

Aus dem Institut für Pathobiochemie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Funktionelle und strukturelle Charakterisierung des Proteins DNAJC13 und der mit
Morbus Parkinson assoziierten Mutation DNAJC13(N855S)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Anna Stein
aus Mainz

Mainz, 2019

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Begutachtung:

2. Begutachtung:

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
2. Literaturdiskussion	4
2.1. DNAJC13	4
2.1.1. Das Protein DNAJC13 in seiner Struktur.....	4
2.1.2. Funktionelle Charakterisierung von DNAJC13	5
2.1.3. Die Mutation DNAJC13(N855S).....	9
2.2. M. Parkinson.....	11
2.2.1. Das Parkinson Syndrom als Ausdruck von Neurodegeneration	11
2.2.2. Überblick familiärer M. Parkinson	12
2.2.3. Zellbiologische Pathomechanismen des M. Parkinson	13
2.3. M. Parkinson und Retromer	14
2.3.1. Der Retromer- Komplex.....	14
2.3.2. Die Degradation von <i>alpha</i> -Synuclein ist Retromer-abhängig	15
2.3.3. Die Retromer-WASH-Interaktion.....	17
2.4. Autophagie.....	19
2.4.1. Der Mechanismus der Makroautophagie.....	20
2.4.2. Die Membranzufuhr und ATG9	23
2.4.3. M. Parkinson und Autophagie	25
2.5. Zielsetzung.....	27
3. Material und Methoden	28
3.1. Materialien	28
3.1.1. Geräte	28
3.1.2. Chemikalien.....	29
3.1.3. Antikörper	29
3.1.4. Oligonukleotide	31
3.1.5. Plasmide	34
3.1.6. Modellorganismen	35
3.1.7. Kits und Standards.....	36

3.1.8. Software	36
3.2. Methoden	37
3.2.1. Zellbiologische Methoden	37
3.2.2. Proteinanalytik.....	42
3.2.3. Molekulargenetische Methoden	49
3.3. Statistische Auswertung	53
4. Ergebnisse	54
4.1. Herstellung einer stabilen DNAJC13 <i>Knockdown</i> -Zelllinie.....	54
4.1.1. Bestimmung der Selektierungs-Bedingungen.....	54
4.1.2. Etablierung der stabilen DNAJC13- <i>Knockdown</i> Zelllinie	56
4.1.3. Genregulation der Interaktionspartner von DNAJC13 im stabilen <i>Knockdown</i>	57
4.2. Strukturelle Charakterisierung von DNAJC13(N855S)	59
4.2.1. Bestätigung der Mutagenese DNAJC13(N855S)	59
4.2.2. Die Lokalisation von DNAJC13(N855S) an endosomalen Kompartimenten	59
4.2.3. Zelluläre Stabilität von DNAJC13(N855S).....	66
4.3. Retromere Funktion von DNAJC13	69
4.3.1. Assoziation von DNAJC13(N855S) mit dem Retromer-Komplex	69
4.3.2. Die Verteilung von Cargo-Molekülen unter DNAJC13(N855S).....	72
4.3.3. LAMP2a und Cathepsin D-Spiegel im stabilen <i>Knockdown</i>	75
4.3.4. Cathepsin D-Aktivität im stabilen DNAJC13- <i>Knockdown</i>	78
4.4. DNAJC13(N855S) und Autophagie	81
4.4.1. Assoziation von DNAJC13(N855S) mit autophagischen Strukturen.....	81
4.4.2. Autophagie unter <i>Recovery</i>	82
4.4.3. Autophagischer Flux unter Überexpression von DNAJC13(N855S).....	85
4.4.4. Die Rolle von DNAJC13 in der Autophagie.....	86
5. Diskussion	90
5.1. Strukturelle Charakterisierung von DNAJC13(N855S)	90
5.1.1. Die subzelluläre Verteilung ist durch DNAJC13(N855S) unbeeinträchtigt.....	90
5.1.2. Die Punktmutation DNAJC13(N855S) führt zu einer Destabilisierung des Proteins	94
5.2. DNAJC13(N855S) und die retromere Funktion	96
5.3. DNAJC13(N855S) und Autophagie	98
5.3.1. Der stabile <i>Knockdown</i> von DNAJC13 führt zur Repression autophagischer Gene	99
5.3.2. Der ATG9-Stoffwechsel stellt den Schnittpunkt der unter stabilem <i>Knockdown</i> von DNAJC13 regulierten Gene dar	103

5.3.3. DNAJC13 könnte als J-Protein Abschnürungsvorgänge regulieren.....	104
5.4. DNAJC13(N855S) als M. Parkinson assoziierte Mutation	107
5.5. Ausblick	110
6. Zusammenfassung	112
7. Literaturverzeichnis.....	114
8. Anhang.....	125
8.1. Plasmid-Karten.....	125
8.1.1. pEF-Bos-DNAJC13-FLAG	125
8.1.2. pEF-Bos-DNAJC13-GFP.....	130
8.1.3. pEF-Bos-DNAJC13(N855S)-FLAG.....	135
8.1.4. pEF-Bos-DNAJC13(N855S)-GFP.....	140
Danksagung	147
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

AD	autosomal dominant
AMPA	Glutamat Rezeptor Typ AMPA
ATP	Adenin-Triphosphat
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	<i>Mikroliter</i>
3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMPK	AMP- activated protein kinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	<i>autosomal rezessiv</i>
ATG	<i>autophagy related gene</i>
ATP	Adenosin Tri-Phosphat
BafiA₁	BafilomycinA ₁
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration [mol/l]
ca.	circa
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaCl₂	Calciumchlorid
CCV	<i>clathrin coated vesicle</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CI-MPR	<i>cation-independent mannose-6-phosphat-rezeptor</i>
CMA	<i>chaperon mediated autophagy</i>
Ctrl	<i>control, Kontrolle</i>
Ct-Wert	<i>cycle-threshold-Wert</i>
d	Schichtdicke [cm]
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochloridhydrat
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxy-Ribonucleid Acid</i>
DMT-1	divalenter Metalltransporter I
DNMT-1	DNA-Methyl-Transferase 1
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>e.coli</i>	<i>escherischia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
EGF-R	<i>epidermal growth-factor-receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER Golgi Intermediate Compartment</i>
ESCRT-Komplex	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
g	Gramm

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLUT1	Glucose-Transporter 1
h	Stunde
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HSC	<i>heat shock cognate</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
Kb	Kilobase
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
KH₂HPO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LAMP	<i>lysosome-associated membrane glycoprotein</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LIR	<i>LC3-interacting region motif</i>
LRRK2	<i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
M	mol/l
M. Alzheimer	Morbus Alzheimer
M. Parkinson	<i>Morbus Parkinson</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mock	Attrappe, Plasmid ohne Insert
mol	Mol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTORC1	<i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
MVB	<i>multi-vesicular bodies</i>
n	Statistische Fallzahl
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
p	P-Wert, Signifikanzwert
PAS	<i>preautophagosomal structure</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PINK	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
qPCR	quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion
r	<i>Pearson´s Correlation</i>
RABGAP	<i>RAB activating protein</i>
RISC	<i>RNA induces silencing complex</i>
RME-8	<i>receptor mediated endocytosis 8</i>
RNA	<i>ribonucleid Acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RQ	<i>relative quantification</i>
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresis</i>

sec	Sekunde
shRNA	<i>small hairpin-RNA</i>
SNCA	<i>alpha-Synuclein-Gen</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNX	<i>Sorting Nexin</i>
sog.	sogenannte(r)
Tf-R	Transerrin-Rezeptor
TGN	<i>Trans-Golgi-Network</i>
TMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	Unter Anderem
u	Units
ULK	<i>Unc-51-like-Kinase</i>
VPS	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein</i>
WASH-Komplex	WASP and SCAR homologue Komplex
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WIPI	<i>WD repeat domain phosphoinositide-interacting</i>
z. Bsp.	<i>Zum Beispiel</i>
ε	molare Extinktionskonstante [$\text{mol/l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des humanen DNAJC13 und M. Parkinson assoziierter Mutationen.....	5
Abbildung 2: Dysfunktion des Retromer Komplex führt zu verminderter lysosomaler Degradation von <i>alpha</i> -Synuclein.....	16
Abbildung 3: Schemazeichnung von Retromer- und WASH-Komplex.	17
Abbildung 4: Überblick Makroautophagie.....	22
Abbildung 5: Konstrukt Nr. 3 zeigt den effektivsten <i>Knockdown</i> . Nach 96 h ist der stärkste <i>Knockdown</i> zu verzeichnen.	55
Abbildung 6: Erfolgreiche Etablierung stabiler DNAJC13- <i>Knockdown</i> Zelllinie.	57
Abbildung 7: Die mRNA-Spiegel DNAJC13-assoziiierter Genen sind unverändert im stabilen <i>Knockdown</i> -System..	58
Abbildung 8: Die Sequenzierungsergebnisse bestätigen die erfolgreiche Mutagenese von DNAJC13(N855S).....	59
Abbildung 9: Subzelluläre Verteilung von wildtypischem und mutantem DNAJC13	60
Abbildung 10: DNAJC13(N855S)-GFP ist am frühen Endosom lokalisiert.	61
Abbildung 11: Kolokalisation von DNAJC13(N855S) mit Tf-R, als Marker für das Recycling-Endosom.	62
Abbildung 12: Kolokalisation von DNAJC13(N855S) mit RAB11, als Marker für das Recycling-Endosom.	63
Abbildung 13: DNAJC13(N855S) ist, wie auch das wildtypische DNAJC13, nicht auf dem späten Endosom lokalisiert.....	64
Abbildung 14: Weder wildtypisches noch mutantes DNAJC13 lokalisieren am <i>Trans</i> -Golgi-Netzwerk.....	65
Abbildung 15: DNAJC13(N855S) kolokalisiert nicht mit LAMP2a.....	66
Abbildung 16: DNAJC13(N855S) wird schneller degradiert als das wildtypische Protein.....	68
Abbildung 17: DNAJC13(N855S) kolokalisiert weiterhin mit VPS35, als Marker für den Retromer-Komplex.	70
Abbildung 18: Die Mutation DNAJC13(N855S) führt nicht zum Verlust der Assoziation zu SNX1.....	71
Abbildung 19: Die Mutation DNAJC13(N855S) führt nicht zu einer veränderten Assoziation mit Komponenten des WASH-Komplex.	72
Abbildung 20: Die Transfektion von DNAJC13(N855S) führt zur Streuung von Cl-MPR ohne Akkumulation auf dem Golgi-Apparat.....	74
Abbildung 21: Cathepsin D- und LAMP2a-Level sind unverändert im Total-Lysat unter stabilem <i>Knockdown</i> von DNAJC13.....	77
Abbildung 22: Die Cathepsin D-Aktivität ist in der lysosomal angereicherten Fraktion der stabilen DNAJC13- <i>Knockdown</i> -Zelllinie unverändert.....	80
Abbildung 23: DNAJC13(N855S) lokalisiert auf autophagosomalen Strukturen.....	82
Abbildung 24: <i>Recovery</i> von DNAJC13(N855S) im stabilen <i>Knockdown</i> -System kann den autophagischen Flux nicht wiederherstellen.	84

Abbildung 25: Überexpression von DNAJC13(N855S) kann den autophagischen Flux nicht steigern.	86
Abbildung 26: Expressionsprofil autophagischer Gene im stabilen DNAJC13- <i>Knockdown</i>	89
Abbildung 27: Der Zusammenhang der unter stabilem <i>Knockdown</i> von DNAJC13 regulierten Gene.....	103
Abbildung 28: Modell der Beteiligung von DNAJC13 an der Synthese von endosomalen Vesikeln.	106
Abbildung 29: DNAJC13 in der Pathogenese von M. Parkinson.	107
Abbildung 30: Vektorkarte des wildtypischen DNAJC13 im Vektor pEF-Bos mit FLAG-Markierung.....	125
Abbildung 31: Vektorkarte des wildtypischen DNAJC13 im Vektor pEF-Bos mit GFP-Markierung.....	130
Abbildung 32: Vektorkarte von DNAJC13(N855S) im Vektor pEF-Bos mit FLAG-Markierung	135
Abbildung 33: Vektorkarte von DNAJC13(N855S) im Vektor pEF-Bos mit GFP-Markierung	140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte mit familiärem M. Parkinson assoziierte Gene und Loci	13
Tabelle 2: Geräteliste	28
Tabelle 3: Antikörper, Western-Blot.....	29
Tabelle 4: Antikörper, Immunfluoreszenz	30
Tabelle 5: Oligonukleotide, Realtime-Q-PCR	31
Tabelle 6: Oligonukleotide, Mutagenese	34
Tabelle 7: Oligonukleotide, Sequenzierung	34
Tabelle 8: Plasmide, Überexpression	35
Tabelle 9: Plasmide, <i>Knockdown</i>	34
Tabelle 10: Bakterien.....	35
Tabelle 11: Zelllinien.....	35
Tabelle 12: Kits und Standards.....	36
Tabelle 13: Software.....	36
Tabelle 14: PCR-Protokoll, Mutagenese	51
Tabelle 15: PCR-Protokoll, RT-Q-PCR.....	53

1. Einleitung

Im demographischen Wandel unserer Gesellschaft steht die moderne Medizin ständig neuen Herausforderungen gegenüber. Durch die steigende Lebenserwartung unterliegen wir einer strukturellen Verschiebung hin zu Erkrankungen des höheren Alters. An Relevanz haben vor allem onkologische und neurodegenerative Erkrankungen gewonnen. Während die Onkologie mit neuen erfolgreichen Therapiekonzepten arbeitet, stehen für neurodegenerative Erkrankungen häufig rein symptomatische Behandlungsoptionen zur Verfügung.

Im Vergleich zu anderen gesellschaftlichen Erkrankungen, wie beispielsweise solchen des Herz-Kreislauf-Systems, bergen Erkrankungen des neurodegenerativen Formenkreises ein besonderes Ausmaß an psychosozialer Belastung. Dies ist der über Jahre unaufhaltsamen Progression der Symptome geschuldet. Nicht selten kommt es zu massiver Wesensveränderung, kognitiver Reduktion wie Amnesie und motorischer Dysfunktion. Krankheitsbilder wie Alzheimer Demenz oder Amyotrophe Lateralsklerose rücken immer wieder in den Fokus wichtiger gesellschaftlicher Debatten um Patientenverfügung und Sterbehilfe. Die langjährige starke Beeinträchtigung der Alltagsbewältigung birgt einen hohen pflegerischen und sozioökonomischen Bedarf.

Unter altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen werden Krankheitsbilder verstanden, die durch einen progressiven und selektiven Untergang von neuronalem Gewebe charakterisiert sind. Klassische Beispiele bilden unter anderem Morbus Parkinson (M. Parkinson), Morbus Alzheimer (M. Alzheimer), Amyotrophe Lateralsklerose oder Chorea Huntington. Typisch ist ein direkter Zusammenhang der pathogenetischen Biochemie des im speziellen veränderten Proteinstoffwechsels, der Selektivität des betroffenen neuronalen Gebietes und einem damit verbundenen charakteristischen klinischen Erscheinungsbild (Jellinger, 2009).

Allen neurodegenerativen Erkrankungen ist die intra- und extrazelluläre Ablagerung von pathologischen Proteinaggregaten gemein. Ob dieses Charakteristikum die kausale toxische Komponente bildet, oder eher den Versuch der Zelle darstellt, die Homöostase zu erhalten, bleibt ungeklärt. Bisher wurden zahlreiche im Rahmen von Neurodegeneration veränderte Stoffwechselwege identifiziert. Als wichtigste Faktoren

seien hier oxidativer Stress, Fehlfaltung von Proteinen z. Bsp. durch dysfunktionale Chaperone und Störung der degradativen Vorgänge, wie dem proteasomalen System oder der Autophagie, genannt (Douglas and Dillin, 2010). In dieser Arbeit soll das Augenmerk vor allem auf dem Zusammenhang zwischen Autophagie und dem Krankheitsbild M. Parkinson liegen.

Bei M. Parkinson handelt sich um eine Störung des extrapyramidal motorischen Systems, welches sich durch einen typischen Symptomkomplex aus Rigor, Tremor, Akinesie und posturaler Instabilität manifestiert. Grundlage dieser dyskinetischen Störung bildet ein zentraler Dopaminmangel durch Verlust dopaminerger Neurone im Mittelhirn. Es werden erbliche Krankheitsverläufe beschrieben. Zum größten Teil tritt die Erkrankung jedoch spontan auf. Auf zellulärer Ebene wurde bei einigen Betroffenen eine dysregulierte autophagische Funktion beobachtet.

Autophagie bezeichnet eine spezielle Form der lysosomalen Degradation, welche zelleigene Materialien, ganze Organellen oder große extrazelluläre Komponenten abbaut. Innerhalb des Begriffs der Autophagie wird weiterhin unterschieden. Die Degradation der Mitochondrien wird als Mitophagie bezeichnet. Die Chaperon vermittelte Autophagie beschreibt den Transfer kleiner Cargo-Moleküle direkt in das Lysosom. Größere Moleküle unterliegen der Makroautophagie, bei der es zur Bildung einer endosomalen Struktur namens Autophagosom kommt. Viele der für familiären M. Parkinson bekannten Mutationen zeigen eine Beeinträchtigung dieser Vorgänge an den unterschiedlichsten Stellen (Nixon, 2013). Mutationen in den Parkinson-assoziierten Genen *PTEN-induced kinase 1* (PINK) und Parkin beeinträchtigen die Mitophagy. Andere wie die der *leucine-rich repeat kinase 2* (LRRK2) stören die Chaperon vermittelte Autophagie (*chaperon mediated autophagy* = CMA). Die lysosomale Degradation sorgt für den Abbau von *alpha*-Synuclein, dem wichtigsten Protein innerhalb der Pathogenese von M. Parkinson (Corti et al., 2011).

Eine weitere Verbindung zwischen autophagischer Degradation und M. Parkinson stellt die Mutation VPS35(D620N) dar, welche die Interaktion des *Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog* (WASH) Komplex mit endosomalen Strukturen stört und konsekutiv die Makroautophagie beeinträchtigt (Zavodszky et al., 2014). Das betroffene Protein VPS35 ist Teil des Retromer-Komplexes. Eines Protein-Komplexes, der aus unterschiedlichen Domänen besteht und endosomale Sortierungsvorgänge hin zum Golgi-Apparat oder zur Plasmamembran reguliert (Cui et al., 2017). Da auch

weitere mit M. Parkinson assoziierte Mutationen (*LRRK2*-Gen, *RAB7L1*-Gen) zu einem gestörten Retromer-abhängigen Transport führen, scheint der Retromer-Komplex eine nicht unerhebliche Rolle in dessen Pathogenese zu spielen (MacLeod et al., 2013).

Ein weiteres Retromer-assoziiertes Protein ist DNAJC13. Mutationen im *DNAJC13*-Gen wurden ebenfalls mit M. Parkinson assoziiert (Vilarino-Guell et al., 2014). Dieses Protein interagiert sowohl mit dem WASH- als auch mit dem Retromer-Komplex. Es reguliert endosomale Reifung, retrograden Transport und Autophagie. DNAJC13 scheint einen Schnittpunkt von M. Parkinson, Retromer-abhängigem endosomalem Transport und Autophagie zu bilden. Für die Mutation *Vacuolar protein sorting-associated protein* (VPS) VPS35(D620N) sind einige funktionelle Zusammenhänge bereits beschrieben; für die mit M. Parkinson assoziierte Mutation im *DNAJC13*-Gen bisher noch nicht.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der mit M. Parkinson assoziierten Mutation DNAJC13(N855S) und gestörter autophagischer Degradation gibt. Weiterhin soll die Integrität des Retromer-abhängigen retrograden Transportes unter Mutation von DNAJC13 überprüft werden. Die Beschreibung der Mutation DNAJC13(N855S) kann außerdem zur grundlegenden Kenntnis der nativen Funktion des Proteins DNAJC13 beitragen und schlussendlich dem wachsenden Verständnis der Pathogenese von M. Parkinson dienen.

2. Literaturdiskussion

2.1. DNAJC13

2.1.1. Das Protein DNAJC13 in seiner Struktur

DNAJC13 ist das humane Ortholog des ursprünglich im Zusammenhang mit rezeptor-vermittelter Endozytose in *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) entdeckten Proteins RME-8 (*receptor mediated endocytosis 8*). Das *rme-8*-Gen ist mit Ausnahme von *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) über mehrere Spezies hochkonserviert. (Koumandou et al., 2013, Zhang et al., 2001) Der Bezeichnung zufolge ist das Protein das 13. Mitglied der Gruppe C der DNAJ bzw. *heat shock protein 40* (HSP40) Familie und dient als Co-Chaperon für *heat shock cognate 70* (HSC70). Die Einteilung der DNAJ-Proteine wurde auf struktureller Basis getroffen und hat wenig funktionelle Konsequenz. Die Gruppe C beschreibt solche Proteine, denen lediglich die J-Domäne gemein ist und diese nicht N-terminal tragen (Craig and Marszalek, 2017). In DNAJ13 fallen neben der J-Domäne vier funktionell noch unklare Domänen auf, die durch ihre repetitive Aminosäuresequenz aus Isoleucin (I), Tryptophan (W) und Asparagin (N) über eine Länge von ca. 60 Aminosäuren gekennzeichnet sind und deshalb als IWN-Domänen bezeichnet werden (Zhang et al., 2001). Mit insgesamt 2243 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 220 kDa ist DNAJC13 ein sehr großes Molekül, das in den meisten Gewebetypen unter anderem neuronal exprimiert wird. (Girard et al., 2005, Fujibayashi et al., 2008). Mikroskopisch beobachtet man eine zytosolische, gepunktete Verteilung mit perinukleärer Akkumulation und Kollokalisierung auf dem frühen Endosom, dem Recycling Endosom und Clathrin ummantelten Vesikeln (*clathrin coated vesicle / CCV*), nicht hingegen auf dem Lysosom und dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) (Girard et al., 2005). Für das Vorkommen auf dem späten Endosom gibt es hinsichtlich der verschiedenen Spezies und auch innerhalb humaner Zelllinien unterschiedliche Befunde (Chang et al., 2004, Girard et al., 2005, Fujibayashi et al., 2008, Shi et al., 2009). Obwohl DNAJC13 mit membranösen Strukturen mikroskopisch kollokalisiert, zeigen Fraktionierungs-Experimente, dass es keinen integralen Bestandteil der Membran darstellt. Vielmehr bindet es mit dem N-Terminus über Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) indirekt an Membranen (Fujibayashi et al., 2008).

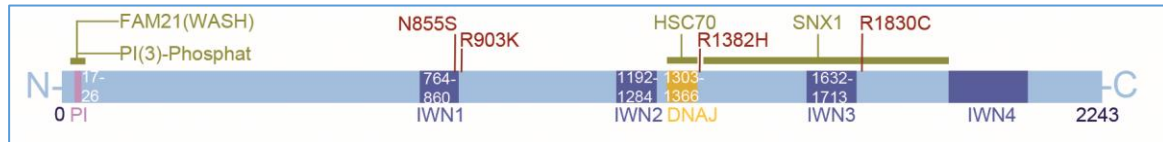


Abbildung 1: Struktur des humanen DNAJC13 und M. Parkinson assoziierter Mutationen. Das humane Protein besteht aus 2243 Aminosäuren. Es enthält vier Domänen aus repetitiven Aminosäuresequenzen (IWN = Isoleucin (I), Tryptophan (W) und Asparagin (N)), Mit der DNAJ-Domäne interagiert es mit HSC70. Über den N-Terminus wird PI(3)Phosphat und FAM21, als Bestandteil des WASH-Komplexes gebunden. Die Mutation DNAJC13 (N855S) liegt innerhalb der ersten IWN Domäne.

2.1.2. Funktionelle Charakterisierung von DNAJC13

DNAJC13 wurde erstmalig in *C.elegans* beschrieben und funktionell zunächst dem Prozess der Rezeptor vermittelten Endozytose zugeschrieben (Zhang et al., 2001). Aktuelle Daten sprechen für eine zentrale Rolle bei späteren endosomalen Transport- und Sortierungsvorgängen.

Mit der J-Domäne, als namensgebendes strukturelles Charakteristikum, interagiert DNAJC13 direkt mit HSC70 und aktiviert damit als Co-Chaperon dessen ATPase-Aktivität. (Girard et al., 2005). Die jeweilige Funktion von HSC70 kann variieren und wird durch das spezifische J-Protein bestimmt. J-Proteine sind an unterschiedlichen zellulären Oberflächen lokalisiert. Die Bindung des J-Proteins an HSC70 führt zu konstitutioneller Umlagerung der Domänen von HSC70. Dadurch wird die ATP-Hydrolyse begünstigt und die Substratselektivität erhöht (Craig and Marszalek, 2017). Sie katalysieren die Substratbindung an HSC70, erhöhen die Selektivität und bestimmen die Lokalisation der Reaktion (Mayer and Gierasch, 2019). Als Substrate für HSC70 dienen *de-novo* synthetisierte Polypeptide, fehlgefaltete Proteine- oder Faltungsintermediate, ebenso wie unter zellulärem Stress denaturierte Proteine. Die Funktion von J-Proteinen und HSC70 ist ein essentieller Faktor für die Proteostase.

Das am besten charakterisierte J-Proteine ist Auxilin/Sec2, welches an der Entmantelung von CCVs beteiligt ist. Da Auxilin auch zur Gruppe C der J-Proteine zählt, wird häufig versucht die Funktion von DNAJC13 in Analogie zu Auxilin zu betrachten. DNAJC13 hat wenig genetische Homologie mit Auxilin/Sec2 oder anderen J-Domänen (Zhang et al., 2001). Für einen Einfluss auf den Clathrin-Haushalt spricht, dass der *Knockdown* von DNAJC13 zu einer veränderten subzellulären Verteilung von Clathrin führt. Der Gesamt-Proteinspiegel von Clathrin bleibt dabei unverändert (Girard et al., 2005). Trotz seiner vier potentiellen Clathrin-Bindungsdomänen konnte jedoch keine direkte biochemische Interaktion mit Clathrin nachgewiesen werden (Girard et

al., 2005). Die Trunkierung der PI(3)P-bindenden Domäne von DNAJC13 führt zur veränderten Clathrin Verteilung. Die Interaktion von HSC70 mit DNAJC13 ist dabei weiterhin gegeben (Xhabija and Vacratsis, 2015). Möglich wäre also, dass der Einfluss von DNAJC13 auf den Clathrin-Haushalt nicht direkt HSC70 abhängig ist, sondern indirekt oder über einen anderen Interaktionspartner vermittelt wird.

Ein weiterer zellulärer Prozess, in dem DNAJC13 nachweislich Funktion übernimmt, ist die endosomale Sortierung. Vom frühen Endosom aus müssen Proteine zu unterschiedlichen Bestimmungsorten geleitet werden. Internalisierte Moleküle können aus dem frühen Endosom oder über das Recycling-Endosom zurück zur Plasmamembran gelangen. Am besten erforscht ist dieser Weg für den Transferrin Rezeptor (Tf-R). DNAJC13 lokalisiert zwar auf dem Recycling Endosom, der *Knockdown* von DNAJC13 hat allerdings keine Konsequenz auf die subzelluläre Verteilung von Tf-R. Es ist dem zu Folge von einer untergeordneten Rolle von DNAJC13 entlang der Recycling-Route auszugehen (Girard et al., 2005).

Alternatives Schicksal eines im frühen Endosom angelangten Proteins ist der Weg zum Golgi-Apparat. Dieser Transportprozess verläuft in entgegengesetzter Richtung des Sekretionsvorgangs und wird deshalb retrograder Transport genannt. Vermittelt werden diese Prozesse vor allem durch den Retromer Komplex, ein Multiproteinkomplex, der aus zwei dynamisch assoziierten, zum Teil funktionell unterschiedlichen Domänen besteht. Ein Dimer aus verschiedenen *Sorting-Nexin*-Isoformen (SNX1/ SNX2, SNX5/ SNX6) sorgt für die Membrantubulation, während der *Cargo Sorting Complex* aus VPS26, VPS35 und VPS29 die zu transportierenden Moleküle (*Cargo*) erkennt und bindet (Liu, 2016). Eines der typischen *Cargo*-Moleküle, welches den retrograden Weg nutzt, ist der *cation-independent mannose-6-phosphat*-receptor (CI-MPR). In der Zelle führt der Verlust von DNAJC13 zur perinukleären Ansammlung von CI-MPR und einer zunehmenden Kolokalisation mit TGN-Markern (Girard et al., 2005, Popoff et al., 2009, Xhabija and Vacratsis, 2015). Die retrograde Funktion von DNAJC13 ist maßgeblich abhängig von einer intakten Membranbindung über PI(3)P (Xhabija and Vacratsis, 2015). Außerdem konnte sowohl im humanen Zellsystem, als auch für *C. elegans* eine direkte Interaktion von DNAJC13 mit dem Retromer-Komplex über SNX1 nachgewiesen werden (Popoff et al., 2009, Shi et al., 2009).

Der eigentliche Einfluss von DNAJC13 auf den retrograden Transport scheint vor allem in der Membranorganisation zu liegen. DNAJC13 interagiert über SNX1, als

Bestandteil der Membrantubulations-Domäne mit dem Retromer. Der *Knockdown* von DNAJC13 führt zu einer Ausbildung von SNX1 positiven tubulären endosomalen Strukturen, die über Mikrotubuli mit dem Zytoskelett verbunden sind (Freeman et al., 2014). Weiterhin an der Membranorganisation beteiligt ist der WASH-Komplex. Dieser interagiert biochemisch mit der *Cargo-Sorting* Domäne des Retromer-Komplexes und kolokalisiert mikroskopisch mit SNX1. Durch Produktion von F-actin sorgt dieser für die Membranbewegung (Freeman et al., 2014). DNAJC13 interagiert über FAM-21 mit dem WASH-Komplex. Der *Knockdown* von DNAJC13 führt zu einer verstärkten Kolokalisation von WASH-Komplex und SNX1-positiven Membrantubulationen. Angenommen wird deshalb, dass DNAJC13 die Komponenten der Membrantubulation und der Membranbewegung koordiniert (Freeman et al., 2014).

Ausgehend vom frühen Endosom können Proteine schließlich auch zur Degradation geleitet werden. Durch Einstülpung von Membranabschnitten entstehen zunächst *multivesicular bodies* (MVB), die anschließend mit Lysosomen fusionieren. Dies geschieht mit Hilfe des *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT). Der ESCRT-Komplex katalysiert Biegung und Abschnürung von Membranen. Es besteht keine direkte Interaktion von DNAJC13 mit dem ESCRT-Komplex (Shi et al., 2009). DNAJC13 gilt allerdings als essentieller Faktor für die Organisation der verschiedenen Domänen auf großen Endosomen der Coelomocyten von *C. elegans* (Norris et al., 2017). Unterteilt werden die Domänen in einen ESCRT positiven, der Degradation zugeschriebenen Bereich und einem SNX1 und DNAJC13 positiven Pendant. Die Domänen sind nur unter Anwesenheit von DNAJC13 und unter voller Funktionalität der J-Domäne mikroskopisch zu unterscheiden (Norris et al., 2017). Ein Hinweis darauf, dass die Co-Chaperone Funktion von DNAJC13 im Erhalt und der Organisation von subendosomalen Membrandomänen liegen könnte.

Experimente in *drosophila melanogaster* (Drosophila) zeigen, dass der *Knockdown* von DNAJC13 die degradative Route stört. Dieser Effekt ist jedoch ESCRT unabhängig (Gomez-Lamarca et al., 2015). Deshalb stellte diese Arbeitsgruppe die Hypothese auf, DNAJC13 könne an einem ESCRT unabhängigen Degradationsweg beteiligt sein.

Unsere Arbeitsgruppe hat erstmalig gezeigt, dass DNAJC13 ein positiver Modulator der autophagischen Degradation ist (Besemer, 2015). Überexpression des Proteins führt zum gesteigerten autophagischen Flux, wohingegen der transiente *Knockdown* die autophagische Aktivität senkt. Dieser Effekt scheint unabhängig von der Interaktion

mit WASH- oder Retromer-Komplex zu sein, denn im Gegensatz zu DNAJC13 kolokalisieren diese nicht mit autophagosomalen Strukturen. DNAJC13 ist selbst kein Substrat der Autophagie. Weiterhin zeigt sich unter *Knockdown* von DNAJC13 eine geringere Kolokalisation von ATG9 mit LC3-positiven Strukturen (Besemer, 2015). ATG9 ist das einzige autophagische Transmembranprotein, welches außerdem in die Autophagosomen-Membran integriert wird. Verantwortlich gemacht wird es für die Membranzufuhr an der Phagophore und unterliegt selbst einem retrograden Recycling (Orsi et al., 2012, Yamamoto et al., 2012). Deshalb ist die aktuelle Vermutung, dass DNAJC13 im Zusammenspiel mit ATG9 eine Rolle für die Membranorganisation während der Phagophorenbildung spielt.

Die Relevanz des Proteins DNAJC13 lässt sich nicht nur im Zellmodell nachweisen, sondern zeigt auch Konsequenzen auf Ebene des Gesamtorganismus. Unter gesonderter Betrachtung neuronaler Vorgänge wurden Interneurone von *C. elegans* auf das post-synaptische Recycling des Glutamat-Rezeptors AMPA (AMPA) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass unter Verlust von DNAJC13 weniger AMPAR zurück zur Plasmamembran gelangt und stattdessen der degradativen Route zugeführt wird. Mechanosensitive Experimente bestätigen diese Daten auch phänotypisch. Unter Verlust von DNAJC13 lässt sich eine beschleunigte Habituation der Würmer in Analogie zur verminderten Rezeptorbereitstellung beobachten (Zhang et al., 2012a).

Schlussendlich soll die Funktion von DNAJC13 auch im pathogenetischen Kontext betrachtet werden. In der onkologischen Forschung wird DNAJC13 im Zusammenhang mit der Entstehung von Brustkrebs diskutiert. Der *Knockdown* von DNAJC13 führt in einer humanen Brustkrebs-Zelllinie zu verminderten Proteinspiegeln des Wachstumsfaktors *epidermal growth-factor-receptor* (EGF-R) (Girard and McPherson, 2008). Der erhöhte EGF-R Proteinspiegel wird in den malignen Zellen durch eine Überexpression des Onkogens ErbB2, besser bekannt als *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2/neu) verursacht. Dies führt zu einer Verstärkung des mitogenen Signals und somit zur übermäßigen Proliferation der Drüsenzellen. Demgegenüber steht die Beobachtung, DNAJC13 könne Ziel einer tumorsupprimierenden micro-RNA in zwei Brustkrebs-Zelllinien sein (Yang et al., 2014). Dieser Theorie zufolge würde das Tumorwachstum durch Mangel an Tumor-Suppressor mit einer gesteigerten DNAJC13-Expression einhergehen. Während nach

der Hypothese von Girard et al. (2005) eine Überexpression von DNAJC13 eher protektive Wirkung auf die Tumorpheriferation hätte.

Unter *Knockdown* von Spastin konnte ebenfalls eine reduzierte Expression von DNAJC13 beobachtet werden. Spastin ist ein pathogenetisch beteiligtes Protein der hereditären spastischen Paralyse. Bei dieser Erkrankung lassen sich reduzierte Spastin-Spiegel und ein defekter WASH-Komplex nachweisen (Freeman et al., 2014). Beim genetischen Screening familiärer M. Parkinson Fälle ließen sich unterschiedliche Mutationen im DNAJC13-Gen identifizieren, auf die im folgenden Kapitel ausführlich eingegangen werden soll.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass DNAJC13 als hochkonserviertes Protein von essentieller Funktion für die Membranbewegung im retrograden Transport und der endosomalen Reifung zu sein scheint. Über die J-Domäne dient es der Organisation von Proteinkomplexen und indirekt dem Clathrin-Haushalt. Des Weiteren ist DNAJC13 im degradativen Weg der Autophagie von Bedeutung. Medizinisch interessante Schnittpunkte ergeben sich im Bereich der Neurodegeneration und maligner Proliferationsprozesse.

2.1.3. Die Mutation DNAJC13(N855S)

Im Jahre 2014 erlangte das Gen *DNAJC13* erweiterte Bedeutung, da die Mutation DNAJC13(N855S) mit M. Parkinson assoziiert wurde (Vilarino-Guell et al., 2014). Untersucht wurden elf DNA-Proben einer mennonitischen Familie mit niederländisch-deutsch-russischer Herkunft, die sich mit den klassischen Kardinalsymptomen Tremor, Rigor und Dyskinesie präsentierten. Die Symptomatik manifestierte sich asymmetrisch mit langsamer Progredienz und einem durchschnittlichen Krankheitsbeginn im 67. Lebensjahr. Klinisch dominierte ein gutes Ansprechen auf Levodopa-Therapie und ein autosomal dominantes Vererbungsmuster mit überwiegend männlichen Betroffenen (Appel-Cresswell et al., 2014, Vilarino-Guell et al., 2014).

Die genetische Analyse identifizierte einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin im *DNAJC13*-Gen, was zu einem Serin statt Asparagin an Stelle 855 führt. Die Prävalenz der Mutation liegt bei neun aus elf Individuen, wobei die verbleibenden zwei abweichende klinische Symptome zeigten. In der Kontrolle fanden sich zusätzlich sechs asymptotische Träger, von denen sich vier zu diesem Zeitpunkt noch unterhalb des durchschnittlichen Erkrankungsbeginns befanden. Ausweitung der

Analyse auf eine multi-ethnische Fall-Kontroll-Datenbank identifizierte weitere vier betroffene Mutationsträger, von denen zwei familiär und zwei sporadisch auftraten.

Die postmortale immunhistochemische Aufarbeitung aus Hirnarealen der Betroffenen, wie Substantia nigra oder bestimmter Hirnnervenkerne, offenbart eine *Lewy-body-Pathologie* mit intrazellulären Einschlüssen, die teilweise auch DNAJC13 enthalten (Appel-Cresswell et al., 2014, Vilarino-Guell et al., 2014).

Neben der pathognomonischen Histologie lassen sich auch subzellulär funktionelle Einschränkungen durch die Mutation nachweisen. Gemessen am intrazellulären Transportverhalten von Transferrin scheint der retrograde Transport beeinträchtigt (Vilarino-Guell et al., 2014, Yoshida et al., 2018). Gleiches gilt für den Transport von EGF vom frühen zum späten Endosom und der zytosolischen Verteilung von Aktin. In anderen Experimenten wurden Zellen, die die Mutation N855S exprimieren mit *alpha-Synuclein* inkubiert. Dies führte zur endosomalen Akkumulation von *alpha-Synuclein*. *Alpha-Synuclein* ist das wesentliche Protein in der Pathogenese der Lewy- Körperchen (Yoshida et al., 2018). Zur autophagischen Aktivität unter Mutation von DNAJC13 existieren aktuell noch keine Daten.

Zwei Jahre nach der Entdeckung von DNAJC13(N855S) wurde dessen Identität als potentielle Parkinson-assoziierte Mutation durch eine andere Arbeitsgruppe in Frage gestellt. Diese registrierte bei erneuter Analyse der gleichen Kohorte eine weitere vorhandene Mutation im Gen des Proteins TMEM230, welche sich auch in neun weiteren chinesischen Patienten nachweisen ließ (Deng et al., 2016). Seither wurden zahlreiche Datenbanken unterschiedlicher Ethnien auf beide Mutationen durchsucht. Für die Mutation im *DNAJC13*-Gen fand sich ein weiterer Träger in einer kanadischen Kohorte mit M. Parkinson (Gustavsson et al., 2015) und zwei Träger in Europa mit essentiellen Tremor (Rajput et al., 2015). Seither wurden zudem weitere Mutationen innerhalb des *DNAJC13*-Genes im Zusammenhang mit M. Parkinson identifiziert (Gagliardi et al., 2018, Lin et al., 2019, Trinh et al., 2019). Für Mutationen im *TMEM230*-Gen bei Parkinson-Patienten hat es keine weiteren Dokumentationen gegeben (Fan et al., 2017, Giri et al., 2017, Quadri et al., 2017, Tejera-Parrado et al., 2018, Wei et al., 2018). Im Gegensatz zu Varianten des *TMEM230*-Gens hat DNAJC13(N855S) als PARK21 Einzug in alle aktuellen Übersichten der genetischen Zusammenhänge mit M. Parkinson gehalten (Tabelle 1).

2.2. M. Parkinson

2.2.1. Das Parkinson Syndrom als Ausdruck von Neurodegeneration

Rigor, Tremor und Akinesie bilden einen Symptomkomplex, der als Parkinson-Syndrom bezeichnet wird. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein, z. Bsp. sekundär im Rahmen anderer Erkrankungen oder als medikamentöse Nebenwirkung. Erst nach Ausschluss anderer möglicher primärer Ursachen darf die Diagnose idiopathisches Parkinson-Syndrom erteilt werden, welches man dann als M. Parkinson bezeichnet. Die definitive Diagnosesicherung ist erst *post mortem* anhand pathognomonischer Hirnveränderungen möglich. Als weltweit zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weist auch M. Parkinson die für Neurodegeneration typischen Proteinaggregate in Form von Lewy-bodies auf (de Lau and Breteler, 2006). Im Speziellen betroffen sind dopaminerge Neurone im Bereich der Substantia nigra, Pars compacta und des Locus coeruleus (Damier et al., 1999). Der sukzessive Verlust der Dopaminausschüttung und der damit verbundene relative Überschuss an Acetylcholin führen zu sehr typischen Symptomen und einem eindrücklichen klinischen Erscheinungsbild. Durch Disinhibition der Basalganglien-Schleife kommt es zur zunehmenden Hemmung bzw. Dysregulation der Motorik, die sich als Bradykinesie, Rigor und Tremor äußert. Auch das Gang- und Schriftbild sind charakteristisch verändert. Der Tremor beginnt typischerweise asymmetrisch und ist auch in Ruhe vorhanden. Das Gesicht mangelt an Mimik (Hypomimie) und im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu vegetativen und neuropsychiatrischen Beeinträchtigungen. Die Betroffenen können an Schlaflosigkeit, depressiver Verstimmung, Hypersalivation und Seborrhoe (Salbengesicht) leiden. In Summe imponieren sie mit einem typischen Äußeren: Der Gang ist kleinschrittig und vornübergebeugt, die Extremitäten schwingen beim Gehen nicht mit. Das Gesicht scheint glänzend und emotionslos. Der möglichst lange Erhalt des Dopaminstoffwechsels ist Ziel der stadienadaptierten Therapie, bis hin zur vollständigen Substitution von Dopamin. Alle zur Verfügung stehenden medikamentösen Optionen helfen nur symptomatisch und sind mit zahlreichen Nebenwirkungen, vor allem tagesabhängigen Fluktuationen verbunden. Das Fortschreiten der Erkrankung bleibt unaufhaltsam und bedarf deshalb dringend weiterer Forschungsanstrengung. Auch unter adäquater Therapie führt M. Parkinson

bereits nach wenigen Jahren zu schwerer Pflegebedürftigkeit und schließlich zum Tod (Jankovic, 2008).

2.2.2. Überblick familiärer M. Parkinson

Innerhalb der Gesamtheit aller M. Parkinson-Fälle unterscheidet man familiären M. Parkinson mit identifiziertem genetischem Korrelat von sporadisch auftretenden Fällen. Dabei folgen insgesamt 10 Prozent einem Mendel'schen Vererbungsmuster, die weiteren 90 Prozent entfallen auf sporadische Fälle (de Lau and Breteler, 2006). Bis heute gibt es mehr als 23 bekannte potentiell pathogene Gene, die vereinfacht als PARK1-23 nummeriert wurden und in [Tabelle 1](#) dargestellt sind (Karimi-Moghadam et al., 2018). Hierbei gelten folgende Kriterien als Indikatoren für Pathogenität eines Gens: vollständige Ko-Segregation von Mutation und Phänotyp und ausbleibender Nachweis in gesunden Kontrollgruppen. Weitere Hinweise können funktionelle Beeinträchtigungen auf zellulärer Ebene sein (Corti et al., 2011), sowie die Lokalisation in einer funktionell wichtigen oder über mehrere Spezies konservierten Domäne. Die unterschiedlichen pathogenen Mutationen zeigen spezifische Feinheiten in der klinischen Manifestation. Die zwei häufigsten autosomal dominant vererbten Mutationen finden sich im *alpha*-Synuclein-Gen (*SNCA*) und im Gen der *LRRK2*. Das *LRRK2*-Gen ist insgesamt dasjenige mit der höchsten Prävalenz und betroffene Patienten präsentieren sich typischerweise als *late-onset* mit gutem Levodopa-Ansprechen. Nach autosomal rezessivem Muster finden sich am häufigsten Mutationen im *parkin* und *PINK1*-Gen. Beide manifestieren sich typischerweise sehr früh (Corti et al., 2011). Die Mutationen im *SNCA*-Gen weisen eine Besonderheit auf. Als einziges Gen führen hier auch strukturelle Veränderungen, die zu einem gesteigerten Gen-Produkt führen, z. Bsp. *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) zu einem dosis-abhängigen Phänotyp (Ross et al., 2008). Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass in diesem speziellen Fall die Überexpression von wildtypischem Protein bereits zu einer Pathologie in der Zelle führt, was sich auch experimentell bestätigen lässt (Cooper et al., 2006). Die Funktionen der identifizierten Gene können den unterschiedlichsten zellulären Prozessen zugeordnet werden.

Loci	Vererbung	Gen	Position	Protein	onset	Mutationen
PARK1	AD selten sporadisch	<i>SNCA</i>	4q21	Synuclein- <i>alpha</i>	Early onset, selten late onset	Missense Duplikation /Triplikation
PARK2	AR sporadisch	<i>PARKIN</i>	6q25–q27	E3 ubiquitin ligase	Early onset	Missense /Nonsense; Splicing; Deletionen; Insertionen
PARK3 PARK4	AD AD selten sporadisch	Unbekannt <i>SNCA</i>	2p13 4q21	Unbekannt Synuclein- <i>alpha</i>	Late onset Early onset, selten late onset	Unbekannt Missense; Duplikation/ Triplikation des regulatorischen Gens
PARK5	AD	<i>UCHL1</i>	4p14	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1	Late onset	Missense
PARK6	AR	<i>PINK1</i>	1p35–p36	PTEN-induced kinase	Early onset	Missense / Nonsense; Splicing; Deletionen; Insertionen
PARK7	AR	<i>DJ-1</i>	1p36	DJ-1	Early onset	Missense; Splicing; Deletionen; Insertionen
PARK8	AD sporadisch	<i>LRRK2</i>	12q12	Leucine-rich repeat kinase 2	Late onset	Missense; Splicing; kleine Deletionen
PARK9	AR	<i>ATP13A2</i>	1p36	Cation-transporting ATPase 13A2	Early onset	Missense; Splicing; Deletionen; Insertionen
PARK10 PARK11	Unklar AD	Unbekannt <i>GIGYF2</i>	1p32 2q36–q37	Unbekannt GRB10 interacting GYF protein 2	Unklar Late onset	Unbekannt Missense;
PARK12	Unklar	Unbekannt	Xq21–q25	Unbekannt	Unklar	Unbekannt
PARK13 PARK14	AD AR	<i>Omi/HTRA2</i> <i>PLA2G6</i>	2p13 22q12–q13	Serine peptidase 2 Phospholipase A2, group 6	Late onset Early onset	Missense; Splicing Missense; Splicing; Deletionen; Insertionen
PARK15	AR	<i>FBX07</i>	22q12–q13	F-box protein 7	Early onset	Missense; Splicing
PARK16 PARK17 PARK18	AD AD AD	Unbekannt <i>VPS35</i> <i>EIF4G1</i>	1q32 16q11.2 3q27.1	<i>u.a. RAB7L1, SLC41A1</i> Vacuolar protein sorting 35 Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1	Late onset Late onset	Unbekannt Missense; Splicing Missense; Deletionen; Insertionen
PARK19	AR	<i>DNAJC6</i>	1p31.3	DNAJ subfamily C member 6	Early onset	Missense / Nonsense; Splicing
PARK20 PARK21	AR AD	<i>SYNJ1</i> <i>DNAJC13</i>	21q22.11 3q22.1	Synaptojanin-1 DNAJ subfamily C member 13	Early onset Early onset	Missense Missense
PARK22	AD	<i>CHCHD2</i>	7p11.2	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain 2	Late onset	Missense
PARK23	AR	<i>VPS13C</i>	15q22.2	Vacuolar protein sorting 13C	Early onset	Missense; kleine Deletionen
–	AD bei PD AR bei GD	<i>GBA</i>	1q21	Glucocerebrosidase	Unklar	Missense; Splicing; Deletionen; Insertionen
–	AD	<i>SCA2</i>	12q24.1	Spinocerebellar ataxia type 2	Unklar	(CAG) Nucleotide repeat Variationen

Tabelle 1: Bekannte mit familiärem M. Parkinson assoziierte Gene und Loci (verändert nach Karimi-Moghadam et al. (2018) AR=autosomal-rezessiv, AD= autosomal dominant

2.2.3. Zellbiologische Pathomechanismen des M. Parkinson

So vielfältig die genetische Grundlage familiären M. Parkinsons ist, so weitreichend und variabel sind auch die daraus resultierenden funktionellen Veränderungen. Die wichtigsten Möglichkeiten wurden durch Cherubini and Wade-Martins (2018) zusammengefasst und beinhalten eine gestörte autophagische und lysosomale Funktion, sowie Störungen im intrazellulären Transport, der Signalübertragung von Calcium, mitochondriale Organisation und Funktion, sowie Stress des endoplasmatischen Retikulums. Fernab der eben Genannten, bestehen zu nahezu jedem bekannten zellulären Stoffwechselweg Bezüge zur Pathogenese von M.

Parkinson. Die Querverbindungen innerhalb sind vielfältig und nur durch bioinformatische Methoden zu überschauen. Allen gemeinsam ist die Ablagerung von *alpha*-Synuclein-Oligomeren und der Untergang dopaminergener Neurone, weshalb M. Parkinson zur Gruppe der Synucleinopathien gezählt wird. Neben pathologisch oligomerisiertem *alpha*-Synuclein werden auch neurofilamentäre Proteine und Ubiquitin in intrazelluläre Einschluss-Körperchen, sogenannte Lewy-bodies abgelagert (Spillantini et al., 1998). *Alpha*-Synuclein selbst ist ein 15 kDa großes zytosolisches Protein, welches seinen Namen durch nukleäre und präsynaptische Lokalisation erhalten hat. Obwohl die Funktion noch nicht vollends geklärt ist, lässt die präsynaptische Anreicherung eine Rolle in der synaptischen Signalübertragung vermuten (Clayton and George, 1998). Im nativen Zustand liegt es ungefaltet vor (Weinreb et al., 1996) und enthält eine zentrale hydrophobe Domäne, die Oligomerisierung und Fibrillenbildung begünstigt (Giasson et al., 2001). Folgend sollen solche Mechanismen erörtert werden, die in Beziehung zu DNAJC13 stehen. Dazu zählen vor allem die Funktion des Retromer-Komplexes und die autophagische Degradation.

2.3. M. Parkinson und Retromer

2.3.1. Der Retromer-Komplex

Auf der Liste der zahlreichen Pathomechanismen, die für die Entstehung des Krankheitsbildes M. Parkinson verantwortlich gemacht werden, spielt der Retromer-Komplex eine zentrale Rolle. Er scheint viele zelluläre Mechanismen zu verknüpfen und zu regulieren (McMillan et al., 2017). Der Retromer-Komplex ist ein membranassoziierter Enzymkomplex, der aus zwei Untereinheiten besteht: dem Heterotrimer aus VPS29, VPS35 und VPS26 und einem Dimer aus SNX-Proteinen. Seine Funktion ist die Regulation endosomaler Sortierungsvorgänge hin zum Golgi-Apparat oder zur Plasmamembran (Cui et al., 2017). Im Einzelnen stellt man sich den Prozess aktuell so vor, dass der Protein-Komplex unter Mithilfe von RAB7 und SNX3 an das Endosom gebunden wird (Harrison et al., 2014). Anschließend erkennen und biegen SNX-Proteine die Membranstrukturen, was zur Röhrenbildung von Teilen des Endosoms führt, der sog. Tubulation. Ein Prozess an dem auch DNAJC13 beteiligt ist (Freeman et al., 2014). Ziel der Tubulation ist die Abschnürung von Vesikeln in

Richtung ihres Bestimmungsortes. RAB7 dissoziiert bereits unter der Tubulation, während der Retromer-Komplex zunächst am Endosom verbleibt, um später ins Zytosol entlassen zu werden. Die retromere Funktion wird durch TBC1D5 kontrolliert, dem RABGAP (*RAB activating protein*) von RAB7 (Jia et al., 2016). TBC1D5 kann neben dem Endosom auch an Autophagosomen binden und könnte somit Recycling und Autophagie aufeinander abstimmen (Popovic et al., 2012). Klassische Cargo-Moleküle des Retromer-Komplexes sind der CI-MPR, der Glucose-Transporter 1 (GLUT1), der divalente Metalltransporter I (DMT1-II) und viele weitere. In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten synaptischen Transmitter und Rezeptoren ebenfalls einem Recycling unterliegen, ist es nicht überraschend, dass die Integrität des Retromers essentiell für die synaptische Homöostase ist. Veränderungen oder Verlust verschiedener Subdomänen des Retromer-Komplexes führen zu mangelndem Recycling von Glutamat- und auch Dopaminrezeptoren (Choy et al., 2014). Betroffene Neurone zeigen entsprechende morphologische Veränderungen, da der Retromer-Komplex neben der Transportfunktion zudem andere für die neuronale Vitalität essentielle Stoffwechselwege reguliert (Tian et al., 2015). Hinsichtlich der Pathogenese von M. Parkinson spielen hier vor allem die lysosomale Degradation, unterschiedliche autophagische Funktionen, mitochondriale Fusions- und Fragmentierungsvorgänge und viele weitere eine Rolle. Anschließend werden ausgewählte Retromer-abhängige Wege diskutiert, die im pathogenetischen Zusammenhang mit M. Parkinson stehen.

2.3.2. Die Degradation von *alpha*-Synuclein ist Retromer-abhängig

In der gesunden Zelle wird *alpha*-Synuclein unter anderem durch lysosomale Proteasen, vor allem Cathepsin D abgebaut (Cullen et al., 2009, Sevlever et al., 2008). Cathepsin D wird hierbei durch CI-MPR als Proenzym zum Lysosom transportiert und dort durch saure Hydrolyse in die aktive Form überführt. Anschließend wird der Rezeptor Retromer-abhängig zurück zum Golgi-Apparat gebracht, wo er einem erneuten Transport von Cathepsin D zur Verfügung steht (Arighi et al., 2004) ([Abbildung 2](#)). *In vitro* und *in vivo* Experimente zeigen, dass die Unterdrückung der Retromer-Funktion durch *Knockdown* zu einer veränderten Verteilung von CI-MPR und damit, durch mangelnde Cathepsin-Aktivität im Lysosom, zur Akkumulation von

alpha-Synuclein führt (Miura et al., 2014). Gleicher Effekt zeigt sich bei der Mutation VPS35(D620N) (Follett et al., 2014).

Für eine geordnete lysosomale Degradation muss jedoch nicht nur die Protease, sondern auch das Substrat selbst den Weg zum Lysosom finden. *Alpha*-Synuclein kann das Lysosom entweder indirekt über Makroautophagie oder direkt über Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperon mediated autophagy* =CMA) erreichen (Vogiatzi et al., 2008).

