lösung in die Zielzellen gelangen.

Je Transfektionsansatz wurden 400 µl Elektroporationspuffer mit 700.000 Zellen, 30 µg siRNA sowie 15-30 µg Plasmid in eine entsprechende Küvette überführt. Mithilfe eines *Nucleofector 2b Elektroporators* (Lonza, Köln) wurde die Elektroporation, mit einem Programm dem Zelltyp entsprechend, durchgeführt. Nach fünfminütiger Erholungsphase der Zellen im Inkubator wurden diese aus der Küvette in Kulturschalen mit Komplett-Medium überführt.

### **Elektroporationspuffer (pH 7,3):**

135 mM KCl

0,2 mM CaCl<sub>2</sub>

2 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM EGTA

10 mM HEPES

25 % Hitze-inaktiviertes FCS

Unabhängig der gewählten Transfektionsmethode wurde stets 24 h nach Applikation der Transfektionslösung ins Komplett-Medium, dieses gegen frisches ausgetauscht und Zellen für weitere 24 h kultiviert bis diese für proteinbiochemische Methoden (2.4. Proteinbiochemische Methoden) verwendet werden konnten.

### 2.3.4 BafilomycinA<sub>1</sub>-Behandlung

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der autophagischen Aktivität von Zellen diese mittels BafilomycinA<sub>1</sub> (BafA<sub>1</sub>) behandelt und analysiert.

BafA<sub>1</sub> gehört zur Familie der toxischen Makrolid-Antibiotika und dient als Inhibitor der autophagolysosomalen Proteindegradation. BafA<sub>1</sub> verhindert die Ansäuerung der Lysosomen durch Inhibition der V-ATPase. Dadurch wird die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom erschwert und zusätzlich die lysosomale Degradation der Proteine durch saure Proteasen inhibiert und als Folge dessen kommt es zu einem „Auflaufen“ von Autophagosomen (Mauvezin and Neufeld, 2015).

Bestandteile der Autophagosomen wie LC3 oder p62 respektive deren Proteinspiegel können proteinbiochemisch (2.4 Proteinbiochemische Methoden) gemessen (Yamamoto *et al.*, 1998) und somit die autophagische Aktivität ermittelt werden. Dazu werden die Proteinspiegel von BafA<sub>1</sub>-behandelten und von einem mit äquivalenter Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Behandlung) behandelten Kontroll-Ansatz in Relation (LC3B-II + BafA<sub>1</sub>) – (LC3B-II - BafA<sub>1</sub>) zueinander gebracht.

Entsprechend der gewünschten Endkonzentration von BafA<sub>1</sub> (2 µM) wurde dieses mit Komplett-Medium versetzt und auf Zellen gegeben. BafA<sub>1</sub> liegt in DMSO gelöst vor, sodass Kontrollen mit gleichen Mengen DMSO behandelt wurden. Nach 4 h Inkubationszeit wurden Zellen geerntet und deren Gesamtprotein isoliert (2.4.2 Zellyse und Proteinpräparation) oder auf Deckgläser ausgesäte Zellen für nachfolgende Immunfluoreszenzfärbung fixiert (2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung).

### 2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der Detektion exprimierter Proteine innerhalb von Zellen. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines primären Antikörpers an das entsprechende Protein, woran wiederum ein sekundärer, fluoreszenzmarkierter Antikörper binden kann. Durch Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge lässt sich dieser sekundäre Antikörper mikroskopisch detektieren.

Dazu wurden Zellen auf sterilen Deckgläschen kultiviert (2.3.2 Kryokonservierung und Kultivierung von Zellen) und bei gegebenem Experiment transfiziert (2.3.3 Transfektion von Zellen) und mit BafA<sub>1</sub> behandelt (2.3.4 BafilomycinA<sub>1</sub>-Behandlung). Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen. Dafür wurden diese zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Zur anschließenden Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Zellen je nach verwendeter Antikörper entweder mit eiskaltem 90 % Methanol oder mit 0,1 % Triton X-100 5 min behandelt und erneut mit 1x PBS gewaschen.

Als nächstes wurde der Primärantikörper (1:200-400 in Verdünnungspuffer) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit 1x PBS erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörper (1:400 in Verdünnungspuffer) für 1 h. Sekundärantikörper lagen entweder konjugiert mit den fluoreszierenden Farbstoffen Alexa Fluor 488 oder Carbocyanin (Cy) vor. Anschließend wurden die Zellkerne mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid-hydrat (DAPI) (500 µg/µl in PBS) während eines zehnmütigen Inkubationsschrittes markiert und 3x mit 1x PBS gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen auf einem Objektträger in Eindeckmedium eingebettet und mit einem klaren Nagellack an den Rändern des Deckgläschens mit dem Objektträger fixiert. Somit wurde gewährleistet, dass weder das Präparate austrocknet noch das Eindeckmedium mit Sauerstoff reagiert. Mithilfe des *Laserscanning*-Mikroskops LSM710 (Zeiss, Göttingen) oder des *TCS SPE confocal*-Mikroskop (Leica, Wetzlar) wurde die Immunfluoreszenzfärbungen visualisiert und aufgenommen und mit den Bildbearbeitungsprogrammen *Adobe Photoshop* oder *Gimp 2.8* bearbeitet.



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

1 mg/ml (Endkonzentration)  $\rho$ -Phenylendiamin  
70 % Glycerol  
in 1x PBS

### **Verdünnungspuffer:**

10 % FCS  
in 1x PBS

### **2.4.2 Zellyse und Proteinpräparation**

Zur Isolierung der Gesamtproteine aus Zellen erfolgte zuerst das sogenannte Ernten von Zellen auf Eis. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt und Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde je nach Zellkonfluenz zwischen 50 - 200  $\mu$ l 1x SDS-Lysispuffer hinzugegeben, Zellen mit einem Schaber von der Schale abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellysate wurden auf Eis 2x 10 s bei 80 Hz sonifiziert. Diese hochfrequenten Schallwellen sorgen für eine vollständige Lyse der Zellen, indem sie deren Membranen aufbrechen und somit den Zellinhalt freilegen. Alle Proteine wurden durch ein fünfminütiges Aufkochen bei 99 °C denaturiert und gegebenenfalls bei -80 °C gelagert.

### **3x SDS-Lysispuffer (pH 6,8):**

187,5 mM Tris-HCL  
6 % [m/v] SDS  
30 % [m/V] Saccharose  
PPI

### **Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren (PPI):**

cComplete™, Mini, EDTA-free *Protease Inhibitor Cocktail* und PhosSTOP™ ((Roche) Merck, Darmstadt) entsprechend den Herstellerangaben

### 2.4.3 ATG8-GST Proteinreinigung und DNAJC13 Peptid Array

Die hoch konzentrierte Anreicherung eines bestimmten Proteins aus einem biologischen Gemisch beschreibt das allgemeine Verfahren einer Proteinreinigung. Ist das angereicherte Protein ein beschriebener Interaktionspartner definierter Motive oder Domänen innerhalb eines Proteins von Interesse, so kann das aufgereinigte Protein zur Detektion jener Motive oder Domänen genutzt werden. Der hier verwendete Peptid Array besteht aus synthetisch hergestellten 15mer DNAJC13 Peptidsequenzen, welche mit einem Versatz von drei Aminosäuren pro Peptidsequenz auf eine Trägermembran gebunden wurden (Intavis, *Bioanalytical Instruments*, Köln). Aufgereinigtes ATG8-GST Protein konnte an seine Bindemotiv-Sequenzen der DNAJC13 Peptidsequenzen binden und mittels Immundetektion nachgewiesen werden.

#### 2.4.3.1 Proteinreinigung von rekombinantem ATG8-GST

Dazu wurden zunächst transformationskompetente Rosetta™(DE3) -Zellen (*E. coli*) mit einem ATG8-GST-tragendem Plasmid transformiert und dessen Expression durch Applikation von IPTG induziert (2.2.7 Transformation von Bakterien). ATG8 lag mit GST konjugiert vor, was die Präzipitation des ATG8 via GST aus dem Zelllysate sowie die Detektion des ATG8s in weiteren proteinbiochemischen Anwendungen wie dem Peptid Array erlaubte. Erfolgreich transformierte und weiter kultivierte Rosetta-Zellen wurden schließlich mittels Zentrifugation pelletiert, mit Proteinreinigungs-Lysispuffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zusätzliches fünfmaliges sonifizieren des Lysates bei einer Amplitude von 30 % für jeweils 30 s auf Eis sorgte für einen vollständigen Zellaufschluss. Weiter wurde das Lysat in Pelletfraktion und Überstand mittels Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 10000 g aufgetrennt. Die sich im entstandenen Überstand befindlichen ATG8-GST Proteine wurden anschließend über Nacht bei 4 °C im Rotator mit *Glutathione Sepharose® 4B Beads* (Sigma-Aldrich, Hamburg; 500 µl/25 ml) inkubiert. Die *Beads* wurden zuvor 2x mit Proteinreinigungs-Lysispuffer gewaschen, für 3 min bei 500 g und 4 °C trocken zentrifugiert und in Proteinreinigungs-Lysispuffer aufgenommen. Am nächsten Tag wurde das Gemisch aus *Glutathione Sepharose® 4B Beads* und Zelllysate 4x mit Proteinreinigungs-Waschpuffer gewaschen. Dieser wurde stets mit Kapillarfiltern abgenommen, um zum einen die Bindung der ATG8-

## 2 MATERIAL UND METHODE

GST Proteine an die *Beads* nicht zu lösen und zum anderen keine der Proteinkomplexe wegzuwaschen. Die Elution der ATG8-GST Proteine von den *Beads* erfolgte in Elutionspuffer auf dem Schüttelinkubator bei 600 rpm für 5 min und wurde dreimal wiederholt. Der dabei mit Kapillarfiltern aufgenommene Überstand enthielt die isolierten ATG8-GST Proteine und wurde in eine Dialysekassette (*3500 MWCO Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassette*, Thermo Fischer Scientific) überführt. Diese wiederum wurde in einem mit Rührfisch und 2 L TBS gefülltem Gefäß befestigt und bei 4 °C inkubiert/gewaschen. Nach 1 h sowie nach weiteren 2 h wurde TBS durch frisches ersetzt und die Dialysekassette über Nacht inkubiert. Die Membran der Dialysekassette besteht aus einer definierten Porengröße, durch die kleinere Moleküle als Verunreinigungen wie Salze aus Puffern diffundieren und somit effektiv entfernt werden können. Die gereinigten ATG8-GST Proteine wurden anschließend der Dialysekassette entnommen und deren Konzentration bestimmt (2.4.4 Proteinquantifizierung nach der BCA-Methode). Das somit aufgereinigte ATG8-GST Protein konnte in TBS-T (1 µg/1 ml) für 2 h mit einer DNAJC13 Peptid Array Membran inkubieren und ausgewertet werden.

Diese Methode wurde freundlicherweise mit der Unterstützung von Dr. Jennifer Jung, Institut für Biochemie II, Goethe Universität, *School of Medicine*, Frankfurt, durchgeführt. Materialien wurden ebenso zur Verfügung gestellt.

### 2.4.3.2 DNAJC13 Peptid Array

Um die einzelnen DNAJC13 Peptide auf der Trägermembran sichtbar zu machen wurde diese für 1 min mit Ponceau S inkubiert, anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Inkubation mit 100 % Methanol für 10 s folgte 2x fünfminütiges Waschen der Membran mit TBS-T und eine weitere Inkubation von 1 h mit 5 % Milch in TBS-T und 3x zehnminütiges Waschen der Membran mit TBS-T. Schließlich wird das zuvor aufgereinigte ATG8-GST Protein in TBS-T (1 µg/1 ml) für 2 h mit der DNAJC13 Peptid Array Membran inkubiert und diese erneut 4x 10 min mit TBS-T gewaschen. Dabei konnten ATG8-GST Proteine an komplementäre Bereiche der DNAJC13 Peptidsequenzen binden. Über Nacht bei 4 °C wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten GST-Antikörper inkubiert und Proteine schließlich densitometrisch nachgewiesen (2.4.9 Immundetektion Membran-gebundener Protein). Die Analyse des Arrays erfolgte nach Angaben des Herstellers, über dessen mitgelieferten

## 2 MATERIAL UND METHODE

Aminosäuresequenz-Codes Rückschlüsse über den Ort bzw. den Bereich der Bindung des ATG8-GST Proteins an DNAJC13 gemacht werden konnte. Die codierten Sequenzbereiche wurden mit gelisteten iLIR Sequenzbereichen von humanem DNAJC13 (*iLIR Autophagy Database*: <https://ilir.warwick.ac.uk>.) verglichen und ausgewertet (Kalvari *et al.*, 2014; Jacomin and Al., 2016).

### **Proteinreinigungs-Lysispuffer :**

20 mM TRIS-HCl (pH 7.5)  
10 mM EDTA  
5 mM EGTA  
150 mM NaCl  
10 % NP40  
1 % Triton-X-100  
Benzonase (10 µl/50 ml)  
1 mM DTT  
PPI  
Lysozym (2 mg/ml)

### **Proteinreinigungs-Waschpuffer :**

1 M TRIS (pH 7.5)  
0,5 M EDTA  
0,5 M EGTA  
1 M NaCl  
100 mM DTT

### **Elutionspuffer:**

10 mM reduzierte Glutathionen  
50 mM Tris-HCl (pH 8)

### **Ponceau S-Lösung:**

0,5 % [m/v] Ponceau S  
1 % [v/v] Essigsäure

### **TBS(-T):**

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
2,8 mM Tris-Basw  
0,02 mM Tris-HCl  
0,05 % Tween20

### 2.4.4 Proteinquantifizierung nach der BCA-Methode

Die Bicinchonin-Säure (BCA) -Methode verknüpft die sogenannte Biuret-Reaktion mit der Bicinchoninsäure als Detektionssystem. Dabei kommt es zunächst zu einer farbigen Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischem, wässrigem Milieu (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes werden zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, die wiederum mit BCA violette Farbkomplexe bilden, welche durch Absorptionsmessung bei 560 nm eine kolorimetrische Detektion von Proteinen zulässt.

Die Proteinkonzentration der Zellysate wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Pierce) nach Angaben des Herstellers relativ zur bekannten Proteinkonzentration einer bovinen Serumalbumin (BSA) -Standardkurve ermittelt. Dazu wurden die Zellysate mit BCA-Lösung versetzt und für 30 min bei 60 °C inkubiert, bevor das absolute Expressionsniveau der Proteine mithilfe des Mikrotiterplatten-Lesegeräts Multiskan RC (Thermo Fischer Scientific, Dreieich) photometrisch bestimmt wurde. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt um mögliche Fehler auszugleichen.

### 2.4.5 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) beschreibt ein biochemisches Verfahren zur Ermittlung einer Protein-Protein-Interaktion *in vitro* sowie *in vivo*. Dabei macht man sich die Eigenschaft zunutze, ein Antigen mit all seinen Interaktionspartnern über einen spezifisch bindenden Antikörper aus einer Lösung zu konzentrieren und mittels weiterer biochemischer Verfahren nachzuweisen (Takahashi, 2015).

Dafür wurden zuvor Zellen je nach Versuch transfiziert (2.3.3 Transfektion Zellen) und am Tag der Ernte auf Eis mit 1x PBS gewaschen und mit einem milden Co-IP-Lysispuffer versetzt. Nach zehninütiger Inkubation der Zellen mit Lysispuffer wurden diese in ein „*Low Retention*“-Inkubationsgefäß überführt und für 10 min bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert. Die Konzentration der im Überstand enthaltenen löslichen Proteine wurde quantifiziert (2.4.4 Proteinquantifizierung nach der BCA-Methode) und 1000 µg Protein auf 1 ml mit Co-IP-Lysispuffer aufgefüllt. Bevor *Magnetic Beads* verwendet wurden, wurden sie zuvor 3x mit 1 ml Co-IP-Lysispuffer gewaschen und dabei stets mithilfe des magnetischen Probenständers von ihrer Lösung getrennt. Eine erste Inkubation des Proteinlysats mit 25 µl „*Pierce Protein A/G Magnetic Beads*“ (Thermo Scientific) im

## 2 MATERIAL UND METHODE

Rotator bei 4 °C für 1 h sorgte dafür, dass alle an die *Magnetic Beads* unspezifisch bindenden Proteine herausgefiltert wurden. Anschließend wurde zu den Proteinlysaten entweder 1 µg Primärantikörper oder 1 µg korrespondierendem Immunglobulin G-Antikörper (IgG-Kontrolle) gegeben, dieses für 1 h bei 4 °C auf dem Rotor inkubiert und erneut mit 25 µl *Magnetic Beads* über Nacht bei 4 °C im Rotor inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *Magnetic Beads* 3x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und in 20 µl 2x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Abgänglich davon aus welcher Spezies die Immunglobuline stammten (Maus oder Kaninchen) wurden die Protein-Protein-Antikörper Verbindungen entweder durch kochen bei 99 °C für 5 min und leichtem Schütteln (Maus) oder durch starkes Schütteln (Kaninchen) für 10 min bei Raumtemperatur von den *Magnetic Beads* gelöst. Mittels SDS-PAGE (2.4.7 SDS-PAGE) wurden die Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt und standen somit für weitere biochemische Verfahren zur Verfügung.

### **Co-IP-Lysispuffer:**

50 mM (pH 7,4) HEPES-NaOH  
150 mM NaCl  
10 % Glycerol  
2,5 mM EDTA  
1 % Triton X-100

### **Waschpuffer:**

HEPES-NaOH (pH 7,4) 50 mM  
NaCl 150 mM  
Triton X-100 1 %

### **2.4.6 Differentielle Fraktionierung**

Die differentielle Fraktionierung dient der Abtrennung von löslichen und nicht-löslichen Zellbestandteilen mittels Zentrifugation. Dabei werden die Gesamtproteine der Zellen wie unter 2.4.2 beschrieben isoliert, in 1x PBS-PPI aufgenommen und 2x für 10 s bei 80 Hz sonifiziert. Nach erfolgter Bestimmung der Proteinkonzentration (2.4.4) wurde ein Teil des Gesamtlysats (GL, 200 µl) separiert und das restliche Lysat (150 µg in 250 µl) für 15 min bei 18000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Ü) wurde abgenommen, das Pellet einmal mit PBS gewaschen und erneut für 15 min bei 18000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet (P) in 300 µl 3x SDS-Lysispuffer

resuspendiert und 2x für 5 s bei 60 Hz sonifiziert. Nach erneuter Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die jeweiligen Proben GL, Ü und P mittels SDS-PAGE (2.4.7) und Western-Blot-Verfahren (2.4.8) weiter analysiert.

### **3x SDS-Lysispuffer (pH 6,8):**

187,5 mM Tris-HCL

6 % [m/v] SDS

30 % [m/V] Saccharose

PPI

### **2.4.7 SDS-PAGE**

Eine *Sodiumdodecylsulfat*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Cleveland *et al.*, 1977). Um dafür die Proteine zu linearisieren, wurden diese durch Erhitzen und der Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol und dem anionischen Detergenz SDS reduziert und denaturiert. Außerdem wurde somit die Eigenladung der Proteine mit einem negativen „Ladungsmantel“ aus SDS überdeckt. Von einem elektrischen Feld angetrieben, wandern die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts durch ein Polyacrylamid-Gel mit definierter Porengröße in Richtung der Anode. Kleinere Moleküle wandern schneller durch die Poren des Gels als größere und trennen sich somit in unterschiedliche Banden auf. Die Gele setzten sich aus einem 4 %igen Sammelgel sowie einem 8 oder 12 %igen Trenngel zusammen (Tabelle 6) und wurden in eine mit 1x SDS-Laufpuffer befüllten Gelelektrophorese-Kammer eingesetzt. Zur Vorbereitung der Proben wurde jeweils dieselbe Menge Protein (15  $\mu$ g) mit 4x Ladepuffer versetzt, bei 99 °C für 5 min aufgekocht und in die Tasche des Gels aufgetragen. *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) wurde als Größenmarker aufgetragen. Zur Synchronisierung der Proteine liefen diese zunächst bei einer Spannung von 90 V in das vorangeschaltete Sammelgel ein und trennten sich schließlich bei 120 V im Trenngel auf. Daraufhin wurde das Gel auf eine Trägermembran transferiert (2.4.8 Proteintransfer auf eine Trägermembran).

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Trenn-und Sammelgele

Reagenz	Trenngel 8%	Trenngel 12%	Sammelgel 4%
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2 ml	3 ml	0,75 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	2,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	5,5 ml	5 ml	6,5 ml
10 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED (Tetramethyldiamin)	10 µl	10 µl	10 µl

**4x Ladepuffer:**

0,25 mM Tris  
 8 % [m/v] SDS  
 40 % [v/v] Glycerol  
 0,04 % [v/v] Bromphenolblau  
 20 % β-Mercaptoethanol

**1x Laufpuffer für SDS-PAGE:**

25 mM Tris-HCl (pH 8,3)  
 250 mM Glycin  
 0,1 % [m/v] SDS

**Trenngelpuffer:**

1,5 M Tris-Base (pH 8,8)  
 0,4 % [m/v] SDS

**Sammelgelpuffer:**

0,6 M Tris-HCl (pH 6,8)  
 0,4 % [m/v] SDS

**2.4.8 Proteintransfer auf eine Trägermembran**

Beim Western-Blot handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen durch einen elektrophoretischen Transfer von einem SDS-PAGE-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran.



## 2 MATERIAL UND METHODE

Das „Blotting-Sandwich“, bestehend aus „Sandwich-Klammern“, Wortmann-Paper, Nitrocellulose-Membran und Gel samt darin aufgetrennter Proteine, wird in eine passende mit 1x Transferpuffer befüllten Nassblot-Kammer (BioRad, München) zwischen zwei Elektroden eingespannt. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 30 V über Nacht. Mit der Ponceau S-Färbung wurden die Proteinbanden nach dem Übertrag auf die Membran visualisiert und der Transfer auf Gleichmäßigkeit überprüft. Ponceau S gehört zu den Azofarbstoffen und bindet an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine was als rosaroter Bandenfarbstoff zu erkennen ist. Der reversibel gebundene Farbstoff wurde anschließend mit ddH<sub>2</sub>O abgewaschen.

### **1x Transferpuffer:**

250 mM Glycin

20 % [v/v] Methanol

25 mM Tris-HCl (pH 8,3)

### **Ponceau S:**

0,02 % [w/v] Ponceau S

0,3 % [w/v] Trichloracetat

0,3 % [w/v] Sulphosalicylsäure

### **2.4.9 Immundetektion Membran-gebundener Proteine**

Der spezifische Nachweis einzelner, auf einer Nitrocellulose-Membran gebundener Proteine, erfolgte via einer sogenannten „indirekten Antikörperfärbung“. Dafür wurden alle unspezifischen Antikörperbindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran mit einer 4 %igen Milchlösung gesättigt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde die Membran 3x mit PBS-T gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit einem spezifischen Primärantikörper, welcher an das Antigen des jeweiligen Proteins auf der Membran binden konnte, inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x 10 min mit PBS-T gewaschen und für 1 h mit einem Sekundärantikörper (2.1.2.6 Antikörper; 1:10000 in 10 ml PBS-T) inkubiert. Dieser ist mit einer Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert, welche dem indirekten Nachweis der Proteine diene. Nach Applikation einer ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) katalysiert die HRP die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, die sich in Form eines Chemilumineszenzsignals

## 2 MATERIAL UND METHODE

detektieren lässt. Dieses proportional der Menge an vorhandenem Protein entstehende Chemilumineszenzsignal wurde mithilfe des Geräts Fusion-SL 3500WL (Peqlab, Erlangen) aufgenommen. Zur Entwicklung einer Membran wurde ein Ansatz aus ECL-Lösung A, ECL-Lösung B und 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hergestellt (Verhältnis 1000:100:1) und unmittelbar vor Detektion auf die Membran gegeben.

Die densitometrische Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm *ImageJ*. Zur Berücksichtigung des Hintergrunds wurde ein Nullwert abgezogen. Eine weitere Verrechnung der Werte erfolgte mithilfe des Programms *Microsoft® Excel*.

### **4 % Milchlösung (pH 7,4):**

4 % [w/v] Magermilchpulver in PBS-T

### **1x PBS-T:**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Anhydrat

1,8 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,05 % Tween20

### **ECL-Lösung A:**

0,1 M Tris-HCl (pH 6,8)

0,025 % [m/v] Luminol

### **ECL-Lösung B:**

0,11 % [m/v] para-Hydroxycumarinsäure in DMSO

## **2.5 Statistik**

Zum statistischen Vergleich von zwei Gruppen, wurden Messwerte mittels des t-Tests für unabhängige Stichproben mit dem Programm Microsoft® Excel 2016 analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) wurde ausgeschlossen, wenn der Signifikanzwert unter 0,05 lag. Der Unterschied der Messwerte zweier Gruppen wurde dann als statistisch signifikant definiert, was durch (\*) gekennzeichnet wurde. Für alle Auswertungen galten folgende Signifikanzgrenzen:  $p \geq 0,05$  (nicht signifikant),  $p < 0,05$  (\*, signifikant),  $p < 0,01$  (\*\*, hoch signifikant). Als Streuungsmaß (Varianz) wurde der Standardfehler (*Standard Error of the Mean*, SEM) berechnet und angegeben.

### 3 ERGEBNISSE

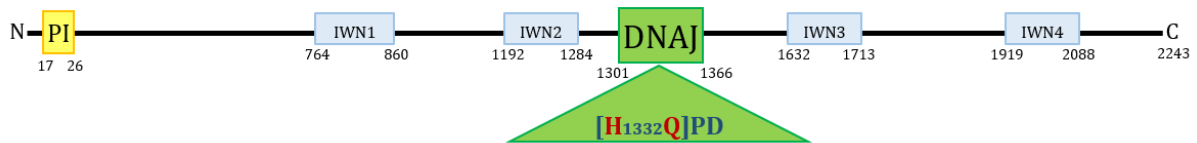
#### 3.1 Charakterisierung der DNAJ-Domäne von DNAJC13

Aufgrund seiner zentral gelegenen DNAJ-Domäne gehört DNAJC13 zu der hoch konservierten DNAJ/HSP40-Proteinfamilie. Die Mitglieder dieser Familie fungieren als Co-Chaperone von HSP70 und regulieren über ihre DNAJ-Domäne deren ATPase-Aktivität, wodurch HSP70 seiner vielfältigen Rolle in der Proteinhomöostase gerecht werden kann (Wall, Zylicz and Georgopoulos, 1994; Tsai and Douglas, 1996; Chang, Hull and Mellman, 2004; Qiu *et al.*, 2006). In dieser Dissertation wurde nun die Fragestellung bearbeitet, inwiefern die DNAJ-Domäne von DNAJC13 relevant für seine Funktion innerhalb seiner autophagischen Aktivität ist. Um dies zu analysieren, wurden zunächst Expressionsstudien unternommen.

##### 3.1.1 Generierung und Untersuchung einer DNAJC13-DNAJ Expressions-Mutanten

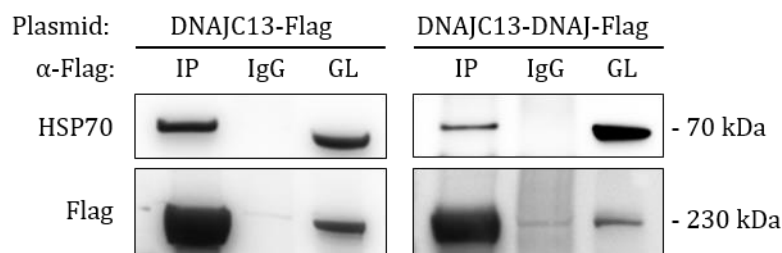
Untersuchungen sowohl im prokaryotischen als auch im eukaryotischen System zeigten, dass das hoch konservierte HPD-Motiv (H=Histidin, P=Prolin, D=Aspartat) innerhalb einer jeden DNAJ-Domäne essentiell für die Bindung und Stimulation der ATPase-Aktivität von DnaK/HSP70 ist (Wall, Zylicz and Georgopoulos, 1995; Tsai and Douglas, 1996). Die Substitution der Aminosäure Histidin zu Glutamin [(H1332Q)PD] führte zu einem Verlust der Bindung an HSP70 und damit auch der Stimulation der ATPase-Aktivität (Wall, Zylicz and Georgopoulos, 1995; Tsai and Douglas, 1996). Durch den Einbau dieser [(H1332Q)PD]-Mutation (**Abbildung 9**) sollte im nächsten Schritt dieser Arbeit die Expression von DNAJC13-DNAJ und dessen Interaktion mit HSP70 untersucht werden. Zur Vereinfachung soll fortan unter der Bezeichnung DNAJC13-DNAJ (pEFBos:DNAJC13-DNAJ[QPD]-Flag) immer die Mutante zu verstehen sein.

### 3 ERGEBNISSE



**Abbildung 9: Proteinstruktur der DNAJC13-DNAJ Mutante.** In die Kernsequenz [HPD] der zentral gelegenen DNAJ-Domäne wurde durch Substitution der Base Cytosin zu Guanin [C3996G] eine Punktmutation [QPD] eingefügt. Die DNAJC13-DNAJ Mutante (pEFBos:DNAJC13-DNAJ[QPD]-Flag) ist analog dem wildtypischen DNAJC13 Expressionskonstrukt (pEFBos:DNAJC13-Flag) 2243 Aminosäuren lang. Dargestellt sind die N-terminal gelegene PI-Domäne und vier IWN-Wiederholungssequenzen. C-terminal wurde das Protein mit Flag konjugiert.

Bevor der Einfluss der DNAJ-Domäne auf den autophagischen Flux untersucht wurde, sollte zuvor überprüft werden, ob die spezifische QPD-Mutation innerhalb der DNAJ-Domäne von DNAJC13 die Interaktion zu HSP70 verhindert. Nach Überexpression in HEK293T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die DNAJC13-DNAJ Mutante im Gesamtlysat (**Abbildung 10**) wie wildtypisches DNAJC13 ein spezifisches Molekulargewicht von 230 kDa aufweist. Nach der Co-IP mit einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper konnte eine Interaktion beider DNAJC13-Varianten, der wildtypischen sowie der DNAJ Mutanten, mit HSP70 mithilfe eines spezifischen Antikörpers im Western-Blot detektiert werden. Der Einbau der spezifischen QPD-Mutation innerhalb der DNAJ-Domäne führte somit zu keinem Interaktionsverlust zu HSP70.



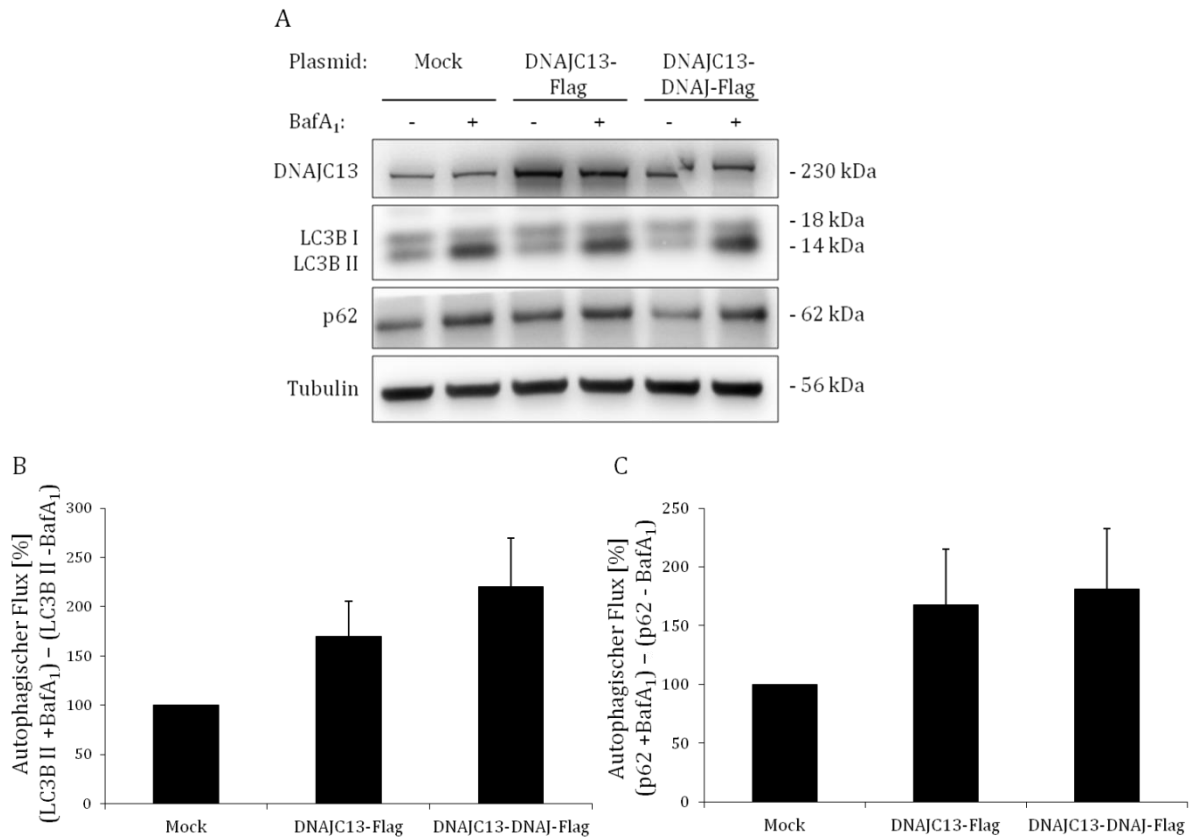
**Abbildung 10: Co-IP der DNAJC13-DNAJ Mutante und HSP70.** Nach Transfektion von pEFBos:DNAJC13-Flag oder von DNAJC13-DNAJ-Flag in HEK293T-Zellen erfolgte die IP (Immunpräzipitation) mit einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper. IgG (Immunglobulin G;  $\alpha$ -Maus) wurde als Negativkontrolle verwendet. GL zeigt das jeweilige Gesamtlysat. Nach SDS-PAGE (10 % Laemmli-Trenngel) und Western-Blot wurden die Proteine HSP70 und Flag mittels spezifischer Antikörper detektiert.

### 3.1.2 Untersuchung des Einflusses der DNAJC13-DNAJ Mutante auf den autophagischen Flux

Um die Frage zu klären, ob die Punktmutation innerhalb der DNAJ-Domäne einen Einfluss auf die Funktion von DNAJC13 in der Autophagie hat, wurde der autophagische Flux bestimmt. Nach Überexpression der Proteine DNAJC13 sowie DNAJC13-DNAJ in HEK293T-Zellen wurden diese mit BafA<sub>1</sub> behandelt. BafA<sub>1</sub> verhindert die Ansäuerung der Lysosomen durch Inhibition der V-ATPase und inhibiert somit die autophagolysosomale Proteindegradation. Dies hat zur Folge, dass Autophagosomen in der Zelle auflaufen. Diese Ansammlung kann mittels Analyse der autophagosomalen Marker LC3B und p62 biochemisch detektiert werden. LC3B ist essentieller Bestandteil von Autophagosomen und sowohl an der inneren als auch an der äußeren Membran lokalisiert. Die kaskadenartige Prozessierung der ATG8/LC3-Familie verläuft von proLC3 über zytosolisches LC3-I zu lipidiertem LC3-II (LC3-PE). An der inneren Membran lokalisiertes, lipidiertes LC3B-II fungiert als Andockstelle für Autophagie-Rezeptoren. p62 ist ein Autophagie-Rezeptor und vermittelt die spezifische Degradation von Autophagie-Substraten, indem es zum einen ubiquitinierte Substrate bindet und zum anderen über sein LIR-Motiv an LC3B-II bindet. Beide genannten Proteine sind zudem selbst Substrat der Autophagie, entsprechend können sie als Maß der autophagischen Aktivität bzw. Degradation verwendet werden.

