

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

Charakterisierung des Proteins DNAJC13, der Mutante DNAJC13(N855S) und der
Interaktion mit ATG9A

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

Vorgelegt von

Stella Vo
aus Idar-Oberstein

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

19. November 2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Morbus Parkinson und das endosomale System.....	3
2.1.1 Molekulare Grundlagen des Morbus Parkinson	3
2.1.2 Die Rolle von α -Synuklein in der Pathogenese des Morbus Parkinson.....	5
2.1.3 Überblick über das endosomale System.....	6
2.2 DNAJC13 und der Retromer-Komplex.....	10
2.2.1 Aufbau und Funktion des Retromer-Komplexes	10
2.2.2 Retromer und der WASH-Komplex.....	12
2.2.3 DNAJC13 als Retromer-assoziiertes Protein	13
2.2.4 Retromer-unabhängige Funktionen von DNAJC13.....	17
2.2.5 Assoziation von DNAJC13 und weiterer endosomaler Proteine mit dem Morbus Parkinson	18
2.3 Autophagie und die Rolle von ATG9A	23
2.3.1 Die Autophagie.....	23
2.3.2 Schnittstellen zwischen dem endosomalen und autophagischen System	27
2.3.3 Die Funktion von ATG9A im Prozess der Autophagie.....	30
2.3.4 Regulation der ATG9A-Aktivität.....	31
2.4 Zielsetzung.....	33
3 Material und Methoden	35
3.1 Materialien	35
3.1.1 Zelllinien und Bakterien	35
3.1.2 Plasmide	35
3.1.3 Antikörper.....	36
3.1.4 Chemikalien	38
3.1.5 Kits und Standards	38
3.1.6 Geräte	38
3.1.7 Software.....	39
3.2 Methoden.....	39
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	39
3.2.2 Molekulargenetische Methoden.....	43
3.2.3 Proteinanalytik.....	45
3.3 Statistische Auswertung	54
4 Ergebnisse	56
4.1 Aggregationsverhalten der ALS-assoziierten SOD1(G85R)-Mutante unter transientem DNAJC13-Knockdown	56
4.2 Aggregationsverhalten der Parkinson-assoziierten DNAJC13(N855S)-Mutante	58

4.3	Autophagischer Flux in stabilen DNAJC13-Knockout-Zelllinien	60
4.4	Einfluss des DNAJC13-KOs auf Komponenten des Retromer-Komplexes und des Autophagienetzwerks	60
4.4.1	Einfluss unter basalen Bedingungen	60
4.4.2	Einfluss unter Autophagie-stimulierenden Bedingungen	62
4.5	Untersuchung der Interaktion zwischen ATG9A und DNAJC13.....	64
4.5.1	Untersuchung einer funktionellen Interaktion zwischen ATG9A und DNAJC13	65
4.5.2	Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9	67
4.6	Die Rolle von DNAJC13 bei der Aufrechterhaltung der endosomalen Integrität bei verändertem endosomalem Milieu.....	71
4.6.1	Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Bafilomycin A ₁	71
4.6.2	Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Concanamycin A.....	76
4.6.3	Kompensation der Bafilomycin A ₁ -Effekte auf das endosomale System durch DNAJC13	78
5	Diskussion	83
5.1	Die Depletion von DNAJC13 begünstigt die Aggregation der ALS-assoziierten SOD1(G85R)-Mutante.....	83
5.2	Die DNAJC13(N855S)-Mutante neigt nicht zur Aggregation.....	84
5.3	Ein Knockout von DNAJC13 hat keinen Einfluss auf die Expression von Proteinen des Retromer-Komplexes oder des Autophagie-Systems.....	85
5.4	Es konnte weder eine funktionelle noch eine direkte Interaktion von DNAJC13 mit ATG9A nachgewiesen werden	87
5.5	DNAJC13 ist essenziell für die Aufrechterhaltung endosomaler Kompartimente bei Milieuänderungen.....	90
6	Zusammenfassung	96
7	Literaturverzeichnis	98
8	Danksagung	120

Abkürzungsverzeichnis

ALR	Autophagic lysosome reformation
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APG9L1/2	APG9-Like ½
Arp	Actin Related Protein
ATG	Autophagy-related protein
BAG3	Bcl-2-associated athanogene 3
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
C. elegans	Caenorhabditis elegans
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD-MPR	Cation-dependent Mannose 6-Phosphate Receptor
CI-MPR	Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
EEA1	Early Endosome Antigen 1
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERC	Endocytic Recycling Compartment
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDI	GDP-Dissoziations-Inhibitor
GLUT1	Glucose transporter 1
HRS	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
HSC	Heat shock cognate
HSP	Hitzeschockprotein
ILV	Intraluminal vesicles
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
kDa	Kilodalton
LAMP	Lysosomal Associated Membrane Protein
LIR	LC3-interacting region
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MAP1LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MTORC1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
MVB	Multivesicular body
PAS	Phagophore assembly site
PE	Phosphatidylethanolamin
PH	Pleckstrin-Homologie
pH	Potential of Hydrogen
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PX	Phox homology
Rab-GAP	Rab-GTPase-activating protein
RME-8	Receptor-mediated endocytosis 8
s.	siehe
SIAH	ubiquitin-protein isopeptide ligase seven in absentia homolog
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SNCA	Synuklein Alpha
SNX	Sorting nexin
STAM	Signal Transducing Adaptor Molecule

TBC1D5	TBC1 Domain Family Member 5
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
u.a.	unter anderem
UBL	Ubiquitin-like protein
UCH-L1	Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase L1
UIM	Ubiquitin-interacting motif
ULK	Unc-51-like kinase
V-ATPase	vakuoläre ATPase
VPS	Vacuolar protein sorting
WASH	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homolog
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reifungsprozess des frühen Endosoms zum späten Endosom.....	8
Abbildung 2: Aufbau der V-ATPase.....	9
Abbildung 3: Die Clathrin-Dynamik am Endosom.....	15
Abbildung 4: DNAJC13 als Bindeglied zwischen dem Retromer- und WASH-Komplex.....	16
Abbildung 5: Parkinson-assoziierte Proteine im endosomalen System.....	19
Abbildung 6: Die Phasen der Makroautophagie.....	24
Abbildung 7: Aggregationsverhalten von SOD1-Varianten unter transientem DNAJC13-Knockdown.....	57
Abbildung 8: Aggregationsverhalten der Parkinson-assoziierten DNAJC13(N855S)-Mutante im Vergleich zum Wildtyp.....	59
Abbildung 9: Autophagischer Flux in stabilen DNAJC13-Knockout-Zelllinien.....	60
Abbildung 10: Einfluss des DNAJC13-Knockouts auf Komponenten des Retromer-Komplexes und des Autophagie-Netzwerks unter basalen Bedingungen	62
Abbildung 11: Einfluss des DNAJC13-Knockouts auf Komponenten des Retromer-Komplexes und des Autophagie-Netzwerks unter Autophagie-stimulierenden Bedingungen.....	64
Abbildung 12: Transfektionseffizienz von HA-ATG9 in naiven HEK293-T-Zellen und dem DNAJC13-Knockout-Klon H11.....	66
Abbildung 13: Untersuchung einer funktionellen Interaktion zwischen ATG9A und DNAJC13.....	67
Abbildung 14: Untersuchung der direkten Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A mittels Co-IP.....	70
Abbildung 15: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A ₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klone B3 und G4 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und EEA1.....	73
Abbildung 16: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A ₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klone B3 und G4 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und dem Transferrin-Rezeptor (TfR).....	74
Abbildung 17: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A ₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klone B3 und G4 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und TGN46.....	75
Abbildung 18: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A ₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klone B3 und G4 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR).....	76
Abbildung 19: Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Concanamycin A als alternativer Inhibitor der vakuolären H ⁺ -ATPase und Auswirkung auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und LC3 in naiven HEK293-A-Zellen und dem DNAJC13-Knockout-Klon B3.....	78
Abbildung 20: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A ₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klon B3 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und SNX1.....	80
Abbildung 21: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A ₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klon B3 auf die intrazelluläre Verteilung von VPS35 und SNX1.....	81
Abbildung 22: Einfluss der Bafilomycin A ₁ -Behandlung und der Depletion von DNAJC13 auf verschiedene Proteine im endosomalen und autophagischen System.....	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PARK-Gene und ihre klinische Ausprägung	4
---	----------

1 Einleitung

Die Bevölkerung in Deutschland und vielen anderen Industrienationen wird immer älter. Betrug der Anteil der über 65-Jährigen im Jahr 1991 noch 15%, ist dieser seitdem bis zum Jahr 2022 auf über 22% angestiegen (Statistisches Bundesamt, zitiert nach de.statista.com, 2023) und dieser Trend wird sich auch in den kommenden Jahren und Jahrzehnten weiter fortsetzen. Grund dafür ist neben dem Geburtenrückgang unter anderem die steigende Lebenserwartung, welche sich auch auf die Prävalenz von Krankheiten, insbesondere von altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen auswirkt. Hierzu zählt auch der Morbus Parkinson, dessen Prävalenz in Deutschland mittlerweile auf über 400.000 Fälle geschätzt wird (Heinzel et al., 2018). Die verschiedenen Ätiologien der Erkrankung werden unter dem Begriff „Parkinson-Syndrom“ zusammengefasst, allen gemeinsam ist jedoch, dass die dopaminerge Neurotransmission zunehmend beeinträchtigt ist, was sich auf motorische, aber auch psychische und vegetative Prozesse auswirkt. In den meisten Fällen ist die Genese der Parkinson-Symptomatik unklar, weshalb diese auch als idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS) bezeichnet werden. Es gibt jedoch auch eine Gruppe familiär auftretender Formen dieser Erkrankung, welche auf Defekten bestimmter Gene beruht, die unter anderem an intrazellulären Abbauprozessen, insbesondere der Autophagie, beteiligt sind. Sind diese Abbauprozesse gestört, kommt es zur Akkumulation krankheitsassoziierter Proteine wie dem α -Synuklein, das in aggregierter Form in degenerierten dopaminergen Neuronen nachgewiesen wurde (Baba et al., 1997).

Eine seltene, autosomal-dominant vererbare Variante der Parkinson-Erkrankung wird auf das Protein DNAJC13 zurückgeführt (Vilariño-Güell et al., 2014). Bisher wurden mehrere Parkinson-assoziierte Mutationen dieses Proteins in Erkrankten identifiziert, darunter die N855S- und die R903K-Mutation (Vilariño-Güell et al., 2014; Gustavsson et al., 2015; Gagliardi et al., 2018; Gialluisi et al., 2021). DNAJC13 ist eng mit dem sogenannten Retromer-Komplex als Teil des lysosomal-endosomalen Systems assoziiert und ist Teil eines Regulationssystems, welches den Transport von Makromolekülen zum Lysosom oder retrograd zurück zur Plasmamembran oder dem Trans-Golgi-Netzwerk koordiniert (Popoff et al., 2009; Shi et al., 2009; Freeman et al. 2014). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass DNAJC13 auch im Netzwerk der Autophagie eine wichtige Rolle spielt und dabei mit dem Autophagie-assoziierten Protein ATG9A interagiert (Besemer et al., 2021). ATG9A ist für die Bildung der

Phagophore, welche am Ende des autophagischen Degradationsweges abzubauenen Cargo umschließt und als Autophagosom dem Lysosom zuführt, unerlässlich (Yorimitsu & Klionsky, 2005).

Gegenstand dieser Dissertation ist die weitere Charakterisierung der Funktion von DNAJC13 im endosomalen System, insbesondere auch bei Veränderung des endosomalen Milieus, sowie die Untersuchung des funktionellen Zusammenhangs zwischen DNAJC13 und ATG9A.

2 Literaturdiskussion

2.1 Morbus Parkinson und das endosomale System

2.1.1 Molekulare Grundlagen des Morbus Parkinson

Das klinische Erscheinungsbild des Morbus Parkinson bzw. der Gruppe der Parkinson-Syndrome wurde erstmals 1817 von dem britischen Arzt James Parkinson beschrieben, nach dem diese neurodegenerative Erkrankung später benannt wurde (Parkinson, 1817). Es setzt sich klassischerweise aus den Symptomen Rigor, Ruhetremor und Akinese sowie posturale Instabilität zusammen, die von weiteren fakultativen Symptomen wie psychiatrischen Störungen sowie Störungen des autonomen Nervensystems und der Sinneswahrnehmung begleitet sein können. Unter dem Begriff Morbus Parkinson im engeren Sinne versteht man das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS). Je nach Schwerpunkt der Symptomatik wird beim IPS zwischen dem akinetisch-rigiden Typ, bei dem die Bewegungsstörung im Vordergrund steht, dem Tremordominanz-Typ mit vorrangig vorliegendem Ruhetremor und dem Äquivalenz-Typ unterschieden, bei dem Rigor, Tremor und Akinese gleichermaßen ausgeprägt sind.

Eine weitere Gruppe stellen die familiären Parkinson-Syndrome dar, welche pathophysiologisch auf monogenetischen Defekten beruhen. Bisher sind 23 Parkinson-assoziierte Genmutationen in unterschiedlichen Loci bekannt (PARK1-23), die autosomal-rezessiv oder -dominant vererbt werden (Kouli et al., 2018). Klinisch ähneln sie dem IPS, die Parkinson-Symptome können dabei in unterschiedlicher Ausprägung vorliegen. Der Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation sowie der jeweilige Verlauf sind individuell und abhängig von dem jeweiligem Gendefekt.

PARK	Gene	Inheritance	Description	Clinical Features
PARK1 PARK4	SNCA	AD	α -synuclein	Ranging from classical PD to early-onset cases with dementia, autonomic dysfunction, and rapid progression
PARK2	PRKN	AR	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase	Early-onset PD, slow progression, often features of dystonia
PARK5	UCHL1	AD	ubiquitin C-terminal hydrolase L1	Classical PD - only one family, findings not since replicated
PARK6	PINK1	AR	PTEN-induced putative kinase 1	Early-onset PD, slow progression
PARK7	DJ-1	AR	Parkinsonism-associated deglycase	Early-onset PD, slow progression
PARK8	LRRK2	AD	Leucine-rich repeat kinase 2	Classical PD with less frequent dementia and slower progression
PARK9	ATP13A2	AR	Cation-transporting ATPase 13A2	Early-onset (adolescence), atypical parkinsonism with dementia, spasticity and supranuclear palsy (Kufor-Rakeb syndrome)

PARK11	GIGYF2	AD	GRB10 interacting GYF protein 2	Classical PD
PARK13	HTRA2	AR	HtrA serine peptidase 2	Classical PD
PARK14	PLA2G6	AR	Calcium-independent phospholipase A2 enzyme	Early onset with atypical features (dystonia parkinsonism)
PARK15	FBX07	AR	F-box protein 7	Early onset with atypical features (pallido-pyramidal syndrome)
PARK17	VPS35	AD	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Classical PD
PARK18	EIF4G1	AD	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Classical PD
PARK19	DNAJC6	AR	HSP40 Auxilin	Early-onset PD, slow progression
PARK20	SYNJ1	AR	Synaptojanin 1	Parkinsonism with dystonia and cognitive decline
PARK21	DNAJC13	AD	Receptor-mediated endocytosis 8 (RME-8)	Classical PD
PARK23	VPS13C	AR	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	Early-onset PD, rapid progression

AD: autosomal dominant, AR: autosomal recessive. PARK3 PARK10, PARK12, PARK16, and PARK22 are considered risk factors or the genes have not been identified yet and are not included in this table.

Tabelle 1: PARK-Gene und ihre klinische Ausprägung (verändert nach Kouli et al., 2018).

Zudem können Parkinson-Plus-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen auftreten, unter denen man die Multisystematrophie, die kortikobasale Degeneration, die Lewy-Body-Demenz und die progressive supranukleäre Blickparese zusammenfasst, sowie sekundäre Parkinson-Syndrome, die z.B. metabolisch bedingt oder medikamentös induziert sind.

Im Rahmen dieser Dissertation wird PARK21 untersucht, welches das Protein DNAJC13 betrifft und dessen Mutationen zu einer Parkinson-Erkrankung mit tendenziell späterem Krankheitsbeginn („*late onset*“) führen (Vilariño-Güell et al., 2014). Dies wird in Kapitel 2.2.2 genauer thematisiert.

Pathophysiologisch beruht der Morbus Parkinson auf dem Untergang dopaminerger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra, welche Bestandteil der im Telencephalon gelegenen Basalganglienschleife ist. Diese dient der Steuerung und Regulation von Bewegungsabläufen. Die Pars compacta der Substantia nigra fördert die Motorik, indem sie den Neurotransmitter Dopamin ausschüttet, welcher über D2-Rezeptoren einen hemmenden Einfluss auf das Striatum ausübt. Das Striatum hemmt über den inhibitorisch wirkenden Neurotransmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) wiederum das laterale Pallidum, das selbst Motorik-aktivierend wirkt. Die Motorik-fördernde Wirkung der Substantia nigra wird folglich durch eine Hemmung der Motorik-hemmenden Wirkung des Striatums vermittelt. Bei Degeneration der Neurone in der Substantia nigra nimmt dieser Effekt durch den resultierenden Dopaminmangel ab und die Bewegung wird gehemmt, da der Einfluss des Striatums überwiegt. Dies liegt den

sogenannten Minussymptomen zugrunde, zu denen die Brady- bzw. Akinese und posturale Instabilität durch Störung der Haltereфлекse gezählt werden. Zugleich kommt es durch den Dopaminmangel zu einem relativen Acetylcholin-Überschuss, was zu den Plusssymptomen Rigor und Tremor führt.

2.1.2 Die Rolle von α -Synuklein in der Pathogenese des Morbus Parkinson

Histopathologisch lässt sich nicht nur eine Degeneration der dopaminergen Zellen in der Pars compacta der Substantia nigra feststellen, sondern auch runde, eosinophile Einschlusskörperchen in den Perikarya der betroffenen Zellen. Diese sogenannten Lewy-Körperchen bestehen hauptsächlich aus unlöslichem, aggregiertem α -Synuklein (Baba et al., 1997). Daher werden die Parkinson-Syndrome, aber auch die Multisystematrophie und die Lewy-Body-Demenz unter dem Oberbegriff der sogenannten Synukleinopathien zusammengefasst.

Die Aggregation von α -Synuklein wird durch verschiedene Faktoren begünstigt, z.B. durch Mutation. Zwei der bisher bekannten 23 Parkinson-assoziierten Genloci betreffen das SNCA-Gen, welches für α -Synuklein codiert, beispielsweise die autosomal-dominant vererbte A53T-Mutation (Polymeropoulos et al., 1997). Diese begünstigt die Bildung von Amyloid-ähnlichen α -Synuklein-Fibrillen, welche gegen den Abbau durch Proteasen resistent sind (Conway et al., 2000).

Doch auch erhöhte Spiegel des Wildtyp-Proteins, beispielsweise aufgrund einer Genduplikation, können zu einer Akkumulation von α -Synuklein führen (Eriksen et al., 2003). Dieses ist teilweise monoubiquitiniert (Hasegawa et al., 2002). Das entsprechende Ubiquitin-Molekül wird durch das Enzym SIAH (*ubiquitin-protein isopeptide ligase seven in absentia homolog*) übertragen und fördert die Bildung von unförmigen, neurotoxischen Aggregaten (Rott et al., 2008), die sich morphologisch von dem filamentösen α -Synuklein unterscheiden. Akkumuliertes α -Synuklein wirkt neurotoxisch, da es bei dessen Aufnahme in Mikroglia mittels Phagozytose zur Freisetzung freier Sauerstoffradikale kommt (Zhang et al., 2005). Zudem wurde beobachtet, dass aggregiertes α -Synuklein auf benachbarte Zellen übergreifen kann, vergleichbar mit dem Pathomechanismus von Prionproteinen. Nach ihrer Aufnahme mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose (Desplats et al., 2009) sind α -Synuklein-Fibrillen imstande, eine Konformationsänderung von noch löslichem α -Synuklein in

ebenfalls unlösliche, fibrilläre Strukturen zu bewirken. Dies könnte eine Ursache für die Krankheitsprogression des Morbus Parkinson darstellen (Luk et al., 2009).

α -Synuklein ist sowohl im Zellkern als auch in der präsynaptischen Endigung von Neuronen lokalisiert (Maroteaux et al., 1988). Die Funktion dieses Proteins ist noch nicht vollständig geklärt, es ist jedoch u.a. am Transport von synaptischen Vesikeln und damit an der Neurotransmission beteiligt, vor allem an der Clathrin-vermittelten Endozytose zur Wiederaufnahme von Transmittern an der Präsynapse (Vargas et al., 2014).

Am Abbau von α -Synuklein sind sowohl das Ubiquitin-Proteasom-System als auch das endolysosomale bzw. autophagische System (Webb et al., 2003) beteiligt. Das Proteasom ist in seiner proteolytischen Aktivität in nigralen Zellen bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom nachweislich eingeschränkt (McNaught & Jenner, 2001) und spielt auch bei familiären Parkinson-Syndromen eine Rolle, da die Mutation PARK2 das Enzym Parkin, eine Ubiquitin-Protein-Ligase (Kitada et al., 1998) und PARK5 die Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase L1 (UCH-L1) (Leroy et al., 1998) betrifft, die beide Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems sind.

Der Abbau über das Autophagie-System spielt ebenfalls eine zentrale Rolle. Eine Hemmung der Autophagosombildung durch 3-Methyladenin bewirkt eine Erhöhung der α -Synuklein-Spiegel und damit der Aggregatbildung (Rott et al., 2008). Dieser Effekt ist bei der A53T-Mutante im Vergleich zum Wildtyp noch ausgeprägter, was darauf hinweist, dass die Autophagie bzw. das endolysosomale System vor allem bei dem Abbau von aggregiertem α -Synuklein eine wichtige Rolle spielen (Webb et al., 2003; Lee et al., 2008). Umgekehrt fördert eine Induktion der Autophagie über Rapamycin effektiv den Abbau von α -Synuklein, sowohl des Wildtyps als auch der Mutante (Webb et al., 2003).

2.1.3 Überblick über das endosomale System

Mehrere Parkinson-assoziierte Mutationen betreffen Komponenten des endosomalen Systems, was zeigt, dass dieses eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung einnimmt. Ist der endosomale Abbau an verschiedenen Stellen gestört, begünstigt dies die Akkumulation von α -Synuklein in Lewy-Körperchen. Doch auch umgekehrt kann ein Übermaß an α -Synuklein das endosomale System in seiner Funktion beeinträchtigen.

Moleküle, die mittels Rezeptor- bzw. Clathrin-vermittelter Endozytose in die Zelle aufgenommen werden sollen, werden durch Einstülpung der Zellmembran in Vesikel eingeschlossen. Rab5, eine Rab-GTPase, ist an der Bildung von Clathrin-beschichteten Vesikeln beteiligt (McLauchlan et al., 1998) und reguliert anschließend den Transport der Vesikel zum frühen Endosom sowie die Fusion mit diesem (Bucci et al., 1992; Rubino et al., 2000). Dies unterliegt unter anderem auch der Kontrolle durch das Protein EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*), ein Marker des frühen Endosoms, das den gerichteten Transport zu diesem Kompartiment koordiniert (Rubino et al., 2000).

Ausgehend vom frühen Endosom kann das Cargo-Molekül unterschiedliche Wege einschlagen, das frühe Endosom stellt somit einen Knotenpunkt des Transports insbesondere von Membranproteinen dar. Proteine im frühen Endosom können zum Lysosom weitertransportiert werden, um dort abgebaut zu werden. Es kann jedoch auch zurück zur Zellmembran transportiert werden, entweder auf direktem Wege, vermittelt durch Rab4 (van der Sluijs et al., 1992), oder über das Recycling-Endosom bzw. das ERC (*Endocytic Recycling Compartment*). Das ERC ist ein perinukleär lokalisierter Endosom-Komplex, der zum frühen Endosom zählt. Es sortiert Cargo und reguliert das Recycling zur Zellmembran unter anderem über Rab11 (Ren et al., 1998).

Der lysosomale Abbau von Proteinen und anderen Makromolekülen über das endosomale System setzt die Reifung des frühen Endosoms zum späten Endosom voraus. Dieser Schritt geht mit einigen strukturellen Veränderungen einher (Abbildung 1). Zum einen wird der abzubauenende, ubiquitinierte Cargo vom sogenannten ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Komplex erkannt (Hurley, 2010). Der ESCRT ist in der Membran des frühen Endosoms lokalisiert und leitet den Einschluss von Cargo in Vesikeln im endosomalen Lumen (*intraluminal vesicles* oder ILV) in die Wege (Katzmann et al., 2001). Diese bilden die sogenannten MVBs (*multivesicular bodies*) (Felder et al., 1990), welche das späte Endosom darstellen.

Zum anderen findet während des Reifungsprozesses ein Austausch der Rab-GTPase Rab5 durch Rab7 statt, was mit einer Verlagerung des Cargos in Richtung Zellinneres und damit zum lysosomalen Kompartiment einhergeht (Rink et al., 2005). Rab7 ist für die Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom erforderlich (Vanlandingham & Ceresa, 2009).

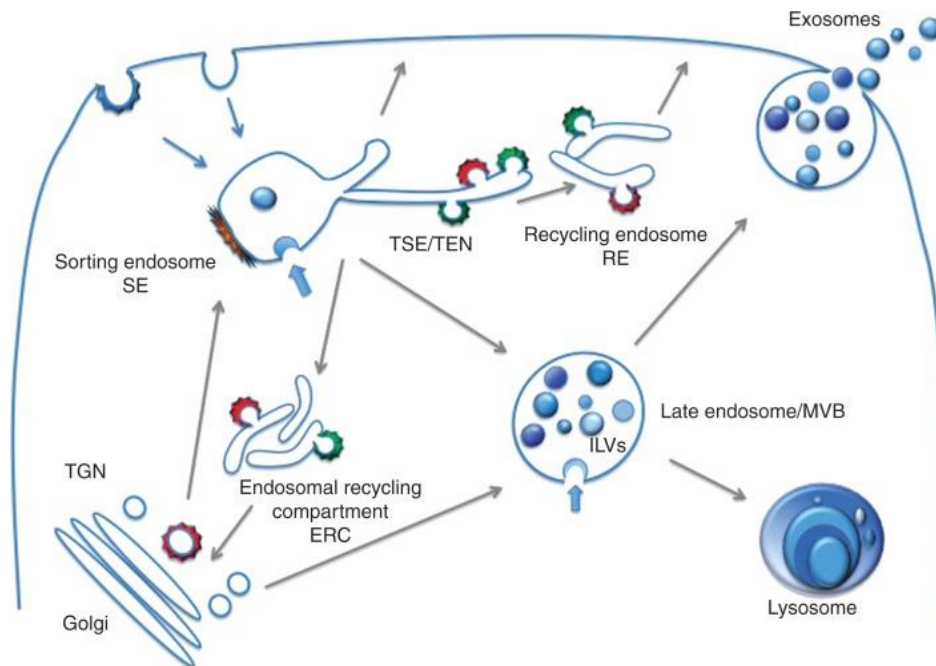


Abbildung 1: Reifungsprozess des frühen Endosoms zum späten Endosom. TSE = tubular sorting endosome, TEN = tubular endosomal network (Klumperman & Raposo, 2014).

Außerdem kommt es während der weiteren Reifung des späten Endosoms zu einer endoluminalen Ansäuerung. Der pH-Wert des frühen Endosoms liegt bei etwa 6,2-6,3, während er im späten Endosom bei etwa 5,2-5,3 liegt (Maxfield & Yamashiro, 1987). Der leicht saure pH im frühen Endosom dient vor allem der Separation von endozytierten Rezeptoren von ihren Liganden, damit letztere zum Lysosom transportiert und abgebaut werden können, während die Rezeptoren über ihren jeweiligen Recycling-Mechanismus an die Zelloberfläche zurückzukehren können (Yamashiro & Maxfield, 1984).

Dies ist auch für den Transport neu synthetisierter lysosomaler Enzyme vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zum Lysosom relevant. Diese sind zunächst an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6PR) gekoppelt, wobei diese Bindung durch das saure Milieu im endosomalen System aufgehoben wird. So können die sauren Hydrolasen das Lysosom als Zielkompartiment erreichen und die Rezeptoren zum TGN zurückkehren (Sahagian & Neufeld, 1983). Ein pathogenetisch relevanter Ligand einer speziellen Form des M6PR, der CI-MPR (*cation-independent mannose 6-phosphate receptor*), ist das lysosomale Enzym Cathepsin D, welches für den Abbau von α -Synuklein verantwortlich ist (Sevlever et al., 2008).

Der erniedrigte endoluminale pH-Wert ist jedoch auch für die Bildung von Vesikeln im frühen Endosom, über die der abzubauen Cargo dem weiteren endosomalen Abbau

zugeführt wird, erforderlich (Clague et al., 1994). Das saure Milieu im späten Endosom ist Voraussetzung für die Aktivierung der dort gespeicherten hydrolytischen Enzyme, da neben dem Lysosom auch bereits das späte Endosom am Abbau des Cargos beteiligt ist (Tjelle et al., 1996). Im Lysosom beträgt der pH schließlich ca. 4,5, wobei dieser Wert Schwankungen in den alkalischeren Bereich unterliegen kann, um der Bandbreite an pH-Optima der lysosomalen Enzyme gerecht zu werden (Butor et al., 1995).

Verantwortlich für die Ansäuerung des endosomalen Lumens während des Reifungsprozesses ist die vakuoläre ATPase oder V-ATPase, eine Protonenpumpe, welche in der endosomalen Membran lokalisiert ist (Yamashiro & Maxfield, 1984). Sie setzt sich aus den zwei funktionellen Domänen V_1 und V_0 zusammen (Abbildung 2). Die dem Zytoplasma zugewandte V_1 -Untereinheit ist für die Hydrolyse von ATP-Molekülen verantwortlich, während die membranständige V_0 -Untereinheit die freigesetzte Energie zum Transfer von Protonen über die Membran nutzt. Dies führt zu einer pH-Senkung im endosomalen Lumen (Arai et al., 1988; Forgac, 2007).

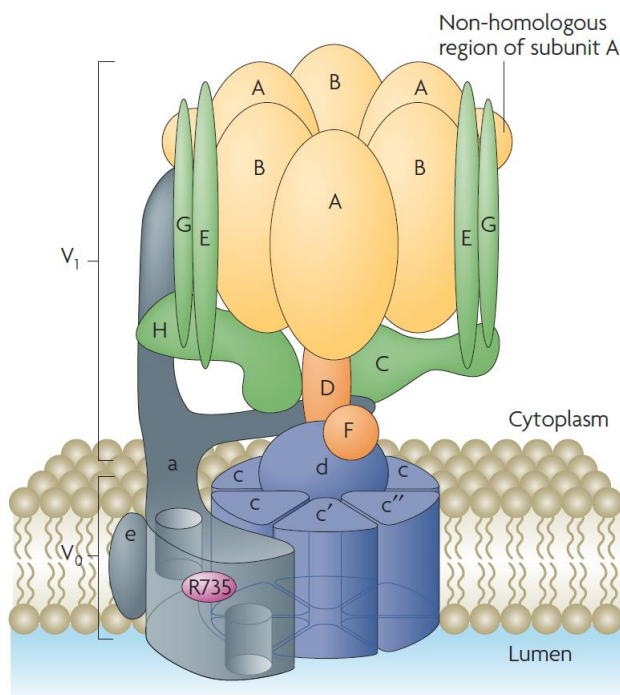


Abbildung 2: Aufbau der V-ATPase (Forgac, 2007).

Die V-ATPase ist nur dann funktionsfähig, wenn die V_1 - und V_0 -Domänen miteinander gekoppelt sind, sie können jedoch auch reversibel voneinander dissoziieren. Die Aktivität der V-ATPase bzw. der endoluminale pH-Wert werden folglich unter anderem durch das Ausmaß an gekoppelten V_1 - und V_0 -Domänen bestimmt (Kane, 1995). Im

Verlauf des Reifungsprozesses vom frühen zum späten Endosom kommt es zu einer Anreicherung von V₁-Domänen und damit einer höheren Anzahl an aktiven V-ATPasen in Form von V₁-V₀-Komplexen (Lafourcade et al., 2008). Auf dieses Phänomen ist die Ansäuerung des Endosoms zurückzuführen.

2.2 DNAJC13 und der Retromer-Komplex

2.2.1 Aufbau und Funktion des Retromer-Komplexes

Der Retromer-Komplex ist ein Proteinkomplex, welcher funktionell zwischen das endosomale System und das Trans-Golgi-Netzwerk geschaltet ist und an der Sortierung und dem retrograden Transport von endosomalem Cargo bzw. Membranproteinen zum TGN sowie der Plasmamembran beteiligt ist (Seaman et al., 2004; Temkin et al., 2011).