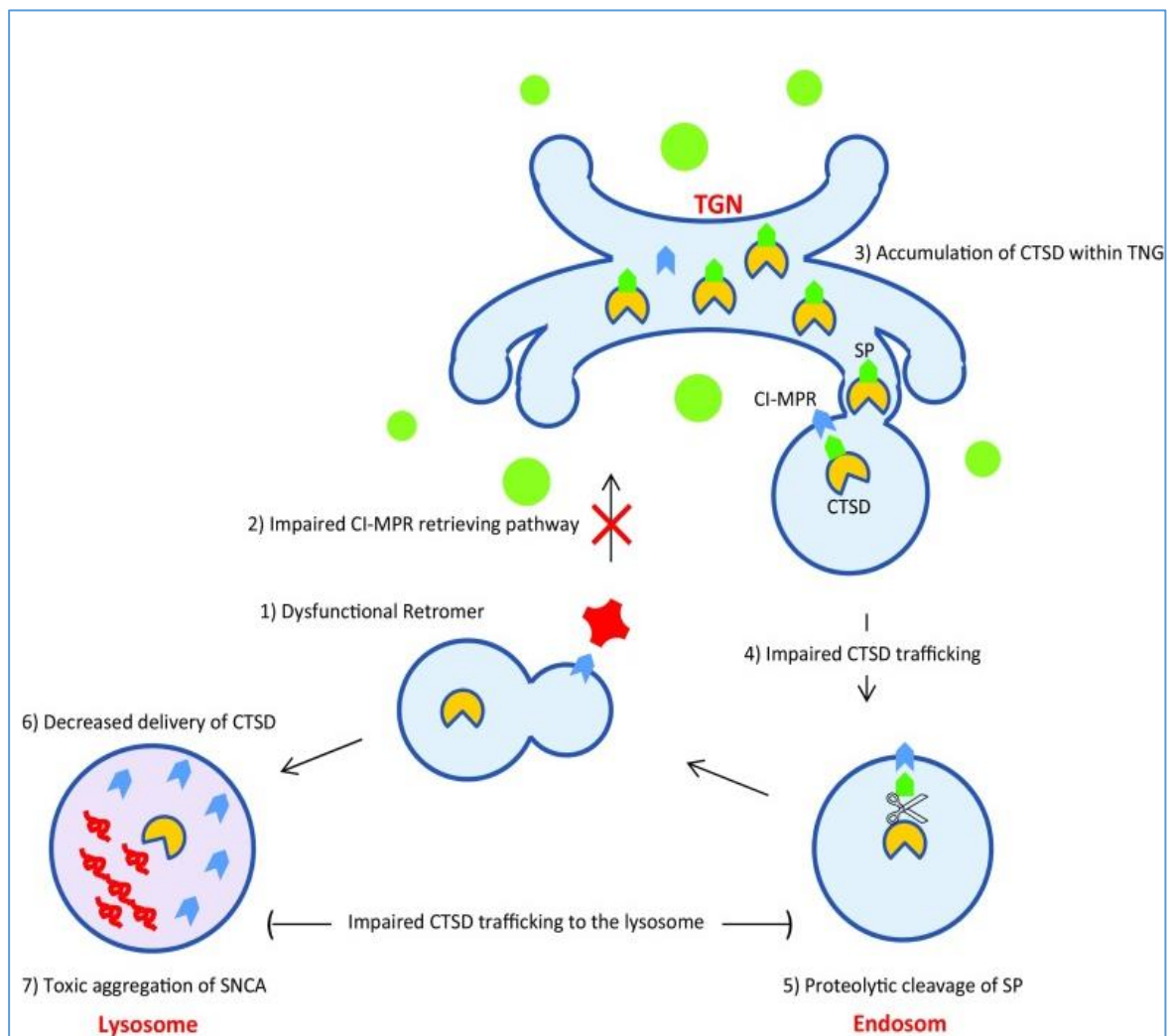


Abbildung 2: Dysfunktion des Retromer Komplex führt zu verminderter lysosomaler Degradation von *alpha*-Synuclein SNCA=Synuclein-alpha, TGN=trans-Golgi-network, CI-MPR= cation-independent Mannose-6-Phosphat Rezeptor, CTSD=Cathepsin D (verändert von Karimi-Moghadam et al. (2018))

Die unmittelbare Translokation von *alpha*-Synuclein ins Lysosom, auch als CMA bezeichnet, wird durch direkte Interaktion mit *lysosome-associated membrane glycoprotein 2a* (LAMP2a) katalysiert. Zum einen führen Mutationen im SNCA-Gen zur erhöhten Affinität von *alpha*-Synuclein zu LAMP2a, was die CMA und infolgedessen

die Degradation von *alpha*-Synuclein und anderen Substraten der CMA beeinträchtigt (Karimi-Moghadam et al., 2018, Cuervo et al., 2004). Zum anderen führt der Verlust von VPS35, genauso wie die Mutation VPS35(D620N), zu einem gestörten Transport und gesteigertem Abbau von LAMP2a. Dies äußerte sich ebenfalls in einer Akkumulation von *alpha*-Synuclein; ein Effekt, der unter Re-Expression von LAMP2a reversibel ist (Tang et al., 2015).

2.3.3. Die Retromer-WASH-Interaktion

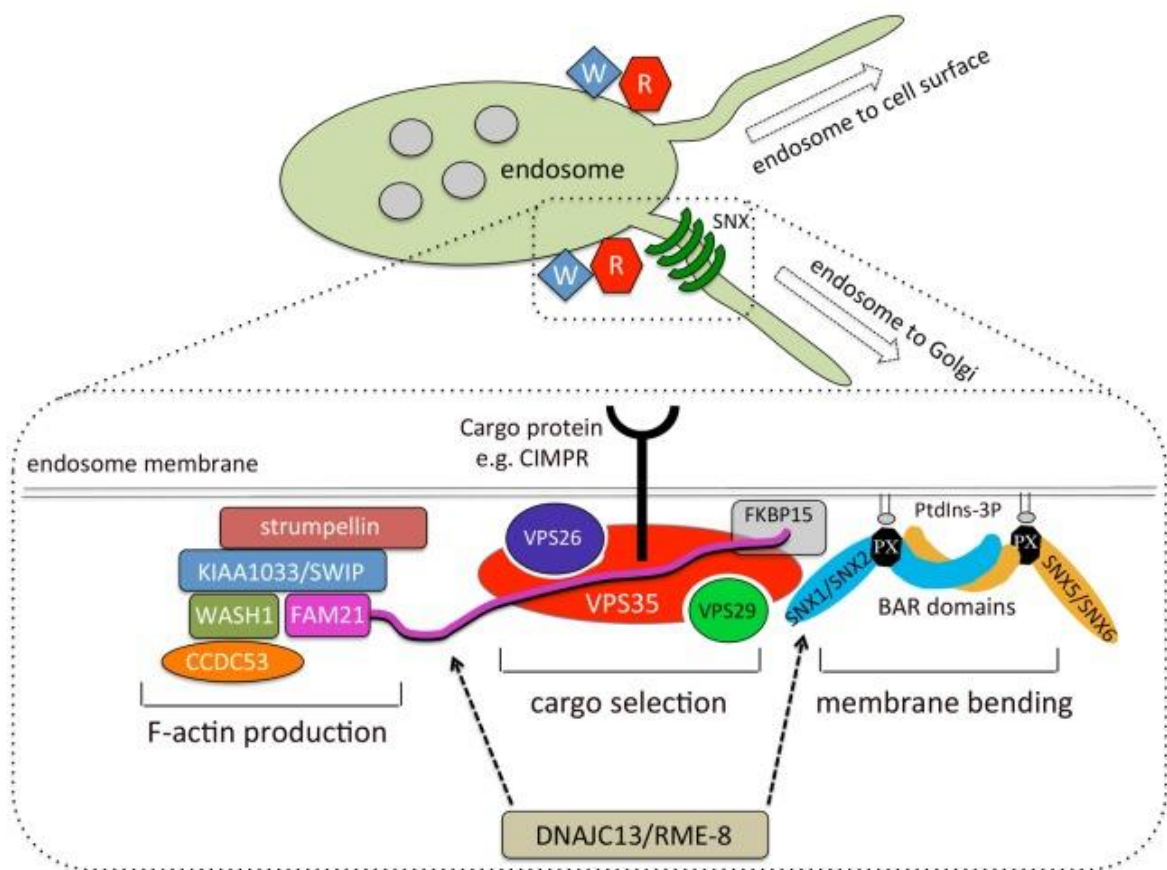


Abbildung 3: Schemazeichnung von Retromer- und WASH-Komplex. DNAJC13 bindet über FAM21 an den WASH-Komplex und über SNX1 an den Retromer-Komplex (Freeman et al., 2014).

Die Integrität des Retromer-Komplexes ist nicht allein ausreichend für einen ungehinderten retrograden Transport. Auch dessen Interaktion mit anderen Proteinen ist entscheidend für ein Gleichgewicht der neuronalen Transmitter. Schlüsselfaktor für eine intakte Funktion scheint das Zusammenspiel der interagierenden Komplexe zu sein. Wichtigste Bedeutung kommt hierbei dem WASH-Komplex zu, ein pentamerer Protein-Komplex, der nach einer seiner zugehörigen Proteine benannt ist (Abbildung

3). Durch die Polymerisierung von F-Aktin unterstützt er, gemeinsam mit Dynamin und den BAR-Domänen der SNX-Proteine, Tubulations- und Abschnürungsvorgänge (Wang et al., 2018). Mit der FAM21-Untereinheit bindet der WASH-Komplex sowohl über VPS35 an den Retromer-Komplex (Harbour et al., 2012, Seaman et al., 2013), als auch direkt an DNAJC13 (Freeman et al., 2014). Mutationen innerhalb des WASH-Komplexes können zu neurologischen Erkrankungen wie hereditärer spastischer Paralyse und intellektueller Einschränkung führen. Dabei bleibt die endosomale Transportkapazität unbeeinträchtigt (Wang et al., 2018). Zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen beweisen eine gestörte WASH-Retromer-Bindung bei stabilem Retromer-Komplex unter der M. Parkinson assoziierten Mutation VPS35(D620N) (McGough et al., 2014, Zavodszky et al., 2014). Diese Dissoziation tangiert zweierlei Stoffwechselwege:

Eine unmittelbare Konsequenz ist die Beeinträchtigung des retrograden Transportes. Sowohl die Route zum Golgi-Apparat (CI-MPR) scheint gestört (McGough et al., 2014, Zavodszky et al., 2014), als auch der Weg von GLUT1 und dem Dopaminrezeptor D1 zur Zelloberfläche (Wang et al., 2016, Zavodszky et al., 2014). *In Vivo* Modelle der VPS35(D620N) Mutation zeigen einen veränderten Stoffwechsel des AMPA-Rezeptors, verminderte dopaminerge Neurotransmission und morphologische Zeichen der Neurodegeneration (Ishizu et al., 2016, Munsie et al., 2015, Tsika et al., 2014). Die im Kapitel zuvor beschriebene Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion durch mangelndes Recycling von CI-MPR in VPS35(D620N) ist auch hier erneut anzuführen und unterstreicht zusätzlich die Rolle der Retromer-WASH-Achse in der Pathogenese von M. Parkinson.

Neben der Mutation im *VPS35*-Gen bildet u.a. auch das *Lrrk2*-Gen einen wichtigen Verknüpfungspunkt zwischen dem Retromer-Komplex und M. Parkinson. Das *Lrrk2*-Gen ist das Parkinson Gen mit zweithäufigster Inzidenz und es steht in Verbindung mit einem anderen Parkinson assoziierten Gen namens *RAB7L1*, das für eine GTPase codiert. Die Funktionen von LRRK2 scheinen sehr vielfältig und noch weitestgehend undefiniert. Als ein Beispiel sei an dieser Stelle die endo-lysosomale Sortierung erwähnt. Sowohl der funktionelle Verlust von LRRK2, wie auch der Verlust von VPS35 führen zur veränderten Verteilung von CI-MPR. Ein Effekt, der unter Expression von wildtypischem VPS35 reversibel ist (MacLeod et al., 2013). Ob es sich hierbei um eine direkte Interaktion handelt oder ob die Funktion von VPS35 lediglich von LRRK2

nachgeschaltet liegt, bleibt zunächst noch offen. Gleichsam muss noch geklärt werden, ob auch hier die distinkte Zusammenarbeit mit dem WASH-Komplex erforderlich ist.

Auch PARKIN reguliert die retromere Funktion. Dies geschieht über die Ubiquitinierung von VPS35. Diese Wechselwirkung scheint außerdem den WASH-Komplex einzuschließen, denn von Mutationen in *parkin* betroffene Neurone zeigen geminderte Expression der WASH-Komponenten und eine veränderte ATG9-Navigation (Williams et al., 2018). Allem Anschein nach ist der retrograde Transport ein wichtiger zentraler Knotenpunkt unterschiedlicher Mutationen und Dysfunktionen, die dadurch die Parkinson-Krankheit auslösen.

Zweiter von der Retromer-WASH-Interaktion direkt abhängiger Stoffwechsel ist die Makroautophagie. Hier soll nur kurz erwähnt sein, dass die Mutation VPS35(D620N) zu einer veränderten ATG9a-Verteilung führt und konsekutiv den autophagischen Flux herabsetzt. Ein Prozess, der ebenfalls von einer intakten WASH-Interaktion abhängig ist (Zavodszky et al., 2014). ATG9 ist ein Transmembranprotein, das die frühe Phagophorenbildung reguliert und auch im Zusammenhang mit DNAJC13 steht. Zwischen Autophagie, M. Parkinson und DNAJC13 scheint es mehrere Schnittstellen zu geben. Deshalb soll diesem Thema folgend ein eigenes Kapitel gewidmet sein.

2.4. Autophagie

Der Begriff Autophagie bedeutet „sich selbst essen“ und beschreibt eine degradative Route, die die Zelle dazu befähigt, sich von zelleigenem Ballast zu befreien. Bereits in den 50iger Jahren wurden erste Beobachtungen gemacht, die den Grundstein des Forschungsfeldes der Autophagie legen sollten. Damals beruhte die Forschung hauptsächlich auf morphologischen Studien. Dabei beobachteten Wissenschaftler angedaute Mitochondrien in Membran-Kompartimenten, die auch lysosomale Hydrolasen enthielten. Diese nannten sie dann einige Jahre später Autophagosomen (Yang and Klionsky, 2010). Mittlerweile weiß man, dass Autophagie ein fundamentaler Prozess für den Erhalt der zellulären Homöostase ist. Die autophagische Degradation reguliert den Umsatz an Zellorganellen und Proteinen und findet nicht nur unter basalen Bedingungen statt, sondern kann auch als vitale Antwort auf zellulären Stress

aktiviert werden. Im Jahre 2013 wurde die Wichtigkeit dieses Forschungsfeldes unterstrichen, indem Yoshinori Ohsumi und seiner Arbeitsgruppe der Medizin-Nobelpreise für die wissenschaftlichen Errungenschaften im Feld der Autophagie verliehen wurde. Demnach scheint die Erforschung der autophagischen Degradation auch unter medizinischen Aspekten eine große Rolle zu spielen. Vor allem bei neurodegenerativen und onkologischen Erkrankungen wurde ein veränderter autophagischer Stoffwechsel beobachtet. Weiterhin scheint Autophagie auch im Rahmen von Infektion und Alterung eine Rolle zu spielen (Choi et al., 2013). Eine Beeinträchtigung der autophagischen Funktion kann weitreichende Konsequenzen auf den Organismus haben.

Zum als zelleigenen Ballast bezeichneten Substrat der Autophagie zählen nicht nur fehlgefaltete Proteine, sondern auch Zellorganellen, Bakterien oder Viren. Ziel aller autophagischer Prozesse ist der lysosomale Abbau. Mechanistisch und auch in Abhängigkeit des zu degradierenden Stoffes werden unterschiedliche Formen der Autophagie unterschieden. Die drei nennenswertesten Vertreter sind die CMA, die Autophagie der Mitochondrien (Mitophagie) und die Makroautophagie (Nixon, 2013).

2.4.1. Der Mechanismus der Makroautophagie

Wird generalisiert der Begriff Autophagie verwendet, ist meist Makroautophagie im Engeren gemeint. Dies ist womöglich der Tatsache geschuldet, dass sie den größten Anteil der autophagischen Degradation ausmacht. Auch in dieser Arbeit soll Autophagie folgend Synonym für Makroautophagie verwendet werden. Zunächst nahm man an, Autophagie sei ein un-selektiver Prozess. Heute weiß man, dass der Großteil des Substrates, mittels autophagischer Rezeptorproteine, spezifisch gebunden wird (Yang and Klionsky, 2010).

Grundlegend kann der autophagische Prozess in unterschiedliche Abschnitte unterteilt werden. Den ersten Schritt bildet die Initiation ([Abbildung 4](#)). Dabei wird, vor allem unter zellulären Stressbedingungen, der kanonische Weg der Autophagie in Gang gesetzt. Als Sensor für die Stoffwechselsituation der Zelle fungieren die zwei Komplexe mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) und AMPK (AMP-activated protein kinase). Unter Aminosäuredeprivation, Insulinwirkung oder

oxidativem Stress wird mTORC1 inhibiert bzw. AMPK aktiviert. Beides führt zur Phosphorylierung des ersten Komplexes der Initiation, dem ULK1-Komplex (Kim et al., 2011). Der ULK1-Komplex besteht aus ULK1/2, FIP200, ATG13 und ATG101 und rekrutiert seinerseits den zweiten wichtigen Komplex des Initiations-Schrittes, den VPS34-Komplex (VPS34, Beclin1, VPS15, ATG14) (Russell et al., 2013, Wirth et al., 2013). Der VPS34-Komplex katalysiert die Phosphorylierung von PI(3) zu PI(3)P. Die Synthese von PI(3)P ist der entscheidende Schritt der Initiation, denn dies führt zur Rekrutierung der zentralen Komplexe der autophagischen Maschinerie. Ort der Initiation ist das Omegasom, eine Membrandomäne des endoplasmatischen Retikulum, die sich durch Konzentration von PI(3)P auszeichnet (Noda, 2017, Axe et al., 2008, Hayashi-Nishino et al., 2009). Folgend können nun Proteine mit PI(3)P-Effektor-Domänen an die Membran binden und sich zu den wesentlichen Autophagie-Komplexen zusammenfügen (Noda, 2017, Obara et al., 2008, Polson et al., 2010).

Zweiter Abschnitt der autophagischen Degradation ist die Verlängerung und der anschließende Verschluss der Doppelmembran zu einem vesikulären Organell, dem Autophagosom. Die sich verlängernde Membran mit den assoziierten Proteinkomplexen wird als Phagophore bezeichnet. Die Elongation der Membran wird durch eine Form von Ubiquitinierung reguliert. Proteine mit PI(3)P-Effektordomänen z. Bsp. *WD repeat domain phosphoinositide-interacting =WIPI1 /WIPI2* binden durch Interaktion mit PI(3)P an die Membran und setzen dort anschließend das erste von zwei Ubiquitinierungs-ähnlichen Systemen in Gange (Dooley et al., 2014). Im ersten System wird ATG12 an ATG5 konjugiert. ATG7 und ATG10 übernehmen hier ähnliche Funktion wie die E1- und E2-Enzyme im Ubiquitinierungs-Prozess. Als nächstes bindet auch ATG16L (Geng and Klionsky, 2008). Der vollständige Komplex aus ATG5, ATG12 und ATG16L sorgt folgend für die kovalente Lipidierung von *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3). Pro-LC3 wird zunächst durch ATG4 proteolytisch prozessiert. Dabei entsteht LC3-I. Im Rahmen eines zweiten Ubiquitinierungs-ähnlichen Prozesses wird LC3-I mit Hilfe von ATG7 und ATG3 an Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert und dann als LC3-II bezeichnet (Kabeya et al., 2004). LC3 zählt neben den GABARAPs zu den humanen Orthologen des in *s. cerevisiae* identifizierten ATG8. Es lokalisiert sowohl innerhalb als auch auf zytosolischer Seite des Autophagsoms. Funktionell ist LC3 für die Elongation und den Verschluss der Phagophore zuständig. Außerdem dient es auf luminaler Seite auch

als Adapterprotein zur spezifischen Erkennung von autophagischem Cargo (Feng et al., 2014, Kabeya et al., 2004, Lee and Lee, 2016, Schaaf et al., 2016).

Letzter Schritt der autophagischen Degradation ist der proteolytische Abbau der enthaltenen Substrate nach Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom. Das Autophagosom verbindet sich entweder zunächst mit einem späten Endosom zum Amphisom oder direkt mit einem Lysosom zu einem Autolysosom. Beide Prozesse bedürfen der üblichen zellulären Mechanismen der endosomalen Fusion. Dazu zählt unter anderem der SNARE-Apparat, sowie Bewegung mithilfe des Zytoskeletts. LC3 interagiert mit Mikrotubuli und kann somit die Autophagosomen retrograd zum Lysosom dirigieren. LAMP1/2, RAB7, RAB11, die Proteine des SNARE-Apparates und viele weitere kontrollieren die Fusion. Im Rahmen der lysosomalen Funktion wird das luminaire LC3-II ebenfalls verdaut. Das LC3-II der äußeren Membran wird dekonjugiert und recycelt. Die bei der lysosomalen Verdauung entstandenen Moleküle wie z. Bsp. Peptide oder Aminosäuren werden ins Zytosol abgegeben und können dort wiederverwertet werden, oder üben regulatorische Funktionen aus (Nixon, 2013, Amaya et al., 2015, Feng et al., 2014, He and Klionsky, 2009).

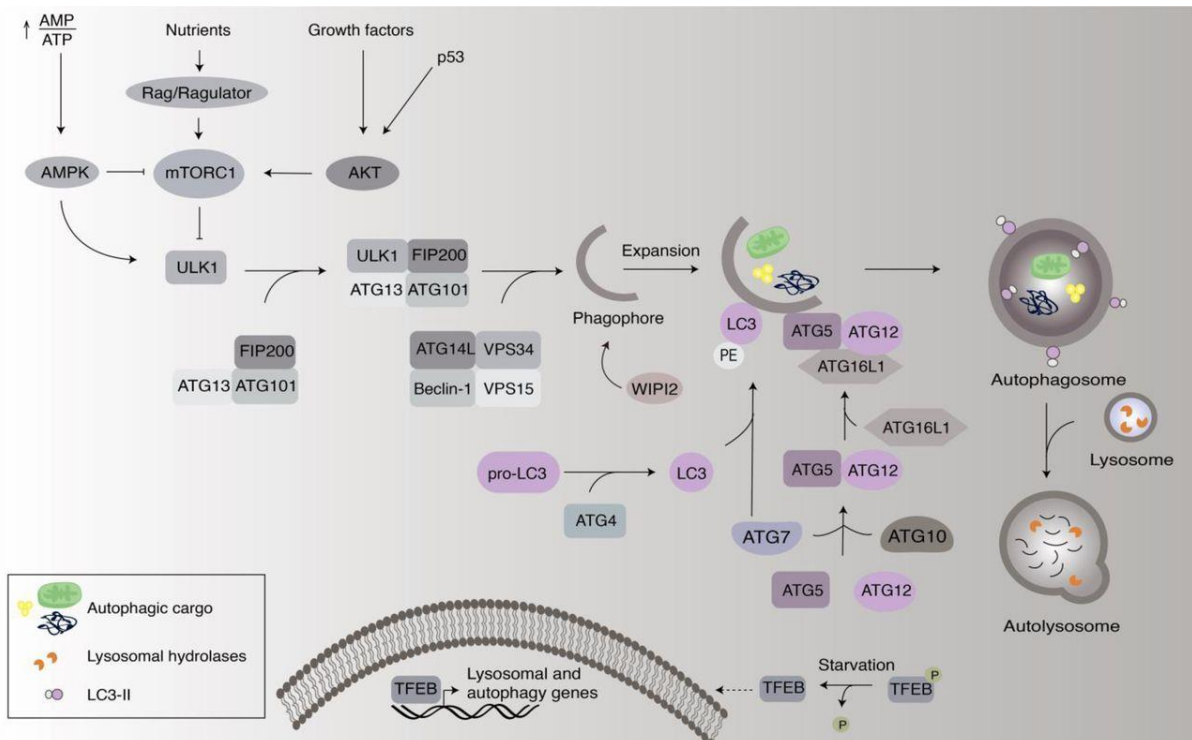


Abbildung 4: Überblick Makroautophagie. Erläuterung siehe Text. AMPK= AMP-dependent protein kinase, FIP200= focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa, mTORC1= mammalian target of rapamycin complex 1, PE= phosphatidylethanolamine, PI(3)P= phosphatidylinositol 3-phosphate, TFEB= transcription factor EB, ULK= mammalian homologues of the *Caenorhabditis elegans* uncoordinated-51 kinase (verändert von Karabiyik et al. (2017))

2.4.2. Die Membranzufuhr und ATG9

Gemeinhin werden das sekretorische/endosomale Kompartiment und das zytosolische Kompartiment als zwei getrennte zelluläre Räume betrachtet. Diese Grenze wird im Verlauf des autophagischen Abbauweges überwunden, indem zytosolische Bestandteile durch Verlängerung und Schluss der Phagophore in vesikuläre Strukturen verpackt und somit nach intraluminal gekehrt werden. Das strukturelle Korrelat dieser mechanistischen Grenze bildet die biologische Membran. Endosomale Strukturen und so auch das Autophagosom definieren sich als ein von einer Lipid-Doppelschicht umgebenes vesikuläres Kompartiment. Die Biogenese des Autophagosoms durch Verlängerung der Phagophore bedarf folglich einer Ausweitung der Membran.

Die Herkunft dieser wachsenden Membranstruktur bleibt bis heute eine zentrale Frage des autophagischen Forschungsfeldes. Mikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Formierung des Autophagosoms in unmittelbarer räumlicher Nähe zum ER stattfindet. Außerdem ist auch eine direkte physikalische Kommunikation von ER und Autophagosom nachgewiesen (Yla-Anttila et al., 2009). Aktuell deutet einiges darauf hin, dass die Hauptquelle das ER zu sein scheint und die Phagophore primär aus einer an PI(3)P angereicherten Membrandomäne des ERs entsteht, dem sogenannten Omegasom (Axe et al., 2008, Hayashi-Nishino et al., 2009). Omegasome scheinen sich vor allem an speziellen Bereichen des ER zu bilden, an denen dieses in Kontakt mit anderen vesikulären Kompartimenten steht. Hierzu zählen Kontaktstellen zur Plasmamembran, den Mitochondrien und dem Golgi-Apparat (Ge et al., 2014, Hamasaki et al., 2013, Nascimbeni et al., 2017). Weitere Daten zeigen, dass jene mit dem ER in Kontakt stehenden Kompartimente auch einen substanziellen Beitrag zur Elongation der Membran leisten (Feng et al., 2014). Schlussendlich lässt sich die Herkunft der Phagophoren-Membran nicht auf einen alleinigen Ursprung zurückführen. Viel eher scheint es sich hierbei um ein äußerst dynamisches vielfältiges System zu handeln.

Wesentlich reguliert wird dieses System durch ein Transmembranprotein, namens ATG9 (Reggiori et al., 2004). Wie die meisten autophagischen Gene wurde auch ATG9 erstmalig in *S.cerevisiae* beschrieben. Unter den mehr als 30 bekannten Autophagie-Genen ist ATG9 das einzige Transmembran-Protein, welches allerdings nicht in die

Autophagosomen-Membran integriert wird. Genau betrachtet scheint die Funktion von ATG9 innerhalb der Autophagie in der frühen Initiation zu liegen. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Beobachtung, dass der Verlust von ATG9 zu einer defekten Formierung des ULK1-Komplexes und mangelhafter Rekrutierung von ATG14 führt (Kageyama et al., 2011). Jene Regulation scheint indes wechselseitiger Natur zu sein, denn die Verteilung von ATG9 ist umgekehrt auch von ULK1 abhängig. Die Identifikation einer für ULK1-spezifischen Phosphorylierungs-Domäne bestätigt dies (Zhou et al., 2017).

Peripher lokalisiertes ATG9 findet sich autophagischen Markern wie LC3 direkt angelagert. Grundsätzlich scheint es ein peripheres und ein juxt nukleäres Reservoir an ATG9-positiven Vesikeln zu geben. Unter Aminosäuredeprivation und konsekutiver Induktion der Autophagie findet eine Verschiebung von ATG9 hin zur peripheren, LC3-angelagerten, Verteilung statt (Orsi et al., 2012).

Aktuelle Hypothesen konstatieren die Existenz von speziellen ATG9-Vesikeln, die sich zwischen den vesikulären Kompartimenten bewegen (Noda et al., 2000). Tatsächlich lässt sich ATG9 auf dem Golgi-Apparat, dem Recycling Endosom, der Plasmamembran und dem frühen Endosom nachweisen (Young et al., 2006, Guo et al., 2012, Puri et al., 2013, Imai et al., 2016). Solche ATG9-Vesikel scheinen dem Golgi-Apparat zu entspringen und auf dem Weg zum Recycling Endosom oder dem ER selbst retrograden Transportmechanismen zu unterliegen (Yamamoto et al., 2012). So kolokalisiert ATG9 zudem auch mit dem typischen Marker der retrograden Transportroute, CI-MPR (Orsi et al., 2012). Speziell die Passage des Recycling Endosoms scheint im Rahmen der endosomalen Sortierung von ATG9 ein essentieller Schritt für die Formation des Autophagosoms zu sein (Imai et al., 2016, Soreng et al., 2018). Die Induktion der Autophagie führt dabei zur Abnahme der Konzentration von ATG9 auf dem Recycling Endosom (Longatti et al., 2012). Ein ähnlicher Effekt lässt sich auch unter *Knockdown* von DNAJC13 beobachten. Hier führt der Verlust des Proteins außerdem zu einer Abnahme der Assoziation von ATG9 mit LC3-positiven Strukturen (Besemer et al., unter Begutachtung). Schlussendlich verknüpft ATG9 das endosomale Kompartiment im Rahmen der Membranzufuhr mit dem autophagischen Abbauweg und DNAJC13 scheint dabei eine Rolle zu spielen.

2.4.3. M. Parkinson und Autophagie

Dysfunktion der Autophagie scheint eine entscheidende Rolle im Kontext der Neurodegeneration zu spielen. Neurone sind besonders anfällig für Defekte der Autophagie. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Diskutiert wird unter anderem der post-mitotische Zustand der Neurone. In mitotisch aktiven Zellen verteilt sich die Menge schwer zu degradierender Zelllasten im Rahmen der Teilung auf die Tochtergeneration und erleichtert damit die einzelne Zelle. Ein Effekt, der in differenzierten Neuronen ausbleibt. Mitunter müssen endosomale Strukturen im Rahmen der Degradation vom Entstehungsort zum Bestimmungsort transportiert werden. Aufgrund der starken dreidimensionalen Aufzweigung stellt dieser Transport eine weitere Herausforderung der Autophagie in Neuronen dar. *Alpha*-Synuclein selbst stellt ein Substrat der autophagischen Degradation dar. Wie bereits im Kapitel zur retromer-abhängigen Degradation beschrieben, kann *alpha*-Synuclein über CMA abgebaut werden, ist aber außerdem in Autophagosomen der Makroautophagie nachweisbar. Tanik et al. (2013) zeigen eine Steigerung der Autophagosomen-Bildung unter Überexpression von *alpha*-Synuclein bei gleichzeitiger Blockade der Autophagie durch aggregiertes *alpha*-Synuclein. Viele der bis heute bekannten mit Parkinson assoziierten Gene stehen in funktioneller Relation zu den unterschiedlichen Stadien der Makroautophagie, was sich auch experimentell beweisen lässt (Nixon, 2013, Karabiyik et al., 2017).

Als erstes Beispiel soll PARK8 dienen. Auswirkungen von dysfunktionalem LRRK2 hinsichtlich Autophagie sind offensichtlich bedeutsam, aber inhaltlich umstritten. Cresto et al. (2018) erörtern die teilweise widersprüchliche Datenlage. Darunter Experimente, die unter *Knockdown* von LRRK2 sowohl Repression als auch Induktion der Autophagie zeigen. Ferner führt der Verlust von LRRK2 zu vergrößerten Lysosomen mit erhöhtem pH-Wert und unverdauten Inhaltsstoffen (Dodson et al., 2014, Henry et al., 2015). Die Wirkung von LRRK2 wird neben Erhalt der lysosomalen Kapazität auch in der Initiation gesehen. Gemessen daran, dass das Protein die Autophagie mTORC1-unabhängig aber BECN-1-abhängig regulieren kann.

Zusätzlich zeigen auch Neurone, die von Patienten mit Mutationen im *GBA*-Gen (Glucocerebrosidase) gewonnen wurden, autophagische und lysosomale Defekte und Akkumulation von *alpha*-Synuclein (Sidransky and Lopez, 2012). Das Enzym

Glucocerebrosidase ist Bestandteil des Glykolipid-Stoffwechsels und homozygote Gendefekte führen zur lysosomalen Speicherkrankheit M. Gaucher. Heterozygote Erbträger haben ein 5-fach erhöhtes Risiko an M. Parkinson zu erkranken. In Zellen von Parkinson Patienten ohne GBA-Mutation kann die Expression von *alpha*-Synuclein den Transport von GBA zum Lysosom hemmen (Mazzulli et al., 2011), was für einen Rückkopplungsmechanismus zwischen GBA und *alpha*-Synuclein spricht.

Ein ähnlicher Phänotyp, wie bei den beiden zuvor beschriebenen Kandidaten, zeigt sich unter Verlust von ATP13A2, auch als PARK9 bezeichnet (Gitler et al., 2009, Usenovic et al., 2012). Hinzu kommt, dass es experimentell *in vivo* möglich war, einen *alpha* Synuclein induzierten Untergang dopaminerger Neurone durch Re-Expression von ATP13A2 rückgängig zu machen (Gitler et al., 2009)

2.5. Zielsetzung

Hinsichtlich der nach aktueller Datenlage vergleichsweise geringen Prävalenz der Punktmutation im *DNAJC13*-Gen spielt *DNAJC13(N855S)* als Parkinson assoziierte Mutation wahrscheinlich vor allem epidemiologisch eine untergeordnete Rolle. Theoretisch erscheint sie jedoch als äußerst geeigneter Kandidat zur Entschlüsselung pathogenetischer Mechanismen dieser neurodegenerativen Erkrankung. Vor allem deshalb, da es an allen zellulären Funktionen beteiligt ist, die bereits im Zusammenhang mit M. Parkinson stehen, oder diese womöglich sogar reguliert. Nachgewiesen sind für die Mutation *DNAJC13(N855S)* bis heute Konsequenzen auf den retrograden Transport und die subzelluläre Verteilung von *alpha*-Synuclein, nicht jedoch auf die autophagische und lysosomale Degradation. Dysfunktionale Autophagie ist eine weitreichend anerkannte Erklärung für neurodegenerative Effekte. Da *DNAJC13* nachweislich auch an der autophagischen Degradation beteiligt ist, soll die konkrete Fragestellung dieser Arbeit lauten: Führt die Mutation *DNAJC13(N855S)* zu einer Herabsenkung des autophagischen Fluxes, als eine mögliche Erklärung für das Parkinson Syndrom in der betroffenen Kohorte? Als Methode der Wahl wurde ein *Recovery Experiment* gewählt, das den autophagischen Flux nach Re-Expression von wildtypischem und mutantern Protein vergleichend darstellt. Zu diesem Zweck war es zunächst erforderlich, ein stabiles *DNAJC13-Knockdown*-System zu etablieren. Dieses Zellsystem kann dann weiter der Charakterisierung der nativen Funktion von *DNAJC13* dienen. Des Weiteren soll die Mutation *DNAJC13(N855S)* strukturell genauer charakterisiert werden, um mögliche funktionelle Rückschlüsse ziehen zu können. Dabei stellt sich vor allem die Frage, ob die Mutation an den endosomalen Kompartimente gleichermaßen lokalisiert wie das wildtypische Protein. Anhand eines Degradations-Assays soll zusätzlich untersucht werden, ob der Phänotyp der *DNAJC13*-Mutation weniger als *gain of function* als eher durch einen relativen Verlust an funktionellem *DNAJC13* hervorgerufen ist.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Gerät / Bezeichnung	Firma
Absaug-System VacuSafe	Integra, Fernwald
Agarosegelkammer, Agagel-Mini Biometra	Biometra, Göttingen
Bakterienschüttler	Bioteck
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Cryo 1°C Freezing Container	NALGENE
Dampfsterilisator VarioClav	H+P, Oberschleißheim
Fluoroskan Ascent FL	Thermo Labsystem, Ulm
FUSION-SL	Peqlab, Erlangen
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Kirchdorf
Gefrierschränke (-80°C)	Heraeus, Hanau
Heizblock: Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
iCycler	BioRad, München
Inkubatoren	Binder, Tuttlingen
iQ Real-Time-PCR Thermocycler	BioRad, München
Kühlschränke 4°C	Liebherr, Kirchdorf
Laserscanning-Mikroskop: LSM710	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplattenlesegerät, Multiscan RC	Thermo Labsystem, Ulm
Mini protean III Western Blotting system	BioRad, München
Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
Netzteil Powerpac 300	BioRad, München
PCR DANN Thermocycler	BioRad, München
pH-Meter C6825	Schott, Mainz
SDS-PAGE-System, Mini –PROTEAN® 3 Cell	BioRad, München
Schüttler	Eppendorf, Hamburg
Sonifikator Micro Ultrasonic Cell Disrupter	Fisher, Schwerte
Spektrophotometer Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Sub-CellGT Agarose Gel Elektrophorese System	BioRad, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VWR, Radnor/USA
Waage Quintix 124-1S	Sartorius, Göttingen
Western Blot System, <i>Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell</i>	BioRad, München
Zählkammer Neubauer- <i>Improved</i>	Optik Labor
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge: Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2: Geräteliste

3.1.2. Chemikalien

In folgender Arbeit wurde bei Verwendung einer Chemikalie die entsprechende Bezugsquelle direkt angegeben. Falls nicht anders ausgezeichnet, wurden dabei hauptsächlich Produkte folgender Firmen verwendet: A. Hartenstein (Würzburg), AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Difco (Detroit/USA), Gibco (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), LC Laboratories (Woburn/USA), Merck (Frankfurt a. M.) New England BioLabs (Frankfurt a. M.), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Die Chemikalien wurden nach Angaben der Hersteller angesetzt und gelagert.

3.1.3. Antikörper

3.1.3.1. Western-Blot

Antikörper	Firma	Spezies	Bestellnummer	Verdünnung
Primärantikörper				
anti-Cathepsin D	Abcam, Cambridge/ UK	Kaninchen	ab75852	1:1000
anti-DNAJC13	*	Kaninchen		1:10000
anti-HSP90	Stressgen, San Diego/USA	Maus	SPA-830	1:1000
Anit-LAMP2a	Abcam, Cambridge/ UK	Kaninchen	ab18528	1:1000
anti-LC3B	Sigma Aldrich, Deisenhofen	Kaninchen	L7543	1:1000
anti-p53	Cell Signaling, Frankfurt a.M.	Maus	2524	1:1000
anti-SQSTM1/p62	Progen, Heidelberg	Meerschweinchen	GP62-C	1:1000
anti- α -Tubulin	Sigma Aldrich, Deisenhofen	Maus	T6557	1:5000
Sekundärantikörper				
anti-Kaninchen, Peroxidasegekoppelt	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK	Esel	711-035-152	1:10000
anti-Maus, Peroxidasegekoppelt	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK	Esel	715-035-151	1:10000
anti-Meerschweinchen, Peroxidasegekoppelt	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK	Esel	706-035-148	1:10000

Tabelle 3: Antikörper, Western-Blot

Die Lösung der Primärantikörper wurde durch 0,1 % Natriumazid konserviert und mehrfach verwendet.

3.1.3.2. Immunfluoreszenz-Färbungen

Antikörper	Firma	Spezies	Bestellnummer	Verdünnung
Primärantikörper				
anti-EEA1	BD Biosciences, Franklin Lakes/ US	Maus	610457	1:200
anti-DNAJC13	*	Kaninchen		1:5000
anti-Flag	Sigma Aldrich, Deisenhofen	Maus	F1804	1:400
anti-LAMP2a	Abcam, Cambridge/ UK	Kaninchen	ab18528	1:200
anti-LC3B	Sigma Aldrich, Deisenhofen	Kaninchen	L7543	1:200
anti-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor	Abcam, Cambridge/ UK	Maus	ab8093	1:200
anti-SNX1	BD Biosciences, Franklin Lakes/ US	Maus	611482	1:400
anti-SQSTM1/p62	Progen, Heidelberg	Meerschweinchen	GP62-C	1:200
anti-Transferrin-Rezeptor	Invitrogen	Maus	13-6800	1:200
anti-Trans-Golgi-Network 46	Bio-rad AbD Serotec	Schaf	AHP500	1:200
anti-VPS35	LSBio, Seattle/US	Ziege	LS-B5909/55567	
anti-WAS	Millipore, Schwalbach	Kaninchen	ABS72	1:200
Sekundärantikörper				
anti-Maus, Carbocyanin 3-gekoppelt	Jackson Immuno Research, Newmarket/ UK	Esel	715-165-151	1:200
anti-Kaninchen, Alexa 647-gekoppelt	Jackson Immuno Research, Newmarket/ UK	Esel	711-605-152	1:200

anti-Meerschweinchen Dylight-488 gekoppelt	Jackson Immuno Research, Newmarket/UK	Esel	706-486-148	1:200
--	---------------------------------------	------	-------------	-------

Tabelle 4: Antikörper, Immunfluoreszenz

* Mit freundlicher Bereitstellung von Prof. Peter McPhersons, Neurologisches Institut und Krankenhaus Montreal (Kanada).

3.1.4. Oligonukleotide

3.1.4.1. Primer für Realtime-PCR

Bezeichnung	Sequenz
alsin for	5'-CCTTGACAGGCAGGAAGAAG-3'
alsin rev	5'-CTGCTTGGGTGTCAGGGTAT-3'
ampk/PRKAA1 for	5'-CCTCAAGCTTTCAGGCATC-3'
ampk/PRKAA1 rev	5'-TTTCATCCAGCCTTCCATTC-3'
ATG-2A for	5'-AAGTACTTCCCTGCCCCAGGT-3'
ATG-2A rev	5'-TCTCCAGGGATCACCATCT-3'
ATG-2B for	5'-AGCTGGCATGAGCAGATTTT-3'
ATG-2B rev	5'-GTGCACAGCTCCAAAGATGA-3'
ATG-3 for	5'-GATGGCGGATGGGTAGATACA-3'
ATG-3 rev	5'-TCTTCACATAGTGCTGAGCAATC-3'
ATG-4B for	5'-ATGGACGCAGCTACTCTGAC-3'
ATG-4B rev	5'-TTTTCTACCCAGTATCCAAACGG-3'
ATG-4C for	5'-GTTGAAGAAGCAAGGCATCC-3'
ATG-4C rev	5'-TCGGTGTGGTTCTTTCTCC-3'
ATG-4D for	5'-AAGGCAGGTGACTGGTATGG-3'
ATG-4D rev	5'-ACAGACTTCCACTCGGCTGT-3'
ATG-5 for	5'-TTCGAGATGTGTGGTTTGGGA-3'
ATG-5 rev	5'-ATGGTTCTGCTTCCCTTTCA-3'
ATG-7 for	5'-TGGAACAAGCAGCAAATGAG-3'
ATG-7 rev	5'-AGACAGAGGGCAGGATAGCA-3'
ATG-9A for	5'-GTCAGCTGCGTGGACTATGA-3'
ATG-9A rev	5'-GACTTGAGCAGGCAAAAAGG-3'
ATG-12 for	5'-TAGAGCGAACACGAACCATCC-3'
ATG-12 rev	5'-CACTGCCAAAACACTCATAGAGA-3'
ATG-14 for	5'-AGCAGACCTTGAGGAGTCCA-3'
ATG-14 rev	5'-CCACAGACTGGGAAGGGATA-3'
ATG-16L1 for	5'-ATGCGCGGATTGTCTCAGG-3'
ATG-16L1 rev	5'-GTCCACTCATTACACATTGCTCT-3'
ATG-16L2 for	5'-TCTGAGGTCAATGCTGTTTCG-3'
ATG-16L2 rev	5'-AGGGGTCAAAGTCCCACTG-3'
b2m for	5'-GTGCTCGCGCTACTCTCTCT-3'
b2m rev	5'-TCTCTGCTGGATGACGTGAG-3'
beclin1 for	5'-AGGTTGAGAAAGGCGAGACA-3'
beclin1 rev	5'-GCTTTTGTCCACTGCTCCTC-3'
clathrin for	5'-ACTTAGCCGGTGCTGAAGAA-3'

clathrin rev	5'-AACCGACGGATAGTGTCTGG-3'
dnmt1 for	5'-ACAGTACCAGCCCATCCTCA-3'
dnmt1 rev	5'-AGGCTTTGCCGGCTTCC-3'
eea1 for	5'-TGCATCTGAAACCTCACTGC-3'
eea1 rev	5'-CCATGCTGCTCCTTTTCTTC-3'
fam21 for	5'-ACAGGCAAAGTCCAATCCAC-3'
fam21 rev	5'-TGACTCACAGTGGCTTCTGG-3'
gabarap for	5'-AGAAGAGCATCCGTTTCGAGA-3'
gabarap rev	5'-GAGCTTTGGGAGCCTTTTCT-3'
gabarapL1 for	5'-GGTCCCCGTGATTGTAGAGA-3'
gabarapL1 rev	5'-GGAGGGATGGTGTGTTGAC-3'
gabarapL2 for	5'-AAATATCCCGACAGGGTTCC-3'
gabarapL2 rev	5'-CAGGAAGATCGCCTTTTCAG-3'
hsc70 for	5'-GGAGGTGGCACTTTTGATGT-3'
hsc70 rev	5'-AGCAGTACGGAGGCGTCTTA-3'
hsp70 for	5'-CAAGATCACCATCACCAACG-3'
hsp70 rev	5'-TCGTCCTCCGCTTTGTA-3'
lamp1 for	5'-CTGCCTTTAAAGCTGCCAAC-3'
lamp1 rev	5'-TGTTCTCGTCCAGCAGACAC-3'
lamp2 for	5'-AATGCCACTTGCCTTTATGC-3'
lamp2 rev	5'-CAGTGCCATGGTCTGAAATG-3'
lamp3 for	5'-CCCCACCAGCTCATACAACT-3'
lamp3 rev	5'-CTGGAAGGGTGGTCTGGTTA-3'
lrrk1 for	5'-CCTGCCCTTTGAAATGTTGT-3'
lrrk1 rev	5'-AGCTGGTCCCTGTAACCT-3'
m6pr for	5'-ACTCCTTGCTTAGCGGACAA-3'
m6pr rev	5'-TCGCTGGTCCTTAACAGCTT-3'
map1lc-3A for	5'-CATGAGCGAGTTGGTCAAGA-3'
map1lc-3A rev	5'-CTCGTCTTCTCCTGCTCGT-3'
map1lc-3B for	5'-CTGTTGGTGAACGGACACAG-3'
map1lc-3B rev	5'-CTGGGAGGCATAGACCATGT-3'
map1lc-3C for	5'-CGGAAGCCTTTTACTTGCTG-3'
map1lc-3C rev	5'-GTCTGTCCTCAAGGCTGCTC-3'
mtor for	5'-CCTGCCACTGAGAGATGACA-3'
mtor rev	5'-TCCGGCTGCTGTAGCTTATT-3'
nbr-1 for	5'-GTTGCTGCCTCTGCATACAA-3'
nbr-1 rev	5'-TTTCTTCAGCAGCCGTAGGT-3'
ndp-52/calco2 for	5'-GTGGAAGACAACCCGTGAGT-3'
ndp-52/calco2 rev	5'-TTCTGGACGGAATTGGAAAG-3'
p62/SQSTM-1 for	5'-GTGGTAGGAACCCGCTACAA-3'
p62/SQSTM-1 rev	5'-GAGAAGCCCTCAGACAGGTG-3'
rab5 for	5'-TTGCCAAAGAATGAACCACA-3'
rab5 rev	5'-GGTTGTGTGGGTTCCGGTAAG-3'
rab7A for	5'-CTGACCAAAGGAGGTGATGGT-3'
rab7A rev	5'-GTAGAAGGCCACACCGAGAG-3'
rab11A for	5'-AGCAAGAGCACCATTGGAGT-3'
rab11A rev	5'-CCCTGCTGTGTCCCATATCT-3'
rab18 for	5'-CTGAAATTTGCACGAAAGCA-3'
rab18 rev	5'-CACAGTCCAGGGGTCTGAAT-3'

rab3gap-1for	5'-CTGACCGAAGGGATCATTGT-3'
rab3gap-1 rev	5'-CCTTTCGACGGCAAATTTTA-3'
rab3gap-2 for	5'-TGAGAATGGTGTGCTCTTGC-3'
rab3gap-2 rev	5'-TGATTTTCGACAAGCACGAAG-3'
rab24 for	5'-GCAAGACTAGCCTGGTGGAG-3'
rab24 rev	5'-CTTGGCACCCCGATAGTAGA-3'
rab26 for	5'-AAAGTTCTGGACGTGGATGG-3'
rab26 rev	5'-GGTGACATCGTAGAGCAGCA-3'
rab33b for	5'-GCTGAGGAGATGGAGTCGTC-3'
rab33b rev	5'-GAGTCGCCGATCACGATTAT-3'
rab40a for	5'-GAGCTTGCAAGACCTCTGCT-3'
rab40a rev	5'-TCTTGTGAGTGGAGCTGGTG-3'
rme8_RT-1 for	5'-GGGATAGGATGGGCATTGCT-3'
rme8_RT-1 rev	5'-GCATGGTCTTGACCAAACCTATAA-3'
rpl-19 for	5'-GAAATCGCCAATGCCAACTC-3'
rpl-19 rev	5'-TTCCTTGGTCTTAGACCTGCG-3'
snx1 for	5'-ATTGAGTGGTGTGCTGGTCTCC-3'
snx1 rev	5'-ACCTCCTGGAGCTTCTCCTC-3'
strump for	5'-AAACGACTTTGGTTGGCATC-3'
strump rev	5'-GTCGCTCCCAACTCTTTCAG-3'
tbc1d5 for	5'-GCCCAGTGAGGAAATGAAAA-3'
tbc1d5 rev	5'-CTTCCCTTCTGACCATCA-3'
tbc1d14 for	5'-GGGAAACAATGTGGTGTCTCT-3'
tbc1d14 rev	5'-TCCACTTCAGAGCCTCCTGT-3'
tbc1d20 for	5'-CACCAGGCTCTGAACAGTGA-3'
tbc1d20 rev	5'-CATTGGCATTGACATTGAGG-3'
tmem230 for	5'-CACTTGCCACTGTGCTGTTT-3'
tmem230 rev	5'-AAAATCCGGGTAGGAACACC-3'
transferrin-R for	5'-AAAATCCGGTGTAGGCACAG-3'
transferrin- R rev	5'-CACCAACCGATCCAAAGTCT-3'
trappc3 for	5'-TGAGCTCTTCACCCTGACCT-3'
trappc3 rev	5'-CCCATTTTGTCCAGCTGTTT-3'
ulk1 for	5'-CAGAACTACCAGCGCATTGA-3'
ulk1 rev	5'-TCCACCCAGAGACATCTTCC-3'
ulk2 for	5'-TTTGGTGCCACACAACATCT-3'
ulk2 rev	5'-GGAAGTGGAAATTGGTGTGT-3'
ulk3 for	5'-CAGGATTCTGCCTGAGAAGG-3'
ulk3 rev	5'-ATGTGTTGTGCGAAACCAAA-3'
uvrag for	5'-GCACCCTAGCCAAGAACAAG-3'
uvrag rev	5'-AGCTTCTGAGACTGGGTGGA-3'
vapa for	5'-TGAGCAGCATCAACAACACA-3'
vapa rev	5'-TGGTTTTGGCATAGGTCCAT-3'
vapb for	5'-TGTTTGAATTGCCAGCAGAG-3'
vapb rev	5'-GCCTCTGAACTTCACCTTGC-3'
VPS26 for	5'-CCAATGTCCGCTTGAGGTAT-3'
VPS26 rev	5'-TGGCAAGCTGGTGAACAATA-3'
VPS35 for	5'-TTCACAGCAGGTGGCTACAG-3'
VPS35 rev	5'-TCCACACGATCAGGGTAACA-3'
wash1 for	5'-ATCTCCCAGCAGGTAGAGCA-3'

wash1 rev	5'-TTCTTGCTGCCCTTGATCTT-3'
wipi1 for	5'-CCAGACCCAGTGCATCTTCA-3'
wipi1 rev	5'-TCATGACTGCTTCGTTTTGC-3'
wipi2 for	5'-CTCTCACGACTGCCCCTTAG-3'
wipi2 rev	5'-ACCCAGGTCGTCTGTGTAGG-3'

Tabelle 5: Oligonukleotide, Realtime-Q-PCR

3.1.4.2. Primer zur Mutagenese von DNAJC13p.Asn855Ser

Bezeichnung	Sequenz
N855S for	5'- GCGATGATAAAGCTCACTGAAAAATTCATACGATCTCTTAATTG ATCC -3'
N855S rev	5'- GGATCAATTAAGGATCGTATGAATTTTTTCAGTGAGCTTTATCAT CGC -3'

Tabelle 6: Oligonukleotide, Mutagenese

3.1.4.3. Primer zur Sequenzierung von DNAJC13p.Asn855Ser

Bezeichnung	Sequenz
N855S_A	5'-CTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTCTG-3'
N855S_B	5'-TTTGGGAAGTAACTCCAGGAGG-3'
N855S_C	5'-GTTTGCTGGATGGAGTAAGAG-3'
N855S_D	5'-CATGTGGATCATGGGACTCCTG-3'
N855S_E	5'-TATTGATGCACTGGAGGGATAG-3'
N855S_F	5'-AAGCCGAGCTACAGTACCAC-3'
N855S_G	5'-ACAATGGAACTTCAGATGACCTC-3'
N855S_H	5'-CATGCTGACACCCTATGTTGC-3'
N855S_I	5'-CAACTTAAAGTGCCCAATGC-3'

Tabelle 7: Oligonukleotide, Sequenzierung

3.1.5. Plasmide

3.1.5.1. Plasmide zur Überexpression

Bezeichnung	Vektor	Resistenz
pEFBos:DNAJC13-Flag	pEFBos	Ampicillin
pEFBos:DNAJC13-GFP		
pEFBos:DNAJC13-N855S-Flag		
pEFBos:DNAJC13-N855S-GFP		

Tabelle 8: Plasmide, Überexpression

3.1.5.2. Plasmide zum *Knockdown*

TRC-Nummer	shRNA-Sequenz	Vektor
000018 1204	5'- CCGGCGCCTTTATCTGAGTGGAGTACTCGAGTACTCCAC TCAGATAAAGGCGTTTTTTG-3'	pLKO.1
000014 6708	5'- CCGGCACGAGAAGAAGTAAAGATACTCGAGTATCTTTC AGTTCTTCTCGTGTTTTTTG-3'	pLKO:1
000024 3949	5'- CCGGCGTGATCCGGCAACCTATAATCTCGAGATTATAGG TTGCCGGATCACGTTTTTTG-3'	pLKO.puro
000024 3951	5'- CCGGAGTCGCCTTGGAGGGTATTTGCTCGAGCAAATAC CCTCCAAGGCGACTTTTTTTG-3'	pLKO.puro
000024 3947	5'- CCGGTAGGTCCAAAGGTTTGAATTACTCGAGTAATTCGA ACCTTTGGACCTATTTTTG-3'	pLKO.puro
000024 3950	5'- CCGGGATCCTAATTGTATCACATTACTCGAGTAATGTGA TACAATTAGGATCTTTTTG-3'	pLKO.puro

Tabelle 9: Plasmide, *Knockdown*

Mit freundlicher Bereitstellung von Prof. Krishnaraj Rajalingam, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz

3.1.6. Modellorganismen

3.1.6.1 Bakterien zur Transformation

Stamm	Gentyp
DH5 α (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

Tabelle 10: Bakterien

3.1.6.2 Zelllinie

	Firma
HEK293A-Zellen	American Type Culture Collection, Manassas/USA
HEK293T- Zellen	American Type Culture Collection, Manassas/USA

Tabelle 11: Zelllinien

Falls nicht anders bezeichnet, wurden für biochemische Analysen HEK293T, verwendet, da sie eine sehr hohe Transfektionseffizienz aufweisen. HEK293A eignen sich aufgrund ihres günstigeren Kern-Zytoplasma Verhältnisses zugunsten des Zytoplasmas eher für Fluoreszenzfärbungen.

3.1.7. Kits und Standards

Bezeichnung	Firma
Absolutely RNA-Miniprep Kit	Agilent Technologies, Cedar Creek /USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Bonn
NucleoSpin® Plasmid, Micro	Macherey-Nagel, Düren
Omniskript RT Kit	Quiagen, Germantown/USA
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius /Litauen
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Cedar Creek /USA
SensiFAST SYBR & Fluorescein Kit	Bioline, Luckenwalde

Tabelle 12: Kits und Standards

3.1.8. Software

Programm	Anwendung
Adobe PhotoshopCS5	Graphische Bearbeitung Immunfluoreszenz/ Western Blot
Ascent Software for Fluoroskan/ Multiskan V2.6	Photometrie und Fluoreszenz-Messung
GraphPad Prism 5	Statistische Auswertung
ImageJ	Densitometrische Auswertung Western Blot Kokalisations-Berechnung der Immunfluoreszenz
Microsoft One Note 2016	Dokumentation
REST2009	Auswertung der Real-time PCR
ZEN 2011 SP2 (black edition) Version 8.0	Aufnahmen Konfokale Mikroskopie

Tabelle 13: Software

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser bei 80 prozentiger Konfluenz (subkonfluent) in 10 ml Komplettmedium bei 37°C und 5 % CO₂. Zum Erhalt musste die Kultur entsprechend ihres Wachstumsverhaltens alle 2-3 Tage passagiert werden. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 1x PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Invitrogen, Karlsruhe, s.u.) gewaschen. Anschließend wurde die PBS-Lösung durch 1 ml 1x Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe) ersetzt und für ca. 1 min inkubiert. Als die Zellen abgelöst waren, wurden sie in der doppelten Menge an Komplettmedium aufgenommen und zur Zentrifugation in ein 15 ml Falcon überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 311 u/ min über 4 min. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit 1 ml Komplettmedium sorgfältig resuspendiert und in variierendem Verdünnungsfaktor zwischen 1:5 und 1:20 erneut ausgesät. Gegebenenfalls war nach bestimmten Behandlungen oder bei erhöhtem Verbrauch ein Mediumwechsel erforderlich. Hierzu wurde das alte Medium gründlich abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 1x PBS-Lösung vorsichtig abgespült und die Kulturschale erneut mit Komplettmedium aufgefüllt.

Komplettmedium

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	
Aktives fötales bovines Serum	10%
Antibiotika/Antimykotika (100fach)	1%
Natriumpyruvat	1%

1x phosphatgepufferte Salzlösung

„phosphat buffered saline“ (PBS)	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH=7,4	

Zur langfristigen Konservierung einer Zelllinie werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zunächst wurden subkonfluent kultivierte Zellen einer Petrischale des Durchmessers 10 cm mit 1 ml 1x Trypsin über 1 min bei Raumtemperatur bis zur möglichst vollständigen Ablösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der doppelten Menge an Komplettmedium aufgenommen und bei 4°C und 311 u/ min über 4 min abzentrifugiert, der Überstand dann abgesaugt. Zuletzt wurde das Zellpellet in 1 ml einer 1:10 Mischung aus DMSO (Dimethylsulfoxid) und Komplettmedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Zur Vermeidung von größerer

Kristallbildung erfolgte der Einfriervorgang im Anschluss möglichst langsam in einem dafür vorgesehenen, isolierten Gefäß zunächst bis -80°C . Um der dabei entstehenden osmotischen Dehydrierung entgegenzuwirken, wurde als Kryoprotektivum DMSO zugegeben. Bei Raumtemperatur zeigt DMSO jedoch toxische Wirkung, deshalb sollte der Auftauvorgang wiederum möglichst zügig erfolgen. Hierfür wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt und dessen Inhalt so schnell wie möglich im Verhältnis 1:5 mit Komplettmedium verdünnt und abzentrifugiert (4°C , 4 min, 311 u/ min). Nach Verwerfen des Überstands und Resuspension in 1 ml Komplettmedium wurde die Zellsuspension auf zwei 10 cm Kulturschalen aufgeteilt und unter den üblichen Bedingungen kultiviert. Trotz der Vorsichtsmaßnahmen kam es bei Inkulturnahme einer kryokonservierten Kultur zum Absterben einiger Zellen, deshalb musste 24 h nach dem Auftauen ein Mediumwechsel erfolgen.