Die Quantifizierung des autophagischen Flux erfolgte durch Subtraktion der LC3B-II- und p62-Kontrollwerte von den jeweiligen BafA<sub>1</sub>-behandelten Werten (**Abbildung 11**, B+C). Anhand der Western-Blot Analyse von LC3B-II und p62 konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Proteinspiegel von DNAJC13, ebenso von DNAJC13-DNAJ, gegenüber der Kontrolle (Leervektor (Mock)) zu einem erhöhten autophagischen Flux führt (**Abbildung 11**, A). Diese Daten deuten darauf hin, dass auch die DNAJC13-DNAJ Mutante die Autophagie positiv moduliert. Des Weiteren bestätigen diese Daten den positiven Einfluss von DNAJC13 auf die Autophagie und verifizieren die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Besemer *et al.*, in Begutachtung).

### 3 ERGEBNISSE



**Abbildung 11: Die Überexpression von DNAJC13 und der DNAJC13-DNAJ Mutante in HEK293T-Zellen führt jeweils zu einem erhöhten autophagischen Flux.** (A) HEK293T-Zellen wurden mit pEFBos:DNAJC13-Flag, pEFBos:DNAJC13-DNAJ-Flag oder pEFBos:Leervektor (Mock) transfiziert und für 4 h mit DMSO oder 2  $\mu$ M BafA<sub>1</sub> behandelt. Die Protein-Auftrennung erfolgte in einem 4 – 12 % NuPAGE Gradientengel. Die Detektion der Proteine DNAJC13, LC3B, p62 und Tubulin erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Bandenintensitäten wurden auf Tubulin normiert. (B+C) Quantifizierung des autophagischen Flux mittels Subtraktion der LC3B-II- bzw. p62-Kontrollwerte von den jeweiligen BafA<sub>1</sub>-behandelten LC3B-II- bzw. p62-Werten. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3. t-Test: p  $\geq$  0,1 (n.s.). Die Daten waren statistisch nicht signifikant.

#### 3.1.3 Subzelluläre Lokalisation der DNAJC13-DNAJ Mutante

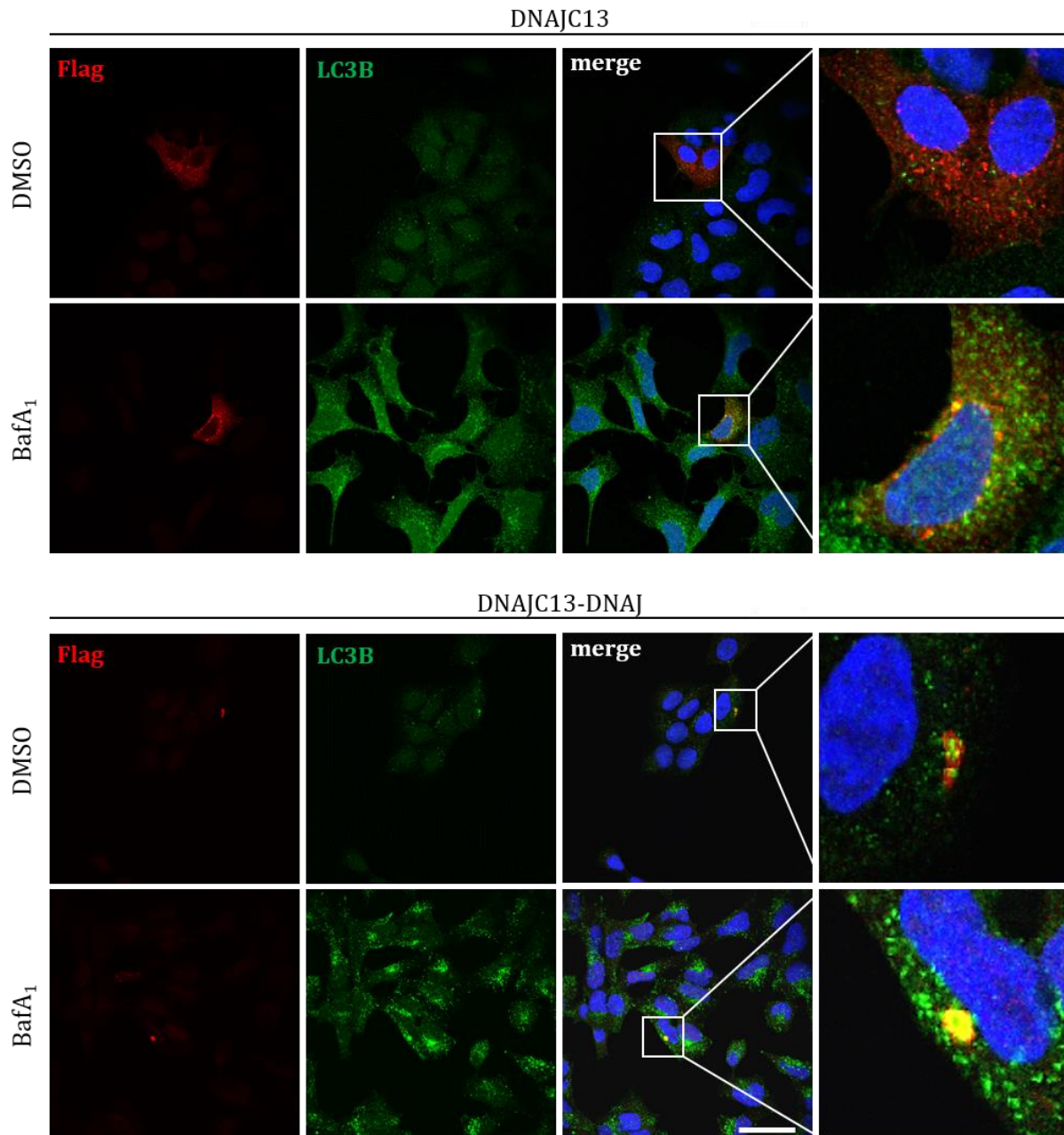
Sowohl endogenes als auch exogenes DNAJC13 liegt innerhalb von Zellen zytoplasmatisch verteilt und mit endosomalen Membranen assoziiert vor. Es weist daher eine distinkt gepunktete Verteilung auf (Fujibayashi *et al.*, 2008; Xhabija *et al.*, 2011; Xhabija and Vacratsis, 2015). Um die subzelluläre Verteilung der DNAJC13-DNAJ Mutante zu analysieren, wurden die zwei DNAJC13-Varianten (Wildtyp und Mutante) in HEK293A-Zellen überexprimiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung anhand ihrer Flag-Markierung detektiert (**Abbildung 12**). Wildtypisches DNAJC13 zeigte, wie bereits

### 3 ERGEBNISSE

beschrieben, eine physiologische Verteilung innerhalb intakter Zellen. Eine partielle Kolokalisation konnte insbesondere nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung, mit dem autophagosomalen Marker LC3B detektiert werden. Eine erfolgreiche BafA<sub>1</sub>-Behandlung war anhand des verstärkten LC3B-Signals gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Die DNAJC13-DNAJ Mutante hingegen lag nicht wie der Wildtyp zytoplasmatisch verteilt vor. Stattdessen aggregierte das mutante Protein innerhalb intakter Zellen. Zusätzlich wurde, insbesondere nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung, eine Kolokalisation der Mutante mit LC3B beobachtet (**Abbildung 12**).

Zusammenfassend konnte anhand mikroskopischer Analysen gezeigt werden, dass die überexprimierte DNAJC13-DNAJ Mutante akkumuliert. Dies könnte bedeuten, dass die DNAJ Mutante fehlgefaltet und somit destabilisiert vorliegt und aufgrund dessen, entgegen der Literatur, stets eine Interaktion mit HSP70 zu beobachten war. Die Analyse der Autophagie nach Überexpression der DNAJ-Mutante zeigte einen gesteigerten autophagischen Flux. Die QPD-Mutation innerhalb der DNAJ-Domäne führte somit zu keiner Veränderung der Funktion von DNAJC13 bezüglich dessen Funktion innerhalb der Autophagie.

### 3 ERGEBNISSE



**Abbildung 12: Analyse der Verteilung der DNAJC13-DNAJ Mutante nach Überexpression in HEK293A-Zellen.** Mit pEFBos:DNAJC13-Flag bzw. pEFBos:DNAJC13-DNAJ-Flag transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit BafA<sub>1</sub> oder DMSO behandelt (4h). Da das Expressionskonstrukt mit Flag konjugiert ist, wurde Flag (rot) und LC3B (grün) visualisiert. Innerhalb intakter Zellen zeigte wildtypisches DNAJC13 eine punktierte Verteilung, die DNAJC13-DNAJ Mutante bildet Aggregate. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. „merge“ zeigt die Überlagerung der Kanäle. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20  $\mu$ m.



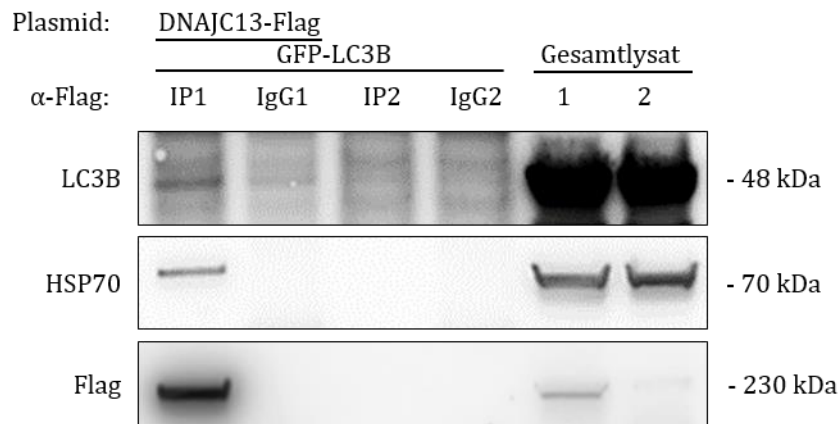
### 3.2 Untersuchung der Interaktion von DNAJC13 mit ATG8-Proteinen

Bislang konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass DNAJC13 ein positiver Modulator der Autophagie ist. Allerdings ist über den Mechanismus bisher wenig bekannt. Vorangegangene Arbeiten unterstützen die Hypothese, dass DNAJC13 mit der Phagophore assoziiert vorliegt. DNAJC13 kolokalisiert partiell mit der essentiellen Autophagie-Komponente ATG9 und beeinflusst deren Transport und/oder die Lokalisation. ATG9 ist das einzig bekannte Transmembranprotein der Autophagiemaschinerie und substanzielle Komponente für die Reifung der Phagophore. Allerdings tragen geschlossene, reife Autophagosomen kein ATG9, was bedeutet, dass ATG9 von dem reifenden Autophagosom entfernt werden muss (Orsi *et al.*, 2012). PI3P stellt ebenso eine essentielle Komponente bei der Bildung der Autophagosomen dar. Interessanterweise trägt DNAJC13 ein N-terminal gelegenes PI-Bindemotiv, über das das Protein mit Membranen assoziieren kann (Xhabija *et al.*, 2011; Xhabija and Vacratsis, 2015). DNAJC13 moduliert zudem die partielle Kolokalisation von ATG9 und LC3B und kolokalisiert selbst partiell mit LC3B (Orsi *et al.* 2012; Besemer *et al.*, in Begutachtung). Die genannten Aspekte unterstützen demnach die Hypothese, dass DNAJC13 mit reifenden Autophagosomen bzw. ATG8-Mitgliedern assoziieren könnte. Zur genaueren Untersuchung einer direkten Protein-Protein-Interaktion von DNAJC13 mit ATG8-Proteinen wurden Co-IPs durchgeführt.

#### 3.2.1 Untersuchung der Interaktion von DNAJC13 mit LC3B

GFP (grün fluoreszierendes Protein) -LC3B wurde allein sowie in Kombination mit DNAJC13-Flag in HEK293T-Zellen überexprimiert und die jeweiligen Lysate einer Co-IP unterzogen. Die alleinige Expression von GFP-LC3B diente als Negativkontrolle, da die IP mit einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper erfolgte (**Abbildung 13**). Entsprechend war DNAJC13-Flag nur in doppelt-transfizierten Zellen (IP1) sowie im Gesamtlisat 1 nachweisbar. Eine geringfügig unspezifische Bindung an den  $\alpha$ -Flag-Antikörper wurde von GFP-LC3B sichtbar (IgG1, IP2 und IgG2; in Höhe von 48 kDa). Hingegen wurde eine deutliche Interaktion von (GFP-) LC3B mit DNAJC13 beobachtet. Die Detektion von HSP70 (IP1) bestätigte als weitere Positivkontrolle die Co-IP. Die durch diese Co-IP gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass DNAJC13 mit dem ATG8-Protein LC3B interagiert.

### 3 ERGEBNISSE

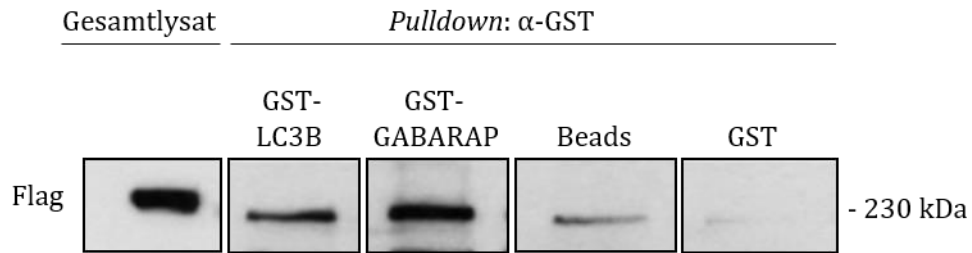


**Abbildung 13: Co-IP von LC3B mit DNAJC13.** Nach Transfektion der HEK293T-Zellen mit pEGFP-LC3B sowie pEGFP-LC3B mit pEFBos:DNAJC13-Flag erfolgte die IP mit einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper. Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE (10 % Laemmli-Trenngel) aufgetrennt und die Proteine durch spezifische Antikörper nach Western-Blot detektiert. HSP70 diente als Positiv- und IgG ( $\alpha$ -Maus) sowie die GFP-LC3B-transfizierten Zellen als Negativkontrolle.

#### 3.2.2 Untersuchung der Interaktion von GST-ATG8 mit DNAJC13

Da in der obigen IP bereits gezeigt werden konnte, dass überexprimiertes DNAJC13 ebenso überexprimiertes LC3B ko-präzipitiert, sollte dies mittels GST-ATG8-Pull-down auf umgekehrte Weise bestätigt werden. Dazu wurde in HEK293T-Zellen DNAJC13-Flag überexprimiert und die entstandenen Zelllysate mit zuvor aufgereinigten GST-ATG8-Proteinen (GST-LC3B oder GST-GABARAP) und Glutathionen-Agarose-Beads inkubiert. Die präzipitierten Protein-Protein-Komplexe wurden mittels Western-Blot Verfahren analysiert. **Abbildung 14** zeigt deutliche Interaktionen beider ATG8-Familienmitglieder, (GST-) LC3B sowie (GST-) GABARAP mit DNAJC13. An dieser Stelle sei zu betonen, dass ein stärkeres Signal/Co-Immünpräzipitat von GST-GABARAP gegenüber GST-LC3B durch DNAJC13 detektiert wurde. Der Pull-down von nur Beads oder GST diente als Kontrolle und bestätigte das Experiment. Es wurde lediglich eine schwache, unspezifische Bindung der Beads an das DNAJC13 Protein detektiert.

### 3 ERGEBNISSE



**Abbildung 14: GST-ATG8 präzipitiert DNAJC13.** HEK293T-Zellen wurden mit pEFBos:DNAJC13-Flag transfiziert. Zelllysate wurden mit GST-ATG8 (LC3B oder GABARAP) und Glutathionen-Agarose-Beads inkubiert. Mithilfe der *Beads* präzipitierte Protein-Komplexe wurden in einem 10 % Laemmli-Trenngel aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen Flag. Die Western-Blot Analyse des Gesamtlysats zeigt das Level der Überexpression von DNAJC13. Die Western-Blot Analyse des GST-LC3B-Pulldowns zeigt eine Interaktion von LC3B mit DNAJC13. Der GST-GABARAP-Pulldown zeigt eine vergleichsweise intensivere Interaktion mit DNAJC13. *Beads* und GST wurden als Kontrollen verwendet. Einzelne Bandenabschnitte wurden neu gruppiert, stammten jedoch alle von einer Membran.

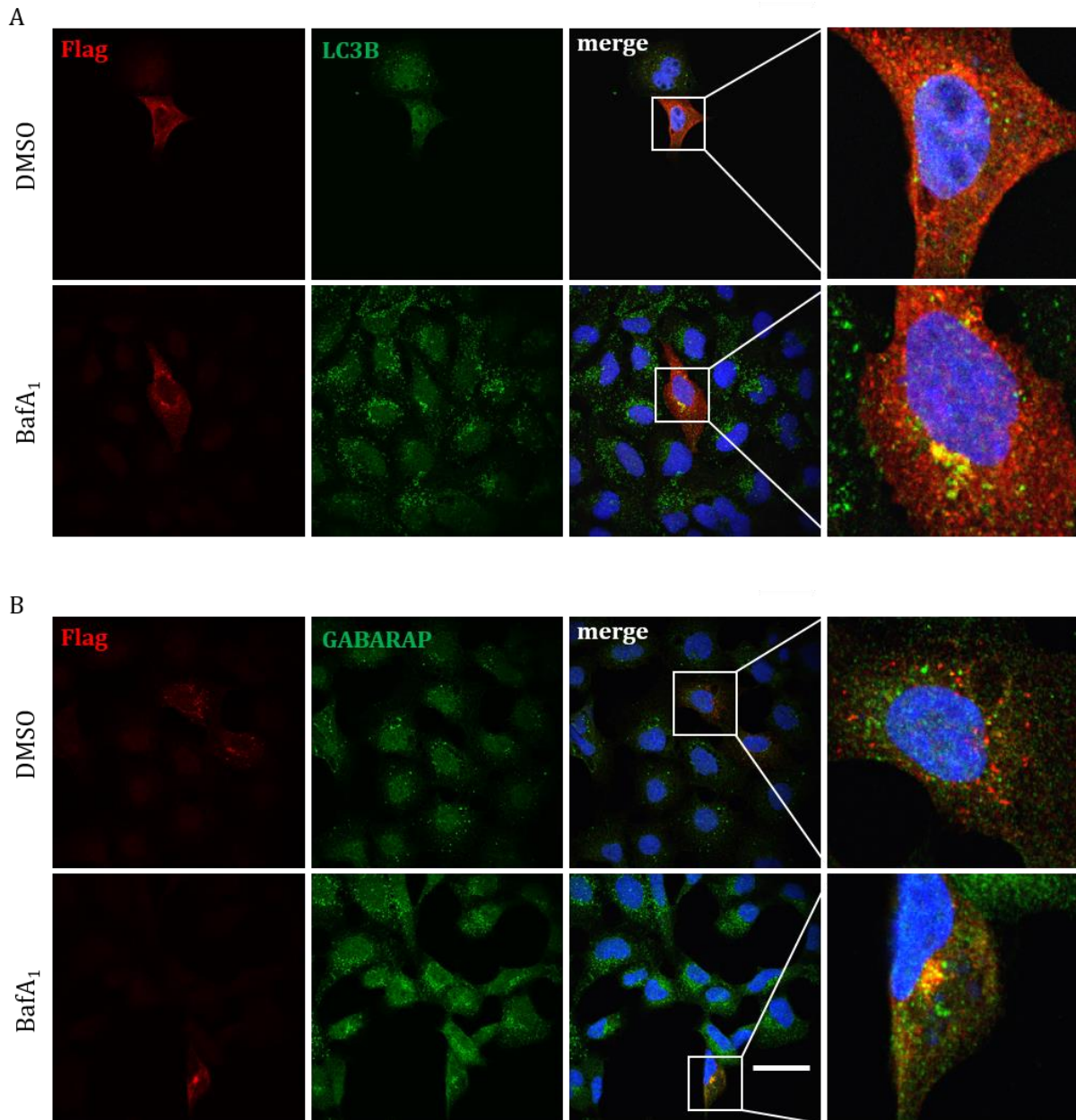
Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Experiment freundlicherweise in Kooperation mit Dr. Jennifer Jung, unter der Laborleitung von Prof. Dr. Christian Behrends, Universität Frankfurt/Main, durchgeführt.

#### 3.2.3 Subzelluläre Lokalisation von DNAJC13 und ATG8

Um die beobachteten Interaktionen von DNAJC13 mit (GFP-) LC3B und GST-ATG8 zu verifizieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von DNAJC13-Flag-exprimierenden HEK293A-Zellen angefertigt (**Abbildung 15**). Diese Immunfluoreszenzfärbungen sollten weiteren Aufschluss darüber liefern, ob DNAJC13 auch innerhalb von intakten Zellen mit den ATG8-Proteinen LC3B und GABARAP kolokalisiert. Der autophagische Prozess stellt einen sehr dynamischen und schnell ablaufenden Prozess dar und etwaige Protein-Protein-Interaktionen sind oftmals von nur kurzer Dauer. Zudem sind generell unter basalen Bedingungen (DMSO), im Vergleich zu BafA<sub>1</sub>-behandelten Zellen, wenige autophagische Strukturen vorhanden. Um eine stattfindende Protein-Protein-Interaktion erfolgreicher detektieren zu können, wurden die Zellen mit BafA<sub>1</sub> behandelt, somit eine Akkumulation von autophagosomalen Markern (LC3B, GABARAP) verursacht, und diese mittels spezifischer Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper mikroskopisch detektiert (**Abbildung 15**, A+B bei BafA<sub>1</sub>). Entsprechend wurde unter basalen Bedingungen (DMSO) weniger LC3B und GABARAP beobachtet (**Abbildung 15**, A+B bei DMSO). Demzufolge

### 3 ERGEBNISSE

konnte unter basalen Bedingungen eine nur sehr schwach partielle hingegen unter BafA<sub>1</sub>-Bedingungen eine deutliche, partielle Kolokalisation von DNAJC13-Flag und LC3B bzw. GABARAP gezeigt werden (**Abbildung 15**, A+B bei BafA<sub>1</sub>). Diese Immunfluoreszenzanalysen bestätigen demnach die zuvor gezeigte Interaktion von DNAJC13-Flag mit LC3B.



**Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbungen nach Überexpression von DNAJC13 zeigen eine partielle Kolokalisation von ATG8-Proteinen (LC3B und GABARAP) mit DNAJC13 nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung in HEK293A-Zellen.** Mit dem Konstrukt pEFBos:DNAJC13-Flag transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit DMSO oder BafA<sub>1</sub> behandelt (4 h). Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnte (DNAJC13-) Flag (rot) sowie (A) LC3B und (B) GABARAP (grün) detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. „merge“ zeigt die Überlagerung der Kanäle. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

Zusammenfassend konnte mittels Co-IP gezeigt werden, dass überexprimiertes LC3B mit DNAJC13 interagiert. Der GST-ATG8-*Pulldown* bestätigte auf umgekehrte Weise, dass DNAJC13 sowohl mit LC3B als auch mit GABARAP interagiert. Immunfluoreszenzanalysen zeigten, insbesondere nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung, eine partielle Kollokalisierung von DNAJC13 mit beiden ATG8-Familienmitgliedern LC3B sowie GABARAP.

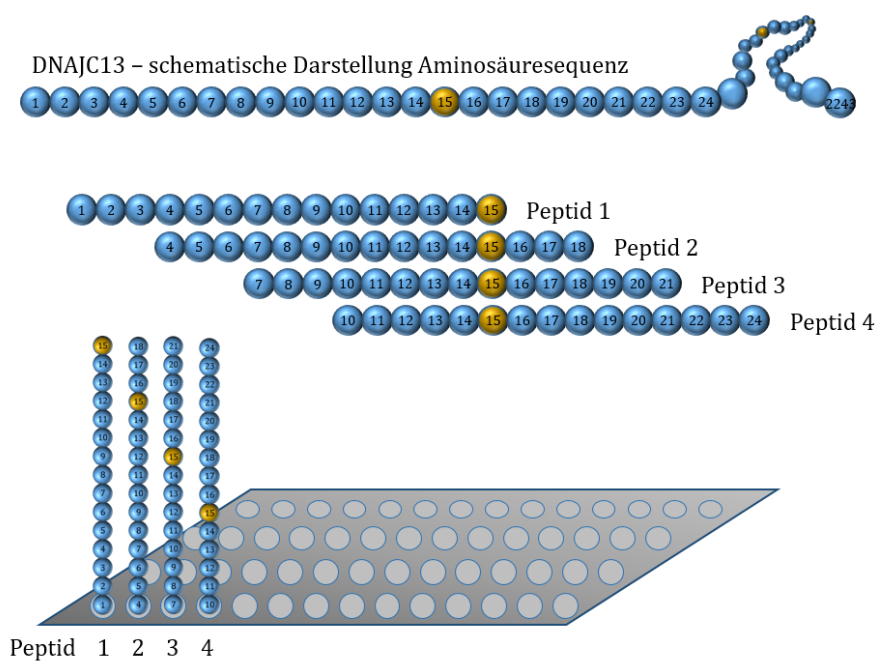
### 3.3 Charakterisierung putativer LIR-Motive von DNAJC13

Mittels eines LIR-Motivs interagieren Proteine mit ATG8-Familienmitgliedern (Kirisako *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2012). Dazu zählen Autophagie-Rezeptoren sowie Adaptor-Proteine, von denen erstere mit auf der inneren und letztere mit auf der äußeren autophagosomalen Membran lokalisierten ATG8-Proteinen in Verbindung treten (Behrends *et al.*, 2010; Pankiv *et al.*, 2010; Popovic *et al.*, 2012). Nachdem gezeigt werden konnte, dass DNAJC13 mit LC3B und GABARAP interagiert, lag der nächste Schritt in der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von einem oder mehreren putativen LIR-Motiven innerhalb von DNAJC13. Ein DNAJC13 Peptid Array sollte Aufschluss bringen, ob ein oder mehrere putative LIR-Motive für eine potentielle ATG8-Interaktion verantwortlich sein könnten.

#### 3.3.1 Identifizierung von vier LIR-Motiven innerhalb von DNAJC13 mittels eines Peptid Arrays

Ein Peptid Array ermöglicht die Identifizierung und Verifizierung bislang unbekannter LIR-Motive in DNAJC13, über diese die bereits beobachtete Interaktion mit LC3B sowie GABARAP stattfindet. Der hier verwendete Peptid Array besteht aus synthetisch hergestellten 15mer DNAJC13 Peptidsequenzen, welche mit einem Versatz von drei Aminosäuren pro Peptidsequenz an eine Cellulose-Membran gebunden wurden (**Abbildung 16**). Mittels der reversiblen Ponceau S-Färbung konnten die 748 Peptide auf der Trägermembran visualisiert werden. Da der Azofarbstoff nur an positiv geladene Aminosäuren bindet, deuten jene Bereiche, in denen die Färbung ausblieb, auf Peptide hin, die überwiegend aus negativ geladenen Aminosäuren bestehen (**Abbildung 17, A**).

### 3 ERGEBNISSE

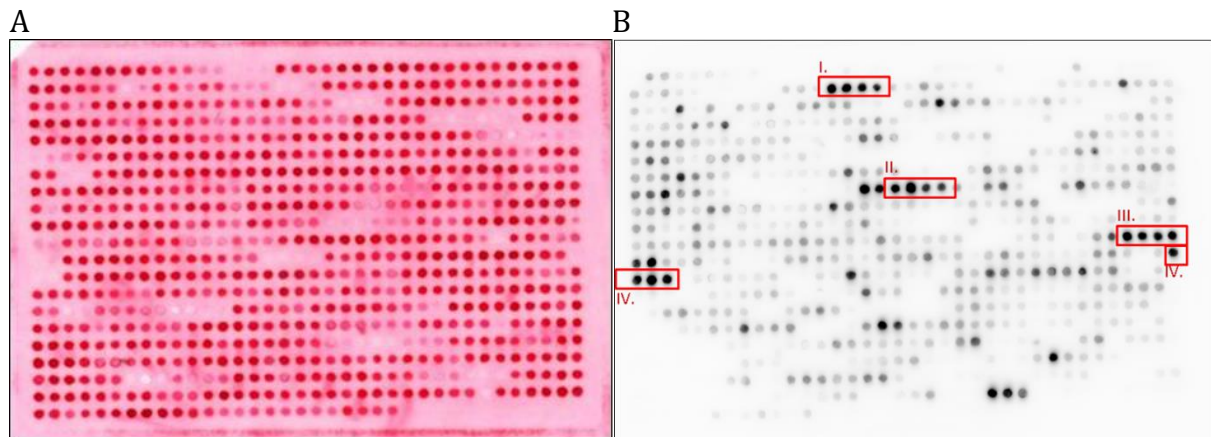


**Abbildung 16: Schematische Darstellung eines Peptid Arrays.** Entsprechend der Sequenz des 2243 Aminosäuren langen DNAJC13 Proteins wurden 748 15mer Peptide mit einem Versatz von drei Aminosäuren synthetisch hergestellt und an eine modifizierte Cellulose-Membran gebunden. Der Peptid Array wurde von der Firma Intavis, *Bioanalytical Instruments*, Köln bezogen.

Auf Grundlage der Co-IP-Daten (siehe 3.2.1) jedoch insbesondere aufgrund der GST-ATG8-Pulldown-Daten (siehe 3.2.2) welche ein gegenüber dem GST-LC3B Co-Immunopräzipitat stärkeres GST-GABARAP Signal zeigen, sollen mit dem Peptid Array die Peptide identifiziert werden, die mit GABARAP interagieren. Die Membran wurde mit GST-GABARAP inkubiert und die gebundenen Proteine mittels Immundetektion nachgewiesen. Aufgrund des Versatzes von drei Aminosäuren pro 15mer Peptid sowie der vier Aminosäuren langen LIR-Kernsequenz wurden Signale von vier aufeinander folgenden Peptiden als positives Signal gewertet. In diesem Peptid Array konnten vier Peptidbereiche detektiert werden, an denen GST-GABARAP gebunden hat. Zur Auswertung des Arrays wurden die vom Hersteller mitgelieferten Aminosäuresequenz-Codes mit den Ergebnissen der Analyse von DNAJC13 aus der iLIR-Datenbank (*iLIR Autophagy Database*: <https://ilir.warwick.ac.uk>) verglichen. Dieser Vergleich zeigte, dass GST-GABARAP spezifisch nur an jene Peptidbereiche gebunden hat, welche durch die iLIR-Datenbank als putative LIR-Motive von DNAJC13 berechnet wurden. Umgekehrt wurden keine Peptidbereiche detektiert, an denen GST-GABARAP unspezifisch gebunden hat, die nicht auch durch die Datenbank als putative LIR-Motive berechnet wurden. Der

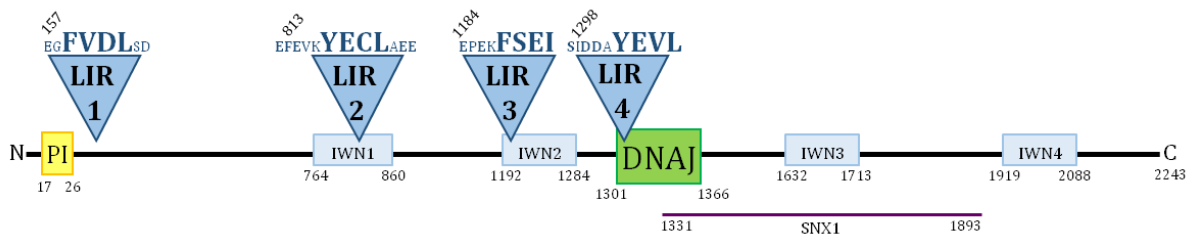
### 3 ERGEBNISSE

vorliegende Peptid Array wies somit eine enorm hohe Spezifität auf und offenbarte vier LIR-Motive innerhalb des DNAJC13 Proteins (**Abbildung 17, B**).



**Abbildung 17: Der Peptid Array identifizierte vier LIR-Motive innerhalb von DNAJC13.** Gezeigt ist eine Cellulose-Trägermembran mit 748 DNAJC13-15mer Peptiden. (A) Mit Ponceau S visualisierte Peptide auf einer Cellulose-Membran. (B) Mittels HRP-gekoppeltem GST-Antikörper konnten vier Peptidbereiche (rote Kästchen I.-IV.) anhand eines Chemilumineszenz-Signals nachgewiesen werden.