Der Retromer-Komplex von Säugetieren besteht aus zwei Untereinheiten, zum einen aus einem Proteintrimer, welches für die Cargo-Selektion verantwortlich ist, zum anderen aus einem Proteindimer, das die Formation von Vesikeln bzw. Tubuli initiiert (Seaman et al., 1997; Horazdovsky et al., 1997; Seaman et al., 1998).

Das Trimer besteht aus den VPS (*vacuolar protein sorting*)-Proteinen VPS35, VPS29 und VPS26 (Seaman et al., 1998), die Cargo identifizieren, sortieren und in Vesikel leiten. VPS35 ist das zentrale Glied des VPS-Trimers. Mit seinem C-terminalen Ende bindet es an VPS29 und N-terminal an VPS26 (Shi et al. 2006; Gokool et al., 2007; Hierro et al., 2007). VPS26 liegt in zwei Isoformen vor, welche zwei verschiedene Retromer-Komplex-Typen mit unterschiedlicher Funktion definieren. Während der Retromer-Komplex mit VPS26A den eingangs beschriebenen, klassischen Komplex darstellt, der vor allem mit dem frühen Endosom interagiert und für den retrograden Transport zum TGN zuständig ist, ist der VPS26B-Retromer-Komplex an der Plasmamembran und dem späten Endosom lokalisiert und scheint an der Regulation von intrazellulären Transportprozessen zur Plasmamembran beteiligt zu sein (Kerr et al., 2005; Bugarcic et al., 2011; Bugarcic et al., 2015). VPS29 ist zusammen mit VPS35 für die Interaktion des VPS-Trimers mit dem Membran-formenden SNX-Dimer erforderlich (Collins et al., 2005).

Das Retromer-Dimer setzt sich aus den SNX (*sorting nexin*)-Proteinen SNX1 oder alternativ SNX2, gepaart mit SNX5 oder SNX6, zusammen (Carlton et al. 2004;

Wassmer et al., 2007; van Weering et al., 2012). Diese SNX-Proteine tragen an ihrem C-terminalen Ende eine sogenannte BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs)-Domäne, die aufgrund ihrer gebogenen Form andere gekrümmte Membranbereiche detektieren und binden kann. Zudem ist sie auch selbst an der Umformung von Membranen zur Bildung von Tubuli und Vesikeln im Rahmen endosomaler Transportprozesse beteiligt (Horazdovsky et al., 1997; Carlton et al., 2004; Peter et al., 2004).

Das SNX-Dimer besitzt neben seiner BAR-Domäne ebenfalls eine PX (*phox homology*)-Domäne, über die es an PI3P in der endosomalen Membran andockt (Cozier et al., 2002; Carlton et al., 2004).

Die Koordination des Retromer-Komplexes zum Endosom erfolgt für die beiden Untereinheiten unabhängig voneinander. Die Rekrutierung des VPS-Trimers wird unter anderem durch die Rab-GTPase Rab7A und SNX3 vermittelt (Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009; Harterink et al., 2011; Harrison et al., 2014).

Rab7A erreicht dies durch Bindung an VPS35, wobei VPS35 nur zur endosomalen Membran rekrutiert werden kann, wenn es mit VPS26 assoziiert ist (Priya et al., 2015). Die Aktivität von Rab7A wird dabei durch das Rab-GAP (*GTPase-activating protein*) TBC1D5 (*TBC1 Domain Family Member 5*) reguliert. Dieses interagiert mit VPS29 (Harbour et al., 2010; Jia et al., 2016) und kann die Assoziation des Retromer-Komplexes mit dem Endosom durch Überführen von Rab7A in dessen inaktive Form herunterregulieren (Seaman et al., 2009; Jia et al., 2016; Jimenez-Orgaz et al., 2018).

SNX3 bindet ebenfalls an VPS35 und koordiniert zusammen mit Rab7A den Retromerkomplex zum Endosom (Harrison et al., 2014). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass SNX3 auch bei der Identifizierung von Cargo eine Rolle spielt (Lucas et al., 2016).

Während der Reifung zum späten Endosom werden PI3P zunehmend durch PI3P₂ und Rab5 durch Rab7 ersetzt, sodass der Aktivitätsbereich des Retromer-Komplexes während des Übergangs vom frühen zum späten Endosom angesiedelt wird (Rojas et al., 2008; Seaman, 2012). Hierfür spricht auch, dass die Ansäuerung des endosomalen Lumens während des Reifungsprozesses bereits begonnen haben muss, da die Dissoziation von Rezeptoren und ihren Liganden ein saures Milieu voraussetzt (Sahagian & Neufeld, 1983).

Eine wichtige Funktion des Retromer-Komplexes besteht im retrograden Transport des CI-MPR zurück zum TGN, nachdem dieser seinen Liganden, ein lysosomales Enzym

wie z.B. Cathepsin D, zum Endosom transportiert hat (Arighi et al., 2004; Seaman, 2004). Voraussetzung für den korrekten Transport von endosomalem Cargo ist dessen Identifizierung durch das VPS-Trimer. Diese erfolgt anhand bestimmter Domänen, die von VPS35 erkannt werden (Nothwehr et al., 2000).

Die Rab-GTPase Rab7 ist wie bereits erwähnt an der Rekrutierung des Retromer-Komplexes beteiligt und wird durch das mit dem VPS-Trimer assoziierte Rab-GAP TBC1D5 herunterreguliert. Hierin besteht eine weitere wichtige Funktion des Retromers, da dieses das Bindeglied zwischen Rab7 und TBC1D5 darstellt, ohne das sie nicht miteinander interagieren können (Jimenez-Orgaz et al., 2018). Fehlt der regulierende Einfluss von TBC1D5 auf die Aktivität von Rab7, beeinträchtigt dies dessen Mobilität zwischen verschiedenen Kompartimenten im lysosomalen System. Dies hat unter anderem auch Folgen für das autophagische System (s. Kapitel 2.3.1 und 2.3.2).

2.2.2 Retromer und der WASH-Komplex

Der Retromer-Komplex ist eng mit dem sogenannten WASH-Komplex (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homolog*) assoziiert, welcher sich aus den Proteinen WASH1, KIAA1033, Strumpellin, FAM21 und CCDC53 zusammensetzt (Derivery et al., 2009; Harbour et al., 2010). Der Retromer-Komplex rekrutiert den WASH-Komplex über VPS35 zum Endosom (Harbour et al., 2010). Dabei bindet VPS35 in Assoziation mit VPS29 an das Protein FAM21 über dessen C-terminale Schwanzdomäne (Harbour et al., 2012; Jia et al., 2012; Helfer et al., 2013).

WASH1 reguliert über Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (*Actin Related Protein 2/3 complex*) die Bildung von Tubuli und Aktinnetzwerken an Endosomen (Derivery et al., 2009; Gomez & Billadeau, 2009; Harbour et al., 2010), was dazu dient, endosomales Cargo in bestimmten Mikrodomänen zu sammeln, zu sortieren und über Koordination in verschiedene Tubuli ihrem korrekten Transportziel zuzuführen (Puthenveedu et al., 2010).

Wie der Retromer-Komplex spielt der WASH-Komplex eine wichtige Rolle bei dem retrograden Transport von Membranproteinen wie z.B. dem CI-MPR und ist dabei für die Rekrutierung zum Endosom und der Selektion von Cargo auf den Retromer-Komplex angewiesen. Der WASH-Komplex koordiniert endosomalen Cargo allerdings

nicht zum TGN, sondern zur Zellmembran (Gomez & Billadeau, 2009; Harbour et al., 2012).

Zudem sind sowohl der Retromer- als auch der WASH-Komplex neben dem endosomalen auch in das autophagische System eingebunden. Hierauf wird in den Kapiteln 2.3.1 und 2.3.2 näher eingegangen.

2.2.3 DNAJC13 als Retromer-assoziiertes Protein

RME-8 (*Receptor-mediated endocytosis 8*), im Menschen auch als DNAJC13 bezeichnet, ist ein Protein, welches an mehreren Stellen den retrograden Transport von endosomalem Cargo zum TGN reguliert und insbesondere mit dem Retromer-Komplex und dem WASH-Komplex interagiert, aber auch in der Autophagie eine wichtige Rolle spielt.

Das auf Chromosom 3q22.1 kodierte (Girard et al., 2005) und ubiquitär exprimierte DNAJC13 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 230 kDa, eine Länge von 2243 Aminosäuren und trägt eine namensgebende zentrale J-Domäne von einer Länge von 60 Aminosäuren, die ein HPD-Kern-Tripeptid (H=Histidin, P=Prolin, D=Asparaginsäure) enthält (Zhang et al., 2001). Außerdem trägt DNAJC13 zu beiden Seiten des Kern-Tripeptids je zwei, also insgesamt vier IWN-Domänen (I=Isoleucin, W=Tryptophan, N=Asparagin) mit einer Länge von je 90 Aminosäuren, die über verschiedene Spezies konserviert sind (Zhang et al., 2001).

DNAJC13 ist ein hoch konserviertes Protein und wurde in verschiedenen vielzelligen Spezies nachgewiesen, u.a. in *C. elegans*, *Drosophila* und in Säugern (Zhang et al., 2001). Es zählt aufgrund seiner J-Domäne zu den HSP40 (*heat shock protein 40 kDa*)- oder DNAJ-Proteinen, die als Co-Chaperone im Zusammenspiel mit den Hitzeschockproteinen unter anderem an der Proteinfaltung beteiligt sind (Wild et al., 1992). Für DNAJC13 wurde eine Interaktion mit HSC70 bzw. HSP70 nachgewiesen (Shi et al., 2009).

DNAJC13 besitzt zudem drei N-terminale PH (Pleckstrin-Homologie)-ähnliche Domänen, die insgesamt eine Spanne von 400 Aminosäuren umfassen (Norris et al., 2022). Über diese bindet es an PI3P in der endosomalen Membran (Fujibayashi et al., 2008; Xhabija et al., 2011; Xhabija & Vaccratsis, 2015).

In der Immunfluoreszenzfärbung weist DNAJC13 intrazellulär eine punktförmig disseminierte Verteilung mit perinukleärer Akkumulation auf und kolokalisiert dabei mit EEA1 als Marker für das frühe Endosom, dem Recycling-Endosom und dem CI-MPR, wohingegen keine Kolokalisation mit dem TGN oder dem Lysosom besteht (Girard et al., 2005, Fujibayashi et al., 2008). Bezüglich des späten Endosoms bestehen wahrscheinlich Spezies-spezifische Unterschiede, da in COS-7-Zellen aus Affen und in *Drosophila* eine Kolokalisation beschrieben wurde (Girard et al., 2005; Chang et al., 2004), in menschlichen HeLa-Zellen und *C. elegans* hingegen nicht (Fujibayashi et al., 2008; Shi et al., 2009).

DNAJC13 ist hauptsächlich mit dem frühen Endosom assoziiert und koordiniert hier auf verschiedenen Ebenen den retrograden Transport. Zum einen gibt es einige Hinweise darauf, dass DNAJC13 zusammen mit HSC70 am „Clathrin-uncoating“ beteiligt ist, also der Clathrin-Dissoziation von Clathrin-beschichteten Vesikeln (Shi et al., 2009; Popoff et al., 2009). Die Funktion von Clathrin am frühen Endosom ist dem Einsatz des Retromer-Komplexes vorgeschaltet und spielt bei der Vorsortierung und Anreicherung von Cargo in bestimmten Domänen eine wichtige Rolle (Abbildung 3). Sie initiiert die Bildung von endosomalen Tubuli, bevor diese Funktion durch den Retromer-Komplex übernommen wird (Raiborg et al., 2006; McGough & Cullen, 2013).

DNAJC13 reguliert diesen Prozess in Interaktion mit HSC70 bzw. HSP70 (Shi et al., 2009; Popoff et al., 2009). HSC70 ist eine Clathrin-uncoating ATPase (Chappell et al., 1986), die von DNAJC13, aber auch von anderen DNAJ-Proteinen wie z.B. DNAJC6 zum frühen Endosom rekrutiert wird (Ungewickell et al., 1995). Dabei bindet sie an deren J-Domäne und reguliert das Gleichgewicht zwischen in der endosomalen Membran gebundenem und frei im Zytosol vorliegendem Clathrin (Shi et al., 2009, Popoff et al., 2009; Xhabija & Vaccratsis, 2015).

Clathrin ist in Assoziation mit dem Protein HRS (*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), eine Komponente des ESCRT-0-Komplexes, für die Einschleusung von Cargo in endosomale Tubuli erforderlich (Raiborg et al., 2006). HRS bindet hierfür an PI3P in der Membran von frühen Endosomen und rekrutiert Clathrin in Interaktion mit SNX1 (Raiborg et al., 2001; Chin et al., 2001) für die Bildung von Clathrin-beschichteten Domänen, in denen Cargo gesammelt wird (Raiborg et al., 2002). DNAJC13 bewirkt anschließend in Interaktion mit SNX1 und HSC70 die Dissoziation von Clathrin und dem ESCRT-0, sobald der Retromer-Komplex zur Membran des frühen Endosoms rekrutiert wird (Popoff et al., 2007; Popoff et al., 2009;

Shi et al., 2009; McGough & Cullen, 2013; Norris et al., 2022). Die Rekrutierung des Retromer-Komplexes könnte unter anderem durch eine nachgewiesene Interaktion von HRS mit VPS35 vermittelt werden (Popoff et al., 2009).

Die Lokalisation von Clathrin und dem ESCRT-0 wird folglich durch die wechselnde Interaktion von SNX1 mit HRS oder DNAJC13 als antagonistisch agierende Systeme bestimmt (Popoff et al., 2009). Dies hat sich als essenziell für die Separierung der Mikrodomänen, in denen der ESCRT-0-Komplex und der Retromer-Komplex aktiv sind, erwiesen. Diese Separierung ist wichtig, damit entgegengesetzte Transportprozesse, ausgehend von dem frühen Endosom als gemeinsamer Startpunkt, gleichzeitig stattfinden können (Norris et al., 2017).

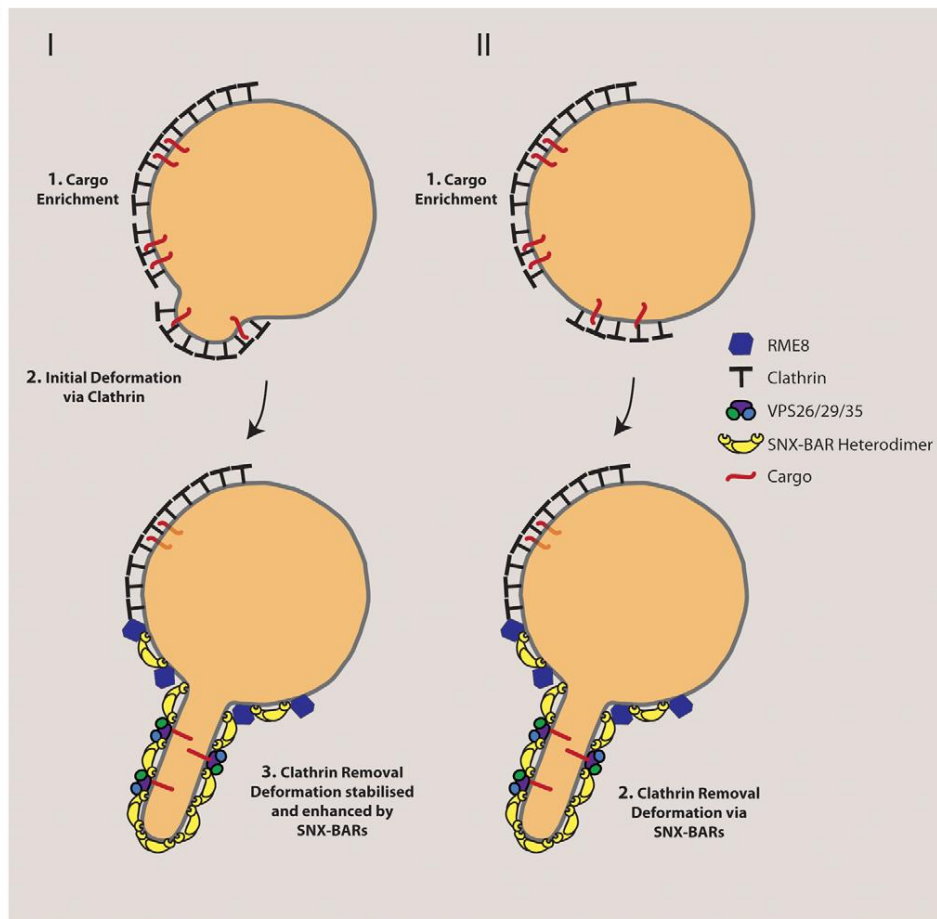


Abbildung 3: Die Clathrin-Dynamik am Endosom (McGough & Cullen, 2013).

Die beiden Komplexe agieren also einerseits in voneinander isolierten endosomalen Domänen, besitzen für eine Abstimmung des lysosomalen Abbaus und retrograden Transports jedoch auch eine gemeinsame regulatorische Schnittstelle, SNX1 und DNAJC13 (Norris et al., 2017). Norris et al. stellten in diesem Zusammenhang ein Modell auf, demzufolge die Aktivität von DNAJC13 am Endosom einem Zyklus

unterliegt, der durch SNX1 und Autoinhibition von DNAJC13 über Bildung von Oligomeren reguliert wird (Norris et al., 2022). Bindet SNX1 als positiver Regulator an den C-Terminus von DNAJC13, werden die DNAJC13-Oligomere aufgebrochen und DNAJC13-Monomere mit freigelegten J-Domänen können nun HSC70 zum Endosom rekrutieren, wo es die Dissoziation des ESCRT-0-Komplexes von der Mikrodomäne des Retromer-Komplexes herbeiführt (Norris et al., 2022). Gemäß dem Modell von Norris et al. bewirkt die ATPase-Aktivität von HSC70 zugleich auch eine Dissoziation von SNX1, damit sich DNAJC13 wieder zu inaktiven Oligomeren zusammensetzen und der Zyklus von Neuem beginnen kann. DNAJC13 nimmt über einen indirekten Feedback-Mechanismus also auch Einfluss auf SNX1, sodass sich die beiden Proteine wechselseitig regulieren (Norris et al., 2022).

Am Endosom fungiert DNAJC13 darüber hinaus als Bindeglied zwischen dem SNX-Dimer des Retromer-Komplexes und dem WASH-Komplex sowie auch als Koordinator dieser beiden Komplexe (Fujibayashi et al., 2008; Freeman et al. 2014) (Abbildung 4).

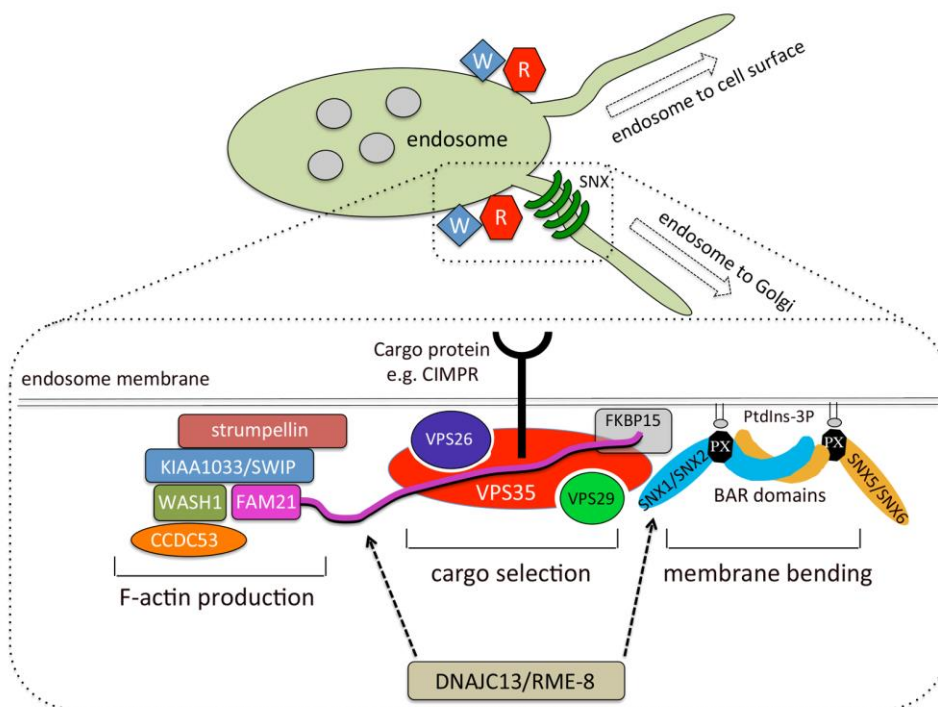


Abbildung 4: DNAJC13 als Bindeglied zwischen dem Retromer- und WASH-Komplex (Seaman & Freeman, 2014).

DNAJC13 bindet über eine C-terminale Region an die BAR-Domäne von SNX1 (Shi et al., 2009) und reguliert die Aktivität von SNX1, indem es Einfluss auf dessen Assoziation mit Membranen nimmt. Unter DNAJC13-Knockdown nimmt die Dynamik von SNX1 ab und dissoziiert mit seiner BAR-Domäne langsamer von der endosomalen

Membran, sodass der formändernde Effekt des SNX-BAR-Dimers länger auf die Membran einwirkt. Dadurch wurde bei Depletion von DNAJC13 eine übermäßige Bildung von endosomalen Tubuli beobachtet (Freeman et al. 2014), die zum Teil mit dem TGN verbunden zu sein scheinen (Popoff et al., 2009).

Mit dem WASH-Komplex interagiert DNAJC13 über dessen N-Terminus mit der Schwanzdomäne von FAM21 (Freeman et al. 2014). Folglich ist DNAJC13 C-terminal mit SNX1 assoziiert, das als Teil des SNX-BAR-Dimers die Bildung endosomaler Tubuli fördert, während der N-terminal gebundene WASH-Komplex endosomalen Cargo in Mikrodomänen sammelt, das in die gebildeten Tubuli geleitet wird (Freeman et al. 2014).

2.2.4 Retromer-unabhängige Funktionen von DNAJC13

Es gibt Hinweise darauf, dass DNAJC13 auch außerhalb des Retromer-Komplexes an zellulären Transportprozessen beteiligt ist.

Gomez-Lamarca et al. zeigten, dass DNAJC13 als Regulator des Recyclings des transmembranären Notch-Rezeptors fungiert. Der Notch-Signalweg ist essenziell für die interzelluläre Kommunikation sowie für die embryonale Entwicklung von Organismen. Um den Erhalt des Signalwegs und eine korrekte Signaltransduktion zu gewährleisten, muss ein Teil der Notch-Rezeptoren nach ihrer Internalisierung zur Plasmamembran zurücktransportiert werden. Dieser Recyclingprozess ist von DNAJC13 abhängig, eine Depletion von DNAJC13 hat eine Akkumulation des Notch-Rezeptors im Rab4-positiven, endosomalen Strukturen zur Folge (Gomez-Lamarca et al., 2015). Rab4 ist zusammen mit dem Retromer-Komplex und SNX27 an einem direkten Transportweg von Rezeptoren vom Endosom zur Plasmamembran beteiligt (Temkin et al., 2011). Folglich könnte DNAJC13 seine regulatorische Funktion auf den Notch-Transport als Teil des Retromer-Komplexes ausüben. Es wurde jedoch beobachtet, dass ein Knockdown von VPS26 nur dann zu einer endosomalen Akkumulation des Notch-Rezeptors führte, wenn DNAJC13 ebenfalls fehlte, eine alleinige Depletion von VPS26 hatte kaum Auswirkungen. Dies spricht laut Gomez-Lamarca et al. für eine Kompensation des VPS26-Knockdowns durch DNAJC13, was impliziert, dass DNAJC13 auch unabhängig vom Retromer-Komplex im Zusammenspiel mit weiteren Komponenten des endosomalen Systems in andere retrograde Transportwege eingebunden ist, die noch nicht genauer definiert sind

(Gomez-Lamarca et al., 2015). Mögliche Interaktionspartner sind u.a. die ESCRT-0-assoziierten Proteine HRS und STAM (*Signal Transducing Adaptor Molecule*), deren Knockdown den Effekt einer Depletion von DNAJC13 und damit eine Akkumulation des Notch-Rezeptors im Endosom zusätzlich verstärkt.

Die Rolle von DNAJC13 im endosomalen System wird schon seit der Erstbeschreibung des Proteins vor über 20 Jahren erforscht. Relativ neu dagegen ist die Erkenntnis, dass DNAJC13 auch auf die autophagische Degradation von Proteinen Einfluss nimmt (Besemer et al., 2021; Swords et al., 2023) und auch der assoziierte Retromer- und WASH-Komplex an der Autophagie beteiligt sind. Dies wird im nächsten Kapitel weiter erörtert.

2.2.5 Assoziation von DNAJC13 und weiterer endosomaler Proteine mit dem Morbus Parkinson

Das endosomale System spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson, da eine Störung des endolysosomalen Abbaus krankheitsrelevanter Proteine, z.B. wie in diesem Fall von α -Synuklein, Ursache neurodegenerativer Erkrankungen sein kann. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass viele Parkinson-assoziierte Genmutationen Proteine betreffen, welche in dieses System eingebunden sind (Abbildung 5).

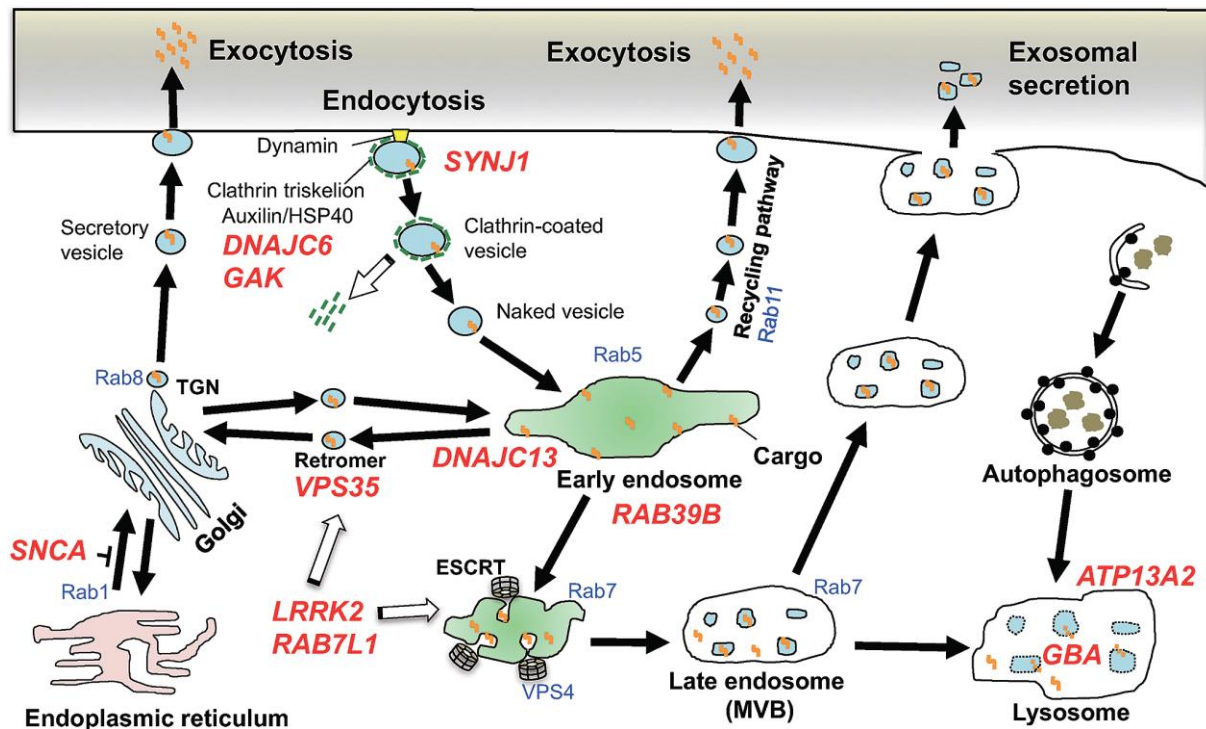


Abbildung 5: Parkinson-assoziierte Proteine im endosomalen System (Hasegawa et al., 2017).

Das Enzym LRRK2 (*Leucine-rich repeat kinase 2*) beispielsweise reguliert die Aktivität der Rab-GTPasen 8 und 10, welche an vesikulären Transportprozessen beteiligt sind (Steger et al., 2016). Durch Phosphorylierung wird die Dissoziation der Rab-GTPasen von der Membran über Hemmung der Interaktion mit dem GDP-Dissoziations-Inhibitor (GDI) verhindert. Die Parkinson-assoziierte LRRK2-Mutation G2019S (Genlocus PARK8) führt zu einer gesteigerten Kinaseaktivität, infolgedessen kommt es zu einer Akkumulation der membrangebundenen Rab-GTPasen, was deren Funktionsfähigkeit beeinträchtigt (Steger et al., 2016; Gomez et al., 2019). Dieses Phänomen lässt sich auch auf Rab5 im frühen Endosom übertragen. Gemäß Beobachtungen, dass Rab5 in dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten akkumuliert, könnte eine übermäßige Phosphorylierung durch mutiertes LRRK2 eine Ursache hierfür darstellen und zu einer Störung des endosomalen Abbauweges führen (Rocha et al., 2020). LRRK2 fungiert zudem als Regulator der Aktivität der endosomalen Form von Rab7. Die LRRK2-Mutanten G2019S und R1441C führen dabei zu einer übermäßigen Herunterregulierung der Rab7-Aktivität (Gómez-Suaga et al., 2014). Dies führt zu einer Beeinträchtigung des endolysosomalen und autophagischen Systems, da Rab7 nicht mehr von Membranen dissoziieren kann.

Auch eine Mutation des Gens, das für die am Trans-Golgi-Netzwerk lokalisierte Rab-GTPase Rab7L1, auch genannt Rab29, codiert, wird als prädisponierender Faktor für

die Parkinson-Erkrankung betrachtet (Satake et al., 2009). Rab29 ist unter anderem an dem Transport des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors vom Endosom zum TGN beteiligt (Wang et al. 2014). Zudem ist Rab29 ebenfalls ein Substrat der LRRK2 und kann deren Lokalisation beeinflussen sowie deren Kinase-Aktivität regulieren (Purlyte et al., 2018). Rab29 und LRRK2 scheinen also bezüglich ihrer Rolle in der Pathogenese in engem Zusammenhang zu stehen, wofür auch die Beobachtung spricht, dass ein Knockdown von Rab7L1 einen ähnlichen Phänotyp in neuronalen Zellen hervorruft wie die LRRK2(G2019S)-Mutante (MacLeod et al. 2013).

Mutationen der Retromer-assoziierten Proteine VPS35 und DNAJC13 stellen ebenfalls Ursachen für familiäre Parkinsonsyndrome dar. Die autosomal-dominant vererbte VPS35(D620N)-Mutation (PARK17) ist im C-terminalen Teil des Proteins lokalisiert (Vilariño-Güell et al., 2011; Zimprich et al., 2011). Die Mutation führt zu einem beeinträchtigten Transport von Membranproteinen wie dem CI-MPR zum TGN (McGough et al., 2014), aber auch seines Liganden Cathepsin D zum späten Endosom bzw. Lysosom, was potenziell einen eingeschränkten Abbau von α -Synuklein und damit dessen Akkumulation zur Folge hat (Follett et al., 2014). Auch die Lokalisation neuronaler Rezeptoren wie z.B. des AMPA-Rezeptors GluR1 in der Postsynapse bzw. das Recycling von Neurotransmittern im Rahmen der Neurotransmission ist bei der Loss-of-Function-Mutation D620N gestört (Munsie et al., 2015). Zudem ist die Assoziation des VPS-Trimers mit dem WASH-Komplex durch eine verminderte Bindungsaffinität von VPS35 zum C-Terminus der WASH-Komponente FAM21 (McGough et al., 2014; Zavodszky et al., 2014) gemindert. Dies wirkt sich auch auf die Lokalisation und Mobilität des Autophagie-assoziierten Proteins ATG9A (*Autophagy-related protein 9A*) aus (Zavodszky et al., 2014).

Die R524W-Mutation ist eine weitere krankheitsrelevante VPS35-Mutation, die ähnlich wie die D620N-Mutation die Assoziation des Retromer-Komplexes mit dem Endosom und Interaktionspartnern wie dem CI-MPR beeinträchtigt (Follett et al., 2016).

Auch das DNAJC13-Gen (PARK21) ist mit einem familiären Parkinson-Syndrom assoziiert. Die über mehrere Spezies konservierte Missense-Mutation N855S, lokalisiert in Exon 24 an Position c.2564A>G auf der cDNA und damit in der J-Domäne, wurde erstmals 2014 von Vilariño-Güell et al. beschrieben und führt zu einem Austausch von Asparagin gegen Serin an Position 855 der Aminosäuresequenz von DNAJC13. Die Mutation folgt einem autosomal-dominanten Erbgang und wurde in mehreren Familien unterschiedlicher Abstammung mit gehäuftem Auftreten der

Parkinson-Erkrankung nachgewiesen (Vilariño-Güell et al., 2014; Gustavsson et al., 2015; Lorenzo-Betancor et al., 2015).