3.2.1.2. Transfektion

Zur Expression eines exogenen Proteins durch Zellen muss zunächst Fremd-DNA in die Zelle eingebracht werden. In humanen Zellen wird dieser Vorgang als Transfektion bezeichnet und kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Im Falle der hier verwendeten Kalzium-Phosphat-Präzipitations-Methode bindet die DNA an Kalzium-Phosphat-Komplexe, die nachfolgend mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

An Tag eins wurden die Zellen in 50 prozentiger Konfluenz auf 6 cm Wells ausplattiert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion. Zuerst wurde das Plasmid zu vorgelegtem H_2O und CaCl_2 gegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um möglichst feine Präzipitate zu erhalten, wurde 2x HBS (HEPES gepufferte Salzlösung, „HEPES buffered saline“) anschließend tropfenweise unter dauerhaftem Schütteln pipettiert. Es folgte eine erneute Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Lösung für 24 h auf die Zellen gegeben. Am Folgetag wurde ein Waschgang mit Komplettmedium zur Entfernung der überbleibenden Präzipitate durchgeführt. Weitere 24 h später konnten die Zellen ggf. zur biochemischen Analyse geerntet werden.

Transfektionlösung für 10 cm Well

H ₂ O	420 µl
CaCl ₂ (2M)	60 µl
HBS (2x)	480 µl
DNA	10 µg

2x HEPES gepufferte Salzlösung

„HEPES buffered saline“ (HBS)	
NaCl	280 mM
Hepes	50 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
pH=7,12	

3.2.1.3. Herstellung einer Zelllinie mit stabilem DNAJC13 *Knockdown*

In der vorliegenden Arbeit wurde eine HEK293T-Linie hergestellt, die konstitutiv *short hairpin*-RNA (shRNA) gegen DNAJC13 exprimiert. Hierfür wurden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches die gewünschte shRNA exprimiert. Bei dieser eigentlich transienten Transfektion kommt es in einem geringen statistischen Umfang auch zur stabilen Integration ins Genom. Der verwendete Vektor trägt deshalb gleichzeitig eine Antibiotika-Resistenz, um die Selektion der stabil transfizierten Klone zu ermöglichen. Als Vortest wurde zunächst eine Reihe von Western Blot Analysen zur Evaluation des effektivsten Konstruktes und des Zeitverlaufes des Knock-downs durchgeführt.

Nach Determination oben genannter Bedingungen wurden die naiven Zellen in 50 prozentiger Konfluenz auf eine Kulturschale von 10 cm Durchmesser ausgesät und am Folgetag mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit dem Plasmid TRC 0000243950 transfiziert. Wie gewohnt wurden die Zellen 24 h später einmal mit Komplettmedium gewaschen. Laut Vorexperimenten zeigte sich der stärkste *Knockdown*-Effekt 72 h nach Transfektion. Deshalb wurde dieser Zeitpunkt als Beginn der Selektionierung festgelegt, d.h. die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Selektionierungsmedium weiterkultiviert.

Selektionierungsmedium

Komplettmedium	
Puromycin	2 ng/µl

Im weiteren Verlauf wurden die transfizierten HEK293T weiter unter Selektionsdruck kultiviert und entsprechend ihres Proliferationsverhaltens alle zwei bis drei Tage passagiert, ohne dabei Zellen zu verwerfen. Nach ca. 10 Tagen beobachtete man den Beginn des Zellsterbens und gleichzeitig das Wachstum verschiedener Klonkolonien. Sobald Kolonien klar vereinzelt vorlagen und von ausreichender Größe einen Transfer zu überleben, wurden diese unter dem Mikroskop ausgewählt, mechanisch mittels

einer 200 µl Pipette aufgenommen und getrennt in 24 Well-Platten überführt. Hierbei entstanden ca. 10 Klone, die weiterhin stets unter Selektionsdruck solange expandiert wurden, bis genügend Zellmaterial für die biochemische Analyse und Konservierung vorhanden war.

3.2.1.4. Ernte und Zell-Lyse

Zur biochemischen oder molekularbiologischen Analyse des Zellinneren ist es erforderlich, die Zellen aus der Kulturschale zu lösen und anschließend zu homogenisieren. Dieser Prozess wird als Lyse bezeichnet und richtet sich in Vorgehen und Pufferzusammensetzung nach dem zu analysierenden Molekül und dessen Lokalisation im jeweiligen Zellkompartiment. Ein Zusammenspiel aus Scherkräften durch Einfrierzyklen, Ultraschallwellen oder Hitze und chemischen Detergentien permeabilisieren die Zellmembran und denaturieren Proteine.

Zur Probengewinnung aus der Zellkulturschale wurde das alte Medium zunächst abgesaugt und die Zellen dann einmal mit 1x PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBSs wurden die Zellen je nach Analyt entweder in dem jeweiligen Lysepuffer oder in PBS abgekratzt und in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Um den metabolischen Zustand der Zelle möglichst zum Zeitpunkt der Lyse zu fixieren, fand die beschriebene Prozessierung auf Eis statt.

3.2.1.5. BafilomycinA₁-Behandlung

Eine der etablierten Methoden zur funktionellen Messung des autophagischen Fluxes ist die Behandlung mit Bafilomycin A₁ (Klionsky et al., 2008). Durch spezifische Inhibition der lysosomalen *vacuolar* ATPase verhindert das Antibiotikum die Azidifizierung der Lysosomen und damit u.a. die Degradation von Autophagosomen. Autophagische Vesikel enthalten charakteristische Rezeptor- oder Cargo-Proteine wie LC3-II oder p62/SQSTM1, deren Kumulation man mangels Degradation unter Bafilomycin A₁ beobachtet. Bildet man die Differenz der Protein-Level zwischen einer behandelten und einer unbehandelten Probe, so erhält man eine Aussage über die autophagische Aktivität.

Am Tag der Behandlung wurde Bafilomycin A₁ (LC Laboratories, Woburn/USA) in finaler Konzentration von 4 µmol/l in Komplettmedium angesetzt und über 4 h im Zellinkubator auf die Zellen gegeben. Die unbehandelten Zellen erhielten als Negativkontrolle gleiche Mengen an DMSO, dem Lösungsmittel von Bafilomycin A₁.

3.2.1.6. Cycloheximid-Behandlung

Das Antibiotikum Cycloheximid hemmt spezifisch und reversibel die zytosolische Translation (Poehlsgaard and Douthwaite, 2005). Findet keine Proteinbiosynthese mehr statt, sind die Proteinspiegel der Zelle abhängig von deren Abbau und lassen Rückschlüsse auf die Kinetik der Degradation zu.

Zum Vergleich des Abbaus von wildtypischem zu mutantern Protein wurden HEK293T 24 h nach Aussaat mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert. Weitere 24 h später wurden die Zellen einmalig mit Komplettmedium gewaschen und ein Teil der Zellen bereits lysiert (t=0 h). Auf die verbleibenden Zellen wurde Cycloheximid (Calbiochem, Bad Soden) in Komplettmedium (30 µg/ml) gegeben und nach 4 h, 6 h und 8 h ebenfalls geerntet.

3.2.1.7. Mikrobiologische Methoden

3.2.1.7.1. Bakterienanzucht

Die hier verwendeten *Escherichia coli* (*E.coli*) Bakterien wurden zur Expansion in Flüssigkultur und zur Vereinzelnung von Klonen als Plattenkultur aus LB-Medium („lysogeny broth“) gezüchtet.

LB-Medium

„lysogeny broth“ (LB)

Bacto-Trypton	1%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	1%
Ampicillin	100 µg/µl

Für die Plattenkultur wurde zusätzlich 1,5 % Agar zugesetzt. Erst nach Abkühlung unter 50°C wurde 1000x Ampicillin (Sigma Aldrich, Deisenhofen) hinzugegeben. Abschließend wurde das Medium nach Fertigstellung autoklaviert.

3.2.1.7.2. Transformation mittels Hitzeschock

Der Begriff Transformation bezeichnet die Aufnahme von freier DNA in einen Prokaryoten und ist ein erforderlicher Schritt zur Vermehrung eines Plasmids in Bakterien. Hier angewendet wurde die Transformation bereits chemisch kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock. Nach der Transformation wurden durch Anzucht auf einer Nährplatte Klone vereinzelt und später in einer Flüssigkultur expandiert, um hieraus die DNA zu extrahieren. Das selektive Wachstum positiv transformierter Bakterien wurde durch Antibiotikaresistenzen und das entsprechende Antibiotikum in der Nährlösung gewährleistet.

E. coli-Bakterien des Stammes DH5 α (New England BioLabs, Frankfurt a. M.) wurden auf Eis aufgetaut. 20-25 μ l wurden mit 1 μ g der zu vermehrenden Nukleinsäure vermischt und für 30 min auf Eis belassen. Es folgte der Hitzeschock über 30 sec bei 42°C. Anschließend wurde die Suspension über 2 min auf Eis abgekühlt und mit 400 μ l warmem LB-Medium aufgefüllt. Nach 45 min Inkubationszeit bei 37°C auf dem Schüttler (200 rpm) wurden die transformierten Bakterien fraktioniert auf eine Ampicillin enthaltende Nährplatte ausgestrichen.

3.2.2. Proteinanalytik

3.2.2.1. Lyse

Der erste Schritt der chemischen Lyse erfolgte bereits durch den beim Erntevorgang verwendeten Lysepuffer. Dabei wurden ca. 70 – 150 μ l 1x Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Durch die Lagerung der Proben über Nacht bei -20°C war automatisch eine Kryolyse eingeschlossen. Vor der Protein-Quantifizierung wurden die Proben dann in zwei Zyklen über 10 sec bei einer Amplitude von 60 % sonifiziert und anschließend einmal unter Schütteln erhitzt (950 rpm, 5 min, 95°C). Somit war eine effektive Kombination physikalischer und chemischer Lyseverfahren gewährleistet.

3x Lysepuffer für Western Blot

Analyse

TRIS/HCl	187,5 mM
EDTA	3 mM
SDS	3%
Saccharose	30%
pH=6,8	

1x Lysepuffer für Western Blot

Analyse

3xLysepuffer	3,33 ml
H ₂ O	6,66 ml
Protease Inhibitor	400 μ l
Phosphatase Inhibitor	1 Tbl

3.2.2.2. Protein-Quantifizierung

Die Ermittlung der absoluten Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Tests (*Bicinchoninic Acid*). Das Funktionsprinzip dieses Verfahrens beruht auf einem gekoppelten optischen Test mit anschließender photometrischer Bestimmung eines chromatischen Farbkomplexes, dessen Konzentration äquimolar zur Proteinkonzentration ist. In der ersten Reaktion werden zweiwertige Kupfer-Ionen durch die Peptidbindung der Proteine reduziert. Anschließend bilden die Cu^+ -Ionen mit Bicinchoninsäure einen Farbkomplex, der bei 562 nm Licht absorbiert. Das Lambert Beer'sche Gesetz beschreibt einen proportionalen Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration. Die Messung der Extinktion der Proben bei genannter Wellenlänge lässt dann unter Berücksichtigung der Eichgerade (BSA= bovines Serumalbumin) Rückschlüsse auf die Gesamt-Proteinkonzentration zu.

Lambert Beer'sches Gesetz:	$E = \epsilon \cdot c \cdot d$
----------------------------	--------------------------------

E = Extinktion

c = Konzentration [mol/l]

ϵ = molare Extinktionskonstante [$\text{mol/l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

d = Schichtdicke [cm]

In eine 96-Well Platte wurden 10 μl BSA, der Konzentrationen 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 und 700 ng/ μl pipettiert, gleichermaßen 10 μl der zu analysierenden Proben (1:10 verdünnt). Die Bestimmung erfolgte für Eichgerade und Analyt jeweils als Triplett. Die Reaktionslösung wurde aus Lösung A und Lösung B (Pierce BCA Protein Assay Kit) im Verhältnis 1:50 angesetzt und 190 μl zu den Eichlösungen und den Proben gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit bei 60°C wurde die Extinktion bei 560 nm gemessen. Hieraus ergab sich die lineare Eichfunktion und daraus berechnete Proteinkonzentrationen der Proben.

3.2.2.3. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese)

Die Western-Blot Analyse dient der Detektion und Quantifizierung spezifischer Proteine. Hierbei werden selbige nach molekularem Gewicht in einer Gelelektrophorese im elektrischen Spannungsfeld aufgetrennt. Anschließend werden

sie auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und somit der immunologischen Detektion zugänglich gemacht. Ein an den Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym katalysiert eine Reaktion, dessen Lichtsignal sich proportional zur Konzentration des Proteins verhält und nachfolgende Quantifizierung zulässt.

Laut dem Prinzip der Elektrophorese wandern geladene Teilchen im elektrischen Feld. Damit die Auftrennung nach molekularem Gewicht erfolgt, muss zunächst ein Ladungsausgleich der zu analysierenden Proteine stattfinden. Diese Funktion erfüllt das amphiphile Molekül Sodiumdodecyl-Sulfat (SDS), welches außerdem dem chemischen Aufschluss der Zellmembran und der Denaturierung der Proteine dient. Der Bereich der Auftrennung wird durch die Konzentration des Acrylamids im Gel bestimmt. Je höher die Konzentration, umso kleiner die Maschengröße und umso feiner die Auftrennung im niedermolekularen Bereich. Eine Marker-Lösung aus Proteinen bekannten molekularen Gewichts dient als Referenzgröße.

Verwendet wurde das System nach Lämmli, bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel (Laemmli, 1970). Die Proben wurden in 4x Ladepuffer angesetzt und vor der Beladung des Gels einmal erhitzt (950 rpm, 5 min, 95°C). Pro Tasche wurden zwischen 5 und 15 µg Gesamtlysat aufgetragen und zunächst über 30 min 50 V, danach 120 V Spannung ausgesetzt. Je nach Größe des zu analysierenden Proteins fand die Auftrennung entweder in 8% oder 15% Polyacrylamid statt.

4x Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

TRIS	0,6 M
SDS	0,4 %
pH=6,8	

4x Trenngelpuffer für SDS-PAGE

TRIS	1,5 M
SDS	0,4 %
pH=8,8	

4x Ladepuffer für SDS-PAGE

TRIS	0,25 M
SDS	8%
Glycerin	40%
Bromphenolblau	0,04%
2-Mercaptoethanol	20%
pH=6,8	

10x Laufpuffer für SDS-PAGE

TRIS	25 mM
Glycin	2,5 M
SDS	1%
pH=9,1	

	4% Sammelgel	8% Trenngel	15% Trenngel
Acrylamid (40%)	0,75 ml	2 ml	3,75 ml
Sammel-/ Trenngelpuffer (4x)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
dH ₂ O	6,5 ml	5,5 ml	3,75 ml
Tetramethylethylendiamin (TEMED)			10 µl
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (10%)			100 µl

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung müssen die Proteinbanden aus dem Gel heraus auf eine Membran übertragen werden. Auch dieser Schritt erfolgt im elektrischen Spannungsfeld.

In dieser Arbeit wurde dafür das Nass-Blot-Verfahren verwendet. Bei einer Spannung von 30 V werden die Proteine über Nacht bei Raumtemperatur auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zur Aktivierung der Nitrozellulosemembran wurde dem Puffer 20 % Methanol zugesetzt. Die Verifizierung des Übertrags erfolgte am nächsten Tag mittels reversibler Ponceau S-Färbung. Die Membran wurde über 5 min in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend kurz mit Wasser ausgewaschen.

Transferpuffer

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

Ponceau-Lösung

Ponceau S	0,02%
Trichloracetat	0,3 %
Sulfosalicylsäure	0,3%

Als letzter Schritt im Western-Blot Prozess werden die aufgetrennten Proteine mittels Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Um die Spezifität zu maximieren, werden freie Proteinbindungsstellen der Membran zunächst mit einer Milchlösung abgeblockt. Hierfür wurde die Membran über 1 h bei Raumtemperatur in 4 prozentiger Milchlösung inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit 1x PBS/Tween-20 von jeweils 10 min. Über Nacht wird die Membran nun bei 4°C in dem proteinspezifischen Primärantikörper inkubiert. Am Folgetag wurde erneut wie oben beschrieben gewaschen, um dann über 1 h bei Raumtemperatur den spezies-spezifischen Sekundärantikörper auf dem Schüttler zu inkubieren. Nach einem letzten Waschvorgang wird die Membran mit ECL-Lösung („*enhanced chemiluminescence*“) benetzt. Der zweite Antikörper trägt das Enzym Meerrettich-Peroxidase, welches unter Anwesenheit von H₂O₂ die Oxidation von Luminol katalysiert. Dabei entsteht ein Lichtsignal, das sich proportional zur Proteinmenge verhält und mittels densitometrischer Messung quantifiziert werden kann. Das Lichtsignal wurde mit dem Fusion S-System (Peflab) gemessen. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ.

1xPBS/Tween-20

NaCl	137nM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ HPO ₄	1,8mM
Tween-20	0,05 %

Milchlösung (4%)

Magermilchpulver in 1x PBS/Tween20	4%
------------------------------------	----

ECL-Lösung

Lösung A (1000 µl)	
Tris-HCl (pH 8,6)	0,1M
Luminol	0,025%
Lösung B (100 µl)	
Para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO	0,11%
Lösung C (1 µl)	
H ₂ O ₂	30%

3.2.2.4. Messung der Cathepsin-Aktivität

Cathepsine sind lysosomale Enzyme, welche im Rahmen der Proteindegradation die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Sie erkennen als ersten Schritt im Abbauprozess zur Degradation bestimmte Substrate und sind lysosomenspezifisch. Darum kann die enzymatische Cathepsin Aktivität als Ausdruck der lysosomalen Aktivität dienen. Im hier beschriebenen Experiment wurde ein Substrat verwendet, das eine Esterbindung zu einem fluorophoren Molekül enthält. Unter Hydrolyse wird ein Fluorophor frei. Das Fluoreszenz-Signal verhält sich dann proportional zur Produktkonzentration. Die Zunahme des Signals im Zeitverlauf (Steigung) lässt Rückschlüsse auf die Enzymaktivität zu. Gemessen wurde die Reaktion in einer durch mehrere Extraktionsschritte mit lysosomalen Proteinen angereicherten Lösung. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit dem spezifischen Cathepsin-Inhibitor E-64-D (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) behandelt (Gumpper et al., 2017).

3.2.2.4.1. Extraktion einer Cathepsin angereicherten Fraktion

Die zu analysierenden Zellen wurden mit 100% Konfluenz auf zwei Kulturschalen des Durchmessers 15 cm ausgesät und über Nacht in Kompletmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurden beide Schalen nach Entfernung des Mediums einmal mit 1x PBS gewaschen, in 2 ml PBS aufgenommen und in einem Greiner-Gefäß vereint, um dann abzentrifugiert zu werden (311 u/min, 4°C, 4 min). Schließlich wurde der Überstand abgesaugt und die Probe bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Die Lokalisation des Analyten bestimmt das Protokoll von Lyse und Extraktion. Im Falle des hier lysosomal lokalisierten Proteins wurde im ersten Lyseschritt deshalb ohne Detergens gearbeitet, um zunächst die Integrität der Lysosomen zu wahren. Das Zellpellet wurde gewogen (durchschnittlich 150 µg) und in der 3-fachen Menge an

zytosolischem Lysepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann über 30 min zentrifugiert (4°C, 13 000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aus angereicherten Zellkompartimenten erneut gewogen (durchschnittlich 50µg). Im letzten Extraktionsschritt sollte nun die lysosomale Membran aufgebrochen werden. Der saure pH-Wert des lysosomalen Lysepuffers entspricht dem physiologischen Milieu des lysosomalen Kompartiments und bewahrt deshalb die Funktion der luminalen Proteine. Das Pellet wurde in der doppelten Menge lysosomalen Lysepuffers resuspendiert und dann in zwei aufeinanderfolgenden Intervallen von 10 sec bei einer Amplitude von 60% sonifiziert. Hiernach schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13 000 rpm über 30min an. Damit sollte sich das zu analysierende Cathepsin im Überstand anreichern, der dann für den weiteren Versuchsablauf in ein Reaktionsgefäß überführt wurde.

Zytosolischer Lysepuffer

TRIS-HCL	20 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Glycerol	1%
Dithiothreitol (DTT)	2 mM
pH	7,8

Lysosomaler Lysepuffer

Natrium-Acetat	200 mM
NaCl	50 mM
Triton X-100	0,1%
pH	5,0

3.2.2.4.2. Messung der Cathepsin-Aktivität

Die Fluoreszenz-Messung fand in einer lichtgeschützten gefärbten 96-Well-Platte statt. Pro Well wurden gleiche Protein-Mengen der lysosomal angereicherten Fraktion eingesetzt. Zunächst wurden 7,5 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 100 µl Puffer zur Messung der Cathepsin Aktivität vorgelegt. Für die Negativmessung wurden die 7,5 µg Protein in 90 µl des Puffers pipettiert. Nun wurden den Proben zur Negativkontrolle 10 µl E-64-D (0,5 mM) zugegeben und die gesamte Platte über 15 min bei 37°C inkubiert. Schließlich erfolgte die Zugabe von 50 µl des Substrates 40 µM Z-FR-AMC (Benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-(7-Amino-4-Methylcoumarin), Merck, Frankfurt a. M.). Zur Aktivierung der Reaktion wurde die Platte dann erneut über 5 min bei 37°C inkubiert. Danach begann die Messphase über 120 min. In Intervallen von 3 min wurde mit Licht der Wellenlänge 355 nm angeregt und die Emmission bei 460 nm gemessen. Die Messung wurde jeweils als Duplikat durchgeführt, deren Mittelwerte dann der Auswertung dienten.

Puffer zur Messung der Cathepsin-Aktivität

Natrium-Acetat	100 mM
NaCl	120 mM
EDTA	1 mM
pH = 5,5	

3.2.2.5. Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Studie subzellulärer Verteilungsmuster wurden die Zellen, ggf. nach Behandlung oder Transfektion, fixiert und mit einem proteinspezifischen Primärantikörper detektiert. Ein an ein Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper erkennt spezie-spezifisch den vorherigen und liefert somit das Lichtsignal für die konfokale Mikroskopie.

HEK293A wurden zu Beginn mit 30 prozentiger Konfluenz auf speziell zur Mikroskopie vorgesehene Ibidi *15 μ -Slide 8 Well* (ibidi, Martinsried) in 150 μ l Komplettmedium ausgesät. Gegebenenfalls wurde am Folgetag nach dem Protokoll der Kalzium-Phosphat-Präzipitation transfiziert und wie gewohnt 24 h nach Transfektion mit Komplettmedium gewaschen, um danach eine weitere Nacht im Brutschrank zu verbleiben. Vor der Fixierung wurden einzelne Wells nach Entfernung des Mediums zunächst einmalig mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 25 min bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd inkubiert. Das Paraformaldehyd hemmt durch Denaturierung der zellulären Enzyme die Autolyse, führt zur Vernetzung der Proteine und befestigt die Zellen am Objektträger. Um das Eindringen der Antikörper zu gewährleisten bedarf es der Permeabilisierung der Zellmembran. Hierfür wurde das PBS erneut entfernt und für 5 min gegen Methanol (90%) ersetzt. Der Permeabilisierungsschritt fand auf Eis statt, verwendet wurde auf -80° C gekühltes Methanol, welches nach Ablauf der Inkubationszeit dann durch drei weitere Waschvorgänge mit 1x PBS entfernt wurde. Die Primärantikörper wurden in Verdünnungspuffer in einem Verhältnis 1:200 oder 1:400 gelöst (Tabelle 4). Nach Absaugen des PBS wurden 150 μ l der Primärantikörper-Lösung auf die Zellen pipettiert und über 2 h bei Raumtemperatur belassen. Vor dem Sekundärantikörper wurde drei weitere Male mit 1x PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde gleichfalls in Verdünnungspuffer (1:200) angesetzt. Die Inkubationszeit unter Lichtschutz betrug hier 1 h bei Raumtemperatur und wurde wie gewohnt durch einen Waschgang mit PBS beendet. Im letzten Schritt erfolgte die Färbung der Zellkerne

durch 4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochloridhydrat (DAPI) (500 µg/µl in 1xPBS), das über 10 min auf den Zellen verweilte und anschließend durch zwei Waschgänge mit PBS wieder entfernt wurde. Während des gesamten Färbeporgangs wurde darauf geachtet, dass die Zellen zu jeder Zeit mit PBS bedeckt blieben um, Austrocknungsartefakte zu vermeiden. Abschließend wurde das PBS abgesaugt. Für optimale Mikroskopie-Bedingungen wurden die Zellen mit 4 Tropfen *Ibidi Mounting Medium* (ibidi, Martinsried) beschichtet.

Verdünnungspuffer

1x PBS

aktives fötales bovines Serum 10%

3.2.3. Molekulargenetische Methoden

3.2.3.1 Plasmidaufreinigung

Zur Gewinnung ausreichender Mengen an Plasmid wurde nach Transformation eine Übernacht-Kultur zur Vermehrung in DH α -Bakterien angelegt. Hierfür wurde mit einer Pipettenspitze eine vereinzelt Kolonie auf der Nährplatte abgestrichen und die Spitze anschließend in 200 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum gegeben. Mit lockerem Verschluss zur Belüftung verblieb die Kultur über Nacht auf dem Bakterienrüttler (37°C, 200 rpm). Die Extraktion der DNA aus den Bakterien erfolgte mittels Säulenchromatographie nach dem Prinzip des Anionenaustauschs mit anschließender Ethanol-Fällung. Hierfür wurde in dieser Arbeit das PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius /Litauen) verwendet.

3.2.3.2. RNA-Extraktion

Im ersten Schritt eines Experiments zur Quantifizierung von mRNA musste die Gesamt-RNA aus Zellen gewonnen werden. Hierfür wurde das Absolutely RNA-Miniprep Kit (Agilent Technologies, Cedar Creek /USA) verwendet, welches nach der *single step*-Methode arbeitet. Die Zellen wurden in einer 10 cm Kulturschale zuvor einmal mit 1xPBS gewaschen und dann in 600 µl Lysepuffer zur RNA-Extraktion aufgenommen. Anschließend erfolgten die einzelnen Schritte nach Angaben des Herstellers mit Ausnahme des DNAase-Verdau. Dieser wurde auf eine Inkubationszeit von 30 min erweitert.

Lysepuffer zur RNA-Extraktion /10 cm Kulturschale

Lysepuffer lt. Absolutely RNA-Miniprep Kit	600 µl
Beta-Mercaptoethanol	4,2 µl

3.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Reinheit und Konzentration der Nukleinsäuren wurden mittels Spektrophotometer Nanodrop1000 (Peqlab, Erlangen) photometrisch bei 260 nm gemessen. Die Messung erfolgte als Triplett, dessen Mittelwert letztlich als Endergebnis diente. Extraktionen mit einem A_{260}/A_{280} -Verhältnis größer 2,2 wurden wegen vermeintlicher Proteinverunreinigung von den Experimenten ausgeschlossen.

3.2.3.4. Mutagenese von DNAJC13p.Asn855Ser

Wesentliche Grundlage der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Mutation DNAJC13p.Asn855Ser, die durch einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin an Stelle 2564 charakterisiert ist. Es musste deshalb ein Plasmid hergestellt werden, das genannte Punktmutation trägt. Die Mutation wurde nach dem Protokoll des QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Cedar Creek /USA) in den Plasmid, der für das wildtypische DNAJC13 codiert, eingefügt. Das Funktionsprinzip des Kits zur Mutagenese ist wie folgt: Einer vom Hersteller angegebenen Formel folgend, werden Oligonukleotide generiert, die die angestrebte Mutation tragen. Dann wird das Basisplasmid nach einem Polymerase-Ketten-Reaktions (PCR)-Protokoll amplifiziert (Tabelle 14). Anhand der Methylierungsmuster verdaut anschließend eine DNAase selektiv die parenterale DNA. Zurück bleibt das mutierte Amplifikat, das dann mittels Transformation vermehrt werden kann.

Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden 100 ng Basisplasmid und jeweils 125 ng der zwei Mutagenese-Primer für die Amplifikation eingesetzt.

PCR-Protokoll zur Mutagenese von DNAJC13p.Asn855Ser			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1. Aufheizen	95°C	5 min	1
2. Amplifikation			
2.1. Denaturierung	95°C	20 sec	18
2.2. Annealing	60°C	10 sec	
2.3. Elongation	68°C	6 min 15 sec	
3. Abkühlung	68°C	5 min	1

Tabelle 14: PCR-Protokoll, Mutagenese

Die Dauer des Elongations-Schrittes ergab sich aus der Größe des zu amplifizierenden Konstruktes (30 sec pro kb). Die Transformation erfolgte in den im Kit enthaltenen Bakterien.

3.2.3.5. Sequenzierung

Zur Verifizierung der erfolgreichen Mutagenese wurde das entstandene Amplifikat nach Transformation und Extraktion der Firma Eurofin-MWG-Operon (Ebersberg) zur Sequenzierung übergeben.

3.2.3.6. Reverse Transkriptase-PCR

Da RNA im Gegensatz zu DNA nicht amplifizierbar ist, ist es zur Quantifizierung von mRNA erforderlich, diese zunächst in *complementary* DNA (cDNA) umzuschreiben. Dieser als reverse Transkription bezeichnete Prozess wurde mit dem Omniskript RT Kit (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Dabei entstanden cDNA-Lösungen von 500 ng – 1000 ng /µl Konzentration, die darauffolgend in der quantitativen Realtime PCR eingesetzt wurden.

Zunächst wurden 500 – 1000ng der Matrizen RNA in 10 µl DEPC-Wasser zur Denaturierung über 5 min bei 65°C erhitzt. Um anschließende Wiederausbildung von Sekundärstrukturen der RNA zu vermeiden, wurden die Proben auf Eis gelagert, während 10 µl des Mastermix zugegeben wurden. Die 20 µl Gesamtvolumen wurden dann für 60 min bei 37°C inkubiert.

Mastermix Reverse Transkription

10x RT-Puffer	2 µl
5 mM dNTPs	2 µl
10 µmol Oligo-dT15-Primer	1 µl
RNAse-Inhibitor RNAsin (10 u/ml)	1 µl
Reverse Transkriptase (4 u/ml)	1 µl
ddH ₂ O	2 µl

3.2.3.7. Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Realtime PCR (qPCR) ist ein Verfahren zur Quantifizierung von DNA unter laufender Amplifizierung. Zumeist findet es Anwendung, um die Regulation eines bestimmten Genes auf mRNA-Ebene zu untersuchen und schließt sich deshalb der reversen Transkription an. Im Falle des hier verwendeten Farbstoffverfahrens interkalieren fluoreszierende Moleküle, deren Lichtsignal dann mit jedem Vermehrungszyklus stärker wird. In Analogie zur Polymerisationsreaktion entsteht eine charakteristische erst exponentielle, dann lineare Dynamik des Lichtsignals, welche schließlich in einem Plateau endet. Gemessen und verglichen wird jedoch das Signal zu jenem Zeitpunkt, an dem es sich vom Hintergrundsignal abhebt (*cycle-threshold*-Wert / *ct*-Wert). Um das mRNA-Expressionsprofil eines zu untersuchenden Genes zu interpretieren, setzt man dessen *ct*-Wert als Differenz im Verhältnis zum *ct*-Wert eines Genes, von dem man weiß, dass es keiner kurzfristigen Regulation unterliegt (*housekeeping gene*). Diese Vorgehensweise nennt man relative Quantifizierung. Werte, die hierbei über 1,5 liegen, werden als Überexpression definiert, Werte kleiner 0,65 als Runterregulation. Die Vergleichbarkeit der *ct*-Werte setzt den Einsatz gleicher Mengen an eingesetzter Matrizen cDNA voraus. Um auszuschließen, dass auch genomische DNA amplifiziert wurde, wurde sich zweierlei Methoden bedient. Zum einen wurde ein Teil der Primer komplementär eines beliebigen Exon-Exon-Übergangs gewählt. Weiterhin wurde für jede zu analysierende Probe während der reversen Transkription eine Negativkontrolle angelegt. Dieser wurde keine reverse Transkriptase zugefügt und sollte somit in der sich anschließenden qPCR kein Signal liefern.

Die PCR-Reaktion wurde nach Protokoll des SensiFAST SYBR & Fluorescein Kit (Bioline, Luckenwalde) in einer 96-Well PCR Platte mit einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt (Tabelle 15). Jede Probe wurde als Triplet angelegt. Als Referenzgene dienten *rpl19* und *dnmt1*.

Mastermix pPCR

cDNA-Matritze	1 µl
<i>forward</i> Primer	0,5 µl
<i>reverse</i> Primer	0,5 µl
ddH ₂ O	8 µl
2x SYBR-Green	10µl

qPCR-Protokoll			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1. Aufheizen	95°C	15 min	1
2. Amplifikation			18
2.1. Denaturierung	95°C	20 sec	
2.2. Annealing	60°C	20 sec	
2.3. Elongation	68°C	6 min 15 sec	
3. Abkühlung	68°C	5 min	1

Tabelle 15: PCR-Protokoll, RT-Q-PCR

3.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism 5 durchgeführt. Verglichen wurden zumeist Mittelwerte relativer prozentual angegebener Daten gegen einen hypothetischen Wert von 100 %. Deshalb wurde in Annahme einer normalverteilten Grundgesamtheit entweder der *t-test* oder im Falle mehrerer Merkmale ein *one-way ANOVA* mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Die statistische Signifikanz wurde wie allgemein üblich bei 5 % festgelegt. Dabei sind in dieser Arbeit die Signifikanzniveaus folgendermaßen definiert:

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung einer stabilen DNAJC13 *Knockdown*-Zelllinie

Zur Etablierung der *Knockdown*-Zelllinie wurden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das eine *small hairpin* RNA (shRNA) codiert, welche sich gegen die nicht translatierte Region des 3'Endes richtet, die sogenannte 3'UTR (*3'untranslated region*). Dies ermöglicht eine Re-Expression des Proteins im Verlauf des *Recovery*-Experiments, ohne, dass die transfizierte Nukleinsäure abgebaut wird. Ziel war die stabile Integration der DNA, die für die shRNA gegen DNAJC13 codiert. Anschließend sollten anhand einer Antibiotikaresistenz solche Zellen selektioniert werden, die stabil die gewünschte shRNA exprimieren.

4.1.1. Bestimmung der Selektierungs-Bedingungen

Die RNA-Interferenz ist eine effektive Methode, ein spezifisches Gen stillzulegen. Hierbei wird ein kurzes Oligonukleotid transfiziert, das komplementär an die mRNA des Zielgenes bindet. Mit Hilfe des Riboprotein-Komplex (*RNA induces silencing complex =RISC*) wird die mRNA abgebaut, sodass die Expression des codierten Proteins konsekutiv ausbleibt. Für den *Knockdown* von DNAJC13 ergab die Analyse der Datenbank des RNAi Consortium (*TRC-library*) sechs passende Sequenzen. Die Effektivität des *Knockdowns* kann in Abhängigkeit vom gewählten Oligonukleotid stark variieren. Deshalb ist es allgemein üblich, mehrere Konstrukte gleichzeitig zu transfizieren oder zunächst unterschiedliche Konstrukte in ihrer Effektivität zu vergleichen. Unter Verwendung eines einzigen Konstruktes minimiert sich die Zahl an *off-target*-Effekten. Deshalb wurde entschieden, die Konstrukte in einer Testreihe zunächst auf Effektivität des *Knockdowns* zu vergleichen. Mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation wurden die von 1-6 nummerierten shRNA-Konstrukte in HEK293T Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Expressionsspiegel mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert. Das Testexperiment zeigt, dass Konstrukt Nummer 3 und 6 nach 48 h zum stärksten *Knockdown* führen ([Abbildung 5, A](#)). Regulär findet die stabile Integration transfizierter DNA bei der Kalzium-Phosphat-Methode nur in einem geringen stochastischen Umfang statt.

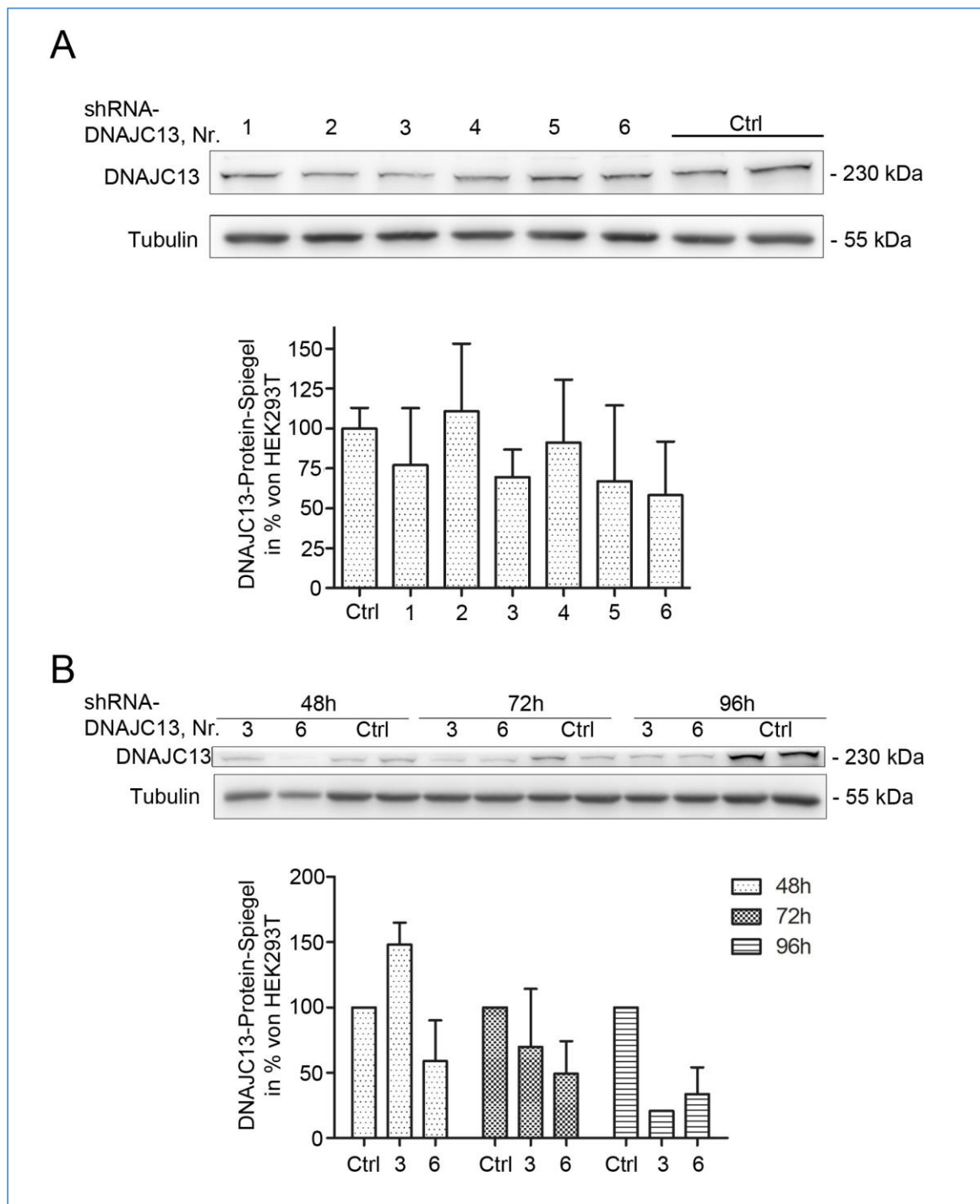


Abbildung 5: Konstrukt Nr. 3 zeigt den effektivsten *Knockdown*. Nach 96 h ist der stärkste *Knockdown* zu verzeichnen. **A)** Western-Blot Analyse der DNAJC13-Protein-Level 48h nach Transfektion verschiedener shRNA-DNAJC13-Konstrukte (1-6). Als Kontrolle für gleichmäßig eingesetzte Gesamt-Proteinkonzentration wurde Tubulin verwendet. Konstrukt 3 und 6 zeigen den effektivsten *Knockdown* ($n=3$, t -test). **B)** Western-Blot Analyse der DNAJC13-Protein-Level im Zeitverlauf nach Transfektion von shRNA-Nr. 3 und 6. Nach 96h liegt bei Konstrukt Nr. 3 der effektivste *Knockdown* vor. ($n=2$, Statistik nicht möglich, da Werte aus zwei unabhängigen Experimenten identisch). Relative Angabe der Proteinspiegel zu HEK293T, die mit Transfektionslösung ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) behandelt wurden (Ctrl).

Im zweiten Schritt sollte der Zeitpunkt des stärksten *Knockdowns* ermittelt werden, unter Annahme, dass eine mögliche Integration ins Genom dann bereits am wahrscheinlichsten stattgefunden haben muss. Verwendet wurden nur noch die beiden zuvor ermittelten Plasmide. Nach 96 h zeigten sich bei Konstrukt Nr. 3 die geringsten Protein-Spiegel ([Abbildung 5, B](#)). Für die Herstellung einer stabilen *Knockdown*-Zelllinie scheint demnach Konstrukt Nr. 3 am sinnvollsten. Der optimale Zeitpunkt für den Beginn des Selektionsdrucks liegt nach 96 Stunden.

4.1.2. Etablierung der stabilen DNAJC13-*Knockdown* Zelllinie

96 h nach Transfektion wurde begonnen, die Zellen in Selektierungs-Medium zu kultivieren, bis ein Wachstum einzelner Klonkolonien zu beobachten war. Die Kolonien wurden dann mechanisch vereinzelt und expandiert. Im weiteren Verlauf wurden die unterschiedlichen Klone mittels Western-Blot-Analyse auf Effizienz des DNAJC13-*Knockdowns* getestet. Die zwei klonalen Zelllinien mit dem stärksten *Knockdown* wurden kultiviert und im Verlauf mehrerer Passagen auf Validität des *Knockdowns* überprüft. Proteinspiegel und mRNA-Spiegel zeigen sich in gleichem Maße reduziert. Es findet sich eine Reduktion der Protein-Spiegel auf einen Mittelwert von 34 % im Vergleich zur naiven Zelle ([Abbildung 6, C+D](#)). Die mRNA Spiegel sind auf einen RQ-Wert von 0,32 reduziert ([Abbildung 6, A](#)). Die enge Korrelation dieser beiden Ergebnisse spiegelt die enge Beziehung zwischen mRNA-Spiegeln und konsekutiver Protein-Expression wider und bestätigt weiterhin die Qualität des Experiments. Zusätzlich liefert die Immunfluoreszenz-Färbung die qualitative Aussage einer verminderten Expression von DNAJC13 im stabilen *Knockdown*-Zellsystem ([Abbildung 6, B](#)). Die Zellen zeigen im Rahmen der lichtmikroskopischen Aufnahmen keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen. Auch das Proliferationsverhalten ist unverändert. Es bestätigt sich eine stabile DNAJC13-*Knockdown*-Zelllinie, ohne offensichtliche strukturelle Veränderungen im Verlauf der Tochtergenerationen.

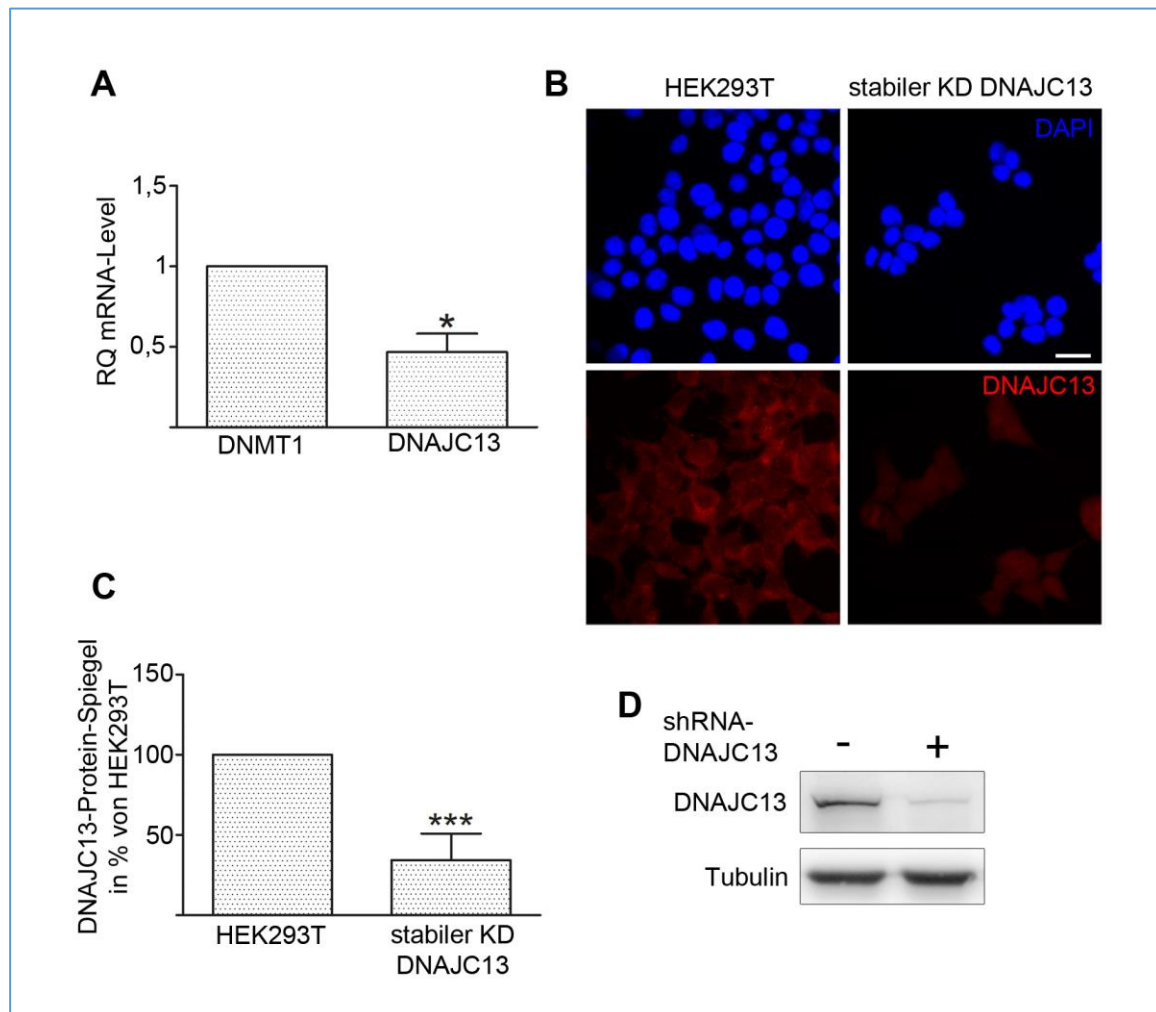


Abbildung 6: Erfolgreiche Etablierung stabiler DNAJC13-Knockdown Zelllinie: **A)** Analyse von mRNA-Spiegeln mittels RT-Q-PCR. Die Relative Quantifizierung (RQ) wurde mit Hilfe der Software REST2009 berechnet. *DNA-Methyl-Transferase 1 (DNMT1)* wurde als Referenzgen verwendet. Signifikanter *Knockdown* von DNAJC13 (n=3, t-test) **B)** Immunhistochemische Färbung von DNAJC13 und DAPI. Sichtbarer *Knockdown* von DNAJC13, keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Der Größenmaßstab entspricht 20µm. **C,D)** Western-Blot Analyse der DNAJC13 Protein-Spiegel in der stabilen DNAJC13-*Knockdown* Zelllinie über mehrere Passagen. Die Auftrennung fand in einem 8-prozentigen Polyacrylamid-Gel statt, mit anschließender Detektion durch spezifische Antikörper. Als Kontrolle für gleichmäßig eingesetzte Gesamte-Proteinkonzentration wurde Tubulin verwendet. Relative Angabe der Protein-Spiegel zu naiven HEK293T. Signifikanter *Knockdown*, n=6, t-test (*p< 0,05 ;**p< 0,01;***p< 0,001).

4.1.3. Genregulation der Interaktionspartner von DNAJC13 im stabilen *Knockdown*

Das stabile *Knockdown*-System soll in den darauffolgenden Experimenten als Arbeitsgrundlage dienen. Um die Validität späterer funktioneller Rückschlüsse zu gewährleisten, wurde in diesem Experiment die Expression der Interaktionspartner von DNAJC13 überprüft. Ausgewählt wurden Gene solcher Proteine, die direkt mit DNAJC13 interagieren oder von denen eine funktionelle Wechselwirkung experimentell nachgewiesen wurde. Hierzu zählen Proteine des WASH- und des Retromer-Komplexes und deren Substrate CI-MPR und Tf-R, ebenso wie Zielproteine

der J-Domäne HSC70 und HSP70. RQ-Werte größer 1,5 wurden als Steigerung und Werte kleiner 0,65 als Reduktion der Expression definiert.

Die mRNA-Spiegel aller untersuchten Gene erweisen sich als nicht reguliert (Abbildung 7). WASH1 zeigt eine signifikante Veränderung, die aber nicht im Definitionsbereich einer Regulation liegt. Die mRNA-Spiegel von HSC70 schwanken stark. Als essentielles Protein der Proteostase, dessen Expression den zellulären Stressbedingungen unterliegt, ist eine starke Streuung nicht überraschend. Betrachtet man die Mittelwerte, liegen diese trotz starker Streuung nicht im Rahmen einer veränderten Expression. Die Ergebnisse zeigen keine Wirkung der shRNA auf die Expression der Proteine, die funktionell im Zusammenhang mit DNAJC13 stehen. Außerdem provoziert der stabile *Knockdown* von DNAJC13 keine kompensatorischen Regulationen seiner Interaktionspartner. Andere Arbeitsgruppe zeigen im transienten *Knockdown* von DNAJC13 stabile Protein-Spiegel von VPS26, Strumpellin, SNX1, HSC70, EEA1 und Clathrin (Freeman et al., 2014, Girard et al., 2005). Das Ergebnis dieses Experiments stimmt demnach mit der aktuellen Literatur überein und bestätigt die etablierte *Knockdown* Zelllinie als valides System für funktionelle Schlussfolgerungen.

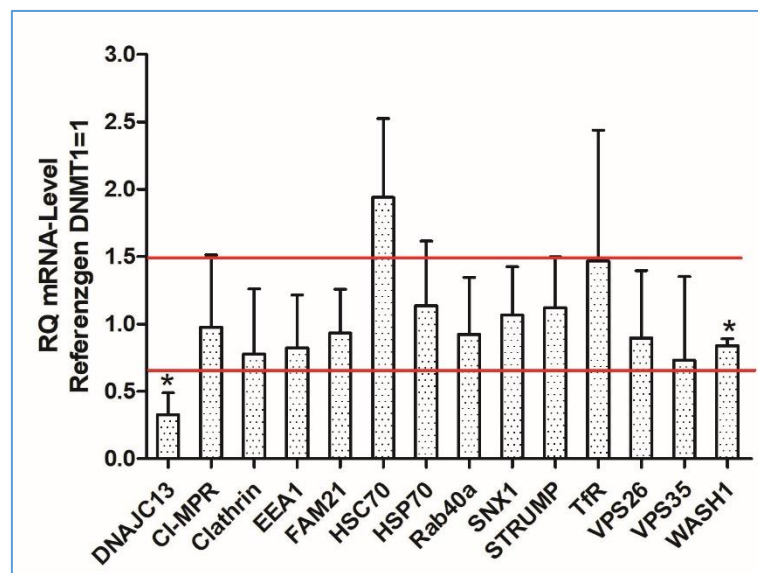


Abbildung 7: Die mRNA-Spiegel DNAJC13-assoziiierter Gene sind unverändert im stabilen *Knockdown*-System. Analyse von mRNA-Spiegeln mittels RT-Q-PCR., keine signifikanten Genregulationen erkennbar. Relative Quantifizierung (RQ) durch Software REST2009 berechnet. *DNA-Methyl-Transferase 1 (DNMT1)* wurde als Referenzgen verwendet. n=4, t-test (*p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001).

4.2. Strukturelle Charakterisierung von DNAJC13(N855S)

4.2.1. Bestätigung der Mutagenese DNAJC13(N855S)

Zur transienten Expression der Mutation DNAJC13(N855S) war es zunächst erforderlich, ein entsprechendes Plasmid zu generieren. Verwendet wurde hierfür ein Vektor, der wildtypisches DNAJC13 codiert und nach dem Funktionsprinzip der Ortsgerichteten Mutagenese verändert wurde. Dabei wird ein Oligonukleotid eingesetzt, welches komplementär der angestrebten Mutation konstruiert ist und im ersten Amplifizierungsvorgang unter Basenfehlpaarung an den Matrizenstrang bindet. Im nächsten Zyklus wird der Matrizenstrang verdaut, und fortan entsteht ausschließlich solches PCR-Produkt, das die Punktmutation enthält. Im Falle von DNAJC13(N855S) sollte an Stelle 2564 Adenin gegen Guanin ausgetauscht werden. Dies führt zur Expression von Serin an Stelle von Asparagin. Das Sequenzierungsergebnis bestätigt die erfolgreiche Mutagenese im Vektor pEF-Bos ([Abbildung 8](#)).

	2564
pEF-Bos-DNAJC13-GFP	gtatgaatTTTTcaatgagcTTTatcatcgc
pEF-Bos-DNAJC13(N855S)-GFP_Seq1	gtatgaatTTTTcagtgagcTTTatcatcgc
pEF-Bos-DNAJC13(N855S)-GFP_Seq2	gtatgaatTTTTcagtgagcTTTatcatcgc

Abbildung 8: Die Sequenzierungsergebnisse bestätigen die erfolgreiche Mutagenese von DNAJC13(N855S). Die obere Zeile zeigt den Abschnitt des wildtypischen Plasmids, darunter in Analogie das Sequenzierungsergebnis des mutierten Plasmids. An Stelle 2564 zeigt der Austausch von Adenin gegen Guanin die erfolgreiche Mutagenese an.

4.2.2. Die Lokalisation von DNAJC13(N855S) an endosomalen Kompartimenten

DNAJC13 ist entsprechend seiner Funktion entlang der endosomalen Kompartimente lokalisiert. Hierzu zählen vor allem das frühe Endosom und das Recycling-Endosom. Auf dem späten Endosom, auch als *multi-vesicular bodies* (MVB) bezeichnet, dem Lysosom oder dem Golgi-Apparat ist es nicht detektierbar (Fujibayashi et al., 2008, Girard et al., 2005). Folgend soll analysiert werden, ob die Mutation zu einer veränderten subzellulären Verteilung oder veränderter Assoziation zu den jeweiligen Kompartimenten führt. Die erste lichtmikroskopische Aufnahme des mutanten DNAJC13 lässt keine offenkundig veränderte Verteilung erkennen ([Abbildung 9](#)).

Außerdem kann eine grobe Aggregation des Proteins durch die Mutation ausgeschlossen werden

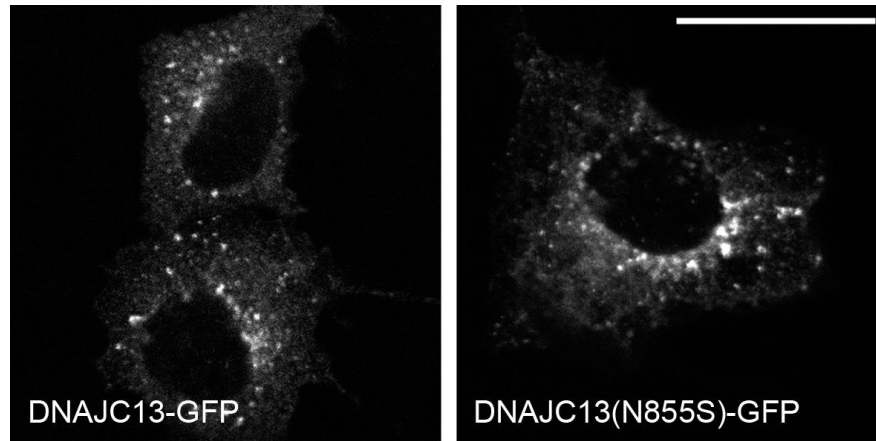


Abbildung 9: Subzelluläre Verteilung von wildtypischem und mutantern DNAJC13. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert. Das GFP-Signal wurde mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Das subzelluläre Verteilungsmuster zeigt weder veränderte Distribution noch offensichtliche Aggregation. Der Maßstab entspricht 20µm.

4.2.3.1. Das frühe Endosom

Das frühe Endosom stellt die erste Station eines von extrazellulär internalisierten Proteins dar. Sowohl Clathrin-abhängig wie -unabhängig entstandene Endozytose-Vesikel erreichen als erstes das frühe Endosom, um dort für ihre weitere Bestimmung sortiert zu werden (Grant and Donaldson, 2009). In dieser Aufnahme wurde *early endosome antigen 1* (EEA1) als Marker für das frühe Endosom verwendet. In der Literatur ist eine Lokalisation von wildtypischem DNAJC13 auf dem frühen Endosom beschrieben (Girard et al., 2005). Die partielle Überlappung beider Signale zeigt an, dass auch DNAJC13(N855S) am frühen Endosom lokalisiert ist ([Abbildung 10](#)).