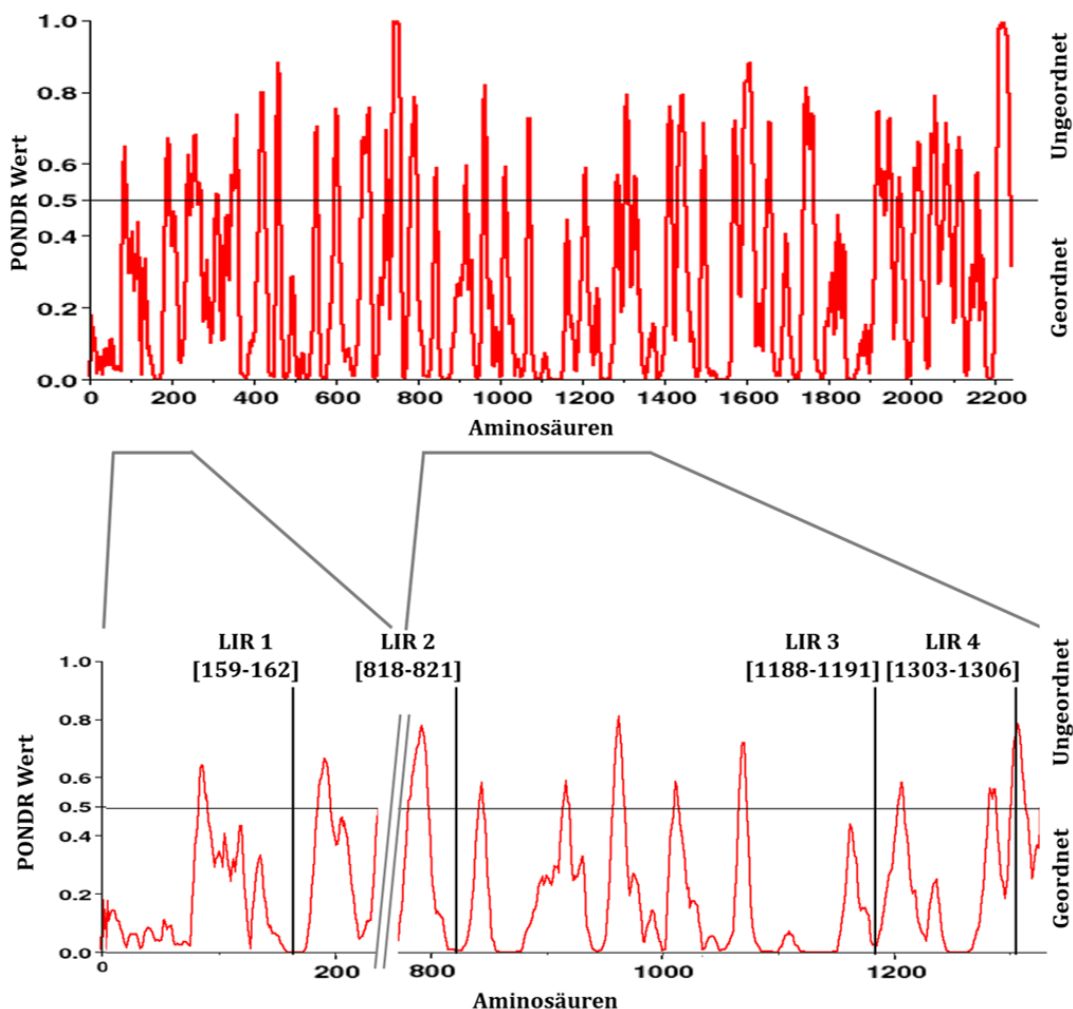
**Abbildung 18** zeigt die Positionierung der mithilfe des Peptid Arrays identifizierten vier LIR-Motive innerhalb der DNAJC13 Proteinstruktur. Interessanterweise sind alle vier LIR-Motive, das LIR1-Motive (Aminosäureposition 159-163), das LIR2-Motiv (Aminosäureposition 818-821), das LIR3-Motiv (Aminosäureposition 1188-1191) sowie das LIR4-Motiv (Aminosäureposition 1303-1306), N-terminal der zentral gelegenen DNAJ-Domäne lokalisiert. Das vierte LIR-Motiv DNAJC13-LIR4 befindet sich innerhalb der DNAJ-Domäne.



**Abbildung 18: Positionierung der vier LIR-Motive innerhalb der DNAJC13 Proteinstruktur.** Mithilfe des Peptid Arrays identifizierte LIR-Motive von DNAJC13. Abgebildet sind die vier Motive LIR1 - LIR4 mit ihrer jeweiligen, aus vier Aminosäuren bestehenden, Kernsequenz sowie benachbarte, insbesondere saure Aminosäuren. Interessanterweise sind die vier LIR-Motive alle N-terminal der zentral gelegenen DNAJ-Domäne lokalisiert. Des Weiteren sind die zentral gelegene DNAJ-Domäne, vier sich wiederholende IWN-Sequenzen sowie eine N-terminal gelegene PI-Domäne dargestellt. Der Sequenzbereich, der die Interaktion mit SNX1 vermittelt, wird durch den lila farbigen Balken angedeutet.

### 3.3.2 Untersuchung der DNAJC13 Proteinstruktur via PONDR

Die PONDR (*Predictor Of Naturally Disordered Regions*) Analyse ist ein auf Algorithmen basierendes Verfahren, um die Struktur eines Proteins vorhersagen zu können (Xue *et al.*, 2010). Mittels dieser Analyse lassen sich für DNAJC13 „geordnete“ sowie „ungeordnete“ Bereiche vorhersagen. Als „geordneter Bereich“ wird die erfolgte funktionelle Faltung des Proteins in eine feste Tertiärstruktur bezeichnet, entsprechend handelt es sich bei „ungeordneten Bereichen“ um jene Bereiche eines Proteins, die nicht als feste Tertiärstruktur, sondern lediglich in  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern gefaltet vorliegen. Die Literatur liefert Hinweise, dass ein LIR-Motiv vermutlich nur dann funktionell ist, wenn es innerhalb eines „ungeordneten“ Bereiches des Proteins gelegen ist (Popelka and Klionsky, 2015a). Die PONDR Analyse von DNAJC13 zeigt, dass das vierte LIR-Motiv (LIR4) in genau solch einem „ungeordneten“ Bereich lokalisiert ist. Die LIR-Motive LIR1, LIR2 und LIR3 hingegen sind in fest „geordnete“ Tertiärstrukturen eingebettet (Abbildung 19).





### 3 ERGEBNISSE

**Abbildung 19: PONDR Profil von DNAJC13.** Die Vorhersage der Proteinstruktur („geordnet“ oder „ungeordnet“) von DNAJC13 beruht auf der Analyse mittels des PONDR Algorithmus (*VLXT NNP Statistics*; [www.pondr.com](http://www.pondr.com)). Der PONDR Wert teilt das Protein bzw. dessen Aminosäuresequenzen in „geordnete“ (< 0,5) und „ungeordnete“ (> 0,5) Bereiche ein. **(A)** Graphische Darstellung der gesamten DNAJC13 Aminosäuresequenz. **(B)** Vergrößerte bzw. gestreckte Darstellung der DNAJC13 PONDR Analyse mit den vier eingezeichneten LIR-Motiven.

#### 3.3.3 Das DNAJC13-LIR4-Motiv ist homolog zum LIR-Motiv in FUNDC1

Interessanterweise ergab eine Sequenzanalyse der LIR-Motive von DNAJC13, dass eine 100 %ige Identität des LIR4-Motivs (YEVL) zu dem LIR-Motiv in FUNDC1 (YEVL) besteht (**Abbildung 20**). FUNDC1 ist ein Protein, welches bei der Mitophagie eine Funktion ausübt und mittels seines LIR-Motivs an LC3A/B bindet. Diese Interaktion ist gestört, wenn Punktmutationen innerhalb des Motives vorliegen (Liu *et al.*, 2012).

```
DNAJC13 1275 awkkevekkppmmsiddayevlnlpqqggphdeskir kayfrlaqkyhpd
FUNDC1   1  -----esdddsyevldl-----
```

**Abbildung 20: Der Vergleich der LIR-Motive in DNAJC13 und FUNDC1 zeigte eine 100 %ige Homologie des DNAJC13-LIR4-Motivs zu dem FUNDC1-LIR-Motiv.** *Alignment* der Aminosäuresequenzen von DNAJC13 und FUNDC1 demonstriert die 100 %ige Homologie der in roter Box dargestellten YEVL-Sequenz. Homologe umliegende Aminosäuren der beiden Proteine sind grün markiert.

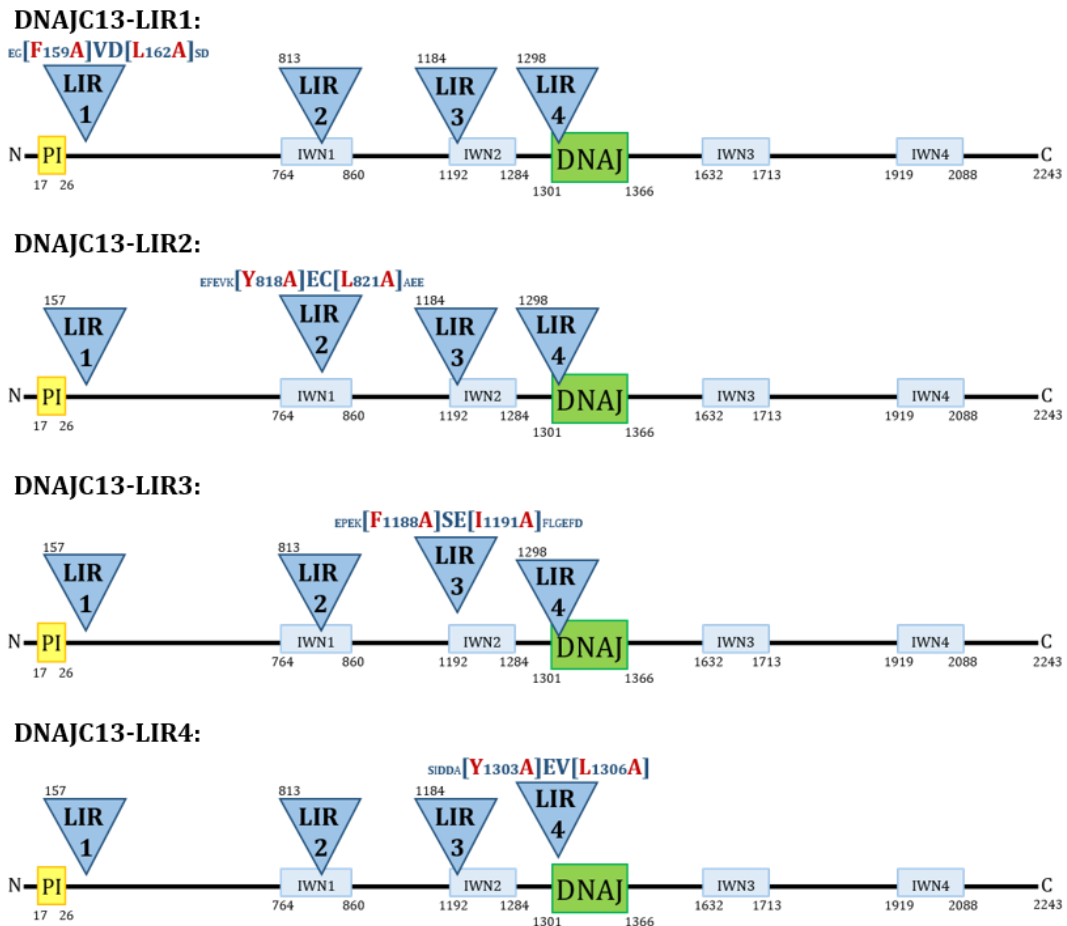
Zusammenfassend konnten mithilfe des Peptid Arrays vier LIR-Motive innerhalb von DNAJC13 identifiziert werden. Die PONDR Analyse zeigte, dass insbesondere das vierte LIR-Motiv (LIR4) aufgrund seiner Lage innerhalb einer ungeordneten Struktur funktionell sein könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die 100 %ige Homologie des DNAJC13-LIR4-Motivs zu dem LIR-Motive von FUNDC1.

### 3.4 Charakterisierung der vier verschiedenen DNAJC13-LIR Mutanten

Mithilfe des Peptid Arrays konnten vier potentiell funktionelle LIR-Motive in DNAJC13 identifiziert werden. Die zusätzliche PONDR Analyse lieferte aufgrund der Zuordnung der LIR-Motive in „geordnete“ und „ungeordnete“ Bereiche erste Hinweise zur Funktionalität der jeweiligen LIR-Motive. Um weitere Analysen zur Charakterisierung und Untersuchung der Funktionalität der jeweiligen LIRs durchführen zu können, bestand der nächste Schritt darin, vier Expressionsplasmide mit jeweils einem mutierten Motiv zu generieren (**Abbildung 21**).

Ausgehend vom wildtypischen DNAJC13 Expressionsplasmid (pEFBos:DNAJC13-Flag), mit C-terminal konjugierter Flag-Markierung, wurden vier verschiedene LIR-Mutanten durch Substitution der entsprechenden randständigen Basen generiert. Die Kernsequenz eines LIR-Motives lautet definitionsgemäß [W/F/Y]XX[L/I/V] (X steht für eine beliebige Aminosäure) (Pankiv *et al.*, 2007; Ichimura, Kumanomidou, *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2008; Birgisdottir and Johansen, 2013). Das im Bereich der Aminosäuren 159-162 gelegene erste LIR-Motiv [FVDL] wurde mittels Substitution entsprechender Basen in die Aminosäuresequenz [(F159A)VD(L162A)] mutiert. Analog wurden die jeweiligen Aminosäuren der übrigen LIR-Motive LIR2, LIR3 und LIR4 mutiert: LIR2-[(Y818A)EC(L821A)]; LIR3-[(F1188A)SE(I1191A)] und LIR4-[(Y1303A)EV(L1306A)]. Entsprechend der **Abbildung 21** soll die Nomenklatur der entstandenen LIR Mutanten von hier an mit DNAJC13-LIR1, DNAJC13-LIR2, DNAJC13-LIR3 und DNAJC13-LIR4 festgelegt werden. Alle Expressionskonstrukte wurden genau wie das wildtypische DNAJC13 Konstrukt C-terminal mit Flag konjugiert.

### 3 ERGEBNISSE



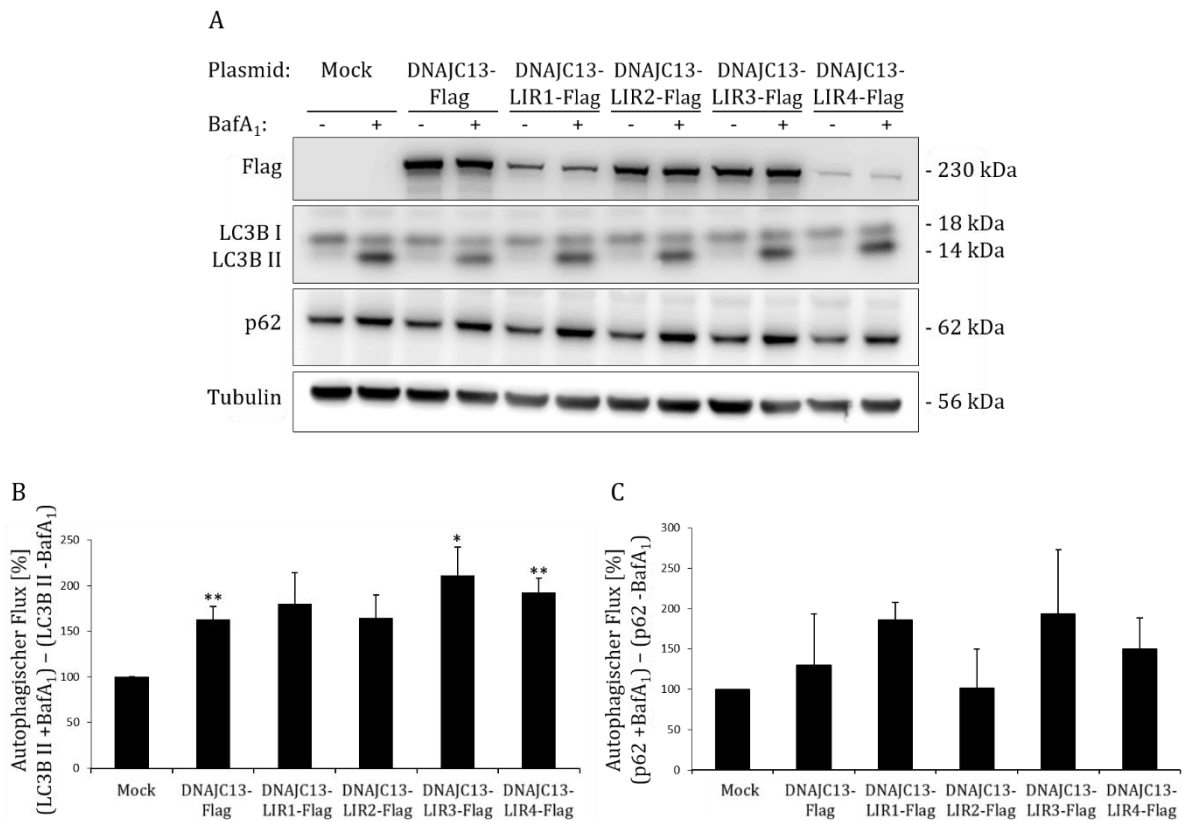
**Abbildung 21: Proteinstruktur der DNAJC13-LIR Mutanten 1-4.** Alle vier LIR Mutanten tragen zwei Punktmutationen. Randständige, die LIR-Kernsequenz bildenden Aminosäuren wurden gegen Alanin ausgetauscht: pEFBos:DNAJC13-LIR1- [(F159A)VD(L162A)], pEFBos:LIR2- [(Y818A)EC(L821A)], pEFBos:LIR3- [(F1188A)SE(I1191A)] und pEFBos:LIR4- [(Y1303A)EV(L1306A)]. Die DNAJC13-LIR Mutanten unterscheiden sich strukturell nicht weiter von dem 2243 Aminosäuren großen, wildtypischen DNAJC13 Expressionskonstrukt. Zu sehen ist die N-terminal gelegene PI-Domäne, die zentral gelegene DNAJ-Domäne und vier IWN-Wiederholungssequenzen. C-terminal sind die Proteine mit Flag konjugiert.

#### 3.4.1 Untersuchung des Einflusses der DNAJC13-LIR1-4 Mutanten auf den autophagischen Flux

Nachdem die vier verschiedenen LIR-Mutationen-tragenden Expressionskonstrukte generiert worden waren, wurde ihr Einfluss auf die Autophagie untersucht. Analog zu den vorangegangenen Arbeiten wurden die jeweiligen DNAJC13-LIR Mutanten mittels der entsprechenden Konstrukte in HEK293T-Zellen überexprimiert und via Western-Blot analysiert. Diese Analyse zeigte, dass alle vier DNAJC13 Mutanten wie das wildtypische

### 3 ERGEBNISSE

DNAJC13 das spezifische Molekulargewicht (inklusive Flag) von ~230 kDa aufwies (Abbildung 22, A).

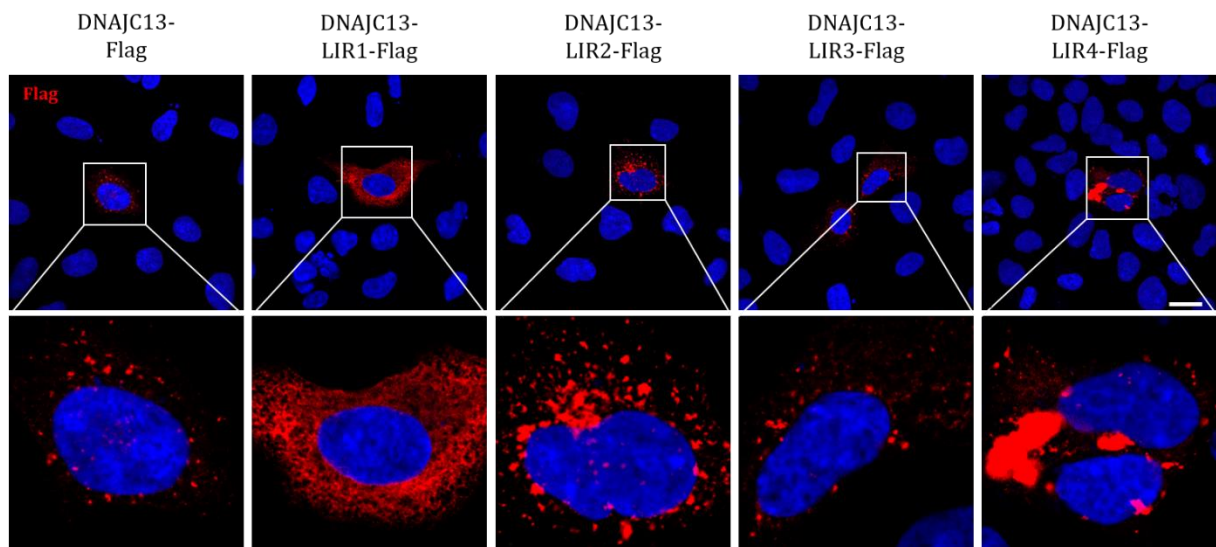


**Abbildung 22: Die Überexpression von DNAJC13 bzw. der LIR Mutanten führt in allen Fällen zu einem erhöhten autophagischen Flux.** (A) HEK293T-Zellen wurden mit pEFBos:DNAJC13-Flag oder einer der vier LIR-Mutanten (pEFBos:DNAJC13-LIR1-Flag, -LIR2-Flag, -LIR3-Flag oder -LIR4-Flag) transfiziert und für 4 h mit DMSO oder 2 µM BafA<sub>1</sub> behandelt. Nach SDS-PAGE (4 – 12 % NuPAGE Gradientengel) und Western-Blot wurden die Proteine (DNAJC13-) Flag, LC3B, p62 und Tubulin mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die Bandenintensitäten wurden auf Tubulin normiert. (B+C) Quantifizierung des autophagischen Flux mittels Subtraktion der LC3B-II- bzw. p62-Kontrollwerte von den jeweiligen BafA<sub>1</sub>-behandelten LC3B-II- bzw. p62-Werten. Mittelwert ± SEM; n=4; t-Test: p ≥ 0,1 (n.s.); p < 0,05 (\*); p < 0,001 (\*\*).

Auffällig war, dass die Expressionsspiegel von LIR1 und LIR4 gegenüber sowohl dem wildtypischen DNAJC13 als auch den LIR2 und LIR3 Mutanten geringer ausfielen. Unabhängig davon führte die Überexpression aller Mutanten zu einem erhöhten autophagischen Flux, verglichen mit den mit Mock transfizierten Zellen. Die Überexpression von wildtypischen DNAJC13 führte zu einem signifikant erhöhten autophagischen Flux, gemessen mittels LC3B-II-Analyse (Abbildung 22). Dies bestätigte ebenfalls die bisherigen Analysen unserer Arbeitsgruppe (Besemer *et al.*, in Begutachtung).

### 3.4.2 Subzelluläre Verteilung der DNAJC13-LIR Mutanten

Die subzelluläre Verteilung der neu gewonnenen DNAJC13-LIR Mutanten wurde nach ihrer Überexpression in HEK293A-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung von Flag mikroskopisch analysiert (**Abbildung 23**). Wie bereits erwähnt liegt sowohl endogenes DNAJC13 als auch überexprimiertes DNAJC13-Flag im Zytosol intakter Zellen verteilt in Form einer distinkten Punktierung vor. Die LIR1 Mutante weist eine homogene Verteilung ohne distinkte Punktierung auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Mutante vermutlich nicht mit membranösen Strukturen assoziiert, sondern gelöst in der Zelle vorliegt. Die DNAJC13-LIR2 und -LIR3 Proteine sind in ihrer subzellulären Verteilung dem wildtypischen Protein ähnlich, jedoch wurde vermutlich abhängig von deren Expressionslevel eine Tendenz zur Aggregatbildung beobachtet. Die LIR4 Mutante hingegen formt überwiegend große Aggregate (**Abbildung 23**).



**Abbildung 23: Charakterisierung der Verteilung der vier LIR Mutanten.** Mit den Konstrukten pEFBos:DNAJC13-Flag, -LIR1-Flag, -LIR2-Flag, -LIR3-Flag oder -LIR4-Flag transfizierte HEK293A-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung (DNAJC13-) Flag (rot) detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

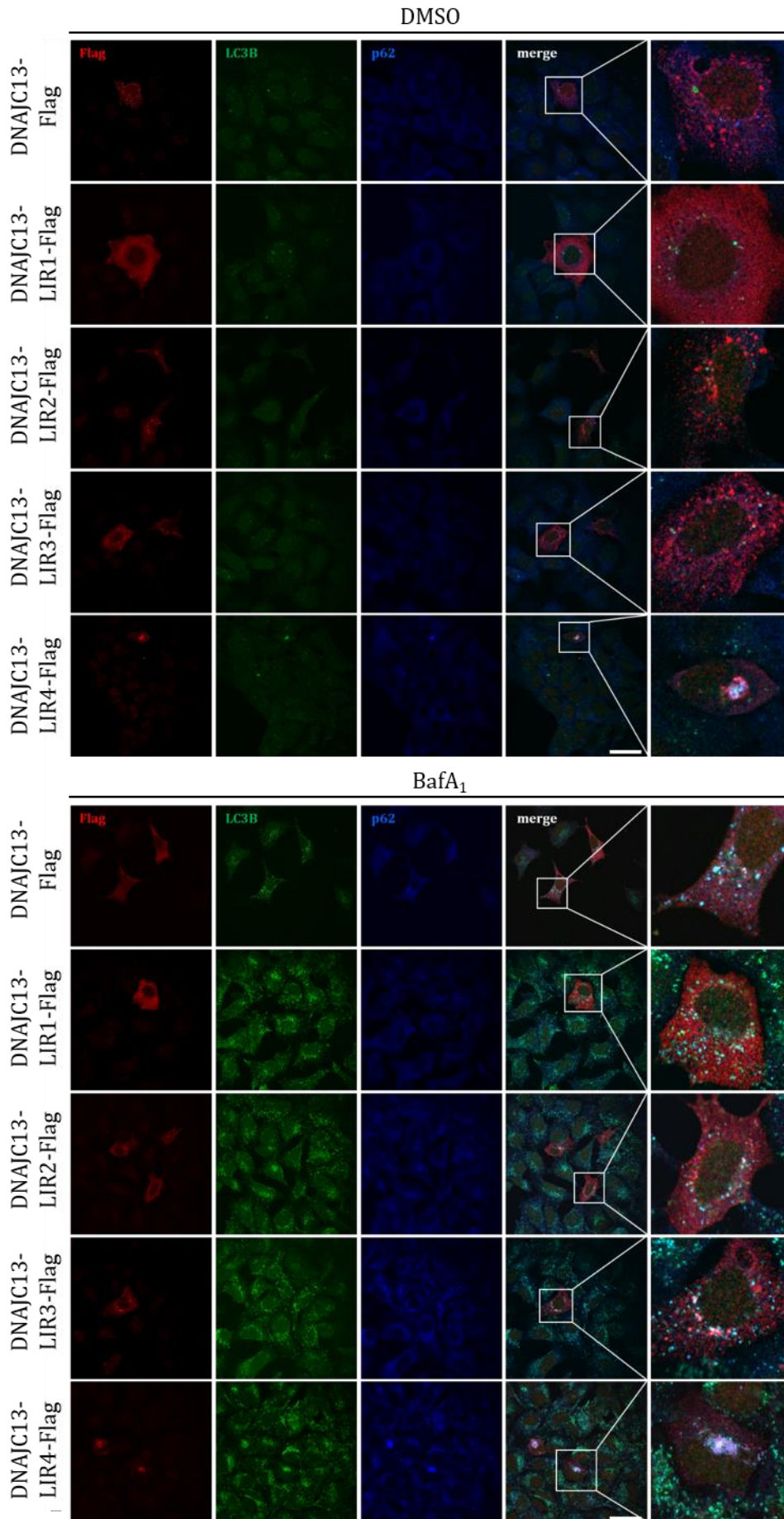
Um eine mögliche Kolo-kalisation der DNAJC13-LIR Mutanten mit den autophagosomalen Markern LC3B und p62 sowie dem ATG8-Protein GABARAP zu untersuchen, wurden

### 3 ERGEBNISSE

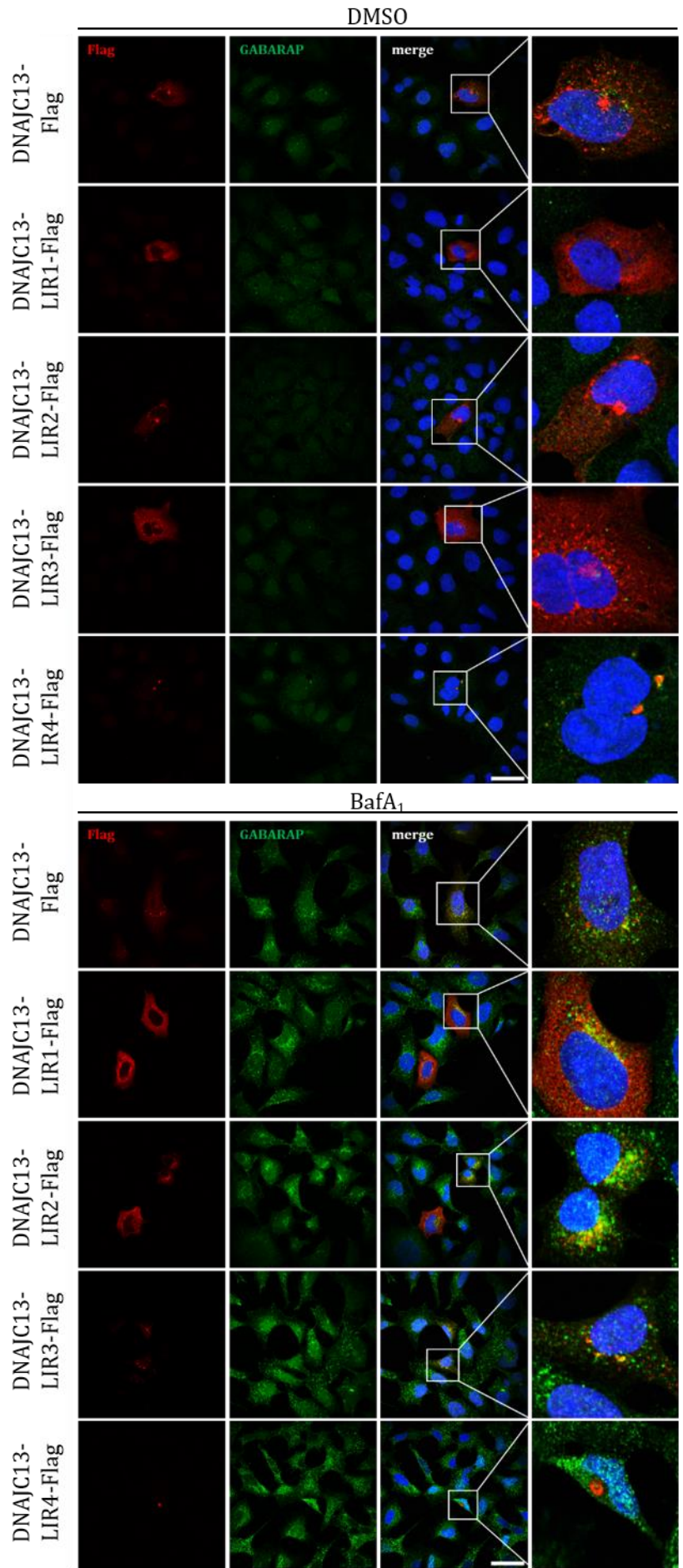
HEK293A-Zellen mit DNAJC13-Flag bzw. DNAJC13-LIR1-Flag, -LIR2-Flag, -LIR3-Flag oder -LIR4-Flag transfiziert. Für DNAJC13 sowie für die vier LIR-Motiv Mutanten konnte, insbesondere nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung, eine Kolokalisation mit p62 sowie eine partielle Kolokalisation mit LC3B beobachtet werden (**Abbildung 24**). Im Hinblick auf die Kolokalisation des Wildtyps mit p62 bestätigte diese Analyse die Daten unserer Arbeitsgruppe (Besemer *et al.*, in Begutachtung). Die DNAJC13-LIR4 Mutante lag auch in dieser Kolokalisationsstudie aggregiert vor, es waren keine distinkten Punkte, sondern lediglich große Aggregate zu detektieren. Diese Aggregate kolokalisierten bereits unter Kontroll-Bedingungen (DMSO), genauso wie nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung mit LC3B sowie mit p62. Ein vergleichbares Ergebnis konnte für das ATG8-Protein GABARAP erzielt werden. Nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung kolokalisierten alle DNAJC13-LIR Mutanten partiell mit diesem Protein (**Abbildung 25**). Eine Ausnahme macht hier die DNAJC13-LIR4 Mutante; nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung wurde keine Kolokalisation mit GABARAP festgestellt, hingegen eine partielle Kolokalisation in der DMSO-Kontrolle. Die DNAJC13-LIR2 und -LIR3 Proteine zeigten auch hier eine Tendenz zur Aggregation; insbesondere, wenn das DNAJC13-LIR3 Protein (+BafA<sub>1</sub>) verstärkt exprimiert und vermutlich demzufolge aggregiert vorlag, kolokalisierte es mit GABARAP (**Abbildung 25**).

**Abbildung 24: Untersuchung der Kolokalisation der DNAJC13-LIR Mutanten mit LC3B und p62.** Mit den Konstrukten pEFBos:DNAJC13-Flag, -LIR1-Flag, -LIR2-Flag, -LIR3-Flag oder -LIR4-Flag transfizierte HEK293A-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit BafA<sub>1</sub> (4 h) behandelt, fixiert und die Proteine (DNAJC13-) Flag (rot), LC3B (grün) und p62 (blau) mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Analysiert wurden transfizierte, intakte Zellen, in denen die Proteine eine möglichst geringe Überexpression zeigten. Alle DNAJC13-LIR Mutanten kolokalisierten mit p62 und partiell mit LC3B nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. „merge“ zeigt die Überlagerung der Kanäle. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

### 3 ERGEBNISSE



### 3 ERGEBNISSE





### 3 ERGEBNISSE

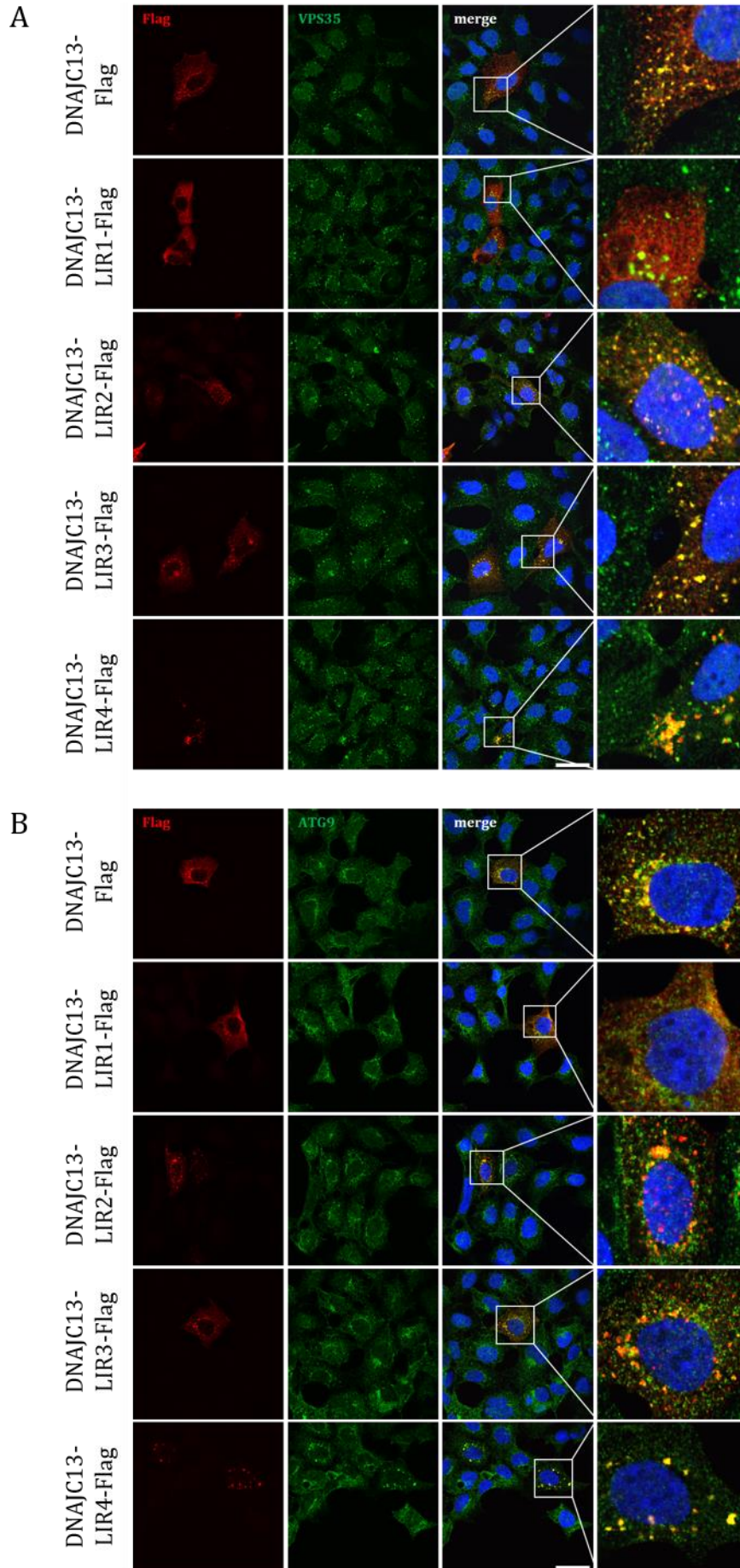
**Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbungen der DNAJC13-Varianten mit GABARAP.** Mit den Konstrukten pEFBos:DNAJC13-Flag, -LIR1-Flag, -LIR2-Flag, -LIR3-Flag oder -LIR4-Flag transfizierte HEK293A-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit BafA<sub>1</sub> (4 h) behandelt, fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung die Proteine (DNAJC13-) Flag (rot) und GABARAP (grün) detektiert. Analysiert wurden transfizierte, intakte Zellen, in denen die Proteine eine möglichst geringe Überexpression zeigten. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. „merge“ zeigt die Überlagerung der Kanäle. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

Des Weiteren wurde die subzelluläre Verteilung der DNAJC13-LIR Mutanten im Hinblick auf Kollokalisierung mit bereits beschriebenen Proteinen untersucht. Mit Ausnahme der DNAJC13-LIR1 Mutanten, kollokalisieren alle anderen LIR Mutanten von DNAJC13 wie wildtypisches DNAJC13 mit VPS35 (**Abbildung 26, A**), einem Protein des Retromers und ATG9 (**Abbildung 26, B**), einer essentiellen Komponente des autophagischen Prozesses (McGough et al. 2014; Popoff et al. 2009; Besemer *et al.*, in Begutachtung).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nach Überexpression aller DNAJC13-LIR Mutanten, ebenso nach Überexpression von wildtypischen DNAJC13, ein erhöhter autophagischer Flux zu detektieren war. Nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung konnte ebenfalls für alle Konstrukte eine partielle Kollokalisierung mit LC3B und GABARAP detektiert werden. Die DNAJC13-LIR2 und -LIR3 Mutanten sind innerhalb intakter Zellen wie wildtypisches DNAJC13 verteilt, zeigen jedoch eine Tendenz zur Aggregation. Im Vergleich lag die DNAJC13-LIR1 Mutante nicht distinkt gepunktet, sondern sehr homogen im Zytosol der Zelle vor. Die DNAJC13-LIR4 Mutante formte stets Aggregate. Außerdem konnte von LIR1 ein mäßig und von LIR4 ein stark vermindertes Expressionslevel beobachtet werden. Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass, mit Ausnahme des DNAJC13-LIR1 Konstrukts, alle anderen Konstrukte mit VPS35 und ATG9 kollokalisieren.