Die Mutation R903K ist eine weitere DNAJC13-Mutation, die mit Parkinson in Verbindung gebracht wird und erstmals 2015 von Gustavsson et al. beschrieben wurde. Sie ist wie die N855S-Mutation in Exon 24 lokalisiert (Gustavsson et al., 2015; Gagliardi et al., 2018).

Das bei den Mutationsträgern präsentierte Parkinson-Syndrom betrifft mehr Männer als Frauen und zeichnet sich durch einen im Vergleich zum IPS relativ späten Krankheitsbeginn aus. Die Progression der Erkrankung ist eher langsam. Klinisch boten die Patienten die klassische Symptomtrias mit Tremor, Rigor und Bradykinese sowie posturale Instabilität mit asymmetrischer Ausprägung. Insgesamt sind die Symptome eher mild ausgeprägt und sprechen gut auf eine Therapie mit Levodopa an (Vilariño-Güell et al., 2014; Appel-Cresswell et al., 2014; Gagliardi et al., 2018).

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die N855S-Mutation in ihrer klinischen Ausprägung von dem klassischen Morbus Parkinson abweichen und z.B. zu einem essenziellen Tremor ohne Parkinson-typische Symptome führen kann (Rajput et al. 2015).

Auf molekularer Ebene zeigte sich bei Überexpression der DNAJC13(N855S)-Mutante in COS-7-Zellen im Vergleich zum Wildtyp in beiden Ansätzen eine reduzierte Endozytose von Transferrin, bei der Mutante waren die endozytierten Vesikel jedoch größer und wiesen eine höhere Dichte auf, was auf einen reduzierten endosomalen Transport hinweisen könnte (Vilariño-Güell et al., 2014). Diese Beobachtungen wurden durch Yoshida et al. bestätigt. Sie wiesen in COS-7-Zellen, die die DNAJC13-Mutante exprimierten, ebenfalls eine verlangsamte Internalisierung des EGF (*Epidermal Growth Factor*), gekoppelt an den EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), nach. Zudem war der endosomale Transport des EGF beeinträchtigt (Yoshida et al., 2018).

Die N855S-Mutante wirkte sich auch auf den Transport von Transferrin vom frühen zum Recycling-Endosom aus, dieser war im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche mit dem DNAJC13-Wildtyp transfiziert worden waren, deutlich eingeschränkt. Dies könnte auch auf einen gestörten Reifungs- sowie Recyclingprozess des Endosoms zurückzuführen sein, da die DNAJC13(N855S)-Mutante nicht nur mit Rab5, sondern auch mit Rab7 und Rab11 kolokalisierte. Zudem zeigte sich eine reduzierte Kolokalisation der Mutante mit Aktin, was auf eine Störung der Aktinpolymerisation

durch den WASH-Komplex und damit auf eine reduzierte WASH-vermittelte Tubulibildung am Endosom hinweist (Yoshida et al., 2018).

Im Gegensatz dazu wurde die Bildung SNX1-positiver endosomaler Tubuli bei Expression der DNAJC13(N855S)-Mutante angeregt. Dies beruht womöglich auf einer verminderten Aktivierung von HSC70 und somit einer reduzierten Dissoziation von SNX1 von der endosomalen Membran, wodurch SNX1 länger auf die Membran einwirkt (Follett et al., 2019). Auf die Proteinspiegel von DNAJC13 sowie die Interaktion mit dem Retromer- und dem WASH-Komplex hatte die Parkinson-assoziierte Mutation keinen Einfluss (Follett et al., 2019).

Die Beeinträchtigung des gesamten endosomalen Systems hat auch Auswirkungen auf die intrazellulären α -Synuklein-Spiegel, was in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese des Morbus Parkinson steht. In Zellen, die die N855S-Mutante exprimierten, kam es nicht zur Fusion von α -Synuklein-haltigen, endosomalen Vesikeln mit dem späten Endosom bzw. dem Lysosom, was eine Akkumulation und damit eine erhöhte Zytotoxizität des Proteins zur Folge hatte. In Drosophila führte dies zu einer Veränderung des Phänotyps und zu Einschränkungen der Motorik, was die Hypothese, dass die DNAJC13(N855S)-Mutante eine intrazelluläre Akkumulation von α -Synuklein und den Untergang dopaminerger Neurone begünstigt, untermauert (Yoshida et al., 2018).

Auch eine Akkumulation von α -Synuklein selbst kann umgekehrt das endosomale System in seiner Funktion beeinträchtigen, z.B. über die Störung der Fusion von Vesikeln, was sich auch negativ auf die Neurotransmission auswirken kann (Gitler et al., 2008). Zudem hat sich gezeigt, dass extrazellulär befindliche α -Synuklein-Fibrillen mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zelle aufgenommen werden und anschließend über den endosomalen Abbauweg den Lysosomen zugeführt werden. Dabei kolokalisieren sie mit EEA1 als Marker für das frühe und LAMP1 (*Lysosomal Associated Membrane Protein 1*) als Marker für das späte Endosom (Lee et al., 2008) sowie mit Rab5 und Rab7 (Desplats et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass erhöhte α -Synuklein-Spiegel zu einer gesteigerten Aktivität der beiden Rab-GTPasen führten, was eine Vergrößerung von frühen Endosomen und eine Beeinträchtigung des axonalen Transports, z.B. des Wachstumsfaktors BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) zur Folge hat (Fang et al., 2017). Dies stellt ein weiteres Phänomen dar, über welches akkumuliertes α -Synuklein neurotoxisch wirkt.

In Anbetracht dieser Erkenntnisse lässt sich festhalten, dass sich eine Beeinträchtigung des endosomalen Systems und die Akkumulation von α -Synuklein gegenseitig begünstigen bzw. aggravieren.

2.3 Autophagie und die Rolle von ATG9A

2.3.1 Die Autophagie

Die Autophagie ist neben dem endosomalen Abbau ein weiteres intrazelluläres Degradationssystem, das ebenfalls in das lysosomale Kompartiment mündet.

Es ist in Eukaryoten konserviert und dient der zellulären Homöostase sowie der Anpassung an zellulären Stress, beispielsweise ausgelöst durch einen Hungerzustand der Zelle (Yorimitsu & Klionsky, 2005). Zudem ist es insbesondere bei dem Abbau von Proteinaggregaten, z.B. bestehend aus akkumuliertem α -Synuklein, von Bedeutung (Webb et al., 2003).

Das autophagische System wird weiter unterteilt in die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA), die Mikroautophagie und die Makroautophagie (Cuervo, 2004).

Der Prozess der CMA erfolgt anhand eines bestimmten Motivs, anhand dessen Substrate erkannt und zum Lysosom transportiert werden (Dice, 1990; Chiang et al., 1989; Salvador et al. 2000; Agarraberes & Dice, 2001).

Unter der Mikroautophagie versteht man die direkte Aufnahme von Cargo in Lysosomen, indem er von der lysosomalen Membran umschlossen und in Vesikel eingeschlossen wird (Marzella et al., 1980; Mijaljica et al., 2011).

Bei der Makroautophagie, im Folgenden als Autophagie bezeichnet, kommt es zur Bildung von Autophagosomen, die durch eine Doppelmembran begrenzt sind und den abzubauenen Cargo zum Lysosom transportieren (Abbildung 6). Durch die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom zum Autolysosom kommt der Cargo mit den lysosomalen Enzymen in Kontakt und kann so gespalten werden (Yorimitsu & Klionsky, 2005).

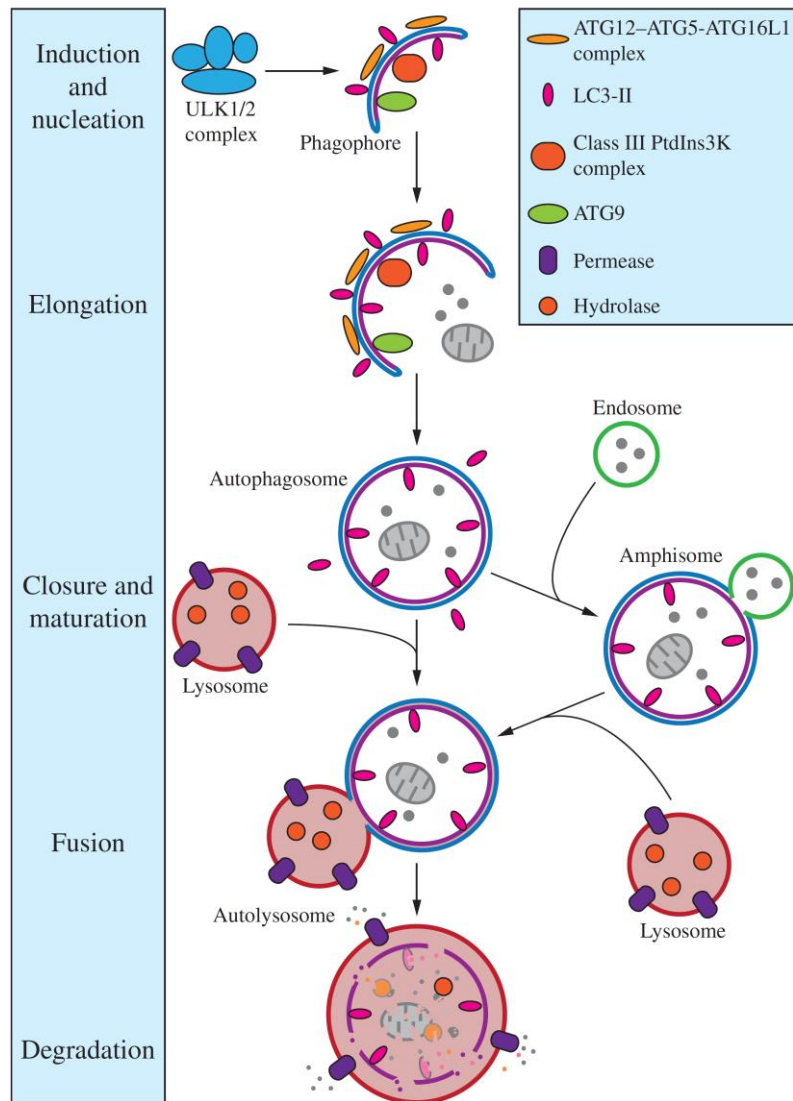


Abbildung 6: Die Phasen der Makroautophagie (Parzych & Klionsky, 2014).

Die Bildung von Autophagosomen beginnt in Hefen an einer sogenannten PAS (*phagophore assembly site*), an der durch Elongation einer Doppelmembran, auch Isolationsmembran genannt, eine Phagophore entsteht (Suzuki et al., 2001; Kim et al., 2002; Itakura & Mizushima, 2010; Chen & Klionsky, 2011). Eine mit der PAS vergleichbare Struktur in Säugern wurde noch nicht genau identifiziert, Konsens besteht jedoch darin, dass Phagophoren im Zytoplasma von Säugern an mehreren Stellen entstehen (Chen & Klionsky, 2011). Potenzielle Lipidquellen, die diskutiert werden, sind z.B. das ER, die Mitochondrien, Endosomen und die Plasmamembran (Axe et al., 2008; Kotani et al., 2018; Schmitt et al., 2022; Zhen & Stenmark, 2023). Auch Lipidtröpfchen stellen der Isolationsmembran Rab18-vermittelt Membranlipide zur Verfügung (Bekbulat et al., 2020).

Reguliert wird die Formation des Autophagosoms durch einen Induktionskomplex, u.a. bestehend aus ULK1 oder 2 (Unc-51-like kinase) (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009). Die Aktivität des Induktionskomplexes wird durch dessen Assoziation mit dem MTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) bestimmt (Loewith et al., 2002). Wichtigster Bestandteil dieses Komplexes ist mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), eine Serin/Threoninkinase, die über Phosphorylierung von ULK1 bzw. 2 die Bildung des Autophagosoms hemmt (Noda & Ohsumi, 1998; Schmelzle & Hall, 2000; Hosokawa et al., 2009).

Weitere Regulatoren des Induktionskomplexes sind die Proteinkinase A (PKA), die einen Autophagie-hemmenden Einfluss ausübt, und die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die Autophagie-stimulierend wirkt (Stephan et al., 2010; Djouder et al., 2010).

Anschließend folgt die Nukleation der Phagophore, also die Rekrutierung weiterer Autophagie-assoziiierter Proteine zur PAS, darunter der Klasse-III-PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Komplex, der für die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol zu PI3P erforderlich ist (Burman & Ktistakis, 2010). Der Komplex setzt sich aus einer spezifischen Untereinheit der PI3K, zwei Proteinen aus der VPS-Familie und Beclin 1 zusammen (Panaretou et al., 1997; Liang et al., 1999; Schu et al., 1993; Kihara et al., 2001; Itakura et al., 2008). Beclin 1 stellt hierbei einen Ansatzpunkt für regulatorische Proteine auf Ebene des PI3K-Komplexes dar (Pattingre et al., 2005; Fimia et al., 2007).

PI3P wird für die Rekrutierung weiterer Proteine benötigt, die an der Expansion der Phagophore beteiligt sind. ATG18 bindet an PI3P und fungiert in Interaktion mit ATG2, welches mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert ist, als Bindeglied zwischen dem PAS und dem ER, was die Expansion der Phagophore ermöglicht (Kotani et al., 2018).

Ebenfalls essenziell für die Entwicklung der Phagophore zum Autophagosom ist das MAP1LC3B (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), kurz LC3B, das strukturelle Ähnlichkeit zu Ubiquitin besitzt (*Ubiquitin-like protein*, kurz UBL) und zur ATG8-Proteinfamilie zählt (Kirisako et al., 1999; Ichimura et al., 2000; Xie et al., 2008). Die Bindung von LC3B an Phosphatidylethanolamin (PE), ein Phospholipid in der Membran der Phagophore, wird auch als Lipidierung bezeichnet und ist für deren Elongation erforderlich (Kabeya et al., 2000; Nakatogawa et al., 2007). Sie wird u.a. durch einen sogenannten E3-Ligase-Komplex, bestehend aus mehreren ATG-

Proteinen, katalysiert (Mizushima et al., 1998; Mizushima et al., 1999; Kabeya et al., 2004; Hanada et al., 2007; Fujita et al., 2008). Die lipidierte, also mit PE konjugierte Form von LC3B, wird LC3B-II genannt (Kabeya et al., 2004).

Die Elongation der Phagophore geht mit einer zunehmenden Krümmung, am ehesten vermittelt durch die Interaktion von LC3B mit PE, um das abzubauen Protein einher, bis durch Verknüpfung der beiden Enden der Phagophore ein geschlossenes, von einer Doppelmembran umgebenes Autophagosom entsteht (Knorr et al., 2015; Maruyama & Noda 2021). Nach Vollendung der Formation des Autophagosoms ist ATG4 für die Dekonjugation von LC3B-II von der Membran der Phagophore verantwortlich (Kirisako et al., 2000; Kabeya et al., 2004; Nair et al., 2012).

Als finaler Schritt des autophagischen Abbauweges fusioniert das Autophagosom mit der Membran des Lysosoms und bildet ein gemeinsames Kompartiment, das Autophagolysosom (Baba et al., 1994; Yorimitsu & Klionsky, 2005). Für die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom ist unter anderem ein SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Proteinkomplex verantwortlich. Dieser Komplex bindet spezifisch an die äußere Membran vollständig geschlossener Autophagosomen und vermittelt die Fusion mit dem Lysosom (Itakura et al., 2012). Auch die Rab-GTPase Rab7 ist an der Fusion beteiligt (Kirisako et al., 1999; Jäger et al., 2004).

Im Autophagolysosom erfolgt die Degradation des Cargos, wobei die Spaltprodukte wieder ins Zytoplasma freigegeben werden und für den zellulären Stoffwechsel genutzt werden können (Yorimitsu & Klionsky, 2005). Zur Aufrechterhaltung des Lysosomenpools für weitere Autophagie-Zyklen schnüren sich anschließend protolysosomale Tubuli aus der Membran des Autophagolysosoms ab, die zu Lysosomen heranreifen. Dieser Recyclingprozess wird auch als ALR (*autophagic lysosome reformation*) bezeichnet (Yu et al., 2010).

Der gezielte Abbau von Proteinen setzt eine Ubiquitinierung und die Identifizierung der ubiquitinierten Proteine durch bestimmte Autophagie-Rezeptoren voraus. Diese ermöglichen den selektiven Abbau bestimmter Organellen und Proteinaggregate, was insbesondere in Neuronen eine wichtige Rolle spielt. Defekte Mitochondrien beispielsweise, welche durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zu oxidativem Stress beitragen können, werden durch Mitophagie eliminiert, der Umbau

des ER wird durch die ERphagie ermöglicht und den Abbau aggregierter, fehlgefalteter Proteine bezeichnet man als Aggrephagie (Stavoe et al. 2019).

Ein Beispiel in Bezug auf die Aggrephagie ist das Protein SQSTM1 (Sequestosom 1), auch p62 genannt, welches eine LIR-Domäne (*LC3-interacting region*) besitzt. Über dieses bindet es an LC3B und kann anschließend spezifisch über das autophagische System abgebaut werden. Zudem besitzt p62 eine Ubiquitin-bindende Domäne, mit der es an ubiquitinierte Proteine bindet und über die Bindung an LC3B zum Autophagosom rekrutiert (Vadlamudi et al., 1996; Bjørkøy et al., 2005; Lamark et al., 2009). Ein weiterer Aggrephagie-assoziiierter Rezeptor ist BAG3 (*Bcl-2-associated athanogene 3*), ein Co-Chaperon von HSP70, der fehlgefaltete Proteine in Interaktion mit HSP70 und Dynein zum Autophagosom koordiniert (Gamerding et al., 2011). Auch BAG3 interagiert mit LC3B über mehrere potenzielle LIR-Domänen (Körschgen et al., 2023).

Eine durch verschiedene Mutationen bedingte Fehlfunktion dieser spezifischen Abbauprozesse stellt eine Ursache für familiäre Formen neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson, aber auch der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), frontotemporalen Demenz, Ataxie und Dystonie dar (Fecto et al., 2011; Haack et al., 2016, Stavoe et al., 2019).

2.3.2 Schnittstellen zwischen dem endosomalen und autophagischen System

Die Tatsache, dass sowohl das autophagische als auch das endosomale System in das lysosomale Kompartiment münden, sowie die Existenz von Amphisomen, also Autophagosomen, die auf ihrem Weg zum Lysosom mit Endosomen fusionieren (Tooze et al., 1990; Berg et al., 1998), zeigen, dass gemeinsame Schnittstellen zwischen beiden Systemen bestehen. Ein bereits erwähntes Beispiel hierfür ist der ESCRT-Komplex, der in beiden Degradationssystemen für Umformungs- bzw. Abschnürungsprozesse von Membranen verantwortlich ist, oder die Beteiligung von Rab-GTPasen.

Auch der Retromer-Komplex spielt neben dem endosomalen System in der Autophagie eine wichtige Rolle. Ein Bindeglied zwischen dem autophagischen System und dem Retromer-Komplex ist das Protein Beclin 1, das als Komponente des PI3K-Komplexes in Interaktion mit weiteren Proteinen die autophagische Aktivität reguliert

(Liang et al., 1999; Fimia et al., 2007; Itakura et al., 2008). Beclin 1 ist an der Endozytose, aber auch an dem retrograden Transport von Proteinen zum TGN beteiligt. Bei einem Funktionsausfall von Beclin 1 aufgrund einer Mutation ist die Reifung des späten Endosoms beeinträchtigt (Ruck et al., 2011). Zudem wurde in Zellen, die die Beclin 1-Mutante exprimieren, eine Störung der Funktion des Retromer-Komplexes, u.a. aufgrund einer verminderten Rekrutierung von DNAJC13 zum Endosom nachgewiesen. Dies indiziert, dass Beclin 1 die Lokalisation von DNAJC13 am Endosom beeinflusst (Ruck et al., 2011).

Umgekehrt ist der Retromer-Komplex, insbesondere dessen VPS-Trimer, jedoch auch die SNX-Proteine SNX3 und SNX6, für den Aufrechterhalt der autophagischen Aktivität bei Induktion der Autophagie erforderlich (Dengjel et al., 2012; Maruzs et al., 2015). Eine Expression der VPS35(D620N)-Mutante führt zu einem verminderten autophagischen Flux im Sinne einer gestörten Autophagosombildung (Zavodszky et al., 2014). Dies wird auf eine Störung des intrazellulären Transports des Proteins ATG9A zurückgeführt (s. Kapitel 2.3.2).

Doch auch der Transport lysosomaler Enzyme bzw. das Recycling der entsprechenden Rezeptoren wie z.B. dem CI-MPR ist beeinträchtigt (Arighi et al., 2004; Seaman, 2004). Erreichen diese Enzyme aufgrund einer gestörten Funktion des Retromer-Komplexes nicht das Lysosom, hat dies auch Auswirkungen auf die autophagische Degradation und es kommt zur Bildung dysfunktionaler Autolysosomen (Maruzs et al., 2015).

Auch das Rab-GAP TBC1D5, das über die Bindung an VPS29 des Retromer-Komplexes die Aktivität und Lokalisation von Rab7A reguliert (Jia et al., 2016; Jimenez-Orgaz et al., 2018), scheint an der Bildung von Autophagosomen beteiligt zu sein. Die Kopplung von TBC1D5 mit dem Retromer-Komplex wird bei einer Stimulation der Autophagie aufgehoben, sodass es das Endosom verlässt und über eine Bindung an LC3B-II zum Autophagosom rekrutiert werden kann. Hierfür besitzt es 2 LIR-Domänen (Popovic et al., 2012). Eine Depletion von TBC1D5 wirkt sich negativ auf den autophagischen Flux aus (Popovic et al., 2012). Umgekehrt kommt es bei einer vermehrten Translokation von TBC1D5 zum Autophagosom zu einer Verstärkung des retrograden Transports von Makromolekülen, da der hemmende Einfluss von TBC1D5 auf Rab7 und damit auf die Assoziation des Retromer-Komplexes mit dem Endosom abnimmt (Roy et al., 2017). Dies dient bei einem Hungerzustand der Zelle, der mit einer Induktion der Autophagie einhergeht, beispielsweise einer Förderung der

Glucoseaufnahme durch einen verstärkten retrograden Transport von GLUT1 (*Glucose transporter 1*)-Rezeptoren zur Zelloberfläche (Roy et al., 2017). Kvainickas et al. zeigten, dass TBC1D5, dessen Aktivität von der Assoziation mit dem Retromer-Komplex abhängt, ein positiver Regulator des MTORC1 ist und damit auch Autophagie-hemmend wirken kann (Kvainickas et al. 2019). Eine Depletion des Retromer-Komplexes bzw. TBC1D5 hingegen hat eine Disinhibition und folglich eine übermäßige Aktivität von Rab7 zur Folge, die hemmend auf den MTORC1 wirkt (Kvainickas et al. 2019). Somit nimmt der Retromer-Komplex auch auf diese Weise Einfluss auf die Autophagie.

Auch der Retromer-assoziierte WASH-Komplex ist für das autophagische System relevant, da er an der Translokation des M6PR bzw. der hydrolytischen Enzyme zum Lysosom beteiligt ist. Bei einem Knockdown von WASH sind diese Transportprozesse eingeschränkt, was auch die Autophagie beeinträchtigt (King et al., 2013). Ist die Rekrutierung des WASH-Komplexes durch den Retromer-Komplex beispielsweise aufgrund der D620N-Mutante von VPS35 gestört, hat dies nachweislich geringere LC3B-II-Spiegel zur Folge, die mit einer Störung der Autophagosom-Bildung einhergehen (Zavodszky et al., 2014).

Die namensgebende Komponente des WASH-Komplexes, das Protein WASH, spielt in der Regulation der Autophagie eine weitere wichtige Rolle. Es kolokalisiert nicht nur mit dem Endosom, sondern auch mit der Phagophore und inhibiert die autophagische Degradation, indem es an Beclin 1 bindet und dessen Ubiquitinierung hemmt. Diese ist für die Aktivierung des PI3K-Komplexes und folglich die Expansion der Phagophore erforderlich (Xia et al., 2013).

Auch das Retromer-assoziierte Protein DNAJC13 nimmt Einfluss auf die autophagische Aktivität. Eine Überexpression von DNAJC13 übt einen stimulierenden Effekt auf die Autophagie aus, während ein Knockdown zu einer Reduktion des autophagischen Fluxes führt. Letzteres beruht zum einen auf einer Störung des intrazellulären Transports des Proteins ATG9 (s. Kapitel 2.3.2) (Besemer et al., 2021), zum anderen ist DNAJC13 an der ALR beteiligt (Swords et al., 2023). Bei Depletion von DNAJC13 ist die Abschnürung protolysosomaler Tubuli von der Membran des Autophagolysosoms gestört, was zu einer Verringerung funktionsfähiger Lysosomen führt. Dies scheint über einen negativen Feedbackmechanismus den autophagischen Flux zu beeinträchtigen (Swords et al., 2023). Zudem wurde bei reduzierten DNAJC13-Spiegeln eine verstärkte Akkumulation krankheitsrelevanter und zur Aggregation

neigender Proteine wie SOD1 beobachtet, was auf die beeinträchtigte autophagische Degradation zurückgeführt werden könnte (Besemer et al., 2021).

Die Parkinson-assoziierte DNAJC13-Mutation N855S hatte bei Überexpression im Gegensatz zum Wildtyp keinen fördernden Einfluss auf die Autophagie, was in Hinblick auf den Abbau von akkumuliertem α -Synuklein bei der Parkinson-Erkrankung pathogenetisch relevant sein könnte (Besemer et al., 2021).

2.3.3 Die Funktion von ATG9A im Prozess der Autophagie

ATG9A, auch als APG9L1 (APG9-Like 1) bezeichnet, ist ein hochkonserviertes, Autophagie-assoziiertes Protein welches ubiquitär exprimiert wird. (Noda et al., 2000; Yamada et al., 2005; Young et al., 2006). Es ist von dessen Isoform ATG9B bzw. APG9L2 abzugrenzen, welche bisher ausschließlich in Wirbeltieren in der Plazenta und Hypophyse nachgewiesen wurde und wahrscheinlich in der embryonalen Entwicklung eine Rolle spielt (Yamada et al., 2005).

ATG9A ist das einzige Transmembranprotein im autophagischen System (Noda et al., 2000), welches für den Transport von Lipiden von Donororganellen zur PAS bzw. zur wachsenden Phagophore verantwortlich ist (Reggiori et al., 2004; Young et al., 2006; He et al., 2008). Es besitzt 6 Transmembrandomänen, der N- und C-Terminus befinden sich im Zytosol (Young et al., 2006).

Unter basalen Bedingungen wurde eine Kollokalisierung von ATG9A mit dem TGN, dem späten Endosom und dem Endolysosom nachgewiesen (Young et al., 2006; Ravussin et al., 2021). Wird die Autophagie stimuliert, werden ATG9A-positive Vesikel vom TGN zur PAS rekrutiert und tragen dort zur Entwicklung einer Phagophore bei (Young et al., 2006). Es wird angenommen, dass der anterograde Transport von ATG9A mit einer Multimerisierung von ATG9A einhergeht (He et al., 2008). Laut Yamamoto et al. werden in Hefen Membranbestandteile von ca. drei ATG9A-Vesikel pro Zyklus in die äußere Phagophorenmembran implementiert (Yamamoto et al., 2012). In der PAS kollokalisiert ATG9A mit LC3B (Young et al., 2006).

Einem aktuellen Modell zufolge wird ATG9A nach dessen Autophagie-induzierter Synthese im rauen ER zunächst über das TGN zur Plasmamembran transportiert und Clathrin-vermittelt in Endosomen internalisiert, sodass es anschließend über den endosomalen Transportweg das Recycling-Endosom erreicht (Ohashi & Munro, 2010;

Longatti et al., 2012; Zhen & Stenmark, 2023). Dort fusionieren ATG9A-Vesikel mit Vesikeln, die ATG16L1 enthalten, eine Komponente des E3-Ligase-Komplexes, welcher an der Lipidierung von LC3B beteiligt ist. Das Recycling-Endosom wird als eines von mehreren Membranreservoirs für die Phagophore angesehen, von dem sich ATG9A-/ATG16L1-positive Vesikel abschnüren, die zu der PAS transportiert werden (Orsi et al., 2012; Puri et al., 2014; Imai et al., 2016).

Der ATG9A-vermittelte Membrantransport erfolgt in mehreren Zyklen, in denen ATG9A ausgehend vom TGN zur Phagophore gelangt und anschließend wieder zum TGN zurückkehrt, damit es für den nächsten Zyklus zur Verfügung steht (Ravussin et al., 2021). Mit der Membran des vollständig gebildeten Autophagosoms ist ATG9A nicht mehr assoziiert, die Assoziation von ATG9A mit der Phagophore ist folglich nur temporär (Orsi et al., 2012).

Parallel dazu tritt der PI3K-Komplex zu der PAS hinzu (Burman & Ktistakis, 2010), der den Lipidtransport vom ER zur Phagophore koordiniert und zu deren Expansion beiträgt (Kotani et al., 2018). ATG9A interagiert an der Phagophore sowohl mit dem PI3P-assoziierten ATG18 als auch mit ATG2, für dessen Rekrutierung ATG9A erforderlich ist (Wang et al., 2001; Reggiori et al., 2004; Papinski et al., 2014; van Vliet et al., 2022; Chumpen Ramirez et al., 2023).

An der Phagophore fungiert ATG9A als Phospholipidtranslokator („scramblase“), indem es 2 Membranporen bildet, welche sich aus je einem ATG9A-Homotrimer zusammensetzen (Matoba et al., 2020; Maeda et al., 2020). Es wird angenommen, dass die Funktion dieser ATG9A-Poren darin besteht, die durch den ATG2-ATG18-Komplex von dem ER zur PAS koordinierten Phospholipide zu der inneren Membran der Phagophore umzuverteilen, damit die Elongation der inneren auf die der äußeren Membran abgestimmt ist (Matoba et al., 2020; Maeda et al., 2020; van Vliet et al., 2022; Chumpen Ramirez et al., 2023). Anschließend sind ATG2 und ATG18 an der Freisetzung von ATG9A aus der PAS beteiligt (Reggiori et al., 2004; He et al., 2008).

2.3.4 Regulation der ATG9A-Aktivität

Die Aktivität bzw. Lokalisation von ATG9A unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen. ULK1 beispielsweise ist am Transport von ATG9A zur Phagophore beteiligt und für die Interaktion mit ATG2 und ATG18 erforderlich

(Reggiori et al., 2004; He et al., 2008). Bei einem Knockdown von ULK1 verbleibt ATG9A trotz einer Stimulation der Autophagie am TGN (Reggiori et al., 2004; Young et al., 2006). Doch auch der retrograde Transport von ATG9A zum TGN ausgehend von der PAS ist in Abwesenheit von ULK1/ATG1 eingeschränkt (Reggiori et al., 2004; Sekito et al., 2009).

Auch die SNX-Proteine SNX4 und SNX7 haben Einfluss auf die Lokalisation von ATG9A. Sie bilden ein Heterodimer, welches die Mobilisation von ATG9A am TGN über das Recycling-Endosom zur Phagophore reguliert. SNX4, das mit seiner PX-Domäne über PI3P zur Phagophore rekrutiert wird, kolokalisiert dort sowohl mit LC3B als auch mit ATG9A am Recycling-Endosom. Bei einer Depletion von SNX4 oder SNX7 ist die Rekrutierung von ATG9A zur PAS gestört (Antón et al., 2020; Ravussin et al., 2021). SNX4 ist jedoch auch am Recycling von ATG9A von der PAS zurück zum TGN beteiligt, damit dieses in einen erneuten Zyklus der Autophagosombildung eintreten kann (Ravussin et al., 2021).

Ein weiterer Regulator von ATG9A ist die Retromer-assoziierte Rab-GTPase TBC1D5 in Interaktion mit dem Adaptorproteinkomplex AP2 (Popovic et al., 2014). TBC1D5 interagiert sowohl mit VPS29 als auch mit LC3B und ist ebenfalls an dem Transport von ATG9A von der Plasmamembran bzw. dem endosomalen System zur PAS beteiligt. Der AP2-Komplex ist unter anderem in die Internalisierung von ATG9A an der Plasmamembran und Einleitung in das endosomale System involviert und damit Voraussetzung für die Interaktion zwischen ATG9A und TBC1D5 (Popovic et al., 2014).