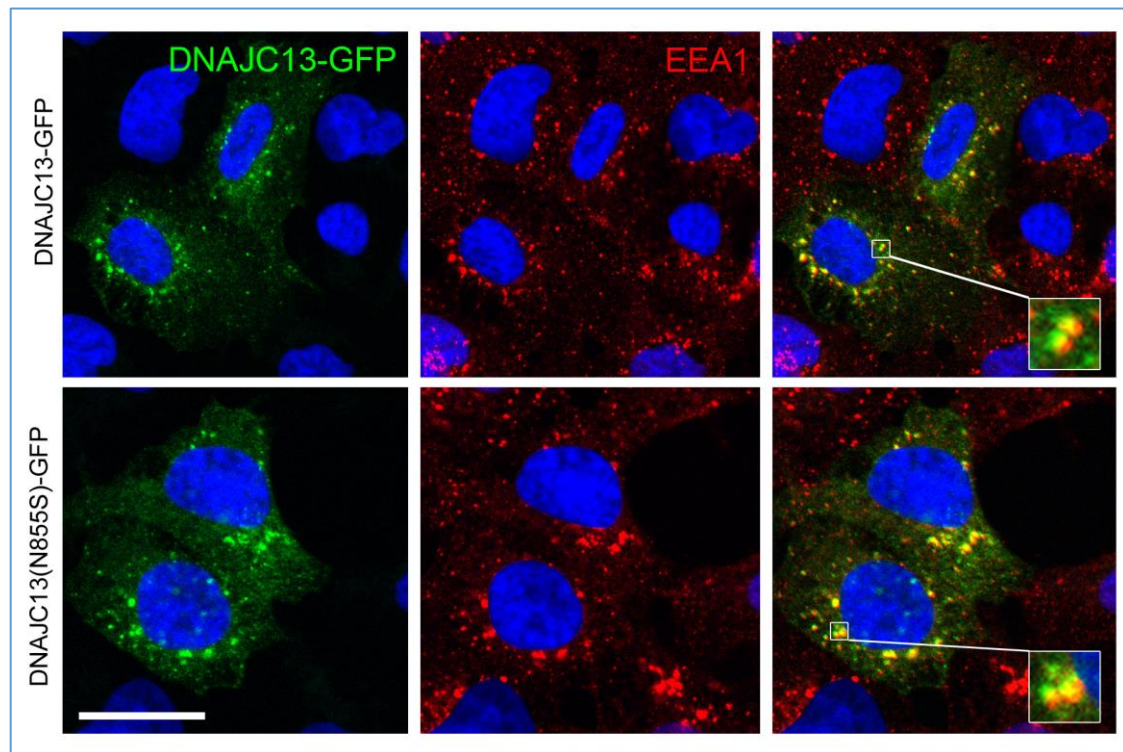


Abbildung 10: DNAJC13(N855S)-GFP ist am frühen Endosom lokalisiert. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S) transfiziert (grün). EEA1 wurde als Marker für das frühe Endosom mit einem spezifischen Antikörper detektiert (rot). Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. DNAJC13(N855S) kolokalisiert in gleichem Maße mit EEA1 wie das wildtypische Protein. Der Maßstab entspricht 20µm.

4.2.3.2. Das Recycling Endosom

Vom frühen Endosom aus können Proteine zum Zielort gelangen, degradiert oder wiederverwertet werden. Für die langsame Recycling-Route bildet das Recycling-Endosom den Zwischenstopp. Um dieses mikroskopisch zu identifizieren, kann beispielsweise der Tf-R verwendet werden. Von DNAJC13 weiß man bereits, dass es mit dem Tf-R kolokalisiert und demzufolge auf dem Recycling-Endosom ansässig ist. (Fujibayashi et al., 2008, Girard et al., 2005). Unter *Knockdown* von DNAJC13 wurde ein Anstieg der Protein-Spiegel von Tf-R identifiziert (Besemer, 2015). Die qualitative Verteilung von Tf-R bleibt dabei unverändert (Girard et al., 2005). Im hier gezeigten Experiment führt die Transfektion des mutanten DNAJC13 zu keinerlei Veränderung der Lokalisation von Tf-R als solches. Ebenso kolokalisiert DNAJC13(N855S) in gleichem Maße mit Tf-R wie das wildtypische Protein (**Abbildung 11**).

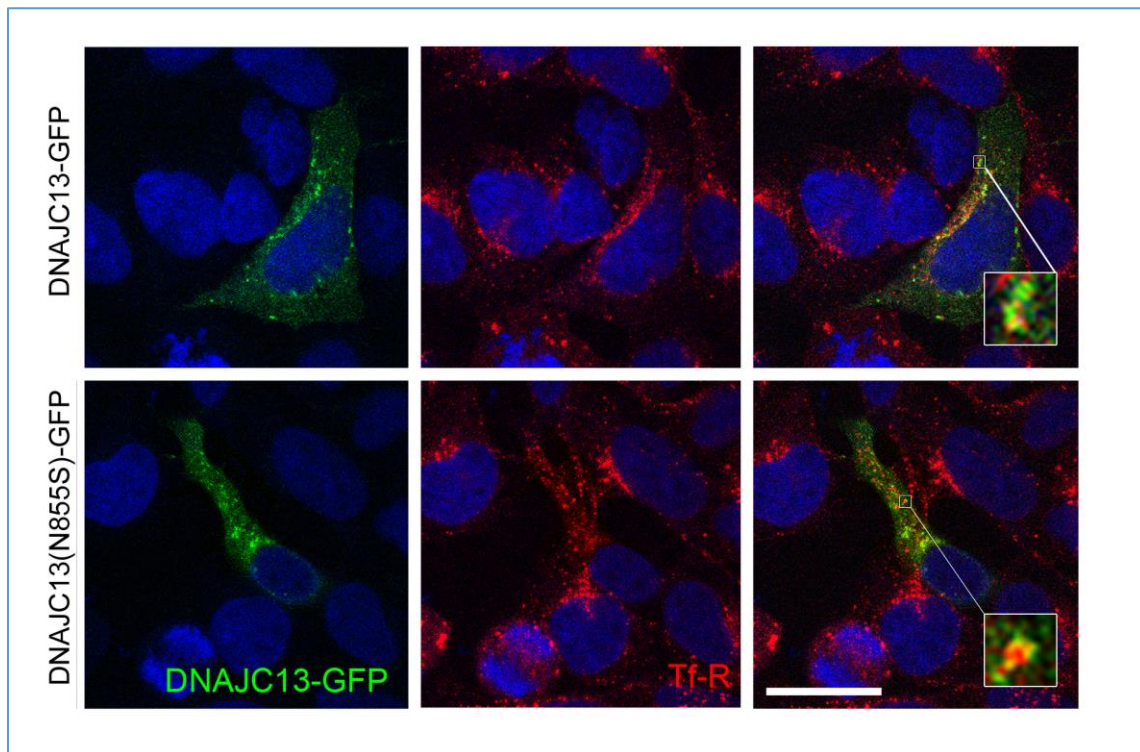


Abbildung 11: Kolokalisation von DNAJC13(N855S) mit Tf-R, als Marker für das Recycling-Endosom. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S) transfiziert (grün). Tf-R wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert (rot). Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. DNAJC13(N855S) lokalisiert in gleichem Maße mit Tf-R wie das wildtypische Protein. Der Maßstab entspricht 20µm.

Als Cargo des Endozytose-Weges markiert der Tf-R nicht ausschließlich das Recycling-Endosom, deshalb wurde das Experiment zusätzlich mit der GTPase RAB11 durchgeführt. Endogenes RAB11 liefert bei Detektion durch spezifische Antikörper ein für die Mikroskopie zu schwaches Signal. Aus diesem Grund wurde RAB11 zusammen mit dem jeweiligen DNAJC-Konstrukt co-transfiziert. Die DNAJC13-Plasmide tragen dieses Mal eine FLAG-Markierung. Gleichzeitig fand eine Transfektion mit RAB11-GFP, als alternativer Marker des Recycling-Endosoms, statt. Die konfokale Aufnahme bestätigt das vorherige Ergebnis mit Tf-R: die Mutation DNAJC13(N855S) führt nicht zur Dissoziation vom Recycling-Endosom ([Abbildung 12](#)).

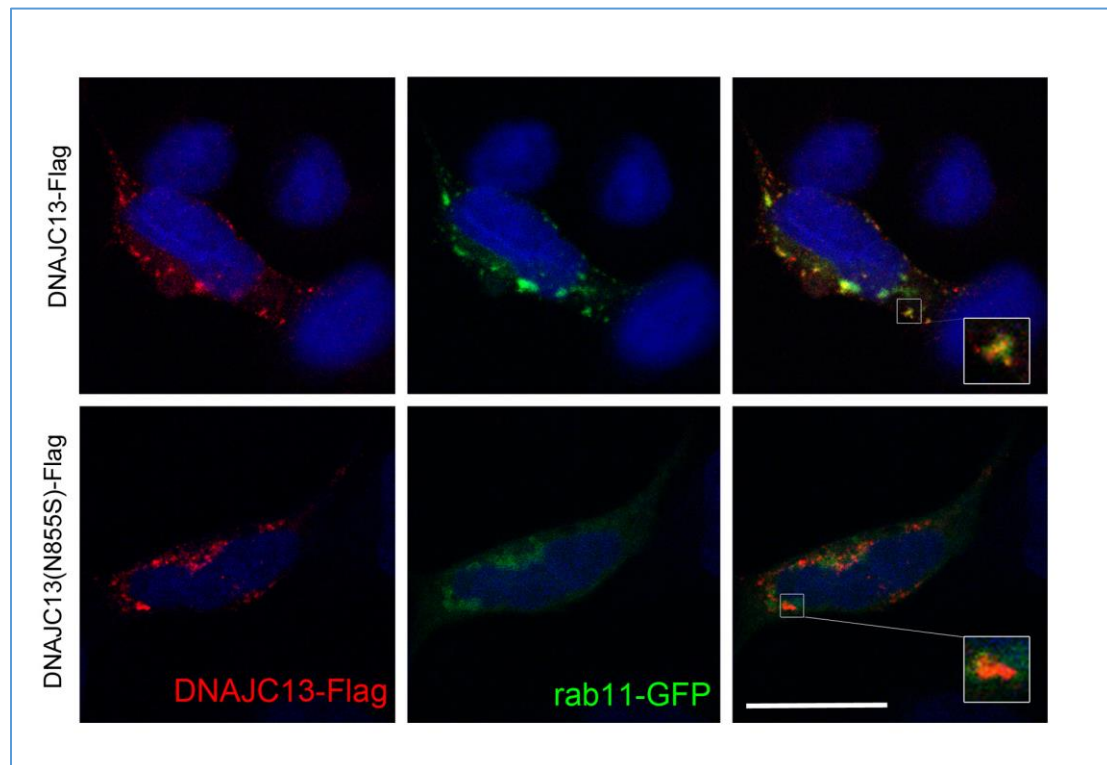


Abbildung 12: Kolokalisation von DNAJC13(N855S) mit RAB11, als Marker für das Recycling-Endosom. HEK293A-Zellen wurden entweder mit DNAJC13-FLAG/ RAB11-GFP oder DNAJC13(N855S)-FLAG/RAB11-GFP ko-transfiziert. DNAJC13 und DNAJC13(N855S) wurden anschließend mit einem spezifischen FLAG-Antikörper detektiert (rot). Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. DNAJC13(N855S) lokalisiert in gleichem Maße mit RAB11 wie das wildtypische Protein. RAB11-GFP = grün. Der Maßstab entspricht 20µm.

4.2.3.3. Das späte Endosom

Auf der degradativen Route bildet das späte Endosom die erste Zwischenstufe auf dem Weg hin zum Lysosom. Im Verlauf des Reifungsprozesses kommt es zur intraluminalen Vesikelbildung. Deshalb wird das späte Endosom synonym auch *multivesicular body* (MVB) genannt. Hier treffen die luminalen Moleküle erstmalig auf einen sauren pH-Wert. Durch Membraneinstülpungen entstehen Transportvesikel, die anschließend abgeschnürt werden. Der gesamte endosomale Reifungsprozess wird durch sogenannte RAB-Proteine kontrolliert. Diese GTPasen regulieren spezifisch die Membrandynamik der einzelnen endosomalen Kompartimente und eignen sich deshalb ausgezeichnet zur spezifischen Markierung der endosomalen Intermediate. (Zerial and McBride, 2001).

Zur Markierung des späten Endosoms wurde an dieser Stelle RAB7 verwendet. Beide Proteine sind offensichtlich am späten Endosom nicht ortsständig. Die Lokalisation ändert sich auch durch die Punktmutation nicht ([Abbildung 13](#)).

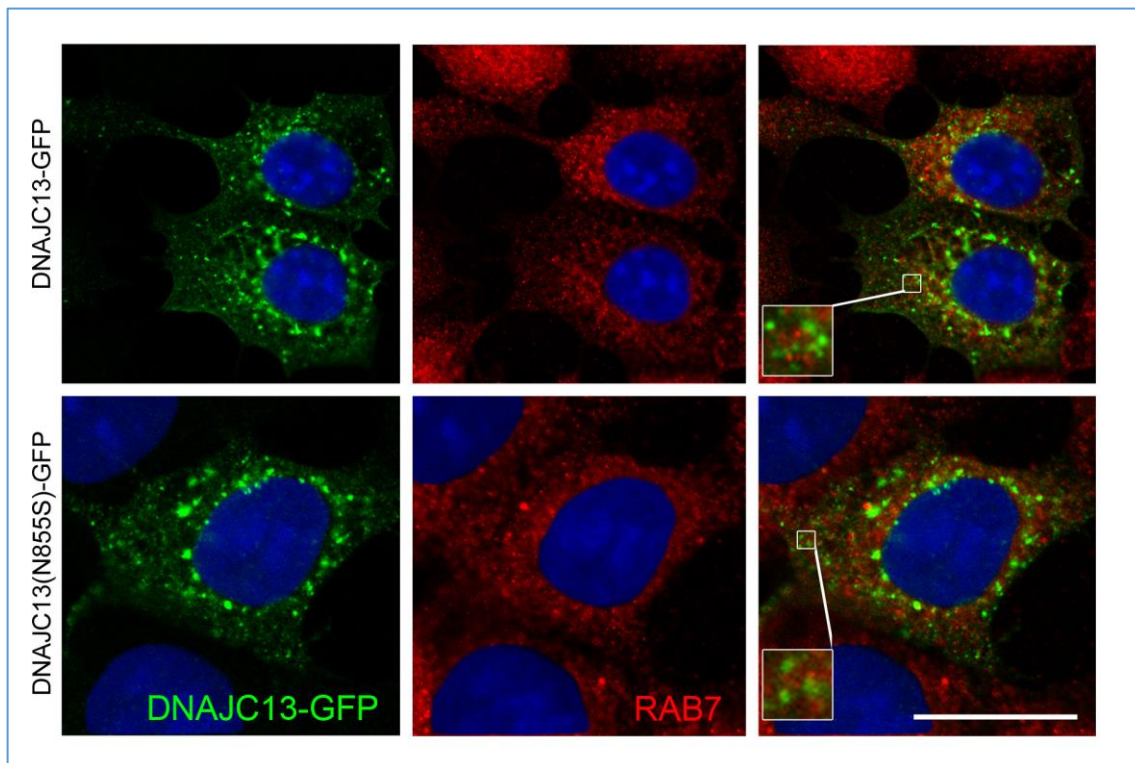


Abbildung 13: DNAJC13(N855S) ist, wie auch das wildtypische DNAJC13, nicht auf dem späten Endosom lokalisiert. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert (grün). RAB7 wurde als Marker für das späte Endosom mit einem spezifischen Antikörper detektiert (rot). Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. DNAJC13(N855S) lokalisiert ebenso wenig mit RAB7 wie das wildtypische DNAJC13-GFP. Der Maßstab entspricht 20µm.

4.2.3.4. Der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat ist ein perinukleär gelegenes Zellorganell, das durch mehrere Membranstapel einen Reaktionsraum für posttranslationale Modifizierungen auf dem sekretorischen Weg eines Proteins bietet. Man kann den Golgi-Apparat weiterhin in ein *cis*- und ein *trans*-Netzwerk einteilen.

In diesem Experiment wurde das *trans*-Golgi-Netzwerk stellvertretend für den Golgi-Apparat angefärbt. Im überlagerten Bild lässt sich erkennen, dass das GFP-Signal von DNAJC13(N855S) dem roten Signal von TGN46 direkt anliegt, ohne sich dabei maßgeblich zu überschneiden ([Abbildung 14](#)). Dieser Eindruck der Anlagerung zeigt sich auch unter Transfektion des wildtypischen Konstruktes. Die Mutation scheint demnach nicht zu einer Akkumulation des Proteins am TGN oder einem verstärkten Transport in Richtung TGN zu führen.

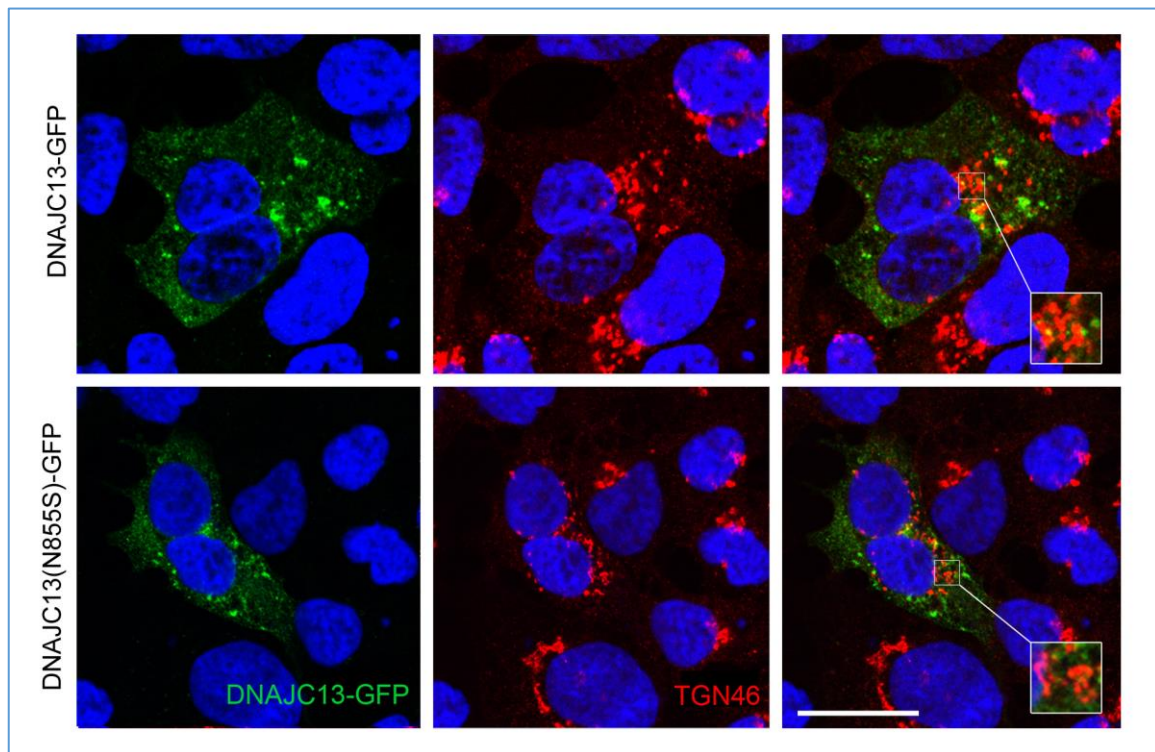


Abbildung 14: Weder wildtypisches noch mutantes DNAJC13 lokalisieren am *Trans*-Golgi-Netzwerk. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert (grün). Als Marker für den Golgi-Apparat wurde ein TGN46-Antikörper verwendet (rot). Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Weder das wildtypische noch das mutante Protein zeigen eine Kolokalisation mit dem *Trans*-Golgi-Netzwerk. Das Signal scheint vielmehr angelagert. Der Maßstab entspricht 20µm.

4.2.3.3. Das Lysosom

Fernab der Recycling-Vorgänge, ist auch die Degradation ein Prozess des endosomalen Transportes. Das Zielorganell ist das Lysosom. Proteine der Gruppe *lysosome-associated membrane protein* (LAMP) markieren dieses spezifisch. Das wildtypische Protein kolokalisiert weder mit LAMP1 (Girard et al., 2005) noch mit LAMP2 (Fujibayashi et al., 2008). Folglich ist DNAJC13 in seiner natürlichen Funktion nicht auf dem Lysosom zu finden. Aus dem *lamp2*-Gen entstehen unterschiedliche *Splicing*-Varianten, die als LAMP2a-c bezeichnet werden. Von ihnen kommt LAMP2a eine besondere Bedeutung zu, denn es ist das Adapter-Protein im Prozess der CMA. In den hier angefertigten lichtmikroskopischen Aufnahmen konnte auch für das mutante DNAJC(N855S) keine Kolokalisation mit lysosomalen Markern, am Beispiel von LAMP2a festgestellt werden (Abbildung 15). Wie auch bei den Experimenten mit TGN46 beschrieben, scheint auch hier eine unmittelbare Anlagerung vorzuliegen.

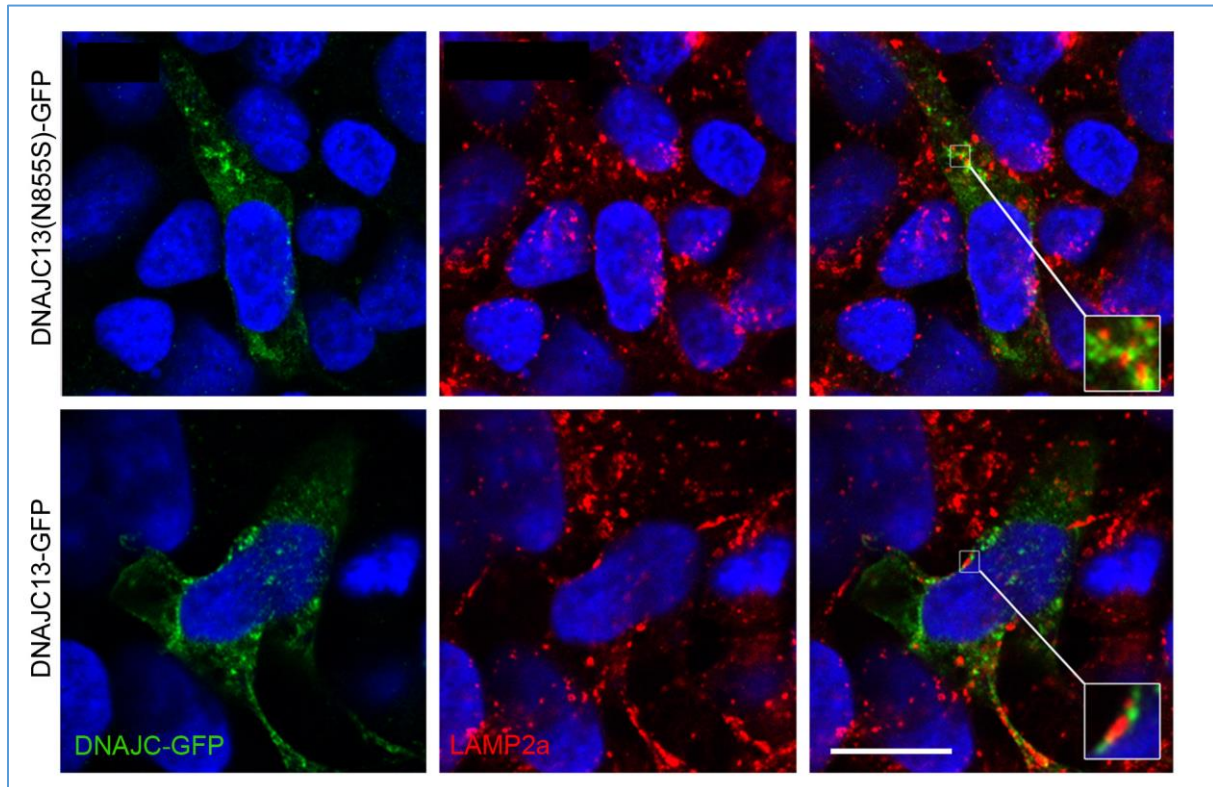


Abbildung 15: DNAJC13(N855S) kolokalisiert nicht mit LAMP2a. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert (grün). LAMP2a wurde als Marker für das Lysosom mit spezifischen Antikörpern detektiert (rot). Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Nach Transfektion beider Konstrukte zeigt das GFP und das LAMP2a-Signal kaum Überlappung. Das mutante DNAJC13 kolokalisiert ebenso wenig mit LAMP2a wie das wildtypische Protein. Der Maßstab entspricht 20µm.

4.2.3. Zelluläre Stabilität von DNAJC13(N855S)

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass DNAJC13 eine wesentliche Funktion im Erhalt der Proteostase ausübt (Besemer, 2015). Doch wie jedes Protein, unterliegt auch DNAJC13 selbst dem Gleichgewicht stetigen Auf- und Abbaus. Ob die Mutation DNAJC(N855S) gegebenenfalls zur Destabilisierung der Proteinstruktur führt und damit den Stoffwechsel des Proteins beeinträchtigt, soll im folgenden Experiment analysiert werden.

Zu diesem Zwecke wurden HEK293T-Zellen mit wildtypischem und mutantern DNAJC13 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Cycloheximid inkubiert. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, dass die Translation hemmt. Ohne *denovo*-Synthese sind die Protein-Spiegel abhängig von der Geschwindigkeit der Degradation. Anschließend wurden die Protein-Spiegel im Zeitverlauf gemessen (Abbildung 16, A). Um endogenes Protein von der Analyse auszuschließen, wurden die transfizierten Konstrukte mit GFP-Markierung gewählt und mit einem Antikörper gegen GFP detektiert.

Der signifikante Abfall der p53-Spiegel beweist eine erfolgreiche Hemmung der Translation ([Abbildung 16, B](#)). Das Protein p53 ist ein Regulator des Zellzyklus. Es hat eine sehr kurze Halbwertszeit und eignet sich deshalb als Positivkontrolle. Die Kurve der Degradation von p53 folgt einer linearen Kinetik. 8 h nach Beginn der Cycloheximid-Behandlung ist die nachweisbare Menge an p53 auf ca. 40 % abgefallen. Die Geschwindigkeit des p53-Abbaus unterscheidet sich dabei zwischen Zellen die mit DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert wurden, nicht von denen, die mit wildtypischem DNAJC13 transfiziert wurden. Es hat eine erfolgreiche Blockierung der Translation stattgefunden. Die Mutation DNAJC13(N855S) hat keinen generalisierten Einfluss auf den Abbau anderer Proteine, wie z. Bsp. p53.

Im direkten Vergleich der Degradationskinetik von wildtypischem zum mutanten DNAJC13 ergeben sich markante Unterschiede ([Abbildung 16, C](#)). Das wildtypische DNAJC13 wird im gemessenen Zeitraum kaum abgebaut. Die Proteinspiegel undulieren zwar, trotzdem sind zum Zeitpunkt nach 8 h noch ca. 80 % der Ausgangsproteinmenge nachweisbar. Anders beim Abbau von DNAJC13(N855S), hier finden sich nach 8 h nur noch ca. 15 % der Ausgangs-Proteinmenge. Die Kurve des Abbaus bildet, wie auch bei p53, eine Lineare ab. Das Experiment zeigt, dass die Mutation DNAJC13(N855S) zum signifikant erhöhten Abbau des Proteins führt, im Vergleich zum wildtypischen DNAJC13.

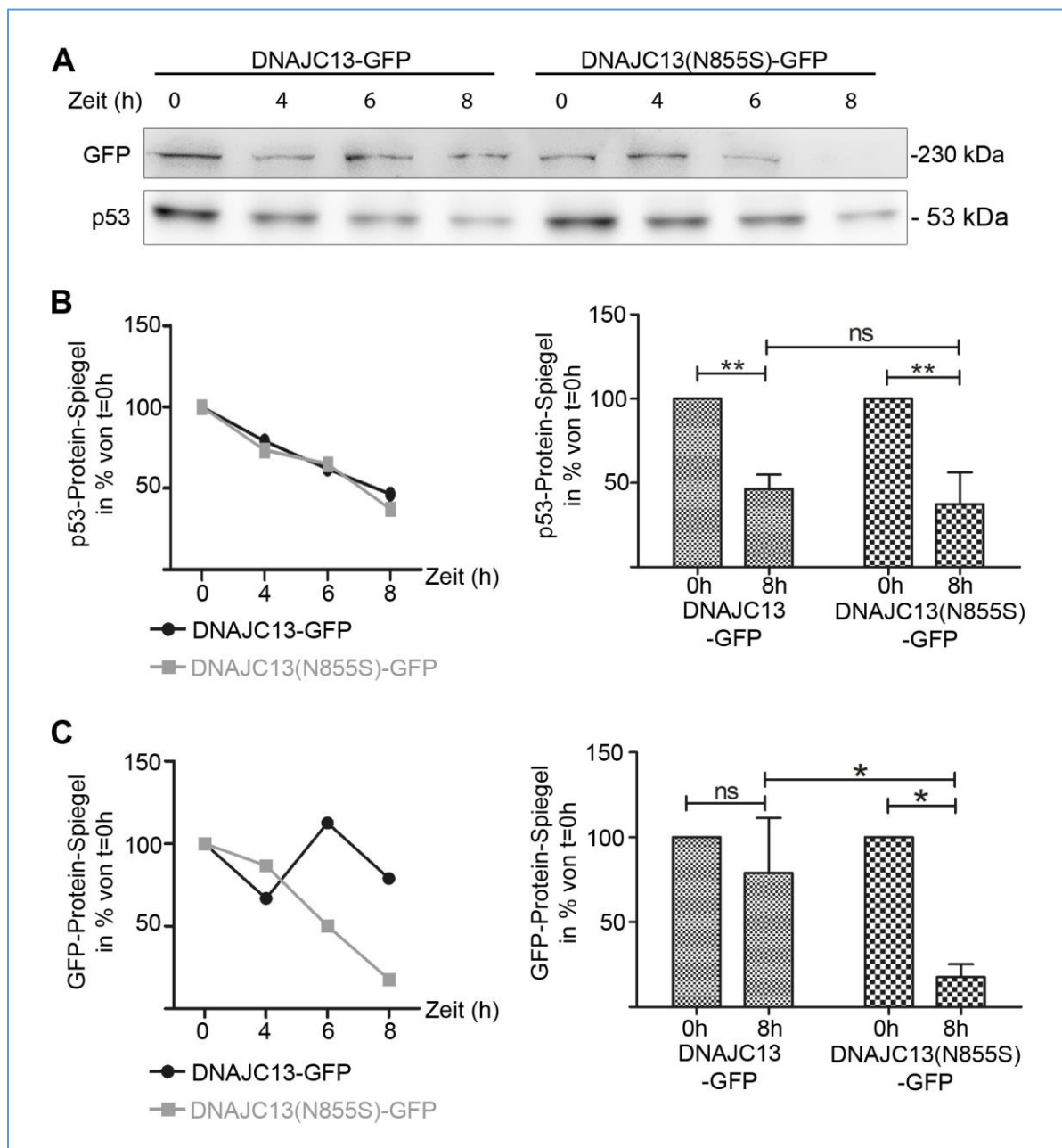


Abbildung 16: DNAJC13(N855S) wird schneller degradiert als das wildtypische Protein. HEK293T wurden mit DNAJC13(N855S)-GFP bzw. DNAJC13-GFP transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen, zur Hemmung der Translation, mit Cycloheximid inkubiert. Mittels Western-Blot-Analyse wurden nach 0, 4, 6, und 8 h die Proteinspiegel bestimmt. **A)** Western-Blot Analyse von DNAJC13-GFP und p53 im Zeitverlauf. Die transfizierten Konstrukte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen GFP dargestellt, um eine Detektion von endogenem DNAJC13 auszuschließen. **B)** Auswertung der Western-Blot Analyse von p53 im Zeitverlauf. Die signifikante Reduktion der p53-Proteinspiegel zum Zeitpunkt nach 8 h bestätigt die erfolgreiche Hemmung der Translation. **C)** Auswertung der Western-Blot Analyse von DNAJC13-GFP im Zeitverlauf. Kontinuierlicher Abfall unter Transfektion beider Konstrukte. Nach 8 h findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Protein-Spiegeln von DNAJC13-GFP und DNAJC13(N855S)-GFP. Das mutante Protein wird deutlich schneller abgebaut. n= 4, t-test, (*p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001).

4.3. Retromere Funktion von DNAJC13

Aufbauend auf quantitativer und struktureller Beschreibung, sollen im Folgenden die funktionellen Eigenschaften der Mutation DNAJC13(N855S) herausgearbeitet werden. Der Fokus liegt dabei auf Stoffwechselwegen, in denen DNAJC13 identifiziert wurde und die im Zusammenhang zur Pathogenese von M. Parkinson stehen.

Die ersten Experimente analysieren die Auswirkungen der Mutation auf den retrograden Transport. Wie bereits beschrieben, ist die Degradation von *alpha*-Synuclein unter anderem von zwei Faktoren abhängig. Zum einen muss *alpha*-Synuclein mittels LAMP2a- vermittelter CMA ins Lysosom importiert werden. Zum anderen bedarf es einer ausreichenden Zufuhr katalytisch aktiver Proteasen zum Lysosom. Hinsichtlich des Abbaus von *alpha*-Synuclein ist vor allem Cathepsin D die verantwortliche Protease (Sevlever et al., 2008). Cathepsin D wird durch CI-MPR zum Lysosom transportiert. Das Recycling von CI-MPR wiederum unterliegt den retrograden Transportmechanismen. Der Stoffwechsel von *alpha*-Synuclein ist also abhängig von einem regelrechten retrograden Transport. Um den retrograden Transport auf Funktionalität im Zusammenhang mit der Mutation DNAJC13(N855S) zu überprüfen, gilt es mehrere Dimensionen zu bewerten. Defekte könnten bereits auf struktureller Ebene der beteiligten Komponenten, vor allem dem Retromer- und dem WASH-Komplex bestehen. Des Weiteren wäre eine Miss-Verteilung der Cargo-Moleküle denkbar. In finaler Instanz soll die Konzentration und die katalytische Aktivität von Cathepsin D untersucht werden.

4.3.1. Assoziation von DNAJC13(N855S) mit dem Retromer-Komplex

Die erste Untersuchung gilt der Assoziation des mutanten DNAJC13 zu den unterschiedlichen Komponenten des Retromer- und des WASH-Komplex.

Der Retromer-Komplex besteht aus zwei Domänen: dem VPS-Trimer und dem SNX-Dimer. VPS35 markiert in den hier angefertigten Aufnahmen den Retromer-Komplex. HEK293A-Zellen wurden entweder mit DNAJC13-GFP oder DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert. Anschließend wurde VPS35, stellvertretend für den Retromer-Komplex mit einem spezifischen Antikörper detektiert.

Die VPS35-Verteilung zeigt unter beiden Bedingungen ein feingepunktetes Bild mit vereinzelt größeren Punkten ([Abbildung 17](#)). Die Transfektion mit dem mutanten Konstrukt verändert die subzelluläre Lokalisation des Retromer-Komplex nicht. Das GFP-Signal von DNAJC13(N855S) überlagert sich in gleichem Maße mit VPS35 wie das des wildtypischen Proteins. Die Mutation in DNAJC13 führt demzufolge nicht zum Verlust der Assoziation zum Retromer-Komplex oder zur De-lokalisierung des Retromer-Komplex..

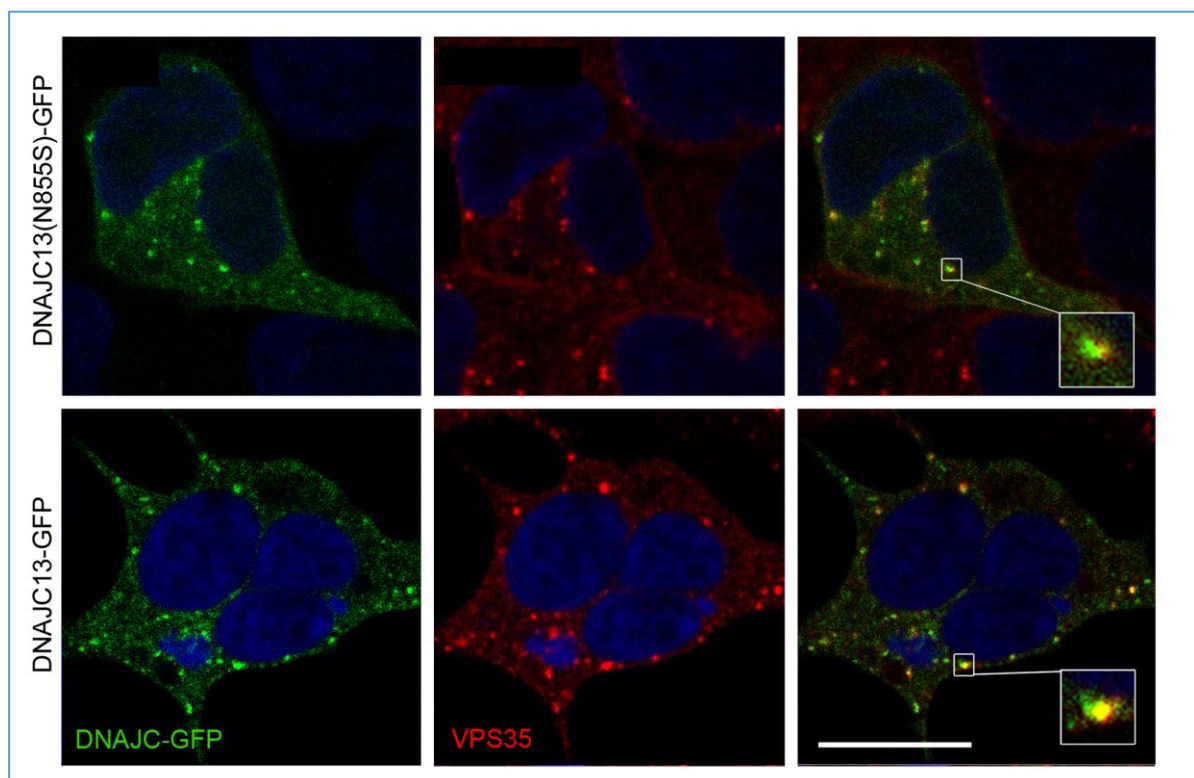


Abbildung 17: DNAJC13(N855S) kolokalisiert weiterhin mit VPS35, als Marker für den Retromer-Komplex. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert (grün). VPS35 wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert (rot). Beide Signale wurden mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen. DNAJC13(N855S) kolokalisiert in gleichem Maße mit VPS35 wie das wildtypische Protein. Die subzelluläre Verteilung von VPS35 ist unverändert. Der Maßstab entspricht 20µm.

DNAJC13 interagiert über SNX1 direkt mit dem Retromer-Komplex (Popoff et al., 2009, Freeman et al., 2014). Neuste Studien postulieren eine vom Retromer-Trimer unabhängige Rolle von SNX1 (Kvainickas et al., 2017, Simonetti et al., 2017). Aus diesem Grund wurde die subzelluläre Verteilung von SNX1 in Abhängigkeit von der Mutation DNAJC13(N855S) gesondert überprüft ([Abbildung 18](#)). Dabei zeigt sich kein qualitativer Unterschied zwischen den unterschiedlich transfizierten Zellen. Perinukleär zeigen sich Areale mit sehr guter Kolokalisation. Peripher lässt sich

hingegen eher eine Anlagerung beschreiben. Offensichtlich gibt es innerhalb einer Zelle unterschiedliche Formen der Interaktion von DNAJC13 mit SNX1. Die Mutation führt nicht zu einem lichtmikroskopisch sichtbaren Verlust der Assoziation von DNAJC13-GFP und SNX1.

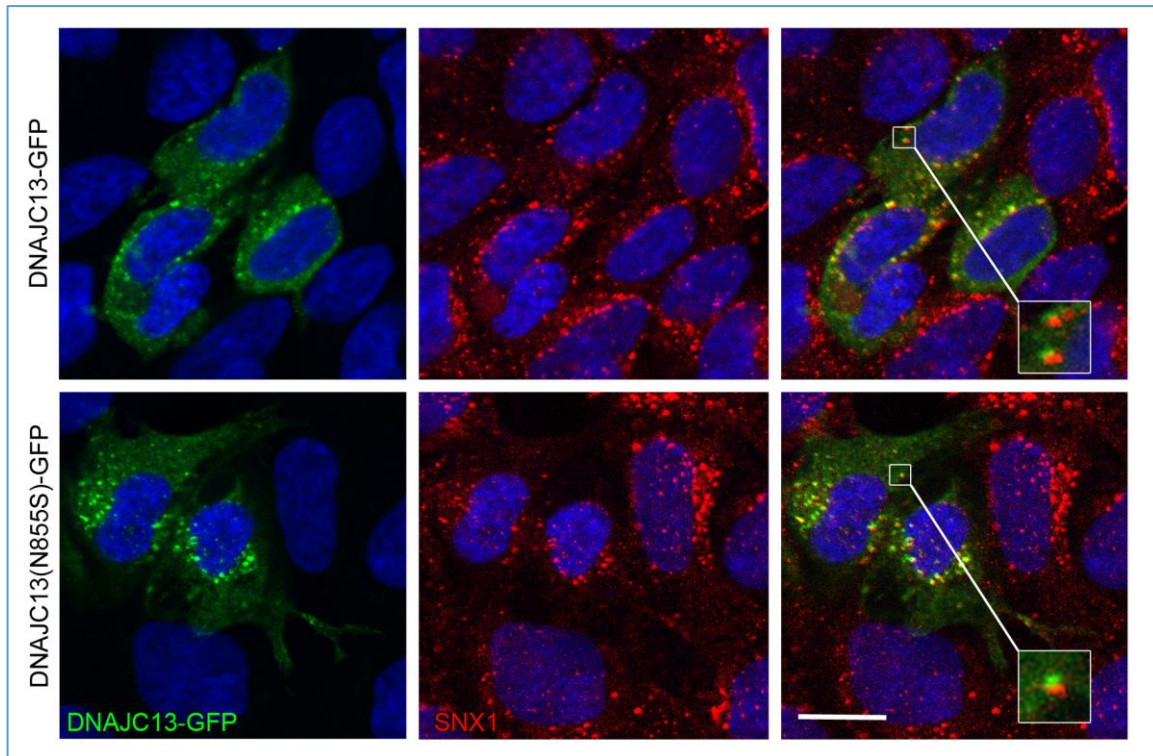


Abbildung 18: Die Mutation DNAJC13(N855S) führt nicht zum Verlust der Assoziation zu SNX1 HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw DNAJC13(N855S) transfiziert (grün). SNX1 wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert (rot). Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. DNAJC13(N855S) lokalisiert in gleichem Maße mit SNX1 wie das wildtypische DNAJC13-GFP. Die Verteilung von SNX1 ändert sich nicht unter Transfektion des mutanten Proteins. Der Maßstab entspricht 20µm.

DNAJC13 kann direkt und indirekt auch den WASH-Komplex binden. Zum einen bindet DNAJC13 an den Retromer-Komplex, welcher seinerseits mit dem WASH-Komplex assoziiert. Zum anderen bindet DNAJC13 über FAM21 direkt an den WASH-Komplex (Freeman et al., 2014). Mögliche Auswirkungen der Punktmutation auf die Verteilung des WASH-Komplexes und die Assoziation von DNAJC13 mit selbigem sind also ebenfalls von Interesse. Dieses Experiment stellt die subzelluläre Verteilung des WASH-Komplex unter Transfektion mit DNAJC13(N855S) dar.

Im Vergleich zu den bisher abgebildeten endosomalen Kompartimenten ist die Verteilung des WASH-Komplex deutlich feiner gestreut. Man sieht größere DNAJC13-positive Punkte, die von mehreren kleineren WASH-positiven Punkten übersät sind.

Ferner wurde die Assoziation der WASH-Komplex Komponente WAS mit dem mutanten DNAJC13 analysiert. Die konfokale Auswertung zeigt, dass sich die Assoziation zum WASH-Komplex durch die Mutation nicht ändert und der WASH-Komplex seine physiologische Lokalisation beibehält ([Abbildung 19](#)).

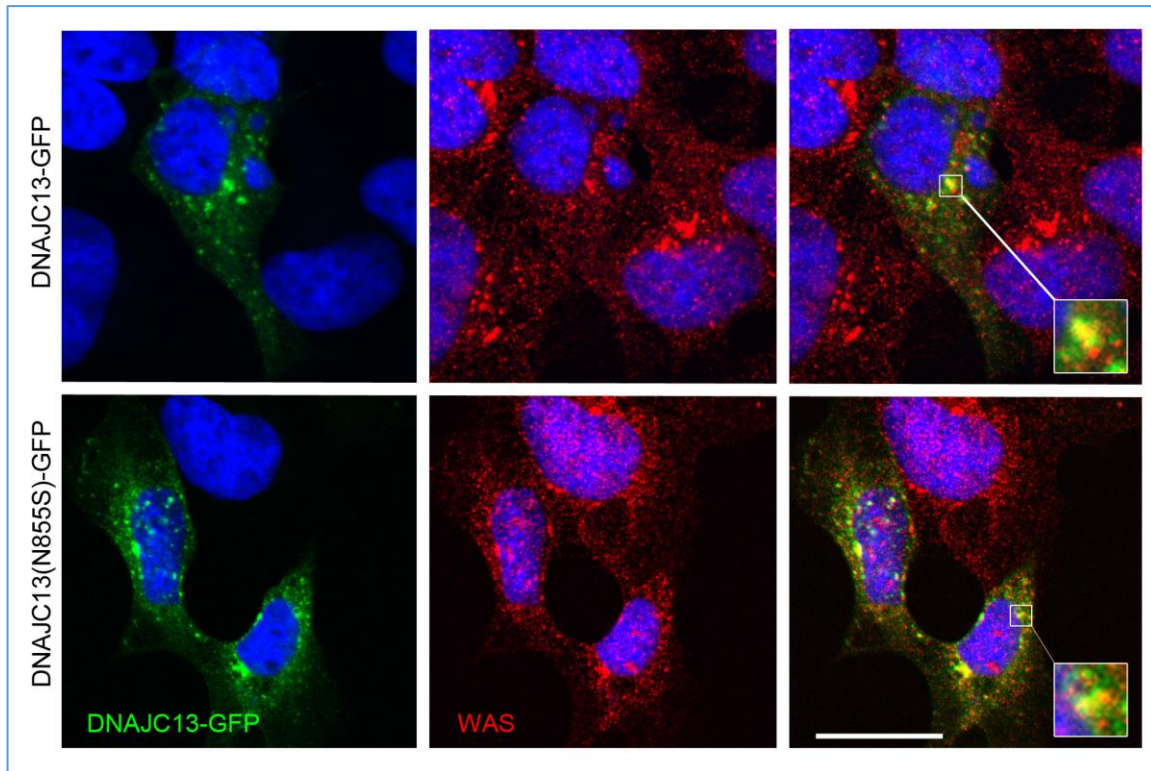


Abbildung 19: Die Mutation DNAJC13(N855S) führt nicht zu einer veränderten Assoziation mit Komponenten des WASH-Komplex. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert (grün). WAS wurde, als Komponente des WASH-Komplex zur Markierung selbigem mit einem spezifischen Antikörper detektiert (rot). Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. DNAJC13(N855S) lokalisiert in gleichem Maße mit dem WASH-Komplex wie das wildtypische DNAJC13-GFP. Der Maßstab entspricht 20µm.

4.3.2. Die Verteilung von Cargo-Molekülen unter DNAJC13(N855S)

Falls die Mutation im *DNAJC13*-Gen eine Störung des retrograden Transportes nach sich zieht, würde man erwarten, dass sich dies als Akkumulation oder Fehlverteilung von betroffenen Cargo-Proteinen niederschlägt. Als Indikator eignet sich der CI-MPR. Funktion und Lokalisation des CI-MPR sind sehr detailliert erforscht und dessen fehlgeleitete Sortierung wurde im Zusammenhang mit M. Parkinson bereits beschrieben.

Zur Evaluation der Verteilung von CI-MPR wurden HEK293A-Zellen entweder mit dem wildtypischen oder mit dem mutanten DNAJC13(N855S) Konstrukt transfiziert.

Anschließend wurde der CI-MPR mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die physiologische Verteilung von CI-MPR stellt sich als umschriebene Punkte dar, die über das Zytosol verteilt liegen. Im perinukleären Bereiche finden sich größere Signalintensitäten ([Abbildung 20, A](#)). Unter Transfektion von DNAJC13(N855S) gehen diese distinkten Punkte verloren und es zeigt sich eine diffuse Verteilung über das gesamte Zytosol. Der CI-MPR scheint gestreut mit weniger distinkten Punkten als unter wildtypischen Bedingungen. Die Analyse der Korrelation von DNAJC13-GFP und CI-MPR zeigt eine partielle Kolo-kalisation mit einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,23. Die Korrelation von DNAJC13(N855S) mit CI-MPR liegt im Mittel bei 0,09 und kann somit als vollständige Dissoziation beider Signale interpretiert werden. Im statistischen Vergleich ergibt sich für das mutante Konstrukt signifikant weniger Kolo-kalisation mit CI-MPR als mit dem wildtypischen DNAJC13.

Das Experiment zeigt, dass DNAJC13(N855S) nicht mit dem CI-MPR kolo-kalisiert und, dass die Transfektion des mutanten Konstruktes zu einem Verlust der physiologischen Verteilung von CI-MPR führt.

Eine veränderte Verteilung von CI-MPR wurde auch unter transientem *Knockdown* von DNAJC13 bereits beobachtet. Damit einhergehend, zeigte sich unter *Knockdown* eine Zunahme der Kolo-kalisation von CI-MPR mit dem Golgi-Apparat. (Girard et al., 2005). Der gleiche Phänotyp wurde auch beim Verlust der N-terminalen PI(3)-Phosphat-Bindung (Xhabija and Vaccratsis, 2015) und unter Transfektion der Mutation VPS35(D20N) (Follett et al., 2014, Munsie et al., 2015) beobachtet.

Vor diesem Hintergrund galt es zu überprüfen, ob auch die unter Transfektion von DNAJC13(N855S) beobachtete Dissoziation von CI-MPR mit einer zunehmenden Lokalisation am Golgi-Apparat einhergeht. Erneut wurden HEK293T-Zellen mit dem wildtypischen DNAJC13 und dem mutanten DNAJC13(N855S) transfiziert ([Abbildung 20, B](#)). Die kleinen Kästchen zeigen als graues Signal die erfolgreiche Transfektion an. Zur Markierung des Golgi-Apparates wurde TGN46 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Verteilung des TGN46-Signals zeigt sich unter Transfektion von DNAJC13(N855S) unverändert, während das Signal von CI-MPR wie bereits beschrieben streut. Im überlagerten Bild lässt sich unter beiden Bedingungen eine gute Korrelation der beiden Signale erkennen.

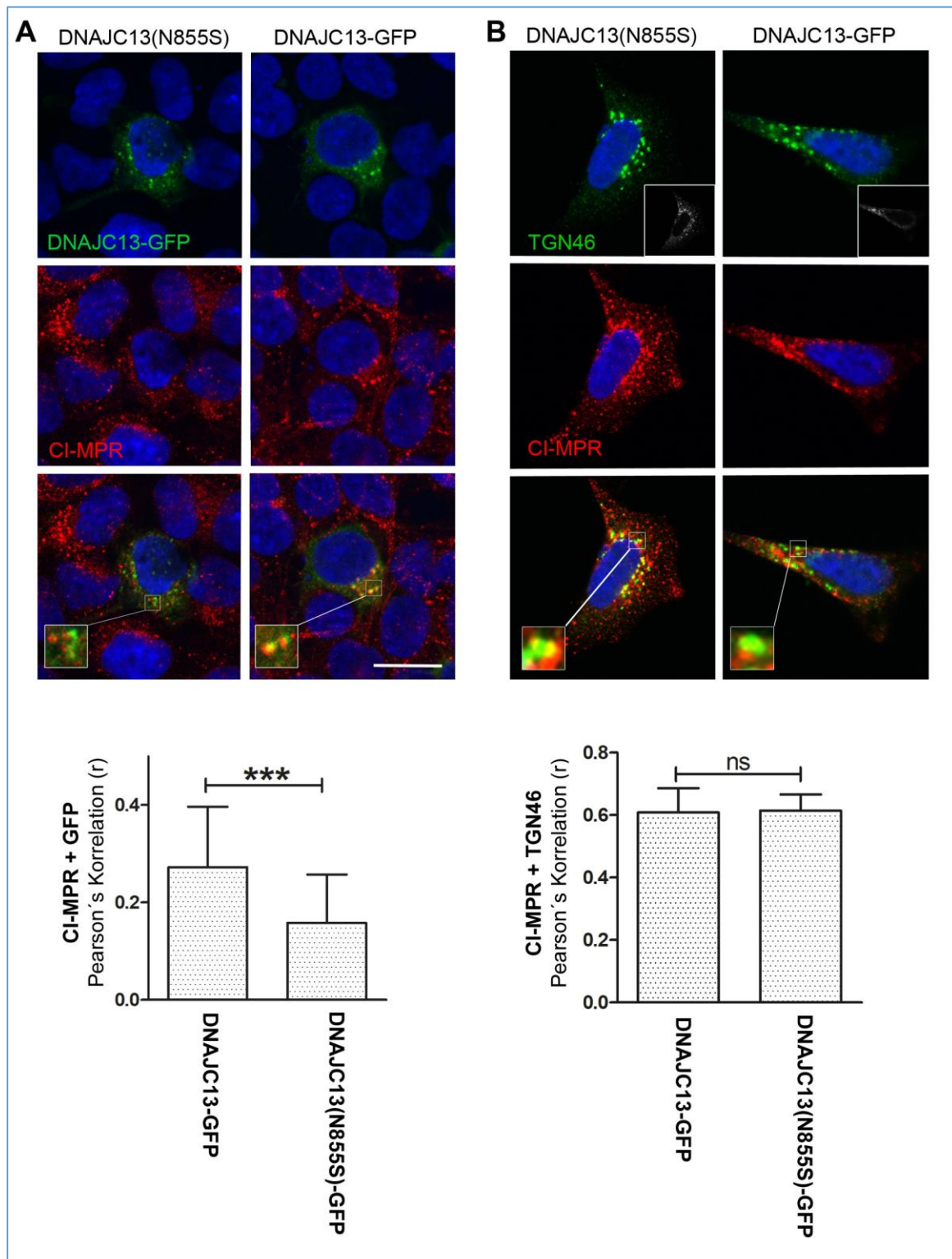


Abbildung 20: Die Transfektion von DNAJC13(N855S) führt zur Streuung von CI-MPR ohne Akkumulation auf dem Golgi-Apparat. Alle Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Der Maßstab entspricht 20µm. **A)** HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert (grün). CI-MPR wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert (rot). Die Transfektion von DNAJC13(N855S)-GFP führt zur Streuung von CI-MPR und zur Abnahme der Kolokalisation beider Signale. *Pearson's*: $r(\text{WT}) = 0,23$; $r(\text{N855S}) = 0,09$; $n=8$; *t-test*. **B)** HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert (grün). CI-MPR (rot) und TGN (grün) wurden mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Transfektion von DNAJC13(N855S)-GFP führt nicht zur Zunahme des CI-MPR-Signals mit TGN46. (*Pearson's*: $r(\text{WT}) = 0,61$; $r(\text{N855S}) = 0,61$; $n=8$; *t-test*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die quantitative Auswertung der Kolo-kalisation von TGN46 und CI-MPR ergibt mittlere Korrelationswerte von 0,61. Die Korrelation unterscheidet sich unter Transfektion von DNAJC13(N855S) statistisch nicht von den Werten unter Transfektion des wildtypischen Plasmids. Die Transfektion von DNAJC13(N855S) führt dem zufolge nicht zu einer Verlagerung von CI-MPR hin zum Golgi-Apparat. Der Phänotyp von DNAJC13(N855S) unterscheidet sich von dem der Mutation VPS35(D20N), sowie dem *Knockdown* von DNAJC13 und dem Verlust der N-terminalen PI(3)-Phosphat-Bindung.

4.3.3. LAMP2a und Cathepsin D-Spiegel im stabilen *Knockdown*

Im vorherigen Experiment wurde die Dissoziation von CI-MPR unter Transfektion von DNAJC13(N855S) demonstriert. An nächster Stelle sollen nun die konsekutiven funktionellen Konsequenzen der Miss-Verteilung von CI-MPR evaluiert werden. CI-MPR wird mit den assoziierten Enzymen über den Retromer-Komplex entlang der retrograden Route transportiert. Hierzu zählt z. Bsp. die am Abbau von *alpha*-Synuclein beteiligte Protease Cathepsin D (Cullen et al., 2009, Sevelever et al., 2008). Pro-Cathepsin D wird an CI-MPR gebunden vom Golgi-Apparat zum Lysosom transportiert, wo es im Rahmen von limitierter Proteolyse in die katalytisch aktive Form überführt wird. Unter *Knockdown* von DNAJC13 wurde im *pulse-chase*-Experiment eine verzögerte Reifung von Pro-Cathepsin D zu Cathepsin D dokumentiert (Girard et al., 2005). Bei der starken Dissoziation von CI-MPR unter Transfektion von DNACJ13(N855S) könnte ebenso eine Reifungsstörung der Proteasen zu erwarten sein.

Um dieser Fragen nachzukommen, wurde das stabile DNAJC13-*Knockdown*-Zellsystem verwendet. Die Zellen mit stabilem DNAJC13-*Knockdown* wurden mit einem leeren Plasmid, dem wildtypischen Plasmid oder DNAJC13(N855S) transfiziert. Dabei wurden die Cathepsin D-Spiegel in Referenz zur naiven Zelllinie quantifiziert ([Abbildung 21, A](#)). Es sind weder unter *Knockdown* von DNAJC13, noch unter Transfektion von wildtypischem oder mutanten DNAJC13 veränderte Cathepsin-Protein-Spiegel im Gesamt-Lysat zu verzeichnen.