**Abbildung 26: Alle DNAJC13-LIR Mutanten kollokalisieren mit VPS35 und ATG9.** Mit den Konstrukten pEFBos:DNAJC13-Flag, -LIR1-Flag, -LIR2-Flag, -LIR3-Flag oder -LIR4-Flag transfizierte HEK293A-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung die Proteine (DNAJC13-) Flag (rot) und (A) VPS35 bzw. (B) ATG9 (grün) detektiert. Analysiert wurden transfizierte Zellen, in denen die Proteine eine möglichst geringe Überexpression zeigten. Ausgenommen der LIR1, kollokalisieren alle DNAJC13-Varianten mit VPS35, einer Komponente des Retromer-Komplexes, und ATG9, einer essentiellen Komponente des autophagischen Prozesses. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. „merge“ zeigt die Überlagerung der Kanäle. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

### 3 ERGEBNISSE



### 3.5 Detaillierte Analyse des LIR-Motivs LIR4 von DNAJC13

Einen ersten Hinweis für die Funktionalität des LIR4-Motivs innerhalb von DNAJC13 lieferte die PONDR Analyse, da diese darauf hindeutete, dass das LIR4-Motiv in einem „ungeordneten Bereich“ des Proteins liegt (**Abbildung 19**). Die 100 %ige Homologie des LIR-Motivs LIR4 von DNAJC13 zu dem LIR-Motiv von FUNDC1 (**Abbildung 20**) war ein weiterer Hinweis, dass das LIR4-Motiv innerhalb des autophagischen Prozesses funktionell sein könnte.

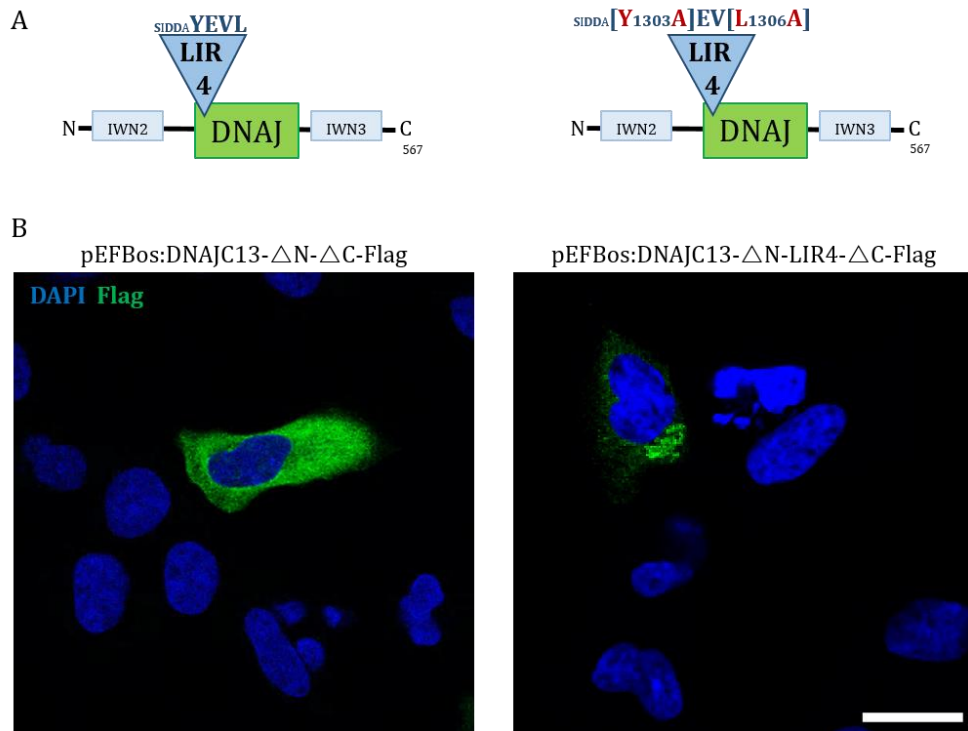
Die Charakterisierung der DNAJC13-LIR4 Mutante mittels Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass diese Mutante aggregiert (**Abbildung 23**). Aufgrund der oben aufgeführten Ergebnisse erfolgte eine spezifischere Analyse des vierten LIR-Motivs von DNAJC13. Dafür wurden verschieden mutierte und trunkierte DNAJC13-LIR4 Konstrukte generiert und analysiert.

#### 3.5.1 Generierung und Untersuchung der subzellulären Verteilung eines N- und C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukts sowie eines DNAJC13- $\Delta$ LIR4 Konstrukts

Zur näheren Analyse des vierten LIR-Motivs von DNAJC13 wurde ein beidseitig trunkiertes DNAJC13 Expressionskonstrukt (pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ N(1-1167)-LIR4-[(Y1303A)EV(L1306A)]- $\Delta$ C(1726-2243)-Flag, kurz: DNAJC13- $\Delta$ N-LIR4- $\Delta$ C; Kontrolle: pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ N(1-1167)- $\Delta$ C(1726-2243)-Flag, kurz: DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C) (**Abbildung 27, A**) sowie ein DNAJC13 Expressionskonstrukt, in dem die gesamte, vier Aminosäuren lange LIR4-Sequenz deletiert wurde (pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ LIR4(1303-1306)-Flag, kurz: DNAJC13- $\Delta$ LIR4) (**Abbildung 28, A**), generiert. Beide Konstrukte wurden anschließend hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens mittels Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch untersucht. Dafür wurden die entsprechenden DNAJC13 Konstrukte in HEK293A-Zellen überexprimiert und anhand ihrer Flag-Markierung gefärbt. Die Analyse dieser Immunfluoreszenzfärbungen deutete darauf hin, dass auch die  $\Delta$ N- $\Delta$ C-trunkierte DNAJC13-LIR4 Mutante Aggregate bildet (**Abbildung 27, B**). Das N- und C-terminal verkürzte DNAJC13 Protein (DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C-Flag) war

### 3 ERGEBNISSE

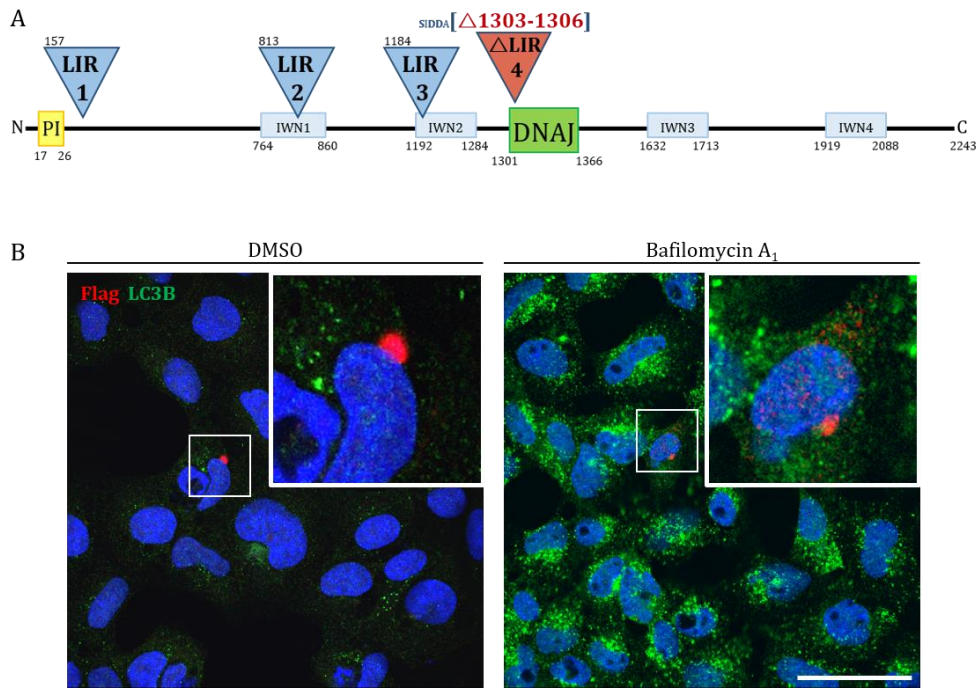
wie die DNAJC13-LIR1 Mutante lokalisiert, es lag nicht distinkt gepunktet, sondern homogen in der Zelle verteilt vor (**Abbildung 27, B**).



**Abbildung 27: Subzelluläre Verteilung der  $\Delta$ N- $\Delta$ C-trunkierten Proteine DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C-Flag und DNAJC13- $\Delta$ N-LIR4- $\Delta$ C-Flag.** (A) Proteinstruktur von pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C-Flag und pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ N-LIR4- $\Delta$ C-Flag, welche nach DNA-Amplifikation der  $\Delta$ N- $\Delta$ C-trunkierten Versionen in den pEFBos-Vektor kloniert und mit einer Flag-Sequenz konjugiert wurden. (B) HEK293A-Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und (DNAJC13-) Flag (grün) mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m.

Die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Deletionsmutante DNAJC13- $\Delta$ LIR4 ergab, dass auch dieses Protein aggregiert (**Abbildung 28, B**). Ko-Färbungen mit dem ATG8-Protein LC3B zeigten unter basalen Bedingungen (DMSO) keine Kollokalisierung mit DNAJC13- $\Delta$ LIR4, ebenso konnte keine Kollokalisierung nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung verzeichnet werden. Die Bildung von LC3B Punktäe signalisierte, dass die BafA<sub>1</sub>-Behandlung erfolgreich war (**Abbildung 28, B**).

### 3 ERGEBNISSE



**Abbildung 28: Subzelluläre Verteilung des DNAJC13- $\Delta$ LIR4-Flag Proteins.** (A) Durch Deletion der Basen 3906-3918 wurde DNAJC13- $\Delta$ LIR4 (pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ LIR4-Flag) generiert. (B) HEK293A-Zellen wurden mit pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ LIR4-Flag transfiziert und mit BafA<sub>1</sub> (4 h) behandelt, fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung (DNAJC13-) Flag (rot) und LC3B (grün) detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20  $\mu$ m.

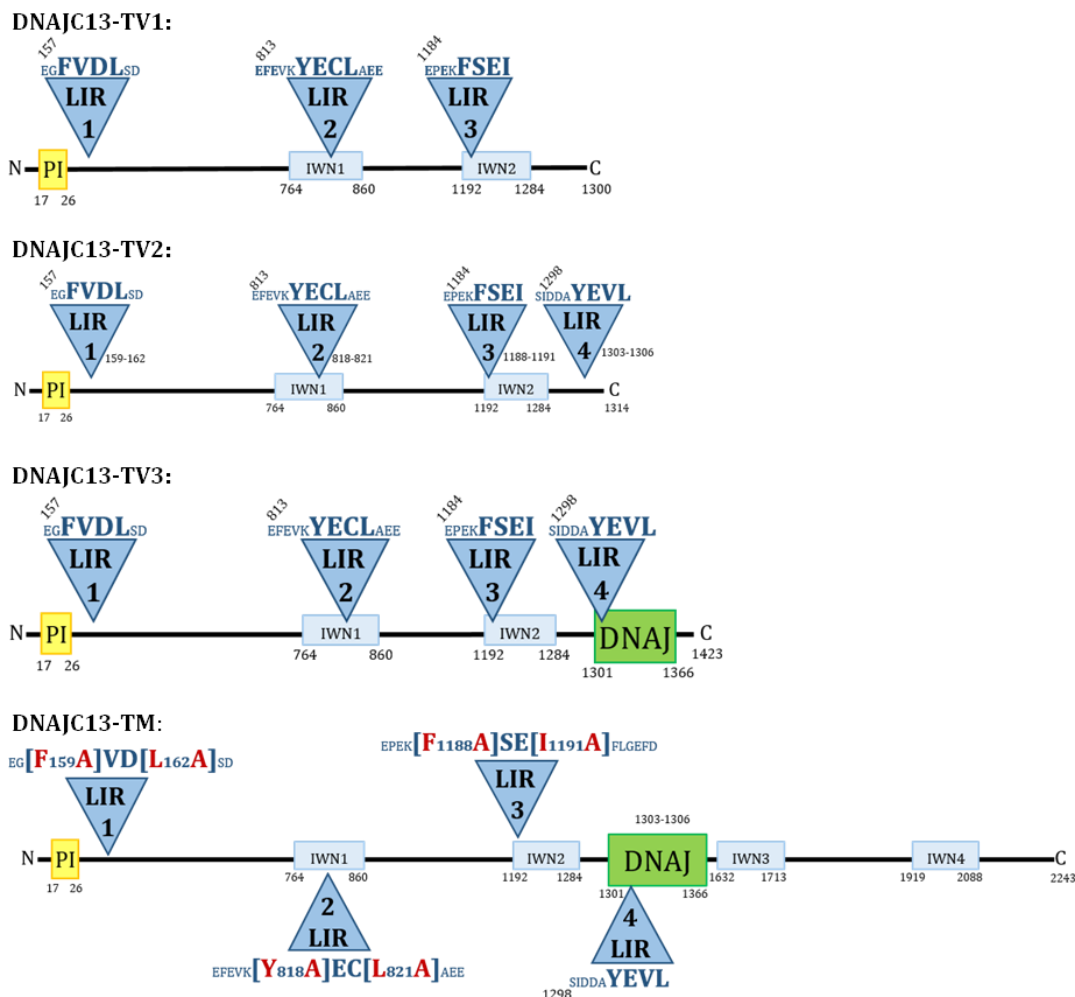
Sowohl die  $\Delta$ N- $\Delta$ C-trunkierte DNAJC13-LIR4 Mutante als auch die DNAJC13- $\Delta$ LIR4 Deletionsmutante, formte wie die DNAJC13-LIR4 Mutante Aggregate. Daher sind fundierte Aussagen über diese DNAJC13-Varianten nicht sinnvoll. Um dennoch die Frage der Funktionalität klären zu können, wurden weitere DNAJC13 Expressionskonstrukte generiert, mit denen eine entsprechende Analyse möglich sein könnte.

#### 3.5.2 Generierung und Untersuchung der Subzelluläre Verteilung von C-terminal trunkierten DNAJC13-LIR4 Mutanten (TV1-3) und einer DNAJC13 *Triple* LIR Mutante (TM)

Im nächsten Schritt wurden Expressionskonstrukte generiert, welche innerhalb des LIR4-Motivs keine Mutation oder Deletion aufweisen, sondern nur C-terminal trunkiert sind. Das vierte LIR-Motiv befindet sich am Anfang der DNAJ-Domäne. Entsprechend

### 3 ERGEBNISSE

entstanden drei C-terminal verkürzte DNAJC13 Mutanten: Der DNAJC13-TV1 Mutante (TV1=trunkierteVersion1; pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ C(1301-2243)-Flag)) fehlt das vierte LIR-Motiv, die DNAJ-Domäne und der C-terminale Bereich von DNAJC13; bei der DNAJC13-TV2 Mutante (pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ C(1315-2243)-Flag) wurde der C-terminale Bereich von DNAJC13 direkt hinter dem LIR4-Motiv (inklusive der DNAJ Domäne) deletiert; die DNAJC13-TV3 Mutante (pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ C(1424-2243)-Flag) verfügt nicht über den C-terminale Bereich von DNAJC13 (**Abbildung 29**). Mit den drei generierten TV Konstrukten von DNAJC13 sollte gewährleistet sein, dass die Mutanten miteinander vergleichbar sind und der Einfluss des vierten LIR-Motivs in Abhängigkeit von der DNAJ-Domäne untersucht werden kann. Zusätzlich wurde eine DNAJC13 *Triple* LIR Mutante (TM; pEFBos:DNAJC13- [LIR1(F159A)VD(L162A)]- [LIR2(Y818A)EC(L821A)]- [LIR3(F1188A)SE(I1191)]) generiert, in der LIR1, LIR2 und LIR3 mutiert sind. Mithilfe dieses Konstrukts sollte eine mögliche Aggregation ausgeschlossen werden. Außerdem würde durch die mutiert vorliegenden LIR1-3-Motive eine mögliche Kompensation des vierten LIR Motivs durch die ersten drei LIR Motive ausgeschlossen sein.

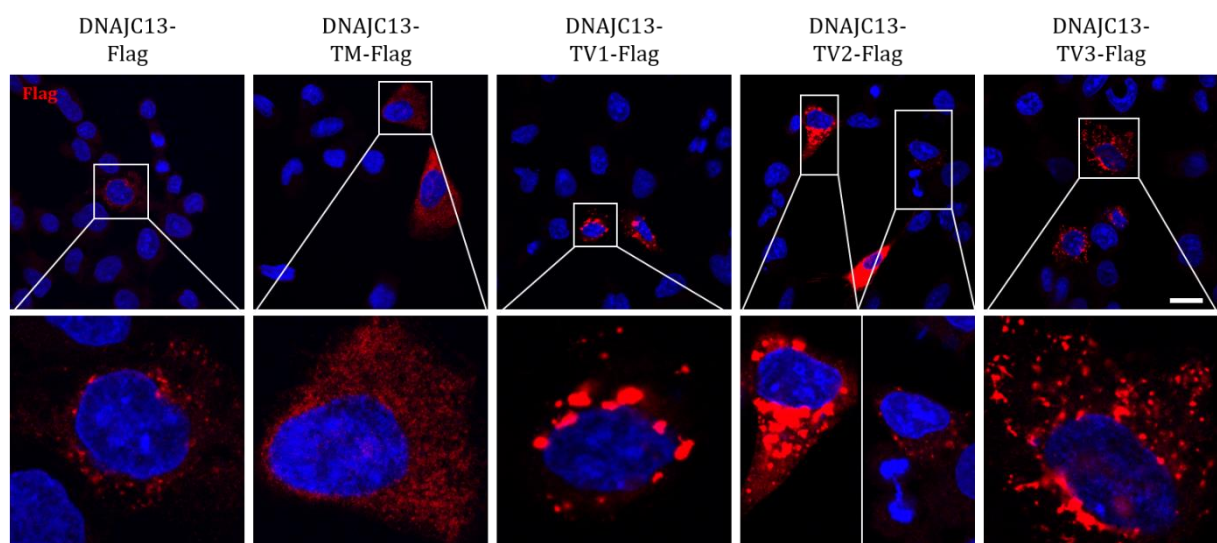


### 3 ERGEBNISSE

**Abbildung 29: Proteinstrukturen der trunkierten Versionen 1-3 und der *Triple* LIR Mutante.** Die TV (TV=trunkierte Version) Konstrukte wurden, ausgehend von dem wildtypischen DNAJC13-Plasmid, C-terminal verkürzt (TV1: pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ C(1301-2243)-Flag; TV2: pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ C(1315-2243)-Flag; TV3: pEFBos:DNAJC13- $\Delta$ C(1424-2243)-Flag). Zur Generierung der *Triple* LIR Mutante (TM); pEFBos:DNAJC13-[LIR1(F159A)VD(L162A)]- [LIR2(Y818A)EC(L821A)]- [LIR3(F1188A)SE(I1191)]-Flag wurden in den ersten drei LIR-Motiven entsprechende Mutationen eingefügt, das vierte LIR-Motiv liegt wildtypisch vor. C-terminal tragen die Proteine eine Flag-Markierung.

Nachdem die C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte TV1, TV2 und TV3 sowie die DNAJC13 *Triple* LIR Mutante (TM) generiert worden waren, sollte die Frage geklärt werden, ob diese Proteine ebenso eine Tendenz zur Aggregation zeigen würden bzw. welche subzelluläre Verteilung sie aufweisen. Die subzelluläre Verteilung der neu gewonnenen DNAJC13 Mutanten wurde nach Expression in HEK293A-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch analysiert.

Wildtypisches DNAJC13 zeigte seine bekannte, distinkte Punktierung. Die TM war, analog zur DNAJC13-LIR1 Mutante sowie zu dem beidseitig trunkierten DNAJC13 Protein (DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C), nicht distinkt gepunktet, sondern homogen im Zytosol der Zelle verteilt. Dies deutete darauf hin, dass auch DNAJC13-TM gelöst vorliegt, also nicht mit membranösen Strukturen assoziiert ist. TV1, TV2 und TV3 waren in ihrer subzellulären Verteilung dem wildtypischen DNAJC13 ähnlich, jedoch wurde auch hier, vermutlich abhängig vom Expressionslevel, eine Tendenz zur Aggregatbildung beobachtet (**Abbildung 30**).



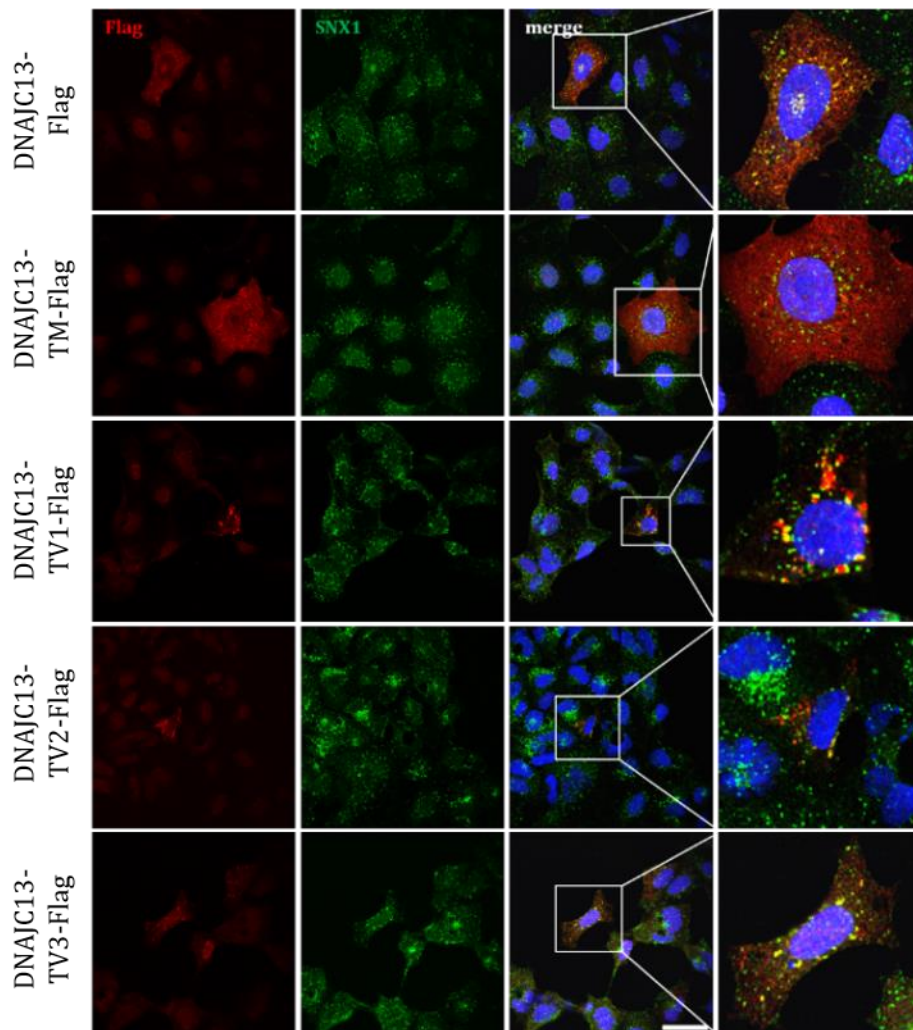
### 3 ERGEBNISSE

**Abbildung 30: Die C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte und die DNAJC13 Triple LIR Mutante zeigen gegenüber wildtypischem DNAJC13 eine teilweise andere subzelluläre Verteilung.** Mit den Konstrukten pEFBos:DNAJC13-Flag bzw. pEFBos:DNAJC13-TV1-Flag, -TV2-Flag, -TV3-Flag oder -TM-Flag transfizierte HEK293A-Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung das Protein (DNAJC13-) Flag (rot) detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

SNX1 ist eine Komponente des Retromers und wurde breites als Interaktionspartner von DNAJC13 beschrieben (Popoff *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009). SNX1 bindet im Bereich der Aminosäuren 1388-1950 an das *C. elegans*-RME-8 (Shi *et al.*, 2009), was den Aminosäuren 1331-1893 im humanen DNAJC13 Protein entspricht. Die Bindung von SNX1 an DNAJC13 erstreckt sich somit über einen Bereich von 562 Aminosäuren. Den Konstrukten TV1 und TV2 fehlt der gesamte SNX-1-Bindebereich. Das TV3 Konstrukt hingegen weist 92 Aminosäuren auf, an die SNX1 binden könnte. Um die vier DNAJC13 Mutanten hinsichtlich ihrer Lokalisation an SNX1 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. In HEK293A-Zellen, welche die DNAJC13 Mutanten exprimierten, wurde sowohl (DNAJC13-) Flag als auch endogenes SNX1 mit spezifischen Immunfluoreszenzantikörpern markiert und mikroskopisch analysiert. Die Auswertung von wildtypischem DNAJC13 zeigte eine Kolokalisation mit SNX1, die TM hingegen kolokalisierte nicht mit SNX1. Für die Analyse der DNAJC13-TV Konstrukte wurden stets intakte Zellen ausgewählt, in denen die Proteine möglichst nicht aggregierten. Im Fall von DNAJC13-TV1 und DNAJC13-TV2 konnte eine partielle Kolokalisation mit SNX1 beobachtet werden; für DNAJC13-TV3 konnte jedoch eine nahezu 100 %ige Kolokalisation detektiert werden (**Abbildung 31**). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Interaktion von TV3 mit SNX1 womöglich über diese 92 Aminosäuren (TV3-Aminosäure-Bereich 1331-1423) stattfindet bzw. dieser Bereich für eine Kolokalisation ausreichend wäre.



### 3 ERGEBNISSE

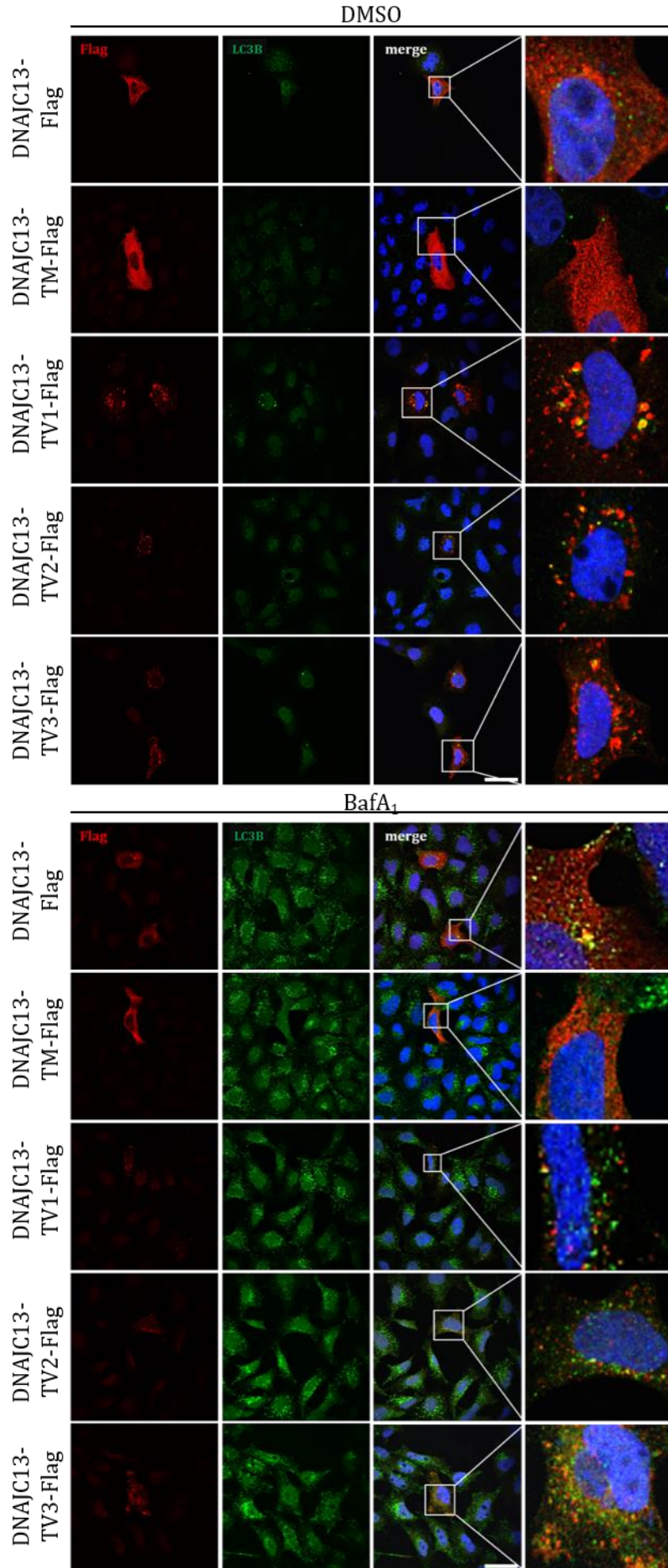


**Abbildung 31: Charakterisierung der C-terminal trunkeierten DNAJC13 Konstrukte und der *Triple LIR* Mutante mittels Ko-Färbung mit SNX1.** Mit den Konstrukten pEFBos:DNAJC13-Flag, -TM-Flag, -TV1-Flag, -TV2-Flag oder -TV3-Flag transfizierte HEK293A-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung die Proteine (DNAJC13-) Flag (rot) und SNX1 (grün) detektiert. Analysiert wurden transfizierte, intakte Zellen, in denen die Proteine eine möglichst physiologische Verteilung zeigten. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. „merge“ zeigt die Überlagerung der Kanäle. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20  $\mu$ m.