Nicht zuletzt ist ATG9A in dessen Funktion auch von dem Retromer-Komplex selbst abhängig. Da ATG9A auf dem Weg zur PAS den endosomalen Transportweg durchläuft, besteht zumindest temporär eine Assoziation mit dem frühen Endosom, wo ATG9A unter anderem mit VPS35 kolokalisiert (Zavodszky et al., 2014). Bei einer Depletion des Retromer-Komplexes wurde eine Einschränkung der Mobilität von ATG9A beobachtet, sodass ATG9A bei Autophagie-Induktion das TGN nicht verlassen kann (Jimenez-Orgaz et al., 2018). Ein möglicher Mediator der Interaktion zwischen dem Retromer-Komplex und ATG9A ist Rab7. Die Rab-GTPase ist ohne ihre Retromer-vermittelte Interaktion mit TBC1D5 in einem GTP-gebundenen, aktiven Zustand gefangen, in dem sie dauerhaft mit der lysosomalen Membran assoziiert ist und vermehrt abgebaut wird. Dies wirkt sich potenziell auf den Transport von ATG9A aus (Jimenez-Orgaz et al., 2018).

Ein weiteres Bindeglied zwischen dem Retromer-Komplex und ATG9A ist der WASH-Komplex. ATG9A kolokalisiert mit einzelnen Komponenten des WASH-Komplexes am Endosom (Zavodszky et al., 2014). Liegt ein Knockdown von WASH1 vor oder ist die Rekrutierung des WASH-Komplexes zur endosomalen Membran z.B. durch die D620N-Mutation von VPS35 gestört, ist der Transport von ATG9A zur Phagophore und damit die Bildung des Autophagosoms beeinträchtigt. Zugleich kommt es zu einer Akkumulation von ATG9A am TGN (Zavodszky et al., 2014; Ravussin et al., 2021). Doch auch die Morphologie von Rab11 ändert sich, was den Transport von ATG9A auch auf Ebene des Recycling-Endosoms mindern könnte (Zavodszky et al., 2014). Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass auch der WASH-Komplex maßgeblich die Lokalisation und Funktion von ATG9A beeinflusst.

Für ATG9A wurde somit sowohl eine Assoziation mit dem Retromer- als auch dem WASH-Komplex nachgewiesen. Ein weiteres Protein, das nachweislich mit beiden Komplexen interagiert, ist DNAJC13. Folglich ergab sich die Frage, ob auch DNAJC13 einen potenziellen Interaktionspartner von ATG9A darstellen könnte. Besemer et al. zeigten, dass DNAJC13 in der Tat die Rekrutierung von ATG9A zur Phagophore beeinflusst (Besemer et al., 2021). Ein Knockdown von DNAJC13 beeinträchtigt sowohl den anterograden als auch den retrograden Transport von ATG9A zwischen dem Recycling-Endosom und der PAS unter basalen und Autophagie-stimulierenden Bedingungen. Zudem war die ATG9A-abhängige Lokalisation von ATG16L1 an der Phagophore reduziert. Insgesamt hatte eine Depletion von DNAJC13 also eine Störung der Autophagosombildung und damit einen verminderten autophagischen Flux zur Folge (Besemer et al., 2021).

2.4 Zielsetzung

Das Protein DNAJC13 spielt eine zentrale Rolle in der Proteinhomöostase und ist an der Funktion und Regulation zweier wichtiger Degradationssysteme beteiligt, dem endosomalen und dem autophagischen System. In Interaktion mit dem Retromer- und dem WASH-Komplex koordiniert es den retrograden Transport von endosomalem Cargo. Zugleich bildet DNAJC13 zusammen mit SNX1 und HSC70 einen Regulationsmechanismus für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen lysosomalem Abbau und retrogradem Transport von Proteinen. Im autophagischen System spielt DNAJC13 eine Rolle für den korrekten Transport des Autophagie-

assoziierten Proteins ATG9A und damit die Bildung von Autophagosomen. Dies hat in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen Relevanz, die auf einer Störung der Proteinhomeostase und folglich einer Akkumulation bzw. Aggregation krankheitsassoziierter Proteine beruhen, wie beispielsweise α -Synuklein in Lewy-Körperchen von Parkinson-Patienten. Dass mindestens zwei Mutationen von DNAJC13 nachgewiesen wurden, die mit familiären Parkinson-Syndromen assoziiert sind, zeigt, dass einer Beeinträchtigung der Funktion von DNAJC13 in der Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Bedeutung zukommt.

Ziel dieser Dissertation ist es, die Funktion des Proteins DNAJC13 im endosomalen sowie insbesondere im autophagischen System weiter zu charakterisieren. Zum einen wurden die Auswirkungen eines transienten Knockdowns bzw. eines stabilen Knockouts von DNAJC13 auf das Aggregationsverhalten des Proteins SOD1 sowie die Expression anderer Komponenten des Retromer-Komplexes und des Autophagie-Netzwerks untersucht. Auch das Aggregationsverhalten der DNAJC13(N855S)-Mutante wurde analysiert. Zum anderen sollte die Assoziation von DNAJC13 mit ATG9A weiter beleuchtet und geprüft werden, ob eine funktionelle oder sogar direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen besteht. Außerdem wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht, welche Folgen eine Inhibition der Ansäuerung von Lysosomen für die intrazelluläre Verteilung verschiedener Komponenten des Retromer-Komplexes und autophagischen Systems hat, insbesondere bei Depletion von DNAJC13.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zelllinien und Bakterien

3.1.1.1 Zelllinien

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

HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen („human embryonal kidney cells“). Die HEK293-Linien sind robust und eignen sich auf Grund ihrer relativ hohen Replikationszahlen für grundlegende zellbiologische Untersuchungen.

HEK293-A eignen sich aufgrund ihrer stärkeren Adhärenz und phänotypischen Eigenschaften für Immunfluoreszenzfärbungen.

HEK293-T ermöglichen eine vergleichsweise hohe Transfektionseffizienz, da sie das sogenannte „SV40 large T antigen“ exprimieren, das die Replikation von Plasmiden, welche den SV40-Replikationsursprung in ihrem jeweiligen Vektor tragen, induziert (Pear et al. 1993). Sie sind daher besonders gut für Western Blots und andere proteinanalytische Methoden geeignet.

Die DNAJC13-Knockout-Zelllinien (die HEK293-T-Klone D7 und H11 und die HEK293-A-Klone B3 und G4) wurden im Labor über CRISPR/Cas9 etabliert.

3.1.1.2 Bakterien

Name	Firma/Ort	Genotyp
DH5 α (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)	American Type Culture Collection, Manassas/USA	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

3.1.2 Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Resistenz
pCMV-HA-N7-ATG9	pCMV	Ampicillin
pEFBos:DNAJC13-Flag	pEFBos	Ampicillin
pEFBos:DNAJC13-GFP		
pEFBos:DNAJC13-N855S-Flag		
pEFBos:DNAJC13-N855S-GFP		
pEGFP-N1:G85R-SOD1	pEGFP-N1	Kanamycin
pEGFP-N1:WT-SOD1		

3.1.3 Antikörper

3.1.3.1 Primäre Antikörper

Anti-körper	Größe des Proteins [kDa]	Spezies	Lagerungs-temp. [°C]	Firma	Bestellnr.	Verdünnung
Western Blot						
ATG9	100-110	Kaninchen	-20	Cell Signaling	13509S	1:1000
Beclin	60	Kaninchen	-20	Cell Signaling	3495S	1:1000
FLAG-M2	1	Maus	-20	Sigma	F1804	1:1000
HA-Tag	1	Maus	-20	Cell Signaling	2367	1:500
Histon 3	18	Maus	-20	Cell Signaling	14269	1:1000
HSP 70/72	70	Maus	-20	Enzo	ADI-SPA-810-F	1:1000
LC3 (I+II)	16-18	Kaninchen	-20	novus	NB100-2220	1:1000
p62 (C-terminal specific)	62	Meerschweinchen	-20	Progen	GP62-C	1:1000
DNAJC13	220	Kaninchen	-20	Protein-tech	Eigenproduktion	1:10000
SNX1	74	Maus	-20	BD Transduction Laboratories	611482	1:1000
SNX2	72	Kaninchen	-20	Sigma	F1804	1:1000
SOD1	16	Kaninchen	-20	abcam	ab51254	1:2000
Tubulin α DM1A	50	Maus	-20	Sigma	T9026	1:1000
ULK 1 (D8H5)	150	Kaninchen	-20	Cell Signaling	8054	1:1000
VPS35	92	Ziege	-20	LSBio	LS-B5909/55567	1:1000
WASH	70	Kaninchen	+4	Millipore	ABS72	1:1000
Immunfluoreszenzen						
ATG9A	100-110	Kaninchen	-20	abcam	ab108338	1:200
EEA1	180	Maus	-20	BD Transduction Laboratories	610457	1:100
Flag	1	Maus	-20	Sigma	F1804	1:400

HA	1	Maus	-20	abcam	ab18181	1:200
LC3 (I+II)	16-18	Kaninchen	-20	novus	NB100-2220	1:200
LC3 clone 2G6		Maus	-20	nano tools	0260-100	1:100
M6PR	250	Maus	-20	abcam	Ab8093	1:200
SNX1	74	Maus	-20	BD Transduction Laboratories	611482	1:400
TfR	95	Maus	-20	Invitrogen	13-6800	1:500
TGN46	80-100	Schaf	+4	Biorad	AHP500	1:200
VPS35	92	Ziege	-20	LSBio	LS-B5909/55567	1:200

3.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Anti-körper	Spezies	Lagerungs-temp. [°C]	Firma	Bestellnr.	Verdünnung
Western Blot					
HRP Goat IgG	Esel	-20	Rockland	605-703-002	1:10000
HRP Anti-Guinea Pig IgG	Esel	-20	Jackson Immuno-Research	706-035-148	1:10000
HRP Anti-Rabbit IgG	Esel	-20	Dianova (Jackson Immuno-research)	711-035-152	1:10000
HRP Anti-Mouse IgG	Esel	-20	Dianova (Jackson Immuno-research)	715-035-151	1:10000
Immunfluoreszenzen					
Cy 5 Anti-Mouse	Esel	-20	Dianova (Jackson Immuno-research)	715-175-150	1:200
Cy 3 Anti-Rabbit IgG	Esel	-20	Jackson Immuno-research	711-165-152	1:200
Cy 3 Anti-Goat	Esel	-20	Jackson Immuno-Research	703-163-14	1:200
Alexa Fluor 647 Rabbit	Esel	-20	Jackson Immuno-Research	711-605-152	1:200
Cy 3 Anti-Sheep	Esel	-20	Jackson Immuno-Research	713-165-147	1:200

3.1.4 Chemikalien

Die in den Versuchen verwendeten Chemikalien wurden jeweils direkt mit der Bezugsquelle angegeben und den Herstellerangaben entsprechend gelagert.

3.1.5 Kits und Standards

Name	Firma/Ort
EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Darmstadt
MassRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Dreieich
PageRuler Prestained Protein Ladder	
Pierce™ Anti-HA Magnetic Bead	
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	
Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads	
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen, Carlsbad/Kalifornien

3.1.6 Geräte

Name	Firma/Ort
Agarose Gel Electrophoresis System Agagel Mini	Biometra, Göttingen
Amersham Imager 600	GE Life Sciences, Freiburg
Bakterieninkubator 37°C	Memmert, Schwabach
Blotschüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA, Staufen
Brutschrank 60°C	Bachofer
Dynabeads™ MPC-S Partikelkonzentrator	Thermo Scientific, Dreieich
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschränke (-80°C)	Heraeus, Hanau
Heracell™ 240i CO2-Inkubator	Thermo Scientific, Dreieich
Inversmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Kühlschränke 4°C	Liebherr, Biberach an der Riß
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer Combimag RCO	IKA, Staufen
Mikrotiterplatten-Photometer MULTISKAN RC	Thermo Scientific, Dreieich
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, Feldkirchen
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System	Bio-Rad, Feldkirchen
Multifuge 3SR	Heraeus, Hanau
pH-Messgerät inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim
Plattformschüttler DUOMAX 1030	Heidolph, Schwabach
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, Feldkirchen
Powersupply BIO105 LVD	Biometra, Göttingen
Quintix 124-1S Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Shaking Incubator NB-205	Biotek, Winooski (USA)
Sonifikator UP50H	Hielscher, Teltow

Spektrophotometer Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Test-Tube-Rotator	Snijders, Tilburg (NL)
ThermoStat Comfort mit ThermoBlock 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg
VACUSAFE Absaugsystem	Integra, Biebertal
VARIOCLAV Dampfsterilisator	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Vortexer IKA Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Waage PL 1200	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad VWB2 18	VWR, Darmstadt
Zählkammer Neubauer- Improved	Optik Labor
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge MIKRO 200	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 32R	Hettich, Tuttlingen

3.1.7 Software

Programm	Anwendung
Corel Draw 2018 V5	Erstellung von Grafiken für Western Blot und Immunfluoreszenz
Ascent Software for Fluoroskan/ Multiskan V2.6	Photometrische Messungen
SPSS Statistics 23 V5R	Statistische Auswertung
AIDA Image Analyser	Auswertung Western Blot
ZEN 2011 SP2 (black edition) Version 8.0	Software Konfokalmikroskop

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkultivierung und -passage

Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und bei 100% Luftfeuchtigkeit in 10 cm-Kulturschalen mit 10 ml DMEM-Nährmedium („Dulbecco’s Modified Eagle Medium“) kultiviert. Um eine zu hohe Zelldichte zu vermeiden, wurden die Zellen je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle 2-3 Tage passagiert.

Dafür wurde zunächst das Nährmedium, in dem die Zellen kultiviert wurden, abgesaugt. Danach wurde 1x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) vom Rand der Schale her hinzugegeben, um die Zellen zu waschen, ohne sie abzulösen. Nach Absaugen des PBS erfolgte die Trypsinierung der Zellen. Hierzu wurde in eine 10 cm-Schale ca. 2 ml, in 6 cm-Schalen ca. 0,5 ml 1x Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben. Durch Zugabe der dreifachen Trypsin-Menge an Nährmedium wurde die Trypsinreaktion nach etwa 1 min abgestoppt. Der Inhalt der Schale mitsamt den

abgelösten Zellen wurde in ein 15 ml Falcon überführt und 5 min lang bei 4°C und 311g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Ein definiertes Volumen dieser Zellsuspension, abhängig von der jeweiligen Verdünnung, wurde schließlich in eine neue Kulturschale mit vorpipetiertem frischem Medium gegeben.

War ein Mediumwechsel erforderlich, wurde das alte Medium wie vor der Zellpassage abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und anschließend wieder mit frischem Nährmedium bedeckt.

DMEM-Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, pH= 7,4)
10% Aktives Kälberserum	137 mM NaCl
1% Antibiotika/Antimykotika (100-fach)	2,7 mM KCl
1% Natriumpyruvat	10 mM Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM KH ₂ PO ₄

3.2.1.2 Lagerung der Zellen und Inkulturnahme

Die Zellen wurden in Einfriermedium (Medium mit 10% DMSO) in flüssigem Stickstoff bei -196°C in speziellen Kryo-Röhrchen (VWR, Darmstadt) gelagert. Nach Entnahme der Röhrchen aus dem Stickstofftank wurden sie im 37°C warmen Wasserbad unter leichtem Schütteln langsam aufgetaut. In 15 ml Plastikröhrchen wurden je 6 ml Nährmedium vorpipetiert und mit einer Pasteurpipette der gesamte Inhalt je eines Kryo-Röhrchens gegeben. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurden die Falcons für 5 min bei 4°C und 311g abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. In 10 cm-Kulturschalen wurden 10 ml Medium vorgelegt. Das Zellpellet wurde mit einer Pasteurpipette und einem Teil des Mediums aufgenommen und nach erneutem Resuspendieren in die Kulturschale gegeben. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbene und damit nicht an der Schale anhaftende Zellen abzuspülen.

3.2.1.3 Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von rekombinanter DNA in eukaryontische Zellen. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden hierbei ist die Calcium-Phosphat-Präzipitation. Diese beruht auf der Verwendung einer Calciumchloridlösung, die mit der einzubringenden DNA versetzt und anschließend mit

einer Natriumphosphatlösung gemischt wird. Nachfolgend kommt es zu einer gemeinsamen Fällungsreaktion des unlöslichen Calciumphosphats mit der DNA in Form kleiner Präzipitate. Die Zellen nehmen diese Präzipitate durch unspezifische Endozytose auf und werden so dazu angeregt, die in der fremden DNA kodierten Proteine zu exprimieren.

Für einen einfachen Ansatz der Transfektionslösung für eine 10cm-Schale wurden zunächst 420 µl H₂O und auf 37°C temperierte 60 µl einer zweimolaren CaCl₂-Lösung in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Nach kurzem Schütteln zur Vermischung der beiden Komponenten wurden 10 µg des jeweiligen Plasmids hinzugegeben. Wurden zwei verschiedene Plasmide ko-transfiziert, wurde die Gesamtmenge auf beide Plasmide aufgeteilt, wobei die Anteile je nach Transfektionseffizienz gegebenenfalls angepasst wurden. Zwei Minuten nach Zugabe des Plasmids wurden tropfenweise 480 µl 2x HBS (HEPES-gepufferte Salzlösung) in die Lösung pipettiert. Dies erfolgte nach jedem Tropfen unter vorsichtigem Schütteln des Röhrchens, um die sich bildenden Präzipitate möglichst klein zu halten und damit deren Aufnahme in die Zellen zu erleichtern.

Die Transfektionslösung inkubierte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Um die Präzipitate, die sich währenddessen gebildet hatten, nicht zu zerstören, wurde die Lösung nach Ablauf der Inkubationszeit nur vorsichtig resuspendiert. 1 ml der Lösung wurde in das Medium einer 10 cm-Schale hinzugegeben.

Für eine Schale mit 6 cm oder 15 cm Durchmesser wurden der halbe bzw. doppelte Ansatz gewählt. Bei der Transfektion von Deckgläschen in 24-Napf-Platten entsprach ein einfacher Ansatz 12 Deckgläschen.

24 Stunden nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel vorgenommen; hierbei wurde die Präzipitatlösung abgesaugt und nach einem Waschschrift mit temperiertem Nährmedium durch frisches Medium ersetzt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen behandelt, geerntet oder direkt für andere Versuche genutzt.

Transfektionslösung (einfacher Ansatz für 10cm-Schale)	2x HBS (HEPES-gepufferte Salzlösung, pH=7,12)
420µl H ₂ O	280 mM NaCl
60µl CaCl ₂ (2M)	50 mM NaCl
480µl 2x HBS	50 mM Na ₂ HPO ₄
10µg DNA	1,5 mM Na ₂ HPO ₄

3.2.1.4 Behandlung mit Bafilomycin A₁/Rapamycin

Bafilomycin A₁ hemmt spezifisch die vakuoläre H⁺-ATPase, die für die Ansäuerung von Lysosomen verantwortlich ist, und inhibiert damit auch den Abbau von Proteinen (Yoshimori et al. 1991). Das Auflaufen von Proteinen nach Bafilomycin A₁-Behandlung, die durch Autophagie abgebaut werden, ermöglicht die Bestimmung des autophagischen Fluxes. Eines dieser Proteine ist LC3B-II (Klionsky et al. 2016). Die Differenz der Proteinspiegel von LC3B-II in Zellen, die vor der Ernte mit Bafilomycin behandelt wurden, und den unbehandelten Kontrollen ist ein Maß für den autophagischen Flux.

Rapamycin induziert Autophagie, indem es über Hemmung von mTOR („mechanistic target of rapamycin“) einen Hungerzustand („starvation“) simuliert. mTOR hemmt abhängig vom Ernährungszustand der Zelle die Aktivität von ULK1, welches seinerseits wiederum die Bildung des Autophagosoms initiiert (Kim et al. 2011). Wird mTOR durch Rapamycin inhibiert, wird dessen hemmender Effekt auf ULK1 aufgehoben und die autophagische Aktivität der Zelle stimuliert.

Vor der Behandlung wurde zunächst das Medium, in dem die Zellen kultiviert worden waren, abgesaugt. Bafilomycin A₁ (Biozol, Eching) wurde in der Endkonzentration 4 µmol/l, Rapamycin (Enzo, Lörrach) in der Endkonzentration 10µmol/l in frischem Nährmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. DMSO (Dimethylsulfoxid) als Negativkontrolle wurde jeweils in derselben Verdünnung wie die angewandte Behandlung verwendet, da sowohl Bafilomycin A₁ als auch Rapamycin in DMSO angesetzt werden. Die Gesamtmenge des Mediums zur Behandlung entsprach der Hälfte der Mediummenge, die zur Kultivierung verwendet worden war.

Nach 4 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, fixiert oder unmittelbar danach für einen Versuch verwendet.

3.2.1.5 Zellernte

Alle Schritte der Zellernte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden zuerst mit kaltem 1x PBS gewaschen. Mit einer Pasteurpipette wurden die Zellen anschließend mit ca. 1,5 ml PBS von dem Boden der Schale abgespült oder mit einem Zellspachtel abgeschabt und in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 5 Minuten bei 311g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.2.1 Transformation E. coli

Die Transformation, also die Aufnahme rekombinanter DNA in Form eines Plasmids durch Bakterienzellen, dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen, in diesem Fall in DH5 α -kompetenten E. coli Bakterien (New England BioLabs, Frankfurt a.M.). Der Vektor, in den die zu vermehrende DNA eingebettet ist, enthält in der Regel ein bestimmtes Resistenzgen, z.B. gegen Ampicillin. Dieses sorgt dafür, dass selektiv nur die Bakterien in ampicillinhaltigem Nährmedium überleben können, die das Plasmid aufgenommen haben. Anschließend werden sie auf eine Agarplatte transferiert und können dort Zellkolonien bilden, die Klone. Ein einzelner Klon wird dann zur weiteren Vermehrung und Extraktion der DNA verwendet.

Die DH5 α -kompetenten E. coli Bakterien wurden bei -80°C gelagert und zunächst aufgetaut. 20 μ l dieser Bakteriensuspension wurden mit 0,5-1 μ l aufgereinigtem Plasmid mit der zu vermehrenden DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde die Suspension für 30 Sekunden bei 42°C erwärmt und danach wieder auf Eis gestellt. 300 μ l 37°C warmes LB-Medium (s.u.) mit Ampicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) wurden zu der Bakteriensuspension hinzugegeben. Diese inkubierte 45 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler. 350 μ l der Suspension wurden auf eine vorbereitete LB-Agarplatte (LB-Medium + 1,5% Agar) mit einem Spatel ausgestrichen und in einen Inkubator bei 37°C über Nacht gestellt.

Am nächsten Tag konnten die auf dem Agar gewachsenen Klone gepickt werden. Hierfür wurde zunächst je ein Erlenmeyerkolben pro verwendetes Plasmid mit 200 ml LB-Medium befüllt. Mit einer Pipettenspitze wurde ein einzelner Klon auf der Platte aufgenommen und diese in das LB-Medium gelegt. Der Kolben inkubierte in einem Bakterienschüttler bei 37°C und 200 rpm über Nacht.

LB-Medium („lysogeny broth“)
1% Bacto™ Trypton (Thermo Fisher Scientific, Dreieich)
0,5% Hefeextrakt
1% NaCl
100 μ g/ μ l Ampicillin

3.2.2.2 Plasmidaufreinigung

Zur Extraktion der DNA aus den Bakterien wurde das PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) verwendet. Dieses verwendet Schwerkraftfluss-Säulen nach dem Prinzip der Anionenaustausch-Chromatographie. Im letzten Schritt wird die DNA mit 70% Ethanol gefällt, und das getrocknete DNA-Pellet in Milli-Q-Wasser gelöst.

Für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung des aufgereinigten Plasmids wurde das Spektrophotometer Nanodrop1000 (PqLab, Erlangen) verwendet. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren beträgt 260 nm, von Proteinen 280 nm. Bei einem A_{260}/A_{280} -Quotienten von über 2,0 gilt die DNA als ausreichend rein.

3.2.2.3 Restriktionsverdau

Um sicherzustellen, dass das richtige Plasmid aufgereinigt wurde, wurden zur Überprüfung Restriktionsenzyme eingesetzt, die das Plasmid an definierten DNA-Sequenzen schneiden. Auf diese Weise war es möglich, ein Plasmid anhand der Länge seiner spezifischen Fragmente zu identifizieren. Die Enzyme wurden so gewählt, dass sich die Plasmidfragmente deutlich in ihrer Länge unterscheiden und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert werden konnten.

In der Online-Datenbank „NEBcloner“ sind die Protokolle zu den benötigten Restriktionsenzymen abrufbar, mit Angaben zu den erforderlichen Puffern, Inkubations- und gegebenenfalls Hitzeinaktivierungszeiten.

1 µg der zu testenden DNA wurden mit der im Protokoll festgelegten Menge an Puffer und Enzymen versetzt und mit Milli-Q-Wasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Im Anschluss inkubierte die Probe unter den vorgegebenen Bedingungen und wurde danach, falls nötig, mit Hitze inaktiviert.

3.2.2.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Über eine Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente, die zuvor mit Restriktionsenzymen geschnitten wurden, nach ihrer Länge aufgetrennt und durch Verwendung von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Je geringer das Molekulargewicht der negativ geladenen Nukleinsäuren, desto weiter wandern sie Richtung Anode. Für die Auftrennung wurden Agarosegelele verwendet, deren Konzentration einen sinnvollen Trennbereich für die zu untersuchenden DNA-Fragmentlängen darstellen.

Zur Herstellung eines 0,8% Agarose-Gels wurden 0,8 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (s.u.) gelöst und in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle vorsichtig erhitzt, bis das Gemisch aufkochte. Sobald sich die Agarose vollständig im Puffer aufgelöst hatte, wurde das Gel in die Kammervorrichtung gefüllt und ein Tropfen Ethidiumbromid hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren und bildet mit diesen einen Komplex, der mit UV-Licht angeregt und sichtbar gemacht werden kann.

Sobald das Gel erstarrt war, wurde es mit TAE-Puffer bedeckt und mit 5 µl MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Dreieich) als Marker für die Länge der DNA-Fragmente sowie den Proben aus dem Restriktionsverdau beladen. Diese wurden vorher mit Ladebuffer (Gel Loading Dye 6x, New England BioLabs) versetzt. Es wurde eine Stromstärke von 70 mA eingestellt und der Gellauf gestartet.

Um die Banden nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung sichtbar zu machen, wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt und als Bild dokumentiert.

50x TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)
50mM EDTA
2M Tris
1M Natriumacetat-Trihydrat

3.2.3 Proteinanalytik

3.2.3.1 Zellyse

Um Extrakte für die Auftrennung und Analyse von Proteinen zu gewinnen, müssen die in PBS geernteten Zellen zunächst lysiert, also aufgebrochen werden. Hierbei werden chemische sowie mechanische Lysemethoden kombiniert.

Zur Herstellung eines Zellysats wurden die Zellen in 1x Lysispuffer aufgenommen. Beim Aufschluss der Zellen wird die Kompartimentierung im Zellinneren aufgehoben, daher können Proteine und Enzyme wie z.B. Proteasen aufeinandertreffen, die unter physiologischen Bedingungen nicht miteinander in Kontakt kommen würden. Um einer Autolyse und dem Verlust von Proteinen vorzubeugen, war es wichtig, die Proben stets auf Eis zu stellen und zu der Extraktionslösung EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (Roche, Mannheim) hinzuzufügen. Zum Ansetzen einer PIC-Stammlösung wurde eine Tablette PIC nach Angaben des Herstellers in 2 ml Wasser gelöst und konnte für insgesamt 50 ml Extraktionslösung verwendet werden.

3x Lysispuffer	Für 5 ml Extraktionslösung:
187,4 mM Tris-HCl	1,66 ml 3x Lysispuffer
6% SDS	3,33 ml Aqua dest.
10 mM Na ₂ HPO ₄ ,	200 µl PIC-Stammlösung
1,8 mM KH ₂ PO ₄	Ggf. 1 Tbl. PhosSTOP (Roche)

Das Zellpellet wurde in ca. 100 µl Extraktionslösung aufgenommen, die Menge variierte abhängig von der Pelletgröße. Nach dieser chemischen Lyse erfolgte die Sonifizierung der Proben für dreimal 10 Sekunden bei einer Amplitude von ca. 70% mit einem Stabhomogenisator (Hielscher, Teltow), bei der die Zellen zusätzlich mechanisch aufgeschlossen wurden. Aufgrund der dabei resultierenden Wärmebildung wurden die Proben auch hier nach jedem Sonifizierungsschritt sofort mit Eis gekühlt.

3.2.3.2 Proteinbestimmung

Um die Proteinkonzentration photometrisch bestimmen zu können, wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Dreieich) verwendet. Peptidbindungen reduzieren Cu²⁺- unter alkalischen Bedingungen zu Cu⁺-Ionen. Diese reagieren mit BCA („bichinonic acid“) zu einem violetten Kupferkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Die Konzentration dieser Komplexverbindung ist proportional zur Ausgangs-Proteinkonzentration.

Für die Quantifizierung der Proteinmenge musste zunächst eine Standardreihe mit Albumin angesetzt werden. Hierfür wurde Albumin (2 mg/ml) im ersten Schritt 1:10 und dann nacheinander in separaten Reaktionsgefäßen achtmal 1:2 mit Wasser verdünnt. Aus den Extinktionswerten der einzelnen Verdünnungen wurde eine Eichgerade abgeleitet, anhand derer die Proteinkonzentration berechnet werden konnte. 50 µl der Standardreihe wurden in absteigender Konzentration auf eine 96-Napf-Platte pipettiert. Auf dieselbe Platte wurden im zweifachen Ansatz 50 µl der zu analysierenden Proben in der Verdünnung 1:10 pipettiert. Die Doppelbestimmung diente später der Ermittlung eines Mittelwerts aus den beiden gemessenen Extinktionswerten einer Probe. Die Proben wurden mit den Reagenzien A und B aus dem BCA Protein Assay Kit versetzt und inkubierten in der Platte für 30 Minuten bei 60°C. Im Mikrotiterplatten-Photometer wurde die Proteinkonzentration der Proben auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes aus den Extinktionswerten der Proben anhand der Albumin-Eichgeraden errechnet.

Lambert Beer'sches Gesetz: $E = \epsilon \cdot c \cdot d$
E = Extinktion
ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [mol/l·cm]
c = Konzentration der absorbierenden Substanz [mol/l]
d = Schichtdicke / Weglänge des Lichts [cm]

3.2.3.3 Western Blot

Um bestimmte Proteine nachzuweisen und quantitativ analysieren zu können, wird das Verfahren des Western Blots angewendet. Dieses gliedert sich grundsätzlich in drei Abschnitte: Im SDS-PAGE werden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld in Polyacrylamidgelen aufgetrennt und liegen als definierte Banden vor. Beim Nass-Blot werden diese Banden auf eine Nitrozellulosemembran elektrophoretisch transferiert. Schließlich werden spezifische Proteinbanden auf der Membran mithilfe von Antikörpern nach dem Prinzip der Immundetektion sichtbar gemacht.

3.2.3.3.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) beruht auf der Denaturierung von Proteinen sowie der Verwendung von SDS („sodium dodecyl sulfate“) als Detergens, welches die Eigenladung der Proteine nach außen abschirmt und durch eine negative Ladung ersetzt, sodass sie in der nachfolgenden Gelelektrophorese ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zudem wurden die Proteine unter reduzierenden Bedingungen (Zugabe von beta-Mercaptoethanol) durch Hitze denaturiert.

Bei allen durchgeführten Western Blots wurden ausschließlich 1,5 mm Laemmli-Gele verwendet, die sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammensetzen. APS (Ammoniumperoxodisulfat) und TEMED (Tetramethylethyldiamin) setzen die Polymerisation des Acrylamids in Gang. Der Größenbereich des Molekulargewichts der aufzutrennenden Proteine wird über die Acrylamidkonzentration festgelegt. Je höher sie ist, desto besser können kleinere Proteine aufgetrennt werden.

Die Aufteilung in Sammel- und Trenngel sorgt für schmalere, schärfere Banden, da die Proteine im Sammelgel zunächst aufkonzentriert werden, bevor sie durch das Trenngel laufen.

4x Trenngelpuffer (pH=8,8)	4x Sammelgelpuffer (pH=6,8)
1,5M TRIS	0,6M TRIS
0,4% SDS	0,4% SDS

Trenngel	H ₂ O	Trenngelpuffer (4x)	Acrylamid	10% APS	TEMED
8%	5,5 ml	2,5 ml	2 ml	100 µl	10 µl
10%	5 ml	2,5 ml	2,5 ml	100 µl	10 µl
15%	3,75 ml	2,5 ml	3,75 ml	100 µl	10 µl
Sammelgel	6,5 ml	2,5 ml (Sammelgel- puffer 4x)	0,75 ml	100 µl	10 µl

Nach abgeschlossener Polymerisation konnten die Geltaschen mit den Proben beladen werden. Standardmäßig setzten sich diese aus 15 µg Lysat und 5 µl Ladepuffer zusammen, die mit Wasser auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt und für 2 Minuten bei 99°C aufgeköcht wurden.