Neben der Zufuhr der Protease ist der Abbau von *alpha*-Synuclein abhängig vom Eintritt des *alpha*-Synucleins in das Lysosom. Dies geschieht durch LAMP2a vermittelter CMA. Aus diesem Grund wurden analog zum vorherigen Experiment die

Protein-Spiegel von LAMP2a im Gesamt-Lysat überprüft. Auch hier zeigen sich keine Veränderungen unter *Knockdown*, wildtypischer Transfektion oder Transfektion mit DNAJC13(N855S). Die q-PCR von LAMP2 bestätigen das Ergebnis einer unveränderten Expression durch *Knockdown* von DNAJC13 auf mRNA-Ebene (Abbildung 21, B). Der lysosomale Abbau von *alpha*-Synuclein stellt einen Konvergenzpunkt des retrograden Transports und der CMA dar. Dieses Experiment zeigt, dass weder der *Knockdown* von DNAJC13, noch die Expression des wildtypischen oder mutanten DNAJC13 zu einer veränderten Konzentration der für diesen Prozess essentiellen Proteine Cathepsin D und LAMP2a führt.

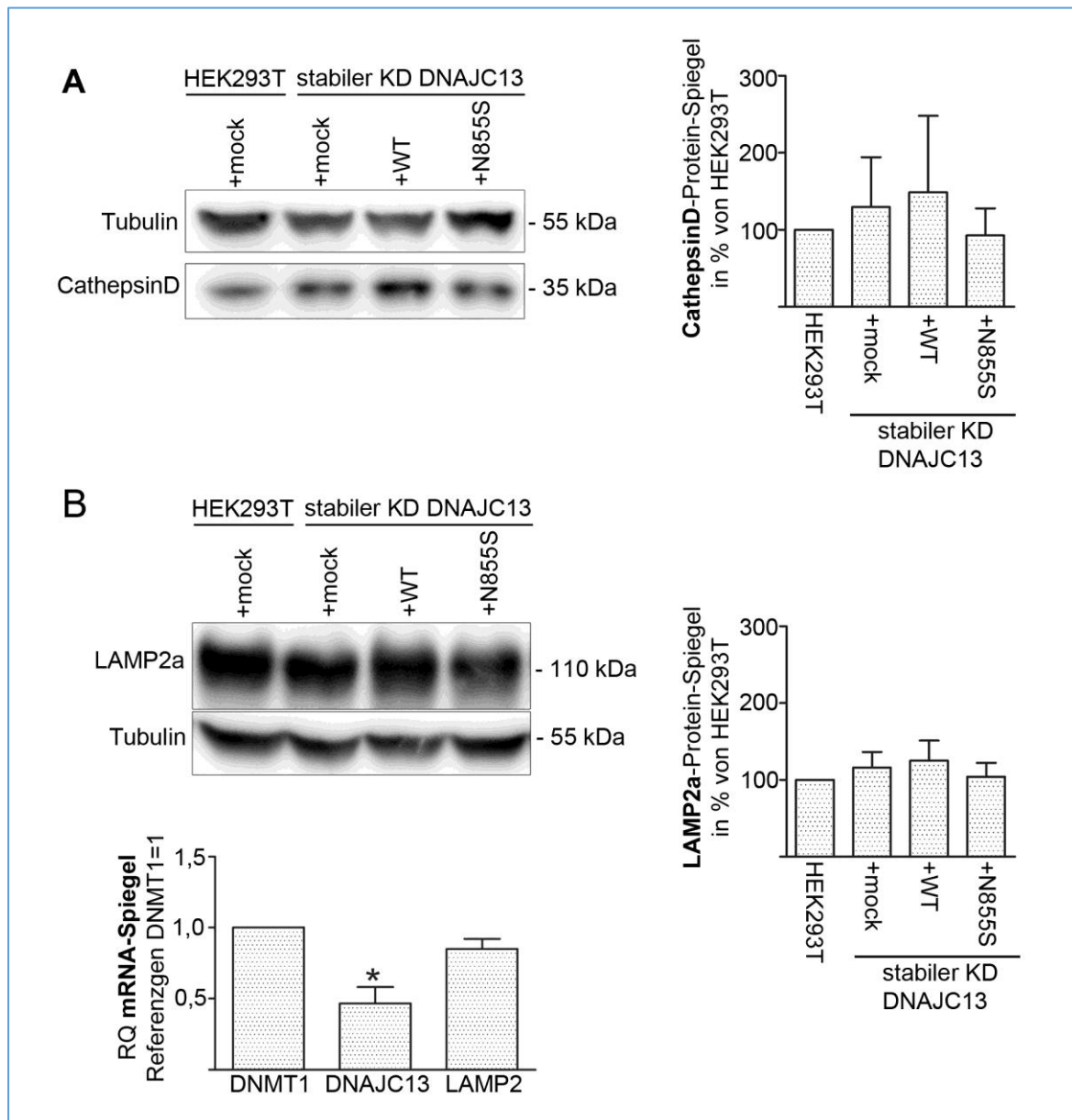


Abbildung 21: Cathepsin D- und LAMP2a-Level sind unverändert im Total-Lysat unter stabilem *Knockdown* von DNAJC13

Western-Blot-Analyse aus Total-Lysat. Die stabile DNAJC13-*Knockdown*-Zelllinie wurde mit einem leeren-Vektor (mock), wildtypischem DNAJC13 und mutantern DNAJC13(N855S) transfiziert. Die Auftrennung fand in einem 10-prozentigen Polyacrylamid-Gel statt, mit anschließender Detektion durch spezifische Antikörper. Als Kontrolle für gleichmäßig eingesetzte Gesamt-Protein-Konzentration wurde Tubulin verwendet. Relative Angabe der Proteinspiegel zu mit mock-transfizierten HEK293T. **A**) Cathepsin D-Protein-Spiegel (n=2) **B**) LAMP2a-Protein-Spiegel (n=3, *t*-test), Analyse von mRNA-Spiegeln mittels RT-Q-PCR. Signifikanter *Knockdown* von DNAJC13, keine Regulation von LAMP2. Relative Quantifizierung (RQ) durch Software REST2009 berechnet. *DNA-Methyl-Transferase 1* (*DNMT1*) wurde als Referenzen verwendet. (n=3, *t*-test). **p*< 0,05; ***p*< 0,01; ****p*< 0,001

4.3.4. Cathepsin D-Aktivität im stabilen DNAJC13-Knockdown

Die Konzentration an Cathepsin D im Gesamt-Lysat hat sich als stabil erwiesen. Aus diesem Grund wurde der Fokus in den nächsten Versuchen auf die Reifung von Cathepsin D im Lysosom gelegt. Durch CI-MPR abhängigen Transport wird Pro-Cathepsin D retrograd zum Lysosom transportiert. Anschließend wird es importiert und durch proteolytische Reifung in die katalytisch aktive Form Cathepsin D überführt. Die katalytische Aktivität von Cathepsin D im Lysosom kann folglich Ausschluss über einen regelrechten retrograden Transport und nachfolgenden Import geben.

Zur Messung der katalytischen Aktivität von Cathepsin D wurden naive HEK293T-Zellen und Zellen, die den stabilen DNAJC13-Knockdown tragen, lysiert. Unter Anwendung eines mehrschrittigen Fraktionierungs-Protokolls wurde eine an Lysosomen angereicherte Fraktion hergestellt (Gumpper et al., 2017).

Die Western-Blot-Analyse zeigt das Profil der Proteine aus der entstandenen Fraktion ([Abbildung 22, A](#)). LAMP1 und LAMP2 sind als spezifische lysosomale Proteine in großer Menge nachweisbar, während zytosolische Proteine wie DNAJC13 und Tubulin nicht zu detektieren sind. Auffällig ist die unscharfe Auftrennung der lysosomalen Proteine. Diese entsteht durch die im Golgi-Apparat stattgehabte Glykosylierung, die zu einer ungleichen Ladungsverteilung führt. Mittels BCA-Assay wurde die Proteinkonzentration ermittelt, um für die Messung der Aktivität gleichmäßig eingesetzte Proteinmengen zu gewährleisten ([Abbildung 22, C](#)). Die Protein-Spiegel von LAMP2a und Cathepsin D sind auch in der lysosomal angereicherten Fraktion unter *Knockdown* von DNAJC13 stabil.

Für die Aktivitätsmessung wurde als Substrat ein kleines Peptid verwendet, das ein konjugiertes Fluorophor trägt. Unter saurer Hydrolyse wird das fluorophore Molekül frei und emittiert nach Anregung einer bestimmten Wellenlänge, ein Lichtsignal. Zeitlich betrachtet verhält sich das Lichtsignal proportional zur hydrolytischen Umsetzung des Substrates und kann deshalb als Maß für die enzymatische Aktivität gewertet werden. Bei Darstellung des fluorophoren Signals (*relative fluorophore units* = RFU) über die Zeit entstehen zwei lineare Kurven, die hier beispielhaft für ein Experiment dargestellt sind ([Abbildung 22, B](#)). Als Negativkontrolle wurden die gleichen Proben mit dem Cathepsin-Inhibitor E64-D behandelt. Das ausbleibende Lichtsignal in der Negativkontrolle validiert das Signal der eigentlichen Messung.

Der statistische Vergleich der Steigung (m) beider Kurven über mehrere Experimente, ergibt keinen signifikanten Unterschied ([Abbildung 22, D](#)) Die enzymatische Aktivität von Cathepsin D in der lysosomal angereicherten Fraktion ist demnach durch den *Knockdown* von DNAJC13 nicht herabgesenkt.

Bei der Untersuchung des retrograden Transportes unter der Mutation DNAJC13(N855S) ergab sich eine unveränderte subzelluläre Verteilung und Assoziation von Domänen des Retromer-Komplexes, sowie dem WASH-Komplex. Als Cargo-Protein des Retromer-abhängigen retrograden Transportes zeigt sich CI-MPR in der subzellulären Verteilung unter Mutation verändert. Außerdem scheint das mutante DNAJC13 weniger mit CI-MPR zu assoziieren als das wildtypische. Im stabilen *Knockdown* von DNAJC13 sind die Proteinspiegel von LAMP2a und Cathepsin D sowohl im Gesamt-Lysat, als auch in der lysosomal angereicherten Fraktion unverändert. Gleiches gilt für die katalytische Aktivität. Die hier abgebildeten Ergebnisse aus dem stabilen *Knockdown* können demnach die Beobachtungen von Girard et al. (2005) im transienten System nicht bestätigen.

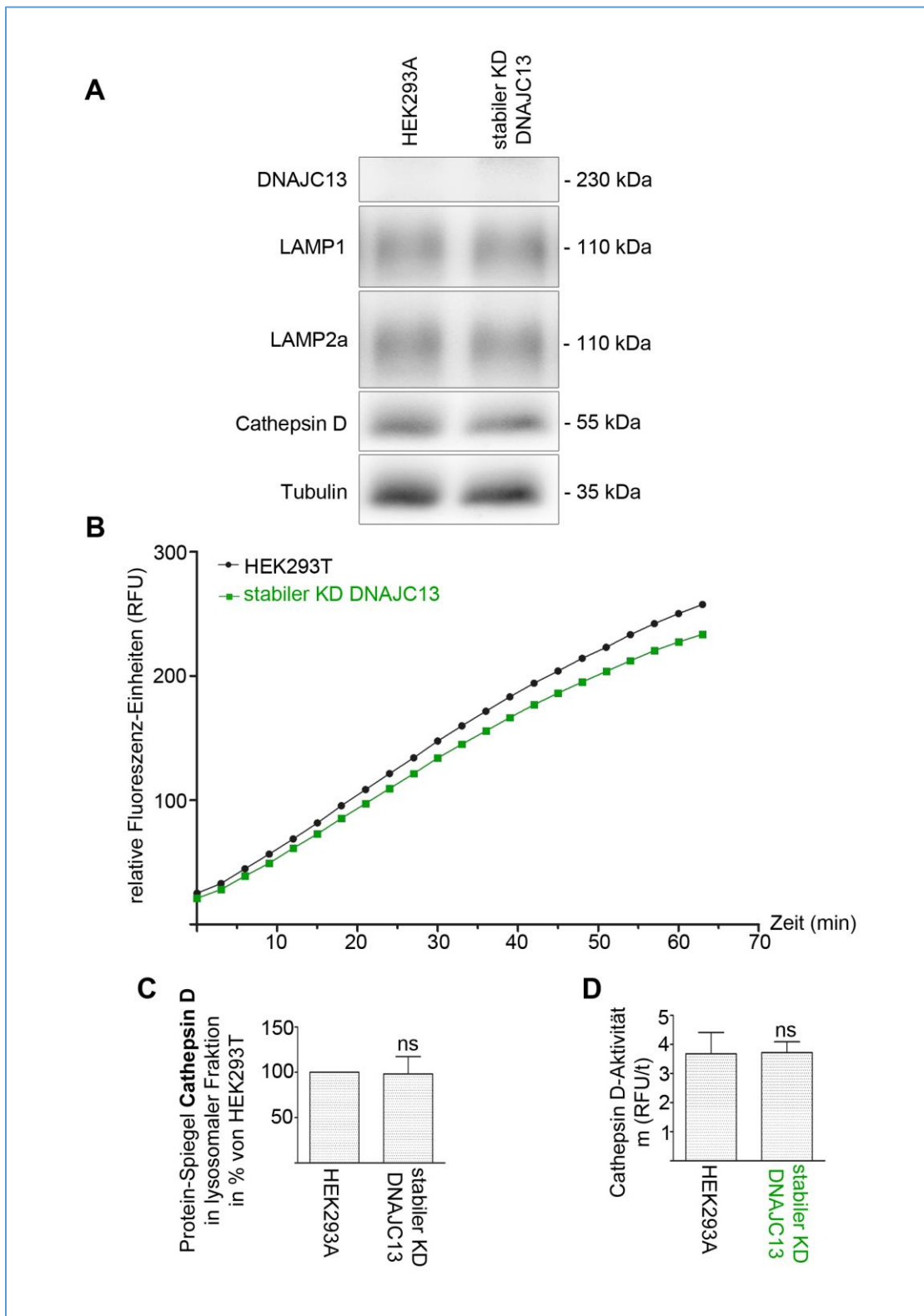


Abbildung 22: Die Cathepsin D-Aktivität ist in der lysosomal angereicherten Fraktion der stabilen DNAJC13-Knockdown-Zelllinie unverändert. A) Western-Blot-Analyse der Proteine in der lysosomal angereicherten Fraktion von HEK293T und stabiler DNAJC13-Knockdown-Zelllinie. Die Auftrennung erfolgte in 10-prozentigem Polyacrylamid-Gel mit anschließender Detektion durch spezifische Antikörper. Zytosolische Proteine wie DNAJC13 und Tubulin sind nicht nachweisbar. Lysosomen-spezifische Proteine wie LAMP1 und LAMP2a sind detektierbar (n=4). **B)** Analyse der enzymatischen Aktivität von Cathepsin D in lysosomal angereicherter Fraktion von HEK293T und stabiler DNAJC13-Knockdown-Zelllinie. Gemessen wurde das Fluoreszenzsignal (RFU) im Zeitverlauf. Der Kurvenverlauf stellt beispielhaft ein Experiment dar. **C)** Die Protein-Spiegel von Cathepsin D sind unter beiden Bedingungen konsistent (n=4, t-test). **D)** Die Steigung der einzelnen Kurven wurde zur statistischen Auswertung verwendet. Die Cathepsin D-Aktivität bleibt unter Knockdown von DNAJC13 unverändert (n=4, t-test). *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001

4.4. DNAJC13(N855S) und Autophagie

Wie für den Retromer-abhängigen retrograden Transport gilt auch für die autophagische Degradation, dass dieser Prozess sowohl funktionell mit DNAJC13 im Zusammenhang steht als auch in pathogenetischen Erklärungen für M. Parkinson Erwähnung findet. Die Überexpression von DNAJC13 führt zur Steigerung des autophagischen Fluxes, während die Depletion die Autophagie zu senken vermag (Besemer, 2015). Dieser Abschnitt soll erörtern, ob der gestörte autophagische Flux als Ursache für den neurodegenerativen Phänotyp unter Mutation von DNAJC13(N855S) in Frage kommt.

In folgenden Experimenten wurde zur Messung des autophagischen Fluxes die Methode der Bafilomycin A₁-Behandlung verwendet. Das Antibiotikum Bafilomycin A₁ inhibiert spezifisch die lysosomale vakuolären ATPase und verhindert dadurch die Azidifizierung der Lysosomen. Autophagosomen können hierdurch nicht degradiert werden und es kommt zu einer Anreicherung von Rezeptor- oder Cargo-Proteinen wie LC3-II oder p62/ SQSTM1. Die Differenz der Protein-Spiegel zwischen einer behandelten und einer unbehandelten Probe gilt letztendlich als quantitative Aussage über die autophagische Aktivität (Klionsky et al., 2008).

4.4.1. Assoziation von DNAJC13(N855S) mit autophagischen Strukturen

In Einklang einer funktionellen Beziehung zur Autophage konnte DNAJC13 auf autophagosomalen Strukturen identifiziert werden. Als Grundlage hierfür diente der Nachweis einer partiellen Kollokalisierung mit LC3-II und p62/SQSTM1-positiven Strukturen (Besemer, 2015). Folgend soll überprüft werden, ob auch das mutante DNAJC13(N855S) auf autophagosomalen Kompartimenten lokalisiert.

Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Zellen nach Transfektion mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP mit Bafilomycin A₁ behandelt. P62/SQSTM1 wurde mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die konfokalen Aufnahmen zeigen eine partielle Lokalisation beider DNAJC13-Varianten mit p62/SQSTM1 ([Abbildung 23](#)). Somit lässt sich feststellen, dass die Mutation DNAJC13(N855S) nicht zur Dissoziation von autophagosomalen Strukturen führt.

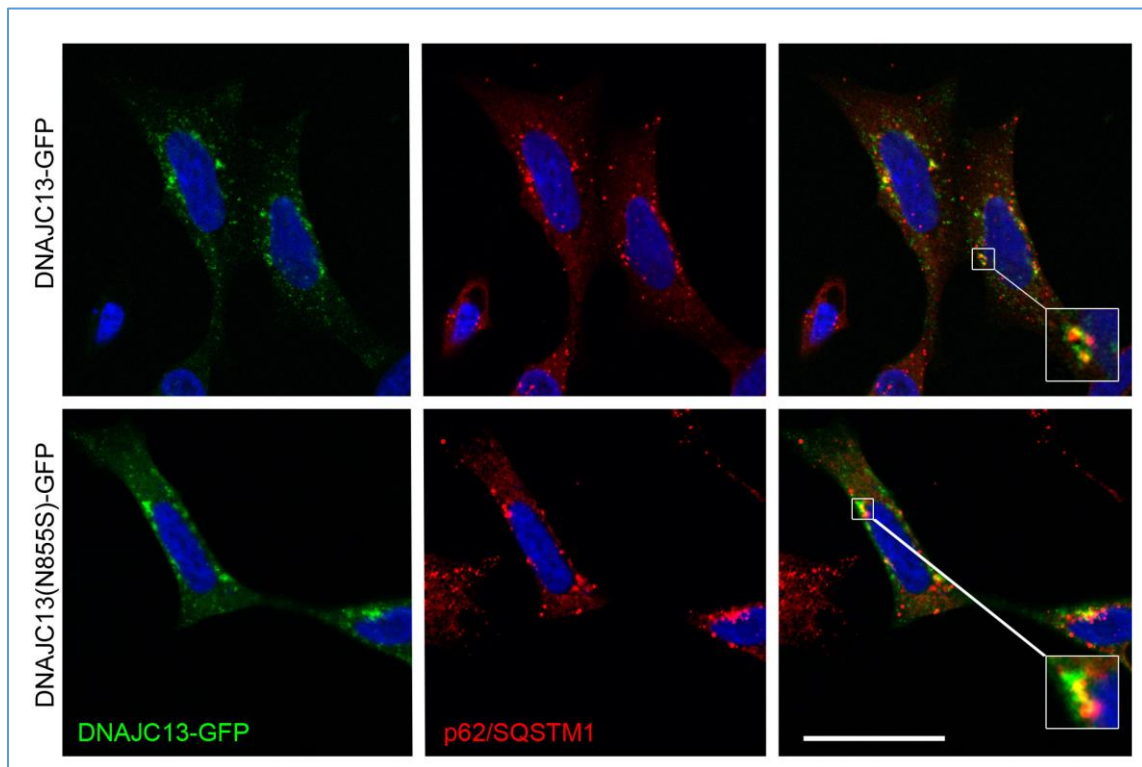


Abbildung 23: DNAJC13(N855S) lokalisiert auf autophagosomalen Strukturen. HEK293A-Zellen wurden mit DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert. Beide Proben wurden über 4 h mit Bafilomycin_{A1} inkubiert. P62/SQSTM1 wurde mit spezifischen Antikörpern detektiert. Beide Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Sowohl das wildtypische Konstrukt als auch das mutante DNAJC13(N855S) zeigt eine partielle Kolokalisation mit p62/SQSTM1. Der Maßstab entspricht 20µm.

4.4.2. Autophagie unter *Recovery*

Als Goldstandard zum Nachweis kausaler Zusammenhänge liefert das *Recovery*-Experiment die beste Evidenz. Hierbei wird das zu untersuchende Protein zunächst herunterreguliert und anschließend wieder in die Zelle eingebracht. Ist der hypothetische funktionelle Effekt dabei reversibel, kann dies als kausale Korrelation interpretiert werden.

Das abgebildete Experiment veranschaulicht diese Beziehung für die M. Parkinson assoziierte Mutation DNAJC13(N855S). Zellen der stabilen DNAJC13-Knockdown-Linie wurden mit leerem Plasmid, wildtypischem DNAJC13-GFP und DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert. Mit Hilfe der Bafilomycin A₁-Behandlung wurde im Anschluss die autophagische Aktivität ermittelt.

Die Western-Blot Analyse von DNAJC13 belegt den konsistenten *Knockdown*, sowie die erfolgreiche Transfektion der zwei unterschiedlichen Konstrukte ([Abbildung 24, A](#)). Auffällig sind an dieser Stelle die sehr hohen Expression-Spiegel von DNAJC13.

Als autophagische Marker dienten LC3B-II und p62/SQSTM1. Die Messung der autophagischen Aktivität anhand von p62/SQSTM1 ergibt unter stabilem *Knockdown* von DNAJC13 einen signifikanten Abfall um ca. 70% im Vergleich zur naiven HEK293T-Zelle ([Abbildung 24, C](#)). Nach Re-Expression des wildtypischen DNAJC13 verdoppelt sich die autophagische Aktivität. Vor dem Hintergrund der hohen Expressions-Spiegel von DNAJC13 lässt sich an dieser Stelle ein Dosis-Effekt vermuten. Ohne skaliertes Titrationsexperiment lässt sich dies jedoch nicht konstatieren, obgleich das Experiment belegt, dass massive Expressions-Spiegel von DNAJC13 die Autophagie nicht negativ beeinflussen. Nach Expression des mutanten DNAJC13(N855S) können im Mittel nur Werte von ca. 66%, im Vergleich zur naiven Zelle, erreicht werden. Im statistischen Vergleich des Fluxes unter Expression der beiden Proteine zeigt sich signifikant weniger autophagischer Flux unter Expression des mutanten DNAJC13(N855S). Die Ergebnisse von LC3B-II zeigen bei der hier durchgeführten Fallzahl keine statistische Signifikanz jedoch die exakt gleichen Tendenzen ([Abbildung 24, B](#)). Die Messung der autophagischen Aktivität anhand von p62/SQSTM1 beweist, dass das System mit mutantem DNAJC13(N855S) nicht die gleiche autophagische Kapazität aufweist, wie unter wildtypischen Bedingungen.

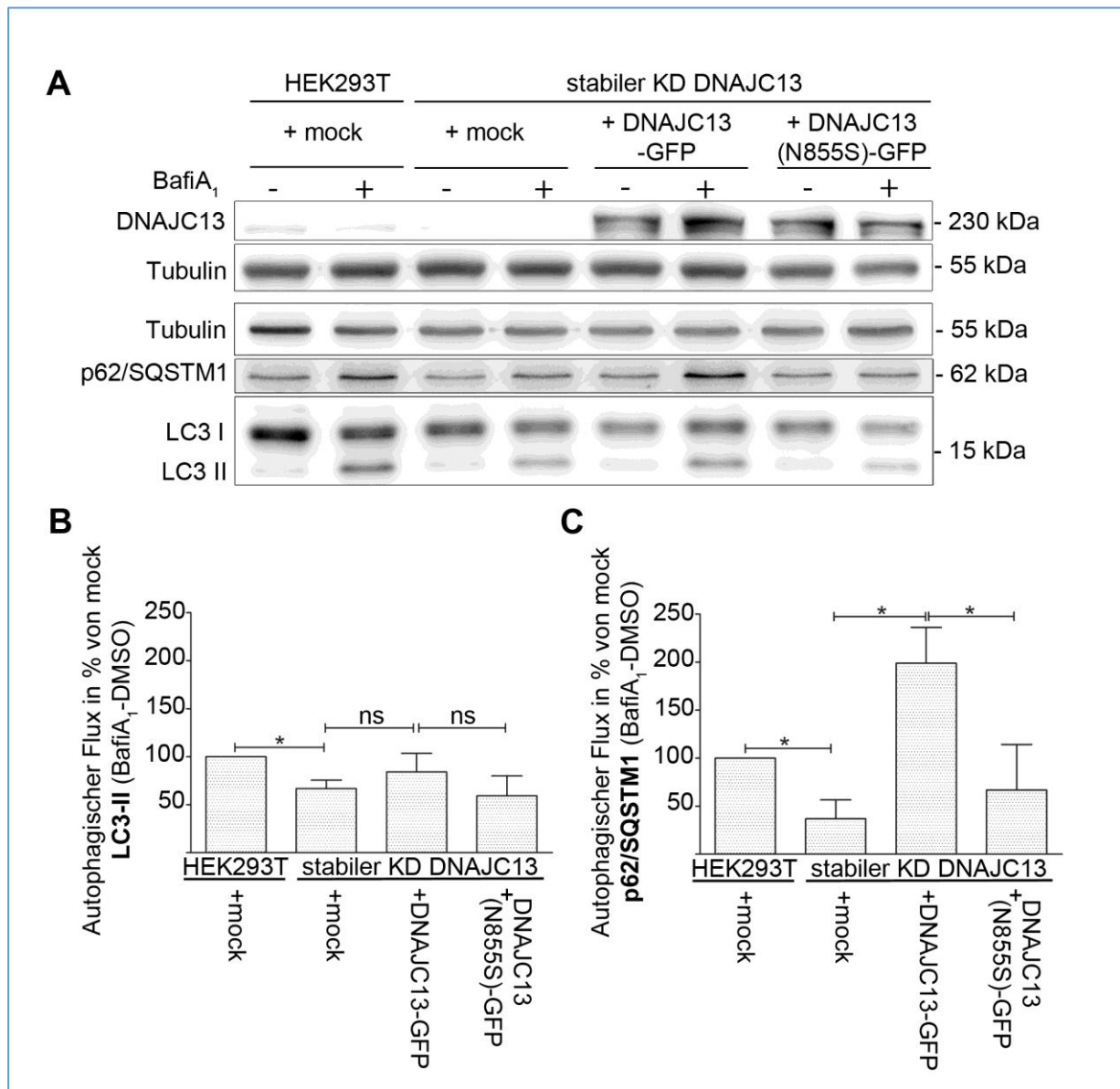


Abbildung 24: Recovery von DNAJC13(N855S) im stabilen Knockdown-System kann den autophagischen Flux nicht wiederherstellen. Die stabile DNAJC13-Knockdown-Zelllinie (KD) wurde mit DNAJC13-GFP und DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert. Die Ergebnisse sind in Bezug auf den autophagischen Flux der naiven HEK293T Zelllinie berechnet **A)** Western-Blot-Analyse von DNAJC13-Expressions-Spiegeln aus einem 8 prozentigem Polyacrylamid-Gel. LC3B-II und p62-Spiegel aus einem 15 prozentigem Polyacrylamid-Gel mit und ohne Behandlung von Bafilomycin A₁. Die jeweiligen Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Kontrolle für gleichmäßig eingesetzte Gesamt-Proteinkonzentration wurde in beiden Fällen Tubulin verwendet. **B)** Statistische Analyse des autophagischen Fluxes anhand der Differenz der LC3B-II-Spiegel mit und ohne Bafilomycin A₁-Behandlung. Im stabilen DNAJC13-Knockdown-System zeigt sich ein signifikanter Abfall der Autophagie (*one-way-ANOVA*, $n=6$). **C)** Statistische Analyse des autophagischen Fluxes anhand der Differenz der p62-Spiegel mit und ohne Bafilomycin A₁-Behandlung. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall unter stabilem Knockdown von DNAJC13 mit Recovery des autophagischen Fluxes nach Re-Expression von wildtypischem DNAJC13. Die Expression von DNAJC(N855S) kann den autophagischen Flux im stabilen Knockdown-System nicht wiederherstellen. ($n=6$; *one-way-ANOVA*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.4.3. Autophagischer Flux unter Überexpression von DNAJC13(N855S)

Das *Recovery*-Experiment hat gezeigt, dass die autophagische Kapazität unter Expression der Mutation DNAJC13(N855S) geringer ist, als unter Expression des wildtypischen Proteins. Dabei liegen die Werte des autophagischen Fluxes unter Expression des mutanten Konstruktes stets unterhalb des in der naiven HEK293T-Zelle gemessenen Fluxes. Die Tendenz ist bei beiden verwendeten autophagischen Proteinen gleich, jedoch ohne statistische Signifikanz. Hinsichtlich des retrograden Transportes führt die Überexpression von DNAJC13(N855S) in naiven HEK293T-Zellen zur Dissoziation von CI-MPR, obwohl die Zellen endogenes DNAJC13 enthalten. Es liegt der Verdacht nahe, die Mutation DNAJC13(N855S) könnte einen toxischen *gain of function* Effekt auf die Zelle ausüben.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das wildtypische und das mutante Konstrukt in naiven HEK293T-Zellen überexprimiert. Im Gegensatz zum *Recovery*-Experiment enthalten die transfizierten Zellen an dieser Stelle endogene DNAJC13-Spiegel. Die erfolgreiche Überexpression wurde durch Detektion von DNAJC13 verifiziert ([Abbildung 25, A+B](#)). Wie zuvor im *Recovery*-Experiment ergeben sich auch hier starke Expressions-Spiegel von bis zu 2500% für beide Konstrukte. Zwischen der Überexpression von DNAJC13 und DNAJC13(N855S) ergibt sich kein statistisch relevanter Unterschied.

Nächst wurde der autophagische Flux, anhand der Differenz der LC3B-II-Spiegel mit und ohne Bafilomycin A₁-Behandlung, bestimmt ([Abbildung 25, A](#)). Die Transfektion mit dem GFP-konjugierten Konstrukt zeigt unter Überexpression von wildtypischem DNAJC13 einen regelrechten Anstieg der Autophagie. Unter Überexpression des mutanten Konstruktes liegen die Werte des Fluxes unterhalb des Niveaus der naiven Zellen, jedoch nicht im signifikanten Bereich ([Abbildung 25, C](#)). Der statistische Vergleich der Überexpression bestätigt die Aussage des *Recovery*-Experimentes, dass die Mutation DNAJC13(N855S) den autophagischen Flux signifikant weniger steigern kann, als das wildtypische Konstrukt. Als Anhalt für einen toxischen *gain-of-function* Effekt lässt sich in diesem Versuch die gleiche Tendenz wie im *Recovery*-Experiment feststellen. Aufgrund fehlender statistischer Signifikanz kann die Hypothese jedoch nicht eindeutig bestätigt werden.

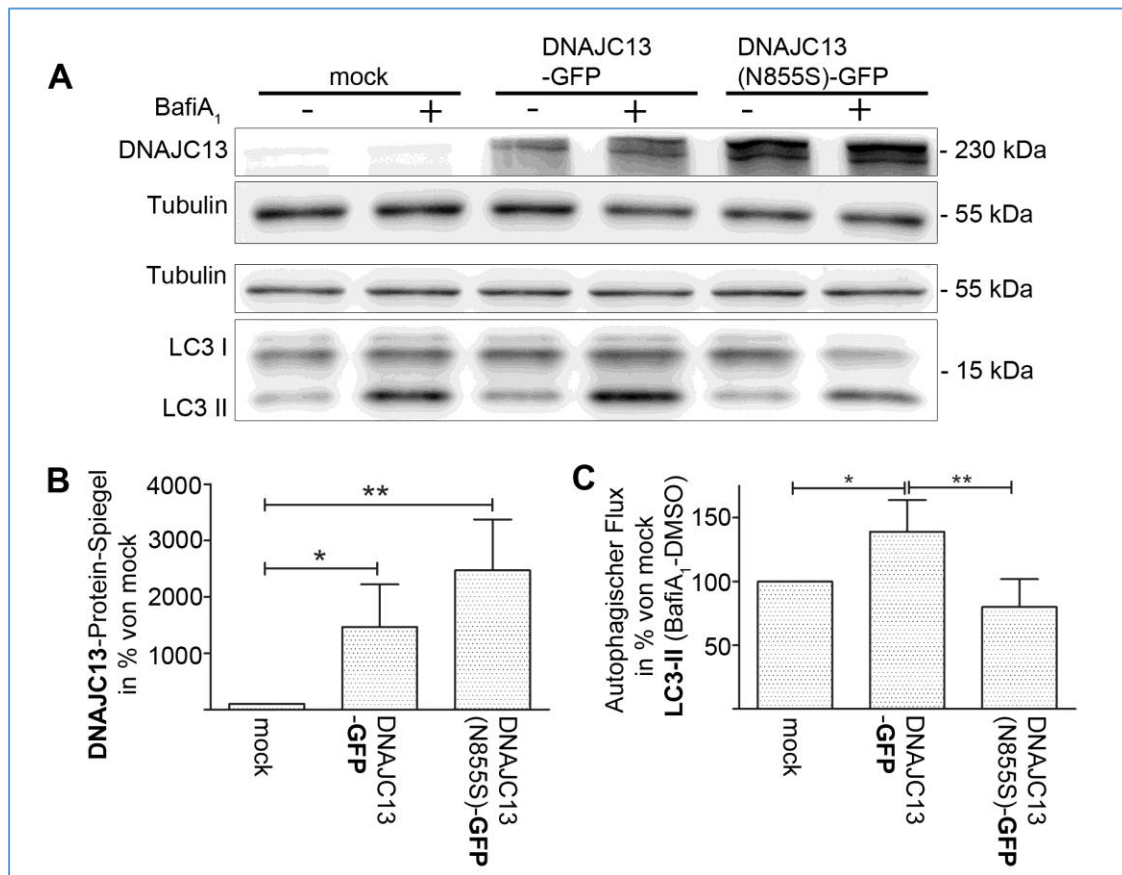


Abbildung 25: Überexpression von DNAJC13(N855S) kann den autophagischen Flux nicht steigern. DNAJC13(N855S)-GFP hat einen negativen Effekt auf die Autophagie. Dargestellt sind die Western-Blot Analysen nach Überexpression des wildtypischen und des mutanten DNAJC13(N855S)-Konstruktes in HEK293T-Zellen. Die Auftrennung fand für DNAJC13 in einem 8 %-Polyacrylamid-Gel statt, für LC3B-II unter BafilomycinA₁ (BafA₁)-Behandlung in einem 15 %-Polyacrylamid-Gel. Als Kontrolle für gleichmäßig eingesetzte Gesamt-Proteinkonzentration wurde in beiden Fällen Tubulin verwendet. Die Protein-Spiegel sind relativ zur naiven HEK293T-Zelle berechnet. Zur Berechnung des autophagischen Fluxes wurde die Differenz der Protein-Spiegel mit BafA₁-Behandlung zu mit DMSO-behandelten Zellen gebildet. **A**) Western-Blot Analyse nach Überexpression von DNAJC13-GFP bzw. DNAJC13(N855S)-GFP in HEK293T-Zellen. **B**) Statistische Analyse der Überexpression von DNAJC13-GFP, signifikante Überexpression von DNAJC13-GFP und DNAJC13(N855S)-GFP, kein signifikanter Unterschied zwischen wildtypischer und mutanter Überexpression (n= 5, *one-way-ANOVA*). **C**) Statistische Analyse des autophagischen Fluxes, anhand der Protein-Spiegel von LC3B-II mit und ohne BafA₁-Behandlung. Signifikanter Anstieg des autophagischen Fluxes unter Überexpression von DNAJC13-GFP, signifikant weniger Anstieg unter Expression von DNAJC13(N855S)-GFP (n=5; *one-way-ANOVA*). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

4.4.4. Die Rolle von DNAJC13 in der Autophagie

Es konnte festgestellt werden, dass die Mutation DNAJC13(N855S) einen negativen Effekt auf die autophagische Degradation ausübt. Um die durch die Mutation DNAJC13(N855S) entstandenen Beobachtungen in den Kontext der Neurodegeneration einzuordnen, ist das Verständnis der physiologischen Funktion des Proteins DNAJC13 unerlässlich. Bisher ist beschrieben, dass das Protein einen Einfluss auf die autophagische Degradation ausübt. Nach aktueller Hypothese scheint eine Beteiligung am Stoffwechsel von ATG9 vorzuliegen (Besemer, 2015). Ohne eine

detailliertere Beschreibung von DNAJC13 im Prozess der autophagischen Degradation gestalteten sich pathogenetische Rückschlüsse schwierig. Aus diesem Anlass ist das folgende Experiment der Untersuchung der physiologischen Funktion von DNAJC13 gewidmet.

Um einen umfassenden Eindruck über die Rolle von DNAJC13 im autophagischen Netzwerk zu gewinnen, wurde ein Genexpressions-Profil der stabilen *Knockdown*-Zelllinie erstellt. Die durch Depletion von DNAJC13 bedingten, regulatorischen Effekte sollen einen Hinweis auf etwaige funktionelle Zusammenhänge liefern. Im Fokus der Untersuchung standen Gene des zentralen Autophagie-Netzwerkes und des vesikulären Transportes. Die Primer wurden der Datenbank *Human Autophagy Primer Library* von Biomol entnommen. Mittels qPCR wurden die jeweiligen Gene auf ihre Expressions-Spiegel untersucht.

Zur Evaluation der Genexpression wurde RNA aus der wildtypischen HEK293T-Zelllinie und aus der DNAJC13-*Knockdown*-Zelllinie extrahiert. Nach Aufreinigung wurde diese mittels reverser Transkription in DNA überführt und anschließend unter Amplifikation nach dem Protokoll der qPCR quantifiziert. Als *housekeeping gene* wurde in einem Vortest die DNA-Methyl-Transferase 1 (DNMT1) als geeignet identifiziert. Die Abbildung zeigt die Gesamtheit der untersuchten Gene ([Abbildung 26, A](#)). RQ-Werte größer 1,5 wurden als Hochregulation und Werte kleiner 0,65 als Herunterregulation definiert. Die horizontalen Linien geben den Definitionsbereich für veränderte Regulation an. Direkte Auffälligkeit ist die Tatsache, dass keines der untersuchten Gene unter Knockdown von DNAJC13 hochreguliert ist. In Kontrast dazu finden sich folgende Gene im Definitionsbereich einer Herunterregulation: AMPK, ATG2A, LAMP3, mTOR, LC3A, RAB33B, TBC1D14, ULK2 und ULK3. Es ist zu bemerken, dass die mRNA-Spiegel von ULK2 und LAMP3 unter denen von DNAJC13 liegen.

Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Regulationen um einen spezifischen Effekt des uniklonalen Systems handelt, wurde ein zweiter Klon isoliert und auf Gen-Expression untersucht ([Abbildung 26, B](#)). Die Ergebnisse im Klonsystem 3 überschneiden sich dabei bis auf wenige Ausnahmen mit denen aus Klonsystem 2. Die einzigen nicht signifikant herunterregulierten Gene in Klon 3 sind AMPK, mTOR und RAB33b. Diese drei Gene zeigen reduzierte mRNA-Spiegel, die jedoch nicht im statistisch signifikanten Rahmen liegen. Die Messung zeigt an dieser Stelle eine starke Varianz, was womöglich die Abweichung von Klon 2 erklärt.

Häufiger kommt es in stabilen *Knockdown* Systemen zu Anpassungsreaktionen der Zelle. Dabei können sich die unter transienten Bedingungen beobachtete Effekte durch Einsetzen von Kompensationsmechanismen verlieren. In dieser Arbeit etablierten stabilen *Knockdown* von DNAJC13 scheint die Zelle dazu nicht in der Lage zu sein, denn trotz persistierender Herunterregulation zeigt sich ein dauerhaft reduzierter autophagischer Flux. Das Ausbleiben kompensatorischer Hochregulation von autophagischen Genen bestätigt diesen Phänotyp.

Die Kandidaten AMPK, ATG2A, mTOR, LAMP3, LC3A, RAB33B, TBC1D14, ULK3 und ULK2 zeigen sich unter stabilem *Knockdown* von DNAJC13 als signifikant reprimiert. Für die weitere Charakterisierung der Funktion von DNAJC13 können jene identifizierten Gene folglich von Interesse sein.

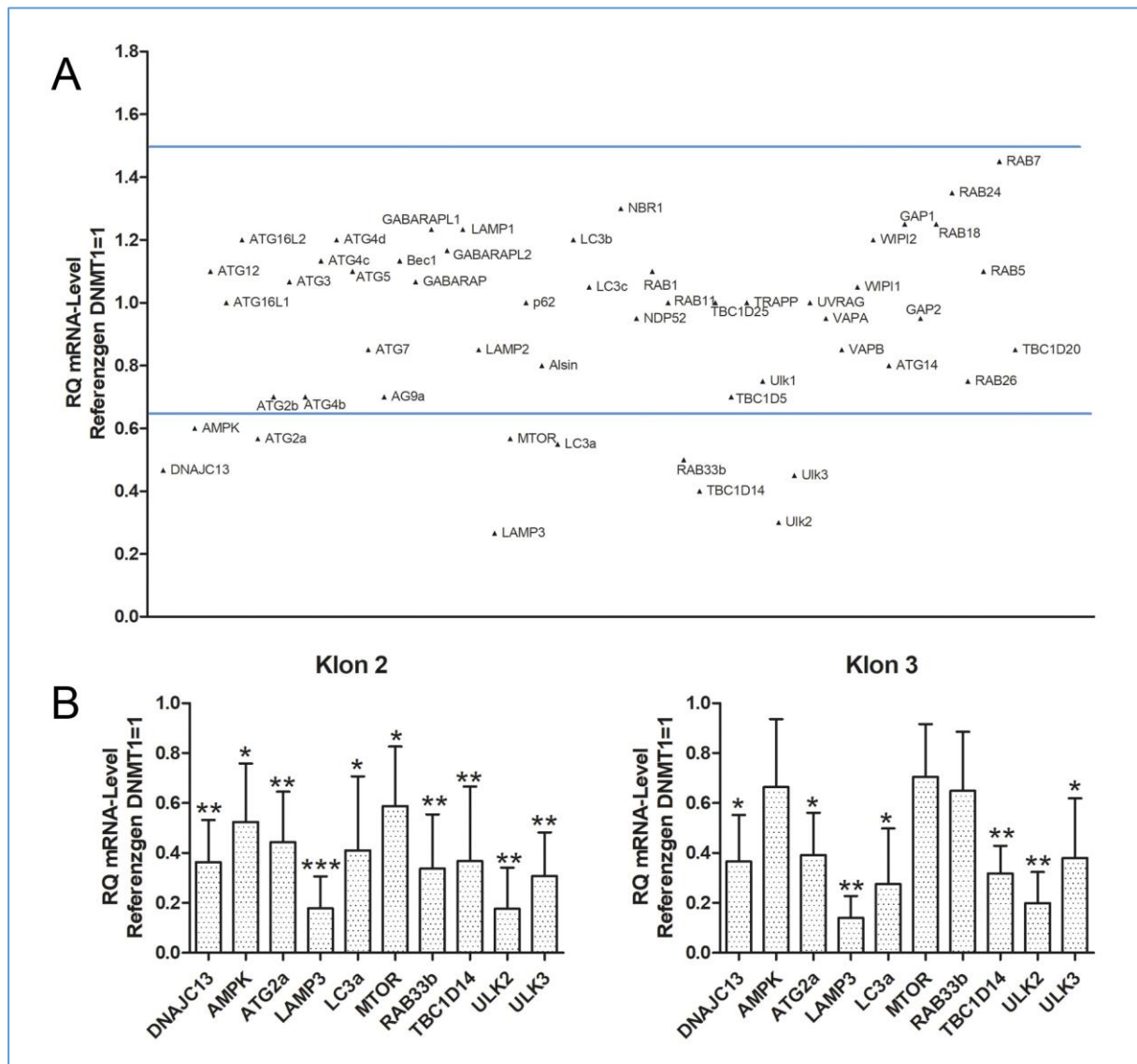


Abbildung 26: Expressionsprofil autophagischer Gene im stabilen DNAJC13-Knockdown. Expressionsprofil autophagischer Gene im stabilen DNAJC13-Knockdown. **A)** Gen-Expressionsanalyse durch RT-Q-PCR der mRNA-Spiegel. $RQ < 0,65$ = Herunterregulation, $RQ > 1,5$ = Hochregulation. Die relative Quantifizierung (RQ) wurde durch Software REST2009 berechnet. *DNA-Methyl-Transferase 1 (DNMT1)* wurde als Referenzgen verwendet. ($n=4$, *t*-test). **B)** Ausschluss eines klonalen Effekts durch Wiederholung des Experiments in zweitem Klonsystem. Größtenteils gleiches Expressionsprofil in beiden Klonsystemen. ($n=4$, *t*-test). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5. Diskussion

Das *DNAJC13*-Gen stellt eines der 23 Gene dar, die im Zusammenhang mit familiärem M. Parkinson stehen. Die Mutation *DNAJC13(N855S)*, die für den neurodegenerativen Phänotyp als verantwortlich identifiziert wurde, ist bis heute in ihrer Struktur und den funktionellen Konsequenzen wenig erforscht. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, diesem Bedarf nachzukommen. Unter mechanistischen Gesichtspunkten wurde die subzelluläre Verteilung der Mutation und die Kinetik der Degradation evaluiert. Zur funktionellen Charakterisierung wurde der durch den Retromer-Komplex vermittelte retrograde Transport und die Makroautophagie untersucht.

5.1. Strukturelle Charakterisierung von *DNAJC13(N855S)*

Die von Vilarino-Guell et al. (2014) untersuchte Kohorte demonstriert eindrücklich, dass der Austausch eines einzigen Nukleotids ausreichend ist, um eine schwere Erkrankung wie M. Parkinson auszulösen. Primär stellt sich die Frage, ob sich durch die Punktmutation direkte Konsequenzen für die Proteinbiosynthese und den Stoffwechsel des Proteins selbst ergeben. Die unmittelbarsten Veränderungen wären bereits auf Ebene der Transkription zu suchen. Da es sich bei der Punktmutation um einen Basenaustausch handelt, sind Effekte wie ein verschobenes Leseraster oder eine qualitativ veränderte Genexpression nicht von Relevanz. Denkbar hätte die Einführung eines Stopp-Codons und der konsekutive Funktionsverlust des Gens sein können. Dies wurde überprüft und hat sich nicht bestätigt. Die Störung kann in nächster Instanz im Stoffwechsel des Proteins zu suchen sein.

5.1.1. Die subzelluläre Verteilung ist durch *DNAJC13(N855S)* unbeeinträchtigt

Betrachtet man zunächst nur die Verteilung von *DNAJC13(N855S)* selbst innerhalb der Zelle, so hat diese Studie keine grundlegenden Unterschiede zum wildtypischen Protein ergeben. Die mikroskopischen Bilder zeigen eine regelrechte Lokalisation des mutanten Proteins in Form einer fein gepunkteten Verteilung mit perinukleärer Signalkumulation. Yoshida et al. (2018) beobachteten im Gegenzug, dass das wildtypische *DNAJC13* eher juxt nukleär, das mutante Protein eher peripher im

Zytosol zu finden ist. Diese Aussage können die Aufnahmen dieser Arbeit nicht teilen. Diese Divergenz könnte den unterschiedlichen verwendeten Zelllinien geschuldet sein. Yoshida et al. (2018) verwenden COS7-Zellen, während diese Arbeit an HEK293T-Zellen durchgeführt wurde. COS7-Zellen sind deutlich größer und können einen subtilen Effekt gegebenenfalls besser zu Tage fördern als HEK293T-Zellen.

Die Untersuchung von DNAJC13(N855S) in Assoziation zu den endosomalen Kompartimenten ergab ebenso wenig qualitative Veränderungen im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle. Je nach Organell oder verwendetem Markerprotein variiert dieses Ergebnis in der Übereinstimmung mit der aktuellen Datenlage. Aus diesem Grund wird folgend die Lokalisation an den unterschiedlichen endosomalen Strukturen getrennt erörtert. Für das frühe Endosom wurde in dieser Arbeit, unter Verwendung von EEA1, eine klare Lokalisation des wildtypischen DNAJC13, sowie mutanten DNAJC13 gezeigt. Dieses Ergebnis spiegelt die aktuelle Datenlage klar wider. Für das wildtypische DNAJC13 ist eine Lokalisation am frühen Endosom anhand von EEA1 einheitlich vorbeschrieben (Fujibayashi et al., 2008, Girard et al., 2005). Yoshida et al. (2018) benutzen RAB5 um die Lokalisation unter der Punktmutation zu bewerten. Das Ergebnis ist kongruent zu dieser Arbeit und zeigt keine veränderte Assoziation von DNAJC13(N855S) zum frühen Endosom.

Die Interpretation der Lokalisation des mutanten Proteins am Recycling Endosom gestaltet sich schwieriger, denn hier herrscht in der Literatur Uneinigkeit hinsichtlich der Lokalisation des wildtypischen Proteins. Die hier angefertigten Aufnahmen zeigen eine partielle Ko-Lokalisation des wildtypischen und des mutanten Proteins mit Tf-R und mit RAB11. Girard et al. (2005) und Fujibayashi et al. (2008) beschreiben eine Ko-Lokalisation des nativen DNAJC13 mit Tf-R und prägen damit die aktuell gängige Interpretation DNAJC13 lokalisiere auf dem Recycling Endosom. Eine neue Veröffentlichung verwendet RAB11 als Markerstruktur des Recycling Endosoms und beobachten darunter keine Ko-Lokalisation von DNAJC13, was die ältere Auffassung in Frage stellt (Yoshida et al., 2018). Der Tf-R wird an der Zelloberfläche internalisiert und nach der Sortierung im frühen Endosom über das Recycling Endosom zurück zur Plasmamembran transportiert. Dabei durchläuft er im Verlauf mehrere Zellkompartimente. Für DNAJC13(N855S) ist sowohl eine Veränderung des Stoffwechsel von Tf-R (Yoshida et al., 2018), wie auch für Transferrin (Vilarino-Guell et al., 2014) beschrieben. Da die Mutation folglich Einfluss auf die Verteilung des

verwendeten Markerproteins nimmt, scheint dieser zur Identifikation des Recycling Endosoms nicht geeignet. Die RAB-GTPasen hingegen regulieren die endosomale Reifung und initiieren dabei Übergänge und Sortierung, was sie als deutlich spezifischeren Marker auszeichnet (Zerial and McBride, 2001). Dies spricht für die von Yoshida et al. (2018) verwendete Methode und damit gegen eine Lokalisation des wildtypischen DNAJC13 am Recycling Endosom. In dieser Arbeit wurde sowohl Tf-R wie auch RAB11 bestimmt. Beide zeigen eine Lokalisation von nativem und mutantern Protein am Recycling Endosom was folglich im Widerspruch mit den Ergebnissen von Yoshida et al. (2018) steht. Auch hier liegt die Erklärung möglicherweise im verwendeten Zellsystem. Die Aussage von Yoshida et al. (2018) wurde sowohl in COS7 als auch in SH-SY5Y-Zellen bestätigt, während die hier angefertigten Aufnahmen aus HEK293A-Zellen stammen und nicht in einem zweiten Zellsystem reproduziert wurden. Nach ausgiebiger Literaturanalyse deutet einiges darauf hin, dass die hier beschriebene Lokalisation von DNAJC13 am Recycling Endosom einen zellspezifischen Effekt oder einen Artefakt darstellen. Die Interpretation der aktuellen Datenlage spricht eher gegen die Lokalisation von DNAJC13 am Recycling Endosom.

In Bezug auf das späte Endosom hat sich in dieser Untersuchung gezeigt, dass weder das wildtypische noch das mutante DNAJC13 dort assoziiert sind, auf der Grundlage, dass sie nicht mit dem Signal von RAB7 kolokalisieren. Girard et al. (2005) konstatieren für DNAJC13 eine Lokalisation am späten Endosom. Diese Aussage beruht auf der Beobachtung, dass DNAJC13 mit einer CI-MPR-positiven Struktur, die von EGF-Signal umgeben ist, kolokalisiert. Der CI-MPR wird an der Zellmembran internalisiert und dann entlang der degradativen Route zum späten Endosom transportiert. Dort werden Cargo-Moleküle z. Bsp. EGF durch Azidifizierung freigegeben. Aus diesem Grund interpretieren Girard et al. (2005) dieses Erscheinungsbild als spätes Endosom und DNAJC13 als dort ortsständig. Analog zur Argumentation hinsichtlich des Tf-R, gilt auch hier, dass das Cargo-Protein einen weniger spezifischen Marker als die entsprechenden RAB-Proteine darstellt. Berücksichtigt man nur jene Literatur, die RAB11 als Marker des späten Endosoms einsetzt, ergibt sich die konsistente Meinung, dass DNAJC13 nicht am späten Endosom lokalisiert (Fujibayashi et al., 2008, Yoshida et al., 2018, Follett et al., 2019). Für den Golgi-Apparat und das Lysosom haben die angefertigten Aufnahmen weder für das native Protein, noch für die Mutation DNAJC13(N855S) eine Kolokalisation

ergeben. Dieses Ergebnis findet in der Literatur Bestätigung (Girard et al., 2005, Fujibayashi et al., 2008).

Der Vergleich der subzellulären Lokalisation von wildtypischem DNAJC13 und DNAJC13(N855S) hat in dieser Arbeit hinsichtlich aller untersuchter endosomaler Organellen keine Dissoziation oder anderweitige Veränderung ergeben. Anzunehmen ist, dass die Assoziation zu den endosomalen Kompartimenten als membranumschlossene vesikuläre Strukturen abhängig von einer intakten Bindung zu PI(3)-Phosphat ist. Die Punktmutation liegt an Stelle 855 und tangiert damit den N-terminal gelegenen Interaktionsbereich von DNAJC13 mit PI(3)-Phosphat nicht, was die stabile Assoziation erklären könnte. Als Referenz liegt hierfür die Publikation von Yoshida et al. (2018) vor. Diese Arbeitsgruppe beschreibt unter der Mutation eine zunehmende Assoziation zum späten Endosom und dem Recycling Endosom, entgegen der physiologischen Lokalität des Proteins. Diese Interpretation fußt auf einer vertikalen Analyse der Intensitäten. Eine abschließende statistische Auswertung oder die Angabe der Fallzahl liegen nicht vor. Die Beobachtung von Yoshida et al. (2018) konnte jedoch in einer zweiten Zelllinie mit dem gleichen Ergebnis valide reproduziert werden. Als mögliche Erklärung für die zunehmende Assoziation des mutanten Proteins mit dem späten Endosom und dem Recycling Endosom wird eine gestörte endosomale Reifung angeführt, die konsekutiv zur Kumulation der RAB-Proteine führt. Folgt man diesem berechtigten Gedankengang, so müsste die gestörte endosomale Reifung im Verlauf zu einer Miss-Verteilung der RAB-Proteine selbst führen, was den Aufnahmen nicht zu entnehmen ist. Der von Yoshida et al. (2018) beschriebene Effekt betrifft zwei unterschiedliche endosomale Routen, nämlich den langsamen Recycling Weg und den degradativen Weg. Widersprüchlich ist hierbei, dass weder der Golgi-Apparat noch das lysosomale Kompartiment von dem Effekt betroffen sind. Es fällt folglich schwer, die Beobachtung von Yoshida et al. (2018) in einen mechanistischen Zusammenhang zu stellen. Die hier angefertigten Aufnahmen zeigen keinen Effekt der Mutation auf die subzelluläre Verteilung und stehen damit im Widerspruch zur Untersuchung von Yoshida et al. (2018). Da auch die in dieser Arbeit getroffenen Aussagen auf qualitativen Beobachtungen beruhen, kann dieser Konflikt nicht abschließend geklärt werden. Eine erneute Durchführung des Experiments mit anschließender statistischer Quantifizierung und Validierung in einem zweiten Zellsystem wäre sinnvoll.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich die Lokalisation des wildtypischen DNAJC13 auf dem frühen Endosom bestätigen. Keine Assoziation ergibt sich am Golgi-Apparat, dem Lysosom und dem späten Endosom. Entgegen der hier angefertigten Aufnahmen, die eine Kolo-kalisation mit dem Recycling-Endosom zeigen, ist die Abwesenheit von DNAJC13 vom Recycling Endosom nach ausführlicher Literaturrecherche als wahrscheinlicher anzusehen. Die Mutation DNAJC13(N855S) zeigt in dieser Arbeit keinen Effekt auf die subzelluläre Verteilung des Proteins. Dies steht im Widerspruch zur Literatur und kann ohne statistische Quantifizierung nicht abschließend geklärt werden.

5.1.2. Die Punktmutation DNAJC13(N855S) führt zu einer Destabilisierung des Proteins

Die Behandlung mit Cycloheximid zur Hemmung der Translation hat offengelegt, dass DNAJC13(N855S) signifikant schneller abgebaut wird, als das wildtypische DNAJC13. Es ist folglich davon auszugehen, dass die Punktmutation zur Destabilisierung des Proteins führt. Durch den Basenaustausch kommt es im Rahmen der Translation zur Synthese von Asparagin an Stelle von Serin. Es gilt zu eruieren, welche Konsequenzen sich durch diesen Aminosäure-Austausch auf die Stabilität des Proteins ergeben. Denkbar wären chemische bzw. thermodynamische Folgen, sowie funktionelle Zusammenhänge, die den Stoffwechsel des Proteins beeinflussen.