3 ERGEBNISSE

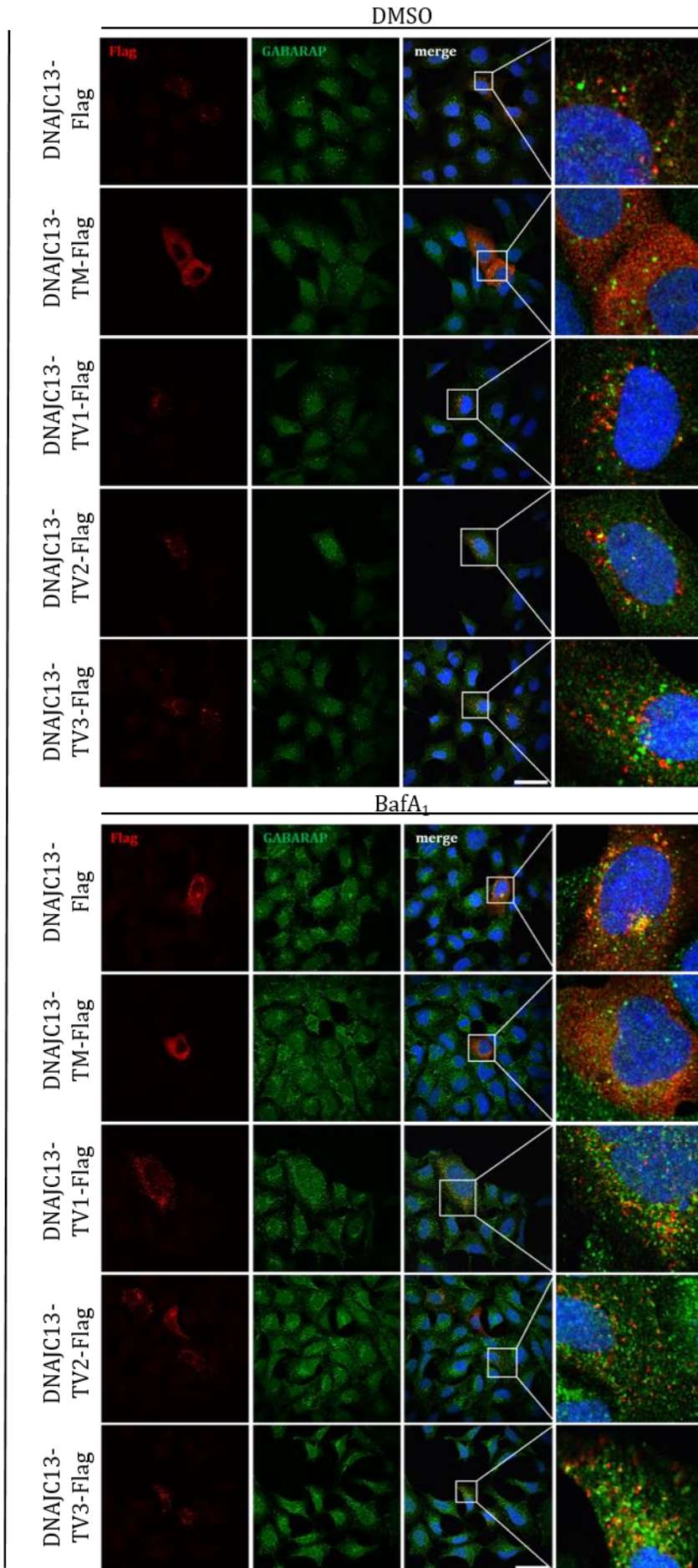
A

LC3B



B

GABARAP



**Abbildung 32: Charakterisierung der C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte und der Triple LIR Mutante mittels Ko-Färbung mit LC3B bzw. GABARAP in BafA<sub>1</sub>-behandelten HEK293A-Zellen.** Mit dem Konstrukt pEFBos:DNAJC13-Flag bzw. pEFBos:DNAJC13-TM-Flag, -TV1-Flag, -TV2-Flag oder -TV3-Flag transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit BafA<sub>1</sub> behandelt (4 h; DMSO zeigt basale Kontrollbedingungen). Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnte Flag (rot) sowie **(A)** LC3B bzw. **(B)** GABARAP (grün) detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. „merge“ zeigt die Überlagerung der Kanäle. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

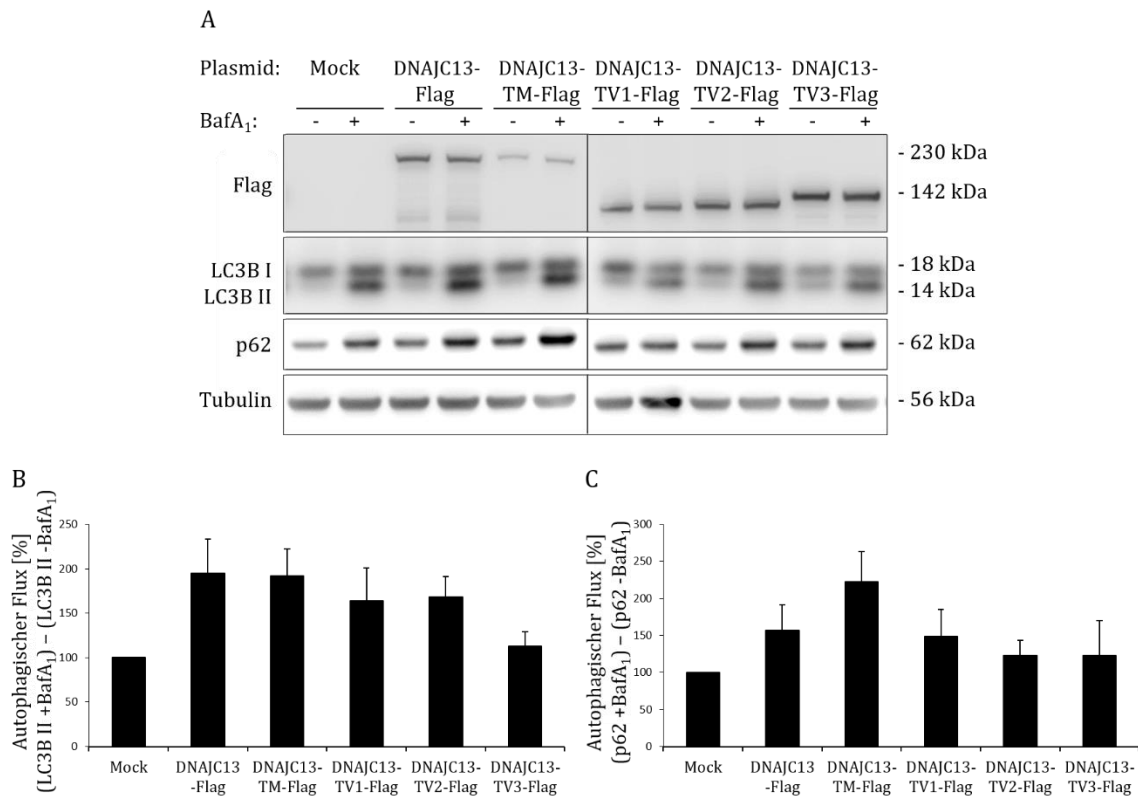
Die subzelluläre Lokalisation der DNAJC13 Konstrukte (TM, TV1, TV2 und TV3) sollte nach Expression in HEK293A-Zellen auf eine mögliche Kolokalisation mit den ATG8-Proteinen LC3B und GABARAP untersucht werden. Wie zuvor für DNAJC13 gezeigt, kolokalisierte dieses nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung partiell mit endogenem LC3B (**Abbildung 32, A**) und GABARAP (**Abbildung 32, B**). Das DNAJC13-TM Protein lag homogen und vermutlich gelöst im Zytosol der Zelle verteilt vor; hier wurde keine Kolokalisation mit den ATG8-Proteinen detektiert. TV1, TV2 und TV3 hingegen kolokalisierten nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung partiell mit LC3B und GABARAP. Auffällig war allerdings, dass mit zunehmender Länge der Proteine (von TV1 nach TV3) auch das Maß der partiellen Kolokalisation mit den ATG8-Mitgliedern LC3B und GABARAP zunahm. Zusätzlich war zu beobachten, dass wenn die DNAJC13-TV Konstrukte aggregiert vorlagen, diese auch in den Kontrollbedingungen (DMSO) partiell mit LC3B und GABARAP assoziiert vorlagen.

#### **3.5.3 Untersuchung des Einflusses der DNAJC13 Triple LIR Mutante TM sowie der C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte TV1-3 auf den autophagischen Flux**

Anhand der Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Proteine TV1-3 sowie die TM partiell mit LC3B und GABARAP kolokalisierten. Um den Einfluss von DNAJC13-TM und von DNAJC13-TV1-3 auf die Autophagie zu untersuchen, wurden die Konstrukte in HEK293T-Zellen exprimiert, mit BafA<sub>1</sub> behandelt und der autophagische Flux bestimmt.

### 3 ERGEBNISSE

Das Expressionslevel des DNAJC13-TM Proteins war gegenüber dem des Wildtyps in der Western-Blot Analyse verringert (**Abbildung 33, A**). Für die DNAJC13-TV Konstrukte konnte ihr entsprechendes spezifisches Molekulargewicht gezeigt werden (TV1: ~130 kDa; TV2: ~132 kDa und TV3: ~142 kDa). Generell ist für alle hier verwendeten Konstrukte ein erhöhter autophagischer Flux zu beobachten. Das wildtypische Protein, das TM Protein sowie das TV1 Protein zeigten basierend auf der LC3B-II- und p62-Flux-Analyse stets einen Anstieg. Im Fall von DNAJC13-TV2 war ein deutlicher Anstieg des LC3B-II-Fluxes (**Abbildung 33, A+B**), hingegen ein minimaler Anstieg des p62-Fluxes im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen zu beobachten (**Abbildung 33, A+C**). Die mit dem DNAJC13-TV3 Konstrukt transfizierten Zellen wiesen gegenüber den DNAJC13-TV1- und TV2-transfizierten Zellen eine geringere autophagischen Aktivität auf.

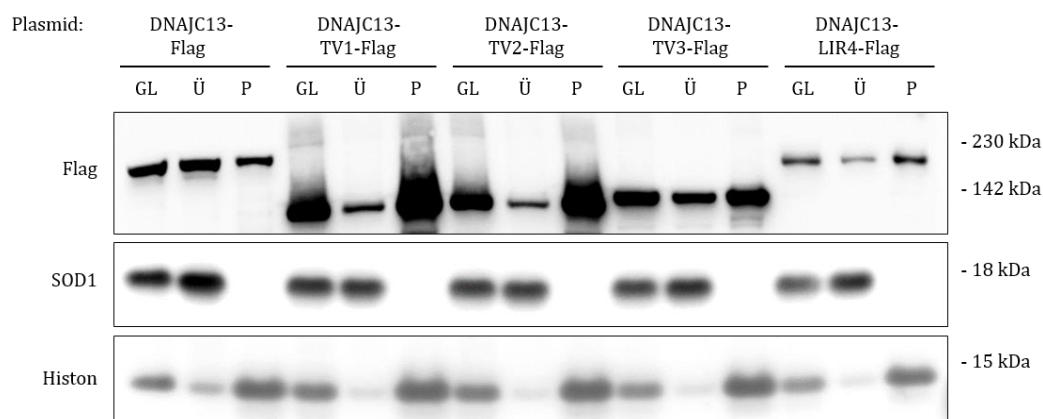


**Abbildung 33: Die Überexpression der C-terminal trunkeierten DNAJC13 Konstrukte (TV1-3) sowie die der Triple LIR Mutante (TM) führt in allen Fällen zu einem tendentiell erhöhten autophagischen Flux. (A)** HEK293T-Zellen wurden mit pEFBos:DNAJC13-Flag bzw. pEFBos:DNAJC13-TM-Flag, -TV1-Flag, -TV2-Flag oder -TV3-Flag transfiziert und für 4 h mit DMSO oder 2  $\mu$ M BafA<sub>1</sub> behandelt. Nach SDS-PAGE (4 – 12 % NuPAGE Gradientengel) und Western-Blot wurden die Proteine (DNAJC13-) Flag, LC3B, p62 und Tubulin mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die Bandenintensitäten wurden auf Tubulin normiert. Aufgrund einer veränderten Reihenfolge der Proben auf der Nitrocellulose-Membran wurde die densitometrische Aufnahme nachträglich mittig durchgeschnitten und hier gespiegelt dargestellt. **(B+C)** Quantifizierung des autophagischen Flux mittels Subtraktion der LC3B-II- bzw. p62-Kontrollwerte von den BafA<sub>1</sub>-behandelten LC3B-II- bzw. p62-Werten. Mittelwert  $\pm$  SEM; LC3B: n=3; p62: n=4; t-Test: p  $\geq$  0,1 (n.s.).

### 3.5.4 Differentielle Fraktionierung der DNAJC13 Konstrukte TV1-3 sowie LIR4

In den vorangegangenen Versuchen wurde anhand der Immunfluoreszenzanalysen beobachtet, dass die unterschiedlich mutierten oder trunkierten DNAJC13 Proteine (TV1-TV3 sowie LIR4) eine Tendenz zur Aggregation zeigten. Daher wurde das Aggregationsverhalten dieser Mutanten mittels differentieller Fraktionierung untersucht. Dafür wurden die entsprechenden Konstrukte in HEK293T-Zellen exprimiert und die Zellysate einer differentiellen Fraktionierung unterzogen. Dieses Verfahren gewährleistet mittels Zentrifugation eine Auftrennung des Zellysats (Gesamtlysat=GL) in eine lösliche Fraktion (Überstandsfraktion=Ü) und in eine Aggregat-angereicherte Pelletfraktion (P). In der Pelletfraktion sind außerdem unlösliche Bestandteile des Zellkerns sowie Zellfragmente enthalten, weshalb die Reinheit der Fraktionierung mithilfe des Kernproteins HistonH3 sowie anhand löslichem SOD1 überprüft wurde. Mittels Western-Blot konnte das DNAJC13-Flag-Level bzw. die Aggregationstendenzen biochemisch analysiert werden (Witan *et al.*, 2008, 2009).

Die Analyse der vier DNAJC13-Mutanten (TV1, TV2, TV3 und LIR4) ergab, dass im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle, alle getesteten DNAJC13-Varianten aggregierten (**Abbildung 34**). Die untersuchten DNAJC13 Mutanten waren alle in der Pelletfraktion (P) angereichert und nicht wie wildtypisches DNAJC13 in der löslichen Fraktion (Ü).



**Abbildung 34:** Die differentielle Fraktionierung der überexprimierten C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte TV1-TV3 sowie die der LIR4 Mutante zeigt, dass diese Proteine aggregieren. HEK293T-Zellen wurden mit pEFBos:DNAJC13-Flag bzw. pEFBos:DNAJC13-TV1-Flag, -TV2-Flag, -TV3-Flag oder -LIR4-Flag transfiziert. Die jeweiligen Gesamtlysate (GL) wurden mittels Zentrifugation in eine lösliche Überstandsfraktion (Ü) und eine Aggregat-angereicherte Pelletfraktion (P) differentiell fraktioniert. Nach

### 3 ERGEBNISSE

SDS-PAGE (4 – 12 % NuPAGE Gradientengel) und Western-Blot wurden die Proteine (DNAJC13-) Flag, SOD1 und HistonH3 mittels spezifischer Antikörper detektiert. SOD1 (lösliche Fraktion) sowie HistonH3 (Aggregat-angereicherte Fraktion) repräsentieren entsprechende Marker bzw. dienen als Maß der Reinheit der Fraktionen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle DNAJC13 Expressionskonstrukte bzw. Mutanten, die zur genaueren Analyse des vierten LIR-Motivs von DNAJC13 generiert worden sind, eine starke Aggregationstendenz aufwiesen. Dies konnte anhand von Immunfluoreszenzanalysen sowie einer differentiellen Fraktionierung für die TV1-TV3 Konstrukte demonstriert werden. Ebenso ergab die Analyse der Fraktionierung der DNAJC13-LIR4 Mutante eine hohe Aggregationstendenz gegenüber dem Wildtyp. Wie bereits für die DNAJC13-LIR4 Mutante veranschaulicht wurde, war auch für das DNAJC13-TM Protein ein vermindertes Expressionslevel (im Western-Blot) zu beobachten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression aller trunkierten DNAJC13 Proteine ebenso die des DNAJC13-TM Proteins zu einem erhöhten autophagischen Flux führte.

## 4 DISKUSSION

Der Begriff Proteostase beschreibt die Aufrechterhaltung eines Protein-Gleichgewichtszustands innerhalb einer Zelle. Bei anhaltenden Stressbedingungen, während des zellulären Alterns oder auch aufgrund von neurodegenerativen Erkrankungen, kann es vermehrt zur Bildung fehlgefalteter Proteine kommen (Taylor and Dillin, 2011; Hipp, Park and Hartl, 2014). Störungen innerhalb der Proteostase sind demnach oft durch die Ansammlung von geschädigten und fehlgefalteten Proteinen gekennzeichnet und pathologisches Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen. Dazu zählen unter anderem die AD, die ALS oder die PD (Rubinsztein *et al.*, 2005; Rubinsztein, 2006; Kern *et al.*, 2010; Hartl, Bracher and Hayer-Hartl, 2011; Morawe *et al.*, 2012). Um das Gleichgewicht zu erhalten, bedient sich die Zelle einem evolutionär hoch konservierten Qualitätskontrollsystem, welches die molekularen Chaperone sowie zwei Degradationssysteme, das UPS und das autophagolysosomale System, umfasst (Hartl, Bracher and Hayer-Hartl, 2011; Morawe *et al.*, 2012). Ein tiefgreifendes Verständnis bezüglich der Organisation des Proteostase-Netzwerks ist Gegenstand derzeitiger Forschung. Die Bedeutung dieses Forschungszweigs wird dadurch verdeutlicht, dass dem Japaner Yoshinori Ohsumi im Jahr 2016 der Nobelpreis in Physiologie oder Medizin für das molekulare Verständnis auf dem Gebiet der Autophagie verliehen wurde.

Unsere Arbeitsgruppe ist daran interessiert, neue Modulatoren der Proteostase und der Autophagie sowohl zu identifizieren als auch zu charakterisieren, um damit neue Ansatzpunkte im Hinblick auf die Aufklärung ihrer Rollen bei neurodegenerativen Erkrankungen zu erhalten. Mithilfe eines RNAi Screens in *C. elegans*, zur Identifizierung von Regulatoren des Proteostase-Netzwerks, gelang es, neben weiteren interessanten Kandidaten (Kern *et al.*, 2018), *rme-8/RME-8* zu identifizieren. Sowohl *rme-8/RME-8* als auch das humane Ortholog *dnajc13/DNAJC13* wurden schließlich durch unsere Arbeitsgruppe als eine neue Komponente der Proteostase und Modulator der Autophagie beschrieben (Besemer *et al.*, in Begutachtung). Welche genaue Rolle RME-8/DNAJC13 allerdings innerhalb des autophagischen Prozesses einnimmt, blieb bisher weitestgehend ungeklärt und wurde im Rahmen dieser Dissertation genauer untersucht.



## 4.1 Die DNAJ-Domäne von DNAJC13 bestimmt die Konformation des Proteins

DNAJC13 enthält eine zentral gelegene DNAJ-Domäne über die es als Co-Chaperon mit HSC70/HSP70 interagiert und dadurch dessen Aktivität reguliert. Demnach wurde dem DNAJC13 Protein innerhalb des endosomalen Vesikeltransports bzw. im Prozess der Clathrin-abhängigen Endozytose eine Funktion zugeschrieben (Chang, Hull and Mellman, 2004; Girard *et al.*, 2005). In dieser Dissertation sollte nun untersucht werden, inwiefern die DNAJ-Domäne in DNAJC13 möglicherweise einen Einfluss auf den autophagischen Prozess ausübt. Dafür wurde zunächst eine H1332Q-Mutation in das HPD-Motiv innerhalb der hoch konservierten DNAJ-Domäne eingefügt. Wall und Kollegen untersuchten bereits in den 1990er Jahren die kooperative Funktion der *E. coli* Hitzeschockproteine DnaJ und DnaK, den prokaryotischen Homologen von DNAJ/HSP40 und HSP70. Die zentrale biochemische Funktion des molekularen Co-Chaperons DnaJ ist die Interaktion mit DnaK, wodurch dessen ATPase-Aktivität stimuliert wird (Wall *et al.*, 1994; Tsai and Douglas, 1996). Wall und Kollegen führten *in vitro* Untersuchungen mit einer Mutante durch, die eine Punktmutation innerhalb der DNAJ-Domäne aufwies. Es lag ein Austausch von Histidin [H] zu Glutamin [Q] im HPD-Motiv innerhalb der DNAJ-Domäne vor. Ihre Ergebnisse bezüglich der Interaktion und somit der Stimulation der ATPase-Aktivität von DnaK durch die DnaJ-Mutante zeigten, dass sowohl die Interaktion zu DnaK als auch die Stimulation der ATPase-Aktivität von DnaK aufgehoben war (Wall *et al.*, 1994, 1995). Sie argumentierten, dass das HPD-Motiv innerhalb der DNAJ-Domäne in zwei putative  $\alpha$ -Helices eingebettet vorkommt und eine essentielle Rolle für die physikalische Interaktion mit DnaK spielt. Lag das HPD-Motiv mutiert vor [QPD], war die Konformation der zwei putativen  $\alpha$ -Helices verändert und die Interaktion zu DnaK gestört (Wall, Zylicz and Georgopoulos, 1994, 1995; Tsai and Douglas, 1996).

Unsere Analysen zeigten, dass DNAJC13 auch mit seiner mutierten DNAJ-Domäne mit HSP70 interagiert. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen der DNAJC13-DNAJ Mutante in HEK293A-Zellen ergab, dass die Mutation innerhalb der DNAJ-Domäne die Konformation des Proteins bestimmte. Die DNAJC13-DNAJ Mutante lag fehlgefaltet und somit destabilisiert vor. Dies führte zur Aggregation des Proteins. Diese Beobachtung der Aggregation stimmt mit Studien von Norris und Kollegen aus *C. elegans* überein. Die Expression einer *rme-8* [HPD-AAA]-DNAJ Mutante in Coelomocyten von *C. elegans* führte

## 4 DISKUSSION

zu einem, vom Wildtyp abweichenden, Aggregat-ähnlich geformten Protein (Norris *et al.*, 2017).

Die beobachtete Aggregation der DNAJC13-DNAJ Mutante ist demnach eine mögliche Erklärung für die Interaktion mit HSP70. HSP70 ist nicht nur für die korrekte Faltung von Proteinen verantwortlich, sondern auch in der Lage, den Transport von zum Abbau markierten Substraten über verschiedene Wege zu verschiedenen Zielorten zu vermitteln: zum UPS oder zum Lysosom via der CMA oder der selektiven Autophagie über BAG3 (Lamark and Johansen, 2012). Durch das UPS werden 80-90 % aller, insbesondere kleine, kurzlebige und ubiquitinierte Proteine abgebaut, welche zuvor in einen löslichen Zustand entfalten werden müssen (Benaroudj *et al.*, 2001; Navon and Goldberg, 2001; Lilienbaum, 2013). Die CMA dient dem selektiven Abbau löslicher, mit einer KFERQ-Sequenz markierten Proteine in Lysosomen (Arias and Cuervo, 2011; Kaushik and Cuervo, 2012). Proteinaggregate hingegen werden bevorzugt über den Weg der selektiven Autophagie (Aggrephagie) abgebaut (Lamark and Johansen, 2012; Khaminets, Behl and Dikic, 2016).

Das Auftreten der Aggregate an einem Ort innerhalb der Zellen könnte darauf hindeuten, dass es sich bei der aggregierten DNAJC13-DNAJ Mutante um eine Akkumulation des Proteins in einem Aggresom bzw. in einer Aggresom-ähnlichen Struktur handeln könnte. In der Literatur wird diskutiert, dass es sich bei der Bildung des Aggresoms um einen regulierten Schutzmechanismus der Zelle handelt, durch den toxisch-wirkende Proteinaggregate aus der Zelle entfernt werden (Arrasate *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004; Tyedmers, Mogk and Bukau, 2010). Aggresome bilden sich um das Mikrotubuli-Organisations-Zentrum durch die Akkumulation von Proteinaggregaten, welche durch Dynein entlang des Mikrotubuli-Netzwerks dorthin transportiert werden (Kopito, 2000). Dafür werden Proteinaggregate entweder durch Polyubiquitinierung oder über einen Ubiquitin-unabhängigen Mechanismus dem Aggresom zugeführt (Johnston, Ward, and Kopito 1998; Kawaguchi *et al.* 2003; Khaminets, Behl, and Dikic 2016). Interessanterweise enthüllte unsere Arbeitsgruppe einen *chaperon-based aggresome-targeting* Mechanismus, welcher auf der Wirkung von dem HSP70 Chaperon und seinem Co-Chaperon BAG3 beruht, Proteinaggregate zum Aggresom zu dirigieren (Gamerdinger *et al.*, 2011). BAG3 überträgt das an HSP70 gebundene, fehlgefaltete Proteinsubstrat direkt auf Dynein, welches somit auf das Aggresom gerichtet wird. Gamerdinger beschrieb außerdem, dass es sich bei dem Aggresom um einen Ort hoher autophagischer

Aktivität handelt, was durch ein vermehrtes Aufkommen an autophagischen Markern wie p62 und LC3 gekennzeichnet ist (Gamerding *et al.*, 2011).

Damit übereinstimmend konnte insbesondere nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung eine Kolokalisation der aggregierten DNAJC13-DNAJ Mutante mit LB3B sowie mit p62 (p62-Daten nicht gezeigt) detektiert werden. Der beobachtete Anstieg des autophagischen Flux nach Überexpression der DNAJ-Mutante unterstützt zusätzlich diese Hypothese. Die genannten Aspekte deuten demnach darauf hin, dass die aggregierte DNAJC13-DNAJ Mutante durch das HSP70 Co-Chaperon BAG3 zum Aggresom vermittelt werden könnte und dort der Autophagie unterliegt. Um diese Hypothese zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen wie Ko-Färbungen mit beispielsweise BAG3, HSP70, Ubiquitin und dem Aggresom-Marker Vimentin notwendig.

Die in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die QPD-Mutation innerhalb der DNAJ-Domäne die Konformation des DNAJC13 Proteins grundlegend beeinflusste. Es kam zu einer Destabilisierung und Aggregation des Proteins, was verdeutlichte, dass die Struktur des Proteins für seine Funktion essentiell ist. Die QPD-Mutation eignete sich somit nicht, den Einfluss der DNAJ-Domäne auf die Autophagie zu untersuchen.

### **4.2 DNAJC13 beeinflusst die Proteostase durch Regulation der Autophagie**

DNAJC13 beeinflusst die Autophagie positiv (Besemer *et al.*, in Begutachtung), jedoch ist der dieser Regulation zugrundeliegende Mechanismus weitestgehend ungeklärt. Um die Rolle von DNAJC13 innerhalb des autophagischen Prozesses im Detail zu verstehen, wurden zunächst Interaktionsstudien sowie Immunfluoreszenzfärbungen von DNAJC13 mit ATG8-Proteinen angefertigt und analysiert.

#### **4.2.1 DNAJC13 interagiert mit ATG8-Proteinen**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals mittels eines Peptid Arrays von DNAJC13 sowie mittels Interaktionsstudien gezeigt werden, dass DNAJC13 mit ATG8-Familienmitgliedern interagiert. Des Weiteren kolokalisiert es nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung partiell mit LC3B sowie mit GABARAP. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Hypothese

#### 4 DISKUSSION

aufgestellt werden, dass DNAJC13 mittels einer funktionellen, temporären Interaktion mit ATG8-Proteinen die Autophagie positiv beeinflussen könnte, indem es möglicherweise als Autophagie-Rezeptor oder Adaptor-Protein wirkt.

ATG8-Proteine wie LC3 und GABARAP sind von zentraler Bedeutung für die Bildung von Autophagosomen. Im Säuger existieren sechs ATG8-Homologe, welche alle essentieller Bestandteil der Autophagosomen sind und vermutlich unterschiedliche, aber auch überlappende Funktionen aufweisen (Shpilka *et al.*, 2011; Rogov *et al.*, 2017). Kovalent an die autophagosomale Membran konjugierte ATG8-Proteine dienen der Rekrutierung von Autophagie-Rezeptoren und Adaptor-Proteinen (Nakatogawa, Ichimura and Ohsumi, 2007; Weidberg *et al.*, 2011; Rogov *et al.*, 2017). Autophagie-Rezeptoren binden an die auf der Innenseite von heranreifenden Autophagosomen lokalisierten ATG8-Proteine und vermitteln selektiv die über das Lysosomen bestimmte Degradation von Substraten. Die Funktion der Interaktion von Adaptor-Proteinen mit ATG8-Proteinen auf der Außenseite von Autophagosomen ist vielfältig. Sie dient der Regulation der Bildung von Autophagosomen, dem Transport von Autophagosomen, der Fusion von Autophagosomen mit dem Lysosom und der Interaktion mit dem endosomalen Netzwerk (Pankiv and Johansen, 2010; Kraft *et al.*, 2012; Popovic *et al.*, 2012; McEwan *et al.*, 2015). Es ist bekannt, dass Adaptor-Proteine, welche stets auf der Außenseite wirken, selbst nicht Substrat der Autophagie sind. Dies ist damit zu erklären, dass ihre Interaktionspartner, also auf der äußeren autophagosomalen Membran lokalisierte ATG8-Proteine durch eine ATG4B-Protease wieder entfernt werden (Kabeya, 2004). Hingegen werden Autophagie-Rezeptoren wie beispielsweise p62 und NBR1, selbst autophagolysosomal degradiert (Bjørkøy *et al.*, 2005; Pankiv *et al.*, 2007; Kirkin *et al.*, 2009). Die Untersuchung des Einflusses von DNAJC13 auf den autophagischen Flux zeigte, dass nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung kein Anstieg sowohl des endogenen als auch des überexprimierten DNAJC13 Proteinlevels im Western-Blot zu beobachten war. Dieses Ergebnis stimmte mit Daten unserer Arbeitsgruppe überein (Besemer *et al.*, in Begutachtung). Würde DNAJC13 ein Substrat der Autophagie darstellen, wäre ein Anstieg des Proteinlevels nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung zu erwarten gewesen (Yamamoto *et al.*, 1998). Der fehlende Anstieg des DNAJC13-Proteinlevels lässt den Rückschluss zu, dass DNAJC13 selbst kein Substrat der Autophagie darstellt. Weiterführend könnten diese Daten darauf hindeuten, dass die Interaktion von DNAJC13 mit ATG8-Proteinen vermutlich auf der

Außenseite von heranreifenden und reifen Autophagosomen stattfindet und DNAJC13 als ein Adaptor-Protein im autophagischen Prozess wirken könnte.

### 4.2.2 DNAJC13 enthält vier LIR-Motive

Die Interaktion mit ATG8-Proteinen wird durch das LIR-Motiv innerhalb der Autophagie-Rezeptoren und Adaptor-Proteine vermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals mithilfe eines Peptid Arrays gezeigt werden, dass DNAJC13 vier LIR-Motive enthält, über die es mit ATG8 bzw. GABARAP interagiert. Die Kernsequenzen der vier, mittels des Peptid Arrays identifizierten LIR-Motive lauten: LIR1-FVDL, LIR2-YECL, LIR3-FSEI und LIR4-YEVL (**Abbildung 18**).

Das LIR-Motiv wurde ursprünglich in p62 von Pankiv und Kollegen entdeckt. Sie beobachteten eine 22 Aminosäuren lange Sequenz, welche für die Interaktion mit LC3A sowie LC3B verantwortlich ist (Pankiv *et al.*, 2007; Ichimura, Kominami, *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2008). Weiterführende Studien anderer Arbeitsgruppen identifizierten weitere LIR-Motiv-enthaltende Proteine und engten den zur Interaktion mit ATG8-Proteinen verantwortlichen Bereich auf das typisch lineare LIR-Motiv mit der Kernsequenz [WFY]XX[LIV] weiter ein (Mohrlüder *et al.*, 2007; Ichimura, Kumanomidou, *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2008; Alemu *et al.*, 2012). Basierend auf neuesten Insilico-Analyse-Verfahren, konnte die Definition des LIR-Motivs bzw. die LIR-Kernsequenz zu einem aus sechs Aminosäuren bestehenden xLIR-Motiv spezifiziert werden ([ADEFGLPRSK] [DEGMSTV] [WFY] [DEILOTV] [ADEFHIKLMPTV] [LIV]) (Jacomín and Al., 2016). Dabei wurden experimentell als funktional verifizierte LIR-Motive diverser Proteine berücksichtigt. Weitere Strukturanalysen entschlüsselten den Mechanismus der Interaktion eines LIR-Motivs mit ATG8-Proteinen (LIR:ATG8/LC3/GABARAP): Der jeweilige Seitenrest, der an Position eins bzw. drei vorkommenden aromatischen Aminosäure [WFY] sowie der an Position vier bzw. sechs vorkommenden konservierten hydrophoben Aminosäure [LIV], welche die LIR-Kernsequenz bilden, interagiert über eine nicht-kovalente Bindung mit jeweils einer hydrophoben Tasche, die durch eine Ubiquitin-ähnliche Struktur des ATG8-Proteins gebildet wird. Diese Interaktion wird außerdem durch die negative Ladung von sauren und phosphorylierten Aminosäuren [S/T/E/D] unterstützt, welche unmittelbar N-terminal der Kernsequenz lokalisiert sind (Ichimura, Kumanomidou, *et al.*, 2008; Wild *et al.*, 2011; Rogov *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013).

Die jeweilige Kernsequenz der innerhalb von DNAJC13 identifizierten LIR-Motive wurde gegen die iLIR-Datenbank (*iLIR Autophagy Database*: <https://ilir.warwick.ac.uk/>) abgeglichen. Die iLIR-Datenbank listet putative LIR-Motive eines beliebigen Proteins auf und ermöglicht somit einen Abgleich gegen die beispielsweise mittels eines Peptid Arrays identifizierten Aminosäuresequenzen. Dabei wird zwischen dem xLIR-Motiv und dem typisch linearen LIR-Motiv mit der Kernsequenz [WFY]XX[LIV], hier (von der iLIR-Datenbank) auch als WxxL-Motiv bezeichnet, unterschieden. xLIR steht für *extended LIR motif*, also die von dem WxxL-Motiv abgeleitete, zu sechs Aminosäuren erweiterte LIR-Kernsequenz (Jacomin and Al., 2016).

Der iLIR-Datenbank zufolge entspricht das erste LIR-Motiv von DNAJC13 (DNAJC13-LIR1) mit der Sequenz EGFVDL einem echten xLIR. Die Sequenzen des zweiten, dritten und vierten LIR-Motives von DNAJC13 (DNAJC13-LIR2, -LIR3 und -LIR4) entsprechen jeweils dem WxxL-typischen LIR-Motiv. Das bedeutet, dass aufgrund dieser Sequenzübereinstimmung insbesondere das erste LIR-Motiv bezüglich seiner Funktion innerhalb des autophagischen Prozesses von Bedeutung sein könnte.

### 4.2.3 Charakterisierung der vier LIR-Motive innerhalb von DNAJC13

DNAJC13 stellt einen positiven Modulator der Autophagie dar (Besemer *et al.*, in Begutachtung) und kolokalisiert partiell mit GABARAP und LC3B nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung. Ebenso konnte eine Interaktion von DNAJC13 mit dem ATG8-GABARAP beobachtet werden. Ein Peptid Array von DNAJC13 mit dem ATG8-Protein GABARAP ergab, dass diese Interaktion mittels vier LIR-Motive in DNAJC13 vermittelt wird. Um die Funktionalität der vier LIR-Motive genauer zu untersuchen und dadurch einen Einblick in einen möglichen Mechanismus zu erlangen, wurden in der vorliegenden Dissertation zunächst vier verschiedene DNAJC13-LIR-Motiv Mutanten, durch Punktmutationen der beiden randständigen, aromatischen Aminosäuren der Kernsequenz, generiert (**Abbildung 21**) und diese bezüglich deren Einfluss auf die Autophagie untersucht.

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass entsprechende Punktmutationen innerhalb der LIR-Motiv-tragenden Proteine zu einer Störung der Interaktion zu ATG8-Proteinen und folglich zu einer Reduktion des autophagischen Flux führten (Behrends *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Die Analyse des autophagischen Flux aller vier generierten

#### 4 DISKUSSION

DNAJC13-LIR Mutanten zeigte, dass ihre Überexpression in HEK293T-Zellen stets zu einer gesteigerten Autophagie führte. Würde der positive Einfluss von DNAJC13 auf die Autophagie über ausschließlich eines der vier LIR-Motive vermittelt werden, wäre vermutlich keine Steigerung stattdessen eine Minderung des autophagischen Flux bei einem der mutanten DNAJC13 Proteine zu erwarten gewesen. Möglicherweise könnte eine gegenseitige Kompensation der vier DNAJC13-LIR-Motive untereinander eine Erklärung für den Anstieg des autophagischen Flux sein.