Zur Größenorientierung der aufgetrennten Proteinbanden wurden neben die Proben 5 µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Dreieich) aufgetragen. Diese Proteinlösung läuft ebenfalls durch das Trenngel und teilt sich in unterschiedlich farbige Banden auf, die die Position definierter Molekulargewichte auf dem Gel und später auf der Membran kennzeichnen.

4x Ladepuffer (pH=8,8)	10x Laufpuffer (pH=9,1)
0,25 M TRIS	250 mM TRIS
8% SDS	1,92 M Glycin
40% Glycerin	1% SDS
0,04% Bromphenolblau	
20% beta-Mercaptoethanol	

Das Gelelektrophoresesystem wurde durch Anschluss an eine Spannungsquelle (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad) gestartet. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wanderten durch das Gel in Richtung Anode, die sich in der Laufkammer unten befindet. Dabei wurde zunächst eine Spannung von 80 V eingestellt, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und dann auf 100-120 V erhöht. Sobald die Lauffront, markiert durch das in den Proben enthaltene Bromphenolblau, durchgelaufen war, war die Gelelektrophorese abgeschlossen.

3.2.3.3.2 Nass-Blot

Anschließend folgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran nach dem Prinzip des Nass-Blots. Hierbei wurde das Gel auf die Membran gelegt und durch eine entsprechende Halterung und mithilfe von Filterpapieren und dünnen Schwämmen zusammengepresst. Die Übertragung erfolgte in einer mit Transferpuffer (s.u.) gefüllten Kammer erneut mittels Elektrophorese unter einer Spannung von 30 V über Nacht.

Um zu überprüfen, ob die Proteine erfolgreich auf die Membran übertragen worden waren, wurde diese am nächsten Tag für zwei Minuten mit Ponceaulösung bedeckt, welches die aufgetrennten Proteinbanden unspezifisch und reversibel anfärbte.

Transferpuffer (pH=8,3)	Ponceaulösung
250 mM Tris-HCl	0,02% Ponceau S
2,5 M Glycerin	0,3% Trichloracetat
20% Methanol	0,3% Sulfosalicylsäure

Danach wurde der Farbstoff mit Wasser wieder abgewaschen und die Membran mit 5%-Milchpulverlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, um freigebliebene Proteinbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran dreimal nach je 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen.

1x TBST	5%-Milchpulverlösung
1,37 M NaCl	5% Magermilchpulver in 1x TBST
27 mM KCl	
28 mM Tris Base	
0,22 M Tris-HCl	
0,05 % Tween-20	

3.2.3.3.3 Immundetektion mittels Chemilumineszenz

Das Prinzip der Immundetektion beruht auf der Verwendung zweier Antikörper. An das nachzuweisende Protein bindet ein spezifischer Primärantikörper, an den wiederum ein gegen ihn gerichteter Sekundärantikörper bindet. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit einem Enzym gekoppelt, die Meerrettich-Peroxidase. Deren Aktivität kann man durch ein Substrat wie Luminol in Form eines Lichtsignals nachweisen. Auf diese

Weise werden spezifische Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht und können entsprechend ihrer Intensität auch quantitativ ausgewertet werden.

Der auf das Zielprotein ausgerichtete primäre Antikörper wurde in der jeweils vorgegebenen Verdünnung (s. 3.1.3.1) in 10 ml 1x TBST angesetzt. Zur Haltbarmachung wurden zusätzlich 100 µl 2%-NaN₃ hinzugegeben. Die Blotmembran wurde mit der Antikörperlösung bedeckt und inkubiert auf einem Kippschüttler bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Tag folgte nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 Minuten die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, 1:10000 in 1x TBST verdünnt. Nach einem erneuten Waschvorgang konnte der Blot entwickelt werden. Hierfür wurde eine ECL („enhanced chemiluminescence“)-Lösung angesetzt, bestehend aus den Lösungen A, B und C.

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

Zur Darstellung der Banden wurde die Membran vollständig mit der ECL-Lösung bedeckt und das Chemilumineszenz-Signal im Amersham Imager 600 (GE Life Sciences, Freiburg) gemessen. Für die densitometrische Auswertung wurde das Programm AIDA verwendet.

3.2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der Visualisierung und Analyse spezifischer Proteine in Zellen und Geweben. Hierzu transfiziert man die Zellen entweder mit einem bestimmten Protein, das mit einem fluoreszierenden Marker wie z.B. GFP („green fluorescent protein“) gekoppelt ist, oder man nutzt den immunologischen Nachweis mittels Antikörper, um endogene Proteinverteilungsmuster darzustellen. Dabei bindet der primäre Antikörper an ein bestimmtes Protein und der gegen ihn gerichtete sekundäre Antikörper ist an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden.

Es wurden HEK293A-Zellen verwendet, die auf Deckgläsern in einer 24-Well-Platte kultiviert und je nach Versuch mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert wurden. Um Zellen lichtmikroskopisch untersuchen zu können, wurden sie 48h nach Transfektion zunächst fixiert. Bei der Fixation mit Paraformaldehyd werden die zellulären Proteine vernetzt, was zur Inaktivierung der Enzyme und damit zum Erliegen des Stoffwechsels und zum Erhalt der zellulären Strukturen führt. Zudem sorgt es dafür, dass die Zellen stärker am Deckglas haften.

Nach Absaugen des Mediums wurde auf die Deckgläser je ca. 1 ml kaltes 1x PBS gegeben. Im nächsten Schritt wurde das PBS mit einer Pasteurpipette abgezogen und bei 4°C gelagertes 4% PFA gegeben, sodass das Deckglas großzügig bedeckt war. Die Deckgläser inkubierten 15 min bei Raumtemperatur, danach wurde das PFA wieder abgezogen und die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen. Die fixierten Platten konnten direkt zur Fluoreszenzfärbung weiterverwendet oder im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Die Deckgläser wurden mit einer Pinzette vorsichtig aus der 24-Well-Platte genommen und sofort mit frischem PBS bedeckt, um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern. Dies war während des gesamten Färbeprozesses erforderlich. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung mit 50 µl 90% Methanol pro Deckglas für 5 Minuten bei -20°C inkubiert. Das Methanol erhöht die Durchlässigkeit der Zellmembran und sorgt dafür, dass die im Anschluss verwendeten Antikörper in das Innere der Zelle eindringen können. Die Deckgläser wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und im nächsten Schritt mit 50 µl primärem Antikörper bedeckt. Dieser wurde mit Verdünnungspuffer (PBS mit 10% FCS) in der jeweiligen Verdünnung (s. Kap. 3.1.3.1) angesetzt.

Nach zwei Stunden Inkubationszeit im Dunkeln und dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der standardmäßig in der Verdünnung 1:200 ebenfalls in Verdünnungspuffer angesetzt wurde. Die Deckgläser inkubierten erneut unter Lichtausschluss eine Stunde mit dem sekundären Antikörper. Anschließend wurde ohne weitere Waschschriffe DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochloridhydrat) in 1x PBS in der Konzentration 500 µg/µl für 5 Minuten zum Anfärben der Zellkerne auf den Deckgläsern belassen, erst danach erfolgten erneut drei Waschgänge mit PBS.

Pro Deckglas wurde je ein Tropfen Eindeckmedium auf dem Objektträger platziert und das Deckglas möglichst luftblasenfrei aufgesetzt. Zum Schluss wurden die Ränder mit Roti®-Seal (Carl Roth) versiegelt und die Objektträger bei -20°C gelagert.

Eindeckmedium in 1x PBS (pH=8,5)
1 mg/ml p-Phenylendiamin
70 % Glycerol

3.2.3.5 Anreicherung der Proteinaggregate

Um das Aggregationsverhalten von bestimmten Proteinen zu überprüfen, wurde das Verfahren der differentiellen Zentrifugation angewendet. Bei diesem werden Zelllysate durch mehrere Zentrifugationsschritte in Überstand und Sediment getrennt. Der Überstand stellt die zytosolische, das Sediment die Aggregat-angereicherte Fraktion dar. Danach werden die Spiegel des untersuchten Proteins mittels Western Blot in beiden Fraktionen quantifiziert und verglichen. Aggregiert es, ist das unlösliche Aggregat vermehrt im Sediment nachweisbar. Die Bestimmung des Verhältnisses zur Proteinmenge im Überstand erlaubt eine Aussage über das Aggregationsverhalten und den Vergleich zu anderen Proteinen.

Das in PBS geerntete Zellpellet wurde zunächst in 300 µl 1x PBS + Protease Inhibitor Cocktail (PIC) resuspendiert und viermal je 4 Sekunden sonifiziert, wobei alle Schritte auf Eis durchgeführt wurden. Danach wurde die Zellsuspension für 4 Minuten bei 4°C und 17000g zentrifugiert und die Überstände in separate Eppendorf-Gefäße für den Western Blot aufbewahrt. Nach erneutem Waschen in 100 µl PBS wurde das Pellet für 15 Minuten bei 17000g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 150 µl SDS-Lysispuffer resuspendiert und viermal 10 Sekunden sonifiziert. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 Minuten bei 95°C unter leichtem Schütteln auf dem Heizblock erhitzt und sofort danach wieder auf Eis gestellt.

Nach Durchführung eines BCA-Assays wurden die Überstände und Sedimente der Zelllysate jeweils mit 25% 4-fach Ladepuffer und beta-Mercaptoethanol versetzt und nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 99°C auf 8% bzw. 15%-Gele geladen. Um nachzuweisen, dass die Fraktionen sauber getrennt wurden, dienten SOD1 für die zytosolische und Histon 3 für die Aggregat-anreichernde Fraktion als Markerproteine.

3.2.3.6 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation dient dem Nachweis einer direkten Interaktion zweier Proteine. Eine mit Antikörper-gekoppelte Matrix, die sogenannten „Beads“, die aus

Agarose besteht oder ferromagnetisch sein kann, binden spezifisch an ein Protein bzw. eine an ihn gebundene Tag-Sequenz und filtern es über Zentrifugation oder Magnetismus aus einem Zelllysat. Diesen Vorgang der Präzipitation eines Antigen-Antikörper-Komplexes bezeichnet man auch als „Pull-down“. Dabei ist es möglich, einen Interaktionspartner eines Proteins zusammen mit diesem zu präzipitieren, sofern eine direkte Wechselwirkung besteht. Anschließend werden die Proteine im Präzipitat mittels Western Blot nachgewiesen.

Für diesen Versuch wurden drei 15 cm-Schalen mit HEK293T-Zellen angesetzt. Eine Schale wurde mit DNAJC13-WT-FLAG, eine mit HA-ATG9 und eine mit beiden Plasmiden mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. Hierfür wurde der 2,5-fache Ansatz verwendet. Nach 48 Stunden wurden die Schalen mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und mit 1,5 ml IP-Lysispuffer versetzt.

Puffer für Co-IP (pH=7,4)
50 mM HEPES-NaOH
150 mM NaCl
10% Glycerol
2,5 mM EDTA
1% Triton
1 Tbl. Proteaseinhibitor
1 Tbl. Phosphataseinhibitor

Mit dem Lysispuffer inkubierten die Schalen für 20 Minuten bei 4°C unter langsamem Schwenken. Danach wurden die lysierten Zellen mit einem Zellspachtel abgeschabt und in ein "Low Retention"-Mikrozentrifugegefäß (Kisker) überführt. Um den Aufschluss der Zellen zu unterstützen, wurden die Lysate mehrmals mit einer U-40-Spritze (Omnican® 40, Braun) resuspendiert. Dieses schonende mechanische Vorgehen sollte verhindern, dass eine mögliche Bindung zweier Proteine zerstört wird. Anschließend wurden die Lysate für 20 min bei 18.000g und 4°C abzentrifugiert.

Die Pellets wurden verworfen, mit den Überständen der drei Ansätze wurde ein BCA-Assay durchgeführt.

Es folgte die Vorinkubation der Proben mit Protein-A/-G-Beads, um unspezifisch bindende Proteine herauszufiltern, die eine Interaktion vortäuschen könnten. Hierfür wurden 2x 1000 µg Protein pro Ansatz in zwei Reaktionsgefäßen mit Lysispuffer auf 1 ml aufgefüllt und mit 25 µl Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads (Thermo Scientific) versetzt. Diese waren vorher dreimal mit dem Lysispuffer resuspendiert und nach

jedem Waschschrift in ein Rack, einen magnetischen Partikelkonzentrator (Dynabeads™ MPC™-S, Thermo Scientific), gestellt worden, um die magnetischen Beads zu pelletieren und den Lysispuffer abnehmen zu können. Die Proben rotierten für eine Stunde mit den Beads bei 4°C.

Währenddessen wurden die FLAG-Sepharosebeads (EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich) und HA-Magnetobeads (Pierce™ Anti-HA Magnetic Beads, Thermo Scientific) dreimal mit dem Lysispuffer gewaschen. Die nicht magnetischen FLAG-Beads wurden nach jedem Waschschrift bei 1000g für 3 Minuten abzentrifugiert.

Dann erfolgte der Pull-down mittels Zentrifugation bei den Sepharose-Beads und Magneten bei den magnetischen Beads. Auf diese Weise wurden die Beads mit ihrem Zielprotein vom restlichen Lysat isoliert, die Sepharose-Beads mit DNAJC13 über den Flag-Tag und die magnetischen Beads mit ATG9A über den HA-Tag.

Hierfür wurden die Proben nach Ablauf der Inkubationszeit mit den Protein-A/-G-Beads in das Rack gestellt und der Überstand abgenommen. Dieser wurde in die Reaktionsgefäße mit den Flag- und HA-Beads pipettiert, wobei je eine Probe pro Transfektionsansatz mit den Flag-Beads und eine mit den HA-Beads versetzt wurde. Die Proben rotierten erneut für eine Stunde bei 4°C. Danach wurden die Beads über Separation im Rack oder per Zentrifugation von den Überständen getrennt, diese wurden diesmal verworfen. Die Beads, die an die zu analysierenden Proteine gebunden haben, wurden als Nächstes dreimal mit dem Lysispuffer gewaschen und anschließend in 20 µl 2xSDS + beta-Mercaptoethanol gelöst. Zum Schluss wurden alle Proben für 10 Minuten bei 60°C erhitzt. Dies hat sich als entscheidender Faktor erwiesen, da ATG9A bei höheren Temperaturen im Western Blot später nicht mehr nachweisbar gewesen wäre.

Die Proben wurden eine Minute lang bei 18.000g zentrifugiert und nur der Überstand mit den von den Beads gelösten Proteinen für die Gelelektrophorese verwendet.

3.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Programm SPSS Statistics 23 V5R verwendet. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. War diese gegeben, wurden bei dem Vergleich der Mittelwerte von Datensätzen zweier Gruppen der t-Test für unabhängige Stichproben zur Bestimmung der zweiseitigen Signifikanz berechnet, bei mehr als 2 Gruppen die einfaktorielle ANOVA

(„analysis of variance“) mit einem nachträglichen Post-Hoc-Test, z.B. dem Bonferroni-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgesetzt, mit folgenden Abstufungen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$. Zur Überprüfung der Varianzgleichheit wurde der Levene-Test angewendet.

Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Aggregationsverhalten der ALS-assoziierten SOD1(G85R)-Mutante unter transientem DNAJC13-Knockdown

Um die Rolle von DNAJC13 für die Homöostase von Proteinen zu charakterisieren, wurde zunächst dessen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der SOD1(G85R)-Mutante untersucht. Diese ist eine von mehreren bekannten Mutanten, welche mit der Amyotrophen Lateralsklerose, kurz ALS, assoziiert ist. Die Akkumulation des mutierten Proteins und die durch sie vermittelte Schädigung von Astrozyten sind zentral an der Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankung beteiligt (Bruijn et al. 1997).

Für den Versuch wurden HEK293-T-Zellen mit siRNA zum transienten Knockdown von DNAJC13 und dem SOD1 Wildtyp oder der SOD1(G85R)-Mutante ko-transfiziert, zwei weitere Ansätze mit nonsense-siRNA dienten jeweils als Negativkontrollen. Im Anschluss wurden die Zelllysate über eine Zentrifugation-basierte Fraktionierung aufgetrennt. Die Proteinspiegel des SOD1-Wildtyps und der Mutante wurden im Überstand (zytosolische Fraktion) und dem Pellet (Aggregat-angereicherte Fraktion) mittels Western Blot quantifiziert (Abbildung 7).

Es zeigte sich, dass die G85R-Mutante von SOD1 unter *DNAJC13*-Knockdown vermehrt im Aggregat-angereicherten Pellet nachweisbar war, was im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Zunahme der Akkumulation bzw. Aggregation der SOD1(G85R)-Mutante indizierte. Dieser Effekt konnte für den SOD1-Wildtyp nicht beobachtet werden, hier fand sich SOD1 sowohl bei normalen als auch bei reduzierten DNAJC13-Spiegeln fast ausschließlich im Überstand. Somit ergab sich in beiden Fällen kein Unterschied im Aggregationsverhalten des Wildtyps, was darauf hinwies, dass der *DNAJC13*-Knockdown die Aggregation der G85R-Mutante begünstigte, nicht aber des SOD1-Wildtyps.

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung der Fraktionierung war der Nachweis erforderlich, dass das Pellet und der Überstand sauber getrennt worden waren. Hierzu dienten der Histon H3-Antikörper als Marker für die Aggregatfraktion und der SOD1-Antikörper für die zytosolische Fraktion, mit dem endogenes SOD1 nachgewiesen wurde. Wie im Blot in Abbildung 1A zu sehen, war im Pellet kein endogenes SOD1 detektierbar, was für eine effiziente Trennung unlöslicher Bestandteile von der löslichen Fraktion spricht.

Im Überstand war in geringen Mengen Histon H3 zu finden, das als Marker der unlöslichen Fraktion gilt. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Histonkomplexe bei der Sonifizierung zum Aufschluss der Zellen teilweise in ihrer Struktur zerstört wurden und Histon H3 infolgedessen teilweise in den Überstand übergegangen war.

Doch auch bei nicht vollständiger Trennung der zytosolischen von der Aggregatfraktion sind die Ergebnisse eindeutig, da die Verunreinigung des Überstandes durch Histon H3 nur geringfügig war.

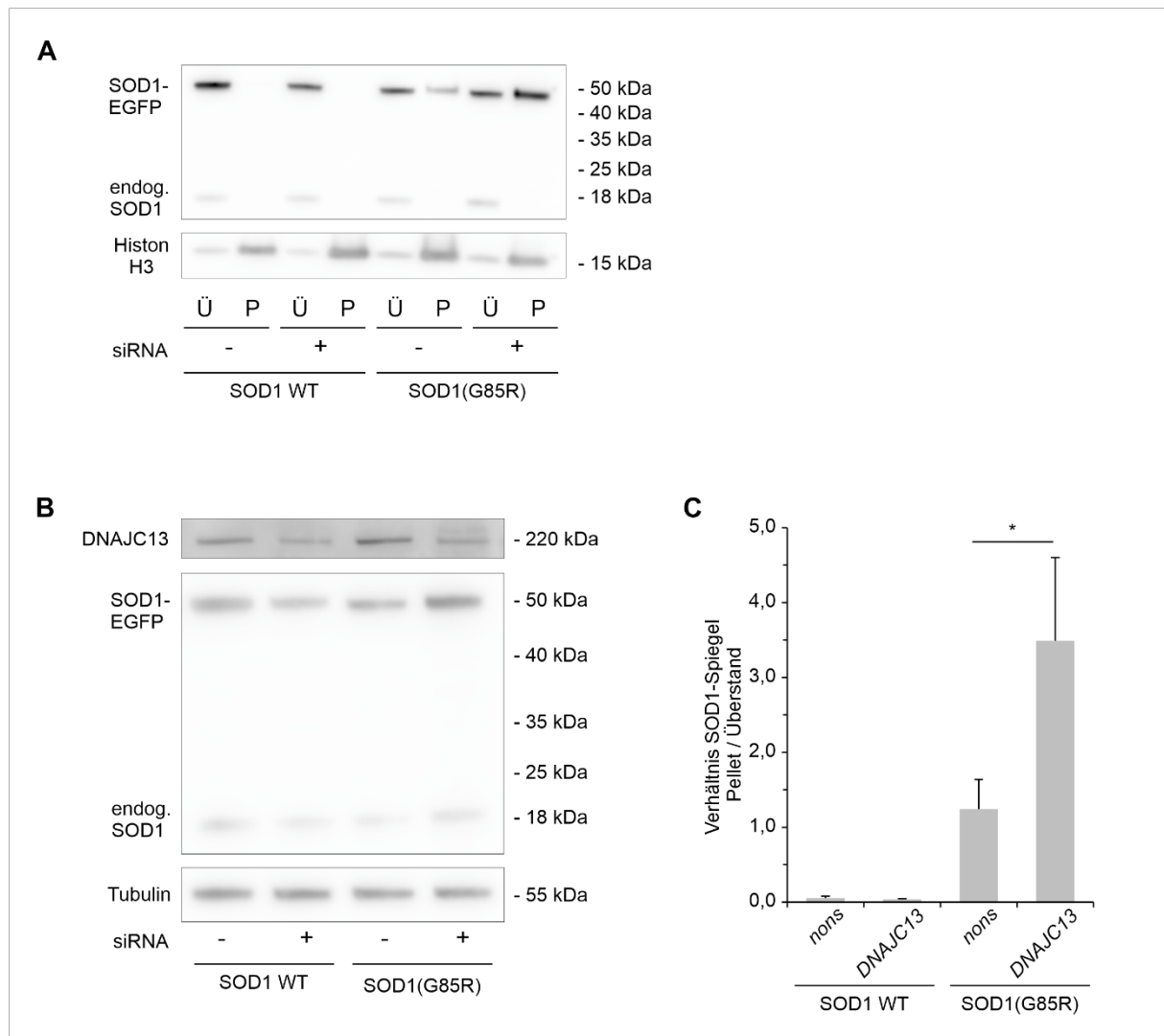


Abbildung 7: Aggregationsverhalten von SOD1-Varianten unter transientem DNAJC13-Knockdown. HEK293-T-Zellen wurden mit SOD1 Varianten und DNAJC13 oder nonsense siRNA transfiziert und die Lysate in eine lösliche Überstandsfraction (Ü) und eine Aggregat-beihaltende Pelletfraction (P) durch Zentrifugation fraktioniert. **A** Mit Western Blots wurden die Proteinspiegel von SOD1 und Histon H3 in den unterschiedlichen Fraktionen detektiert. **B** Der Western Blot der Gesamtlysate zeigt die Spiegel von DNAJC13, SOD1 und Tubulin als Ladekontrolle. **C** Quantifizierung des Western Blot in A. Das Verhältnis der SOD1-Spiegel in der unlöslichen zur löslichen Fraktion zeigt das Aggregationsverhalten (Mittelwert +/-SD, n=3, Students-t-Test, *: p≤0,05).

4.2 Aggregationsverhalten der Parkinson-assoziierten DNAJC13(N855S)-Mutante

Neben der Frage, inwiefern reduzierte DNAJC13-Spiegel das Aggregationsverhalten anderer krankheitsassoziiierter Proteine verändert, war auch das Aggregationsverhalten von DNAJC13 selbst, insbesondere im Vergleich zur N855S-Mutante, von Interesse.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, erfolgte auch hier eine Transfektion von HEK293-T-Zellen, diesmal mit *DNAJC13(WT)-GFP* und der Mutante *DNAJC13(N855S)-GFP*. Darauf folgte eine Fraktionierung der Zellysate und über Western Blots die Quantifizierung der Proteinspiegel der getaggten DNAJC13-Varianten im Überstand und Pellet, um das Ausmaß der Aggregation zu bestimmen.

Beide DNAJC13-Varianten waren nach der Fraktionierung fast ausschließlich im Überstand nachweisbar (Abbildungen 8A und C), woraus sich ableiten lässt, dass sowohl *DNAJC13(WT)* als auch die *DNAJC13(N855S)*-Mutante unter diesen Bedingungen nur in einem sehr geringen Maße zur Aggregation neigen. Die jeweiligen relativen Proteinspiegel im Überstand waren signifikant höher als im Pellet. Dies scheint auch auf das endogen vorliegende DNAJC13 übertragbar zu sein, welches im Western Blot in Abbildung 8A aufgrund des niedrigeren Molekulargewichts als dünne Bande unterhalb der überexprimierten, GFP-getaggten Form zu sehen ist. Die Quotienten aus den DNAJC13-Spiegeln in Pellet und Überstand zur Darstellung des Aggregationsverhaltens waren zwischen dem Wildtyp und der N855S-Mutante vergleichbar (Abbildung 8D).

Analog zu Versuch 4.1 wurden Western Blots mit dem ursprünglichen Zellysate und den beiden daraus gewonnenen Fraktionen durchgeführt, um nachzuweisen, dass die Fraktionierung erfolgreich durchgeführt worden war. Dabei wurden ebenfalls die Antikörper von Histon H3 zum Nachweis der Aggregatfraktion und SOD1 als Markerprotein für die zytosolische Fraktion verwendet (Abbildung 8B).

In der Aggregatfraktion war kein SOD1 nachweisbar, umgekehrt jedoch konnte die zytosolische Fraktion nicht vollständig vom Pellet getrennt werden, Histon H3 lag hier in geringen Mengen vor (Abbildung 8B).

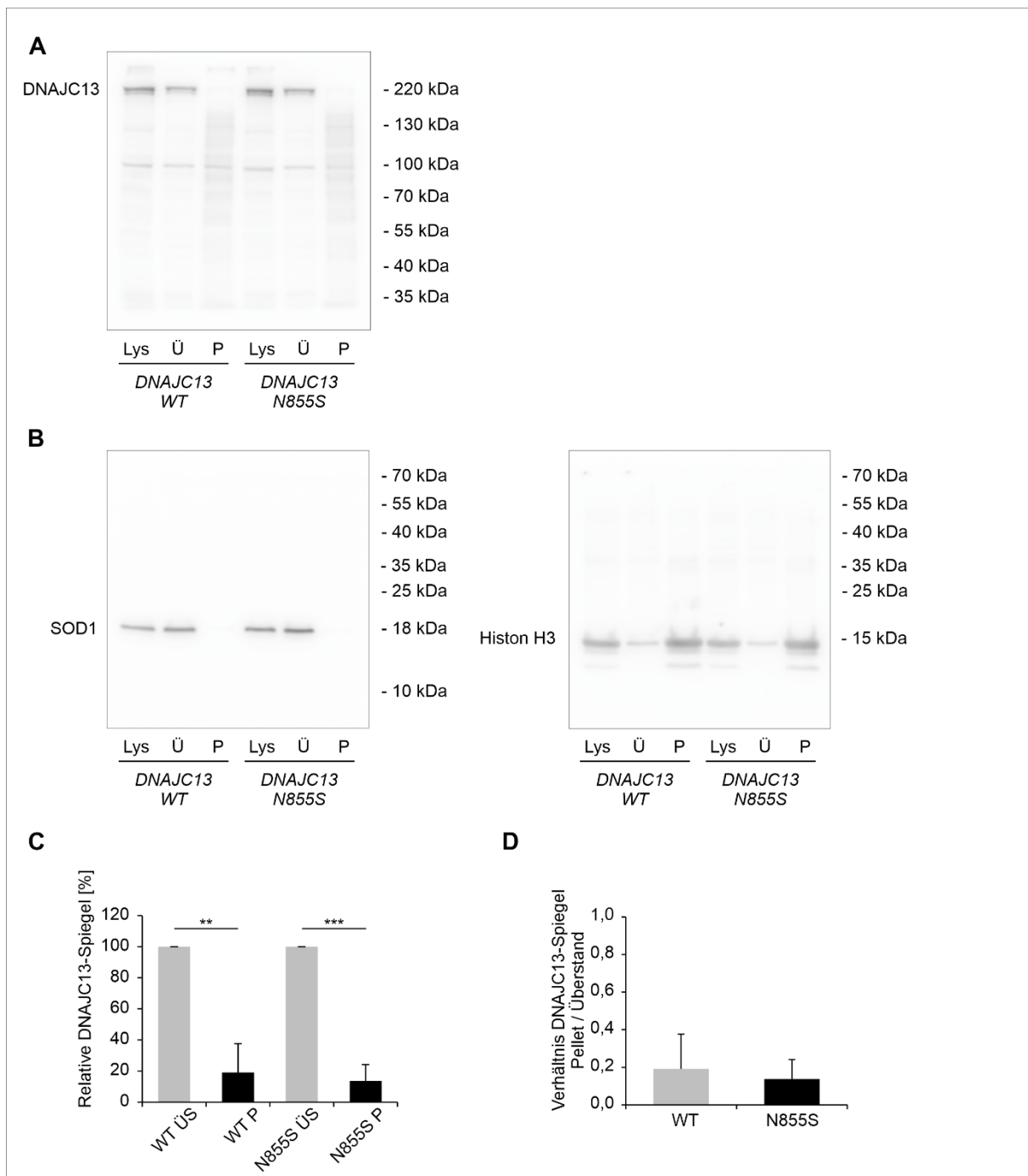


Abbildung 8: Aggregationsverhalten der Parkinson-assoziierten DNAJC13(N855S)-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. HEK293-T-Zellen wurden mit dem DNAJC13-Wildtyp oder der DNAJC13(N855S)-Mutante transfiziert und die Lysate in eine lösliche Überstandsfraktion (Ü) und eine Aggregat-beinhaltende Pelletfraktion (P) durch Zentrifugation fraktioniert. **A-B:** Die Western Blots zeigen die Proteinspiegel des transfizierten DNAJC13-Wildtyps und der DNAJC13(N855S)-Mutante sowie der endogenen SOD1- und Histon H3-Spiegel in Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Fraktionierung dar. **C:** Die relativen DNAJC13-Spiegel sind sowohl bei dem Wildtyp als auch bei der N855S-Mutante im Überstand signifikant höher als im Pellet. **D:** Quantifizierung des Western Blot in B. Das Verhältnis der DNAJC13-Wildtyp- und N855S-Spiegel in der unlöslichen zur löslichen Fraktion zeigt das Aggregationsverhalten. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante nachgewiesen werden (Mittelwert +/-SD, n=4, Students-t-Test, *: p≤0,05).

4.3 Autophagischer Flux in stabilen DNAJC13-Knockout-Zelllinien

Die Verwendung stabiler DNAJC13-Knockout-Zelllinien ermöglichte durch den Vergleich mit den entsprechenden Wildtyp-Zellen die Erforschung der Funktion von DNAJC13 im Autophagie-System. Dabei waren insbesondere die Auswirkungen eines Fehlens von DNAJC13 auf den autophagischen Flux von Interesse. Dieser wird nach Bafilomycin A₁-Behandlung quantifizierbar durch den Nachweis der Anreicherung von Proteinen, die durch Autophagie abgebaut werden (z.B. LC3B-II).

In dem entsprechenden Versuch wurden mittels Western Blot die LC3B-II-Spiegel in HEK293-T-Zellen bestimmt, sowohl im Wildtyp als auch in zwei DNAJC13-Knockout-Klonen, D7 und H11. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass in den Knockout-Klonen signifikant weniger LC3B-II unter Bafilomycin A₁-Behandlung akkumulierte als in den Wildtyp-Zellen, was einen reduzierten autophagischen Flux unter Abwesenheit von DNAJC13 impliziert (Abbildung 9). Diese Daten bestätigen Untersuchungen, die einen verminderten autophagischen Flux bei transienter Reduktion der DNAJC13-Proteinspiegel durch siRNA zeigen (Besemer et al., 2021).

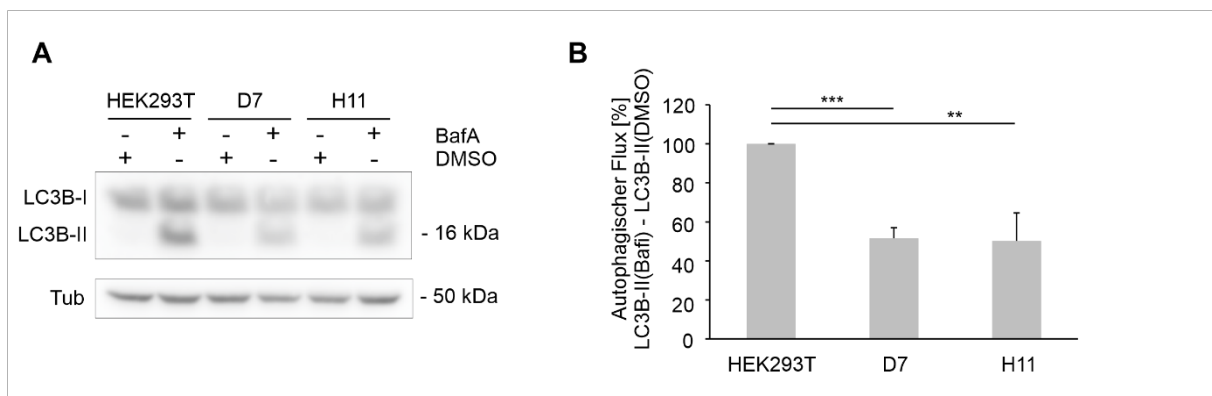


Abbildung 9: Autophagischer Flux in stabilen DNAJC13-Knockout-Zelllinien. HEK293-T-Zellen und die DNAJC13-Knockout-Klone D7 und H11 wurden mit Bafilomycin A₁ oder DMSO als Kontrolle behandelt. **A:** Der Western Blot zeigt die Proteinspiegel von LC3B-II für HEK293-T und die Knockout-Klone sowie Tubulin als Ladekontrolle. **B:** Der autophagische Flux der drei untersuchten Zelllinien wird mittels der Differenz der LC3B-II-Spiegel nach Bafilomycin A₁- und DMSO-Behandlung quantifiziert. Der autophagische Flux ist bei den Knockout-Klonen D7 und H11 im Vergleich zu den HEK293-T-Zellen signifikant reduziert (Mittelwert +/-SD, n=3, Students-t-Test, *: p≤0,05).