Chemisch betrachtet stellen sich Sequenzen mit hohem Asparagin-Anteil um ein vielfaches instabiler dar, als andere Aminosäuren (Wang, 1999). Der Austausch der Aminosäuren führt zum Verlust einer Hydroxy-Gruppe zugunsten eines Carbonsäure-amids. Der Verlust der Hydroxy-Gruppe bedeutet möglicherweise den Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung. Wasserstoffbrückenbindung gelten als die wesentlichen intermolekularen Kräfte um die räumliche Struktur des Proteins aufrecht zu erhalten. Durchaus zu erwägen wäre folglich eine konstitutionelle Veränderung der dreidimensionalen Struktur durch die Punktmutation. Die räumliche Struktur ist das charakteristische Identitätsmerkmal eines jeden Proteins, im Gegensatz zu anderen biologischen Makromolekülen. Sie bestimmt die thermodynamischen Eigenschaften des Proteins und damit die Kinetik als Enzym, die Affinität zu anderen Interaktionspartnern und auch die Stabilität des Proteins selbst. Inwiefern der Verlust

einer einzigen Wasserstoffbrücke die Stabilität des Proteins bedingen kann, bleibt zu untersuchen.

In immunhistochemischen Untersuchungen von Hirnschnitten betroffener Patienten konnte das mutierte Protein in Lewy Körperchen nachgewiesen werden (Vilarino-Guell et al., 2014). Fehlfaltung und Aggregation des Proteins durch die Mutation sind also durchaus vorstellbare Krankheitsmechanismen. Initiale Experimente in COS7-Zellen (Vilarino-Guell et al., 2014) und diese Studie zeigen, dass die Expression von DNAJC13(N855S) nicht zur mikroskopisch sichtbaren Aggregation führt. Trotzdem wäre ein Aggregationspotential durch die Punktmutation unter Stress- oder Alterungsbedingungen denkbar. Der mikroskopische Befund spricht jedoch für eine geringere Relevanz dieses Erklärungsansatzes.

Die Punktmutation ist an Stelle 855 innerhalb der ersten IWN-Domäne lokalisiert. Die IWN-Domänen zeichnen sich durch repetitive Aminosäuresequenz aus Isoleucin (I), Tryptophan (W) und Asparagin (N) aus und sind über die Spezies hochkonserviert. Das gesamte Protein weist vier solcher Domänen auf, deren Funktion zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt ist. Die Tatsache, dass die Sequenz über mehrere Spezies konserviert ist, gilt als Hinweis für eine funktionelle Relevanz der Domäne. Vorstellbar wäre zum Beispiel ein positiver oder negativer allosterischer Effekt der IWN-Domäne auf die Assoziation zu HSP70 mit konsekutiv beschleunigtem proteasomalem Abbau. Die Bafilomycin A₁-Behandlung hat keine Akkumulation von DNAJC13 gezeigt (Besemer, 2015), insofern ist davon auszugehen, dass DNAJC13 nicht lysosomal bzw. autophagisch abgebaut wird, sondern wahrscheinlicher über das Proteasom. Ein aufschlussreiches Experiment wäre die Analyse der Degradationskinetik von DNAJC13 unter proteasomaler Blockade. Mit ziemlicher Sicherheit lässt sich sagen, dass die IWN-Domäne eine funktionelle Relevanz für das Protein DNAJC13 zu haben scheint.

Die Tatsache, dass die Punktmutation einen beschleunigten Abbau und damit den konsekutiven Verlust an funktionalem DNAJC13 provoziert, legt einen *loss of function*-Effekt als pathogenetischen Erklärungsansatz für den neurodegenerativen Phänotyp nahe. DNAJC13 ist im Kontext der zellulären Proteostase vorbeschrieben (Besemer, 2015). Der Verlust des Proteins durch die Punktmutation könnte zur erhöhten Vulnerabilität der Neurone führen und sekundär zur Aggregation wie z. Bsp. der Bildung von *alpha*-Synuclein-Oligomeren.

5.2. DNAJC13(N855S) und die retromere Funktion

Für DNAJC13 sind direkte und indirekte Interaktion zum Retromer- und dem WASH-Komplex nachgewiesen. Dabei ist für das wildtypische Protein eine partielle Kolo-kalisation mit SNX1, VPS35 und WASH beschrieben (Popoff et al., 2009, Shi et al., 2009, Freeman et al., 2014). Die in dieser Arbeit angefertigten Immunfluoreszenz-Aufnahmen demonstrieren eine konsistente physiologische Lokalisation unter der Punktmutation. Follett et al. (2019) bestätigen diese Beobachtung. Es gibt demnach keinen offenkundigen Verlust der Assoziation zum Retromer- oder WASH-Komplex durch die Punktmutation. Weiterhin zeigt diese Arbeit, dass die Überexpression von DNAJC13(N855S) nicht zur veränderten subzellulären Verteilung von Retromer- und WASH-Komponenten führt.

Die Lokalisation des Retromer-Komplexes und auch dessen Integrität scheint demzufolge von der Mutation DNAJC13(N855S) nicht beeinträchtigt. Der Retromer-Komplex ist der zentrale regulative Proteinkomplex der retrograden Sortierung zwischen dem frühen Endosom dem Golgi-Apparat und dem Lysosom. Aus diesem Grund liegt nahe, dass sich unter Dysfunktion der Komponenten des Retromer-Komplex Effekte der CI-MPR-Verteilung und konsekutiver Cathepsin D-Funktion ergeben. Unter *Knockdown* von Komponenten des Retromer-Komplexes wurde eine subzelluläre Umverteilung des CI-MPR beobachtet, die mit einer zunehmenden Lokalisation entlang der degradativen Route einhergeht. Parallel zeigt sich ein gesteigerter Abbau von CI-MPR. Dies führt außerdem zum gestörten Stoffwechsel von Cathepsin D und einem Abfall der absoluten Cathepsin D-Spiegel (Arighi et al., 2004). Follett et al. (2014) und Tsika et al. (2014) untersuchten die Mutation VPS35(D620N), die ebenfalls im Zusammenhang mit M. Parkinson steht (Vilarino-Guell et al., 2011) und beobachteten den gleichen Phänotyp. Die Überexpression von DNAJC13(N855S) hat ebenfalls eine Umlagerung des CI-MPR gezeigt. Bei genauerer Betrachtung scheint es sich hier jedoch um einen anderen Phänotyp zu handeln, denn die unter Überexpression des mutierten DNAJC13 beobachtete subzelluläre Umverteilung von CI-MPR führt nicht zu einer Verlagerung hin zur degradativen Route. Weiterhin bleibt der Cathepsin D-Stoffwechsel darunter unbeeinträchtigt. Viel eher entsteht der Eindruck, der Rezeptor sei diffuser in der Zelle verteilt. Der Phänotyp der CI-MPR Dissoziation scheint sich unter Expression von DNAJC13(N855S) von jenem unter *Knockdown* von DNAJC13 und unter dysfunktionalem Retromer-Komplex zu

unterscheiden. Da der Cathepsin D-Stoffwechsel unter Überexpression von DNAJC13(N855) intakt bleibt, ist davon auszugehen, dass die Punktmutation den retrograden Transport vom frühen Endosom über den Golgi-Apparat hin zum Lysosom nicht stört.

Es verbleibt die Tatsache, dass sich der CI-MPR unter Transfektion mit DNAJC13(N855S) diffus in der Zelle verteilt. Interessanterweise konnten andere Arbeitsgruppen einen ähnlichen Phänotyp unter *Knockdown* von WASH-Komponenten (Gomez and Billadeau, 2009) und unter *Knockdown* der SNX-Dimere (Kvainickas et al., 2017) demonstrieren. Kvainickas et al. (2017) und Simonetti et al. (2017) beobachteten ebenfalls unterschiedliche Phänotypen der CI-MPR-Verteilung zwischen Depletion des Retromer-Komplexes und Depletion der SNX-Dimere. Beide können weiterhin eine direkte biochemische Interaktion von SNX-Proteinen mit CI-MPR nachweisen. Sie postulieren deshalb einen retrograden Transport von CI-MPR über SNX unabhängig vom VPS-Trimer und stellen damit das klassische Arbeitsmodell des Retromer-Komplexes in Frage stellen. Die Arbeitsgruppe von Simonetti et al. (2017) demonstriert, dass der *Knockdown* von SNX-Dimeren zu einer Kumulation von CI-MPR am frühen Endosom führt, nicht aber am Golgi-Apparat. Im Hinblick auf DNAJC13 führt der *Knockdown*, wie auch der *Knockin* von DNAJC13(N855S) zur Ausbildung von verlängerten SNX1-positiven Tubulationen des frühen Endosoms (Freeman et al., 2014, Follett et al., 2019). In Zusammenschau der Datenlage wäre folgender Mechanismus denkbar: DNAJC13 koordiniert gemeinsam mit SNX1 und dem WASH-Komplex den Export von Cargo aus dem frühen Endosom. Unter Überexpression der Mutation DNAJC13(N855S) verbleibt internalisiertes CI-MPR vermehrt im frühen Endosom, was sich als der beschriebene Streuungs-Effekt darstellt. Da der CI-MPR anterograd und retrograd zwischen dem Golgi-Apparat und dem degradativen Weg pendelt, bleibt diese Route von der Mutation unbeeinträchtigt. Dies würde außerdem erklären, warum der Transport von Transferrin durch die Mutation beeinträchtigt ist (Vilarino-Guell et al., 2014, Yoshida et al., 2018). Zwar beschreiben Yoshida et al. (2018) auch eine Beeinträchtigung der degradativen Route des EGF zum Lysosom, doch könnte dies ebenso ein indirekter Effekt an Ermangelung des Transport von EGF-R über das frühe Endosom sein, denn auch der EGF-R ist Substrat des WASH-Komplexes (Seaman et al., 2013). Wie Follett et al. (2019) ebenfalls erörtern, ist es naheliegend, dass DNAJC13 in seiner Funktion als Co-Chaperon für die regelrechte Dissoziation der Komplexe vom frühen Endosom

zuständig ist. Dafür spricht, dass der funktionelle Verlust der J-Domäne zu einer Zunahme der Assoziation von FAM21 mit DNAJC13 führen (Freeman et al., 2014) und in *C. elegans* zu einer Überlagerung funktionell getrennter endosomaler Domänen (Norris et al., 2017). Der beobachtete Phänotyp der CI-MPR-Verteilung ist auf Basis der Überexpression von DNAJC13(N855S) in HEK293T entstanden. Dabei handelt es sich um Zellen, die einen endogenen Spiegel von wildtypischem DNAJC13 aufweisen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Überexpression des mutanten Proteins einen toxischen *gain of function* Effekt auf den Stoffwechsel von CI-MPR ausübt.

Zusammenfassend hat die Studie des retrograden Transportes unter Überexpression von DNAJC13(N855S) ergeben, dass die retrograde Route zwischen Golgi-Apparat und Lysosom, ebenso wie der Stoffwechsel von Cathepsin D durch die Mutation unbeeinträchtigt bleiben. Stattdessen scheint die Mutation DNAJC13(N855S) einen toxischen Effekt auf den Export von CI-MPR aus dem frühen Endosom zu haben. Als Ursache hierfür käme eine mangelnde Dissoziation von WASH-Komplex, Retromer-Komplex bzw. SNX-Dimeren aufgrund der Dysfunktion der J-Domäne von DNAJC13 in Frage.

5.3. DNAJC13(N855S) und Autophagie

Die Charakterisierung des in dieser Arbeit etablierten stabilen DNAJC13-*Knockdown* Systems hat einen nachhaltig geminderten autophagischen Flux ergeben. Besemer (2015) konnten den Abfall der autophagischen Aktivität bereits unter transienten *Knockdown*-Bedingungen demonstrieren. Diese Arbeit bestätigt den gleichen Effekt unter dauerhafter Depletion des Proteins. Der zelluläre Organismus ist offensichtlich nicht in der Lage einen Verlust von DNAJC13 längerfristig zu kompensieren. Unter Re-Expression des wildtypischen Proteins in der stabilen *Knockdown* Zelllinie ist es möglich, den autophagischen Flux zu steigern. Hinsichtlich der M. Parkinson assoziierten Mutation DNAJC13(N855S) konnte gezeigt werden, dass dessen Re-Expression die autophagische Aktivität nicht wiederherstellen kann. Die Experimente konnten folglich aufzeigen, dass die Punktmutation DNAJC13(N855S) einen negativen Einfluss auf die Makroautophagie im humanen Zellsystem ausübt. Wie bereits im Versuch zum retrograden Transport beschrieben, scheint sich auch hier ein toxischer *gain of function*-Effekt abzuzeichnen.

5.3.1. Der stabile *Knockdown* von DNAJC13 führt zur Repression autophagischer Gene

Die langfristige Beeinträchtigung der autophagischen Aktivität unter Verlust von DNAJC13 legt eine maßgebliche Rolle dieses Proteins für die Makroautophagie nahe. Die distinkte Funktion von DNAJC13 innerhalb der autophagischen Degradation ist bis heute noch nicht bekannt. Zur näheren Aufklärung der Funktion von DNAJC13 in der Autophagie sollte eine breitflächige Untersuchung des Expressionsmusters autophagischer Gene im stabilen *Knockdown* von DNAJC13 behilflich sein. Im Rahmen des biologischen Rückkopplungs-Prinzips geht man davon aus, dass die Genexpression eines Proteins an dessen Bedarf angepasst wird. Als Konsequenz würde man bei zunehmender Belastung eines Stoffwechselzweiges eine kompensatorische Hochregulation der betroffenen Gene erwarten. Im Umkehrschluss führt die Stilllegung einer Route zur Herunterregulation der betroffenen Gene. Die Analyse des Expressionsprofils soll folglich den zellulären Bedarf der untersuchten Proteine und damit verbundener Stoffwechselwege unter dauerhaftem Verlust von DNAJC13 widerspiegeln. Für den stabilen *Knockdown* von DNAJC13 konnten folgende Gene als anhaltend reprimiert identifiziert werden: ATG9, ATG2A, RAB33B, TBC1D14, ULK2, ULK3, LAMP3, LC3A, AMPK, mTOR.

Vor Interpretation dieser Ergebnisse sollten fehldeutende Störfaktoren bestmöglich ausgeschlossen werden. Hier ist vor allem der *off-target* Effekte der zum *Knockdown* verwendeten shRNA zu berücksichtigen. Ein *off-target* Effekt beschreibt die unerwünschte Wirkung der shRNA auf solche Gene, die primär nicht als Ziel beabsichtigt waren. Die verwendete shRNA wurde der offiziellen *TRC-Library* entnommen und sollte deshalb ein minimales Risiko unerwünschter Effekte mit sich bringen. Als zusätzliche Kontrolle wurde für alle identifizierten Gene eine BLAST-Analyse durchgeführt (*Basic Local Alignment Search Tool*). Die BLAST Analyse durchsucht das menschliche Genom auf Sequenzanalogien mit dem untersuchten Oligonukleotid. Für die hier verwendeten Primer ergaben sich für keinen der Kandidaten relevante Analogien. Die identifizierten Gene können also als valides Abbild der veränderten Expression unter *Knockdown* von DNAJC13 gewertet werden. Um einen möglichen funktionellen Zusammenhang herzustellen, wurde eine ausgiebige Recherche der identifizierten Gene durchgeführt ([Abbildung 27](#)).

Für ATG2A hat sich gezeigt, dass es die Fusion von Vesikeln katalysieren kann. Dies wird durch seine stäbchenförmige Struktur begünstigt. Mit dem N-Terminus bindet das Protein an Vesikel, z. Bsp. aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und mit dem entgegengesetzten Ende über WIPI4 an die autophagosomale Membran (Graef, 2018). ATG2A lokalisiert auf PAS und *lipid droplets* (Velikkakath et al., 2012). Funktionell scheint die Membranzufuhr zum Autophagosom nahezuliegen. ATG2A interagiert direkt mit ATG9 (Wang et al., 2001) und reguliert dessen retrograden Transport (Reggiori et al., 2004).

Gleiches gilt für TBC1D14, ein Protein aus der Gruppe der RABGAPs, welches ebenfalls den retrograden Transport von ATG9 vom Endosom zum Golgi-Apparat reguliert (Lamb et al., 2016a). Durch die Bindung an den TRAPPIII-Komplex, bzw. das humane Ortholog TRAPPC8, reguliert TBC1D14 die Aktivität von RAB1 und damit indirekt die Verteilung von ATG9 (Lamb et al., 2016b). Es bindet außerdem an den ULK-Komplex und hat einen regulativ negativen Einfluss auf die Autophagie (Longatti et al., 2012). Wie genau der Mechanismus von TBC1D14 innerhalb der Autophagie aussieht, ist noch nicht abschließend geklärt, aber der *Knockdown* von TBC1D14 führt zum gestörten Transport von Tf-R über das Recycling-Endosom. Mögliche wäre außerdem, dass TBC1D14 ein Effektor der RAB11/RAB1-Dynamik ist (Longatti et al., 2012).

RAB33B reguliert eine weitere bisher noch nicht beschriebene retrograde Transportroute. Unter *Knockdown* von RAB33b wird *Shigatoxin like Protein B* nicht mehr vom Golgi-Apparat zurück zum ER transportiert, während der anterograde Weg unbeeinträchtigt bleibt (Liu and Storrie, 2012). Da sich der größte Teil der Membranzufuhr im Rahmen der Makroautophagie wahrscheinlich als Omegasom aus dem ER bildet, ist dieser Transportweg für die Bildung des Autophagosomen essentiell. Itoh et al. (2008) gelang es eine regulative Rolle von RAB33B innerhalb der Autophagosomen-Bildung nachzuweisen, indem sie eine direkte Interaktion von RAB33B mit dem ATG5-12/16L-Komplex nachwiesen. Dieser Komplex wiederum lokalisiert an der frühen Phagophore und besorgt die Lipidierung von LC3. Eine direkte Wirkung von RAB33B auf den Stoffwechsel von ATG9 ist bisher noch nicht beschrieben.

Eine übergeordnete Rolle scheinen die *Unc-51-like-Kinasen* (ULK) zu spielen. Sie sind das humane Ortholog von ATG1. Im hier durchgeführten genetischen Screening wurden ULK2 und ULK3 als herunterreguliert identifiziert, nicht jedoch ULK1. In der

Literatur werden ULK1 und ULK2 als weitestgehend homolog beschrieben. Im Rahmen der Autophagie sind sie nachweislich funktionell redundant. Deshalb werden sie meist synonym verwendet (McAlpine et al., 2013). In der Makroautophagie lokalisiert ULK1/2 wahrscheinlich am ER bzw. dem Omegasom und wird durch die Inhibition von mTORC1 oder der Aktivierung der AMPK durch Phosphorylierung aktiviert. ULK1/2 phosphoryliert daraufhin BECN-1/VPS34, was in der Synthese von PI(3)P endet. Somit wird garantiert, dass Proteine mit PI(3)P-Effektordomäne binden können, z. Bsp. ATG2A (Zachari and Ganley, 2017). Des Weiteren reguliert die Phosphorylierung von ATG9 durch ULK1 offensichtlich dessen Verteilung sowohl von der Plasmamembran, als auch von der juxt nukleären Region hin zum peripheren Pool (Zhou et al., 2017). Die indirekte Synthese von PI(3)P durch ULK1 hat außerdem Auswirkungen auf die Rekrutierung des COPII-Komplex und reguliert damit zusätzlich den Austritt vom ER zum Golgi-Apparat (Wang and Kundu, 2017).

ULK3 wurde zunächst nicht im Kontext der Autophagie betrachtet, sondern als Regulator von Abschnürungsvorgängen durch die Phosphorylierung des ESCRT-III-Komplexes (Caballe et al., 2015). Doch im Jahre 2016 zeigten Braden and Neufeld (2016) in *drosophila melanogaster*, dass ADUK, das Ortholog von ULK3 tatsächlich die Autophagie unabhängig von ULK1/2 regulieren kann.

LC3A ist eine Isoform des LC3 und gehört damit zur Gruppe der ATG8-Proteine. Innerhalb der Makroautophagie zeigen die drei Isoformen (A-C) von LC3 funktionelle Homologie. Subtile Unterschiede konnten für andere Unterformen der Autophagie wie der Xenophagie identifiziert werden. Die Besonderheit der Isoform A stellt eine mehrfach beobachtete Repression in onkogenen Zelllinien dar (Schaaf et al., 2016). Im hier durchgeführten Screening wurden HEK293T-Zellen analysiert. Dabei handelt es sich um eine embryonale Zelllinie. Embryonale Zellen zeichnen sich durch mindere Differenzierung und pluripotente Wachstumseigenschaften aus und unterscheiden sich somit nicht wesentlich von onkogenen Zellen. Es ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit identifizierte Repression von LC3A kein spezifischer Effekt des *Knockdowns* von DNAJC13 ist, als eher eine Eigenschaft des verwendeten Zell-Systems.

LAMP3 nimmt innerhalb der als herunterreguliert identifizierten Gene eine Sonderstellung ein. Wie LAMP1 und LAMP2 ist auch LAMP3 ein lysosomales Membranprotein. Die spezifische Funktion dieser Isoform ist unklar. Allerdings wurde

LAMP3 bereits mehrfach in Zusammenhang mit M. Parkinson gestellt. Pihlstrom et al. (2013) identifizierten LAMP3/MCC1 als Risikofaktor für M. Parkinson. In diesem Zusammenhang zeigt sich auch, dass der *Knockdown* von LAMP3 die Induktion der Autophagie unter proteasomaler Hemmung hemmt (Dominguez-Bautista et al., 2015).

Die Regulation von AMPK und mTOR bestätigt sich nicht konsistent im zweiten Klonsystem. Beide Kinasen regulieren die Induktion der Autophagie und spiegeln deshalb wahrscheinlich die herabgesenkte Aktivität des im Ganzen betrachteten Stoffwechselweges als eher einen funktionellen Zusammenhang wider.

Schlussendlich lässt sich durch die Recherche der unter stabilem *Knockdown* von DNAJC13 reprimierten Gene in der Tat eine übergeordnete Gemeinsamkeit erkennen. Alle identifizierten Gene stehen in direktem oder indirektem funktionellem Zusammenhang zum Stoffwechsel von ATG9 und der Bildung der Phagophore. Das Expressions-Assay der stabilen *Knockdown*-Zelllinie untermauert die Vermutung von Besemer (2015), dass der Einfluss von DNAJC13 auf die Makroautophagie im funktionellen Zusammenhang mit dem Stoffwechsel von ATG9 steht.

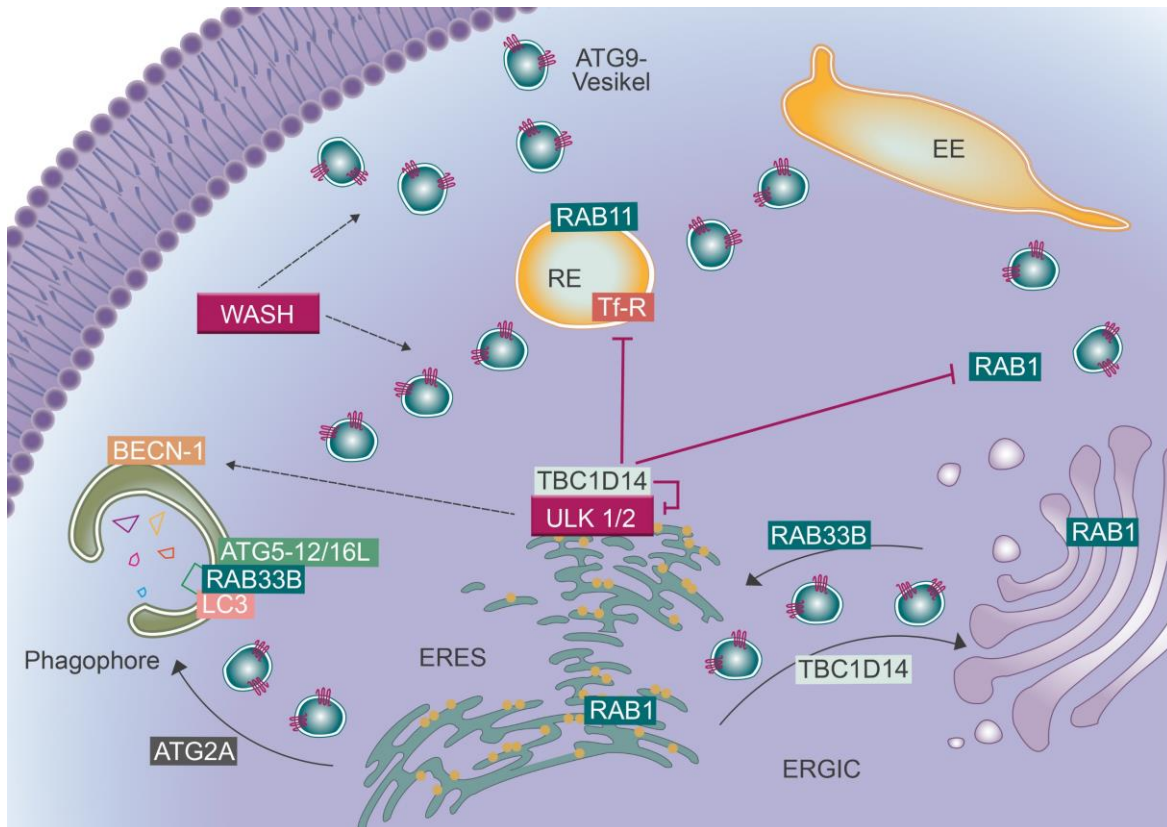


Abbildung 27: Der Zusammenhang der unter stabilem *Knockdown* von DNAJC13 regulierten Gene. Fast alle, unter stabilem *Knockdown* von DNAJC13 reprimierten Gene, zeigen als gemeinsamen Schnittpunkt eine Beteiligung am Stoffwechsel von ATG9 auf. Die schwarzen Pfeile zeigen die Routen zwischen endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und Phagophore. Diese werden u.a. reguliert von RAB33b, TBC1D14 und ATG2a. Die gestrichelten Pfeile stellen eine positive regulative Wirkung dar. ULK1/2 aktiviert Beclin1. Der WASH-Komplex ist an der Regulation der Recycling Route zur Plasmamembran und zur Phagophore beteiligt. Die roten Pfeile zeigen die negativen regulativen Einflüsse durch TBC1D14 auf ULK1/2, die Verteilung des Tf-R und der RAB1/RAB11-Konversion an. RE= Recycling Endosom, ERES= ER-Exit-Site, ERGIC= ER-Golgi intermediate compartment, EE= Frühes Endosom.

5.3.2. Der ATG9-Stoffwechsel stellt den Schnittpunkt der unter stabilem *Knockdown* von DNAJC13 regulierten Gene dar

Die genetische Analyse der etablierten Zelllinie hat gezeigt, dass der *Knockdown* von DNAJC13 zur Repression von Genen führt, die am Stoffwechsel von ATG9 beteiligt sind. Der Stoffwechsel von ATG9 ist ein hochdynamisches System, bei dem kontinuierlich Vesikel, sog. uniforme ATG9-Vesikel von endosomalen Kompartimenten abgeschieden werden, um an anderer Stelle erneut zu fusionieren. Vor diesem Hintergrund fällt auf, dass einige der regulierten Gene und deren Funktion im Zusammenhang mit Fusions- und Abschnürungsprozessen stehen. ATG2A kann durch seine stäbchenförmige Struktur Vesikel-Fusion katalysieren (Graef, 2018). Während die RAB-Proteine an nahezu allen Schritten des vesikulären Transportes beteiligt sind (Liu and Storrie, 2012). TBC1D14 ist ein RABGAP, dass u.a. ULK1/2

negativ reguliert (Longatti et al., 2012), was wiederum Auswirkungen auf den COPII-Komplex hat, einem wesentlichen Faktor der SNARE-Maschinerie (Wang and Kundu, 2017). ULK3 phosphoryliert den ESCRT-III-Komplex, der vesikuläre und zytokinetische Abschnürungsprozesse reguliert (Caballe et al., 2015). Eine mögliche Hypothese wäre, dass DNAJC13 in seiner Funktion als J-Protein zelluläre Abschnürungs- und Fusions-Mechanismen reguliert. Der Verlust von DNAJC13 und auch die Mutation DNAJC13(N855S) führen am frühen Endosom zur Ausbildung von langen tubulären Strukturen (Freeman et al., 2014, Follett et al., 2019). Möglicherweise sind diese tubulären Strukturen eine Konsequenz aus der Unfähigkeit der Vesikel-Abschnürung unter Mangel von DNAJC13.

5.3.3. DNAJC13 könnte als J-Protein Abschnürungsvorgänge regulieren

Häufig wird DNAJC13 eine ähnliche Funktion wie Auxilin (DNAJC6) in der Entmantelung von CCVs zugeschrieben. Auxilin bindet Clathrin und findet sich angereichert auf CCVs (Gorenberg and Chandra, 2017). Beides trifft auf DNAJC13 jedoch nicht zu (Girard et al., 2005). Der *Knockdown* von DNAJC13 führt zwar zur subzellulären Umverteilung von Clathrin, allerdings zeigt DNAJC13 mit Auxilin, fernab der J-Domäne, keine Sequenzhomologie (Zhang et al., 2001). Weiterhin bindet DNAJC13 im *Pulldown*-Experiment trotz seiner vier potentiellen Clathrin-Bindungs-Domänen nicht direkt an Clathrin (Girard et al., 2005). Der Einfluss von DNAJC13 auf die subzelluläre Clathrin-Verteilung scheint demnach indirekt, ggf. über einen anderen Interaktionspartner zu funktionieren.

Ein weiterer Vertreter der Gruppe C der J-Proteine ist DNAJC5 (CSP α). DNAJC5 ist ein Protein, das direkt mit SNAP-25 und Dynamin interagieren kann und damit die Ausbildung des SNARE-Apparates und auch die Vesikel-Abschnürung reguliert (Zhang et al., 2012b). Es spielt eine wesentliche Rolle in der Homöostase der Neurotransmitter und übt zudem einen Einfluss auf den Haushalt von *alpha*-Synuclein aus (Chandra et al., 2005, Gorenberg and Chandra, 2017).

Vor dem Hintergrund, dass die beiden am besten beschriebenen Vertreter der Gruppe C der J-Proteine am SNARE-Apparat beteiligt sind, lassen sich durch den Hinweis des genetischen *Screenings* der *Knockdown*-Zelllinie auch für DNAJC13 solche

Verknüpfungen herstellen. DNAJC13 interagiert über FAM21 mit dem WASH-Komplex (Freeman et al., 2014). Der WASH-Komplex kann nicht direkt mit endosomalen Membranen assoziieren. Es konnte in diesem Rahmen nachgewiesen werden, dass die FAM21-Domäne den entscheidenden Faktor für die Membranassoziation des WASH-Komplexes darstellt (Freeman et al., 2014, Gomez and Billadeau, 2009, Harbour et al., 2012, Seaman et al., 2013). Der WASH-Komplex kann über die Aktivierung von Arp2/3 die Polymerisation von Actin und damit die Membranbewegung regulieren (Derivery et al., 2009). Weiterhin zeigt der WASH-Komplex eine direkte biochemische Interaktion mit Dynamin. Sowohl der *Knockdown* von Dynamin als auch der von WASH-Komponenten führen zu einem ähnlichen Phänotyp von langen Membrantubulationen am frühen Endosom wie unter *Knockdown* von DNAJC13 (Derivery et al., 2009).

DNAJC13 liegt über PI(3)P an endosomale Membranen gebunden vor und interagiert über den FAM21-Teil direkt mit dem WASH-Komplex, sowie mit SNX1. Denkbar wäre demzufolge, dass DNAJC13 beide Komplexe zur endosomalen Membran rekrutiert und dessen Assoziation und ggf. auch die Dissoziation steuert. Dabei könnte man sich vorstellen, dass DNAJC13 die Aktivität von Dynamin reguliert, ähnlich wie DNAJC6. Dies könnte direkt über die J-Domäne geschehen oder indirekt über den WASH-Komplex. Als hochkonserviertes Protein wäre es möglich, dass DNAJC13 somit eine essentielle Rolle im Mechanismus der vesikulären Abschnürung einnimmt. Die Ausbildung von langen Tubulationen unter Verlust von DNAJC13 wäre folglich eine logische Konsequenz der dysfunktionalen Abschnürung. Für die subzelluläre Clathrin-Verteilung beschreiben Girard et al. (2005) eine Abnahme der zytosolischen Fraktion unter Verlust von DNAJC13. Dieser Phänotyp könnte sich durch die Konzentration von Clathrin an den endosomalen Tubulationen mangels Abschnürung erklären. Gleiches gilt für die unter Überexpression von DNAJC13(N855S) beobachtete Streuung des CI-MPR. Ohne intakte Abschnürungs-Maschinerie kann der CI-MPR das frühe Endosom nicht verlassen und folglich nicht zum Golgi-Apparat transportiert werden. Er verbleibt im frühen Endosom, was sich phänotypisch als Streuung darstellt. Die Theorie, DNAJC13 könne wesentlicher Faktor von Abschnürungsvorgängen sein, wird durch die Ergebnisse von Yoshida et al. (2018) gestützt, denn diese Arbeitsgruppe zeigt eine Kumulation von internalisiertem *alpha*-Synuclein am frühen Endosom unter Expression von DNAJC13(N855S). Gleichzeitig zeigt sich ein gestörter Export von Tf-F und EGFR. Die von Yoshida et al. (2018) beobachtete Dysfunktion des endosomalen

Transports geht weiterhin mit einer mangelnden Aktin-Polymerisation einher. Diese Beobachtung könnten die Hypothese, dass DNAJC13 zusammen mit dem WASH-Komplex die vesikuläre Abschnürung reguliert, untermauern.

Hinsichtlich der autophagischen Degradation wäre die Rolle von DNAJC13 in der Bildung von ATG9-Vesikeln durch Abschnürung aus endosomalen Kompartimenten zu suchen. Besemer et. al. (unter Bearbeitung) beschreiben unter *Knockdown* von DNAJC13 einen gleichartigen subzellulären Streueffekt von ATG9 wie den von CI-MPR. Dieser Phänotyp wurde weiterhin charakterisiert als abnehmende Lokalisation von ATG9 auf dem Recycling Endosom, dem Golgi-Apparat und autophagischen Markern wie LC3B. Hier gilt es zu evaluieren, ob der Streueffekt von ATG9 unter *Knockdown* von DNAJC13 mit einer zunehmenden Lokalisation von ATG9 auf dem frühen Endosom einhergeht.

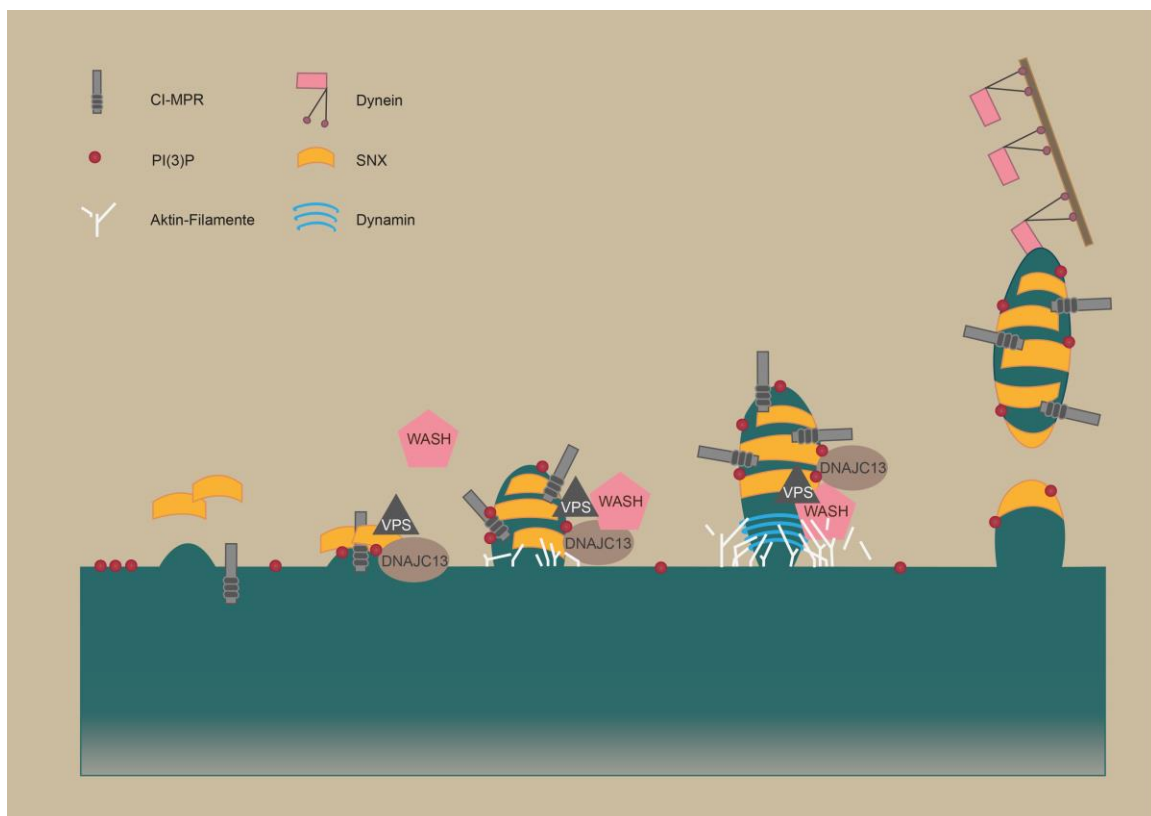


Abbildung 28: Modell der Beteiligung von DNAJC13 an der Synthese von endosomalen Vesikeln. Das SNX-Dimer kann mit Hilfe der BAR-Domäne die Membranbiegung initiieren. DNAJC13 bindet über PI(3)P an endosomale Membranen und assoziiert über SNX1 mit dem VPS-Trimer und über FAM21 mit dem WASH-Komplex. Der WASH-Komplex kann die Aktivität von Dynamin regulieren und über Arp2/3 Aktinfilamente bilden. (in Anlehnung an Simonetti et al. (2017))

5.4. DNAJC13(N855S) als M. Parkinson assoziierte Mutation

Die pathologische Oligomerisierung von *alpha*-Synuclein ist die konvergierende zelluläre Endstrecke, die beim Erkrankungsbild M. Parkinson zu beobachten ist. Eine Vielzahl von dysfunktionalen Stoffwechselwegen kann zur besagten Aggregation von *alpha*-Synuclein führen. Im Speziellen wurden in dieser Arbeit der retrograde Transport über den Retromer-Komplex, die Chaperon-vermittelte Autophagie und die Makroautophagie auf Basis der M. Parkinson assoziierten Mutation DNAJC13(N855S) untersucht (Abbildung 29).

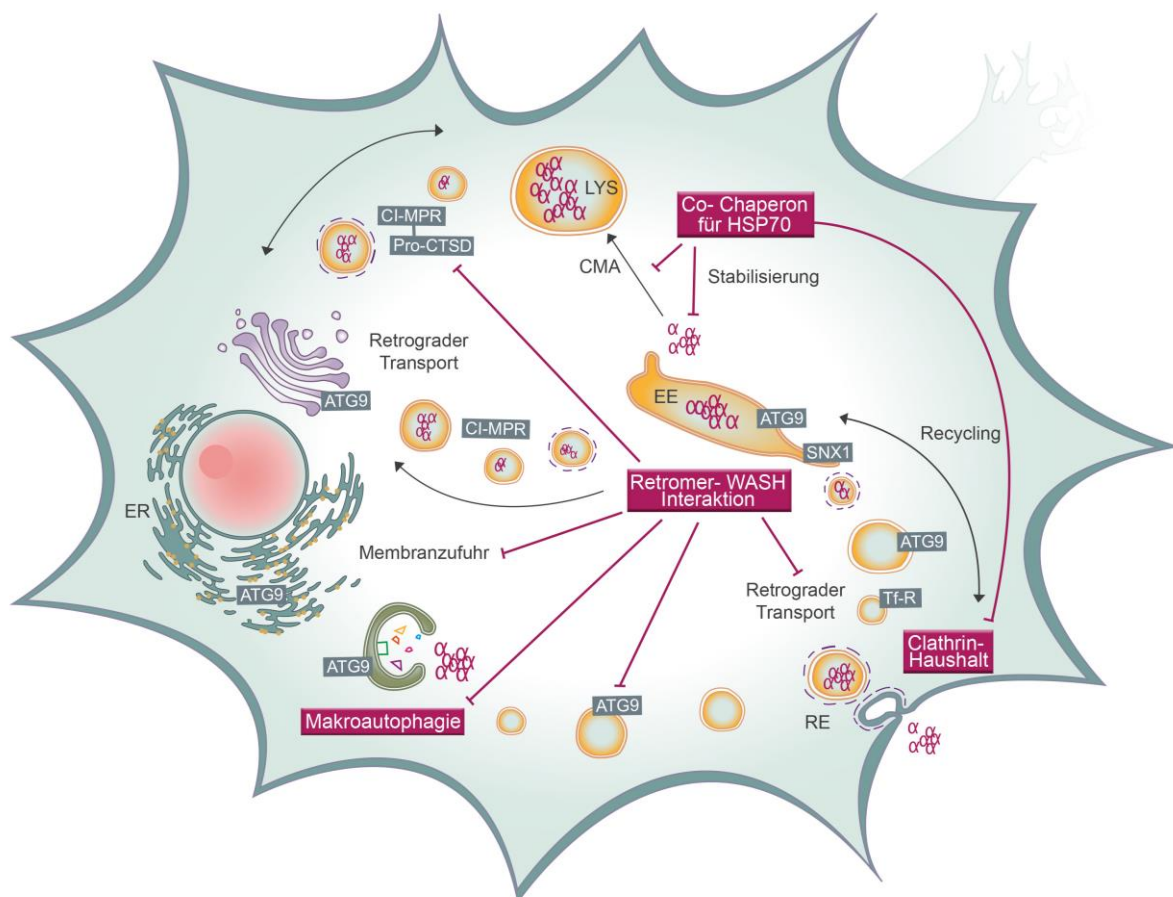


Abbildung 29: DNAJC13 in der Pathogenese von M. Parkinson. Die Graphik zeigt Stoffwechselwege, an denen DNAJC13 funktionell beteiligt ist. Dazu zählt der retrograde Transport vom frühen Endosom zur Plasmamembran oder zum Golgi-Apparat, ebenso die Recycling-Route und die Makroautophagie (schwarze Pfeile). Die roten Pfeile markieren solche Stellen, an denen eine Dysfunktion von DNAJC13 mit dem Auftreten von M. Parkinson assoziiert sein kann. CTSD= CathepsinD, ER= endoplasmatisches Retikulum, LYS= Lysosom, RE= Recycling Endosom, EE= Frühes Endosom, CMA= Chaperon Mediated Autophagy, CI-MPR= Cation-independent Mannose-6-Phosphat-Receptor, SNX1= Sorting-Nexin1, ATG9= Autophagy Related Gene 9, $\alpha\alpha$ = oligomerisiertes *alpha*-Synuclein

In den Versuchen hat sich in mit DNAJC13(N855S) transfizierten Zellen zwar eine veränderte Verteilung von CI-MPR gezeigt, aber die Zufuhr und Funktion von Cathepsin D zum Lysosom bleibt dabei erhalten. Gleichzeitig bleibt auch die Expression von LAMP2a ohne Veränderung. Die lysosomale Degradation von *alpha*-Synuclein ist vom Eintritt selbigem über LAMP2a vermittelte CMA in das Lysosom und von der Zufuhr der verdauende Protease Cathepsin D abhängig. Beide Funktionen bleiben durch die DNAJC13(N855S)-Mutation unangetastet und scheiden deshalb als mögliche Ursache für die Synukleinopathie aus.

Wie jedes andere Protein der Zelle unterliegt auch *alpha*-Synuclein einem eng regulierten Gleichgewicht aus Synthese und Degradation. Der pathologischen Aggregation des für M. Parkinson verantwortlichen Proteins liegen also zwei Faktoren zugrunde: Die pathologische Bildung von Oligomeren und deren verminderter Abbau. Welche dieser beiden Komponenten den Auslöser bildet ist ungeklärt. Allem Anschein nach herrscht eine gegenseitige Wechselwirkung, die zu einer Art Teufelskreis führt. Wendet man dieses Modell auf die Mutation DNAJC13(N855S) an, so finden sich Dysfunktionen auf beiden Seiten des sich verstärkenden Mechanismus.

Zum einen hat das Degradations-Experiment gezeigt, dass die Punktmutation zur Destabilisierung des Moleküls führt. Obwohl sich keine mikroskopische Aggregation beobachten lässt, ist DNAJC13 in den Lewy Bodies der Betroffenen nachweisbar (Vilarino-Guell et al., 2014). Yoshida et al. (2018) beobachten unter Expression von DNAJC13(N855S) eine Zunahme von PBS-unlöslichen *alpha*-Synuclein-Aggregaten in neuronalen Zellen von *drosophila melanogaster*. Dieser Effekt geht einher mit einem zunehmenden Verlust dopaminerger Neurone. Da *alpha*-Synuclein nebst CMA auch über Makroautophagie degradiert wird, zeigt diese Arbeit außerdem, dass die Punktmutation in DNAJC13(N855S) durch Behinderung der Makroautophagie auch den Abbau von *alpha*-Synuclein einschränken kann. Insgesamt sind also beide Bedingungen für eine pathologische Aggregation im untersuchten Beispiel gegeben.

Obwohl familiärer M. Parkinson deutlich seltener ist als die sporadisch auftretende Form, kann die Studie der betroffenen Gene Aufschluss über die zu Grunde liegenden Mechanismen geben. Hinsichtlich Makroautophagie finden sich unter den PARK-Genen einige Vertreter, deren Funktionen sich mit der von DNAJC13 diskutierten Rolle in der Makroautophagie überschneiden. Mutationen im *parkin*-Gen (PARK2) zum Beispiel führen zu verminderter Ubiquitinierung von VPS35 und Gewebeproben von

Betroffenen zeigen außerdem eine reprimierte Expression des WASH-Komplexes. Der komplette Verlust des Genproduktes Parkin führt ebenfalls zur Misslokation von ATG9 (Williams et al., 2018). Das Protein des am häufigsten betroffenen Gen Irrk2 reguliert zwar ebenfalls BECN-1 und stimuliert dadurch die Autophagie, dies scheint allerdings unabhängig von ULK1 zu sein (Manzoni et al., 2016). Eine weitere Verbindung der diskutierten Ergebnisse und M. Parkinson zeigt die Publikation von Winslow et al. (2010). Diese Arbeitsgruppe zeigt, dass die Überexpression von *alpha*-Synuclein zu einer gestörten Autophagie durch Dysregulation von RAB1 führt. Der *Knockdown* von *alpha*-Synuclein und RAB1 führt zur Störung des sekretorischen Weges zwischen ER und Golgi-Apparat. Damit einher geht ebenfalls eine Umverteilung von ATG9 weg von Autophagosomen und konsekutiv eine gestörte Bildung der Omegasomen.

Die in dieser Arbeit demonstrierte funktionelle Beeinträchtigung durch die Mutation DNAJC13(N855) und die jüngste Veröffentlichung zwei weiterer mit M. Parkinson assoziierten Mutationen (Lin et al., 2019, Trinh et al., 2019) im *DNAJC13*-Gen untermauern die Rolle dieses Proteins in der Pathogenese von M. Parkinson.

Das mutierte Protein zeigt eine Destabilisierung und führt gleichzeitig zu einem toxischen Effekt auf die autophagische Degradation. Die Tatsache, dass die Vererbung der Mutation DNAJC13(N855S) einem autosomal dominanten Erbmuster folgt, untermauert hierbei den Eindruck, es handle sich mechanistisch um einen *gain of function* Effekt. Die CMA ist unverändert und auch die Retromer-abhängigen Funktionen scheinen unbeeinträchtigt. Denkbar wäre, dass die Punktmutation zu einer Änderung der Konformation des Proteins führt, die durch die veränderte dreidimensionale Struktur gleichzeitig die Destabilisierung des Proteins, wie auch dessen funktionelle Einschränkung bewirkt. So wird durch die Mutation DNAJC13(N855S) sowohl der Transport, wie auch der Abbau von *alpha*-Synuclein beeinträchtigt. Die Destabilisierung von DNAJC13 als solches könnte dabei zusätzlich die zelluläre Vulnerabilität erhöhen und den neurodegenerativen Prozess beschleunigen.

5.5. Ausblick

In dieser Arbeit wurden der retrograde Transport und die Makroautophagie hinsichtlich der mit M. Parkinson assoziierten Mutation DNAJC13(N855S) untersucht. Die Zusammenschau der Ergebnisse mit der Literatur hat eine mögliche Rolle für DNAJC13 im Rahmen von vesikulären Abschnürungs-Vorgängen ergeben. Dies könnte gleichfalls den Schnittpunkt zur autophagischen Degradation darstellen. Um die Stellung von DNAJC13 in der Abschnürungs- und SNARE-Maschinerie näher zu charakterisieren, wäre die Erstellung eines Interaktoms von Vorteil. Hierdurch könnte außerdem eine direkte Interaktion von DNAJC13 mit den im genetischen Screening als reprimiert identifizierten Genen eruiert werden. Gleichzeitig sollte die Proteinexpression und subzelluläre Verteilung der identifizierten Gene unter *Knockdown* von DNAJC13 und unter Expression von DNAJC(N855S) überprüft werden. Die Studie der subzellulären Verteilung von Fusions- und Abschnürungsproteinen unter Depletion von DNAJC13 wäre ebenfalls interessant. Im optimalen Fall könnte eine Darstellung von Abschnürungsvorgängen mittels *live*-Mikroskopie stattfinden. Dieses Experiment könnte unter Anwesenheit und Abwesenheit von ATP bzw. GTP durchgeführt werden, um eine Abhängigkeit der Verteilung von der Co-Chaperonen Funktion von DNAJC13 widerzuspiegeln.

Die Evaluation der kristallinen Struktur von DNAJC13 könnte an mehreren Stellen Aufschluss geben. Zunächst wäre die dreidimensionale Lage der IWN-Domänen beschrieben, woraus sich gegebenenfalls ein Hinweis auf die Destabilisierung des Proteins durch die Punktmutation DNAJC13(N855S) ergeben würde. Zur Studie der endosomalen Transport-Kapazität fand ein Großteil der Experimente der bisherigen Publikationen an klassischen Markerproteine wie CI-MPR, EGF-R und Tf-R statt. Dabei lag das Augenmerk vor allem auf dem retrograden Transport von Endosom zu Golgi-Apparat oder zur Plasmamembran. Keine Beachtung fand bisher die sekretorische Route vom ER zum Golgi-Apparat. Als Ort der Omegasomenbildung sollte die Lokalisation von DNAJC13 und deren Einfluss auf Transportwege durch das ER tieferer Beachtung geschenkt werden. Des Weiteren sollte ferne überprüft werden, ob DNAJC13 selbst eine regulatorische Wirkung auf den ULK1/ULK2-Komplex oder BECN-1 ausübt.

Hinsichtlich der Pathogenese von M. Parkinson unter der Mutation DNAJC13(N855S) wäre es wünschenswert, Patientenproben auf Expressions-Spiegel von DNAJC13 und der unter *Knockdown* von DNAJC13 regulierten Gene untersuchen zu können. Nach aktueller wissenschaftlicher Meinung bilden gestörte mitochondriale Fusions- und Abschnürungsvorgänge einen wichtigen Erklärungsansatz für die Entstehung von M. Parkinson. Sollte sich bestätigen, dass DNAJC13 eine Funktion in der endosomalen Vesikelbildung ausübt, wäre eine Studie der mitochondrialen Funktion, vor allem in Bezug auf Fusionsvorgänge, sinnvoll.

6. Zusammenfassung

Im Jahre 2014 wurde die Mutation DNAJC13(N855S) in einer von M. Parkinson betroffenen Familie identifiziert. *DNAJC13* gilt seither als eines von 23 Genen, die mit der Entstehung von familiärem M. Parkinson assoziiert sind. Das Protein DNAJC13 ist funktionell vor allem am Retromer-abhängigen retrograden Transport und der makroautophagischen Degradation beteiligt. Diese beiden zellulären Prozesse gelten, neben vielen weiteren, als pathogenetischer Ansatzpunkt für die Entstehung der Parkinson-Krankheit. Um die grundlegenden Mechanismen von M. Parkinson und die Funktion von DNAJC13 tiefergreifend zu verstehen, wurde die Mutation DNAJC13(N855S) in der hier angefertigten Arbeit im Kontext von Retromer-abhängigem Transport und Makroautophagie untersucht.

Beginnend mit einer strukturellen Charakterisierung der Mutation wurden zunächst Lokalisationsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass DNAJC13(N855S) weiterhin an den für DNAJC13 bekannten endosomalen Strukturen lokalisiert. Anschließend wurde die retrograde Transportroute durch mikroskopische Analyse der Verteilung von Cargo-Proteinen, wie CI-MPR und Cathepsin D, untersucht. Die Versuche haben eine Zerstreuung von CI-MPR unter Überexpression von DNAJC13(N855S) gezeigt. Die Zufuhr von Cathepsin D zum Lysosom bleibt dabei unbeeinträchtigt. Dieser Phänotyp entspricht weder dem *Knockdown* von Komponenten des Retromer-Komplexes, noch der ebenfalls im Zusammenhang mit M. Parkinson untersuchten Mutation VPS35(D620N). Vielmehr ähnelt der unter Expression des mutanten DNAJC13 beobachtete Effekt jenen Veränderungen wie unter Depletion von SNX1 oder WASH1.

Die Messung des autophagischen Fluxes fand durch Überexpression der Mutation in naiven Zellen und durch *Recovery* in einer zuvor etablierten stabilen DNAJC13-*Knockdown*-Zelllinie statt. Für die Überexpression des wildtypischen DNAJC13 ist eine Steigerung der Makroautophagie vorbeschrieben. Beide Versuche dieser Arbeit zeigen, dass die Mutation DNAJC13(N855S) die Autophagie hingegen nicht steigern kann. Zur ferneren Charakterisierung der nativen Rolle von DNAJC13 im autophagischen Abbauweg wurde ein genetisches Screening des stabilen *Knockdown*-Systems durchgeführt. Dieses stellt die Regulation von über fünfzig autophagischen Genen dar. Hierbei hat das Expressions-Profil folgende Gene als reprimiert identifiziert: ATG9, ATG2A,

RAB33B, TBC1D14, ULK2, ULK3, LAMP3, LC3A, AMPK, mTOR. Die Literatur-Recherche zeigte für alle Gene eine Beteiligung am ATG9-Stoffwechsel im Rahmen von Abschnürungs- und Fusionsvorgängen.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, dass die Überexpression der Mutation DNAJC13(N855S) die subzelluläre Verteilung des CI-MPR, unabhängig von der retrograden Route zum Lysosom, verändert, und dass die Rolle von DNAJC13 in der Autophagie im Rahmen von grundlegenden Abschnürungsmechanismen zu suchen ist. Bereits bekannt ist, dass DNAJC13 sowohl mit dem WASH-Komplex, als auch mit SNX1 interagiert. Als Funktion von DNAJC13 könnte sich folglich die Regulation der Assoziation der für die Abschnürung essentiellen Komponenten wie WASH-Komplex und SNX-Dimere ergeben. Berücksichtigt man weiterhin das strukturelle Charakteristikum der J Domäne, wäre ein Einfluss von DNAJC13 auf die Regulation der GTPase-Aktivität von Dynamin und der Aktinpolymerisation denkbar. Die gestörte Vesikelsynthese könnte den Phänotyp der veränderten ATG9 und CI-MPR-Verteilung und die gestörte autophagische Degradation unter Verlust von DNAJC13 erklären.

Die beeinträchtigte Degradationskapazität durch die Mutation DNAJC13(N855S) zeigt, dass der verminderte Abbau pathologisch aggregierter *alpha*-Synuclein Oligomere einen möglichen Krankheitsmechanismus darstellt. Neben dem dysfunktionalen Abbau der Oligomere muss, zur Ausbildung der Parkinson Krankheit, jedoch außerdem eine pathologische Aggregatbildung stattfinden. Um diese Komponente ebenfalls zu untersuchen, wurde die Degradationskinetik des mutierten Proteins unter Hemmung der Translation untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Punktmutation zur Destabilisierung des Proteins führt. Dies könnte die pathologische Oligomer-Bildung durch proteotoxischen Stress der betroffenen Zellen zusätzlich beschleunigen.

Die hier angefertigte Arbeit konnte zeigen, dass die Mutation DNAJC13(N855S) sowohl die Entstehung, wie auch den Abbau pathologischer *alpha*-Synuclein-Oligomere beeinflussen könnte. Der Nachweis einer reduzierten autophagischen Aktivität unter der Mutation DNAJC13(N855S) untermauert zusätzlich die Rolle des Proteins DNAJC13 in der Autophagie. Durch den Hinweis der nativen Funktion von DNAJC13 als J-Protein, im Rahmen grundlegender vesikulärer Abschnürungs-Vorgängen, konnte ein Beitrag zur Aufklärung hochkonservierter biologischer Mechanismen geleistet werden.