Das Rab GTPase-aktivierende Protein TBC1D5 beispielsweise enthält zwei LIR-Motive, das TBC1D5-LIR1-Motiv und das TBC1D5-LIR2-Motiv (Popovic *et al.*, 2012). Popovic und Kollegen konnten zeigen, dass während basal ablaufender Autophagie TBC1D5 an endosomalen Strukturen lokalisiert vorliegt und über sein LIR1-Motiv an die Retromer-Komponente VPS29 bindet. TBC1D5 übt eine Funktion beim Retromer-vermittelten retrograden Transport von physiologisch wichtigen Membranproteinen wie beispielsweise dem CI (*Cation-independent*)-M6PR aus (Harbour *et al.*, 2010; Popovic *et al.*, 2012). Bei Nährstoffmangel-induzierter Autophagie hingegen findet eine Lokalisationsänderung von TBC1D5 von endosomalen Strukturen hin zu autophagosomalen Strukturen statt. TBC1D5 bindet zunächst über sein LIR2-Motiv an ATG8 wodurch es weiter zur autophagosomalen Membran rekrutiert wird, bis es schließlich auch mit seinem LIR1-Motiv an ATG8-Familienmitglieder bindet. Popovic und Kollegen argumentierten, dass TBC1D5 als molekularer Schalter zwischen endosomalem und autophagosomalem Transport agieren könnte und letztendlich an der Reprogrammierung von Vesikeltransporten nach Autophagie-Induktion beteiligt ist. Die überlappende Bindung von Retromer- und ATG8-Proteinen an das TBC1D5-LIR1 könnte Grundlage für die TBC1D5-Translokation von Endosomen zu Autophagosomen bei Induktion der Autophagie sein (Popovic *et al.*, 2012). Aufschluss über eine mögliche Kompensation der vier DNAJC13-LIR-Motive untereinander bzw. eine Beteiligung mehrerer DNAJC13-LIR-Motive könnte die Untersuchung des Einflusses von Doppel- und Dreifach-LIR-Motiv Mutanten auf die Autophagie erbringen.

Die Immunfluoreszenzanalysen in HEK293A-Zellen verdeutlichten, dass die subzelluläre Verteilung aller vier LIR Mutanten gegenüber dem wildtypischen DNAJC13 Protein verändert war. Insbesondere die zwei Punktmutationen [F159A] und [L162A] innerhalb des xLIR LIR1-Motivs von DNAJC13 führten zu einem vom Wildtyp abweichenden Bild. Die DNAJC13-LIR1 Mutante lag stets homogen im Zytosol der Zellen verteilt vor.

## 4 DISKUSSION

Wildtypisches DNAJC13 hingegen zeigt eine distinkte Punktierung und liegt innerhalb von Zellen Membran-gebunden vor (Fujibayashi *et al.*, 2008; Xhabija *et al.*, 2011). Aufgrund dieser veränderten, homogenen Verteilung der DNAJC13-LIR1 Mutante lässt sich mutmaßen, dass die Bindung an membranösen Strukturen gestört war und das Protein gelöst in der Zelle vorlag.

Diese Hypothese wird durch Studien von Fujibayashi und Kollegen unterstützt. Sie konnten zeigen, dass eine DNAJC13- $\Delta$ N Mutante, der die ersten 453 Aminosäuren fehlte, diffus im Zytoplasma von COS-1-Zellen verteilt vorlag, da die Fähigkeit, an Membranen zu binden, aufgehoben war (Fujibayashi *et al.*, 2008). DNAJC13 besitzt N-terminal (Aminosäure 17-26) eine PI-Domäne, über die es an PIs, insbesondere an PI3P und PI(3,5)P2, bindet (Xhabija *et al.*, 2011). Fraglich ist demnach, ob die LIR1-Mutation womöglich die Funktionalität der N-terminal gelegenen PI-Domäne beeinflusst. Die Mutation innerhalb des LIR1-Motivs von DNAJC13 könnte Ursache für eine Konformationsänderung innerhalb des N-terminalen Bereichs von DNAJC13 sein. Diese mutationsbedingte Änderung der Konformation könnte ebenso zu einer Änderung oder zu einem Verlust der Funktionalität der PI-Domäne geführt haben, sodass die Bindung an Membranen über PIs reduziert oder aufgehoben war und die DNAJC13-LIR1 Mutante gelöst im Zytosol der Zelle verteilt vorlag. Darüber hinaus wurde nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung von allen DNAJC13 Mutanten eine partielle Kolokalisation mit den ATG8-Proteinen LC3B und GABARAP beobachtet. Dies könnte ein weiterer Hinweis sein, dass die Funktionalität eines der LIR-Motive eventuell durch ein oder mehrere der anderen drei LIRs kompensiert bzw. übernommen wurde.

Die Immunfluoreszenzanalysen der DNAJC13-LIR2, -LIR3 und -LIR4 Mutanten zeigte, dass diese mutanten Proteine eine Neigung zur Aggregation aufwiesen. In allen das DNAJC13-LIR4 Konstrukt überexprimierenden HEK293A-Zellen wurden DNAJC13-LIR4-Aggregate detektiert. Die Akkumulation in Zellkernnähe sowie die Kolokalisation mit LC3B und p62 können darauf hindeuten, dass es sich, wie bei der DNAJC13-DNAJ Mutante, um eine Aggresom-ähnliche Struktur handelt. Aufgrund der konstant auftretenden Aggregation des DNAJC13-LIR4 Proteins liegt die Vermutung nahe, dass die Aggregation in erster Linie durch die Punktmutationen hervorgerufen wurde. Demgegenüber lagen die DNAJC13-LIR2 und -LIR3 Mutanten in einigen Zellen aggregiert und in anderen Zellen punktiert, ähnlich dem wildtypischen Protein, vor. Diese unterschiedliche Verteilung deutet auf eine Dosis-Abhängigkeit der Aggregation hin. In den Zellen, in denen die



## 4 DISKUSSION

DNAJC13-LIR2 und -LIR3 mutanten Proteine normal verteilt vorlagen, wurden diese hinsichtlich ihrer Ko-Lokalisation mit der Retromer-Komponente VPS35 sowie dem ATG9-Membranprotein untersucht.

ATG9 ist von allen bisher bekannten ATG-Proteinen das einzig bekannte Transmembranprotein und essentielle Komponente der autophagosomalen Biogenese (Orsi *et al.*, 2012; Reggiori and Tooze, 2012; Yamamoto *et al.*, 2012). Unter basalen Bedingungen ist ATG9 an endosomalen Kompartimenten wie dem TGN, dem späten und dem Recycling-Endosom lokalisiert (Orsi *et al.*, 2012). Nach Induktion der Autophagie pendelt ATG9 zwischen dem TGN, dem Endosom und der Phagophore (Young, 2006). Eine neuere Studie von Popovic und Dikic zeigte, dass der ATG9-Transport nach Induktion der Autophagie u.a. durch TBC1D5 reguliert wird (Popovic and Dikic, 2014). DNAJC13 nimmt eine essentielle Rolle innerhalb der endosomalen Proteinsortierung, der Ausbildung von endosomalen Ausstülpungen sowie dem retrograden Transport vom Endosom zum TGN ein (Girard *et al.*, 2005; Fujibayashi *et al.*, 2008; Girard and McPherson, 2008; Popoff *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009; Freeman, Hesketh and Seaman, 2014). Durch unsere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass DNAJC13 partiell mit ATG9 kolokalisiert sowie die intrazelluläre Lokalisation von ATG9 am späten und Recycling-Endosom sowie an LC3-positiven Strukturen beeinflusst (Besemer *et al.*, in Begutachtung). Die Immunfluoreszenzanalysen der vier DNAJC13-LIR Mutanten und ATG9 zeigten, dass die LIR2, LIR3 und LIR4 Mutanten genau wie wildtypisches DNAJC13 mit ATG9 partiell kolokalisieren. Eine Ausnahme bildete die LIR1 Mutante. Da sie homogen im Zytoplasma der Zelle verteilt vorliegt, war eine Aussage bezüglich einer Kolokalisation mit ATG9 nicht möglich. Jedoch war die punktierte Verteilung von ATG9 innerhalb transfizierter Zellen durch die veränderte Lokalisation der LIR1 Mutante nicht beeinflusst. Lagen die Mutanten Proteine allerdings aggregiert vor, kolokalisierten diese stets mit ATG9, was auf eine Umverteilung des ATG9 Proteins hindeutet (**Abbildung 26**; weitere Daten von DNAJC13-LIR2, -LIR3 und -LIR4 Aggregaten nicht gezeigt). Grundlegend wären an dieser Stelle quantitative Kolokalisationsstudien sowie biochemische Analysen hinsichtlich einer Interaktion von DNAJC13 mit ATG9 hilfreich, um einen tieferen Einblick bezüglich des Einflusses von DNAJC13 und den mutanten Formen auf ATG9 und dessen Verteilung zu erhalten.

Analoge Ergebnisse wurden für die Analyse aller vier DNAJC13-LIR Mutanten mit VPS35 beobachtet. Wie das wildtypische Protein kolokalisierten die DNAJC13-LIR2, -LIR3 und -

LIR4 mutanten Proteine partiell mit VPS35. Auffällig war auch hier, dass ebenso die aggregierten Formen der Mutanten VPS35 mit in das Aggregat hineinzogen (**Abbildung 26**; weitere Daten von DNAJC13-LIR2, -LIR3 und -LIR4 Aggregaten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass deren Aggregation zu einer Umverteilung von VPS35 führte.

### 4.2.4 Das DNAJC13-LIR4-Motiv

Das Hauptaugenmerk bezüglich der Analyse der Funktionalität eines DNAJC13-LIR-Motivs lag auf LIR4. Dafür gab es zwei entscheidende Hinweise. Die PONDR Analyse von DNAJC13 deutete darauf hin, dass das LIR4-Motiv in einem „ungeordneten Bereich“ vorkommt. Popelka und Klionsky beobachteten, dass ein LIR-Motiv innerhalb eines Proteins dann funktionell sein könnte, wenn es in einem intrinsisch „ungeordneten Bereich“ eines Proteins lokalisiert ist (Popelka and Klionsky, 2015a). Das bedeutet, dass nur jene LIR-Motive, welche nicht innerhalb einer Tertiärstruktur eines Proteins eingebettet vorkommen, eine Funktionalität bezüglich der ATG8-Interaktion aufweisen. Des Weiteren wies das LIR4-Motiv von DNAJC13 eine 100 %ige Homologie gegenüber dem LIR-Motiv des mitochondrialen Transmembranproteins FUNDC1 auf. Zusätzlich zeigten auch die umliegenden Aminosäuren der beiden LIR-Motiv-tragenden Proteine eine hohe Homologie zueinander. Interessanterweise wurden von Liu und Kollegen bereits Versuche bezüglich des Proteins FUNDC1 durchgeführt, das an der äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert ist. Ihre Untersuchungen zeigten, dass FUNDC1 ein Autophagie-Rezeptor für Hypoxie-induzierte Mitophagie darstellt. FUNDC1 bindet zum einen zum Abbau via Mitophagie bestimmte Mitochondrien, zum anderen bindet es gleichzeitig ATG8-Proteine, die an heranreifenden Autophagosomen lokalisiert sind (Liu *et al.*, 2012). Die Interaktion von FUNDC1 mit ATG8 wird durch das in FUNDC1 enthaltene LIR-Motiv [YEVV] vermittelt. Die zwei Punktmutationen [Y18A] und [L21A] innerhalb des LIR-Motivs führten zu einer Verminderung der Interaktion von FUNDC1 zu den ATG8-Proteinen LC3B und GABARAP. Folglich war die Induktion des autophagischen Flux reduziert (Liu *et al.*, 2012).

Die Immunfluoreszenzanalysen der DNAJC13-LIR4 Mutante deuteten allerdings konstant darauf hin, dass die Mutation innerhalb des LIR4-Motivs die Konformation von DNAJC13 störte, da das mutierte Protein aggregierte. Auch sei an dieser Stelle noch einmal zu

erwähnen, dass die Kernsequenz des vierten LIR-Motivs innerhalb der zentralen DNAJ-Domäne liegt. Erstaunlicherweise führte, unabhängig der Mutation (also LIR4-Motiv oder DNAJ-QPD-Sequenz), eine veränderte Aminosäuresequenz innerhalb der evolutionär konservierten DNAJ-Domäne zur Aggregation der Proteine. Diese Beobachtung der Aggregation der DNAJC13-LIR4 Mutante konnte anhand einer differentiellen Fraktionierung bestätigt werden. Die Mutation innerhalb des vierten LIR-Motivs von DNAJC13 eignete sich demnach nicht, das LIR4-Motiv auf seine Funktionalität innerhalb des autophagischen Prozesses zu untersuchen. Um dennoch eine detaillierte Analyse auf eine mögliche Funktionalität des LIR4-Motivs durchzuführen, wurden entsprechend verschieden mutierte und trunkierte DNAJC13 Konstrukte generiert.

### 4.2.5 Charakterisierung der verschieden mutierten und trunkierten

#### DNAJC13-LIR4 Konstrukte

Zur detaillierteren Untersuchung des vierten LIR-Motivs wurde sowohl ein wildtypisches als auch ein LIR4-Motiv-mutiertes, N- und C-terminal trunkiertes DNAJC13 Konstrukt sowie ein DNAJC13- $\Delta$ LIR4 Deletionskonstrukt generiert.

Die mit dem DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C und dem DNAJC13- $\Delta$ N-LIR4- $\Delta$ C Konstrukt angefertigten Immunfluoreszenzen zeigten ein, mit in dieser Dissertation bereits gewonnenen Daten, interessantes Ergebnis. Das DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C Protein verhielt sich analog zu der DNAJC13-LIR1 Mutante; es lag homogen in den HEK293A-Zellen verteilt vor. Wie bereits oben vermutet und diskutiert wurde, könnte die Mutation innerhalb des LIR1-Motivs einen Einfluss auf die Funktionalität der PI-Domäne ausüben. Dem DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C Protein fehlte die PI-Domäne, wodurch die Bindung an Membranen über PIs unterbunden wurde (Fujibayashi *et al.*, 2008). Hingegen zeigten die mikroskopischen Aufnahmen der trunkierten DNAJC13- $\Delta$ N-LIR4- $\Delta$ C Mutante, dass die Mutation innerhalb des vierten LIR-Motivs konstant zu einer Aggregation des Proteins führte. Diese beobachtete Aggregation der trunkierten Mutante stimmte mit der beobachteten Aggregation der DNAJC13-LIR4 Mutante überein.

Ebenso sehr interessant ist, dass Liu und Kollegen, neben den Analysen mit der FUNDC1-LIR-[Y18A]-[L21A] Mutante, weitere Analysen mit einer FUNDC1- $\Delta$ LIR Deletionsmutante durchgeführt haben. Sie konnten zeigen, dass die Deletion des

## 4 DISKUSSION

FUNDC1-LIR-Motivs zu einem vollständigen Verlust der Interaktion von FUNDC1 zu LC3B führte. Die Induktion der Mitophagie durch das wildtypische FUNDC1 Protein war bei Überexpression des FUNDC1- $\Delta$ LIR Deletionskonstrukts in HeLa-Zellen vollständig aufgehoben (Liu *et al.*, 2012). Ihrer Analyse zufolge schien die FUNDC1- $\Delta$ LIR Deletionsmutante nicht zu aggregieren. Im Gegensatz dazu, aggregierte die DNAJC13- $\Delta$ LIR4 Deletionsmutante und eignete sich damit nicht zur detaillierteren Untersuchung hinsichtlich ihrer Funktion innerhalb des autophagischen Prozesses.

Schließlich sollte sowohl eine DNAJC13 Dreifachmutante, die *Triple* LIR Mutante (TM), mit einem mutierten LIR1-, LIR2- und LIR3-Motiv als auch C-terminal trunkeierte DNAJC13 Versionen (TV) ohne mutierte Bereiche helfen, die Funktionalität des vierten LIR-Motivs zu untersuchen. Dazu wurden drei verschiedene DNAJC13-TV Konstrukte generiert, denen der gesamte C-terminale Bereich einschließlich des vierten LIR-Motivs (DNAJC13-TV1), der gesamte C-terminale Bereich ausschließlich des vierten LIR-Motivs (DNAJC13-TV2) und der gesamte C-terminale Bereich bis zur DNAJ-Domäne (DNAJC13-TV3) fehlten (**Abbildung 29**). Durch die Generierung des DNAJC13-TV3 Konstrukts sollte gewährleistet sein, dass womöglich ein Einfluss der DNAJ-Domäne auf die Funktionalität des vierten DNAJC13-LIR-Motivs detektiert werden könnte.

Zunächst wurden auch diese Konstrukte nach Überexpression in HEK293A-Zellen hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens untersucht. Erstaunlicherweise zeigte die Immunfluoreszenzanalyse des DNAJC13-TM Proteins, dass dieses nicht aggregiert, sondern, sowohl wie DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C als auch DNAJC13-LIR1, homogen im Zytosol der Zellen verteilt vorlag. Diese Beobachtung verdeutlichte erneut, dass die Mutation innerhalb des LIR1-Motivs vermutlich einen Einfluss auf die PI-Domäne und somit auf die Bindung an Membranen ausübt. Die Mutation innerhalb des LIR1-Motivs wies offensichtlich einen dominanten Effekt auf die Verteilung des Proteins gegenüber den Mutationen innerhalb des zweiten und dritten LIR-Motivs auf.

Bezüglich der drei C-terminal trunkeierten DNAJC13 Proteine lässt sich anhand der Immunfluoreszenzen auch an dieser Stelle vermuten, dass deren Verteilung, von normal punktiert bis aggregiert, auf einem Dosis-Effekt der Überexpression beruht. Eine differentielle Fraktionierung entsprechender HEK293T-Zellysate bestätigte auch hier, dass alle drei DNAJC13-TV Proteine aggregiert vorlagen. Entsprechend wurden möglichst nur innerhalb von HEK293A-Zellen überexprimierte DNAJC13-TV Proteine analysiert, die wie der Wildtyp eine distinkte Punktierung zeigten.

#### 4 DISKUSSION

In der Literatur bereits beschrieben, interagiert DNAJC13 mit dem Retromer-Komplex über dessen Komponente SNX1 (Popoff *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009). Grundlegend sind SNX-Proteine für die Bildung tubulärer Strukturen an den Endosomen verantwortlich und unterstützen dadurch die effiziente Sortierung von Molekülen (Carlton *et al.*, 2004; Van Weering *et al.*, 2012). Von Shi und Kollegen wurden bereits Untersuchungen mit verschiedenen N- und C-terminal trunkierten RME-8 Proteinen in *C. elegans* hinsichtlich einer physikalischen Interaktion mit der Retromer-Komponente SNX1 durchgeführt. Ihnen gelang es den für die Interaktion mit SNX1 verantwortlichen Bereich innerhalb von RME-8 auf die Aminosäuren 1388-1950, d.h. auf die orthologe Region der Aminosäuren 1331-1893 im humanen DNAJC13 Protein, einzuengen (Shi *et al.*, 2009). Entsprechend wurden die DNAJC13-TV Proteine im Hinblick auf eine Kollokalisierung mit SNX1 mikroskopisch analysiert. Interessanterweise konnte für alle DNAJC13-TV Proteine eine partielle Kollokalisierung mit der Retromer-Komponente SNX1 gezeigt werden. Das DNAJC13-TV1 Protein umfasst die Aminosäuren 1-1300 und das TV2 Protein die Aminosäuren von 1-1314. Demnach wäre für diese beiden Proteine keine Kollokalisierung mit SNX1 zu erwarten gewesen. Das DNAJC13-TV3 Protein ist 1423 Aminosäuren lang, was bedeutet, dass ein Überlapp von 92 Aminosäuren für eine Kollokalisierung von DNAJC13 mit SNX1 ausreichen könnte. Diese Ergebnisse würden den durch Shi und Kollegen auf das humane Protein bezogenen definierten Bereich der verantwortlichen Aminosäuren (1331-1893) innerhalb von DNAJC13 zur Interaktion mit SNX1 einengen. Allerdings scheint diese Aussage jedoch zu generalisierend. Xhabija und Kollegen führten Kollokalisationsstudien mit einer, den SNX1-Bindebereich fehlenden, DNAJC13- $\Delta$ 1165 Deletionsmutante und SNX1 durch. Ihre Analysen zeigten, dass genau wie in dieser Dissertation beobachtet, stets eine, dem Wildtyp gegenüber verminderte Kollokalisierung von DNAJC13- $\Delta$ 1165 und SNX1 vorlag. Weitere Depletionsversuche verrieten, dass für eine räumliche Nähe an endosomalen Strukturen keine direkte Interaktion der beiden Proteine erforderlich ist (Xhabija and Vacratsis, 2015). Demnach sei die hier beobachtete Kollokalisierung damit zu erklären, dass DNAJC13 mittels seiner PI-Domäne und SNX1 mittels seiner BAR- sowie seiner charakteristischen PX- Domäne an PI3P endosomaler Strukturen gebunden vorlag. Ein weiterer interessanter Datenpunkt ist, dass wenn die DNAJC13 Mutanten aggregiert vorlagen, deren Aggregation scheinbar zu einer Umverteilung der SNX1 Proteine führte, da diese stets mit SNX1 kollokaliserten (**Abbildung 31**; weitere Daten von DNAJC13-TV Aggregaten nicht gezeigt).

## 4 DISKUSSION

Des Weiteren wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von den Mutanten mit den ATG8-Proteinen analysiert. Das DNAJC13-TM Protein war stets homogen im Zytosol von HEK293A-Zellen verteilt, entsprechend konnte keine Kolokalisation mit LC3B oder GABARAP detektiert werden. Dies könnte allerdings auch damit zu erklären sein, dass unter basalen Bedingungen generell wenige autophagosomale Proteine angereichert vorliegen. Jedoch konnte auch nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung keine Kolokalisation von DNAJC13-TM und LC3B oder GABARAP detektiert werden. Hingegen kolokalisierten interessanterweise alle trunkierten DNAJC13-TV Proteine unter basalen Bedingungen und insbesondere nach BafA<sub>1</sub>-Behandlung partiell mit beiden ATG8-Mitgliedern. Allerdings wäre keine Kolokalisation des DNAJC13-TV1 Proteins mit LC3B oder GABARAP zu erwarten gewesen, wenn davon ausgegangen werden könnte, dass das vierte LIR-Motiv innerhalb von DNAJC13 alleinig funktional ist. Das DNAJC13-TV3 Protein kolokalisierte partiell stärker mit LC3B und GABARAP als das DNAJC13-TV2 und -TV1 Protein. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Funktionalität des DNAJC13-LIR4-Motivs durch eine funktionale DNAJ-Domäne verbessert wäre.

Diese Kolokalisationsstudien lieferten weitere Hinweise, dass der positive Einfluss von DNAJC13 auf die Autophagie möglicherweise alleinig in der Funktion des LIR4-Motivs liegen könnte. Diese Aussage muss allerdings unter Vorbehalt gemacht werden, denn auch die biochemischen Analysen hinsichtlich des Einflusses der DNAJC13-TV Mutanten auf den autophagischen Flux und somit die Aussagen über die Funktionalität des vierten LIR-Motivs konnten diesen Hinweis nicht weiter bekräftigen. Sowohl sei die Dosis-Abhängigkeit der Überexpression und die daraus resultierende unterschiedliche Verteilung (normal punktiert bis aggregiert) als auch der unterschiedliche Zelltyp (HEK293A und HEK293T) zu berücksichtigen. Die Flux-Analysen wurden stets in HEK293T-Zellen durchgeführt, da diese die Konstrukte wesentlich besser als die HEK293A-Zellen aufnahmen und exprimierten. Wie durch die differentielle Fraktionierung bestätigt, lagen die mutanten Proteine insbesondere in den HEK293T-Zellen aggregiert vor, weshalb ein Anstieg des autophagischen Flux zu erwarten war. Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass die Analyse des Fluxes nach Überexpression der DNAJC13-TV Mutanten aufgrund deren Aggregation nicht deren wahren Einfluss auf die Autophagie widerspiegelte.

Ebenso war es sehr gewagt, anhand der biochemischen Untersuchung des DNAJC13-TM Proteins und dessen Einfluss auf die Autophagie eine Bekräftigung unserer Hypothese

anzunehmen. Seine Überexpression führte zwar, genau wie die des Wildtyps, zu einem gesteigerten autophagischen Flux, was darauf hindeuten würde, dass alleinig das LIR4-Motiv für diese Steigerung ausreicht bzw. verantwortlich ist. Jedoch muss diese Aussage mit großer Vorsicht betrachtet werden, da, wie bereits oben erwähnt, das mutierte LIR1-Motiv einen dominanten Effekt auf das gesamte Protein und dessen Stabilität hinsichtlich seiner Lokalisation in der Zelle ausübte.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Dissertation gezeigt, dass keine der generierten DNAJC13-Varianten zu einer konstruktiven Aussage bezüglich der Funktionalität der vier LIR-Motive führen konnten. Stattdessen offenbarten die verschiedenen Mutationen innerhalb des DNAJC13 Moleküls eine enorme Sensibilität hinsichtlich seiner Konformation und somit seiner Verteilung innerhalb der Zelle.

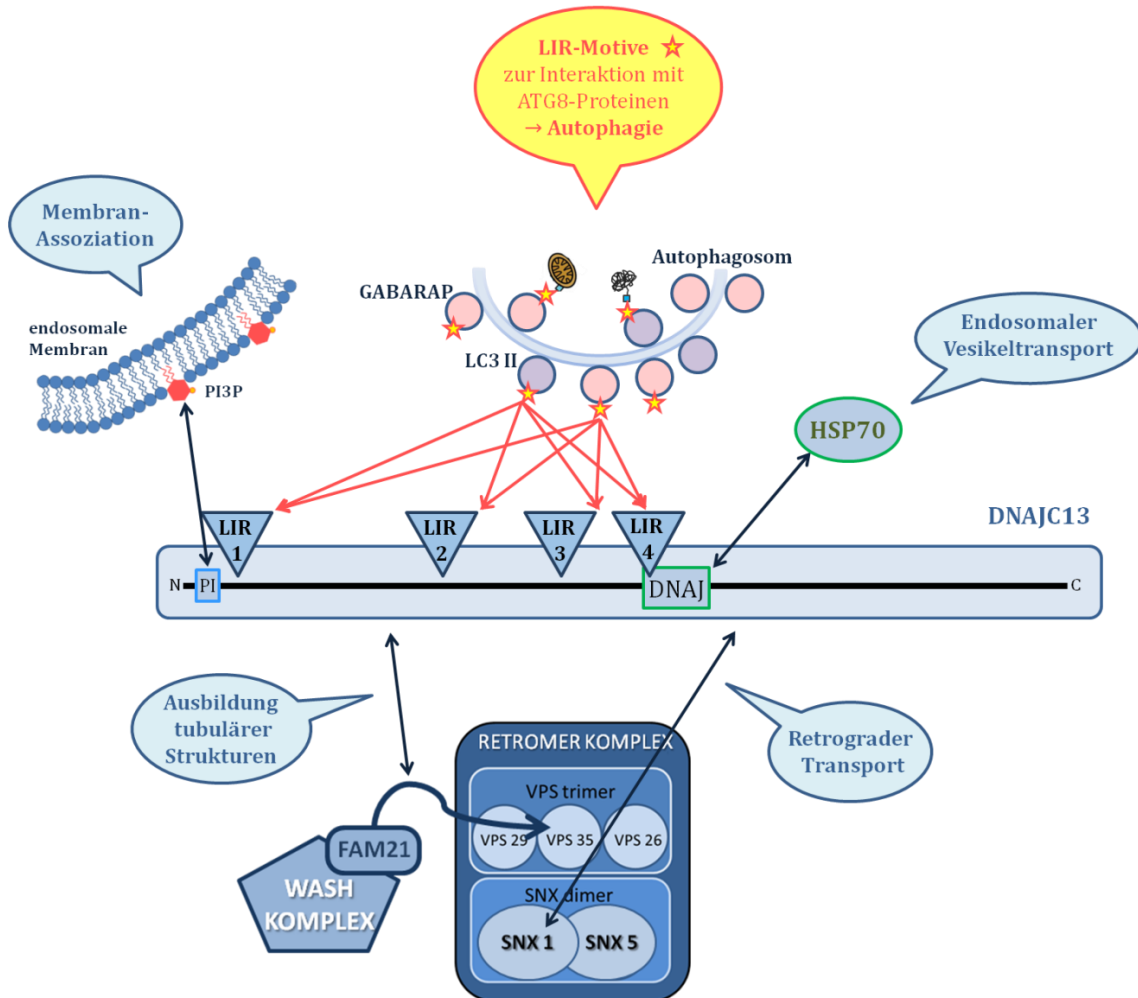
### 4.2.6 Die Konformation des multifunktionalen Proteins DNAJC13

Für das hoch konservierte DNAJC13 Protein wurden bereits eine Reihe von funktionellen Domänen und damit einhergehend eine Reihe von Interaktionspartnern verschiedener Funktionen beschrieben, weshalb hier von einem facettenreichen und multifunktionalen Protein gesprochen werden kann (**Abbildung 35**). Die zentral gelegene DNAJ-Domäne ist für die Interaktion und somit für die Regulation der Aktivität des Chaperons HSP70 verantwortlich. Dadurch nimmt DNAJC13 eine wichtige Funktion innerhalb des endosomalen Vesikeltransports ein (Chang, Hull and Mellman, 2004; Girard *et al.*, 2005). Außerdem trägt es eine N-terminal gelegene PI-Domäne, worüber es mit membranösen Strukturen interagiert (Fujibayashi *et al.*, 2008; Xhabija and Vacratsis, 2015). Des Weiteren ist DNAJC13 mit dem Retromer-Komplex assoziiert und übernimmt eine entscheidende Rolle innerhalb des retrograden Transports von Rezeptoren wie die des M6PRs oder des EGFRs (Girard *et al.*, 2005; Girard and McPherson, 2008; Popoff *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009).

In dieser Dissertation wurden erstmals vier LIR-Motive (LIR1, LIR2, LIR3 und LIR4) innerhalb des DNAJC13 Proteins identifiziert und in Ansätzen deren Funktion im Autophagie-Prozess untersucht. Die Expression der verschiedenen DNAJC13 Mutanten führte zu Veränderungen des Aggregationszustands der mutierten Proteine in der Zelle. Die Proteinaggregation steht im Zusammenhang mit fehlgefalteten Proteinen und

## 4 DISKUSSION

pathologischen Erscheinungsformen wie beispielsweise der PD. Daher ist die Identifikation neuer Modulatoren der Abbauprozesse von großer Wichtigkeit.



**Abbildung 35: Überblick über das multifunktionale DNAJC13 Protein.** DNAJC13 ist ein positiver Modulator der **Autophagie**. Es enthält vier LIR-Motive über die es potentiell mit ATG8-Familienmitgliedern (LC3 und GABARAP) interagieren kann. Eine N-terminale gelegene PI-Bindedomäne dient der Assoziation mit Phosphatidylinositolen (z.B.: PI3P) und daher der **Membran-Assoziation**. DNAJC13 interagiert mit seinem N-Terminus mit dem FAM21-Schweif, einer Komponente des WASH-Komplexes und reguliert die **Ausbildung tubulärer Strukturen**. Über seinen SNX1-Bindebereich interagiert DNAJC13 mit dem SNX-Dimer des Retromer-Komplexes und reguliert den **retrograden Transport** wichtiger Rezeptoren (z.B.: M6PR, EGFR). Die DNAJ-Bindedomäne dient der Interaktion und dadurch der Regulation der ATPase-Aktivität von HSP70 und hat daher eine Funktion im **endosomalen Vesikeltransport**.

Jedes Protein faltet sich nach bzw. auch schon während seiner Synthese in seine native, dreidimensionale Konformation (Dobson and Karplus, 1999; Dobson, 2003). Insbesondere große Proteine sind dabei auf die Hilfe molekularer Chaperone angewiesen, um schließlich ihre dreidimensionale und somit spezifische, funktionelle Konformation einzunehmen und biologisch aktiv zu sein. In seltenen Fällen erfolgt die Faltung sehr



#### 4 DISKUSSION

kleiner Proteine autonom und wird durch einen sogenannten hydrophoben Effekt angetrieben, der die Abkehr hydrophober Seitenketten vom wässrigen Milieu ins Innere des mehrdimensional gefalteten Proteins beschreibt (Hartl, Bracher and Hayer-Hartl, 2011). Extrinsische Faktoren wie oxidativer Stress oder ein ungünstiger pH-Wert, aber auch intrinsische Faktoren wie Mutationen innerhalb der Aminosäuresequenz können zu einer anormalen Faltung und zur Destabilisierung von Proteinen führen (Tyedmers, Mogk and Bukau, 2010). Ein Merkmal für die Bildung und Struktur von Proteinaggregaten sind insbesondere bei Faltungsintermediaten auftretende exponierte hydrophobe Bereiche. Diese können sowohl untereinander als auch mit exponierten hydrophoben Bereichen anderer Proteine intramolekulare Wechselwirkungen eingehen, was darüber hinaus zu weitreichenden Schäden der Zelle führen kann. Grundlegend kann die Aggregation zur Bildung von Einschlusskörpern, Amyloidfibrillen sowie Faltungsaggregaten führen (Fink, 1998). Einschlusskörper bilden sich häufig, wenn Proteine überexprimiert werden. Eine starke Überexpression kann zur Folge haben, dass ein Zellsystem kollabiert und somit die normale Faltung der Proteine nicht mehr gewährleisten werden kann. Des Weiteren finden sich Einschlusskörper und verwandte unlösliche nicht-geordnete Proteinaggregate auch bei bestimmten neurodegenerativen Krankheiten wieder, wie beispielsweise der ALS, der PD oder der AD. Proteinaggregate stellen demnach ein pathologisches Merkmal von neurologischen Krankheitsbildern dar und können die Proteinhomöostase stark herausfordern (Soto, 2003; Ross and Poirier, 2004).

Die eingefügten Punktmutationen innerhalb der vier DNAJC13-LIR-Motive resultierten in einer gegenüber dem Wildtyp veränderten homogenen Verteilung (DNAJC13-LIR1 und -TM) oder Aggregation (DNAJC13-LIR4,  $-\Delta$ LIR4 sowie -DNAJ) der verschiedenen Mutanten. Daraus lassen sich Schlussfolgerungen über die Proteinstabilität von DNAJC13 ziehen. Offensichtlich übt die veränderte Aminosäuresequenz jeder einzelnen Mutante einen Einfluss auf die Konformation des DNAJC13 Proteins aus. Jedoch ist hier eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Mutanten notwendig.

Die Aggregation der DNAJC13-LIR2, -LIR3, -TV1, -TV2 und -TV3 Mutanten ist vermutlich auf einen Dosis-Effekt zurückzuführen. Die transienten Transfektionen führten zu sehr starken Überexpressionen der Mutanten innerhalb der einzelnen Zellen, was schließlich deren Aggregation bedingte.

Die DNAJC13-LIR4,  $-\Delta$ LIR4 sowie -DNAJ Proteine aggregierten jedoch konstant. Das bedeutet, dass die entsprechend eingefügten Punktmutationen oder die Deletion

## 4 DISKUSSION

maßgeblich die Konformation des jeweiligen DNAJC13 Proteins beeinflussten. Die DNAJ-Domäne sowie das darin eingebettete LIR4-Motiv sind offensichtlich von enormer Bedeutung hinsichtlich der Stabilität des Proteins.