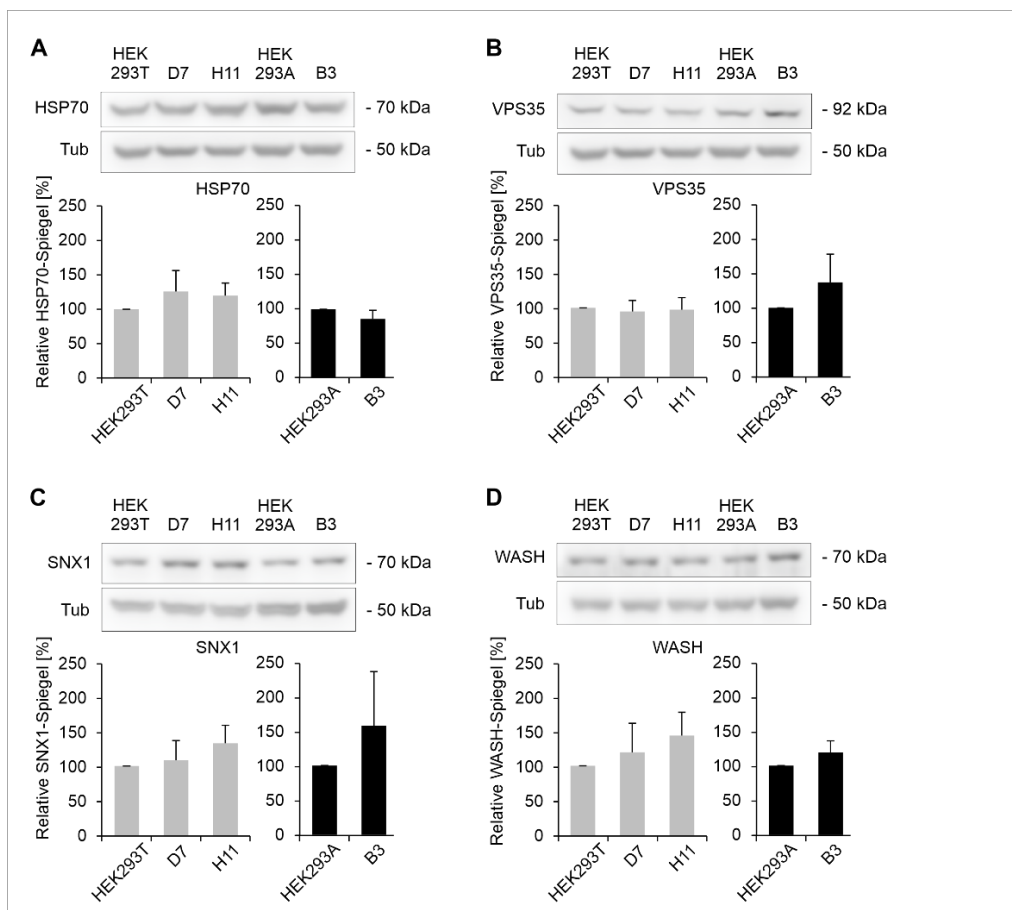
4.4 Einfluss des DNAJC13-KOs auf Komponenten des Retromer-Komplexes und des Autophagienetzwerks

4.4.1 Einfluss unter basalen Bedingungen

DNAJC13 ist funktionell mit den Retromer- und WASH-Komplexen verbunden und bindet direkt an SNX1 (Popoff et al., 2009; Shi et al., 2009) sowie an FAM21 (Freeman

et al., 2014). Um zu untersuchen, ob der stabile Knockout von DNAJC13 zu einer Veränderung der Proteinspiegel von Komponenten der beiden Komplexe und des Autophagie-Netzwerks unter basalen Bedingungen führt, wurden Western Blots durchgeführt. Dazu wurden Gesamtllysate von HEK293-T- und HEK293-A-Knockout-Linien und den entsprechenden naiven Zelllinien mittels Western Blot analysiert. Hinsichtlich des Retromer-Komplexes wurden HSP70, VPS35, SNX1 und WASH überprüft. Außerdem wurden die Spiegel der an der Autophagie beteiligten Proteine p62, ULK1 und Beclin bestimmt.

Im Vergleich der naiven HEK293-T- und -A-Zellen mit ihren jeweiligen Knockout-Klonen konnte bei keinem der überprüften Komponenten ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen Proteinspiegel nachgewiesen werden (Abbildung 10).



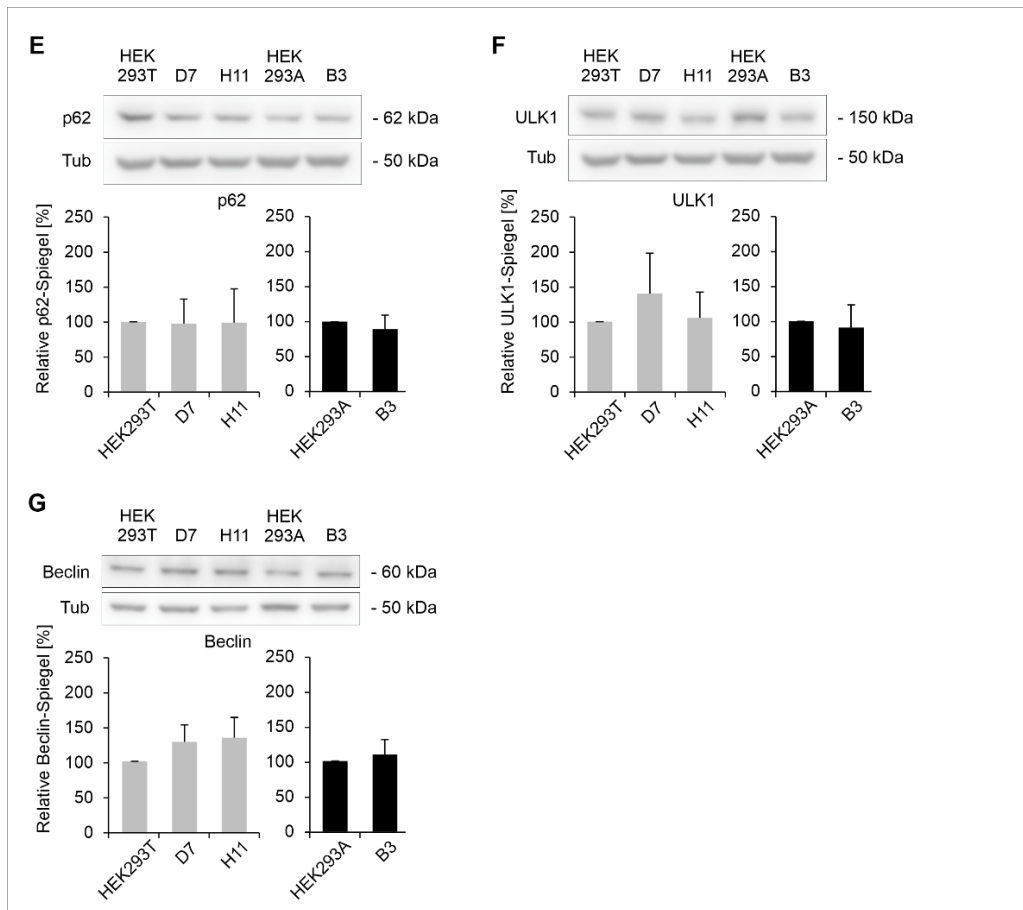


Abbildung 10: Einfluss des DNAJC13-Knockouts auf Komponenten des Retromer-Komplexes und des Autophagie-Netzwerks unter basalen Bedingungen. A-D: Die Western Blots zeigen die Spiegel von Retromer-assoziierten Proteinen (HSP70, VPS35, SNX1, WASH) in den einzelnen Zelllinien. Die Säulendiagramme zeigen die relativen Proteinspiegel, die naiven HEK293-T- und -A-Zellen dienen dabei als Referenz (= 100%). E-G: Western Blots und Säulendiagramme zu den Proteinspiegeln der Komponenten des Autophagie-Netzwerks (p62, ULK1, Beclin) (Mittelwert \pm SD, $n=4$, Students-t-Test, $*: p \leq 0,05$).

4.4.2 Einfluss unter Autophagie-stimulierenden Bedingungen

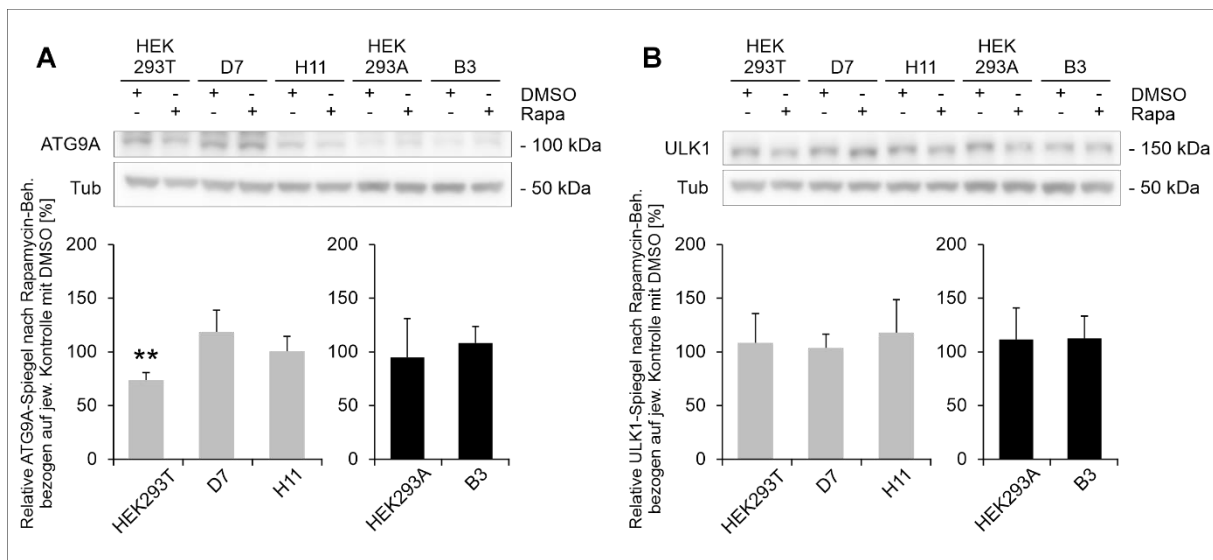
DNAJC13 wie auch VPS35 als Bestandteil des Retromer-Komplexes und WASH als Bestandteil des WASH-Komplexes sind als Modulatoren der Autophagie beschrieben (Zavodszky et al., 2014; Maruzs et al., 2015). Um zu überprüfen, ob die Proteinspiegel von Retromer- und WASH-Komplexproteinen nach Stimulation der Autophagie in Abhängigkeit von DNAJC13 verändert sind, wurden die Zelllinien mit Rapamycin behandelt. Rapamycin hemmt die Aktivität von mTOR, was zu einer Steigerung des autophagischen Fluxes führt. In früheren Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der autophagische Flux auch nach Induktion der Autophagie durch Rapamycin bei transientem Knockdown von DNAJC13 reduziert ist (Besemer et al., 2021).

Es wurden die Proteinspiegel von WASH, SNX1 und SNX2, welche mit dem Retromer-Komplex assoziiert sind, sowie von ATG9A, ULK1 und Beclin als Bestandteile des Autophagie-Systems analysiert.

In der Auswertung wurden die relativen Proteinspiegel betrachtet, wobei hier die fünf Zelllinien isoliert voneinander analysiert wurden. Die jeweiligen Spiegel der untersuchten Proteine bei vorangegangener Rapamycin-Behandlung wurden ins Verhältnis zu der Kontrollbehandlung mit DMSO gesetzt, welche als Referenz diente.

Bei ULK1, Beclin, WASH, SNX1 und SNX2 konnte bei den Proteinspiegeln nach Rapamycin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, sowohl bei den naiven HEK293-T und -A-Zellen als auch bei ihren DNAJC13-Knockout-Klonen (Abbildung 11B-E).

Wie in Abbildung 11A zu sehen, war ATG9A hingegen in naiven HEK293-T-Zellen nach Rapamycin-Behandlung jeweils in Bezug auf die jeweilige Kontrolle signifikant reduziert. Bei naiven HEK293-A-Zellen ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen.



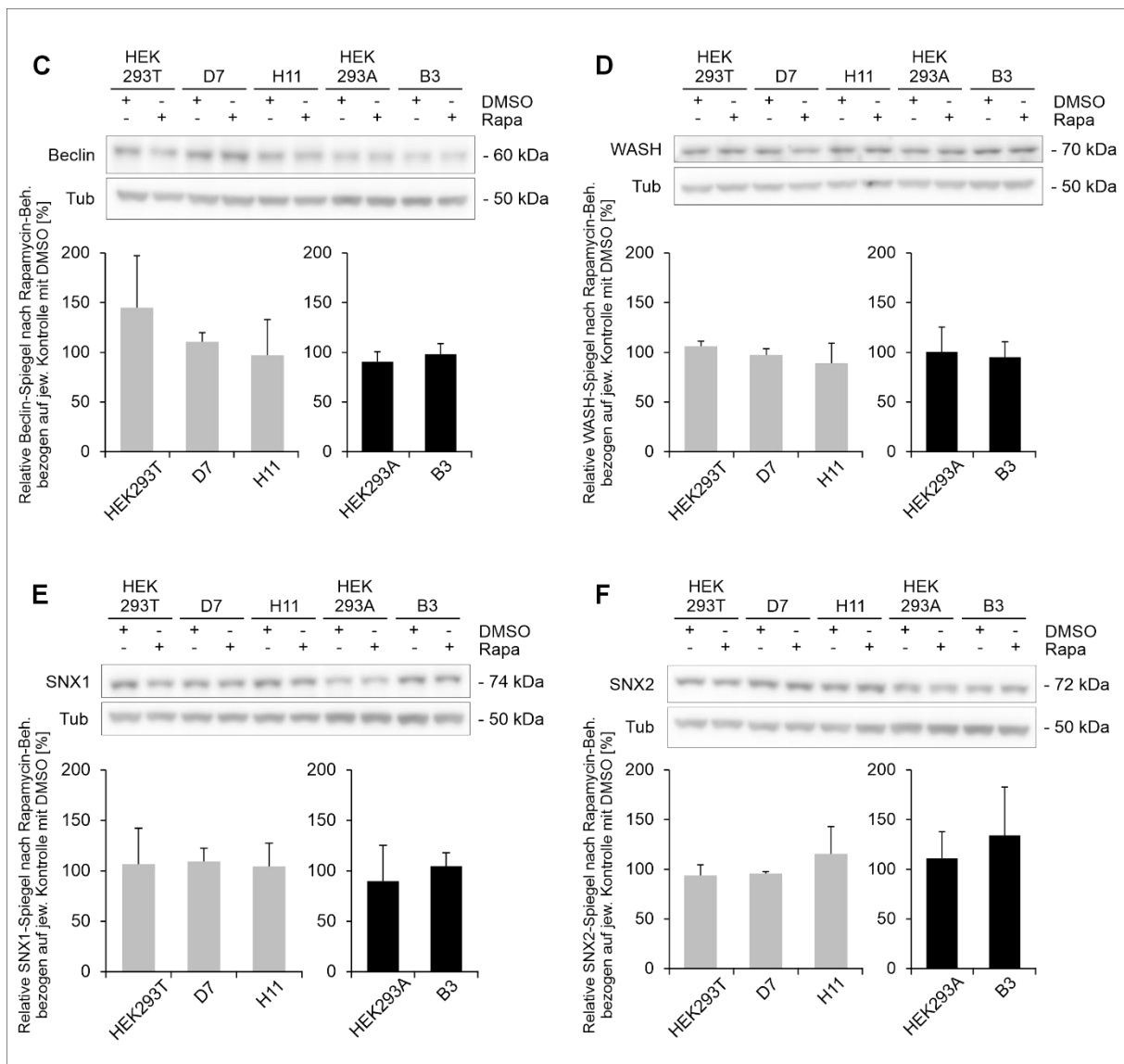


Abbildung 11: Einfluss des DNAJC13-Knockouts auf Komponenten des Retromer-Komplexes und des Autophagie-Netzwerks unter Autophagie-stimulierenden Bedingungen. Naive HEK293T-Zellen sowie die DNAJC13-Knockout-Klone D7 und H11 wurden mit Rapamycin behandelt und anschließend mittels Western Blots untersucht. **A-C:** Die Western Blots zeigen die Proteinspiegel von Komponenten des Autophagie-assoziierten Proteinen (ATG9A, ULK1, Beclin) in den einzelnen Zelllinien. Die Säulendiagramme zeigen die relativen Proteinspiegel, als Referenz (= 100%) dienen die jeweiligen Spiegel bei DMSO-Behandlung als Kontrolle. **D-F:** Western Blots und Säulendiagramme zu den Spiegeln der Retromer-assoziierten Proteine (WASH, SNX1, SNX2) (Mittelwert \pm SD, $n=4$, Students-t-Test, **: $p<0,01$).

4.5 Untersuchung der Interaktion zwischen ATG9A und DNAJC13

Grundlage der Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A waren vorangegangene Beobachtungen von Besemer et al., dass in immunhistochemischen Färbungen die Lokalisation von ATG9A am späten und Recycling-Endosom unter transientem DNAJC13-Knockdown reduziert war. Dies basierte auf einer verminderten Koloalokalisation von ATG9A mit dem TGN, sowie Rab7

und Rab11. Zudem verblieb ATG9A, welches nach Autophagiestimulation durch Rapamycin normalerweise vom Recycling-Endosom wegdiffundiert, unter DNAJC13-Knockdown an Ort und Stelle (Besemer et al. 2021).

Dies weist darauf hin, dass der Transport von ATG9A selbst beeinträchtigt sein könnte, und dass dieser Prozess möglicherweise von DNAJC13 abhängt. Auf eine funktionelle Interaktion zwischen ATG9A und DNAJC13 weisen auch die oben gezeigten Ergebnisse hin. Bei wildtypischen HEK293-T-Zellen sind die ATG9A-Spiegel nach Rapamycin-Behandlung reduziert, während sie in den beiden Knockout-Linien unverändert bzw. leicht erhöht sind.

4.5.1 Untersuchung einer funktionellen Interaktion zwischen ATG9A und DNAJC13

Zunächst wurde analysiert, ob eine funktionelle Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A vorliegt. Hierzu wurde untersucht, ob die Überexpression von ATG9A einen Knockout von DNAJC13 und die damit einhergehende Reduktion der autophagischen Aktivität kompensieren kann.

Wie im Versuch 4.3 bereits gezeigt, ist der autophagische Flux in DNAJC13-KO-Zellen signifikant reduziert. Um zu testen, ob eine Erhöhung der ATG9A-Spiegel in diesen Zellen den Flux wieder steigern kann, wurden naive HEK293-T- und der Knockout-Klon H11 mit HA-getaggten ATG9A-Konstrukten transfiziert. Danach wurde der autophagische Flux nach Behandlung der Zelllysate mit Bafilomycin A₁ bestimmt und die LC3B-II-Spiegel von Zellen mit und ohne ATG9A-Überexpression mittels Western Blot quantifiziert und verglichen.

Die Transfektionseffizienz wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen geprüft, wobei HEK293-T-Zellen auf mit Polyornithin beschichteten Deckgläsern kultiviert wurden. Mittels Konfokalmikroskopie konnte das Fluoreszenzsignal der erfolgreich transfizierten Zellen festgehalten werden. Dabei zeigte sich, dass die Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, nur einen geringen Anteil der Gesamtzellzahl ausmachten und sich zudem morphologisch verändert hatten, was darauf hinweist, dass sie nicht mehr vital waren (Abbildung 12).

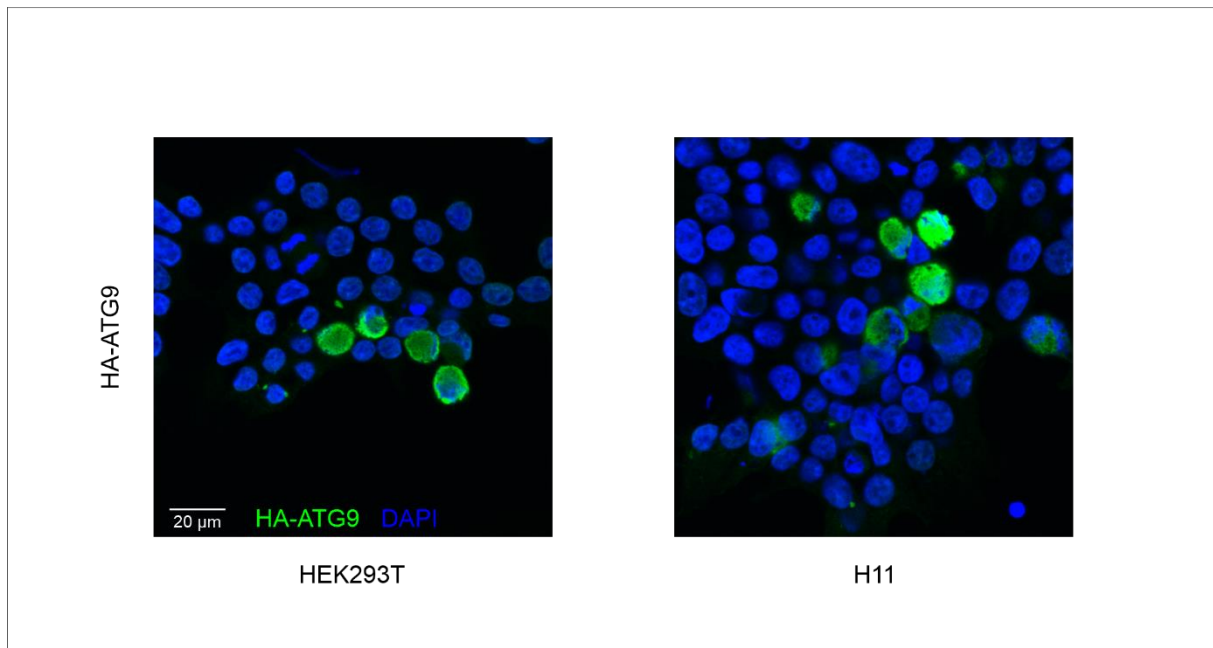


Abbildung 12: Transfektionseffizienz von HA-ATG9 in naiven HEK293-T-Zellen und dem DNAJC13-Knockout-Klon H11. Darstellung durch immunhistochemische Färbungen. In beiden Zelllinien hat nur ein geringer Anteil der Zellen das HA-ATG9-Plasmid aufgenommen. Die transfizierten Zellen sind zum größten Teil morphologisch verändert.

Bei Vergleich der Zellen mit Überexpression von ATG9A mit den nicht-transfizierten Kontrollen konnte weder in den HEK293-T-Zellen noch im Knockout-Klon H11 eine signifikante Veränderung des autophagischen Fluxes nachgewiesen werden (Abbildung 13).

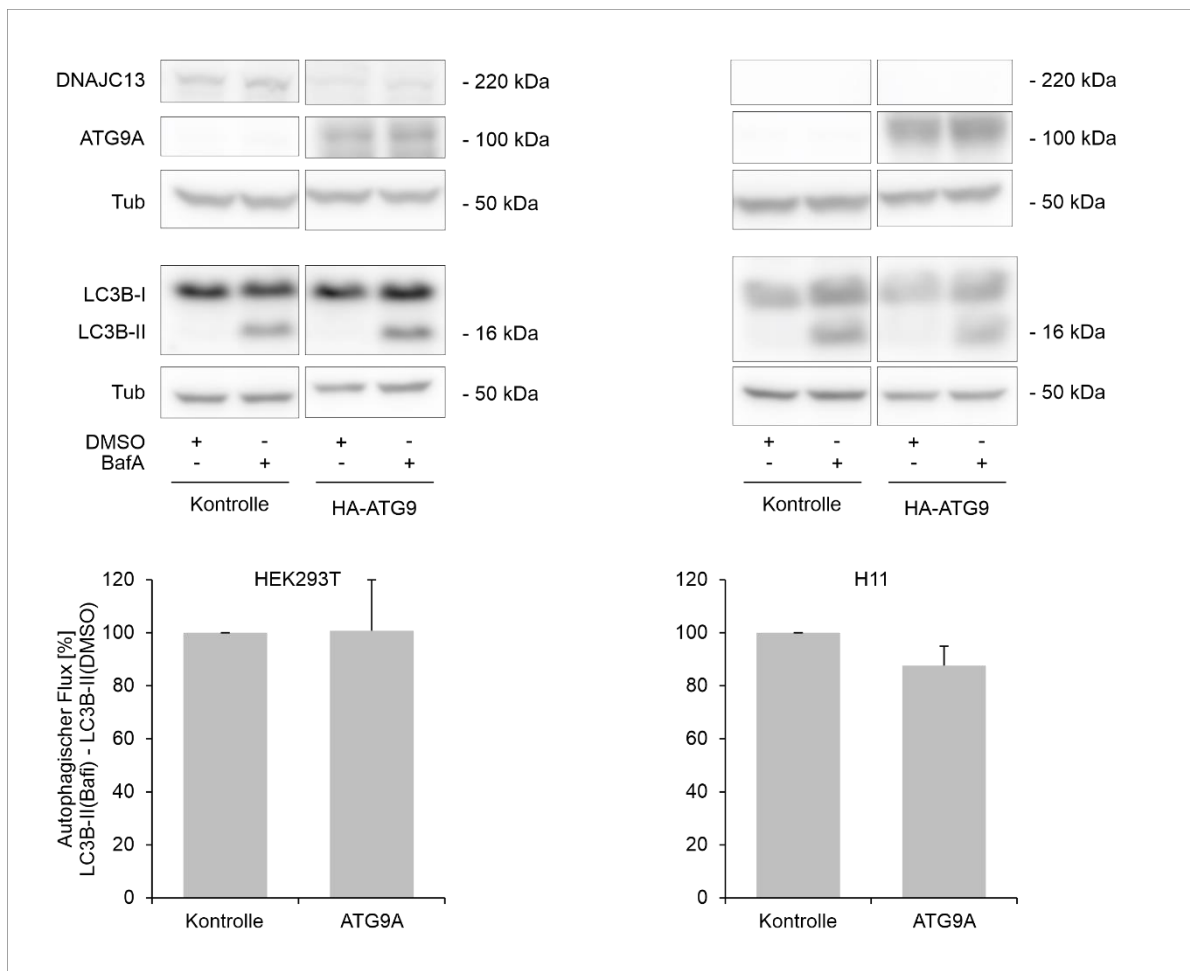


Abbildung 13: Untersuchung einer funktionellen Interaktion zwischen ATG9A und DNAJC13. Die Western Blots zeigen die ATG9A-Überexpression sowie die Proteinspiegel von LC3B-II nach Behandlung mit Bafilomycin A₁ oder DMSO. Die Säulendiagramme zeigen den autophagischen Flux von naiven HEK293-T-Zellen und dem DNAJC13-Knockout-Klon H11 als Differenz der LC3B-II-Spiegel nach Bafilomycin A₁- und DMSO-Behandlung (Mittelwert +/-SD, n=4, Students-t-Test, *: p<0,05).

4.5.2 Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9

Um eine potenzielle direkte Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A nachzuweisen, wurde eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) durchgeführt.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, ein Protein mit seinem Bindungspartner mittels eines sogenannten Pulldowns aus dem Zelllysat herauszufiltern und diesen Bindungspartner anschließend im Western-Blot mit dem entsprechenden spezifischen Antikörper nachzuweisen. Der Pull-down erfolgt mithilfe von Antikörpern, die an sogenannte Beads gekoppelt sind und eine Anreicherung mit physikalischen Methoden wie Zentrifugation oder Magnetfelder ermöglichen.

Die verwendeten HEK293-T-Zellen wurden zunächst mit Flag-getagtem DNAJC13 und mit HA-getagten ATG9A transfiziert. Die Lysate von parallelen Ansätzen wurden

zum einen mit Sepharose-Beads, an die anti-FLAG-Antikörper gekoppelt waren, versetzt, zum anderen wurden ferromagnetische Beads, an die anti-HA-Antikörper gekoppelt waren, hinzugegeben. Die Präzipitate wurden anschließend über Western Blot analysiert.

Bestünde eine direkte Wechselwirkung zwischen ATG9A und DNAJC13, wäre ATG9A mit den Flag-Beads im Pull-down mitgezogen worden und anschließend im Western Blot über HA-Antikörper nachweisbar gewesen. Umgekehrt hätten die HA-Beads über ATG9A DNAJC13 präzipitiert, welches im Nachhinein mit Flag-Antikörpern detektierbar gewesen wäre.

Zur Validierung der Methode musste überprüft werden, dass einerseits die an die Beads gekoppelten Flag- und HA-Antikörper ihre spezifischen Antigene präzipitieren. Andererseits musste sichergestellt werden, dass die Beads nicht den möglichen Interaktionspartner binden.

Die Positivkontrollen zeigten, dass die HA-Beads spezifisch an das transfizierte HA-ATG9A und die Flag-Beads an DNAJC13-Flag gebunden hatten (Abbildung 14A). Im Vergleich zu den Ausgangslysaten, die für den Versuch verwendet worden waren, wurde außerdem ersichtlich, dass die Beads ihre Zielproteine effizient aus dem Lysat gezogen und damit aufkonzentriert hatten. Zur Durchführung der Negativkontrolle wurden *HA-ATG9*-Lysate mit Flag-Beads und *DNAJC13-Flag*-Lysate mit HA-Beads versetzt und die Präzipitate mittels Western Blot überprüft. In beiden Fällen wurden keine relevanten Proteine gefällt (Abbildung 14B).

Die Co-IP wurde mit Lysaten von mit *HA-ATG9* und *DNAJC13-Flag* ko-transfizierten Zellen durchgeführt. Nach der Fällung mit HA- oder Flag-Beads konnte in beiden Fällen keine Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A nachgewiesen werden. In den doppelt transfizierten IP-Proben, die mit Flag-Beads inkubierten, wurde kein ATG9A im Pull-down mitgezogen, umgekehrt zogen die HA-Beads kein DNAJC13 mit.

Um zu demonstrieren, dass die Co-IP bei einer existierenden Bindung der Proteine funktioniert hätte und die Bindung durch das angewandte Versuchsprotokoll nicht zerstört worden wäre, wurde HSP70, ein etablierter Interaktionspartner von DNAJC13, nachgewiesen. HSP70 wurde nur in den Flag-Bead-Präzipitaten aus *DNAJC13-Flag*-Lysaten nachgewiesen, nicht aber in HA-Bead-Präzipitaten aus *HA-ATG9*-Lysaten (Abbildung 14C). Dies zeigt einerseits, dass Co-IPs grundsätzlich unter den gewählten

Bedingungen durchführbar sind und andererseits, dass die HA-Beads und Flag-Beads hinreichend spezifisch sind.

Es wurde der Versuch unternommen, das Experiment durch Erhöhung der Transfektionseffizienz von DNAJC13 zu optimieren, da die doppelt transfizierten Zellen bevorzugt *HA-ATG9* exprimierten. Dies könnte unter anderem auf das wesentlich geringere Molekulargewicht von *HA-ATG9* zurückzuführen sein. Die Überexpression von DNAJC13 war nur sehr gering und ging kaum über die endogenen Werte hinaus. Um auszuschließen, dass eine zu geringe Menge an exprimiertem DNAJC13 für den fehlenden Interaktionsnachweis verantwortlich ist, wurden die Plasmidmengen angepasst und die Menge an eingebrachtem DNAJC13-Plasmid von 50% auf 75% der Gesamtmenge erhöht, während *HA-ATG9* entsprechend reduziert wurde. Doch auch damit ließ sich die Expressionsrate nicht wesentlich erhöhen. Daher wurden die Zellen in einem weiteren Ansatz anstelle einer Ko-Transfektion mit *HA-ATG9* und *DNAJC13-Flag* nur mit *DNAJC13-Flag* transfiziert, um die Expression von DNAJC13 zu fördern. Dabei wurde eine mögliche Bindung mit endogenem ATG9A geprüft. Auch hier zeigte sich keine direkte Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A.