7. Literaturverzeichnis

- AMAYA, C., FADER, C. M. & COLOMBO, M. I. 2015. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Lett*, 589, 3343-53.
- APPEL-CRESSWELL, S., RAJPUT, A. H., SOSSI, V., THOMPSON, C., SILVA, V., MCKENZIE, J., DINELLE, K., MCCORMICK, S. E., VILARINO-GUELL, C., STOESSL, A. J., DICKSON, D. W., ROBINSON, C. A., FARRER, M. J. & RAJPUT, A. 2014. Clinical, positron emission tomography, and pathological studies of DNAJC13 p.N855S Parkinsonism. *Mov Disord*, 29, 1684-7.
- ARIGHI, C. N., HARTNELL, L. M., AGUILAR, R. C., HAFT, C. R. & BONIFACINO, J. S. 2004. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol*, 165, 123-33.
- AXE, E. L., WALKER, S. A., MANIFAVA, M., CHANDRA, P., RODERICK, H. L., HABERMANN, A., GRIFFITHS, G. & KTISTAKIS, N. T. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 182, 685-701.
- BESEMER, A. 2015. *Charakterisierung von RME-8 als neuen Regulator der Proteinhomöostase und der Autophagie*. Dissertation Dissertation, Johannes Gutenberg Universität.
- BRADEN, C. R. & NEUFELD, T. P. 2016. Atg1-independent induction of autophagy by the Drosophila Ulk3 homolog, ADUK. *FEBS J*, 283, 3889-3897.
- CABALLE, A., WENZEL, D. M., AGROMAYOR, M., ALAM, S. L., SKALICKY, J. J., KLOC, M., CARLTON, J. G., LABRADOR, L., SUNDQUIST, W. I. & MARTIN-SERRANO, J. 2015. ULK3 regulates cytokinetic abscission by phosphorylating ESCRT-III proteins. *Elife*, 4, e06547.
- CHANDRA, S., GALLARDO, G., FERNANDEZ-CHACON, R., SCHLUTER, O. M. & SUDHOF, T. C. 2005. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123, 383-96.
- CHANG, H. C., HULL, M. & MELLMAN, I. 2004. The J-domain protein Rme-8 interacts with Hsc70 to control clathrin-dependent endocytosis in Drosophila. *J Cell Biol*, 164, 1055-64.
- CHERUBINI, M. & WADE-MARTINS, R. 2018. Convergent pathways in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*, 373, 79-90.
- CHOI, A. M., RYTER, S. W. & LEVINE, B. 2013. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*, 368, 1845-6.
- CHOY, R. W., PARK, M., TEMKIN, P., HERRING, B. E., MARLEY, A., NICOLL, R. A. & VON ZASTROW, M. 2014. Retromer mediates a discrete route of local membrane delivery to dendrites. *Neuron*, 82, 55-62.
- COOPER, A. A., GITLER, A. D., CASHIKAR, A., HAYNES, C. M., HILL, K. J., BHULLAR, B., LIU, K., XU, K., STRATHEARN, K. E., LIU, F., CAO, S., CALDWELL, K. A., CALDWELL, G. A., MARSISCHKY, G., KOLODNER, R. D., LABAER, J., ROCHET, J. C., BONINI, N. M. & LINDQUIST, S. 2006. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, 313, 324-8.
- CORTI, O., LESAGE, S. & BRICE, A. 2011. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev*, 91, 1161-218.
- CRAIG, E. A. & MARSZALEK, J. 2017. How Do J-Proteins Get Hsp70 to Do So Many Different Things? *Trends Biochem Sci*, 42, 355-368.

- CRESTO, N., GARDIER, C., GUBINELLI, F., GAILLARD, M. C., LIOT, G., WEST, A. B. & BROUILLET, E. 2018. The Unlikely Partnership Between LRRK2 and alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *Eur J Neurosci*.
- CUERVO, A. M., STEFANIS, L., FREDENBURG, R., LANSBURY, P. T. & SULZER, D. 2004. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, 305, 1292-5.
- CUI, Y., YANG, Z. & TEASDALE, R. D. 2017. The functional roles of retromer in Parkinson's disease. *FEBS Lett*.
- CULLEN, V., LINDFORS, M., NG, J., PAETAU, A., SWINTON, E., KOLODZIEJ, P., BOSTON, H., SAFTIG, P., WOULFE, J., FEANY, M. B., MYLLYKANGAS, L., SCHLOSSMACHER, M. G. & TYYNELA, J. 2009. Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. *Mol Brain*, 2, 5.
- DAMIER, P., HIRSCH, E. C., AGID, Y. & GRAYBIEL, A. M. 1999. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*, 122 (Pt 8), 1437-48.
- DE LAU, L. M. & BRETELER, M. M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5, 525-35.
- DENG, H. X., SHI, Y., YANG, Y., AHMETI, K. B., MILLER, N., HUANG, C., CHENG, L., ZHAI, H., DENG, S., NUYTEMANS, K., CORBETT, N. J., KIM, M. J., DENG, H., TANG, B., YANG, Z., XU, Y., CHAN, P., HUANG, B., GAO, X. P., SONG, Z., LIU, Z., FECTO, F., SIDDIQUE, N., FOROUD, T., JANKOVIC, J., GHETTI, B., NICHOLSON, D. A., KRAINC, D., MELEN, O., VANCE, J. M., PERICAK-VANCE, M. A., MA, Y. C., RAJPUT, A. H. & SIDDIQUE, T. 2016. Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease. *Nat Genet*, 48, 733-9.
- DERIVERY, E., SOUSA, C., GAUTIER, J. J., LOMBARD, B., LOEW, D. & GAUTREAU, A. 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell*, 17, 712-23.
- DODSON, M. W., LEUNG, L. K., LONE, M., LIZZIO, M. A. & GUO, M. 2014. Novel ethyl methanesulfonate (EMS)-induced null alleles of the Drosophila homolog of LRRK2 reveal a crucial role in endolysosomal functions and autophagy in vivo. *Dis Model Mech*, 7, 1351-63.
- DOMINGUEZ-BAUTISTA, J. A., KLINKENBERG, M., BREHM, N., SUBRAMANIAM, M., KERN, B., ROEPER, J., AUBURGER, G. & JENDRACH, M. 2015. Loss of lysosome-associated membrane protein 3 (LAMP3) enhances cellular vulnerability against proteasomal inhibition. *Eur J Cell Biol*, 94, 148-61.
- DOOLEY, H. C., RAZI, M., POLSON, H. E., GIRARDIN, S. E., WILSON, M. I. & TOOZE, S. A. 2014. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell*, 55, 238-52.
- DOUGLAS, P. M. & DILLIN, A. 2010. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol*, 190, 719-29.
- FAN, T. S., LIN, C. H., LIN, H. I., CHEN, M. L. & WU, R. M. 2017. Lack of TMEM230 mutations in patients with familial and sporadic Parkinson's disease in a Taiwanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 174, 751-756.
- FENG, Y., HE, D., YAO, Z. & KLIONSKY, D. J. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24, 24-41.
- FOLLETT, J., FOX, J. D., GUSTAVSSON, E. K., KADGIEN, C., MUNSIE, L. N., CAO, L. P., TATARNIKOV, I., MILNERWOOD, A. J. & FARRER, M. J. 2019.

- DNAJC13 p.Asn855Ser, implicated in familial parkinsonism, alters membrane dynamics of sorting nexin 1. *Neurosci Lett*, 706, 114-122.
- FOLLETT, J., NORWOOD, S. J., HAMILTON, N. A., MOHAN, M., KOVTUN, O., TAY, S., ZHE, Y., WOOD, S. A., MELLICK, G. D., SILBURN, P. A., COLLINS, B. M., BUGARCIC, A. & TEASDALE, R. D. 2014. The Vps35 D620N mutation linked to Parkinson's disease disrupts the cargo sorting function of retromer. *Traffic*, 15, 230-44.
- FREEMAN, C. L., HESKETH, G. & SEAMAN, M. N. 2014. RME-8 coordinates the activity of the WASH complex with the function of the retromer SNX dimer to control endosomal tubulation. *J Cell Sci*, 127, 2053-70.
- FUJIBAYASHI, A., TAGUCHI, T., MISAKI, R., OHTANI, M., DOHMAE, N., TAKIO, K., YAMADA, M., GU, J., YAMAKAMI, M., FUKUDA, M., WAGURI, S., UCHIYAMA, Y., YOSHIMORI, T. & SEKIGUCHI, K. 2008. Human RME-8 is involved in membrane trafficking through early endosomes. *Cell Struct Funct*, 33, 35-50.
- GAGLIARDI, M., ANNESI, G., PROCOPIO, R., MORELLI, M., IANNELLO, G., BONAPACE, G., MANCINI, M., NICOLETTI, G. & QUATTRONE, A. 2018. DNAJC13 mutation screening in patients with Parkinson's disease from South Italy. *Parkinsonism Relat Disord*, 55, 134-137.
- GE, L., ZHANG, M. & SCHEKMAN, R. 2014. Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER-Golgi intermediate compartment. *Elife*, 3, e04135.
- GENG, J. & KLIONSKY, D. J. 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*, 9, 859-64.
- GIASSON, B. I., MURRAY, I. V., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 2001. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem*, 276, 2380-6.
- GIRARD, M. & MCPHERSON, P. S. 2008. RME-8 regulates trafficking of the epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett*, 582, 961-6.
- GIRARD, M., POUPON, V., BLONDEAU, F. & MCPHERSON, P. S. 2005. The DnaJ-domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking. *J Biol Chem*, 280, 40135-43.
- GIRI, A., MOK, K. Y., JANSEN, I., SHARMA, M., TESSON, C., MANGONE, G., LESAGE, S., BRAS, J. M., SHULMAN, J. M., SHEERIN, U. M., INTERNATIONAL PARKINSON'S DISEASE, C., DIEZ-FAIREN, M., PASTOR, P., MARTI, M. J., EZQUERRA, M., TOLOSA, E., CORREIA-GUEDES, L., FERREIRA, J., AMIN, N., VAN DUIJN, C. M., VAN ROOIJ, J., UITTERLINDEN, A. G., KRAAIJ, R., NALLS, M. & SIMON-SANCHEZ, J. 2017. Lack of evidence for a role of genetic variation in TMEM230 in the risk for Parkinson's disease in the Caucasian population. *Neurobiol Aging*, 50, 167 e11-167 e13.
- GITLER, A. D., CHESI, A., GEDDIE, M. L., STRATHEARN, K. E., HAMAMICHI, S., HILL, K. J., CALDWELL, K. A., CALDWELL, G. A., COOPER, A. A., ROCHET, J. C. & LINDQUIST, S. 2009. Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet*, 41, 308-15.
- GOMEZ-LAMARCA, M., SNOWDON, L. A., SEIB, E., KLEIN, T. & BRAY, S. 2015. Rme-8 depletion perturbs Notch recycling and predisposes to pathogenic signaling. *J Cell Biol*, 210, 517.

- GOMEZ, T. S. & BILLADEAU, D. D. 2009. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell*, 17, 699-711.
- GORENBERG, E. L. & CHANDRA, S. S. 2017. The Role of Co-chaperones in Synaptic Proteostasis and Neurodegenerative Disease. *Front Neurosci*, 11, 248.
- GRAEF, M. 2018. Membrane tethering by the autophagy ATG2A-WIPI4 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 10540-10541.
- GRANT, B. D. & DONALDSON, J. G. 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 597-608.
- GUMPPER, K., SERMERSHEIM, M., ZHU, M. X. & LIN, P. H. 2017. Skeletal Muscle Lysosomal Function via Cathepsin Activity Measurement. *Methods Mol Biol*.
- GUO, Y., CHANG, C., HUANG, R., LIU, B., BAO, L. & LIU, W. 2012. AP1 is essential for generation of autophagosomes from the trans-Golgi network. *J Cell Sci*, 125, 1706-15.
- GUSTAVSSON, E. K., TRINH, J., GUELLA, I., VILARINO-GUELL, C., APPEL-CRESSWELL, S., STOESSL, A. J., TSUI, J. K., MCKEOWN, M., RAJPUT, A., RAJPUT, A. H., AASLY, J. O. & FARRER, M. J. 2015. DNAJC13 genetic variants in parkinsonism. *Mov Disord*, 30, 273-8.
- HAMASAKI, M., FURUTA, N., MATSUDA, A., NEZU, A., YAMAMOTO, A., FUJITA, N., OOMORI, H., NODA, T., HARAGUCHI, T., HIRAOKA, Y., AMANO, A. & YOSHIMORI, T. 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495, 389-93.
- HARBOUR, M. E., BREUSEGEM, S. Y. & SEAMAN, M. N. 2012. Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended 'tail' of Fam21 binding to the retromer protein Vps35. *Biochem J*, 442, 209-20.
- HARRISON, M. S., HUNG, C. S., LIU, T. T., CHRISTIANO, R., WALTHER, T. C. & BURD, C. G. 2014. A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 267-72.
- HAYASHI-NISHINO, M., FUJITA, N., NODA, T., YAMAGUCHI, A., YOSHIMORI, T. & YAMAMOTO, A. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*, 11, 1433-7.
- HE, C. & KLIONSKY, D. J. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93.
- HENRY, A. G., AGHAMOHAMMADZADEH, S., SAMAROO, H., CHEN, Y., MOU, K., NEEDLE, E. & HIRST, W. D. 2015. Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression. *Hum Mol Genet*, 24, 6013-28.
- IMAI, K., HAO, F., FUJITA, N., TSUJI, Y., OE, Y., ARAKI, Y., HAMASAKI, M., NODA, T. & YOSHIMORI, T. 2016. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J Cell Sci*, 129, 3781-3791.
- ISHIZU, N., YUI, D., HEBISAWA, A., AIZAWA, H., CUI, W., FUJITA, Y., HASHIMOTO, K., AJIOKA, I., MIZUSAWA, H., YOKOTA, T. & WATASE, K. 2016. Impaired striatal dopamine release in homozygous Vps35 D620N knock-in mice. *Hum Mol Genet*, 25, 4507-4517.
- ITOH, T., FUJITA, N., KANNO, E., YAMAMOTO, A., YOSHIMORI, T. & FUKUDA, M. 2008. Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19, 2916-25.
- JANKOVIC, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 368-76.

- JELLINGER, K. A. 2009. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm (Vienna)*, 116, 1111-62.
- JIA, D., ZHANG, J. S., LI, F., WANG, J., DENG, Z., WHITE, M. A., OSBORNE, D. G., PHILLIPS-KRAWCZAK, C., GOMEZ, T. S., LI, H., SINGLA, A., BURSTEIN, E., BILLADEAU, D. D. & ROSEN, M. K. 2016. Structural and mechanistic insights into regulation of the retromer coat by TBC1d5. *Nat Commun*, 7, 13305.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., YAMAMOTO, A., OSHITANI-OKAMOTO, S., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 117, 2805-12.
- KAGEYAMA, S., OMORI, H., SAITOH, T., SONE, T., GUAN, J. L., AKIRA, S., IMAMOTO, F., NODA, T. & YOSHIMORI, T. 2011. The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella. *Mol Biol Cell*, 22, 2290-300.
- KARABIYIK, C., LEE, M. J. & RUBINSZTEIN, D. C. 2017. Autophagy impairment in Parkinson's disease. *Essays Biochem*, 61, 711-720.
- KARIMI-MOGHADAM, A., CHARSOUEI, S., BELL, B. & JABALAMELI, M. R. 2018. Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular Insights into the Neurodegeneration Process. *Cell Mol Neurobiol*, 38, 1153-1178.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KLIONSKY, D. J., ABELIOVICH, H., AGOSTINIS, P., AGRAWAL, D. K., ALIEV, G., ASKEW, D. S., BABA, M., BAEHRECKE, E. H., BAHR, B. A., BALLABIO, A., BAMBER, B. A., BASSHAM, D. C., BERGAMINI, E., BI, X., BIARD-PIECHACZYK, M., BLUM, J. S., BREDESEN, D. E., BRODSKY, J. L., BRUMELL, J. H., BRUNK, U. T., BURSCH, W., CAMOUGRAND, N., CEBOLLERO, E., CECCONI, F., CHEN, Y., CHIN, L. S., CHOI, A., CHU, C. T., CHUNG, J., CLARKE, P. G., CLARK, R. S., CLARKE, S. G., CLAVE, C., CLEVELAND, J. L., CODOGNO, P., COLOMBO, M. I., COTO-MONTES, A., CREGG, J. M., CUERVO, A. M., DEBNATH, J., DEMARCHI, F., DENNIS, P. B., DENNIS, P. A., DERETIC, V., DEVENISH, R. J., DI SANO, F., DICE, J. F., DIFIGLIA, M., DINESH-KUMAR, S., DISTELHORST, C. W., DJAVAHERI-MERGNY, M., DORSEY, F. C., DROGE, W., DRON, M., DUNN, W. A., JR., DUSZENKO, M., EISSA, N. T., ELAZAR, Z., ESCLATINE, A., ESKELINEN, E. L., FESUS, L., FINLEY, K. D., FUENTES, J. M., FUEYO, J., FUJISAKI, K., GALLIOT, B., GAO, F. B., GEWIRTZ, D. A., GIBSON, S. B., GOHLA, A., GOLDBERG, A. L., GONZALEZ, R., GONZALEZ-ESTEVEZ, C., GORSKI, S., GOTTLIEB, R. A., HAUSSINGER, D., HE, Y. W., HEIDENREICH, K., HILL, J. A., HOYER-HANSEN, M., HU, X., HUANG, W. P., IWASAKI, A., JAATTELA, M., JACKSON, W. T., JIANG, X., JIN, S., JOHANSEN, T., JUNG, J. U., KADOWAKI, M., KANG, C., KELEKAR, A., KESSEL, D. H., KIEL, J. A., KIM, H. P., KIMCHI, A., KINSELLA, T. J., KISELYOV, K., KITAMOTO, K., KNECHT, E., et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4, 151-75.
- KOUMANDOU, V. L., BOEHM, C., HORDER, K. A. & FIELD, M. C. 2013. Evidence for recycling of invariant surface transmembrane domain proteins in African trypanosomes. *Eukaryot Cell*, 12, 330-42.

- KVAINICKAS, A., JIMENEZ-ORGAS, A., NAGELE, H., HU, Z., DENGJEL, J. & STEINBERG, F. 2017. Cargo-selective SNX-BAR proteins mediate retromer trimer independent retrograde transport. *J Cell Biol*, 216, 3677-3693.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAMB, C. A., LONGATTI, A. & TOOZE, S. A. 2016a. Rabs and GAPs in starvation-induced autophagy. *Small GTPases*, 7, 265-269.
- LAMB, C. A., NUHLEN, S., JUDITH, D., FRITH, D., SNIJDERS, A. P., BEHREND, C. & TOOZE, S. A. 2016b. TBC1D14 regulates autophagy via the TRAPP complex and ATG9 traffic. *EMBO J*, 35, 281-301.
- LEE, Y. K. & LEE, J. A. 2016. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep*, 49, 424-30.
- LIN, C. H., CHEN, P. L., TAI, C. H., LIN, H. I., CHEN, C. S., CHEN, M. L. & WU, R. M. 2019. A clinical and genetic study of early-onset and familial parkinsonism in taiwan: An integrated approach combining gene dosage analysis and next-generation sequencing. *Mov Disord*, 34, 506-515.
- LIU, J. J. 2016. Retromer-Mediated Protein Sorting and Vesicular Trafficking. *J Genet Genomics*, 43, 165-77.
- LIU, S. & STORRIE, B. 2012. Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cell Mol Life Sci*, 69, 4093-106.
- LONGATTI, A., LAMB, C. A., RAZI, M., YOSHIMURA, S., BARR, F. A. & TOOZE, S. A. 2012. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J Cell Biol*, 197, 659-75.
- MACLEOD, D. A., RHINN, H., KUWAHARA, T., ZOLIN, A., DI PAOLO, G., MCCABE, B. D., MARDER, K. S., HONIG, L. S., CLARK, L. N., SMALL, S. A. & ABELIOVICH, A. 2013. RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. *Neuron*, 77, 425-39.
- MANZONI, C., MAMAS, A., ROOSEN, D. A., DIHANICH, S., SOUTAR, M. P., PLUN-FAVREAU, H., BANDOPADHYAY, R., HARDY, J., TOOZE, S. A., COOKSON, M. R. & LEWIS, P. A. 2016. mTOR independent regulation of macroautophagy by Leucine Rich Repeat Kinase 2 via Beclin-1. *Sci Rep*, 6, 35106.
- MAYER, M. P. & GIERASCH, L. M. 2019. Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem*, 294, 2085-2097.
- MAZZULLI, J. R., XU, Y. H., SUN, Y., KNIGHT, A. L., MCLEAN, P. J., CALDWELL, G. A., SIDRANSKY, E., GRABOWSKI, G. A. & KRAINIC, D. 2011. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*, 146, 37-52.
- MCALPINE, F., WILLIAMSON, L. E., TOOZE, S. A. & CHAN, E. Y. 2013. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy*, 9, 361-73.
- MCGOUGH, I. J., STEINBERG, F., JIA, D., BARBUTI, P. A., MCMILLAN, K. J., HEESOM, K. J., WHONE, A. L., CALDWELL, M. A., BILLADEAU, D. D., ROSEN, M. K. & CULLEN, P. J. 2014. Retromer binding to FAM21 and the WASH complex is perturbed by the Parkinson disease-linked VPS35(D620N) mutation. *Curr Biol*, 24, 1670-1676.
- MCMILLAN, K. J., KORSWAGEN, H. C. & CULLEN, P. J. 2017. The emerging role of retromer in neuroprotection. *Curr Opin Cell Biol*, 47, 72-82.

- MIURA, E., HASEGAWA, T., KONNO, M., SUZUKI, M., SUGENO, N., FUJIKAKE, N., GEISLER, S., TABUCHI, M., OSHIMA, R., KIKUCHI, A., BABA, T., WADA, K., NAGAI, Y., TAKEDA, A. & AOKI, M. 2014. VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of alpha-synuclein and exacerbates neurotoxicity in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 71, 1-13.
- MUNSIE, L. N., MILNERWOOD, A. J., SEIBLER, P., BECCANO-KELLY, D. A., TATARNIKOV, I., KHINDA, J., VOLTA, M., KADGIEN, C., CAO, L. P., TAPIA, L., KLEIN, C. & FARRER, M. J. 2015. Retromer-dependent neurotransmitter receptor trafficking to synapses is altered by the Parkinson's disease VPS35 mutation p.D620N. *Hum Mol Genet*, 24, 1691-703.
- NASCIMBENI, A. C., GIORDANO, F., DUPONT, N., GRASSO, D., VACCARO, M. I., CODOGNO, P. & MOREL, E. 2017. ER-plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis. *EMBO J*, 36, 2018-2033.
- NIXON, R. A. 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 19, 983-97.
- NODA, T. 2017. Autophagy in the context of the cellular membrane-trafficking system: the enigma of Atg9 vesicles. *Biochem Soc Trans*, 45, 1323-1331.
- NODA, T., KIM, J., HUANG, W. P., BABA, M., TOKUNAGA, C., OHSUMI, Y. & KLIONSKY, D. J. 2000. Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol*, 148, 465-80.
- NORRIS, A., TAMMINENI, P., WANG, S., GERDES, J., MURR, A., KWAN, K. Y., CAI, Q. & GRANT, B. D. 2017. SNX-1 and RME-8 oppose the assembly of HGRS-1/ESCRT-0 degradative microdomains on endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E307-E316.
- OBARA, K., SEKITO, T., NIIMI, K. & OHSUMI, Y. 2008. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J Biol Chem*, 283, 23972-80.
- ORSI, A., RAZI, M., DOOLEY, H. C., ROBINSON, D., WESTON, A. E., COLLINSON, L. M. & TOOZE, S. A. 2012. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 23, 1860-73.
- PIHLSTROM, L., AXELSSON, G., BJORNARA, K. A., DIZDAR, N., FARDELL, C., FORSGREN, L., HOLMBERG, B., LARSEN, J. P., LINDER, J., NISSBRANDT, H., TYSNES, O. B., OHMAN, E., DIETRICH, E. & TOFT, M. 2013. Supportive evidence for 11 loci from genome-wide association studies in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 34, 1708 e7-13.
- POEHLGAARD, J. & DOUTHWAITE, S. 2005. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 3, 870-81.
- POLSON, H. E., DE LARTIGUE, J., RIGDEN, D. J., REEDIJK, M., URBE, S., CLAGUE, M. J. & TOOZE, S. A. 2010. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, 6, 506-22.
- POPOFF, V., MARDONES, G. A., BAI, S. K., CHAMBON, V., TENZA, D., BURGOS, P. V., SHI, A., BENAROCHE, P., URBE, S., LAMAZE, C., GRANT, B. D., RAPOSO, G. & JOHANNES, L. 2009. Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes. *Traffic*, 10, 1868-80.
- POPOVIC, D., AKUTSU, M., NOVAK, I., HARPER, J. W., BEHRENDT, C. & DIKIC, I. 2012. Rab GTPase-activating proteins in autophagy: regulation of endocytic

- and autophagy pathways by direct binding to human ATG8 modifiers. *Mol Cell Biol*, 32, 1733-44.
- PURI, C., RENNA, M., BENTO, C. F., MOREAU, K. & RUBINSZTEIN, D. C. 2013. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*, 154, 1285-99.
- QUADRI, M., BREEDVELD, G. J., CHANG, H. C., YEH, T. H., GUEDES, L. C., TONI, V., FABRIZIO, E., DE MARI, M., THOMAS, A., TASSORELLI, C., ROOD, J. P., SADDI, V., CHIEN, H. F., KIEVIT, A. J., BOON, A. J., STOCCHI, F., LOPIANO, L., ABBRUZZESE, G., CORTELLI, P., MECO, G., COSSU, G., BARBOSA, E. R., FERREIRA, J. J., INTERNATIONAL PARKINSONISM GENETICS, N., LU, C. S. & BONIFATI, V. 2017. Mutations in TMEM230 are not a common cause of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 32, 302-304.
- RAJPUT, A., ROSS, J. P., BERNALES, C. Q., RAYAPROLU, S., SOTO-ORTOLAZA, A. I., ROSS, O. A., VAN GERPEN, J., UITTI, R. J., WSZOLEK, Z. K., RAJPUT, A. H. & VILARINO-GUELL, C. 2015. VPS35 and DNAJC13 disease-causing variants in essential tremor. *Eur J Hum Genet*, 23, 887-8.
- REGGIORI, F., TUCKER, K. A., STROMHAUG, P. E. & KLIONSKY, D. J. 2004. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell*, 6, 79-90.
- ROSS, O. A., BRAITHWAITE, A. T., SKIPPER, L. M., KACHERGUS, J., HULIHAN, M. M., MIDDLETON, F. A., NISHIOKA, K., FUCHS, J., GASSER, T., MARAGANORE, D. M., ADLER, C. H., LARVOR, L., CHARTIER-HARLIN, M. C., NILSSON, C., LANGSTON, J. W., GWINN, K., HATTORI, N. & FARRER, M. J. 2008. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol*, 63, 743-50.
- RUSSELL, R. C., TIAN, Y., YUAN, H., PARK, H. W., CHANG, Y. Y., KIM, J., KIM, H., NEUFELD, T. P., DILLIN, A. & GUAN, K. L. 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 15, 741-50.
- SCHAAF, M. B., KEULERS, T. G., VOOIJS, M. A. & ROUSCHOP, K. M. 2016. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J*, 30, 3961-3978.
- SEAMAN, M. N., GAUTREAU, A. & BILLADEAU, D. D. 2013. Retromer-mediated endosomal protein sorting: all WASHed up! *Trends Cell Biol*, 23, 522-8.
- SEVLEVER, D., JIANG, P. & YEN, S. H. 2008. Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of alpha-synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species. *Biochemistry*, 47, 9678-87.
- SHI, A., SUN, L., BANERJEE, R., TOBIN, M., ZHANG, Y. & GRANT, B. D. 2009. Regulation of endosomal clathrin and retromer-mediated endosome to Golgi retrograde transport by the J-domain protein RME-8. *EMBO J*, 28, 3290-302.
- SIDRANSKY, E. & LOPEZ, G. 2012. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol*, 11, 986-98.
- SIMONETTI, B., DANSON, C. M., HEESOM, K. J. & CULLEN, P. J. 2017. Sequence-dependent cargo recognition by SNX-BARs mediates retromer-independent transport of CI-MPR. *J Cell Biol*, 216, 3695-3712.
- SORENG, K., MUNSON, M. J., LAMB, C. A., BJORN DAL, G. T., PANKIV, S., CARLSSON, S. R., TOOZE, S. A. & SIMONSEN, A. 2018. SNX18 regulates ATG9A trafficking from recycling endosomes by recruiting Dynamin-2. *EMBO Rep*, 19.
- SPELLANTINI, M. G., CROWTHER, R. A., JAKES, R., CAIRNS, N. J., LANTOS, P. L. & GOEDERT, M. 1998. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple

- system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*, 251, 205-8.
- TANG, F. L., ERION, J. R., TIAN, Y., LIU, W., YIN, D. M., YE, J., TANG, B., MEI, L. & XIONG, W. C. 2015. VPS35 in Dopamine Neurons Is Required for Endosome-to-Golgi Retrieval of Lamp2a, a Receptor of Chaperone-Mediated Autophagy That Is Critical for alpha-Synuclein Degradation and Prevention of Pathogenesis of Parkinson's Disease. *J Neurosci*, 35, 10613-28.
- TANIK, S. A., SCHULTHEISS, C. E., VOLPICELLI-DALEY, L. A., BRUNDEN, K. R. & LEE, V. M. 2013. Lewy body-like alpha-synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *J Biol Chem*, 288, 15194-210.
- TEJERA-PARRADO, C., JESUS, S., LOPEZ-RUIZ, A., BUIZA-RUEDA, D., BONILLA-TORIBIO, M., BERNAL-BERNAL, I., PERINAN, M. T., VARGAS-GONZALEZ, L., GOMEZ-GARRE, P. & MIR, P. 2018. TMEM230 in Parkinson's disease in a southern Spanish population. *PLoS One*, 13, e0197271.
- TIAN, Y., TANG, F. L., SUN, X., WEN, L., MEI, L., TANG, B. S. & XIONG, W. C. 2015. VPS35-deficiency results in an impaired AMPA receptor trafficking and decreased dendritic spine maturation. *Mol Brain*, 8, 70.
- TRINH, J., LOHMANN, K., BAUMANN, H., BALCK, A., BORSCHE, M., BRUGGEMANN, N., DURE, L., DEAN, M., VOLKMANN, J., TUNC, S., PRASUHN, J., PAWLACK, H., IMHOFF, S., LILL, C. M., KASTEN, M., BAUER, P., ROLFS, A., INTERNATIONAL PARKINSON'S DISEASE GENOMICS, C. & KLEIN, C. 2019. Utility and implications of exome sequencing in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 34, 133-137.
- TSIKA, E., GLAUSER, L., MOSER, R., FISER, A., DANIEL, G., SHEERIN, U. M., LEES, A., TRONCOSO, J. C., LEWIS, P. A., BANDOPADHYAY, R., SCHNEIDER, B. L. & MOORE, D. J. 2014. Parkinson's disease-linked mutations in VPS35 induce dopaminergic neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, 23, 4621-38.
- USENOVIC, M., TRESSE, E., MAZZULLI, J. R., TAYLOR, J. P. & KRAINIC, D. 2012. Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, alpha-synuclein accumulation, and neurotoxicity. *J Neurosci*, 32, 4240-6.
- VELIKKAKATH, A. K., NISHIMURA, T., OITA, E., ISHIHARA, N. & MIZUSHIMA, N. 2012. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell*, 23, 896-909.
- VILARINO-GUELL, C., RAJPUT, A., MILNERWOOD, A. J., SHAH, B., SZU-TU, C., TRINH, J., YU, I., ENCARNACION, M., MUNSIE, L. N., TAPIA, L., GUSTAVSSON, E. K., CHOU, P., TATARNIKOV, I., EVANS, D. M., PISHOTTA, F. T., VOLTA, M., BECCANO-KELLY, D., THOMPSON, C., LIN, M. K., SHERMAN, H. E., HAN, H. J., GUENTHER, B. L., WASSERMAN, W. W., BERNARD, V., ROSS, C. J., APPEL-CRESSWELL, S., STOESSL, A. J., ROBINSON, C. A., DICKSON, D. W., ROSS, O. A., WSZOLEK, Z. K., AASLY, J. O., WU, R. M., HENTATI, F., GIBSON, R. A., MCPHERSON, P. S., GIRARD, M., RAJPUT, M., RAJPUT, A. H. & FARRER, M. J. 2014. DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 23, 1794-801.
- VILARINO-GUELL, C., WIDER, C., ROSS, O. A., DACHSEL, J. C., KACHERGUS, J. M., LINCOLN, S. J., SOTO-ORTOLAZA, A. I., COBB, S. A., WILHOITE, G. J., BACON, J. A., BEHROUZ, B., MELROSE, H. L., HENTATI, E., PUSCHMANN, A., EVANS, D. M., CONIBEAR, E., WASSERMAN, W. W., AASLY, J. O., BURKHARD, P. R., DJALDETTI, R., GHICA, J., HENTATI, F., KRYGOWSKA-

- WAJS, A., LYNCH, T., MELAMED, E., RAJPUT, A., RAJPUT, A. H., SOLIDA, A., WU, R. M., UITTI, R. J., WSZOLEK, Z. K., VINGERHOETS, F. & FARRER, M. J. 2011. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89, 162-7.
- VOGIATZI, T., XILOURI, M., VEKRELLIS, K. & STEFANIS, L. 2008. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem*, 283, 23542-56.
- WANG, B. & KUNDU, M. 2017. Canonical and noncanonical functions of ULK/Atg1. *Curr Opin Cell Biol*, 45, 47-54.
- WANG, C., NIU, M., ZHOU, Z., ZHENG, X., ZHANG, L., TIAN, Y., YU, X., BU, G., XU, H., MA, Q. & ZHANG, Y. W. 2016. VPS35 regulates cell surface recycling and signaling of dopamine receptor D1. *Neurobiol Aging*, 46, 22-31.
- WANG, C. W., KIM, J., HUANG, W. P., ABELIOVICH, H., STROMHAUG, P. E., DUNN, W. A., JR. & KLIONSKY, D. J. 2001. Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J Biol Chem*, 276, 30442-51.
- WANG, J., FEDOSEIENKO, A., CHEN, B., BURSTEIN, E., JIA, D. & BILLADEAU, D. D. 2018. Endosomal receptor trafficking: Retromer and beyond. *Traffic*, 19, 578-590.
- WANG, W. 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 185, 129-88.
- WEI, Q., OU, R., ZHOU, Q., CHEN, Y., CAO, B., GU, X., ZHAO, B., WU, Y., SONG, W. & SHANG, H. F. 2018. TMEM230 Mutations Are Rare in Han Chinese Patients with Autosomal Dominant Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*, 55, 2851-2855.
- WEINREB, P. H., ZHEN, W., POON, A. W., CONWAY, K. A. & LANSBURY, P. T., JR. 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, 35, 13709-15.
- WILLIAMS, E. T., GLAUSER, L., TSIKA, E., JIANG, H., ISLAM, S. & MOORE, D. J. 2018. Parkin mediates the ubiquitination of VPS35 and modulates retromer-dependent endosomal sorting. *Hum Mol Genet*, 27, 3189-3205.
- WINSLOW, A. R., CHEN, C. W., CORROCHANO, S., ACEVEDO-ARZENA, A., GORDON, D. E., PEDEN, A. A., LICHTENBERG, M., MENZIES, F. M., RAVIKUMAR, B., IMARISIO, S., BROWN, S., O'KANE, C. J. & RUBINSZTEIN, D. C. 2010. alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol*, 190, 1023-37.
- WIRTH, M., JOACHIM, J. & TOOZE, S. A. 2013. Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol*, 23, 301-9.
- XHABIJA, B. & VACRATSI, P. O. 2015. Receptor-mediated Endocytosis 8 Utilizes an N-terminal Phosphoinositide-binding Motif to Regulate Endosomal Clathrin Dynamics. *J Biol Chem*, 290, 21676-89.
- YAMAMOTO, H., KAKUTA, S., WATANABE, T. M., KITAMURA, A., SEKITO, T., KONDO-KAKUTA, C., ICHIKAWA, R., KINJO, M. & OHSUMI, Y. 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol*, 198, 219-33.
- YANG, Z., HE, M., WANG, K., SUN, G., TANG, L. & XU, Z. 2014. Tumor suppressive microRNA-193b promotes breast cancer progression via targeting DNAJC13 and RAB22A. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 7563-70.
- YANG, Z. & KLIONSKY, D. J. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12, 814-22.

- YLA-ANTTILA, P., VIHINEN, H., JOKITALO, E. & ESKELINEN, E. L. 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 5, 1180-5.
- YOSHIDA, S., HASEGAWA, T., SUZUKI, M., SUGENO, N., KOBAYASHI, J., UEYAMA, M., FUKUDA, M., IDO-FUJIBAYASHI, A., SEKIGUCHI, K., EZURA, M., KIKUCHI, A., BABA, T., TAKEDA, A., MOCHIZUKI, H., NAGAI, Y. & AOKI, M. 2018. Parkinson's disease-linked DNAJC13 mutation aggravates alpha-synuclein-induced neurotoxicity through perturbation of endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*, 27, 823-836.
- YOUNG, A. R., CHAN, E. Y., HU, X. W., KOCHL, R., CRAWSHAW, S. G., HIGH, S., HAILEY, D. W., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & TOOZE, S. A. 2006. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*, 119, 3888-900.
- ZACHARI, M. & GANLEY, I. G. 2017. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*, 61, 585-596.
- ZAVODSZKY, E., SEAMAN, M. N., MOREAU, K., JIMENEZ-SANCHEZ, M., BREUSEGEM, S. Y., HARBOUR, M. E. & RUBINSZTEIN, D. C. 2014. Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat Commun*, 5, 3828.
- ZERIAL, M. & MCBRIDE, H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 107-17.
- ZHANG, D., ISACK, N. R., GLODOWSKI, D. R., LIU, J., CHEN, C. C., XU, X. Z., GRANT, B. D. & RONGO, C. 2012a. RAB-6.2 and the retromer regulate glutamate receptor recycling through a retrograde pathway. *J Cell Biol*, 196, 85-101.
- ZHANG, Y., GRANT, B. & HIRSH, D. 2001. RME-8, a conserved J-domain protein, is required for endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, 12, 2011-21.
- ZHANG, Y. Q., HENDERSON, M. X., COLANGELO, C. M., GINSBERG, S. D., BRUCE, C., WU, T. & CHANDRA, S. S. 2012b. Identification of CSPalpha clients reveals a role in dynamin 1 regulation. *Neuron*, 74, 136-50.
- ZHOU, C., MA, K., GAO, R., MU, C., CHEN, L., LIU, Q., LUO, Q., FENG, D., ZHU, Y. & CHEN, Q. 2017. Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. *Cell Res*, 27, 184-201.

8. Anhang

8.1. Plasmid-Karten

8.1.1. pEF-Bos-DNAJC13-FLAG

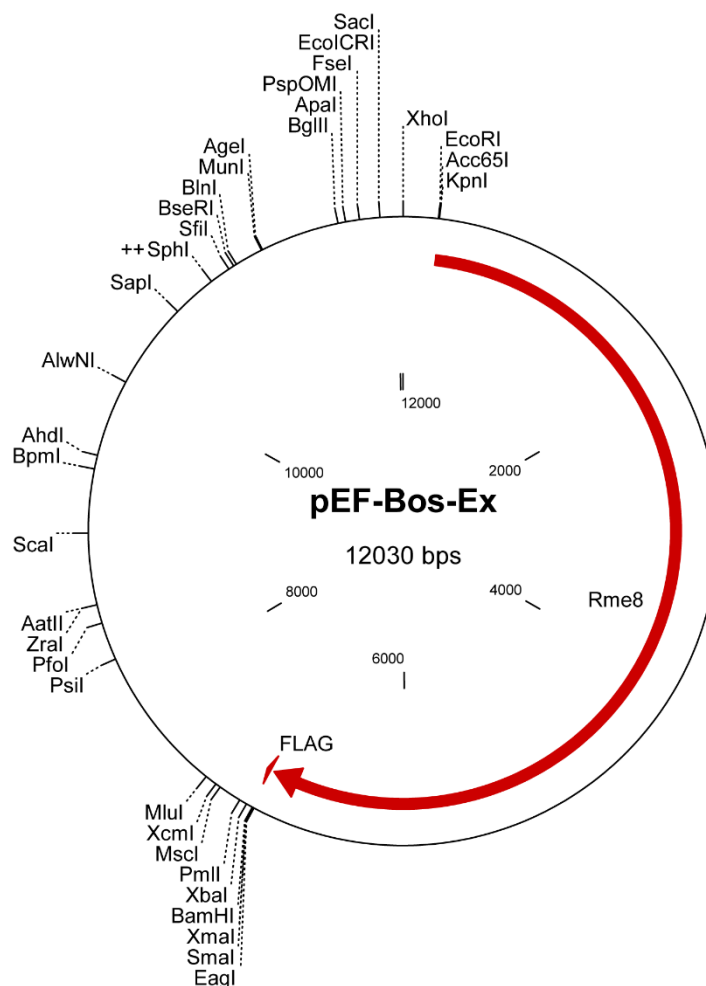


Abbildung 30: Vektorkarte des wildtypischen DNAJC13 im Vektor pEF-Bos mit FLAG-Markierung

```

CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGAT
GGAGTTTCCCCACACTGATGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTT
GATGTAATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCA
AGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAGGAAT
TCGGTACCATGAACATAATTAGGGAAAATAAGGATCTGGCATGTTTCTACACAAC
AAACATTCATGGAGGGGGAAGTATAAGCGTGTCTTTTCAGTTGGAACATCATGC
GATTACTACATATAATCCCAATACCTTAGAAGTAACAAATCAGTGGCCTTATGGA
GACATTTGCAGCATCAGCCCTGTTGGAAAAGGACAAGGAACGGAGTTCAACCTC
ACATTTGTAAAGGCAGTGGAAAAAGTCAGAACTTTAAAATTTTCTACAGAGCA
CAGAACAGAACTTCTTACAGAAGCATTGAGATTTAGAACTGATTTTTTCAGAGGGA
AAAATCACAGGAAGGAGATACAACCTGCTATAAGCATCACTGGAGTGACTCAAGA
AAACCTGTAATTTTGGAAAGTAACTCCAGGAGGCTTTGACCAAATTAATCCTGCAA
CCAACAGAGTACTCTGTTCCCTATGACTATAGAAATATTGAAGGATTTGTAGATCT
CTCAGATTATCAAGGAGGATTTTGTATACTTTATGGAGGATTTAGTAGATTGCAT
TTATTTGCGTCAGAGCAAAGAGAAGAGATTATTAAGAGTGCAATAGACCATGCTG

```

GTA ACTACATAGGTATTTTCATTGCGGATCAGGAAAGAGCCTTTAGAAATTCGAGCA
ATATTTGAATCTTCGCTTTGGAAAATACAGCACTGATGAATCCATCACATCTTTAG
CAGAGTTTGTAGTCCAAAAAATATCACCTAGACATTTCGGAGCCTGTTAAAAGAGT
TCTAGCACTTACAGAAACATGTTTAGTAGAACGTGATCCGGCAACCTATAATATT
GCAACATTGAAGCCTTTAGGAGAAGTATTTGCGTTGGTCTGTGACTCAGAAAAT
CCACAACCTTTTACCATTGAATTTATAAAAGGGCAAGTACGGAAATATTCTTCAAC
AGAGAGAGATTCCCTTATTAGCAAGTTTGCTGGATGGAGTAAGAGCCTCTGGTAA
TAGAGATGTTTGTGTAAAAATGACACCAACCCATAAAGGTCAGCGATGGGGGTT
ACTCAGCATGCCTGTTGATGAGGAAGTAGAGAGCCTTCACCTCAGGTTCTTAGC
TACGCCCTCCAAATGGCAACTTTGCAGATGCTGTATTTCAGGTTCAATGCTAATATT
TCATACAGTGGAGTCCTACATGCAGTAACACAGGATGGTCTCTTCTCAGAAAAC
AAAGAAAACTGATCAATAATGCCATAACAGCATTACTGTCCCAAGAAGGGGAT
GTCGTTGCTTCAAATGCGGAACTTGAGAGTCAGTTCCAGGCTGTGAGGAGGCTT
GTGGCATCCAAAGCTGGTTTCCTGGCTTTCACTCAGCTTCCAAAGTTTCGCGAG
CGTCTAGGGGTGAAGGTAGTAAAAGCACTCAAAGAAGCAACAACGGAATAATC
CATGCAGCAGTTGATATGCTTTGTGCCCTTATGTGTCCCATGCATGATGACTATG
ACTTAAGACAAGAACAGTTGAACAAAGCTTCTCTTCTCTCGTCAAAGAAGTTTCT
GGAAACTTACTGGAGAAATTTAATTCCTATGTGGATCATGGGACTGGTGCCCT
AGTTATTAGTTTCGCTCTTGGACTTCCTTACCTTTGCCCTCTGTGCTCCATATAGT
GAGACAACCTGAAGGGCAGCAGTTTGTATGCTCTTGGAGATGGTAGCATCCAAT
GGAAGAACCCTTTTTAACTTTTTTCAGCATCCTTCCATGGCAATAATAAAAGGAG
CTGGGTTGGTTATGAAGGCAATAATAGAGGAAGGTGATAAAGAAATTGCTACAA
AAATGCAGGAGCTTGCCCTAAGTGAAGGTGCCTTACCTCGACACTTGCATACTG
CGATGTTTACAATAAGCTCAGATCAAAGGATGCTTACAAATAGACAGCTAAGTAG
ACATTTAGTGGGACTCTGGACAGCTGATAATGCAACTGCAACAACTTGTTGAAA
CGCATTTTGCCGCCAGGCTTGCTGGCATACTTGGAAAGCTCAGATCTCGTACCT
GAGAAGGATGCTGATCGGATGCATGTTAGAGACAATGTGAAAATAGCAATGGAT
CAGTATGAAAATTTAATAAAGTTCCAGAGTGGCAAAGACTAGCTGGAAAAGCT
GCTAAAGAAGTTGAAAAATTTGCCAAAGAAAAAGTGGATCTTGTATTGATGCACT
GGAGGGATAGGATGGGCATTGCTCAAAAAGAGAATATAAATCAGAAGCCAGTG
GTTCTTCGAAAGAGAAGACAAAGAATAAAAAATAGAAGCAAATTGGGATCTCTTCT
ATTATAGGTTTGGTCAAGACCATGCCAGGTCAAACCTTATTTGGAATTTCAAAC
ACGAGAAGA ACTGAAAGATACTCTTGAATCTGAAATGAGAGCATTTAATATTGAC
AGAGA ACTTGGAAAGTGCAAATGTGATCTCCTGGAACCACCATGAGTTTGGAGTT
AAATATGAGTGCCTGGCAGAGGAAATTTAAAATAGGAGACTATTACCTGAGACTA
CTATTGGAGGAAGATGAGAATGAAGAAAGTGGATCAATTAAGAGATCGTATGAA
TTTTTCAATGAGCTTTATCATCGCTTCTTGCTCACCCCAAAGTAAACATGAAGT
GTTTATGTTTACAAGCCCTTGCTATTGTTTATGGCAGATGTCACGAAGAAATAGG
ACCTTTTACAGATACCAGATATATCATTGGAATGTTAGAGAGGTGCACAGATAAA
CTTGAACGAGATAGGTTGATTCTTCTTCTTAACAAGTTGATCCTTAATAAGAAAA
ATGTTAAGGATCTCATGGATTCAAATGGAATAAGAATCCTTGTGGACTTGCTTAC
CCTTGCACATCTCCATGTAAGCCGAGCTACAGTACCACTGCAAAGCAATGTAAT
TGAAGCTGCTCCAGATATGAAAAGAGAGAGTGAAGAAGGAATGGTATTTTGGCAA
CGCAGACAAAGAAAGGAGTGGCCCGTATGGATTTTATGAGATGCAAGAATTGTG
GACCAAAGGAATGTTAAATGCAAAAACCAGATGCTGGGCTCAAGGCATGGATGG
ATGGCGACCACTTCAGTCCATACCCAGCTTAAGTGGTGTCTCTTAGCCAGTGG
ACAGGCTGTCTGAATGAACTGACCTTGCTACCCTTATATTGAACATGTTGATC
ACAATGTGTGGATATTTTCCAAGCAGGGATCAAGACAATGCCATCATTCCGGCCT
CTACCCAAAGTGAAAAGACTGCTGTGAGATAGCACTTGCCTTCCCATATTATTC
AGCTACTGCTGACCTTTGACCCTATCCTTGTGAGAAGGTTGCTATTTTGTATA
CCATATCATGCAAGATAACCCACAGTTACCCCGCCTTTATCTGAGTGGAGTATTT

TTCTTTATCATGATGTACACAGGTTCCAATGTGCTTCCTGTTGCTCGATTTTTGAA
ATACACACATAACCAACAGGCTTTCAAGTCAGAAGAGACAAAAGGACAAGATATT
TTTCAGAGAAGTATACTTGGGCACATTCTACCTGAAGCAATGGTTTGTACTTAG
AAAATTATGAACCTGAAAAGTTTTCTGAGATTTTTCTAGGAGAATTTGATACTCCA
GAAGCAATCTGGAGCAGTGAAATGAGGCGCCTGATGATAGAGAAGATTGCTGC
CCATCTCGCGGATTTACACCTCGTCTTCAGAGTAACACAAGAGCACTTTATCA
GTATTGCCCCATTCTATAATCAACTATCCACAACCTCGAAAATGAACTATTTTTGTA
ATATTTATTACCTCAAACAACCTGTGTGATACACTCCGGTTTCCAGATTGGCCAAT
TAAAGACCCGGTTAAGCTTCTAAAAGATACCCTTGATGCCTGGAAGAAAGAAGT
AGAAAAGAAGCCACCTATGATGTCAATAGATGATGCTTATGAAGTGCTTAATCTG
CCTCAAGGACAGGGACCGCATGATGAGAGCAAGATTAGGAAAGCTTACTTCAGA
CTTGCACAAAAGTACCACCCTGATAAGAATCCAGAAGGGAGGGACATGTTTGAA
AAAGTAAATAAAGCATATGAATTTTTATGTACCAAATCAGCAAAAATAGTGGATG
GGCCAGATCCAGAGAATATAATTTTAATTCTAAAACACAGAGCATCCTCTTCAA
CCGTCATAAAGAAGATTTACAGCCTTATAAATATGCAGGATACCCCATGCTTATT
CGGACTATAACAATGGAACTTCAGATGACCTCCTTTTTCTCAAAGAATCACCAT
TGTTGCCTGCGGCTACAGAGCTAGCTTTCCATACTGTCAACTGTTGAGCCCTCA
ATGCTGAAGAGCTCAGAAGAGAGAATGGACTAGAGGTGTTACAAGAGGCATTTA
GTCGCTGTGTGGCTGTCTTGACTCGTGCTAGTAAACCAAGTGACATGTCAGTAC
AGGTGTGTGGATACATAAGTAAATGCTACAGTGTGGCTGCTCAGTTTGAGGAAT
GCCGAGAGAAGATCACGGAAATGCCTAGCATCATCAAGGATCTCTGTCTGGGTA
CTATATTTTGGCAAGAGTATCCCCGCGTAGCTGCTCTTGGGGTAGAATGTGTC
AGTTCTTTTGCTGTGGATTTCTGGCTACAGACACACCTATTTGAGGCTGGAATTT
TGTGGTATCTCCTTGGTTTTCTGTTTAATTATGACTACACACTAGAAGAGAGTGG
CATTGAGAAAAGTGAAGAAACAAACCAGCAGGAGGTAGCAAACAGCCTTGCCAA
ACTGAGTGTCCATGCTCTGAGTCGCCTTGGAGGGTATTTGGCTGAAGAACAAGC
AACTCCAGAAAATCCAACCATAAGGAAAAGCTTAGCTGGCATGCTGACACCCTA
TGTTGCTAGAAAACCTTGTGTGGCTAGTGTGACTGAGATTTTGAAGATGCTTAAC
AGCAACACAGAAAGTCCATATTTGATATGGAACAATTCTACAAGAGCAGAATTAC
TTGAATTTCTTGAATCCCAACAAGAAAACATGATTAAAAAAGGTGATTGTGACAA
AACTTATGGATCAGAATTTGTCTACAGTGATCATGCCAAAGAACTTATTGTAGGG
GAGATTTTTGTTAGGGTGTATAATGAAGTTCTACTTTCCAACCTGGAGGTTCCAA
AAGCATTTGCTGCAAGTCTCTTGGATTATATAGGCTCGCAGGCCCAATACTTGC
ACACATTCATGGCCATCACACACGCGGCAAAAGTGGAGTCAGAGCAACATGGA
GATCGCTTACCGAGAGTAGAAATGGCTTTGGAGGCTCTGAGAAATGTCATAAAA
TACAATCCAGGTTCTGAGAGTGAATGCATTGGGCACTTTAAGTTGATATTTTTCTC
TTCTCCGAGTTCATGGAGCTGGTCAAGTGCAGCAGTTGGCTTTAGAGGTTGTGA
ATATAGTGACATCTAACCAAGACTGTGTCAACAATATTGCTGAATCAATGGTTTT
GTCCAGTTTATTGGCTCTTCTACATTCATTGCCATCAAGTCGTCAGCTTGTTCTG
GAACTCTTTATGCTTTGACATCGAGTACAAAATAATCAAAGAAGCAATGGCAA
AGGGTGCTTTGATCTATTTACTGGATATGTTCTGCAATTCAACACATCCACAGGT
TCGAGCCCAAACAGCAGAACTTTTTGCCAAAATGACAGCAGATAAACTGATAGG
TCCAAAGGTTCGAATTACGTTAATGAAATTTCTACCAAGCGTTTTTCATGGATGCT
ATGAGAGACAATCCTGAAGCTGCTGTACATATTTTTGAAGGAACTCATGAAATC
CTGAGTTAATTTGGAATGATAATTCCAGAGATAAAGTGTCCACAACAGTTAGGGA
AATGATGCTAGAGCACTTTAAAATCAGCAGGACAACCCTGAGGCCAACTGGAA
GTTGCCTGAAGATTTTGTGTGGTGTGTTGGAGAAGCAGAGGGTGAACCTTGCTGT
TGGAGGAGTCTTCTTGAGGATCTTTATTGCACAACCAGCCTGGGTTCTAAGAAA
GCCTAGAGAATTTCTTATTGCCCTGTTAGAAAAATTAAGTACTGAGCTCCTAGAGAAG
AACAACTCTCATGGAGAACTCTGGAAACCTTGACAATGGCAACAGTGTGTCTC
TTCAGCGCACAACTCAGCTGGCAGATCAGGTCCCGCCATTGGGCCATCTTCC

CAAAGTTATCCAGGCAATGAATCATAGGAACAATGCCATTCCCTAAGAGTGCCATT
CGGGTTATCCATGCCTTGTCTGAAAATGAGCTGTGTGTTTCGAGCCATGGCATCT
TTAGAGACCATTGGCCCACTGATGAATGGAATGAAAAAGCGAGCAGATACTGTT
GGTCTAGCCTGTGAAGCAATTAATCGAATGTTTCAGAAGGAGCAGAGTGAATTA
GTAGCACAAGCCCTGAAAGCAGATTTGGTTCCATACCTCTTAAAATTACTCGAAG
GCATTGGCCTTGAAAACCTGGACAGCCCAGCAGCCACTAAGGCTCAGATTGTTA
AAGCTCTCAAGGCAATGACTCGAAGTTTGCAGTATGGAGAACAGGTGAATGAAA
TCCTGTGCCGTTCTTCAGTCTGGAGTGCCTTCAAAGATCAGAAACATGATTTGTT
CATTTCTGAGTCACAAACAGCAGGATACCTCACAGGACCTGGAGTTGCTGGCTA
CCTTACCGCAGGTACATCTACATCAGTCATGTCTAACCTGCCACCTCCTGTAGA
CCATGAGGCAGGCGACCTTGGCTATCAGACTCACCGGCCGCCCGGGGATCCG
ATCATGGACTACAAGGATGACGATGACAAATAATCTAGAGTGAGGGTCCCCACC
TGGGACCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCCACGTGGGAGACAAGAAATCCCTGTTT
AATATTTAAACAGCAGTGTTCCTCATCTGGGTCTTGCACCCCTCACTCTGGCC
TCAGCCGACTGCACAGCGGCCCTGCATCCCCTTGGCTGTGAGGCCCTGGAC
AAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGGGTCCCACGAATTTG
CTGGGAATCTCGTTTTTCTTCTTAAGACTTTTGGGACATGGTTTACTCCCGAA
CATCACCGACGCGTCTCCTGTTTTTCTGGGTGGCCTCGGGACACCTGCCCTGC
CCCCACGAGGGTCAGGACTGTGACTCTTTTTAGGGCCAGGCAGGTGCCTGGAC
ATTTGCCTTGCTGGACGGGGACTGGGGATGTGGGAGGGAGCAGACAGGAGGA
ATCATGTCAGGCCTGTGTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCACCCTCCACCTCTTC
ACCCCCACTCACAGTGTCCCCTCCACTGTCACATTGTAACCTGAACCTTCAGGA
TAATAAAGTGCTTGCCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAGAATTAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG
GCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTA
ATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAAT
GGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCA
CACCGCATACTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCC
TAGCGCCCCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCT
TTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTT
TACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGC
CATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAA
TAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCT
TTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGA
TTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGT
GCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACC
CGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCT
TACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTTACC
GTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATA
GGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGA
AATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCC
TTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCT
TGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG
CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAA
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAT
GAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG

AGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTT
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG
CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACT
CTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGA
CCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATT
TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT
TCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCAC
CGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA
AGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTC
TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGGCGCAGCGGTGGGGCTGAACG
GGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCT
CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA
AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTG
CTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC
CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAG
CGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC
AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT
ACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTAATTCCCT
CCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAG
TCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCAT
TCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCC
TCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGC
TTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTG
CAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTCGTGAGGCTCCGGTGC
CCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGA
GGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGG
AAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCG
TATATAAGTGAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCC
AGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGG
TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTT
GATCCCGAGCTTCCGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTA
AGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGC
CGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAA
GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAA
GATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGG
GCCGCGGGCGGGCAGCGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGG
CGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTG
GCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTG
GGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCG

CTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGGCGCTCGGGAG
 AGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCC
 GTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA
 GTT

8.1.2. pEF-Bos-DNAJC13-GFP

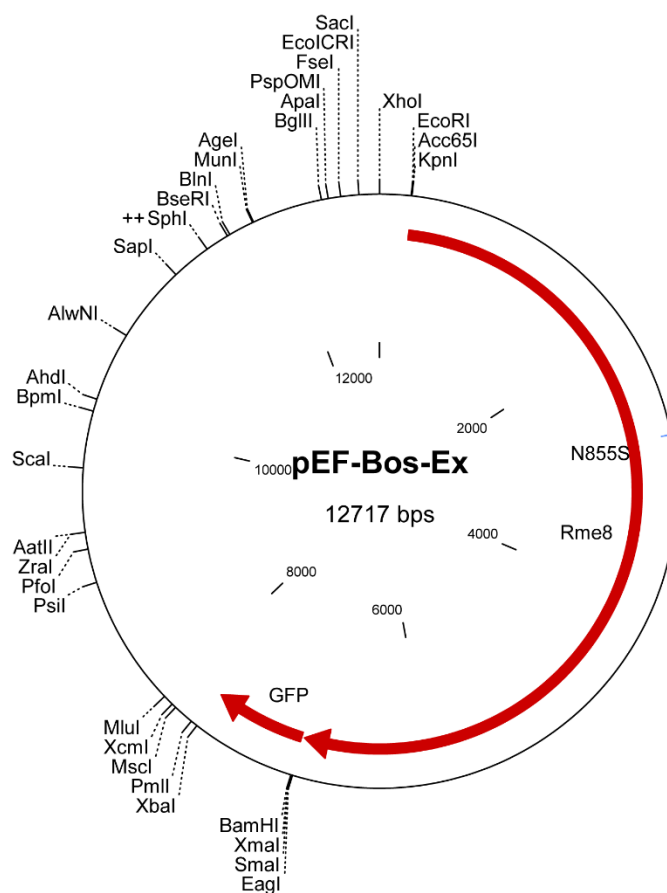


Abbildung 31: Vektorkarte des wildtypischen DNAJC13 im Vektor pEF-Bos mit GFP-Markierung

CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGAT
 GGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACT
 TGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC
 AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAGGAA
 TTCGGTACCATGAACATAATTAGGGAAAATAAGGATCTGGCATGTTTCTACACAA
 CAAAACATTCATGGAGGGGGAAGTATAAGCGTGTCTTTTCAGTTGGAACATCATG
 CGATTACTACATATAATCCCAATACCTTAGAAGTAACAAATCAGTGGCCTTATGG
 AGACATTTGCAGCATCAGCCCTGTTGGAAAAGGACAAGGAACGGAGTTCAACCT
 CACATTTTCGTAAAGGCAGTGGAAAAAAGTCAGAACTTTAAAATTTTCTACAGAG
 CACAGAACAGAACTTCTTACAGAAGCATTGAGATTTAGAACTGATTTTTTCAGAGG
 GAAAAATCACAGGAAGGAGATACAACCTGCTATAAGCATCACTGGAGTGACTION
 GAAAACCTGTAATTTTGAAGTAACTCCAGGAGGCTTTGACCAAATTAATCCTGC
 AACCAACAGAGTACTCTGTTCCCTATGACTATAGAAATATTGAAGGATTTGTAGAT
 CTCTCAGATTATCAAGGAGGATTTTGTATACTTTATGGAGGATTTAGTAGATTGC
 ATTTATTTGCGTCAGAGCAAAGAGAAGAGATTATTAAGTGAATAGACCATGC

TGGTAACTACATAGGTATTTTCATTGCGGATCAGGAAAGAGCCTTTAGAATTCGAG
CAATATTTGAATCTTCGCTTTGGAAAATACAGCACTGATGAATCCATCACATCTTT
AGCAGAGTTTGTAGTCCAAAAAATATCACCTAGACATTCGGAGCCTGTAAAAGA
GTTCTAGCACTTACAGAAACATGTTTAGTAGAACGTGATCCGGCAACCTATAATA
TTGCAACATTGAAGCCTTTAGGAGAAGTATTTGCGTTGGTCTGTGACTCAGAAAA
TCCACAACTTTTTACCATTGAATTTATAAAAGGGCAAGTACGGAAATATTCTTCAA
CAGAGAGAGATTCTTATTAGCAAGTTTGCTGGATGGAGTAAGAGCCTCTGGTA
ATAGAGATGTTTGTGTAAAAATGACACCAACCCATAAAGGTCAGCGATGGGGGT
TACTCAGCATGCCTGTTGATGAGGAAGTAGAGAGCCTTCACCTCAGGTTCTTAG
CTACGCCTCCAAATGGCAACTTTGCAGATGCTGTATTAGGTTCAATGCTAATAT
TTCATACAGTGGAGTCCTACATGCAGTAACACAGGATGGTCTCTTCTCAGAAAA
CAAAGAAAACTGATCAATAATGCCATAACAGCATTACTGTCCCAAGAAGGGGA
TGTCGTTGCTTCAAATGCGGAACCTTGAGAGTCAGTTCCAGGCTGTGAGGAGGCT
TGTGGCATCCAAAGCTGGTTTTCTGGCTTTCACTCAGCTTCCAAAGTTTCGCGA
GCGTCTAGGGGTGAAGGTAGTAAAAGCACTCAAAGAAGCAACAACGGAATAAT
CCATGCAGCAGTTGATATGCTTTGTGCCCTTATGTGTCCCATGCATGACTAT
GACTTAAGACAAGAACAGTTGAACAAAGCTTCTCTTCTCTCGTCAAAGAAGTTTC
TGAAAACTTACTGGAGAAATTTAATTCCCATGTGGATCATGGGACTGGTGCCC
TAGTTATTAGTTCGCTCTTGGACTTCTTACCTTTGCCCTCTGTGCTCCATATAG
TGAGACAACCTGAAGGGCAGCAGTTTATGATGCTCTTGGAGATGGTAGCATCCAA
TGGAAGAACCCTTTTTAAACTTTTTTCAGCATCCTTCCATGGCAATAATAAAGGA
GCTGGGTTGGTTATGAAGGCAATAATAGAGGAAGGTGATAAAGAAATTGCTACA
AAAATGCAGGAGCTTGCCCTAAGTGAAGGTGCCCTTACCTCGACACTTGCATACT
GCGATGTTTACAATAAGCTCAGATCAAAGGATGCTTACAATAGACAGCTAAGTA
GACATTTAGTGGGACTCTGGACAGCTGATAATGCAACTGCAACAACTTGTGTA
AACGCATTTTGCCGCCAGGCTTGCTGGCATACTTGGAAAGCTCAGATCTCGTAC
CTGAGAAGGATGCTGATCGGATGCATGTTAGAGACAATGTGAAAATAGCAATGG
ATCAGTATGGAAAATTTAATAAAGTTCCAGAGTGGCAAAGACTAGCTGGAAAAG
CTGCTAAAGAAGTTGAAAAATTTGCCAAAGAAAAAGTGGATCTTGTATTGATGCA
CTGGAGGGATAGGATGGGCATTGCTCAAAAAGAGAATATAAATCAGAAGCCAGT
GTTCTTTCGAAAGAGAAGACAAAGAATAAAAATAGAAGCAAATTGGGATCTCTTC
TATTATAGTTTTGGTCAAGACCATGCCAGGTCAAACCTTATTTGGAATTTCAAAA
CACGAGAAGAACTGAAAGATACTCTTGAATCTGAAATGAGAGCATTTAATATTGA
CAGAGAACCTTGAAGTGCAAATGTGATCTCCTGGAACCACCATGAGTTTGAGGT
TAAATATGAGTGCCTGGCAGAGGAAATTAATAAGGAGACTATTACCTGAGACTA
CTATTGGAGGAAGATGAGAATGAAGAAAGTGGATCAATTAAGAGATCGTATGAA
TTTTTCAATGAGCTTTATCATCGCTTCTTGCTCACCCCAAAGTAAACATGAAGT
GTTTATGTTTACAAGCCCTTGCTATTGTTTATGGCAGATGTCACGAAGAAATAGG
ACCTTTTACAGATACCAGATATATCATTGGAATGTTAGAGAGGTGCACAGATAAA
CTTGAACGAGATAGGTTGATTCTCTTCTTAACAAGTTGATCCTTAATAAGAAAA
ATGTTAAGGATCTCATGGATTCAAATGGAATAAGAATCCTTGTGGACTTGCTTAC
CCTTGCACATCTCCATGTAAGCCGAGCTACAGTACCACTGCAAAGCAATGTAAT
TGAAGCTGCTCCAGATATGAAAAGAGAGAGTGAAGAAGGAATGGTATTTTGGCAA
CGCAGACAAAGAAAGGAGTGGCCCGTATGGATTTTATGAGATGCAAGAATTGTG
GACCAAAGGAATGTTAAATGCAAAAACCAGATGCTGGGCTCAAGGCATGGATGG
ATGGCGACCACTTCAGTCCATACCCAGCTTAAGTGGTGTCTCTTAGCCAGTGG
ACAGGCTGTCTGAATGAACTGACCTTGCTACCCTTATATTGAACATGTTGATC
ACAATGTGTGGATATTTTCCAAGCAGGGATCAAGACAATGCCATCATTCCGGCCT
CTACCCAAAGTGAAAAGACTGCTGTGAGATAGCACTTGCCTTCCCATATTATTC
AGCTACTGCTGACCTTTGACCCTATCCTTGTGAGAAGGTTGCTATTTTGTATA
CCATATCATGCAAGATAACCCACAGTTACCCCGCCTTTATCTGAGTGGAGTATTT

TTCTTTATCATGATGTACACAGGTTCCAATGTGCTTCCTGTTGCTCGATTTTTGAA
ATACACACATAACCAACAGGCTTTCAAGTCAGAAGAGACAAAAGGACAAGATATT
TTTCAGAGAAGTATACTTGGGCACATTCTACCTGAAGCAATGGTTTGTACTTAG
AAAATTATGAACCTGAAAAGTTTTCTGAGATTTTTCTAGGAGAATTTGATACTCCA
GAAGCAATCTGGAGCAGTGAAATGAGGCGCCTGATGATAGAGAAGATTGCTGC
CCATCTCGCGGATTTACACCTCGTCTTCAGAGTAACACAAGAGCACTTTATCA
GTATTGCCCCATTCTATAATCAACTATCCACAACCTCGAAAATGAACTATTTTTGTA
ATATTTATTACCTCAAACAACCTGTGTGATACACTCCGGTTTCCAGATTGGCCAAT
TAAAGACCCGGTTAAGCTTCTAAAAGATACCCTTGATGCCTGGAAGAAAGAAGT
AGAAAAGAAGCCACCTATGATGTCAATAGATGATGCTTATGAAGTGCTTAATCTG
CCTCAAGGACAGGGACCGCATGATGAGAGCAAGATTAGGAAAGCTTACTTCAGA
CTTGCACAAAAGTACCACCCTGATAAGAATCCAGAAGGGAGGGACATGTTTGAA
AAAGTAAATAAAGCATATGAATTTTTATGTACCAAATCAGCAAAAATAGTGGATG
GGCCAGATCCAGAGAATATAATTTTAATTCTAAAACACAGAGCATCCTCTTCAA
CCGTCATAAAGAAGATTTACAGCCTTATAAATATGCAGGATACCCCATGCTTATT
CGGACTATAACAATGGAACTTCAGATGACCTCCTTTTCTCAAAGAATCACCAT
TGTTGCCTGCGGCTACAGAGCTAGCTTTCCATACTGTCAACTGTTGAGCCCTCA
ATGCTGAAGAGCTCAGAAGAGAGAATGGACTAGAGGTGTTACAAGAGGCATTTA
GTCGCTGTGTGGCTGTCTTGACTCGTGCTAGTAAACCAAGTGACATGTCAGTAC
AGGTGTGTGGATACATAAGTAAATGCTACAGTGTGGCTGCTCAGTTTGAGGAAT
GCCGAGAGAAGATCACGGAAATGCCTAGCATCATCAAGGATCTCTGTGCGGTA
CTATATTTTGGCAAGAGTATCCCCGCGTAGCTGCTCTTGGGGTAGAATGTGTC
AGTTCTTTTGCTGTGGATTTCTGGCTACAGACACACCTATTTGAGGCTGGAATTT
TGTGGTATCTCCTTGGTTTTCTGTTTAATTATGACTACACACTAGAAGAGAGTGG
CATTGAGAAAAGTGAAGAAACAAACCAGCAGGAGGTAGCAAACAGCCTTGCCAA
ACTGAGTGTCCATGCTCTGAGTCGCCTTGGAGGGTATTTGGCTGAAGAACAAGC
AACTCCAGAAAATCCAACCATAAGGAAAAGCTTAGCTGGCATGCTGACACCCTA
TGTTGCTAGAAAACCTTGTGTGGCTAGTGTGACTGAGATTTTGAAGATGCTTAAC
AGCAACACAGAAAGTCCATATTTGATATGGAACAATTCTACAAGAGCAGAATTAC
TTGAATTTCTTGAATCCCAACAAGAAAACATGATTAATAAAGGTGATTGTGACAA
AACTTATGGATCAGAATTTGTCTACAGTGATCATGCCAAAGAACTTATTGTAGGG
GAGATTTTTGTTAGGGTGTATAATGAAGTTCTACTTTCCAACCTGGAGGTTCCAA
AAGCATTTGCTGCAAGTCTCTTGGATTATATAGGCTCGCAGGCCCAATACTTGC
ACACATTCATGGCCATCACACACGCGGCAAAAGTGGAGTCAGAGCAACATGGA
GATCGCTTACCGAGAGTAGAAATGGCTTTGGAGGCTCTGAGAAATGTCATAAAA
TACAATCCAGGTTCTGAGAGTGAATGCATTGGGCACTTTAAGTTGATATTTTCTC
TTCTCCGAGTTCATGGAGCTGGTCAAGTGCAGCAGTTGGCTTTAGAGGTTGTGA
ATATAGTGACATCTAACCAAGACTGTGTCAACAATATTGCTGAATCAATGGTTTT
GTCCAGTTTATTGGCTCTTCTACATTCATTGCCATCAAGTCGTCAGCTTGTTCTG
GAACTCTTTATGCTTTGACATCGAGTACAAAATAATCAAAGAAGCAATGGCAA
AGGGTGCTTTGATCTATTTACTGGATATGTTCTGCAATTCAACACATCCACAGGT
TCGAGCCCAACAGCAGAACTTTTTGCCAAAATGACAGCAGATAAACTGATAGG
TCCAAAGGTTCGAATTACGTTAATGAAATTTCTACCAAGCGTTTTTCATGGATGCT
ATGAGAGACAATCCTGAAGCTGCTGTACATATTTTTGAAGGAACTCATGAAATC
CTGAGTTAATTTGGAATGATAATTCCAGAGATAAAGTGTCCACAACAGTTAGGGA
AATGATGCTAGAGCACTTTAAAATCAGCAGGACAACCCTGAGGCCAACTGGAA
GTTGCCTGAAGATTTTGTGTGGTGTGTTGGAGAAGCAGAGGGTGAACCTTGCTGT
TGGAGGAGTCTTCTTGAGGATCTTTATTGCACAACCAGCCTGGGTTCTAAGAAA
GCCTAGAGAATTTCTTATTGCCCTGTTAGAAAAATTAACCTGAGCTCCTAGAGAAG
AACAACTCTCATGGAGAACTCTGGAAACCTTGACAATGGCAACAGTGTGTCTC
TTCAGCGCACAACTCAGCTGGCAGATCAGGTCCCGCCATTGGGCCATCTTCC

CAAAGTTATCCAGGCAATGAATCATAGGAACAATGCCATTCCCTAAGAGTGCCATT
CGGGTTATCCATGCCTTGTCTGAAAATGAGCTGTGTGTTTCGAGCCATGGCATCT
TTAGAGACCATTGGCCCACTGATGAATGGAATGAAAAAGCGAGCAGATACTGTT
GGTCTAGCCTGTGAAGCAATTAATCGAATGTTTCAGAAGGAGCAGAGTGAATTA
GTAGCACAAGCCCTGAAAGCAGATTTGGTTCCATACCTCTTAAAATTACTCGAAG
GCATTGGCCTTGAAAACCTGGACAGCCCAGCAGCCACTAAGGCTCAGATTGTTA
AAGCTCTCAAGGCAATGACTCGAAGTTTGCAGTATGGAGAACAGGTGAATGAAA
TCCTGTGCCGTTCTTCAGTCTGGAGTGCCTTCAAAGATCAGAAACATGATTTGTT
CATTTCTGAGTCACAAACAGCAGGATACCTCACAGGACCTGGAGTTGCTGGCTA
CCTTACCGCAGGTACATCTACATCAGTCATGTCTAACCTGCCACCTCCTGTAGA
CCATGAGGCAGGCGACCTTGGCTATCAGACTCACCGGCCGCCCGGGGATCCC
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA
GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCA
AGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAG
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCC
ATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAA
CTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC
ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAA
GCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA
GAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGT
GCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATCTAGAGTGAGGGTCCCCA
CCTGGGACCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCCACGTGGGAGACAAGAAATCCCTG
TTTAATATTTAAACAGCAGTGTTCCCATCTGGGTCTTGCACCCCTCACTCTGG
CCTCAGCCGACTGCACAGCGGCCCTGCATCCCCTTGGCTGTGAGGCCCTGG
ACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGGGTCCCACGAATT
TGCTGGGGAATCTCGTTTTTCTTCTTAAGACTTTTGGGACATGGTTTACTCCCG
AACATCACCGACGCGTCTCCTGTTTTTCTGGGTGGCCTCGGGACACCTGCCCT
GCCCCACGAGGGTCAGGACTGTGACTCTTTTTAGGGCCAGGCAGGTGCCTGG
ACATTTGCCTTGCTGGACGGGGACTGGGGATGTGGGAGGGAGCAGACAGGAG
GAATCATGTCAGGCCTGTGTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCACCCTCCACCTCT
TCACCCCCCACTCACCAGTGTCCCCTCCACTGTCACATTGTAACCTGAACCTCAG
GATAATAAAGTGCTTGCTTCCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAGAATTAATTCCTGACCCTGTTTTTACAACGTCTGACTGGGAAAACCT
GGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGT
AATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
TGCGCAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTT
ACACCGCATACTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAG
CGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCC
CTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGC
TTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCT
TTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG
CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTCGAGTTGGAGTCCACGTTCTTT
AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATT
CTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCT
GATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATG
GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCC

GCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCA
CCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTA
TAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGA
GTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG
CCTTCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGG
TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGA
AAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAAC
CATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
GGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTA
CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA
ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTA
ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAC
ACCGTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC
GAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTA
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCCTACATACCTCGC
TCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTAC
CGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAA
CGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG
AGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA
GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGG
GAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCGCCAC
CTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATG
GAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTT
TGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC
GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCG
AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCC
GCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAA
AGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC
CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTAATTCC
CTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAT
AGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCC
ATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCG
CCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTT
TGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAGGAGTGCCTCGTGAGGCTCCGGT
GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGG
GAGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG

GGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
 CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCG
 CCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACG
 GTTATGGCCCTTGCCTGTCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATT
 CTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGC
 TTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGG
 GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGAT
 AAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC
 AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG
 GGGCCGCGGGCGGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGA
 GCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGC
 TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCC
 TGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC
 CGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGGCGCTCGGG
 AGAGCGGGCGGGTGTAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAG
 CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGAT
 TAGTT

8.1.3. pEF-Bos-DNAJC13(N855S)-FLAG

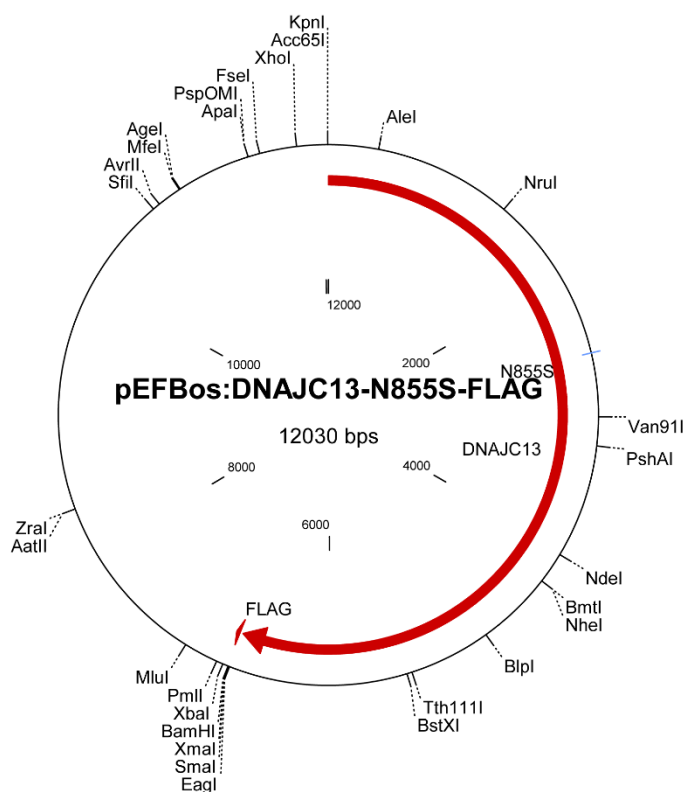


Abbildung 32: Vektorkarte von DNAJC13(N855S) im Vektor pEF-Bos mit FLAG-Markierung

CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGAT
 GGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACT
 TGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC
 AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTTCGTGAGGAA
 TTCGGTACCATGAACATAATTAGGGAAAATAAGGATCTGGCATGTTTCTACACAA

CAAAACATTCATGGAGGGGGAAGTATAAGCGTGTCTTTTCAGTTGGAACATCATG
CGATTACTACATATAATCCCAATACCTTAGAAGTAACAAATCAGTGGCCTTATGG
AGACATTTGCAGCATCAGCCCTGTTGGAAAAGGACAAGGAACGGAGTTCAACCT
CACATTTTCGTAAAGGCAGTGGAAAAAGTCAGAACTTTAAAATTTTCTACAGAG
CACAGAACAGAACTTCTTACAGAAGCATTGAGATTTAGAAGTATTTTTTCAGAGG
GAAAAATCACAGGAAGGAGATACAAGTCTATAAGCATCACTGGAGTGAAGTCAA
GAAAACCTGTAATTTTGGAAAGTAACTCCAGGAGGCTTTGACCAAATTAATCCTGC
AACCAACAGAGTACTCTGTTCCCTATGACTATAGAAATATTGAAGGATTTGTAGAT
CTCTCAGATTATCAAGGAGGATTTTGTATACTTTATGGAGGATTTAGTAGATTGC
ATTTATTTGCGTCAGAGCAAAGAGAAGAGATTATTAAGTGAATAGACCATGC
TGGTAACTACATAGGTATTTTATTGCGGATCAGGAAAGAGCCTTTAGAATTCGAG
CAATATTTGAATCTTCGCTTTGGAAAATACAGCACTGATGAATCCATCACATCTTT
AGCAGAGTTTGTAGTCCAAAAAATATCACCTAGACATTCGGAGCCTGTTAAAAGA
GTTCTAGCACTTACAGAAACATGTTTAGTAGAACGTGATCCGGCAACCTATAATA
TTGCAACATTGAAGCCTTTAGGAGAAGTATTTGCGTTGGTCTGTGACTCAGAAAA
TCCACAACCTTTTACCATTGAATTTATAAAAGGGCAAGTACGGAAATATTCTTCAA
CAGAGAGAGATTCTTATTAGCAAGTTTGTCTGGATGGAGTAAGAGCCTCTGGTA
ATAGAGATGTTTGTGTAATAATGACACCAACCCATAAAGGTCAGCGATGGGGGT
TACTCAGCATGCCTGTTGATGAGGAAGTAGAGAGCCTTCACCTCAGGTTCTTAG
CTACGCCTCCAAATGGCAACTTTGCAGATGCTGTATTGAGTTCAATGCTAATAT
TTCATACAGTGGAGTCTTACATGCAGTAACACAGGATGGTCTCTTCTCAGAAAA
CAAAGAAAAACTGATCAATAATGCCATAACAGCATTACTGTCCCAAGAAGGGGA
TGTCGTTGCTTCAAATGCGGAACTTGAGAGTCAGTTCCAGGCTGTGAGGAGGCT
TGTGGCATCCAAAGCTGGTTTCTGGCTTTCACTCAGCTTCCAAAGTTTCGCGA
GCGTCTAGGGGTGAAGGTAGTAAAAGCACTCAAAGAAGCAACAACGGAAATAAT
CCATGCAGCAGTTGATATGCTTTGTGCCCTTATGTGTCCCATGCATGACTAT
GACTTAAGACAAGAACAGTTGAACAAAGCTTCTCTTCTCTCGTCAAAGAAGTTTC
TGAAAACTTACTGGAGAAATTTAATTCCCATGTGGATCATGGGACTGGTGCCC
TAGTTATTAGTTTCGCTCTTGGACTTCTTACCTTTGCCCTCTGTGCTCCATATAG
TGAGACAACCTGAAGGGCAGCAGTTTATGCTCTTGGAGATGGTAGCATCCAA
TGGAAGAACCCTTTTTAACTTTTTTTCAGCATCCTTCCATGGCAATAATAAAGGA
GCTGGGTTGGTTATGAAGGCAATAATAGAGGAAGGTGATAAAGAAATTGCTACA
AAAATGCAGGAGCTTGCCCTAAGTGAAGGTGCCCTTACCTCGACACTTGCATACT
GCGATGTTTACAATAAGCTCAGATCAAAGGATGCTTACAATAAGACAGCTAAGTA
GACATTTAGTGGGACTCTGGACAGCTGATAATGCAACTGCAACAACTTGTGGA
AACGCATTTTGGCGCCAGGCTTGGTGGCATACTTGGAAAGCTCAGATCTCGTAC
CTGAGAAGGATGCTGATCGGATGCATGTTAGAGACAATGTGAAAATAGCAATGG
ATCAGTATGGAAAATTTAATAAAGTTCCAGAGTGGCAAAGACTAGCTGGAAAAG
CTGCTAAAGAAGTTGAAAAATTTGCCAAAGAAAAAGTGGATCTTGTATTGATGCA
CTGGAGGGATAGGATGGGCATTGCTCAAAAAGAGAATATAAATCAGAAGCCAGT
GGTTCTTCGAAAGAGAAGACAAAGAATAAAAATAGAAGCAAATTTGGGATCTCTTC
TATTATAGTGGTCAAGACCATGCCAGGTCAAACCTTATTTGGAATTTCAAAA
CACGAGAAGAACTGAAAGATACTCTTGAATCTGAAATGAGAGCATTTAATATTGA
CAGAGAACCTTGAAGTGCAAATGTGATCTCCTGGAACCACCATGAGTTTGGAGT
TAAATATGAGTGCCTGGCAGAGGAAATTAATAAGGAGACTATTACCTGAGACTA
CTATTGGAGGAAGATGAGAATGAAGAAAGTGGATCAATTAAGAGATCGTATGAA
TTTTTCAGTGAGCTTTATCATCGCTTCTTGTCTACCCCAAAAGTAAACATGAAGT
GTTTATGTTTACAAGCCCTTGTCTATTGTTTATGGCAGATGTCACGAAGAAATAGG
ACCTTTTACAGATACCAGATATATCATTGGAATGTTAGAGAGGTGCACAGATAAA
CTTGAACGAGATAGGTTGATTCTCTTCTTAAACAAGTTGATCCTTAATAAGAAAA
ATGTTAAGGATCTCATGGATTCAAATGGAATAAGAATCCTTGTGGACTTGCTTAC

CCTTGCACATCTCCATGTAAGCCGAGCTACAGTACCACTGCAAAGCAATGTAAT
TGAAGCTGCTCCAGATATGAAAAGAGAGAGTGAAAAGGAATGGTATTTTGGCAA
CGCAGACAAAGAAAGGAGTGGCCCGTATGGATTTTCATGAGATGCAAGAATTGTG
GACCAAAGGAATGTTAAATGCAAAAACCAGATGCTGGGCTCAAGGCATGGATGG
ATGGCGACCACTTCAGTCCATACCCAGCTTAAGTGGTGTCTCTTAGCCAGTGG
ACAGGCTGTCTGAATGAACTGACCTTGCTACCCCTTATATTGAACATGTTGATC
ACAATGTGTGGATATTTTCCAAGCAGGGATCAAGACAATGCCATCATTGCGCCT
CTACCCAAAGTGAAAAGACTGCTGTGAGATAGCACTTGCCTTCCCATATTATTC
AGCTACTGCTGACCTTTGACCCTATCCTTGTTGAGAAGGTTGCTATTTTGTATA
CCATATCATGCAAGATAACCCACAGTTACCCCGCCTTTATCTGAGTGGAGTATTT
TTCTTTATCATGATGTACACAGGTTCCAATGTGCTTCCTGTTGCTCGATTTTTGAA
ATACACACATAACCAACAGGCTTTCAAGTCAGAAGAGACAAAAGGACAAGATATT
TTTCAGAGAAGTATACTTGGGCACATTCTACCTGAAGCAATGGTTTGTACTTAG
AAAATTATGAACCTGAAAAGTTTTCTGAGATTTTTCTAGGAGAATTTGATACTCCA
GAAGCAATCTGGAGCAGTGAATGAGGCGCCTGATGATAGAGAAGATTGCTGC
CCATCTCGCGGATTTACACCTCGTCTTCAGAGTAACACAAGAGCACTTTATCA
GTATTGCCCCATTCTATAATCAACTATCCACAACCTCGAAAATGAACTATTTTGT
ATATTTATTACCTCAAACAACCTGTGTGATACACTCCGGTTTCCAGATTGGCCAAT
TAAAGACCCGGTTAAGCTTCTAAAAGATACCCTTGATGCCTGGAAGAAAGAAGT
AGAAAAGAAGCCACCTATGATGTCAATAGATGATGCTTATGAAGTGCTTAATCTG
CCTCAAGGACAGGGACCGCATGATGAGAGCAAGATTAGGAAAGCTTACTTCAGA
CTTGCACAAAAGTACCACCCTGATAAGAATCCAGAAGGGAGGGACATGTTTGAA
AAAGTAAATAAAGCATATGAATTTTTATGTACCAAATCAGCAAAAATAGTGGATG
GGCCAGATCCAGAGAATATAATTTTAATTCTAAAAACACAGAGCATCCTCTTCAA
CCGTCATAAAGAAGATTTACAGCCTTATAAATATGCAGGATACCCCATGCTTATT
CGGACTATAACAATGGAACTTCAGATGACCTCCTTTTCTCAAAGAATCACCAT
TGTTGCCTGCGGCTACAGAGCTAGCTTTCCATACTGTCAACTGTTGAGCCCTCA
ATGCTGAAGAGCTCAGAAGAGAGAATGGACTAGAGGTGTTACAAGAGGCATTTA
GTCGCTGTGTGGCTGTCTTGACTCGTGCTAGTAAACCAAGTACATGTCAGTAC
AGGTGTGTGGATACATAAGTAAATGCTACAGTGTGGCTGCTCAGTTTGAAGGAA
GCCGAGAGAAGATCACGGAAATGCCTAGCATCATCAAGGATCTCTGTGCGGTA
CTATATTTTGGCAAGAGTATCCCCGCGTAGCTGCTCTTGGGGTAGAATGTGTC
AGTTCTTTTGTGTGGATTTCTGGCTACAGACACACCTATTTGAGGCTGGAATTT
TGTGGTATCTCCTTGGTTTTCTGTTTAATTATGACTACACACTAGAAGAGAGTGG
CATTGAGAAAAGTGAAGAAACAAACCAGCAGGAGGTAGCAAACAGCCTTGCCAA
ACTGAGTGTCCATGCTCTGAGTCGCCCTTGGAGGGTATTTGGCTGAAGAACAAGC
AACTCCAGAAAATCCAACCATAAGGAAAAGCTTAGCTGGCATGCTGACACCCTA
TGTTGCTAGAAAACCTGCTGTGGCTAGTGTGACTGAGATTTTGAAGATGCTTAAC
AGCAACACAGAAAGTCCATATTTGATATGGAACAATTCTACAAGAGCAGAATTAC
TTGAATTTCTTGAATCCCAACAAGAAAACATGATTAATAAAGGTGATTGTGACAA
AACTTATGGATCAGAATTTGTCTACAGTGATCATGCCAAAGAACTTATTGTAGGG
GAGATTTTTGTTAGGGTGTATAATGAAGTTCCTACTTTCCAACCTGGAGGTTCCAA
AAGCATTGCTGCAAGTCTCTTGGATTATATAGGCTCGCAGGCCCAATACTTGC
ACACATTCATGGCCATCACACACGCGGCAAAAGTGGAGTCAGAGCAACATGGA
GATCGCTTACCGAGAGTAGAAATGGCTTTGGAGGCTCTGAGAAATGTCATAAAA
TACAATCCAGGTTCTGAGAGTGAATGCATTGGGCCTTTAAGTTGATATTTTCTC
TTCTCCGAGTTCATGGAGCTGGTCAAGTGCAGCAGTTGGCTTTAGAGGTTGTGA
ATATAGTGACATCTAACCAAGACTGTGTCAACAATATTGCTGAATCAATGGTTTT
GTCCAGTTTATTGGCTCTTCTACATTCATTGCCATCAAGTCGTCAGCTTGTCTG
GAACTCTTTATGCTTTGACATCGAGTACAAAATAATCAAAGAAGCAATGGCAA
AGGGTGCTTTGATCTATTTACTGGATATGTTCTGCAATTCAACACATCCACAGGT

TCGAGCCCAAACAGCAGAACTTTTTGCCAAAATGACAGCAGATAAACTGATAGG
TCCAAAGGTTCTGAATTACGTTAATGAAATTTCTACCAAGCGTTTTTCATGGATGCT
ATGAGAGACAATCCTGAAGCTGCTGTACATATTTTTGAAGGAACTCATGAAAATC
CTGAGTTAATTTGGAATGATAATTCCAGAGATAAAGTGTCCACAACAGTTAGGGA
AATGATGCTAGAGCACTTTAAAAATCAGCAGGACAACCCTGAGGCAAACCTGGAA
GTTGCCTGAAGATTTTGTCTGTGGTGTGGGAGAGCAGAGGGTGAACCTTGCTGT
TGGAGGAGTCTTCTTGAGGATCTTTATTGCACAACCAGCCTGGGTTCTAAGAAA
GCCTAGAGAATTTCTTATTGCCCTGTTAGAAAAATTAACCTGAGCTCCTAGAGAAG
AACAACTCCTCATGGAGAACTCTGGAAACCTTGACAATGGCAACAGTGTGTCTC
TTCAGCGCACAACTCAGCTGGCAGATCAGGTCCCGCCATTGGGCCATCTTCC
CAAAGTTATCCAGGCAATGAATCATAGGAACAATGCCATTCTAAGAGTGCCATT
CGGGTTATCCATGCCTTGTCTGAAAATGAGCTGTGTGTTTCGAGCCATGGCATCT
TTAGAGACCATTGGCCCACTGATGAATGGAATGAAAAAGCGAGCAGATACTGTT
GGTCTAGCCTGTGAAGCAATTAATCGAATGTTTCAGAAGGAGCAGAGTGAATTA
GTAGCACAAAGCCCTGAAAGCAGATTTGGTTCCATACCTCTTAAAATTACTCGAAG
GCATTGGCCTTGAAAACCTGGACAGCCCAGCAGCCACTAAGGCTCAGATTGTTA
AAGCTCTCAAGGCAATGACTCGAAGTTTGCAGTATGGAGAACAGGTGAATGAAA
TCCTGTGCCGTTCTTCAGTCTGGAGTGCCTTCAAAGATCAGAAACATGATTTGTT
CATTCTGAGTCACAAACAGCAGGATACCTCACAGGACCTGGAGTTGCTGGCTA
CCTTACCGCAGGTACATCTACATCAGTCATGTCTAACCTGCCACCTCCTGTAGA
CCATGAGGCAGGCGACCTTGGCTATCAGACTCACCGGCCGCCCGGGGATCCG
ATCATGGACTACAAGGATGACGATGACAAATAATCTAGAGTGAGGGTCCCCACC
TGGGACCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCACGTGGGAGACAAGAAATCCCTGTTT
AATATTTAAACAGCAGTGTTCCTCATCTGGGTCTTGCACCCCTCACTCTGGCC
TCAGCCGACTGCACAGCGGCCCTGCATCCCCTTGGCTGTGAGGCCCTGGAC
AAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGGGTCCCACGAATTTG
CTGGGGAATCTCGTTTTTCTTCTTAAGACTTTTGGGACATGGTTTACTCCCGAA
CATCACCGACGCGTCTCCTGTTTTTCTGGGTGGCCTCGGGACACCTGCCCTGC
CCCCACGAGGGTCAGGACTGTGACTCTTTTTAGGGCCAGGCAGGTGCCTGGAC
ATTTGCCTTGCTGGACGGGGACTGGGGATGTGGGAGGGAGCAGACAGGAGGA
ATCATGTCAGGCCTGTGTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCACCCTCCACCTCTTC
ACCCCCACTCACAGTGTCCCCTCCACTGTCACATTGTAACCTGAACCTTCAGGA
TAATAAAGTGCTTGCCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAGAATTAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTG
GCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTA
ATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAAT
GGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCA
CACCGCATACTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCC
TAGCGCCCCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCT
TTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTT
TACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGC
CATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAA
TAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCT
TTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGA
TTTAACAAAAATTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGT
GCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACC
CGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCT
TACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTTACC
GTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATA
GGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGA

AATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCC
TTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCT
TGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG
CTATGTGGCGCGGTATTATCCCCTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAA
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAT
GAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG
AGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTT
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG
CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACT
CTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGA
CCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATT
TAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT
TCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACAC
CGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA
AGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTC
TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACG
GGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCT
CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA
AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTG
CTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC
CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAG
CGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC
AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT
ACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTAATTCCCT
CCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAG
TCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCAT
TCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCC
TCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGC
TTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTG
CAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTCGTGAGGCTCCGGTGC
CCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGAGAAGTTGGGGGGA
GGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGG
AAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCG
TATATAAGTGAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCC
AGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGG

TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTT
 GATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCCTTA
 AGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGC
 CGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAA
 GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAA
 GATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGG
 GCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGG
 CGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTG
 GCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTG
 GGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCG
 CTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGGCGCTCGGGAG
 AGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCC
 GTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA
 GTT

8.1.4. pEF-Bos-DNAJC13(N855S)-GFP

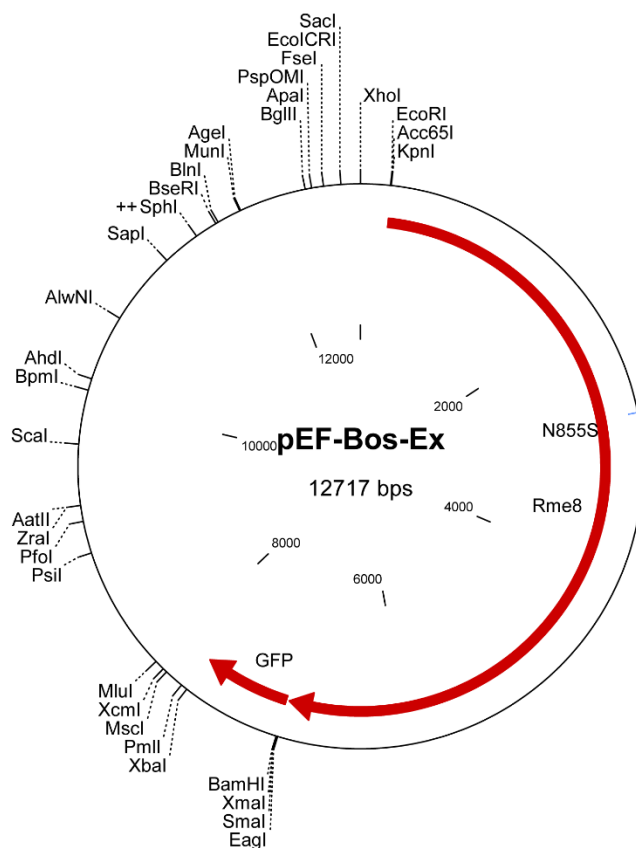


Abbildung 33 : Vektorkarte von DNAJC13(N855S) im Vektor pEF-Bos mit GFP-Markierung

CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGAT
 GGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACT
 TGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC
 AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCTGAGGAA
 TTCGGTACCATGAACATAATTAGGGAAAATAAGGATCTGGCATGTTTCTACACAA
 CAAAACATTCATGGAGGGGGAAGTATAAGCGTGTCTTTTCAGTTGGAACATCATG

CGATTACTACATATAATCCCAATACCTTAGAAGTAACAAATCAGTGGCCTTATGG
AGACATTTGCAGCATCAGCCCTGTTGGAAAAGGACAAGGAACGGAGTTCAACCT
CACATTTTCGTAAGGCAGTGGAAAAAGTCAGAACTTTAAAATTTTCTACAGAG
CACAGAACAGAACTTCTTACAGAAGCATTGAGATTTAGAACTGATTTTTTCAGAGG
GAAAAATCACAGGAAGGAGATACAACCTGCTATAAGCATCACTGGAGTGACTION
GAAAACCTGTAATTTTGGAAAGTAACTCCAGGAGGCTTTGACCAAATTAATCCTGC
AACCAACAGAGTACTCTGTTCCCTATGACTATAGAAATATTGAAGGATTTGTAGAT
CTCTCAGATTATCAAGGAGGATTTTGTATACTTTATGGAGGATTTAGTAGATTGC
ATTTATTTGCGTCAGAGCAAAGAGAAGAGATTATTAAGAGTGCAATAGACCATGC
TGGTAACTACATAGGTATTTTCATTGCGGATCAGGAAAGAGCCTTTAGAATTCGAG
CAATATTTGAATCTTCGCTTTGGAAAATACAGCACTGATGAATCCATCACATCTTT
AGCAGAGTTTGTAGTCCAAAAATATCACCTAGACATTCGGAGCCTGTTAAAAGA
GTTCTAGCACTTACAGAAACATGTTTAGTAGAACGTGATCCGGCAACCTATAATA
TTGCAACATTGAAGCCTTTAGGAGAAGTATTTGCGTTGGTCTGTGACTCAGAAAA
TCCACAACCTTTTTACCATTGAATTTATAAAAGGGCAAGTACGGAAATATTCTTCAA
CAGAGAGAGATTCCCTTATTAGCAAGTTTGTCTGGATGGAGTAAGAGCCTCTGGTA
ATAGAGATGTTTGTGTAATAATGACACCAACCCATAAAGGTCAGCGATGGGGGT
TACTCAGCATGCCTGTTGATGAGGAAGTAGAGAGCCTTCACCTCAGGTTCTTAG
CTACGCCTCCAAATGGCAACTTTGCAGATGCTGTATTCAGGTTCAATGCTAATAT
TTCATACAGTGGAGTCCTACATGCAGTAACACAGGATGGTCTCTTCTCAGAAAA
CAAAGAAAAACTGATCAATAATGCCATAACAGCATTACTGTCCCAAGAAGGGGA
TGTCGTTGCTTCAAATGCGGAACTTGAGAGTCAGTTCCAGGCTGTGAGGAGGCT
TGTGGCATCCAAAGCTGGTTTCCCTGGCTTTCACTCAGCTTCCAAAGTTTCGCGA
GCGTCTAGGGGTGAAGGTAGTAAAAGCACTCAAAGAAGCAACAACCGGAATAAT
CCATGCAGCAGTTGATATGCTTTGTGCCCTTATGTGTCCCATGCATGACTAT
GACTTAAGACAAGAACAGTTGAACAAAGCTTCTCTTCTCTCGTCAAAGAAGTTTC
TGGAACCTTACTGGAGAAATTTAATTCCCATGTGGATCATGGGACTGGTGCCC
TAGTTATTAGTTGCTCTTGGACTTCCCTTACCTTTGCCCTCTGTGCTCCATATAG
TGAGACAACCTGAAGGGCAGCAGTTTGTATGCTCTTGGAGATGGTAGCATCCAA
TGGAAGAACCCTTTTTAACTTTTTTCAGCATCCTTCCATGGCAATAATAAAAGGA
GCTGGGTTGGTTATGAAGGCAATAATAGAGGAAGGTGATAAAGAAATTGCTACA
AAAATGCAGGAGCTTGCCCTAAGTGAAGGTGCCTTACCTCGACACTTGCATACT
GCGATGTTTACAATAAGCTCAGATCAAAGGATGCTTACAAATAGACAGCTAAGTA
GACATTTAGTGGGACTCTGGACAGCTGATAATGCAACTGCAACAACTTGTGTA
AACGCATTTTGCCGCCAGGCTTGCTGGCATACTTGGAAAGCTCAGATCTCGTAC
CTGAGAAGGATGCTGATCGGATGCATGTTAGAGACAATGTGAAAATAGCAATGG
ATCAGTATGGAAAATTTAATAAAGTTCCAGAGTGGCAAAGACTAGCTGGAAAAG
CTGCTAAAGAAGTTGAAAAATTTGCCAAAGAAAAAGTGGATCTTGTATTGATGCA
CTGGAGGGATAGGATGGGCATTGCTCAAAAAGAGAATATAAATCAGAAGCCAGT
GGTTCTTCGAAAGAGAAGACAAAGAATAAAAAATAGAAGCAAATTGGGATCTCTTC
TATTATAGGTTTGGTCAAGACCATGCCAGGTCAAACCTTATTTGGAATTTCAAAA
CACGAGAAGAACTGAAAGATACTCTTGAATCTGAAATGAGAGCATTTAATATTGA
CAGAGAACTTGAAGTGCAAATGTGATCTCCTGGAACCACCATGAGTTTGAGGT
TAAATATGAGTGCCTGGCAGAGGAAATTAATAAGGAGACTATTACCTGAGACTA

CTATTGGAGGAAGATGAGAATGAAGAAAGTGGATCAATTAAGAGATCGTATGAA
TTTTTCAGTGAGCTTTATCATCGCTTCTTGCTCACCCCAAAGTAAACATGAAGT
GTTTATGTTTACAAGCCCTTGCTATTGTTTATGGCAGATGTCACGAAGAAATAGG
ACCTTTTACAGATACCAGATATATCATTGGAATGTTAGAGAGGTGCACAGATAAA
CTTGAACGAGATAGGTTGATTCTCTTCCTTAACAAGTTGATCCTTAATAAGAAAA
ATGTTAAGGATCTCATGGATTCAAATGGAATAAGAATCCTTGTGGACTTGCTTAC
CCTTGCACATCTCCATGTAAGCCGAGCTACAGTACCACTGCAAAGCAATGTAAT
TGAAGCTGCTCCAGATATGAAAAGAGAGAGTGAAAAGGAATGGTATTTTGGCAA
CGCAGACAAAGAAAGGAGTGGCCCGTATGGATTTTATGAGATGCAAGAATTGTG
GACCAAAGGAATGTTAAATGCAAAAACCAGATGCTGGGCTCAAGGCATGGATGG
ATGGCGACCACTTCAGTCCATACCCAGCTTAAGTGGTGTCTCTTAGCCAGTGG
ACAGGCTGTCTGAATGAACTGACCTTGCTACCCTTATATTGAACATGTTGATC
ACAATGTGTGGATATTTTCCAAGCAGGGATCAAGACAATGCCATCATTGCGCCT
CTACCCAAAGTGAAAAGACTGCTGTGAGATAGCACTTGCCTTCCCATATTATTC
AGCTACTGCTGACCTTTGACCCTATCCTTGTGAGAAGGTTGCTATTTTGTATA
CCATATCATGCAAGATAACCCACAGTTACCCCGCCTTTATCTGAGTGGAGATTT
TTCTTTATCATGATGTACACAGGTTCCAATGTGCTTCTGTTGCTCGATTTTGA
ATACACACATAACCAACAGGCTTTCAAGTCAGAAGAGACAAAAGGACAAGATATT
TTTCAGAGAAGTATACTTGGGCACATTCTACCTGAAGCAATGGTTTGTACTTAG
AAAATTATGAACCTGAAAAGTTTTCTGAGATTTTTCTAGGAGAATTTGATACTCCA
GAAGCAATCTGGAGCAGTGAAATGAGGCGCCTGATGATAGAGAAGATTGCTGC
CCATCTCGCGGATTTACACCTCGTCTTCAGAGTAACACAAGAGCACTTTATCA
GTATTGCCCCATTCTATAATCAACTATCCACAACCTCGAAAATGAACTATTTTGT
ATATTTATTACCTCAAACAACCTGTGTGATACACTCCGGTTTCCAGATTGGCCAAT
TAAAGACCCGGTTAAGCTTCTAAAAGATACCCTTGATGCCTGGAAGAAAGAAGT
AGAAAAGAAGCCACCTATGATGTCAATAGATGATGCTTATGAAGTGCTTAATCTG
CCTCAAGGACAGGGACCGCATGATGAGAGCAAGATTAGGAAAGCTTACTTCAGA
CTTGCACAAAAGTACCACCCTGATAAGAATCCAGAAGGGAGGGACATGTTTGA
AAAGTAAATAAAGCATATGAATTTTTATGTACCAAATCAGCAAAAATAGTGGATG
GGCCAGATCCAGAGAATATAATTTTAATTCTAAAAACACAGAGCATCCTCTTCAA
CCGTCATAAAGAAGATTTACAGCCTTATAAATATGCAGGATACCCCATGCTTATT
CGGACTATAACAATGGAACTTCAGATGACCTCCTTTTCTCAAAGAATCACCAT
TGTTGCCTGCGGCTACAGAGCTAGCTTTCCATACTGTCAACTGTTGAGCCCTCA
ATGCTGAAGAGCTCAGAAGAGAGAATGGACTAGAGGTGTTACAAGAGGCATTTA
GTCGCTGTGTGGCTGTCTTGACTCGTGCTAGTAAACCAAGTGACATGTCAGTAC
AGGTGTGTGGATACATAAGTAAATGCTACAGTGTGGCTGCTCAGTTTGAAGAA
GCCGAGAGAAGATCACGGAAATGCCTAGCATCATCAAGGATCTCTGTCGGGTA
CTATATTTTGGCAAGAGTATTCCCCGCGTAGCTGCTCTTGGGGTAGAATGTGTC
AGTTCTTTTGTGCTGTGGATTTCTGGCTACAGACACACCTATTTGAGGCTGGAATTT
TGTGGTATCTCCTTGGTTTTCTGTTTAATTATGACTACACACTAGAAGAGAGTGG
CATTGAGAAAAGTGAAGAAACAAACCAGCAGGAGGTAGCAAACAGCCTTGCCAA
ACTGAGTGTCCATGCTCTGAGTCGCCCTTGAGGGTATTTGGCTGAAGAACAAGC
AACTCCAGAAAATCCAACCATAAGGAAAAGCTTAGCTGGCATGCTGACACCCTA
TGTTGCTAGAAAACCTTGTGTGGCTAGTGTGACTGAGATTTTGAAGATGCTTAAC

AGCAACACAGAAAGTCCATATTTGATATGGAACAATTCTACAAGAGCAGAATTAC
TTGAATTTCTTGAATCCCAACAAGAAAACATGATTAATAAAGGTGATTGTGACAA
AACTTATGGATCAGAATTTGTCTACAGTGATCATGCCAAAGAACTTATTGTAGGG
GAGATTTTTGTTAGGGTGTATAATGAAGTTCCTACTTTCCAAGTGGAGGTTCCAA
AAGCATTTGCTGCAAGTCTCTTGGATTATATAGGCTCGCAGGCCCAATACTTGC
ACACATTCATGGCCATCACACACGCGGCAAAAGTGGAGTCAGAGCAACATGGA
GATCGCTTACCGAGAGTAGAAATGGCTTTGGAGGCTCTGAGAAATGTCATAAAA
TACAATCCAGGTTCTGAGAGTGAATGCATTGGGCACTTTAAGTTGATATTTTTCTC
TTCTCCGAGTTCATGGAGCTGGTCAAGTGCAGCAGTTGGCTTTAGAGGTTGTGA
ATATAGTGACATCTAACCAAGACTGTGTCAACAATATTGCTGAATCAATGGTTTT
GTCCAGTTTATTGGCTCTTCTACATTCATTGCCATCAAGTCGTCAGCTTGTTCTG
GAAACTCTTTATGCTTTGACATCGAGTACAAAAATAATCAAAGAAGCAATGGCAA
AGGGTGCTTTGATCTATTTACTGGATATGTTCTGCAATTCAACACATCCACAGGT
TCGAGCCCAACAGCAGAAGTCTTTTCCAAAATGACAGCAGATAAACTGATAGG
TCCAAAGGTTCGAATTACGTTAATGAAATTTCTACCAAGCGTTTTTCATGGATGCT
ATGAGAGACAATCCTGAAGCTGCTGTACATATTTTTGAAGGAACTCATGAAAATC
CTGAGTTAATTTGGAATGATAATTCCAGAGATAAAGTGTCCACAACAGTTAGGGA
AATGATGCTAGAGCACTTTAAAAATCAGCAGGACAACCCTGAGGCAAACTGGAA
GTTGCCTGAAGATTTTGTCTGTGGTGTGGGAGGAGCAGAGGGTGAAGTTGCTGT
TGGAGGAGTCTTCTTGGAGGATCTTTATTGCACAACCAGCCTGGGTTCTAAGAAA
GCCTAGAGAATTTCTTATTGCCCTGTTAGAAAAATTAAGTGAAGCTCCTAGAGAAG
ACAATCCTCATGGAGAACTCTGGAAACCTTGACAATGGCAACAGTGTGTCTC
TTCAGCGCACAACTCAGCTGGCAGATCAGGTCCCAGCATTGGGCCATCTTCC
CAAAGTTATCCAGGCAATGAATCATAGGAACAATGCCATTCTAAGAGTGCCATT
CGGGTTATCCATGCCTTGTCTGAAAATGAGCTGTGTGTTTCGAGCCATGGCATCT
TTAGAGACCATTGGCCACTGATGAATGGAATGAAAAAGCGAGCAGATACTGTT
GGTCTAGCCTGTGAAGCAATTAATCGAATGTTTCAGAAGGAGCAGAGTGAATTA
GTAGCACAAAGCCCTGAAAGCAGATTTGGTTCCATACCTCTTAAAATTAAGTGAAG
GCATTGGCCTTGAAAACCTGGACAGCCCAGCAGCCACTAAGGCTCAGATTGTTA
AAGCTCTCAAGGCAATGACTCGAAGTTTGCAGTATGGAGAACAGGTGAATGAAA
TCCTGTGCCGTTCTTCAGTCTGGAGTGCCCTCAAAGATCAGAAACATGATTTGTT
CATTCTGAGTCACAAACAGCAGGATACCTCACAGGACCTGGAGTTGCTGGCTA
CCTTACCGCAGGTACATCTACATCAGTCATGTCTAACCTGCCACCTCCTGTAGA
CCATGAGGCAGGCGACCTTGGCTATCAGACTCACCGGCCGCCCGGGGATCCC
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCCG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA
GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCA
AGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAG
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC
ATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAA
CTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC
ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAA
GCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA
GAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG

TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGT
GCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATCTAGAGTGAGGGTCCCCA
CCTGGGACCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCCACGTGGGAGACAAGAAATCCCTG
TTTAATATTTAAACAGCAGTGTTCCCCATCTGGGTCTTGCACCCCTCACTCTGG
CCTCAGCCGACTGCACAGCGGCCCTGCATCCCCTTGGCTGTGAGGCCCTGG
ACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGGGTCCCACGAATT
TGCTGGGGAATCTCGTTTTTCTTCTTAAGACTTTTGGGACATGGTTTGACTCCCG
AACATCACCGACGCGTCTCCTGTTTTTCTGGGTGGCCTCGGGACACCTGCCCT
GCCCCACGAGGGTCAGGACTGTGACTCTTTTTAGGGCCAGGCAGGTGCCTGG
ACATTTGCCTTGCTGGACGGGGACTGGGGATGTGGGAGGGAGCAGACAGGAG
GAATCATGTCAGGCCTGTGTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCACCCCTCCACCTCT
TCACCCCCACTCACCAGTGTCCTCCACTGTCACATTGTAAGTGAAGTTTCA
GATAATAAAGTGCTTGCCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAGAATTAATTCCTGACCGTGCCTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCT
GGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGT
AATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTT
ACACCGCATACTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAG
CGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCC
CTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCCGGC
TTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCT
TTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG
CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT
AATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATT
CTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCT
GATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTTAACGTTTACAATTTTATG
GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCC
GCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCA
CCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTA
TAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAAGGAAGA
GTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTTG
CCTTCTGTTTTTGTCAACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGG
TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGA
AAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAAC
CATGAGTGATAAACAAGTGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTCCGCTTGATCG

TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTA
CTCTAGCTTCCC GGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA
ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTA
ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC
GAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTA
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGC
TCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTAC
CGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAA
CGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG
AGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA
GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGG
GAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTGCCAC
CTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATG
GAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTT
TGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC
GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCG
AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCC
GCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAA
AGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC
CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTAATTCC
CTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAT
AGTCCCGCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCC
ATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCG
CCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTT
TGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTCAAAGGAGTGCCTCGTGAGGCTCCGGT
GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGG
GAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG
GGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTTGCCG
CCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACG
GGTTATGGCCCTTTCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATT
CTTGATCCCGAGCTTCCGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGC
TTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGG
GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGAT

AAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC
AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG
GGCCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGA
GGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGC
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCC
TGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC
CGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGGCGCTCGGG
AGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAG
CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGAT
TAGTT

Danksagung