Die DNAJC13-LIR1 und -TM Proteine hingegen wiesen stets eine homogene Verteilung durch das Zytosol der Zellen auf. Wie bereits oben diskutiert, könnte dieses Phänomen im Zusammenhang mit einer Beeinflussung der PI-Domäne stehen, sodass die Assoziation mit Membranen eventuell gestört war. Interessant ist allerdings auch, dass die Möglichkeit über die SNX1-Bindestelle mit Membranen zu assoziieren scheinbar auch gestört war. Ein denkbarer Versuchsansatz um dies genauer zu untersuchen könnte eine Lebendzellextraktion sein. Zytosolische Komponenten lassen sich mit milden Detergenzien wie Saponin oder Digitonin extrahieren, sodass möglichst membranöse Strukturen erhalten bleiben, welche dann hinsichtlich einer Interaktion von DNAJC13-LIR1 und -TM mit ATG8-Proteinen mikroskopisch analysiert werden könnten. Auch die Superauflösungs-Mikroskopie wäre eine Möglichkeit einen noch besseren Einblick in diesen Prozess zu bekommen.

Trotz der bisher diskutierten Mutanten, die die Aggregation von DNAJC13 verursachten, sind in der Literatur Mutationen für DNAJC13 beschrieben, welche nicht zu einer Änderung seiner Konformation führten, sondern diese ähnlich wie der Wildtyp exprimiert vorlagen. Dazu zählt beispielsweise die Mutation [N855S] innerhalb von DNAJC13, welche in einem kausalen Zusammenhang mit der familiären PD steht (Vilariño-Güell *et al.*, 2014). Die Expression der DNAJC13-[N855S] Mutante führte zu keiner Aggregation, hingegen aber zu einer veränderten Lokalisation mit endosomalen Kompartimenten. Der resultierende negative Effekt auf endosomale Sortierprozesse äußerte sich durch einen beeinträchtigten Transport von beispielsweise Transferrin, EGF/EGFR oder  $\alpha$ -Synuklein (Hasegawa *et al.*, 2018; Yoshida *et al.*, 2018). Auch die Mutationen [K8A] oder [K25A] innerhalb der PI-Domäne von DNAJC13, welche durch Xhabija und Kollegen zur Entschlüsselung dieser generiert wurden (Xhabija and Vacratsis, 2015) hatten keinen Einfluss auf eine veränderte Verteilung des Proteins innerhalb von Zellen. Hingegen zeigten die Mutationen [K17A], [W20A], [Y24A] und [R26A] exakt dieselbe homogene Verteilung wie die DNAJC13-LIR1 und -TM Proteine was einmal mehr die Sensibilität des Proteins unterstreicht.

### 4.3 Ausblick

In dieser Dissertation konnten erstmals vier LIR-Motive innerhalb von DNAJC13 aufgedeckt und beschrieben werden. Für einige der zur Untersuchung dieser vier LIR-Motive eingefügten Mutationen (-LIR1, -LIR4, -TM) konnte gezeigt werden, dass diese die Struktur des Proteins destabilisieren. Um jedoch einen besseren Einblick und Aufklärung der Funktionalität der vier LIR-Motive innerhalb von DNAJC13 zu erbringen, wären diverse Ansätze denkbar. Beispielsweise verlagert sich der Schwerpunkt der bioinformatischen Wissenschaften immer mehr in Richtung der Fragestellung nach der Proteinfaltung und Strukturvorhersage bei gegebener Aminosäuresequenz. Demnach könnten solche Insilico-Analysen im Hinblick auf die Konformation von DNAJC13 bzw. der jeweiligen Sequenzbereiche für ein besseres Verständnis hilfreich sein. Aufgrund der Dosis-Abhängigkeit der Expression der verschiedenen Konstrukte (-LIR2, -LIR3, -TV1-3) und daraus resultierend deren Lokalisation bzw. Aggregation war auch hier keine Aussage bezüglich der Funktionalität der LIR-Motive möglich. Neben der Umklonierung in einen weniger stark die Proteine exprimierenden Vektor sei die Generierung von stabilen mutierten und verkürzten DNAJC13-Linien mittels des CRISPR/Cas Verfahrens denkbar. Dadurch würde gewährleistet, dass die Konstrukte unter einem endogenen Promotor exprimiert und somit in einem endogenen Expressionspiegel vorliegen. Dieses System würde dazu beitragen, weitere Analysen zur Funktionalität der LIR-Motive innerhalb DNAJC13 hinsichtlich seiner ATG8-Interaktionspartner durchzuführen. Dazu sollten mögliche Unterschiede zwischen der Interaktion von DNAJC13 zu LC3B und GABARAP untersucht werden. Auch sollte analysiert werden, inwiefern die LIR-Motive einen möglicherweise sekundären Einfluss auf die ATG9-Verteilung ausüben. Unsere Arbeitsgruppe postulierte bereits, dass DNAJC13 die ATG9-Lokalisation an autophagosomalen Strukturen moduliert (Besemer *et al.*, in Begutachtung). Möglicherweise fungiert DNAJC13 als ein Bindeglied zwischen ATG9 und der Phagophore bzw. dem Autophagosom. Weitere Studien im Kontext des Retromer-Komplexes bzw. SNX1 würden Aufschluss über eine mögliche Bedeutung des Komplexes für die Autophagie erbringen.

## 5 Zusammenfassung/Summary

### 5.1 Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase ist für das Überleben eines Organismus sowie seiner Funktion von entscheidender Bedeutung. Um das Gleichgewicht von Proteinsynthese, -stabilisierung und -abbau zu erhalten, bedient sich die Zelle einem hoch konservierten Qualitätskontrollsystem, welches sich aus molekularen Chaperonen sowie den beiden Protein-Degradationswegen, dem Ubiquitin-Proteasom-System und dem (autophago-) lysosomalen System, zusammensetzt. Während des autophagischen Prozesses werden zytoplasmatische Komponenten von einer vesikulären Doppelmembran, dem Autophagosom, umschlossen; nach seiner Reifung fusioniert das Autophagosom mit dem Lysosom. In letzterem enthaltene Hydrolasen sorgen schließlich für die Degradation der Substrate. Unsere Arbeitsgruppe konnte das bisher mit dem retrograden Transport von endosomalen Vesikeln assoziierte DNAJ/HSP40 Protein DNAJC13 als einen positiven Regulator der Autophagie identifizieren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Rolle von DNAJC13 innerhalb des autophagischen Prozesses detaillierter untersucht. Sowohl Lokalisations- als auch Interaktionsstudien zeigten, dass DNAJC13 mit den ATG8-Familienmitgliedern LC3B und GABARAP interagiert. Generell wird die Interaktion zwischen ATG8-Proteinen und deren Interaktionspartnern durch das LIR (*LC3-interacting region*) -Motiv vermittelt. Mit Hilfe eines Peptid Arrays konnten innerhalb von DNAJC13 vier LIR-Motive identifiziert werden, die spezifisch mit dem ATG8-Protein GABARAP interagieren. Zur Untersuchung der Funktionalität dieser LIR-Motive sowie der DNAJ-Domäne von DNAJC13 wurden verschiedene DNAJC13 Mutanten generiert (u.a. DNAJC13-LIR1-4, -TV1-3, -TM, -DNAJ). Die detaillierte Analyse dieser Mutanten ergab, dass Punktmutationen innerhalb von DNAJC13 hinsichtlich ihrer Konformation zu enorm sensiblen und somit destabilisierten Proteinen führten. Punktmutationen innerhalb der DNAJ-Domäne sowie des vierten LIR-Motivs oder die Deletion des vierten LIR-Motivs (DNAJC13-DNAJ, -LIR4 sowie  $-\Delta$ LIR4) bewirkten die Aggregation von DNAJC13. Punktmutationen im zweiten oder dritten LIR-Motiv von DNAJC13 sowie die C-terminale Trunkierung von DNAJC13 (DNAJC13-TV1-3) hatten eine Dosis-abhängige Aggregation des Proteins zur Folge. Interessanterweise resultieren andere Punktmutationen in DNAJC13, wie beispielsweise die pathologisch bedeutsame Parkinson-assoziierte N855S-Mutation, nicht in der Aggregation des Proteins. Eine Punktmutation im ersten LIR-Motiv (DNAJC13-LIR1 und -TM) beeinflusste die Assoziation von DNAJC13 mit Membranen; dies lässt auf einen dominanten Effekt des ersten LIR-Motivs (LIR1) auf das Protein und dessen Konformation schließen.

Im Zuge der funktionellen Charakterisierung des HSP40 Proteins DNAJC13 konnten im Rahmen dieser Dissertation innerhalb DNAJC13 vier LIR-Motive identifiziert werden. Durch Mutation dieser putativ funktionellen Motive sowie Trunkierungen von DNAJC13 wurden Mutanten generiert, die eine Analyse der Funktion von DNAJC13 als positiven Regulator der Autophagie erlauben. Die in dieser Arbeit erlangten Resultate werden damit nicht nur zur weiteren detaillierteren Charakterisierung des HSP40 Proteins DNAJC13 selbst, sondern auch zur Aufklärung seiner Rolle im autophagischen Prozess beitragen.

## 5.2 Summary

The maintenance of cellular protein homeostasis is of vital importance for the survival of an organism and its cellular function. To maintain the balance of protein synthesis, stabilization, and degradation, cells are equipped with a highly conserved quality control system consisting of molecular chaperones as well as two protein degradation pathways: the ubiquitin-proteasome system and the (autophago-) lysosomal system. During the autophagic process, cytoplasmic components are engulfed by a vesicular double membrane, the so-called autophagosome. The mature autophagosome fuses with the lysosome and its content is subsequently degraded by lysosomal hydrolases.

Our group identified the DNAJ/HSP40 protein DNAJC13 which was previously described in the retrograde transport of endosomal vesicles, as a positive regulator of autophagy.

In the present study, the role of DNAJC13 within the autophagic process was investigated in more detail. Localization as well as interaction studies revealed that DNAJC13 interacts with the ATG8 family members LC3B and GABARAP. In general, the interaction between ATG8 proteins and their interaction partners is mediated by the LIR (LC3-interacting region) motif. Using a peptide array, four LIR motifs within DNAJC13 were identified which specifically interact with the ATG8 protein GABARAP. In order to study the functionality of these LIR motifs and the DNAJ domain of DNAJC13, various DNAJC13 mutants were generated (including DNAJC13-LIR1-4, -TV1-3, -TM, -DNAJ). Detailed analysis of these mutants revealed that point mutations within DNAJC13 led to a highly sensitive and thus destabilized protein conformation. Point mutations in the DNAJ domain or in the fourth LIR motif as well as the deletion of the fourth LIR motif (DNAJC13-DNAJ, -LIR4 and - $\Delta$  LIR4) caused the aggregation of DNAJC13. Point mutations in the second or third LIR motif of DNAJC13 as well as the truncation of its C-terminus (DNAJC13-TV1-3) resulted in a dose-dependent aggregation of the protein. Interestingly, other point mutations in DNAJC13, such as the pathologically significant Parkinson-associated N855S mutation, did not result in the aggregation of the protein. A point mutation in the first LIR motif (DNAJC13-LIR1 and -TM) negatively influenced the association of DNAJC13 with membranes which suggests a dominant effect of the first LIR motif (LIR1) on protein conformation.

In the course of the functional characterization of the HSP40 protein DNAJC13, four LIR motifs of DNAJC13 could be identified. Analysis of the mutation or truncation of these putative functional motifs led to a deeper understanding of the role of DNAJC13 as a positive regulator of autophagy. The results obtained in this study contribute not only to further characterization of the HSP40 protein DNAJC13, but also to the elucidation of its role in the autophagic process.

## 6 Literaturverzeichnis

Alemu, E. A. *et al.* (2012) 'ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: Sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M112.378109.

Amaya, C., Fader, C. M. and Colombo, M. I. (2015) 'Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/j.febslet.2015.09.021.

Amm, I., Sommer, T. and Wolf, D. H. (2014) 'Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.031.

Anikster, Y. *et al.* (2017) 'Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability', *American Journal of Human Genetics*. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.002.

Ao, X., Zou, L. and Wu, Y. (2014) 'Regulation of autophagy by the Rab GTPase network', *Cell Death and Differentiation*, pp. 348–358. doi: 10.1038/cdd.2013.187.

Arias, E. and Cuervo, A. M. (2011) 'Chaperone-mediated autophagy in protein quality control', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ceb.2010.10.009.

Arighi, C. N. *et al.* (2004) 'Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200312055.

Arrasate, M. *et al.* (2004) 'Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death', *Nature*. doi: 10.1038/nature02998.

Atlashkin, V. *et al.* (2003) 'Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8.', *Molecular and cellular biology*. doi: 10.1128/MCB.23.15.5198-5207.2003.

Axe, E. L. *et al.* (2008) 'Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200803137.

Barr, F. and Lambright, D. G. (2010) 'Rab GEFs and GAPs', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ceb.2010.04.007.

Behl, C. (2011) 'BAG3 and friends: Co-chaperones in selective autophagy during aging and disease', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.7.7.15844.

Behrends, C. *et al.* (2010) 'Network organization of the human autophagy system', *Nature*. doi: 10.1038/nature09204.

Benaroudj, N. *et al.* (2001) 'The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes', *Biochimie*. doi: 10.1016/S0300-9084(01)01244-5.

Bird, P. I., Trapani, J. A. and Villadangos, J. A. (2009) 'Endolysosomal proteases and their inhibitors

in immunity', *Nature Reviews Immunology*. doi: 10.1038/nri2671.

Birgisdottir, A. and Johansen, T. (2013) 'The LIR motif – crucial for selective autophagy', *Journal of cell science*, 126, pp. 3237–3247. doi: 10.1242/jcs.120477.

Bjørkøy, G. *et al.* (2005) 'p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death', *The Journal of Cell Biology*, 171(4), p. 603 LP-614. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/171/4/603.abstract>.

Boehm, M. and Bonifacino, J. S. (2001) 'Adaptins: the final recount.', *Molecular biology of the cell*. doi: 10.1091/mbc.12.10.2907.

Boettner, D. R., Chi, R. J. and Lemmon, S. K. (2012) 'Lessons from yeast for clathrin-mediated endocytosis', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2403.

Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H. (2008) 'Retromer', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ceb.2008.03.009.

Bonifacino, J. S. and Rojas, R. (2006) 'Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm1985.

Burd, C. and Cullen, P. J. (2014) 'Retromer: A master conductor of endosome sorting', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a016774.

Carlton, J. *et al.* (2004) 'Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2004.09.077.

Cha-Molstad, H. *et al.* (2015) 'Amino-terminal arginylation targets endoplasmic reticulum chaperone BiP for autophagy through p62 binding', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3177.

Chan, E. Y. W. *et al.* (2009) 'Kinase-Inactivated ULK Proteins Inhibit Autophagy via Their Conserved C-Terminal Domains Using an Atg13-Independent Mechanism', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/MCB.01082-08.

Chang, H. C., Hull, M. and Mellman, I. (2004) 'The J-domain protein Rme-8 interacts with Hsc70 to control clathrin-dependent endocytosis in *Drosophila*', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200311084.

Chua, C. E. L., 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*. doi: 10.1007/s00018-011-0748-9.

Ciechanover, A. (1998) 'The ubiquitin-proteasome pathway: On protein death and cell life', *EMBO Journal*. doi: 10.1093/emboj/17.24.7151.

Clark, S. L. (1957) 'Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope.', *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. doi: 10.1083/jcb.3.3.349.

Cleveland, D. W. *et al.* (1977) 'Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis.', *The Journal of biological chemistry*.

Collins, B. M. (2008) 'The structure and function of the retromer protein complex', *Traffic*. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00777.x.

Cozier, G. E. *et al.* (2002) 'The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M206986200.

Cullen, P. J. (2008) 'Endosomal sorting and signalling: An emerging role for sorting nexins', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2427.

Cullen, P. J. and Korswagen, H. C. (2012) 'Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2374.

Damen, E. *et al.* (2006) 'The human Vps29 retromer component is a metallo-phosphoesterase for a cation-independent mannose 6-phosphate receptor substrate peptide', *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/BJ20060033.

Derivery, E. *et al.* (2009) 'The Arp2/3 Activator WASH Controls the Fission of Endosomes through a Large Multiprotein Complex', *Developmental Cell*, 17(5), pp. 712–723. doi: 10.1016/j.devcel.2009.09.010.

Derivery, E. *et al.* (2012) 'Actin polymerization controls the organization of WASH domains at the surface of endosomes', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0039774.

Dobson, C. M. (2003) 'Protein folding and misfolding', *Nature*. doi: 10.1038/nature02261.

Dobson, C. M. and Karplus, M. (1999) 'The fundamentals of protein folding: Bringing together theory and experiment', *Current Opinion in Structural Biology*. doi: 10.1016/S0959-440X(99)80012-8.

de Duve, C. *et al.* (1955) 'Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue', *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/bj0600604.

de Duve, C. and Wattiaux, R. (1966) 'Functions of Lysosomes', *Annual Review of Physiology*. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251.

Edvardson, S. *et al.* (2012) 'A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating Co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0036458.

Feldmann, A. *et al.* (2017) 'The RAB GTPase RAB18 modulates macroautophagy and proteostasis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.112.

Filimonenko, M. *et al.* (2007) 'Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease', *Journal of Cell*



*Biology*. doi: 10.1083/jcb.200702115.

Fink, A. L. (1998) 'Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid', *Folding and Design*. doi: 10.1016/S1359-0278(98)00002-9.

Frasa, M. A. M. *et al.* (2012) 'Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3267.

Freeman, C. L., Hesketh, G. and Seaman, M. N. J. (2014) 'RME-8 coordinates the activity of the WASH complex with the function of the retromer SNX dimer to control endosomal tubulation', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.144659.

Frydman, J. (2001) 'Folding of newly-translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones', *Annu Rev Biochem*.

Fujibayashi, A. *et al.* (2008) 'Human RME-8 is involved in membrane trafficking through early endosomes.', *Cell structure and function*. doi: 10.1247/csf.07045.

Fukui, K. *et al.* (1997) 'Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins.', *The Journal of biological chemistry*. doi: 10.1074/JBC.272.8.4655.

Fusek, M. and Vetvicka, V. (2005) 'Dual role of cathepsin D: ligand and protease.', *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*. doi: 10.5507/bp.2005.003.

Gamerding, M. *et al.* (2009) 'Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2009.29.

Gamerding, M. *et al.* (2011) 'BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins', *EMBO Reports*. doi: 10.1038/embor.2010.203.

Girard, M. *et al.* (2005) 'The DnaJ-domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M505036200.

Girard, M. and McPherson, P. S. (2008) 'RME-8 regulates trafficking of the epidermal growth factor receptor', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/j.febslet.2008.02.042.

Glick, D., Barth, S. and Macleod, K. F. (2010) 'Autophagy: cellular and molecular mechanisms', *The Journal of pathology*. doi: 10.1002/path.2697.

Goldberg, A. L. (2003) 'Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins', *Nature*. doi: 10.1038/nature02263.

Gomez, T. S. and Billadeau, D. D. (2009) 'A FAM21-Containing WASH Complex Regulates Retromer-Dependent Sorting', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2009.09.009.

Gorenberg, E. L. and Chandra, S. S. (2017) 'The role of co-chaperones in synaptic proteostasis and neurodegenerative disease', *Frontiers in Neuroscience*, 11(MAY), pp. 1–16. doi:

10.3389/fnins.2017.00248.

Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) 'A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA', *Virology*. doi: 10.1016/0042-6822(73)90341-3.

Greener, T. *et al.* (2001) 'Caenorhabditis elegans auxilin: A J-domain protein essential for clathrin-mediated endocytosis in vivo', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/35055137.

Griffiths, G. *et al.* (1988) 'The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(88)80026-6.

Gruenberg, J. (2001) 'The endocytic pathway: A mosaic of domains', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/35096054.

Gustavsson, E. K. *et al.* (2015) 'DNAJC13 genetic variants in parkinsonism', *Movement Disorders*. doi: 10.1002/mds.26064.

Gwinn, D. M. *et al.* (2008) 'AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.003.

Hamasaki, M. *et al.* (2013) 'Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites', *Nature*. doi: 10.1038/nature11910.

Harbour, M. E. *et al.* (2010) 'The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.071472.

Hartl, F. U., Bracher, A. and Hayer-Hartl, M. (2011) 'Molecular chaperones in protein folding and proteostasis', *Nature*. doi: 10.1038/nature10317.

Hasegawa, T. *et al.* (2018) 'DnaJ/Hsp40 family and Parkinson's disease', *Frontiers in Neuroscience*, 11(JAN), pp. 1–9. doi: 10.3389/fnins.2017.00743.

He, C. and Klionsky, D. J. (2009) 'Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy', *Annual Review of Genetics*. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.

Hemelaar, J. *et al.* (2003) 'A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M308762200.

Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) 'The ubiquitin system.', *Annual review of biochemistry*. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.

Hipp, M. S., Park, S. H. and Hartl, U. U. (2014) 'Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2014.05.003.

Hirst, J. and Robinson, M. S. (1998) 'Clathrin and adaptors', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/S0167-4889(98)00056-1.

## 6 Literaturverzeichnis

Hsu, V. W., Bai, M. and Li, J. (2012) 'Getting active: Protein sorting in endocytic recycling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3332.

Huotari, J. and Helenius, A. (2011) 'Endosome maturation', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2011.286.

Hutagalung, A. H. and Novick, P. J. (2011) 'Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology', *Physiological Reviews*. doi: 10.1152/physrev.00059.2009.

Ichimura, Y., Kominami, E., *et al.* (2008) 'Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.6826.

Ichimura, Y., Kumanomidou, T., *et al.* (2008) 'Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M802182200.

Itoh, T. *et al.* (2008) 'Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation.', *Molecular biology of the cell*. doi: 10.1091/mbc.E07-12-1231.

Jacomin, A. C. and Al, E. (2016) 'iLIR database: a web resource for LIR motif-containing proteins in eukaryotes', *Autophagy*. doi: 10.1080/15548627.2016.1207016.

Jager, S. (2004) 'Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.01370.

Jee, H. (2016) 'Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review.', *Journal of exercise rehabilitation*. doi: 10.12965/jer.1632642.321.

Jeong, H. *et al.* (2009) 'Acetylation Targets Mutant Huntingtin to Autophagosomes for Degradation', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.018.

Johannes, L. and Popoff, V. (2008) 'Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.009.

Johansen, T. and Lamark, T. (2011) 'Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.7.3.14487.

Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R. (1998) 'Aggresomes: A cellular response to misfolded proteins', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.143.7.1883.

Jung, C. H. *et al.* (2009) 'ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1249.

Kabeya, Y. (2000) 'LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing', *The EMBO Journal*. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720.

Kabeya, Y. (2004) 'LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.01131.

## 6 Literaturverzeichnis

- Kalvari, I. *et al.* (2014) 'iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.28260.
- Kampinga, H. H. and Craig, A. E. (2011) 'The Hsp70 chaperone Hsp70 chaperone machinery: J-proteins as drivers of functional specificity', *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 29(10), pp. 1883–1889. doi: 10.3174/ajnr.A1256.Functional.
- Kaushik, S. and Cuervo, A. M. (2012) 'Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2012.05.006.
- Kawaguchi, Y. *et al.* (2003) 'The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00939-5.
- Kern, A. *et al.* (2010) 'HSF1-controlled and age-associated chaperone capacity in neurons and muscle cells of *C. elegans*', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0008568.
- Kern, A. *et al.* (2018) 'Novel Modulators of Proteostasis : RNAi Screen of Chromosome I in a Heat Stress Paradigm in *C. elegans*', pp. 3–10. doi: 10.3390/cells7060049.
- Kern, A., Dikic, I. and Behl, C. (2015) 'The integration of autophagy and cellular trafficking pathways via RAB GAPs', *Autophagy*. doi: 10.1080/15548627.2015.1110668.
- Khaminets, A., Behl, C. and Dikic, I. (2016) 'Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.010.
- Kim, Y. E. *et al.* (2013) 'Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis', *Annual Review of Biochemistry*. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.
- Kirchhausen, T., Owen, D. and Harrison, S. C. (2014) 'Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a016725.
- Kirisako, T. *et al.* (2000) 'The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.151.2.263.
- Kirkin, V. *et al.* (2009) 'A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.020.
- Kirkin, V. and Dikic, I. (2007) 'Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.002.
- Kleppe, K. *et al.* (1971) 'Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases', *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/0022-2836(71)90469-4.
- Klionsky, D. J. (2012) 'Look people, "Atg" is an abbreviation for "autophagy- related." That's it', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.21812.

## 6 Literaturverzeichnis

- Klionsky, D. J. and Codogno, P. (2013) 'The mechanism and physiological function of macroautophagy', *Journal of Innate Immunity*. doi: 10.1159/000351979.
- Kopito, R. R. (2000) 'Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01852-3.
- Koumandou, V. L. *et al.* (2011) 'Evolutionary reconstruction of the retromer complex and its function in *Trypanosoma brucei*', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.081596.
- Kraft, C. *et al.* (2012) 'Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2012.225.
- Kubota, H. (2009) 'Quality control against misfolded proteins in the cytosol: A network for cell survival', *Journal of Biochemistry*. doi: 10.1093/jb/mvp139.
- Lamark, T. and Johansen, T. (2012) 'Aggrephagy: Selective disposal of protein aggregates by macroautophagy', *International Journal of Cell Biology*. doi: 10.1155/2012/736905.
- Lamb, C. A., Dooley, H. C. and Tooze, S. A. (2013) 'Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation', *BioEssays*, 35(1), pp. 34–45. doi: 10.1002/bies.201200130.
- Lemmon, S. K. (2001) 'Clathrin uncoating: Auxilin comes to life', *Current Biology*. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00010-0.
- Levine, B. and Kroemer, G. (2008) 'Autophagy in the Pathogenesis of Disease', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Li, C. *et al.* (2016) 'Role of the retromer complex in neurodegenerative diseases', *Frontiers in Aging Neuroscience*. doi: 10.3389/fnagi.2016.00042.
- Lilienbaum, A. (2013) 'Relationship between the proteasomal system and autophagy', *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*.
- Liu, L. *et al.* (2012) 'Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2422.
- Liu, T.-T. *et al.* (2012) 'Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E11-11-0915.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R. and Bright, N. A. (2007) 'Lysosomes: Fusion and function', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2217.
- Mari, M. *et al.* (2010) 'An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200912089.
- Martinez-Vicente, M. and Cuervo, A. M. (2007) 'Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike', *Lancet Neurology*. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70076-5.

## 6 Literaturverzeichnis

Martinez, O. and Goud, B. (1998) 'Rab proteins', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/S0167-4889(98)00050-0.

Mauvezin, C. and Neufeld, T. P. (2015) 'Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion', *Autophagy*. doi: 10.1080/15548627.2015.1066957.

Maxfield, F. R. and McGraw, T. E. (2004) 'Endocytic recycling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm1315.

Mayer, M. P. and Bukau, B. (2005) 'Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism', *Cell. Mol. Life Sci.* doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.

McEwan, D. G. *et al.* (2015) 'PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2014.11.006.

McGough, I. J. *et al.* (2014) 'Retromer binding to FAM21 and the WASH complex is perturbed by the Parkinson disease-linked VPS35(D620N) mutation', *Current Biology*, 24(14), pp. 1670–1676. doi: 10.1016/j.cub.2014.06.024.

Menzies, F. M. *et al.* (2017) 'Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities', *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.022.

Mercer, T. J., Gubas, A. and Tooze, S. A. (2018) 'A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.R117.810366.

Mijaljica, D., Prescott, M. and Devenish, R. J. (2011) 'Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.7.7.14733.

Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F. and Novick, P. (2012) 'GTPase Networks in Membrane Traffic', *Annual Review of Biochemistry*. doi: 10.1146/annurev-biochem-052810-093700.

Mizushima, N. *et al.* (1998) 'A new protein conjugation system in human: The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.273.51.33889.

Mizushima, N. (2007) 'Autophagy: Process and function', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.1599207.

Mizushima, N. *et al.* (2008) 'Autophagy fights disease through cellular self-digestion', *Nature*. doi: 10.1038/nature06639.

Mizushima, N. and Komatsu, M. (2011) 'Autophagy: Renovation of cells and tissues', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.

Mizushima, N., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2011) 'The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.

## 6 Literaturverzeichnis

Mohrlüder, J. *et al.* (2007) 'Identification of calreticulin as a ligand of GABARAP by phage display screening of a peptide library', *FEBS Journal*. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06073.x.

Morawe, T. *et al.* (2012) 'Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease', *Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s12035-012-8246-0.

Müller, M. *et al.* (2011) 'Rab3-GAP Controls the Progression of Synaptic Homeostasis at a Late Stage of Vesicle Release', *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.025.

Mullis, K. *et al.* (1986) 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. doi: 10.1101/SQB.1986.051.01.032.

Nair, U. *et al.* (2012) 'A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.19385.

Nakada-Tsukui, K. (2005) 'A Retromerlike Complex Is a Novel Rab7 Effector That Is Involved in the Transport of the Virulence Factor Cysteine Protease in the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E05-04-0283.

Nakatogawa, H., Ichimura, Y. and Ohsumi, Y. (2007) 'Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.021.

Navon, A. and Goldberg, A. L. (2001) 'Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00407-5.

Noda, N. N. *et al.* (2008) 'Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy', *Genes to Cells*, 13(12), pp. 1211–1218. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01238.x.

Noda, T. and Ohsumi, Y. (1998) 'Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.273.7.3963.

Norris, A. *et al.* (2017) 'SNX-1 and RME-8 oppose the assembly of HGRS-1/ESCRT-0 degradative microdomains on endosomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.1612730114.

Norwood, S. J. *et al.* (2011) 'Assembly and solution structure of the core retromer protein complex', *Traffic*. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01124.x.

Nothwehr, S. F., Ha, S. A. and Bruinsma, P. (2000) 'Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.151.2.297.

NOVIKOFF, A. B., BEAUFAY, H. and DE DUVE, C. (1956) 'Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver.', *J. Biophys. Biochem. Cytol.* doi: 10.1083/jcb.2.4.179.

Oishi, H. *et al.* (1998) 'Localization of the Rab3 small G protein regulators in nerve terminals and their involvement in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis', *Journal of Biological Chemistry*. doi:

10.1074/jbc.273.51.34580.

Orsi, A. *et al.* (2012) 'Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E11-09-0746.

Pankiv, S. *et al.* (2007) 'p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy\*[S]', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M702824200.

Pankiv, S. *et al.* (2010) 'FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end - Directed vesicle transport', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200907015.

Pankiv, S. and Johansen, T. (2010) 'FYCO1: Linking autophagosomes to microtubule plus end-directing molecular motors', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.6.4.11670.

Parzych, K. R. and Klionsky, D. J. (2014) 'An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation', *Antioxidants & Redox Signaling*. doi: 10.1089/ars.2013.5371.

Pauli, D., Arrigo, A. P. and Tissières, A. (1992) 'Heat shock response in *Drosophila*', *Experientia*. doi: 10.1007/BF02118306.

Paz, Y., Elazar, Z. and Fass, D. (2000) 'Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.C000307200.

Pfeffer, S. R. (1994) 'Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/0955-0674(94)90071-X.

Popelka, H. and Klionsky, D. J. (2015a) 'Analysis of the native conformation of the LIR/AIM motif in the Atg8/LC3/GABARAP-binding proteins', *Autophagy*. doi: 10.1080/15548627.2015.1111503.

Popelka, H. and Klionsky, D. J. (2015b) 'Post-translationally-modified structures in the autophagy machinery: An integrative perspective', *FEBS Journal*. doi: 10.1111/febs.13356.

Popoff, V. *et al.* (2009) 'Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes', *Traffic*. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00993.x.

Popovic, D. *et al.* (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(9), pp. 1733–1744. doi: 10.1128/MCB.06717-11.

Popovic, D. and Dikic, I. (2014) 'TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy', *EMBO Reports*. doi: 10.1002/embr.201337995.

Priya, A. *et al.* (2015) 'Molecular Insights into Rab7-Mediated Endosomal Recruitment of Core Retromer: Deciphering the Role of Vps26 and Vps35', *Traffic*. doi: 10.1111/tra.12237.



Puschmann, A. (2017) 'New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism', *Current Neurology and Neuroscience Reports*. doi: 10.1007/s11910-017-0780-8.

Puthenveedu, M. A. *et al.* (2010) 'Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.003.

Qiu, X. B. *et al.* (2006) 'The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(22), pp. 2560–2570. doi: 10.1007/s00018-006-6192-6.

Ravid, T. and Hochstrasser, M. (2008) 'Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2468.

Ravikumar, B. *et al.* (2010) 'Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2078.

Ravikumar, B., Moreau, K. and Rubinsztein, D. C. (2010) 'Plasma membrane helps autophagosomes grow', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.6.8.13428.

Reggiori, F. and Tooze, S. A. (2012) 'Autophagy regulation through Atg9 traffic', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201206119.

Rogov, V. *et al.* (2014) 'Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.014.

Rogov, V. V. *et al.* (2013) 'Structural basis for phosphorylation-triggered autophagic clearance of *Salmonella*', *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/BJ20121907.

Rogov, V. V. *et al.* (2017) 'Structural and functional analysis of the GABARAP interaction motif (GIM)', *EMBO reports*. doi: 10.15252/embr.201643587.

Rojas, R. *et al.* (2008) 'Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200804048.

Ross, C. A. and Poirier, M. A. (2004) 'Protein aggregation and neurodegenerative disease', *Nature Medicine*. doi: 10.1038/nm1066.

Rubinsztein, D. C. *et al.* (2005) 'Dyneins, autophagy, aggregation and neurodegeneration.', *Autophagy*. doi: 10.4161/auto.1.3.2050.

Rubinsztein, D. C. (2006) 'The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration', *Nature*. doi: 10.1038/nature05291.

Sakane, A. *et al.* (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*. doi: 10.1073/pnas.0600304103.

Schimmöller, F., Simon, I. and Pfeffert, S. R. (1998) 'Rab GTPases, directors of vesicle docking',

*Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.273.35.22161.

Seaman, M. N. J. (2004) 'Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200312034.

Seaman, M. N. J. *et al.* (2009) 'Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.048686.

Seaman, M. N. J. (2012) 'The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.103440.

Seaman, M. N. J. (2015) 'The Retromer Complex', in *Encyclopedia of Cell Biology*. doi: 10.1016/B978-0-12-394447-4.20048-5.

Seaman, M. N. J., McCaffery, J. M. and Emr, S. D. (1998) 'A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.142.3.665.

Shaid, S. *et al.* (2013) 'Ubiquitination and selective autophagy', *Cell Death and Differentiation*. doi: 10.1038/cdd.2012.72.

Shein, H. M. and Enders, J. F. (1962) 'Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Shi, A. *et al.* (2009) 'Regulation of endosomal clathrin and retromer-mediated endosome to Golgi retrograde transport by the J-domain protein RME-8', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2009.272.

Shpilka, T. *et al.* (2011) 'Atg8: An autophagy-related ubiquitin-like protein family', *Genome Biology*. doi: 10.1186/gb-2011-12-7-226.

Singh, R. and Cuervo, A. M. (2011) 'Autophagy in the cellular energetic balance', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.004.

Smith, C. J. and Pearse, B. M. F. (1999) 'Clathrin: Anatomy of a coat protein', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/S0962-8924(99)01631-1.

Sørensen, K. *et al.* (2018) 'SNX18 regulates ATG9A trafficking from recycling endosomes by recruiting Dynamin-2', *EMBO reports*. doi: 10.15252/embr.201744837.

Soto, C. (2003) 'Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases', *Nature Reviews Neuroscience*. doi: 10.1038/nrn1007.