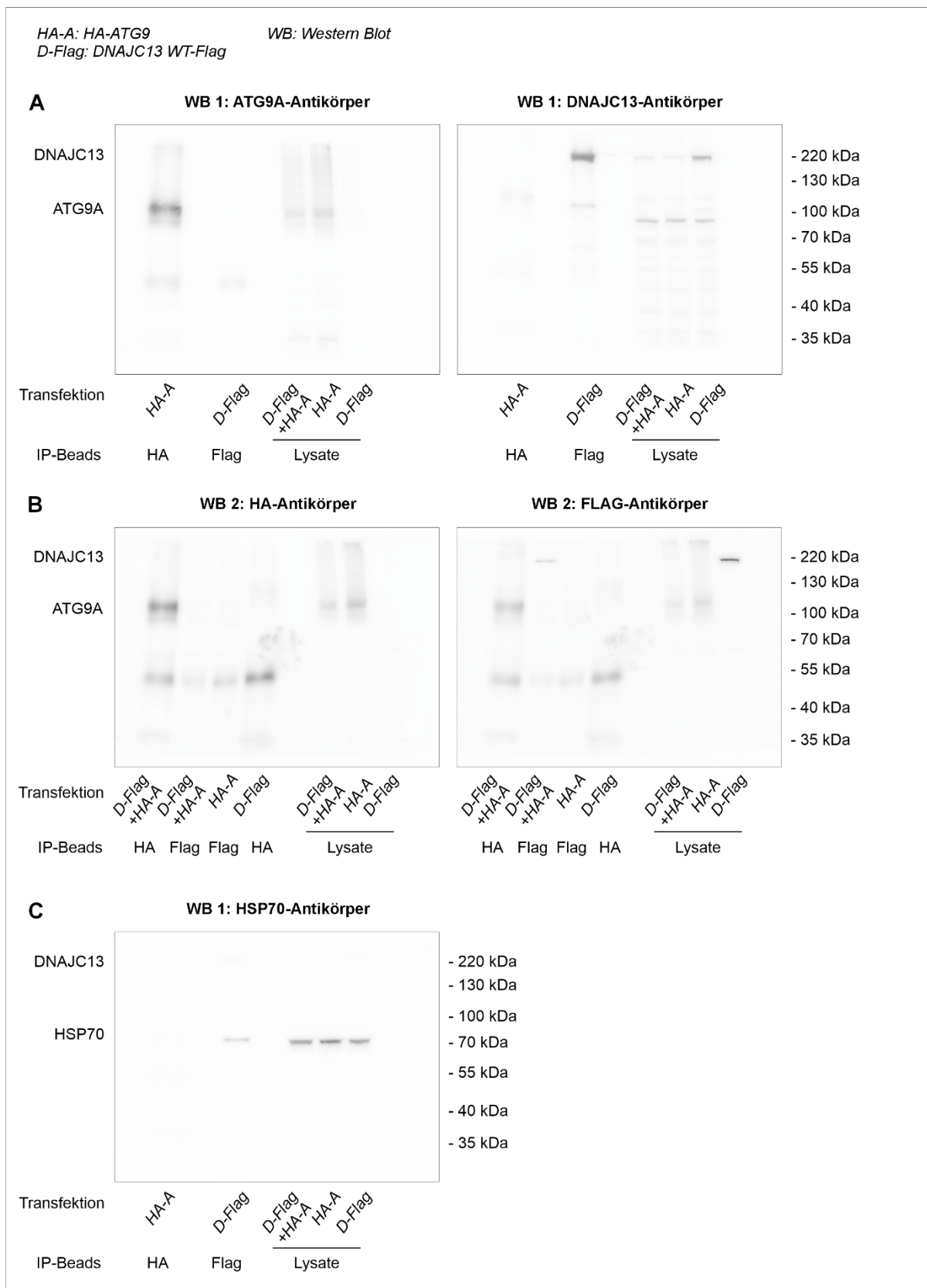


Abbildung 14: Untersuchung der direkten Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A mittels Co-IP. HEK293-T-Zellen wurden mit HA-ATG9 und DNAJC13-Flag-Konstrukten einzeln oder in Kombination transfiziert. Lysate wurden mit Beads, an die entweder Antikörper gegen HA oder Flag gekoppelt wurden, versetzt. Die Lysate und Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert, wobei die beiden Blots in A und B jeweils dieselben Membranen darstellen, die mit unterschiedlichen Antikörpern entwickelt wurden. Gezeigt ist eines von mindestens drei unabhängigen Experimenten. **A:** Gezeigt ist die Spezifität der HA- und Flag-Beads, die jeweils nur

die spezifischen Antigene präzipitierten. **B:** Die Analyse von mit HA-ATG9 und DNAJC13-Flag kointransfizierten Zelllysaten zeigt, dass diese nur über die jeweiligen spezifischen Beads, nicht aber im Komplex, präzipitiert wurden. **C:** Positivkontrolle der Co-IP mit HSP70 als Interaktionspartner von DNAJC13. Die Membran aus A wurde mit dem HSP70-Antikörper entwickelt.

4.6 Die Rolle von DNAJC13 bei der Aufrechterhaltung der endosomalen Integrität bei verändertem endosomalem Milieu

4.6.1 Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Bafilomycin A₁

DNAJC13 ist ein für das endosomale System essenzieller Regulator, der auf Ebene des frühen Endosoms agiert und in Assoziation mit dem Retromer-Komplex, insbesondere dessen Komponente SNX1, den retrograden Transport von endosomalem Cargo und die Einleitung in den lysosomalen Abbauweg aufeinander abstimmt (Popoff et al., 2009; Shi et al., 2009; Norris et al., 2017; Norris et al., 2022).

Um die Rolle von DNAJC13 in der endosomalen Homöostase weiter zu erörtern, wurde untersucht, wie sich eine Veränderung des dort vorliegenden Milieus, z.B. bezüglich des jeweiligen pH-Werts, auf das endosomale System auswirkt und inwiefern DNAJC13 an der Aufrechterhaltung der endosomalen Kompartimente beteiligt ist.

Naive HEK293-A-Zellen wurden erneut den DNAJC13-Knockout-Klonen B3 und G4 gegenübergestellt, diesmal mittels immunhistochemischer Färbungen. Hierfür wurden HEK293-A-Zellen und die Knockout-Klone für die Fluoreszenzfärbungen auf Deckgläsern kultiviert und vor der Fixierung für 4 Stunden mit Bafilomycin A₁ bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert.

Bafilomycin A₁ ist ein Antibiotikum der Gruppe der Makrolide und zudem ein häufig eingesetzter Inhibitor des autophagischen Fluxes (Yoshimori et al., 1991), da es die Ansäuerung der Lysosomen über Hemmung der vakuolären H⁺-ATPase verhindert (Bowman et al., 1988). Doch auch das zunehmend saure Milieu vom frühen bis zum späten Endosom ist auf diese H⁺-ATPase zurückzuführen, wobei der pH-Wert auf variierenden Anteilen ihrer V₁ und V₀ Untereinheit beruht. Der V₁-Anteil steigt im Verlauf vom frühen bis zum späten Endosom (Lafourcade et al., 2008). Die V₁-Untereinheit übernimmt die eigentliche Funktion der H⁺-ATPase, während die V₀-Untereinheit an der Translokation von Protonen über die Membran und an der Fusion von Vesikeln beteiligt ist (Arai et al., 1988; Forgac, 1999). Bafilomycin A₁ bindet an die

V₀-Domäne (Zhang et al., 1994), speziell an deren c-Untereinheit (Bowman & Bowman, 2002).

Zunächst wurde der Effekt der Behandlung mit Bafilomycin A₁ auf unterschiedliche endosomale Kompartimente analysiert, sowohl in naiven HEK293-A-Zellen als auch in den DNAJC13-Knockout-Klonen B3 und G4. Hierfür wurde die intrazelluläre Lokalisation bzw. Verteilung von ATG9A sowie von verschiedenen Markerproteinen der einzelnen Kompartimente untersucht, EEA1 als Marker für das frühe Endosom, der Transferrin-Rezeptor (TfR), der den Transportweg von der Zelloberfläche zum frühen Endosom markiert, TGN46 als Marker für das trans-Golgi-Netzwerk und der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) als Cargo zwischen dem TGN und den Endosomen.

Das Verteilungsmuster aller untersuchten Proteine nach Bafilomycin A₁-Behandlung unterschied sich dabei in den Knockout-Zelllinien B3 und G4 deutlich von den naiven HEK293-A-Zellen. Nur unter Depletion von DNAJC13 war beispielweise ATG9A nach Hemmung der vakuolären H⁺-ATPase nicht mehr als isolierte Punkte in der gesamten Zelle verteilt, sondern akkumulierte in einzelnen großen Aggregaten (s. Abbildungen 15-18). Denselben Effekt hatte die endosomale pH-Wert-Änderung bei den Klonen B3 und G4 auf EEA1 (Abbildung 15), den Transferrin-Rezeptor (Abbildung 16), TGN46 (Abbildung 17) und den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Abbildung 18). Auch bei diesen Proteinen kam es zu einer klar abgrenzbaren, vereinzelter Akkumulation.

Eine wichtige Beobachtung ist hierbei, dass mit Ausnahme des TGN-Markers alle untersuchten Proteine in denselben Aggregaten akkumulierten und somit kolokalisierten, jedoch nur in den Knockout-Klonen und unter Einfluss von Bafilomycin A₁. Das TGN akkumuliert in den Zelllinien B3 und G4 nach Bafilomycin A₁-Behandlung ebenfalls, bildet aber, wie in Abbildung 17 zu sehen, ein separates Aggregat, welches sich in der Nähe der anderen aggregierten Komponenten des endosomalen Systems befindet, jedoch nicht mit ihnen kolokalisiert. Auch das TGN scheint also durch die pH-Veränderung strukturell verändert worden zu sein.

Diese Veränderung des intrazellulären Verteilungsmusters der verschiedenen Markerproteine könnte auf einem Kollaps des endosomalen Systems beruhen, der in voller Ausprägung allerdings nur aufzutreten scheint, wenn DNAJC13 fehlt.

In den naiven HEK293-A-Zellen, die DNAJC13 exprimieren, blieb die punktuelle Verteilung unter Einwirkung von Bafilomycin A₁ noch weitestgehend erhalten, wenn

auch teilweise schon merklich kondensierter als unter Kontrollbedingungen (s. Abbildungen 15-18). Auch hier schien sich die Bafilomycin A₁-Behandlung also bereits auf die intrazelluläre Verteilung der untersuchten Proteine auszuwirken, es kam jedoch nicht zur Bildung von deutlich abgrenzbaren Aggregaten wie in den Knockout-Zellen.

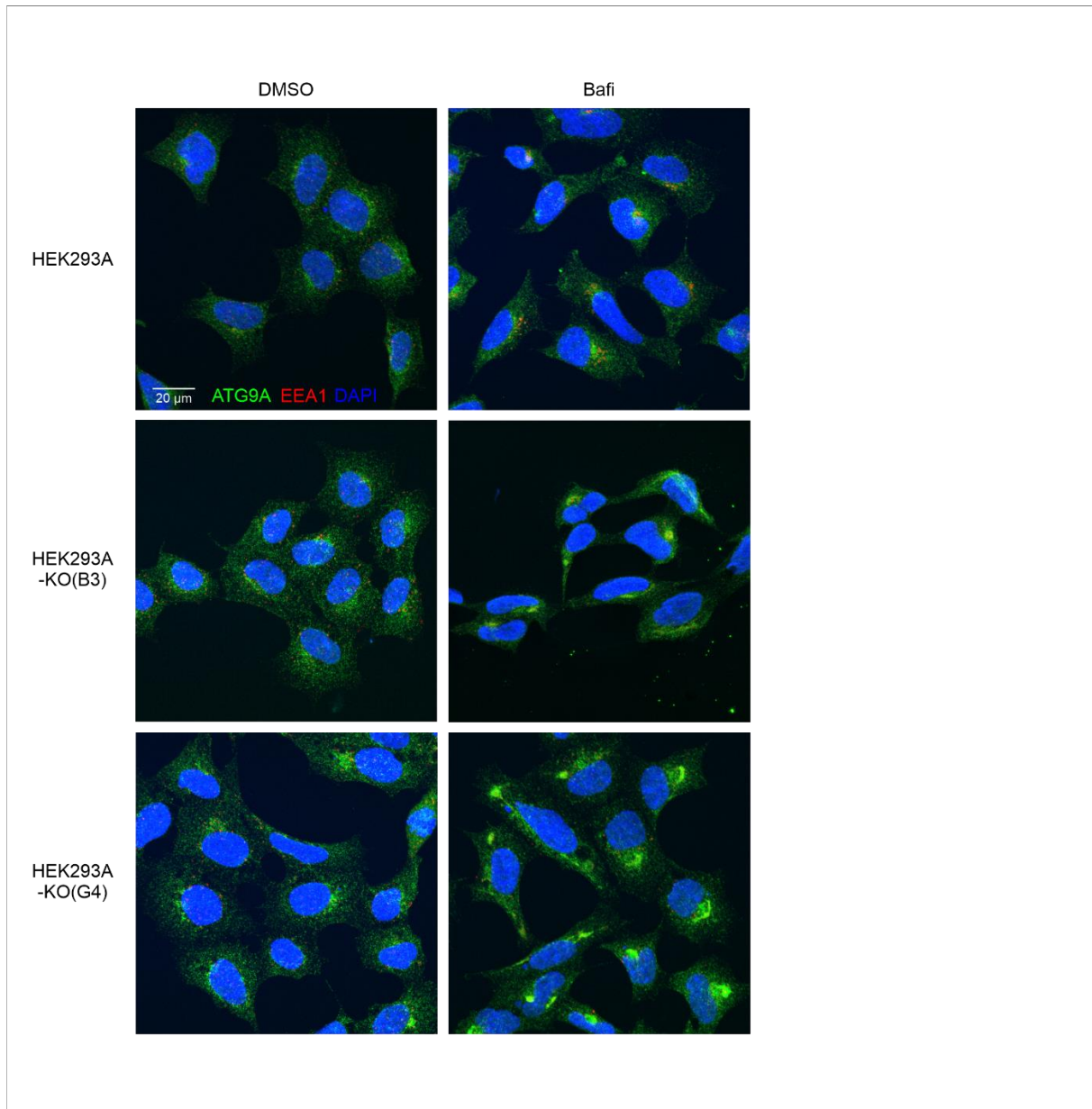


Abbildung 15: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klone B3 und G4 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und EEA1. Darstellung durch immunhistochemische Färbungen. In beiden Klonen aggregierten und kolokalisierten ATG9A und EEA1 nach Bafilomycin A₁-Behandlung.

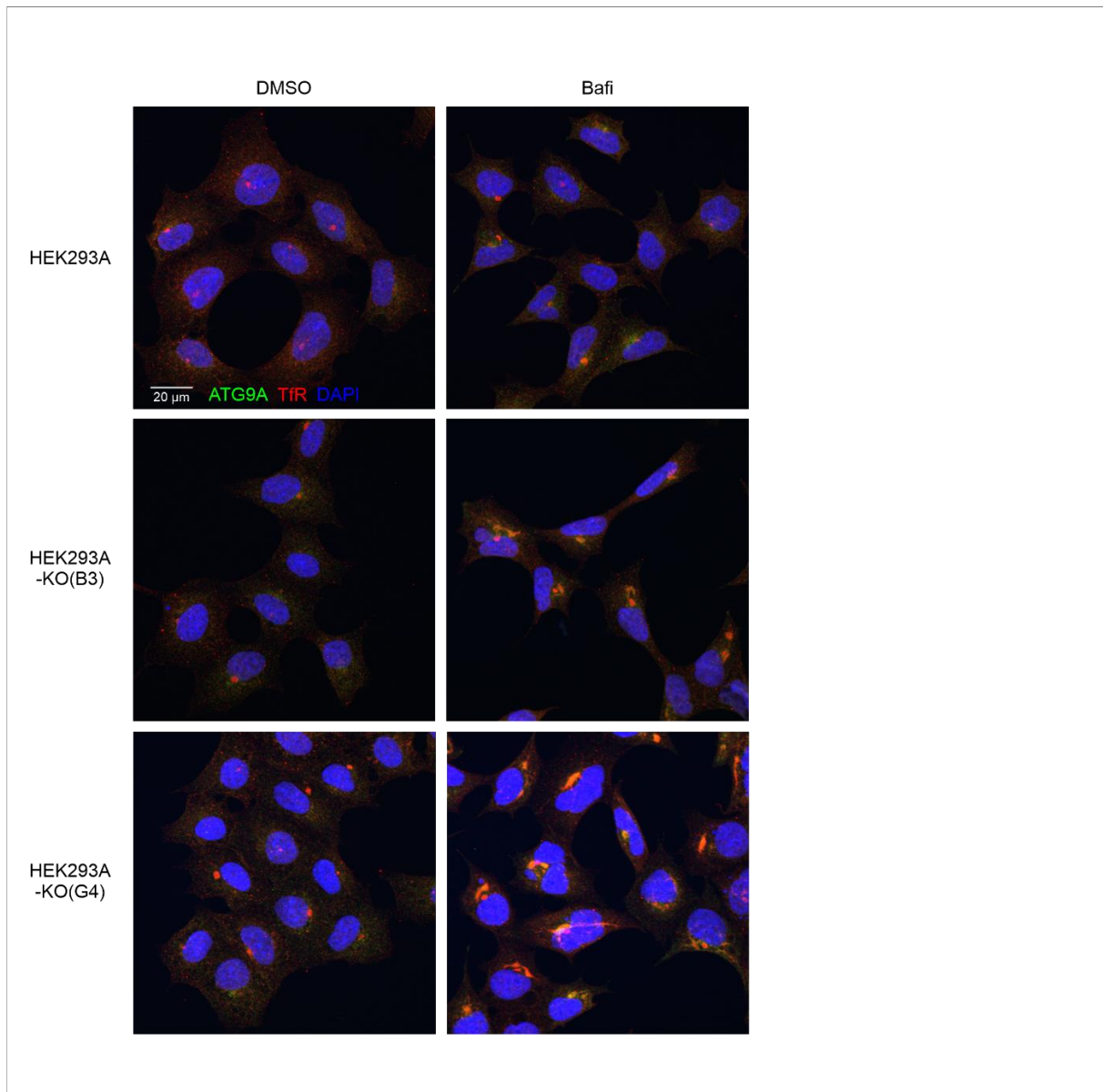


Abbildung 16: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klone B3 und G4 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und dem Transferrin-Rezeptor (TfR). Darstellung durch immunhistochemische Färbungen. ATG9A und der TfR bildeten in beiden Knockout-Klonen nach Bafilomycin A₁-Behandlung gemeinsame Aggregate.

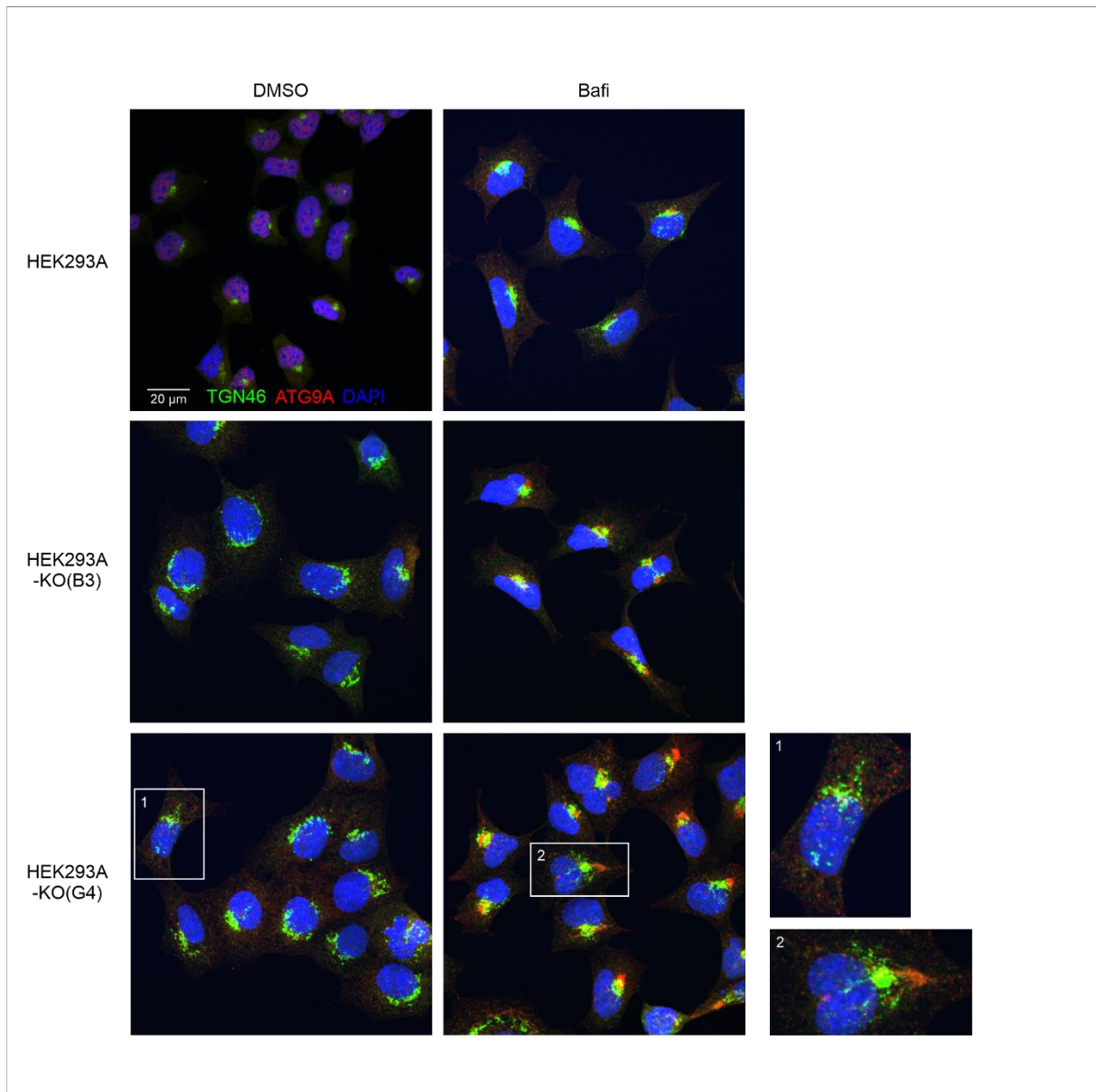


Abbildung 17: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klone B3 und G4 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und TGN46. Darstellung durch immunhistochemische Färbungen. TGN46 akkumulierte wie ATG9A nach Bafilomycin A₁-Behandlung, kolokalisierte dabei jedoch nicht mit dem ATG9A-Aggregat.

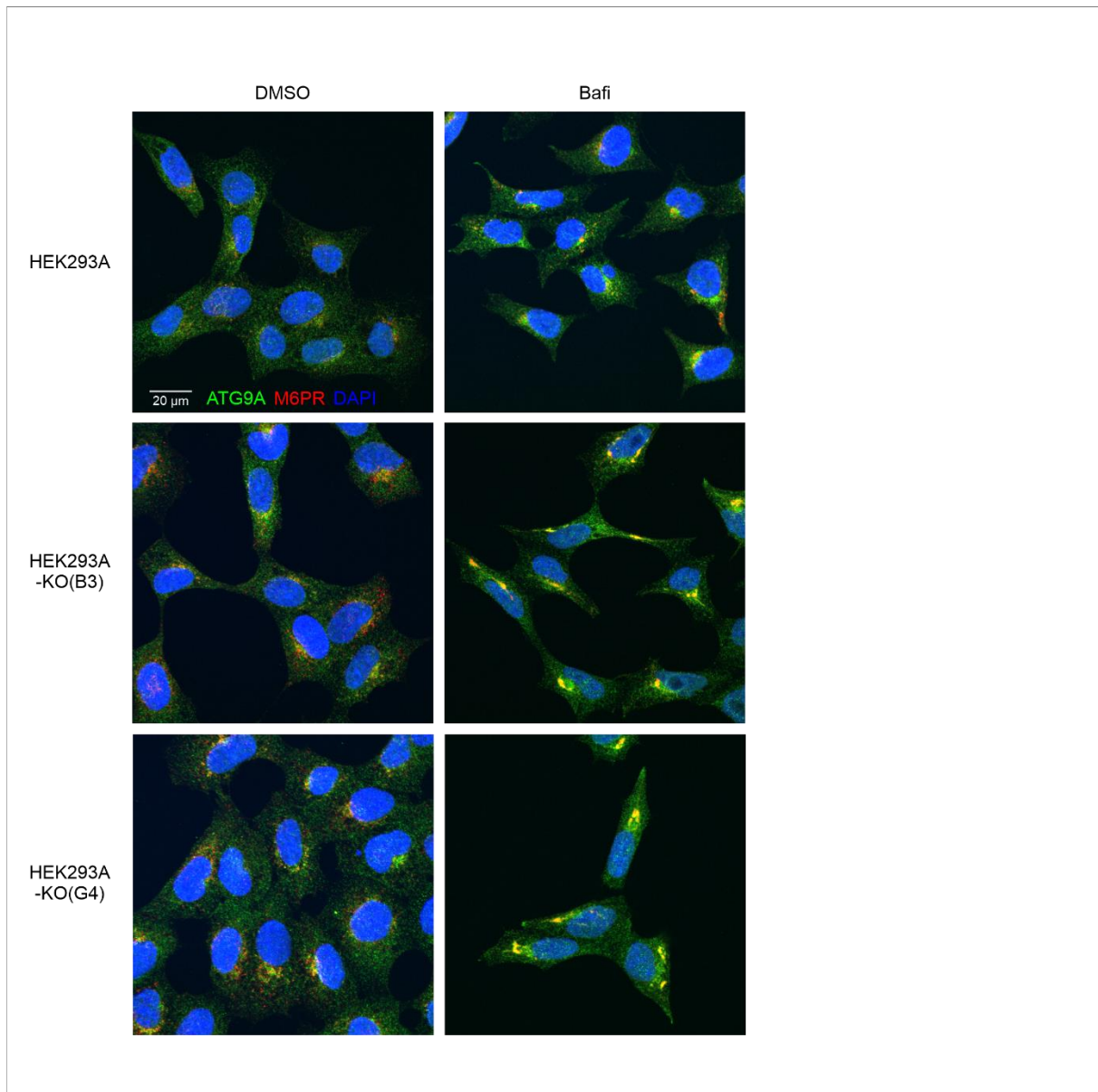


Abbildung 18: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klone B3 und G4 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR). Darstellung durch immunhistochemische Färbungen. Auch der M6PR akkumulierte unter Einfluss von Bafilomycin A₁ zusammen mit ATG9A in denselben Aggregaten.

4.6.2 Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Concanamycin A

Um nachzuprüfen, ob die veränderte intrazelluläre Verteilung der analysierten Proteine spezifisch auf die Hemmung der vakuolären H⁺-ATPase zurückzuführen ist, wurde getestet, ob sich der Effekt von Bafilomycin A₁ insbesondere in den DNAJC13-Knockout-Zellen mit einem anderen Inhibitor reproduzieren lässt. Hierfür wurde Concanamycin A gewählt, welches Bafilomycin A₁ strukturell sehr ähnlich ist und ebenfalls zu den Makrolid-Antibiotika zählt. Auch Concanamycin A ist ein spezifischer

und sogar potenterer Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPase (Dröse et al., 1993) und bindet wie Bafilomycin A₁ an die c-Untereinheit der V₀-Domäne (Huss et al., 2002).

HEK293-A-Zellen und der DNAJC13-Knockout-Klon B3 wurden analog zu den Fluoreszenzfärbungen mit Bafilomycin A₁ diesmal für 4 Stunden mit 0,5 µM Concanamycin A behandelt und danach fixiert.

Auch nach Behandlung mit Concanamycin A kam es vor allem im Knockout-Klon B3 zur Bildung von Aggregaten durch akkumuliertes ATG9A, welche morphologisch denen nach Bafilomycin A₁-Behandlung entsprachen (Abbildung 19). Ähnlich wie bei den Versuchen mit Bafilomycin A₁ kam es auch in den HEK293-A-Zellen teilweise bereits zu einer lokalen Verdichtung der intrazellulären ATG9A-Verteilung.

Da Concanamycin A über Inhibierung der vakuolären H⁺-ATPase ebenfalls die Ansäuerung der Lysosomen und damit den Abbau von LC3, genauer LC3B-II, hemmt, führte dies wie bei Bafilomycin A₁ zu einem Auflaufen dieses Proteins. Daher verstärkte sich das Fluoreszenzsignal von LC3 bzw. LC3B-II sowohl in den HEK293-A-Zellen als auch im DNAJC13-Knockout-Klon B3. Zudem fällt bei Vergleich des oberen mit dem unteren vergrößerten Bildausschnitt in Abbildung 19 auf, dass LC3B-II in den Knockout-Zellen nicht mehr wie in den HEK293-A-Zellen disseminiert in der gesamten Zelle verteilt war, sondern sich in der Nähe des ATG9A-Aggregats ansammelte. Es zeigt sich also, dass sich die intrazelluläre Verteilung von LC3B-II unter Einfluss von Concanamycin A ebenfalls verändert.

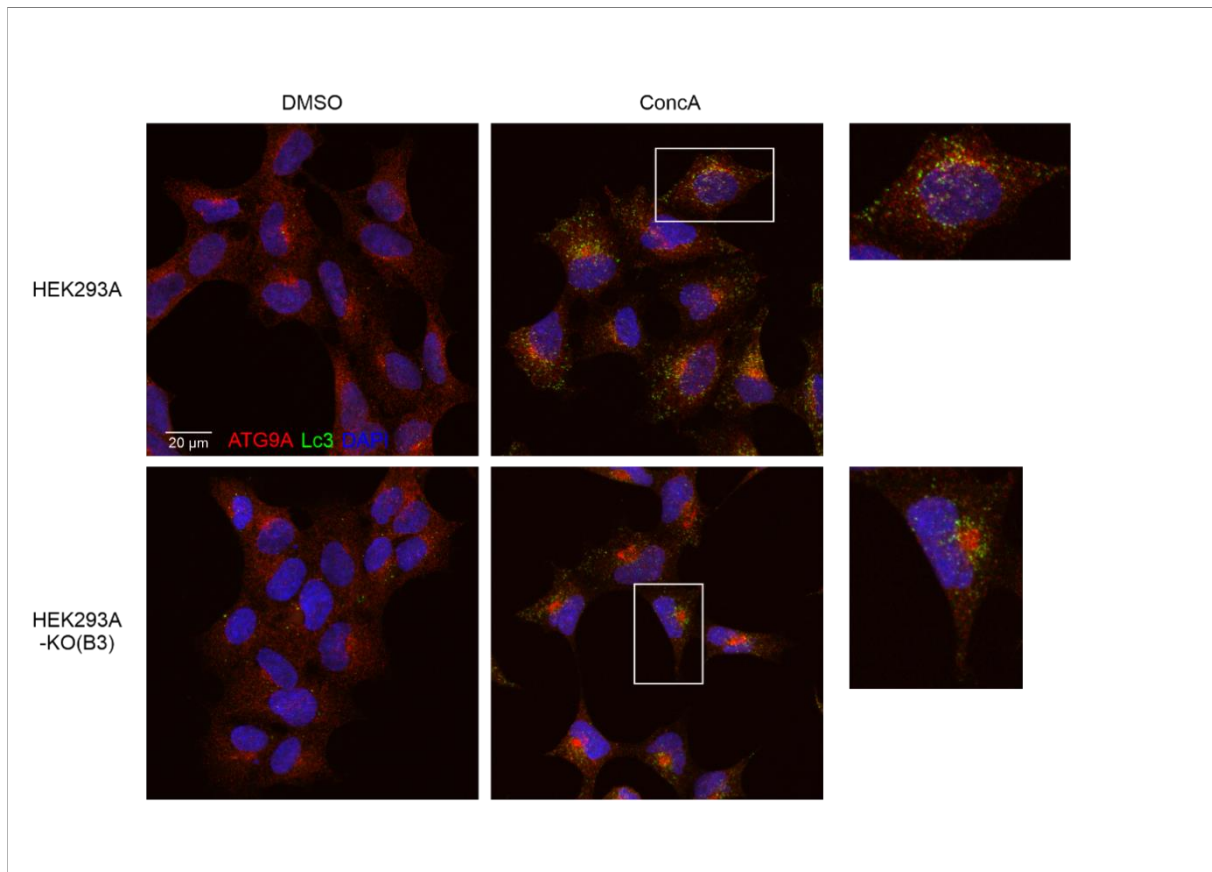


Abbildung 19: Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Concanamycin A als alternativer Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPase und Auswirkung auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und LC3 bzw. LC3B-II in naiven HEK293-A-Zellen und dem DNAJC13-Knockout-Klon B3. Darstellung durch immunhistochemische Färbungen. Entsprechend der Beobachtungen mit Bafilomycin A₁ bildete ATG9A nach Behandlung mit Concanamycin A im Knockout-Klon B3 einzelne Aggregate. Das Fluoreszenzsignal von LC3 war unter Einfluss von Concanamycin sowohl in den HEK293-A- als auch im Knockout-Klon B3 verstärkt. Zudem sammelte sich LC3B-II in den Knockout-Zellen in der Nähe des ATG9A-Aggregats an (s. unterer Bildausschnitt).