Spang, N. *et al.* (2014) 'RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy', *Autophagy*. doi: 10.4161/15548627.2014.994359.

Steinberg, F. *et al.* (2013) 'A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity

## 6 Literaturverzeichnis

- reveals a function in glucose and metal ion transport', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2721.
- Stenmark, H. and Olkkonen, V. M. (2001) 'The Rab GTPase family.', *Genome biology*. doi: 10.1186/gb-2001-2-5-reviews3007.
- Stolz, A., Ernst, A. and Dikic, I. (2014) 'Cargo recognition and trafficking in selective autophagy', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2979.
- Straniero, L. *et al.* (2017) 'DNAJC12 and dopa-responsive nonprogressive parkinsonism', *Annals of Neurology*. doi: 10.1002/ana.25048.
- Stürner, E. and Behl, C. (2017) 'The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease', *Frontiers in Molecular Neuroscience*. doi: 10.3389/fnmol.2017.00177.
- Sugawara, K. *et al.* (2004) 'The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8', *Genes to Cells*. doi: 10.1111/j.1356-9597.2004.00750.x.
- Takahashi, Y. (2015) 'Co-immunoprecipitation from transfected cells', in *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications: Second Edition*. doi: 10.1007/978-1-4939-2425-7\_25.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001) 'Small GTP-binding proteins.', *Physiological reviews*. doi: 10.1038/353668a0.
- Tanaka, M. *et al.* (2001) 'Role of Rab3 GDP/GTP exchange protein in synaptic vesicle trafficking at the mouse neuromuscular junction.', *Molecular biology of the cell*, 12(5), pp. 1421–1430. doi: 10.1091/mbc.12.5.1421.
- Tanaka, M. *et al.* (2004) 'Aggresomes Formed by  $\alpha$ -Synuclein and Synphilin-1 Are Cytoprotective', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M310994200.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004) 'LC3 conjugation system in mammalian autophagy', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.009.
- Taylor, R. C. and Dillin, A. (2011) 'Aging as an event of proteostasis collapse', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a004440.
- Teasdale, R. D. and Collins, B. M. (2012) 'Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease', *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/BJ20111226.
- Temkin, P. *et al.* (2011) 'SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2252.
- Tooze, S. A. and Yoshimori, T. (2010) 'The origin of the autophagosomal membrane', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb0910-831.
- Tsai, J. and Douglas, M. G. (1996) 'A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1

## 6 Literaturverzeichnis

stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.271.16.9347.

Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993) 'Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/0014-5793(93)80398-E.

Tyedmers, J., Mogk, A. and Bukau, B. (2010) 'Cellular strategies for controlling protein aggregation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2993.

Ungewickell, E. *et al.* (1995) 'Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles', *Nature*. doi: 10.1038/378632a0.

Ungewickell, E. and Branton, D. (1981) 'Assembly units of clathrin coats', *Nature*. doi: 10.1038/289420a0.

Vilariño-Güell, C. *et al.* (2014) 'DNAJC13 mutations in Parkinson disease', *Human molecular genetics*, 23(7), pp. 1794–1801. doi: 10.1093/hmg/ddt570.

Wada, M. *et al.* (1997) 'Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the RAB3 subfamily small G proteins', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.272.7.3875.

Wall, Zylicz and Georgopoulos (1994) 'The NH<sub>2</sub>-terminal 108 Amino Acids of the', *Biochemistry*, 269(7), pp. 5446–5451.

Wall, D., Zylicz, M. and Georgopoulos, C. (1994) 'The NH<sub>2</sub>-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for  $\lambda$  replication', *Journal of Biological Chemistry*.

Wall, D., Zylicz, M. and Georgopoulos, C. (1995) 'The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.270.5.2139.

'Wall et al. 1995 J. Biol. Chem.-1995-Wall-2139-44.pdf' (no date).

Wassmer, T. *et al.* (2006) 'A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.03302.

Van Weering, J. R. T. *et al.* (2012) 'Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2012.283.

Van Weering, J. R. T. and Cullen, P. J. (2014) 'Membrane-associated cargo recycling by tubule-based endosomal sorting', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.03.015.

Weidberg, H. *et al.* (2011) 'LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2011.02.006.

Wild, P. *et al.* (2011) 'Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella

growth', *Science*. doi: 10.1126/science.1205405.

Wild, P., McEwan, D. G. and Dikic, I. (2014) 'The LC3 interactome at a glance', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.140426.

Witan, H. *et al.* (2008) 'Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation', *Human Molecular Genetics*. doi: 10.1093/hmg/ddn025.

Witan, H. *et al.* (2009) 'Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) does not facilitate, but impedes the formation of protein aggregates of amyotrophic lateral sclerosis causing mutant SOD1', *Neurobiology of Disease*. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.024.

Wolf, D. H. and Hilt, W. (2004) 'The proteasome: A proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.10.007.

Xhabija, B. *et al.* (2011) 'Receptor mediated endocytosis 8 is a novel PI(3)P binding protein regulated by myotubularin-related 2', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.016.

Xhabija, B. and Vacratsis, P. O. (2015) 'Receptor-mediated endocytosis 8 utilizes an N-terminal phosphoinositide-binding motif to regulate endosomal clathrin dynamics', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M115.644757.

Xia, P. *et al.* (2013) 'WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2013.189.

Xie, Z. and Klionsky, D. J. (2007) 'Autophagosome formation: Core machinery and adaptations', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1007-1102.

Xue, B. *et al.* (2010) 'PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.01.011.

Yamamoto, A. *et al.* (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*. doi: 10.1247/csf.23.33.

Yamamoto, H. *et al.* (2012) 'Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201202061.

Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J. (2005) 'Autophagy: Molecular machinery for self-eating', *Cell Death and Differentiation*. doi: 10.1038/sj.cdd.4401765.

Yoshida, S. *et al.* (2018) 'Parkinson's disease-linked DNAJC13 mutation aggravates alpha-synuclein-induced neurotoxicity through perturbation of endosomal trafficking', *Human Molecular Genetics*. doi: 10.1093/hmg/ddy003.

Young, A. R. J. (2006) 'Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.03172.

## 6 Literaturverzeichnis

Zavodszky, E., Seaman, M. N. J. and Rubinsztein, D. C. (2014) 'VPS35 Parkinson mutation impairs autophagy via WASH', *Cell Cycle*. doi: 10.4161/cc.29734.

Zelazny, E. *et al.* (2013) 'Mechanisms governing the endosomal membrane recruitment of the core retromer in Arabidopsis', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M112.440503.

Zhang, J. *et al.* (2016) 'Intracellular trafficking network of protein nanocapsules: Endocytosis, exocytosis and autophagy', *Theranostics*, 6(12), pp. 2099–2113. doi: 10.7150/thno.16587.

Zhang, Y., Grant, B. and Hirsh, D. (2001) 'RME-8, a conserved J-domain protein, is required for endocytosis in *Caenorhabditis elegans*.', *Molecular biology of the cell*. doi: 10.1091/mbc.12.7.2011.

Zhou, F. *et al.* (2017) 'A Rab5 GTPase module is important for autophagosome', *PLoS Genetics*. doi: 10.1371/journal.pgen.1007020.

Zhu, Y. *et al.* (2013) 'Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M112.399345.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Molekulares Netzwerk aus Chaperonen, dem UPS und der Autophagie zur Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Überblick über die Degradationsmaschinerien: Autophagie und UPS.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des selektiven Autophagie-Prozesses.....	8
<b>Abbildung 4:</b> Die Regulation der Autophagie als Reaktion auf Nährstoffe.....	9
<b>Abbildung 5:</b> Diversität selektiver Autophagie-Rezeptoren der Säugetier-Zelle.....	14
<b>Abbildung 6:</b> Überblick über den Retromer-Komplex.....	19
<b>Abbildung 7:</b> Proteinstruktur von DNAJC13.....	22
<b>Abbildung 8:</b> Ein Modell für die Rolle von DNAJC13 als Interaktionspartner von WASH und SNX1 im Prozess des retrograden Transports.....	23
<b>Abbildung 9:</b> Proteinstruktur der DNAJC13-DNAJ Mutante.....	58
<b>Abbildung 10:</b> Co-IP der DNAJC13-DNAJ Mutanten und HSP70.....	58
<b>Abbildung 11:</b> Die Überexpression von DNAJC13 und der DNAJC13-DNAJ Mutante in HEK293T-Zellen führt jeweils zu einem erhöhten autophagischen Flux.....	60
<b>Abbildung 12:</b> Analyse der Verteilung der DNAJC13-DNAJ Mutante nach Überexpression in HEK293A-Zellen.....	62
<b>Abbildung 13:</b> Co-IP von LC3B mit DNAJC13.....	64
<b>Abbildung 14:</b> GST-ATG8 präzipitiert DNAJC13.....	65
<b>Abbildung 15:</b> Immunfluoreszenzfärbungen nach Überexpression von DNAJC13 zeigen eine partielle Kolokalisation von ATG8-Proteinen (LC3B und GABARAP) mit DNAJC13 nach BafA <sub>1</sub> -Behandlung in HEK293A-Zellen.....	66
<b>Abbildung 16:</b> Schematische Darstellung eines Peptid Arrays.....	68
<b>Abbildung 17:</b> Der Peptid Array enthüllte vier LIR-Motive innerhalb von DNAJC13.....	69
<b>Abbildung 18:</b> Positionierung der vier neuen LIR-Motive innerhalb der DNAJC13 Proteinstruktur.....	69
<b>Abbildung 19:</b> PONDR Profil von DNAJC13.....	70
<b>Abbildung 20:</b> Der Vergleich der LIR-Motive in DNAJC13 und FUNDC1 zeigte eine 100 %ige Homologie des DNAJC13-LIR4-Motivs zu dem FUNDC1-LIR-Motiv.....	71
<b>Abbildung 21:</b> Proteinstruktur der DNAJC13-LIR Mutanten 1-4.....	73
<b>Abbildung 22:</b> Die Überexpression von DNAJC13 bzw. der LIR Mutanten führt in allen Fälle zu einem erhöhten autophagischen Flux.....	74

<b>Abbildung 23:</b> Charakterisierung der Verteilung der vier LIR Mutanten.....	<b>75</b>
<b>Abbildung 24:</b> Untersuchung der Kolo­kalisierung der DNAJC13-LIR Mutanten mit LC3B und p62.....	<b>77</b>
<b>Abbildung 25:</b> Immunfluoreszenzfärbungen der DNAJC13-Varianten mit GABARAP .....	<b>78</b>
<b>Abbildung 26:</b> Alle DNAJC13-LIR Mutanten kolo­kalisieren mit VPS35 und ATG9.....	<b>80</b>
<b>Abbildung 27:</b> Subzelluläre Verteilung der $\Delta$ N- $\Delta$ C-trunkierten Proteine DNAJC13- $\Delta$ N- $\Delta$ C-Flag und DNAJC13- $\Delta$ N-LIR4- $\Delta$ C-Flag.....	<b>82</b>
<b>Abbildung 28:</b> Subzelluläre Verteilung des DNAJC13- $\Delta$ LIR4-Flag Proteins.....	<b>83</b>
<b>Abbildung 29:</b> Proteinstrukturen der trunkierten Versionen 1-3 und der <i>Triple</i> LIR Mutanten.....	<b>84</b>
<b>Abbildung 30:</b> Die C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte und die DNAJC13 <i>Triple</i> LIR Mutante zeigen gegenüber wildtypischem DNAJC13 eine teilweise andere subzelluläre Verteilung.....	<b>85</b>
<b>Abbildung 31:</b> Charakterisierung der C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte und der <i>Triple</i> LIR Mutante mittels Ko-Färbung mit SNX1.....	<b>87</b>
<b>Abbildung 32:</b> Charakterisierung der C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte und der <i>Triple</i> LIR Mutante mittels Ko-Färbung mit LC3B und GABARAP in BafA <sub>1</sub> -behandlten HEK293A-Zellen.....	<b>88/89</b>
<b>Abbildung 33:</b> Die Überexpression der C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte TV1-3 sowie die der <i>Triple</i> LIR Mutanten (TM) führt in allen Fällen zu einem tendentiell erhöhten autophagischen Flux.....	<b>91</b>
<b>Abbildung 34:</b> Die differentielle Fraktionierung der überexprimierten C-terminal trunkierten DNAJC13 Konstrukte TV1-TV3 sowie die der LIR4 Mutante zeigt, dass diese Proteine aggregieren.....	<b>92</b>
<b>Abbildung 35:</b> Überblick über das multifunktionale DNAJC13 Protein.....	<b>110</b>



## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

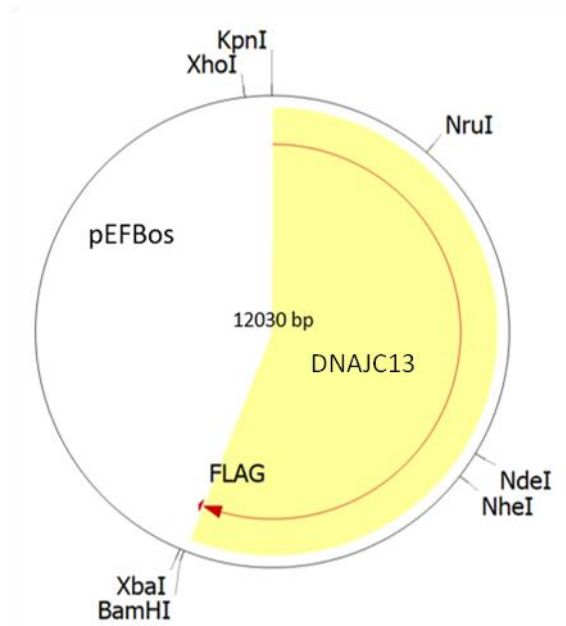
ad	Latein: bis
AD	Alzheimer's disease
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Ambra1	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP activating protein kinase
ATG	Autophagy related
BafA <sub>1</sub>	BafilomycinA <sub>1</sub>
BAG	BCL2-associated athanogene
bp	Basenpaare
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CMA	Chaperon-mediated autophagy
CSC	Cargo-Selective Complex
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid-hydrat
DFCP1	Double FYVE-containing protein 1
DNAJC13	DNAJ homolog subfamily C member 13
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
et al.	et alteres (Latein: und andere)
FAM21	Fat Facets in mouse21
FIP200	Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Y2H	Yeast Two-Hybrid
HEK	Human embryonic kidney
HSC70	70 kDa konstitutiv exprimierte HSP-Form
HSP	Hitzeschockproteine
LAMP2A	Lysosomal membrane-associated receptor 2A
LC3 (MAP1LC3)	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LIR	LC3-interacting region

## 7 Anhang

LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
M6P	Mannose-6-Phosphat
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mTOR	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1
PAS	Phagophore assembly site
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
Rab	Ras-related in brain
RME-8	Receptor-mediated endocytosis 8
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SNX	Sorting nexin
SOD1	Cu/Zn-Superoxid-Dismutase 1
TBC1D5/25	TBC1 domain family member 5/25
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
ULK	Unc-51-like kinase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VPS	Vacuolar protein sorting
WASH	Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog
WIPI	WD repeat domain phosphoinositide-interacting

### 7.3 Plasmidkarte und DNAJC13-Sequenz

pEFBos:DNAJC13-Flag:



DNA-Sequenz von pEFBos:DNAJC13-Flag (**DNAJC13**, **Flag**)

```

ATGAACATAATTAGGGAAAATAAGGATCTGGCATGTTTCTACACAACAAAACATTCATGGAGGGGGAAGTATAAGCGTGTCTT
TTCAGTTGGAACCTCATGCGATTACTACATATAATCCCAATACCTTAGAAGTAACAAATCAGTGGCCTTATGGAGACATTTGCA
GCATCAGCCCTGTTGAAAAGGACAAGGAACGGAGTTCAACCTCACATTTGTAAGGCAGTGGAAAAAAGTCAGAACTTTA
AAATTTTCTACAGAGCACAGAACAGAACTTCTTACAGAAGCATTGAGATTTAGAAGTATTTTTCAGAGGGAAAAATCACAGG
AAGGAGATACAACCTGCTATAAGCATCACTGGAGTGACTCAAGAAAACTGTAATTTTGGAAAGTAAGTCCAGGAGGCTTTGACC
AAATTAATCTGCAACCAACAGAGTACTCTGTTTCTATGACTATAGAAATATTGAAGGATTTGTAGATCTCTCAGATTATCAA
GGAGGATTTGTATACTTTATGGAGGATTTAGTAGATTGCATTTATTTGCGTCAGAGCAAAGAGAAGAGATTATTTAAAGTGC
AATAGACCATGCTGGTAACTACATAGGTATTTCAATTGCGGATCAGGAAAGAGCCTTTAGAATTCGAGCAATATTTGAATCTTC
GCTTTGAAAAATACAGCACTGATGAATCCATCACATCTTTAGCAGAGTTTGTAGTCCAAAAAATATCACCTAGACATTCGGAG
CCTGTTAAAAAGAGTTCTAGCACTTACAGAAACATGTTTAGTAGAACGTGATCCGGCAACCTATAATATTGCAACATTTGAAGCC
TTTAGGAGAAGTATTTGCGTTGGTCTGTGACTCAGAAAAATCCACAACCTTTTACCATTGAATTTATAAAAGGGCAAGTACGGA
AATATTCTTCAACAGAGAGAGATTCTTATTAGCAAGTTTGTGATGGAGTAAGAGCCTCTGGTAATAGAGATGTTTGTGTA
AAAATGACACCAACCCATAAAGGTCAGCGATGGGGTACTCAGCATGCCTGTTGATGAGGAAGTAGAGAGCCTTACCTCAG
GTTCTTAGCTACGCCCTCAAATGGCAACTTTGCAGATGCTGTATTCAGGTTCAATGCTAATATTTTCATACAGTGGAGTCCATA
TGCAGTAACACAGGATGGTCTCTTCTCAGAAAAACAAAGAAAACTGATCAATAATGCCATAACAGCATTACTGTCCCAAGAAG
GGGATGTCGTTGCTTCAAATGCGGAACCTTGAGAGTCAAGTCCAGGCTGTGAGGAGGCTTGTGGCATCCAAAGCTGGTTTCTGG
CTTTCACCTCAGCTTCCAAAGTTTTCGCGAGCGTCTAGGGGTGAAGGTAGTAAAAAGCACTCAAAAAGAAGCAACAACGGAATAATC
CATGCAGCAGTTGATATGCTTTGTGCCCTTATGTGTCCCATGCATGATGACTTAAGACAAGAACAGTTGAACAAAGCT
TCTCTTCTCTCGTCAAAGAAGTTTCTGGAAAACTTACTGGAGAAATTTAATTTCCCATGTGGATCATGGGACTGGTGCCCTAGTT
ATTAGTTGCTCTTGGACTTCCCTTACCTTTGCCCTCTGTGCTCCATATAGTGAGACAACCTGAAGGGCAGCAGTTTGATATGCTC
TTGGAGATGGTAGCATCCAATGGAAGAACCCTTTTAAACTTTTTCAGCATCCTTCCATGGCAATAATAAAAGGAGCTGGGTT
GGTTATGAAGCAATAATAGAGGAAGGTGATAAAGAAATGCTACAAAAATGCAGGAGCTTGGCCTAAGTGAAGGTGCCTTAC
CTCGACACTTGCATACTGCGATGTTTACAATAAGCTCAGATCAAAGGATGCTTACAAATAGACAGCTAAGTAGACATTTAGTG
GGACTCTGGACAGCTGATAATGCAACTGCAACAAACTTGTGAAACGCATTTTGGCCAGGCTTGTGGCATACTTGGAAAGC
TCAGATCTCGTACCTGAGAAGGATGCTGATCGGATGCATGTTAGAGACAATGTGAAAAATAGCAATGGATCAGTATGGAAAAAT
TAATAAAGTCCAGAGTGGCAAGACTAGCTGAAAAAGCTGCTAAAGAAGTTGAAAAATTTGCCAAAGAAAAAGTGGATCTTG
TATTGATGCACTGGAGGGATAGGATGGGCATTGCTCAAAAAGAGAATATAAATCAGAAGCCAGTGGTTCTTCGAAAAGAGAAGA
CAAAGAATAAAAAATAGAAGCAAATTTGGGATCTCTTCTATTATAGGTTTGGTCAAGACCATGCCAGGTCAAACCTTATTTGGAA
TTTCAAACACGAGAAGAAGTGAAGATACTCTTGAATCTGAAATGAGAGCATTTAATATTGACAGAGAAGTGGAAAGTGCAA
ATGTGATCTCTGGAACCACCATGAGTTTGAAGTTAAATATGAGTGCCTGGCAGAGGAAATTAATAAGGAGACTATTACCTG
AGACTACTATTGGAGGAAGATGAGAATGAAGAAAGTGATCAATTAAGAGATCGTATGAATTTTCAATGAGCTTTATCATCG
CTTCTTGCTCACCCCAAAAGTAAACATGAAGTGTATGTTTACAAGCCCTTGTATTGTTTATGGCAGATGTCACGAAGAAAT

```

AGGACCTTTTACAGATACCAGATATATCATTGGAATGTTAGAGAGGTGCACAGATAAACTTGAACGAGATAGGTTGATTCTCT  
 TCCTTAACAAGTTGATCCTTAATAAGAAAAATGTTAAGGATCTCATGGATTCAAATGGAATAAGAATCCTTGTGGACTTGCTT  
 ACCCTTGACATCTCCATGTAAGCCGAGCTACAGTACCAGTCAAAGCAATGTAATTGAAGCTGCTCCAGATGAAAAAGAGAG  
 AGTGAAGAAGGAATGGTATTTTGGCAACGCAGACAAAAGAAAGGAGTGGCCCGTATGGATTTCATGAGATGCAAGAATGTGGAC  
 CAAAGGAATGTTAAATGCAAAAACCAGATGCTGGGCTCAAAGGATGGATGGCGACCAGCTTCAGTCCATACCCCGTTA  
 AGTGGTGTCTTTAGCCAGTGGACAGGCTGTCTGAACTGAACTGACCTTGCTACCCCTATATTGAACATGTTGATCACAATGT  
 GTGGATATTTTCCAAGCAGGGATCAAGACAATGCCATCATTCGGCCTTACCCAAAAGTAAAAAGACTGCTGTGAGATGCACTT  
 GCCTTCCCATATTATTCAGCTACTGCTGACCTTTGACCCTATCCTTGTTGAGAAGGTTGCTATTTTGTATACCATATCATGC  
 AAGATAACCCACAGTTACCCCGCTTATCTGAGTGGAGTATTTTCTTTATCATGATGTACACAGGTTCCAAATGTGCTTCTGT  
 TTGCTCGATTTTGAATACACACATACCAAACAGGCTTCAAGTCAGAAGAGACAAAAGGACAAGATATTTTTCAGAGAAAGT  
 ATACTTGGGCACATTCTACCTGAAGCAATGGTTTGTACTTAGAAAATTATGAACCTGAAAAGTTTTCTGAGATTTTCTAGG  
 AGAATTTGATACTCCAGAAGCAATCTGGAGCAGTGAATGAGGCGCTGATGATAGAGAAGATTGCTGCCATCTCGCGGATT  
 TCACACTCGTCTTCCAGAGTAACACAAGAGCACTTTATCAGTATTGCCCATTTCTATAATCAACTTCCACAACCTCGAAAAATG  
 AACTATTTTGTAAATATTTATTACCTCAAACAACCTGTGTGATACACTCCGGTTCCAGATTGGCCAATTAAGACCCGGTTAAGC  
 TTCTAAAAGATACCCCTGATGCCTGGAAGAAAGAAGTAGAAAAGAAGCCACCTATGATGTCAATAGATGATGCTTATGAAGTG  
 CTTAATCTGCCTCAAGGACAGGGACCGCATGATGAGAGCAAGATTAGGAAAGCTTACTTCAGACTTGCACAAAAGTACCACCCT  
 GATAAGAATCCAGAAGGGAGGGACATGTTTGAAAAAGTAAATAAAGCATATGAATTTTTATGTACCAAATCAGCAAAAATAG  
 TGGATGGGCCAGATCCAGAGAAATAAATTTAATTCTAAAACACAGAGCATCCTTCAACCGTCATAAAGAAGATTTACAG  
 CCTTATAAATATGCAGGATACCCCATGCTTATTCGGACTATAACAATGAAACCTCAGATGACCTCCTTTTCTCAAAAAGATCA  
 CCATTGTGCTGCGGCTACAGAGCTAGCTTTCCATACTGTCAACTGTTTCAAGCCCTCAATGCTGAAGAGCTCAGAAGAGAGAAT  
 GGACTAGAGGTGTACAAGAGGCATTTAGTCTGCTGTGCTGCTTCAAGTCTAGTAAACCAAGTGCATGACATGTACGTACA  
 GGTGTGGGATACATAAAGTAAATGCTACAGTGTGGCTGCTCAGTTTGGAGGAATGCCGAGAGAAGATCAGGAAATGCCATAGCA  
 TCATCAAGGATCTCTGCTCGGTTACTATATTTTGGCAAGAGTATTCCTCGGTAGCTGCTCTTGGGGTAGAATGTGTGAGTCTT  
 TTGCTGTGGATTTCTGGCTACAGACACACCTATTTCAGGCTGGAATTTTGGTATCTCCTTGGTTTCTGTTAATTATGACT  
 ACACACTAGAAGAGAGTGGCATTCAAGAAAAGTGAAGAAAACAACCAGCAGGAGGTAGCAAAACAGCCTTGCCAAAGTGTGCT  
 CATGCTCTGAGTGCCTTGGAGGGTATTTGGCTGAAGAACAAGCAACTCCAGAAAATCCAACATAAGGAAAAGCTTAGCTGG  
 CATGCTGACACCCTATGTTGCTAGAAAACCTGCTGTGGCTAGTGTGACTGAGATTTTGAAGATGCTTAAACAGCAACACAGAAA  
 GTCCATTTGATATGGAACAATTTCTACAAGAGCAGAATTACTTGAATTTTGAATCCCAACAAGAAAAGATGATTAAAAAA  
 GGTGATTTGACAAAACCTTATGGATCAGAATTTGCTACAGTATGATGCTTCAAGAACTTATTGTAGGGAGATTTTGTAG  
 GGTGATAATGAAGTTCTACTTTTCAACTGGAGTTTCAAAAAGCAATTTGCTGCAAGTCTCTTGGATATATAGGCTCGCAGGC  
 CCAATACTTGCACACATTCTATGGCCATCACACACGCGGCAAAAAGTGGAGTCAAGCAACATGGAGATCGCTTACCAGAGTAGA  
 AATGGCTTTGGAGGCTCTGAGAAAATGTCATAAAATACAATCCAGGTTCTGAGAGTGAATGCATTGGGCACCTTAAAGTTGATAT  
 TTTCTCTTCTCCGAGTTCATGGAGCTGGTCAAGTGCAGCAGTTGGCTTTAGAGGTTGTGAATATAGTGACATCTAACCAAGACT  
 GTGTCAACAATATTGCTGAATCAATGGTTTTGTCAGTATTTAGGCTCTTCTACATTCATTGCCATCAAGTCTGAGCTGTTTC  
 TGGAAAACCTTTATGCTTTGACATCGAGTACAAAAATAATCAAAGAAGCAATGGCAAAGGGTGCTTTGATCTATTTACTGGAT  
 ATGTTTGTCAATTCACACATCCACAGGTTCCAGCCCAACAGCAGAACTTTTGGCAAAATGACAGCAGATAAACTGATAGGT  
 CCAAAGGTTCGAATACGTAAATGAAATTTCTACCAAGCGTTTTCTAGGATGCTATGAGAGACAACTGAAGCTGCTGTACA  
 TATTTTGAAGCAACTCATAAAAATCCTGAGTTAATTTGGAATGATAAATCCAGAGATAAAGTGTCCCAACAAGTTAGGAAA  
 TGATGCTAGAGCACTTAAAAATCAGCAGGACAACCCTGAGGCAAACTGGAAGTTGCCTGAAGATTTTGTGTGTTTGGGA  
 GAAGCAGAGGGTGAACCTGCTGTTGGAGGAGTCTTCTTGGAGTCTTTATTGCACAACCAGCCTGGGTTCTAAGAAAAGCCTAG  
 AGAATTTCTTATTTGCCCTGTTAGAAAAATTAAGTGAAGTCTTCTAGAGAAGAACAATCCTCATGGAGAAAAGCTTGGAAAACCTTGA  
 CAATGGCAACAGTGTGTCTTTCAGCGCACAACTCAGCTGGCAGATCAGTCCCGCCATTGGGGCCTTTCCCAAAGTTATCC  
 AGGCAATGAATCATAGGAACAATGCCATTCTAAGAGTGGCATTTCGGGTTATCCATGCCTTGCTGAAAATGAGCTGTGTGTTT  
 GAGCCATGGCATCTTTAGAGACCATTGGCCCACTGATGAAATGGAATGAAAAGCGAGCAGATACTGTTGGTCTAGCCTGTGAA  
 GCAATTAATCGAATGTTTCCAGAGGAGCAGAGTGAATTAGTAGCACAAAGCCCTGAAAGCAGATTTGGTTCCATACCTCTTAAA  
 ATTAAGCAAGGCACTTGGCCTTGAACACTGGACAGCCGACAGCCACTAAGGCTCAGATTGTTAAAGCTTCAAGCTCAAGGTGAC  
 TCGAAGTTTGCAGTATGGAGAACAGTGAATGAAATCCTGTGCGGTTCTTTCAGTCTGGAGTGCCTTCAAAGATCAGAAAATG  
 ATTTGTTCACTTTCTGAGTCAACAACAGCAGGATACCTCACAGGACCTGGAGTGTGCTGACCTTACCAGCAGGTACATCTACAT  
 CAGTCATGCTAACCTGCCACCTCCTGTAGACCATGAGGACAGGCGACCTTTGGCTATCAGACTCACCGGCGCCCGGGGATCCGAT  
**CATGGACTACAAGGATGACGATGACAAATAA**TCTAGAGTGAAGGTTCCACACCTGGGACCCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCACGT  
 GGGAGACAAGAAATCCCTGTTAATATTTAAACAGCAGTGTTCACCATCTGGGTCCTTGACCCCTCACTCTGGCCTCAGCCGA  
 CTGCACAGCGGCCCTGCATCCCTTGGCTGTGAGGGCCCTGGACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGGG  
 TCCCACGAATTTGCTGGGGAATCTCGTTTTCTTTAAGACTTTTGGGACATGGTTTTGACTCCCAGAACATCACCGACCGCTCT  
 CCTGTTTTTCTGGGTGGCTCGGGACACCTGCCCCTGACAGGAGGTCAGGACTGTGACTCTTTTAAAGGCGAGCAGGTGGC  
 TGGACATTTGCTTGGTGGACGGGACTGGGGATGTGGGAGGAGCAGACAGGAGGAATCATGTACAGGCTGTGTGTGAAAAG  
 AAGCTCCACTGTACCCCTCCACCTTTCACCCCCACTCACAGTGTCCCTCCACTGTACATTTGAATGAACTTCAAGGATAA  
 TAAAGTGTTCCTCCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAATTAATTAAGTGGCGTCTGTTTA  
 CAACGTCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATGCGCTTGCAGCACATCCCCTTTCCGAGCTGGCGTAATAGC  
 GAAGAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACG  
 CATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCAGCGGGCGGTGTGG  
 TGGTTACCGCGCAGCGTACCCGTACACTTGCAGCGCCCTAGGCGCCCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCCGACAGTT  
 CGCCGGCTTTCCCGCTCAAAGTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA  
 ACTTGATTTGGGTGATGGTTACAGTGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCCTTTGACGTTCCGAGTCCACCGTTCTT  
 TAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGAT  
 TTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTAACCGAATTTTAAACAATAATTAACGTTTACAATTTTAT  
 GGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG  
 GGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGTTTTACCGCTCATC

## 7 Anhang

ACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGT  
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCCTCATGA  
GACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCT  
TTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC  
GAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTTCCAATGATGAGCA  
CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCATACACTATTCTC  
AGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC  
ATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCGTTTTTTGCACAA  
ATGGGGGATCATGTAACCTGCTTGGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGCAT  
CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGG  
ATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGT  
GAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGT  
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAAGTCTCAGACCAAGT  
TACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCA  
TGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT  
TTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGGCAAAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAA  
CTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACT  
TCAAGAACTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAAGTCGTGTC  
TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCT  
TGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGCGG  
ACAGGTATCCGGTAAGCGGAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCTTGGTATCTTTATAGT  
CCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGC  
AACCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATA  
ACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCGGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGG  
AAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCTTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGTTTTCCCGACTGGA  
AAGCGGGCAGTGAGCGCAACGAATTAATGTGAGTTAGCTACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC  
GTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTAATTCCTCC  
CCAGCAGGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCC GCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAA  
CTCCGCCAGTTCGGCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTGTA  
GCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAAC  
AGAGAGGAATCTTTCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAGGAGTGCCTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCACTGGGCAGAG  
CGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGAGGGTTCGGCAATTTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAAC  
TGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCCCGTGAAC  
GTTCTTTTTCGCAACGGTTTGGCCGAGAACACAGGTAAGTGCCTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTAT  
GGCCCTTGGCTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCCGGTTGGAAGTGGGTGGGAG  
AGTTCGAGGCCTTGGCCTTAAGGAGCCCTTCCCTCGTGTGTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCCGCGGTGCGA  
ATCTGGTGGACCTTCCGCGCTGTCTCGTGTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTT  
TTTTCTGGCAAGATAGTCTTGAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCAGCGG  
GCCCCGTGCGTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGGCGGGCCTGCGAGCGCGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCT  
GGCCGGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCACTG  
CGTGAGCGGAAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACCGCGGCTCGGGAGAGCGGGCGGGT  
AGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGC  
ACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTG  
AGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTGTAATTTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGT  
TCATTTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTGAGGAATTCGGTACC

## 7.4 Lebenslauf

### LEBENS LAUF

**JOANNA MAUS**

#### PERSÖNLICHE DATEN

Anschrift

[REDACTED]

Geburtstag

[REDACTED]

Geburtsort

[REDACTED]

Staatsangehörigkeit

[REDACTED]

#### AUSBILDUNG

Februar 2015 - August 2018

**Doktorarbeit im Fachbereich Biologie**

Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

[REDACTED]

**Diplom im Fachbereich Biologie**

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]

**Biologiestudium**

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

## 7.5 Publikationsleistung

### Publikation in Fachzeitschrift:

[REDACTED], Joanna Maus, [REDACTED]

[REDACTED] (in Begutachtung): Receptor-mediated endocytosis 8 (RME-8)/DNAJC13 is a new component of the proteostasis network and modulates autophagy

### Posterpräsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen:

**J. Maus,** [REDACTED] (2016)

Characterization of hRME8, a newly identified regulator of protein homeostasis.

- *FTN Status-Meeting*, Mainz

**J. Maus,** [REDACTED]

[REDACTED] (2017): Characterization of hRME8, a newly identified regulator of protein homeostasis.

- *FTN-Retreat*, Mainz.

- *EMBO conference "Autophagy- From molecular principles to human diseases"*, Kroatien.

- *Collaborative Research Center 1080*, Frankfurt.

## 7.6 Danksagung

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]