4.6.3 Kompensation der Bafilomycin A₁-Effekte auf das endosomale System durch DNAJC13

Basierend auf den Beobachtungen bezüglich der Auswirkungen einer Hemmung der vakuolären H⁺-ATPase durch Bafilomycin A₁ oder Concanamycin A auf das endosomale System wurde überprüft, ob die strukturellen Veränderungen spezifisch auf dem Fehlen von DNAJC13 in den Knockout-Klonen beruhen. Hierfür wurde der Knockout-Klon B3 sowohl mit dem Wildtyp von DNAJC13 als auch mit der N855S-Mutante transfiziert und die Folgen einer Wiederaufnahme der Expression von DNAJC13 analysiert. Zudem wurde dabei der Einfluss von Bafilomycin A₁ auf die Lokalisation von zwei weiteren Proteinen, SNX1 und VPS35, untersucht.

Auch die beiden Komponenten des Retromer-Komplexes waren nach Behandlung mit Bafilomycin A₁ in der DNAJC13-Knockout-Zelllinie B3 nicht mehr disseminiert in der

Zelle verteilt, sondern akkumulierten in denselben Aggregaten wie ATG9A und kolokalisieren folglich auch mit den anderen untersuchten endosomalen Markern (s. Abbildung 20B und 21B).

Es zeigte sich, dass es in den Knockout-Zellen, die erfolgreich mit *DNAJC13^{wt}-GFP* transfiziert worden waren und folglich dieses Protein wieder exprimierten, nicht zur Akkumulation kam und die Lokalisation von SNX1, VPS35 und ATG9A der in den naiven Zellen glich, die Proteine waren punktförmig disseminiert verteilt. Dies ist im oberen vergrößerten Bildausschnitt in Abbildung 21B dargestellt. Es lässt sich also eine Art Recovery-Effekt feststellen, der weiter untermauert, dass die Ausprägung der Auswirkungen der Bafilomycin A₁-Behandlung von der Anwesenheit von DNAJC13 abhängig zu sein scheinen.

Weiterführend stellte sich die Frage, ob sich bezüglich der Recovery-Fähigkeit in den Knockout-Zellen Unterschiede zwischen einer Transfektion der Wildtyp- und der N855S-Variante von DNAJC13 feststellen lassen. Vergleicht man den oberen und unteren gezoomten Bildausschnitt in Abbildung 21B, fällt auf, dass es in mit der N855S-Mutante transfizierten Zellen trotzdem zur Bildung eines Aggregats aus VPS35 und SNX1 zu kommen scheint. Auch Abbildung 20B impliziert, dass der Effekt von Bafilomycin A₁ im Knockout-Klon B3 durch die N855S-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp nicht verhindert werden kann und ATG9A und SNX1 aggregieren.

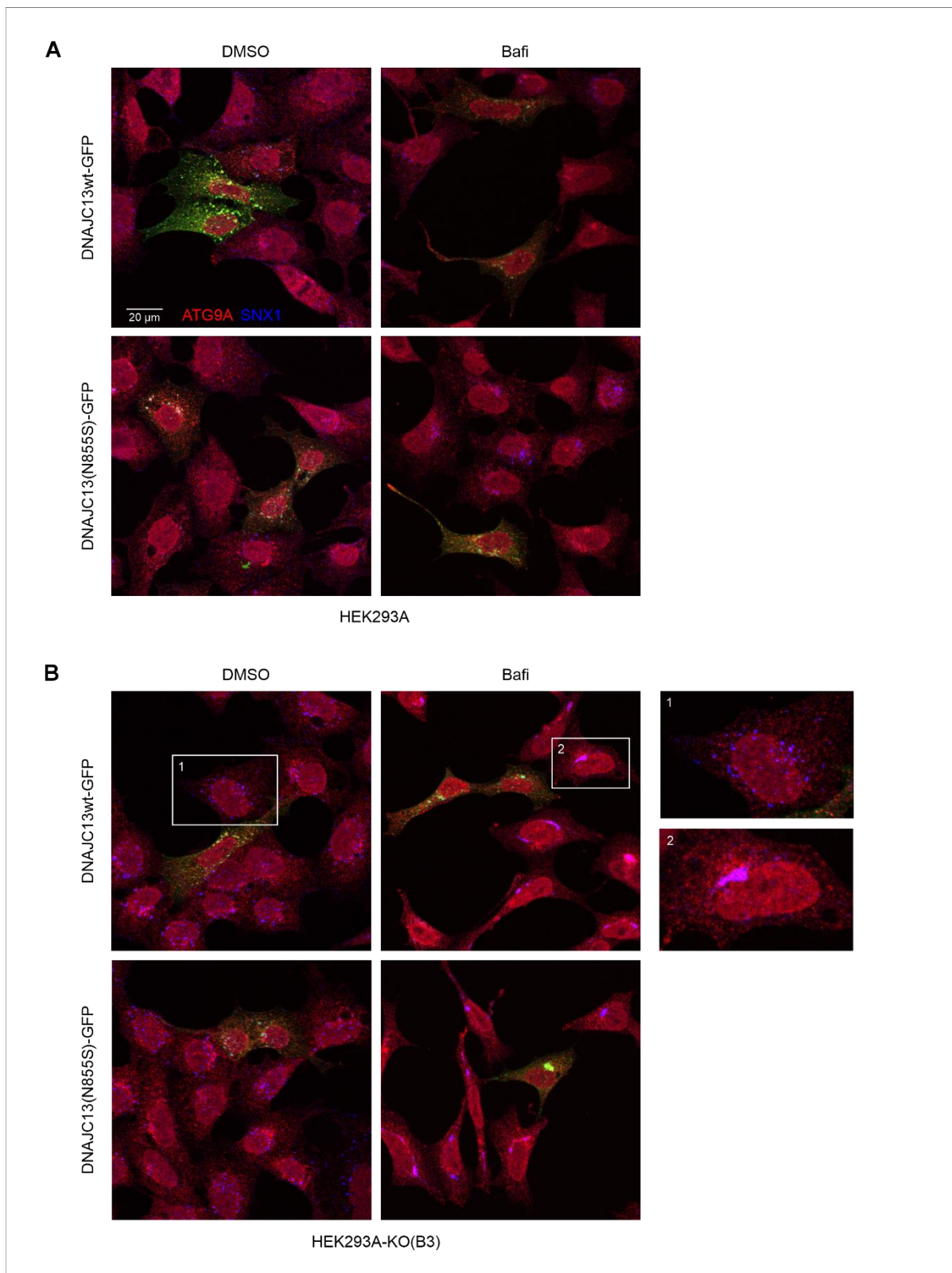


Abbildung 20: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klon B3 auf die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und SNX1. Darstellung durch immunhistochemische Färbungen. **A:** HEK293-A-Zellen nach Bafilomycin A₁- und Kontrollbehandlung mit DMSO, vereinzelt transfiziert mit DNAJC13wt-GFP oder DNAJC13(N855S)-GFP. Die intrazelluläre Verteilung von ATG9A und SNX1 blieb unter Einfluss von Bafilomycin A₁ weitgehend bestehen. **B:** Färbungen analog zu A, hier mit HEK293-A-KO(B3)-Zellen. Im Gegensatz zur Kontrolle akkumulierten sowohl ATG9A als auch SNX1 nach Behandlung mit Bafilomycin A₁ gemeinsam in großen vereinzelt, intrazellulären Aggregaten (vgl. Bildausschnitte 1 und 2).

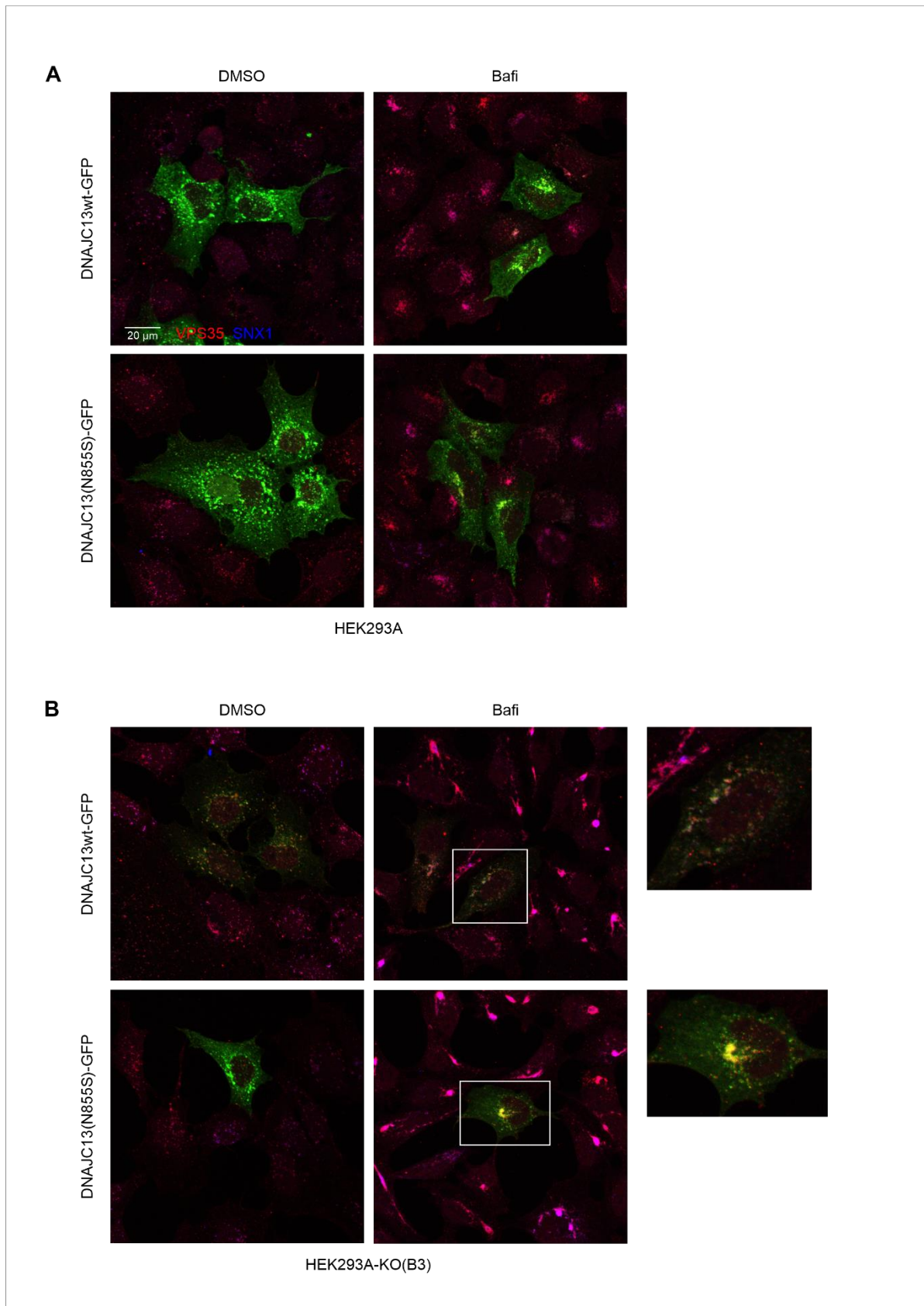


Abbildung 21: Auswirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch Bafilomycin A₁ in naiven HEK293-A-Zellen und deren DNAJC13-Knockout-Klon B3 auf die intrazelluläre Verteilung von VPS35 und SNX1.

Darstellung durch immunhistochemische Färbungen. **A:** HEK293-A-Zellen nach Bafilomycin A₁- und Kontrollbehandlung mit DMSO, vereinzelt transfiziert mit DNAJC13wt-GFP oder DNAJC13(N855S)-GFP. Die intrazelluläre Verteilung von VPS35 und SNX1 war unter Bafilomycin A₁-Behandlung bereits stellenweise verdichtet. **B:** Färbungen analog zu A, hier mit HEK293-A-KO(B3)-Zellen. Wie in Abb. 20 kolokalisierten SNX1 und auch VPS35 nach Behandlung mit Bafilomycin A₁ in denselben Aggregaten. In den mit DNAJC13wt-GFP transfizierten Knockout-Zellen konnte eine Akkumulation und Aggregation der beiden Proteine trotz Einfluss von Bafilomycin A₁ verhindert werden (s. oberer Bildausschnitt). Dieser protektive Effekt scheint bei Knockout-Zellen, die mit DNAJC13(N855S)-GFP worden waren, eingeschränkt zu sein, es kam dennoch zur Bildung eines Aggregats (s. unterer Bildausschnitt).

5 Diskussion

5.1 Die Depletion von DNAJC13 begünstigt die Aggregation der ALS-assoziierten SOD1(G85R)-Mutante

Die Ergebnisse von Besemer et al. sowie Swords et al. zeigten eine Einflussnahme von DNAJC13 auf den autophagischen Flux und die Lokalisation von ATG9A (Besemer et al., 2021; Swords et al., 2023). Weiterführend stellte sich die Frage, welche Auswirkungen eine funktionelle Beeinträchtigung von DNAJC13 auf den Abbau krankheitsassoziiertes, aggregationsanfälliger Proteine wie z.B. der α -Synuklein(A53T)-Mutante oder der ALS-auslösenden SOD1(G85R)-Mutante hat. Bezüglich des endosomalen Systems wurde in Zusammenhang mit der Parkinson-assoziierten DNAJC13(N855S)-Mutante bereits eine Einschränkung des endosomalen Transports (Vilariño-Güell et al., 2014; Yoshida et al., 2018), eine Störung der WASH-Komplex- und SNX1-vermittelten Bildung von Tubuli (Yoshida et al., 2018; Follett et al., 2019) sowie eine Inhibition der Fusion von α -Synuklein-haltigen Vesikeln mit dem Lysosom (Yoshida et al., 2018) beschrieben.

Bei der Degradation von Proteinaggregaten spielt das autophagische System eine wesentliche Rolle (Webb et al., 2003; Lee et al., 2008). Die Aggregate werden durch Autophagie-Rezeptoren wie p62 erkannt, die ebenfalls Bestandteil von Einschlusskörperchen wie z.B. den Lewy-Körperchen sind (Kuusisto et al., 2001). Diese Rezeptoren leiten die von ihnen gebundenen Proteinaggregate schließlich über deren LC3-bindende LIR-Domäne zur Phagophore. Nach Reifung zum Autophagosom führt die Fusion mit Lysosomen zum Abbau der Aggregate (Lamark et al., 2009).

Die ALS-assoziierte SOD1(G85R)-Mutation neigt wie das mutierte α -Synuklein ebenfalls zur Aggregation und wurde daher stellvertretend als Modellprotein für die Untersuchung des Effektes eines transienten DNAJC13-Knockdowns herangezogen. Die durchgeführte Zentrifugation-basierte Fraktionierung ergab ein gesteigertes Auftreten von SOD1(G85R) Aggregaten bei Depletion von DNAJC13, was eine Störung der autophagischen Degradation impliziert. Dies wurde durch die Bestimmung des autophagischen Fluxes in zwei unabhängigen stabilen HEK-Zelllinien, die kein DNAJC13 exprimieren, weiter untermauert. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der autophagischen Aktivität im Vergleich zu den Zellen, welche den DNAJC13-Wildtyp exprimierten. Diese Beobachtung entspricht auch den Ergebnissen von Besemer et al. und Swords et al., die ebenfalls eine Abnahme des autophagischen

Fluxes bei einem Knockdown von DNAJC13 verzeichneten (Besemer et al., 2021; Swords et al., 2023). Dies spricht dafür, dass DNAJC13 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der autophagischen Degradation spielt.

Darüber hinaus ist die beobachtete Abhängigkeit der autophagischen Aktivität von DNAJC13 als Retromer-assoziiertes Protein in Zusammenhang mit den Ergebnissen von Zavodszky et al. zu setzen. Sie zeigten, dass die D620N-Mutation der Retromer-Komponente VPS35 bzw. die durch die Mutation bedingte verminderte Rekrutierung des WASH-Komplexes zum Endosom ähnliche Auswirkungen wie das Fehlen von DNAJC13 auf die Autophagie hatten (Zavodszky et al., 2014). Wie VPS35 interagiert auch DNAJC13 mit dem WASH-Komplex über eine Bindung an das Protein FAM21 (Freeman et al. 2014). Somit könnte ein Funktionsausfall von DNAJC13 aufgrund einer Depletion oder Mutation ebenfalls auf einer beeinträchtigten Rekrutierung des WASH-Komplexes beruhen. Dies hat eine Beeinträchtigung des Transports von ATG9A zur Phagophore und somit eine Störung der Autophagosomenbildung zur Folge (Zavodszky et al., 2014), was einen Erklärungsansatz für die nachgewiesene Verminderung des autophagischen Fluxes und die gesteigerte Aggregation der SOD1(G85R)-Mutante bei Depletion von DNAJC13 bieten könnte.

5.2 Die DNAJC13(N855S)-Mutante neigt nicht zur Aggregation

Eine mögliche pathologische Wirkung der Parkinson-auslösenden DNAJC13(N855S)-Mutante ist eine verstärkte Neigung zur Bildung von Aggregaten. Dies könnte einerseits die Anzahl der verfügbaren Moleküle verringern oder eine fehlerhafte Interaktion mit anderen Proteinen fördern.

Die Fraktionierung der Zellysate, welche mit DNAJC13(WT)-GFP oder der Mutante DNAJC13(N855S)-GFP transfiziert worden waren, ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Aggregationsverhaltens beider DNAJC13-Varianten. Die DNAJC13(N855S)-Mutante zeigte somit keine vermehrte Tendenz zur Aggregation im Vergleich mit dem DNAJC13-Wildtyp.

Eine verstärkte Aggregation hätte insbesondere Auswirkungen auf die Funktion von DNAJC13 als Regulator des retrograden Transports im Zusammenspiel mit SNX1 und HSC70 (Shi et al., 2009; Norris et al., 2017; Norris et al., 2022). Das Modell von Norris et al. besagt, dass mehrere DNAJC13-Moleküle im Rahmen eines

Autoinhibitionszyklus Oligomere bilden, die durch Assoziation mit SNX1 aufgebrochen werden können. Erst die DNAJC13-Monomere sind dann in der Lage, mit ihren zugänglichen J-Domänen an HSC70 zu binden und es zum Endosom rekrutieren. Hier bewirkt HSC70 die Dissoziation des ESCRT-0-Komplexes zugunsten des retrograden Transports von endosomalem Cargo, jedoch auch die Dissoziation von SNX1, sodass sich DNAJC13 wieder zu Oligomeren zusammenlagern kann (Norris et al., 2022).

Follett et al. stellten die Theorie auf, dass die DNAJC13(N855S)-Mutante HSC70 in geringerem Ausmaß zum Endosom rekrutiert und aktiviert, was eine verzögerte Dissoziation von SNX1 zur Folge hat (Follett et al., 2019). Die DNAJC13-Moleküle wären somit länger als Monomere zusammen mit HSC70 aktiv und könnten das Verhältnis von retrogradem Transport zu lysosomalem Abbau von Proteinen zugunsten von ersterem verschieben.

Die durchgeführte Fraktionierung zeigte zwar keinen signifikanten Unterschied in der Aggregationsneigung der DNAJC13-Mutante und des Wildtyps, dies könnte jedoch auch auf die von Follett beobachtete verlängerte Assoziation von SNX1 mit der endosomalen Membran bzw. DNAJC13 zurückzuführen sein (Follett et al., 2019), die DNAJC13 oder deren N855S-Mutante an der Zusammenlagerung zu Oligomeren hindert.

Es ist somit nicht auszuschließen, dass die DNAJC13(N855S)-Mutante sogar weniger zur Aggregation bzw. Oligomerisierung neigt als der Wildtyp. Folglich wäre sie in ihrer Fähigkeit zur Autoinhibition eingeschränkt, sodass es zu einem übermäßigen retrograden Transport von Proteinen wie beispielsweise α -Synuklein kommt, die eigentlich dem lysosomalen Abbau zugeführt werden sollten. Dies könnte einen Pathomechanismus der DNAJC13(N855S)-Mutante in Bezug auf die α -Synuklein-Homöostase darstellen.

5.3 Ein Knockout von DNAJC13 hat keinen Einfluss auf die Expression von Proteinen des Retromer-Komplexes oder des Autophagie-Systems

DNAJC13 interagiert als Regulator des retrograden Transports direkt oder indirekt mit verschiedenen Komponenten des Retromer-Komplexes. Als Co-Chaperon von HSC70 bzw. HSP70 und Interaktionspartner von SNX1, an das es C-terminal bindet, nimmt DNAJC13 Einfluss auf die Clathrindynamik und damit auf das Gleichgewicht zwischen

dem retrograden Transport von endosomalem Cargo und dessen lysosomalen Abbau (Popoff et al., 2009; Shi et al., 2009; Norris et al., 2017; Norris et al., 2022). Mit seinem N-Terminus bindet DNAJC13 direkt an FAM21 als Bestandteil des WASH-Komplexes (Freeman et al. 2014). VPS35 ist kein direkter Interaktionspartner von DNAJC13, ist jedoch eine weitere essenzielle Komponente des Retromer-Komplexes und als zentrales Glied des VPS-Trimers an der Cargo-Selektion beteiligt (Seaman et al., 1998; Hierro et al., 2007).

Eine direkte Interaktion von DNAJC13 mit Proteinen des Autophagie-Netzwerks wurde bisher noch nicht nachgewiesen, aufgrund des beobachteten Effekts eines DNAJC13-Knockouts auf den autophagischen Flux wurden jedoch auch die Proteinspiegel wichtiger Autophagie-assoziiierter Proteine analysiert.

ULK1 ist ein Teil des Induktionskomplexes, welcher die Autophagosombildung initiiert und dabei einen Ansatzpunkt für verschiedene Regulationsmechanismen darstellt (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009). Beclin ist eine Komponente des PI3K-Komplexes, der für die Expansion der Phagophore verantwortlich ist (Liang et al., 1999; Itakura et al., 2008), und p62 ist ein Autophagie-Rezeptor (Lamark et al., 2009).

Die genannten Retromer- und Autophagie-assoziierten Proteine waren Gegenstand der Fragestellung, ob ein stabiler Knockout von DNAJC13 Einfluss auf die Expression und somit die Spiegel dieser Proteine nimmt. Dies hätte einen möglichen Pathomechanismus darstellen können, auf dem die Reduktion des autophagischen Fluxes bei Depletion von DNAJC13 und folglich eine begünstigte Akkumulation aggregationsanfälliger Proteine wie α -Synuklein beruht.

In dem durchgeführten Assay konnten unter basalen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen der analysierten Proteinspiegel in den DNAJC13-Knockout-Klonen festgestellt werden, was indiziert, dass der DNAJC13-Knockout die Aktivität der untersuchten Proteine des endosomalen und autophagischen Systems nicht auf Expressionsebene beeinflusst.

Ähnlich verhielt es sich unter Stimulation der Autophagie durch Rapamycin, auch hier hatte die Depletion von DNAJC13 keine signifikanten Auswirkungen auf die relativen Proteinspiegel von WASH, SNX1, SNX2, ULK1 und Beclin.

Eine Ausnahme bildete ATG9A. Die ATG9A-Spiegel waren nach Rapamycin-Behandlung in naiven HEK293-T-Zellen signifikant reduziert. Rapamycin simuliert einen Hungerzustand der Zelle, der im autophagischen System zu der Dissoziation

des MTORC1 von dem Induktionskomplex führt. Bei Autophagie-Stimulation wird ATG9A ausgehend vom TGN verstärkt mobilisiert und ATG9A-Vesikel zur PAS rekrutiert, die dort zu der Expansion der Phagophore beitragen (Sekito et al., 2009; Yamamoto et al., 2012).

Die Beobachtung, dass die ATG9A-Spiegel in naiven Zellen nach Stimulation der Autophagie reduziert sind, stimmt nicht mit den Ergebnissen von Yamamoto et al. überein, die eine gesteigerte Expression von ATG9A nach Rapamycin-Behandlung feststellten (Yamamoto et al., 2012). Da die reduzierten ATG9A-Spiegel nur bei der HEK293T-Zelllinie nachgewiesen werden konnten, nicht jedoch in den ebenfalls untersuchten HEK293A-Zellen, ist hierbei am ehesten von einem zellspezifischen Phänomen auszugehen.

5.4 Es konnte weder eine funktionelle noch eine direkte Interaktion von DNAJC13 mit ATG9A nachgewiesen werden

Die Ergebnisse von Besemer et al. implizieren, dass der intrazelluläre Transport von ATG9A, dessen Funktion als Membranlieferant und Phospholipidtranslokator an der Phagophore für das autophagische System unabdingbar ist, von DNAJC13 abhängt (Reggiori et al., 2004; Young et al., 2006; Matoba et al., 2020; Maeda et al., 2020; Besemer et al., 2021). Basierend auf den Beobachtungen, dass der autophagische Flux in stabilen DNAJC13-Knockout-Klonen reduziert ist, wurde zunächst der funktionelle Zusammenhang zwischen ATG9A und DNAJC13 weiter untersucht.

In dem durchgeführten Versuch konnte weder in den naiven Zellen noch in einem DNAJC13-Knockout-Klon eine Steigerung des autophagischen Fluxes bei Überexpression von ATG9A festgestellt und folglich keine Kompensation eines Fehlens von DNAJC13 nachgewiesen werden.

Allerdings sind diese Ergebnisse vor dem Hintergrund zu bewerten, dass die Transfektionseffizienz von dem eingebrachten *HA-ATG9*-Plasmid in beiden untersuchten Zelllinien sehr niedrig war. Zudem hatte die Transfektion Einfluss auf die Morphologie und somit wahrscheinlich auch die Vitalität der transfizierten Zellen. Daher ist fraglich, ob der ausgebliebene Effekt der ATG9A-Überexpression auf den autophagischen Flux in dem Klon H11 die tatsächlichen Gegebenheiten in vivo widerspiegelt oder ob die erzielte Transfektionseffizienz von ATG9A lediglich nicht ausgereicht hat, um einen Einfluss auf die autophagische Aktivität zu nehmen.

Ergänzend zu dem ATG9A-Überexpressionsversuch wurde eine Co-IP durchgeführt, um eine mögliche direkte Interaktion zwischen ATG9A und DNAJC13 nachzuweisen, die im Rahmen einer Beteiligung von DNAJC13 am Transport von ATG9A denkbar wäre. Trotz mehrfacher Modifikations- bzw. Optimierungsversuche des Versuchsaufbaus ließ sich keine Bindung zwischen den beiden Proteinen nachweisen.

Dennoch schließt dies eine indirekte Interaktion keineswegs aus. Es wäre beispielsweise möglich, dass der funktionelle Zusammenhang zwischen DNAJC13 und ATG9A durch weitere Proteine vermittelt wird. Hier könnte man mehrere potenzielle Mediatoren in Betracht ziehen, z.B. das Rab-GAP TBC1D5.

TBC1D5 besitzt zwei LIR-Domänen, über die es sowohl mit VPS29 des Retromer-Komplexes als auch mit LC3B-II in der Membran des Autophagosoms assoziiert ist (Popovic et al., 2012; Jia et al., 2016; Jimenez-Orgaz et al., 2018). Es reguliert nicht nur die Assoziation des Retromer-Komplexes mit dem Endosom (Jia et al., 2016; Jimenez-Orgaz et al., 2018), sondern ist auch für die Bildung des Autophagosoms unerlässlich und an der Regulation der autophagischen Aktivität beteiligt, wobei beide Funktionen durch die Interaktion von TBC1D5 mit Rab7A vermittelt werden (Popovic et al., 2012; Kvainickas et al. 2019). Die Lokalisation von TBC1D5 wird durch die autophagische Aktivität bestimmt. Ist diese beispielsweise durch einen Hungerzustand der Zelle erhöht, wird TBC1D5 vermehrt von Endosomen zu Autophagosomen rekrutiert (Popovic et al., 2012). Dabei interagiert es mit ATG9A-Vesikeln, für deren Bildung der AP2-Komplex erforderlich ist, und fördert den Transport von ATG9A zur PAS (Popovic et al., 2014). Gleichzeitig hat die verstärkte Assoziation von TBC1D5 mit dem Autophagosom zur Folge, dass der Retromer-Komplex vermehrt zu der endosomalen Membran rekrutiert wird, sodass bei einer Autophagie-Stimulation auch der retrograde Transport zunimmt (Roy et al., 2017).

Ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen TBC1D5 und DNAJC13 ist bisher noch nicht bekannt. Beide Proteine sind jedoch molekulare Schaltstellen, TBC1D5 zwischen dem autophagischen und dem endosomalen System und DNAJC13 zwischen dem endosomalen Abbau und retrograden Transport. Aufgrund ihrer gemeinsamen Lokalisation am frühen Endosom und engen Assoziation mit dem Retromer-Komplex wäre denkbar, dass sich ein Knockout von DNAJC13 auch auf die Aktivität von TBC1D5 bzw. dessen Lokalisation auswirkt. Dies könnte sich z.B. in einer reduzierten Translokation von TBC1D5 zur Phagophore äußern und somit den Transport von ATG9A zur Phagophore beeinträchtigen.

Ein weiterer potenzieller Mediator, der sowohl mit DNAJC13 als auch mit ATG9A assoziiert ist, ist der WASH-Komplex. Auch dieser trägt maßgeblich zum Transport von ATG9A zur PAS bei (Zavodszky et al., 2014). Voraussetzung hierfür ist die Rekrutierung des WASH-Komplexes zum Endosom durch Interaktion von VPS35 mit dem C-Terminus der WASH-Komponente FAM21 (McGough et al., 2014; Zavodszky et al., 2014). Zavodszky et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass in Zellen, die die Parkinson-assoziierte VPS35(D620N)-Mutante exprimierten, der autophagische Flux als Folge der gestörten WASH-Rekrutierung und damit des beeinträchtigten ATG9A-Transports reduziert war (Zavodszky et al., 2014). Auch DNAJC13 ist direkt mit FAM21 assoziiert (Freeman et al. 2014) und könnte wie VPS35 an der Rekrutierung des WASH-Komplexes zum Endosom beteiligt sein. Hierfür spricht, dass der WASH-Komplex wahrscheinlich in derselben Mikrodomäne am Endosom aktiv ist wie der Retromer-Komplex. Dessen Lokalisation wird durch das System aus SNX1, DNAJC13 und HRS bestimmt, welches die Rekrutierung des ESCRT-0 und des Retromer-Komplexes koordiniert (Popoff et al., 2009; Shi et al., 2009). Somit könnte ein Knockout oder eine Mutation von DNAJC13 ähnliche Auswirkungen haben wie die D620N-Mutation von VPS35 (Zavodszky et al., 2014).

Auch SNX4 ist ein Protein, das potenziell den funktionellen Zusammenhang zwischen DNAJC13 und ATG9A herstellen könnte. SNX4 koordiniert in Interaktion mit anderen SNX-Proteinen ATG9A-haltige Membranen zur PAS und trägt so zur Reifung der Phagophore bei. Dabei kolokalisiert es mit ATG9A am Recycling-Endosom, das eines von mehreren Membranreservoirs im Autophagie-Netzwerk darstellt (Orsi et al., 2012; Antón et al., 2020). Ravussin et al. konnten keine direkte Interaktion zwischen ATG9A und SNX4 nachweisen, stellten jedoch die Hypothese auf, dass beide Proteine Teil eines größeren, übergeordneten Komplexes sein könnten (Ravussin et al., 2021). In Anbetracht der Tatsache, dass SNX4 auch für den Transport von ATG9A von der PAS zum TGN erforderlich ist, damit ATG9A einen erneuten Zyklus des Membrantransports zur Phagophore durchlaufen kann (Ravussin et al., 2021), wäre auch eine Beteiligung des Retromer-Komplexes bzw. DNAJC13 an diesem Prozess denkbar. Möglicherweise könnte die indirekte Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A also im Rahmen dieses Multiproteinkomplexes stattfinden.

5.5 DNAJC13 ist essenziell für die Aufrechterhaltung endosomaler Kompartimente bei Milieuänderungen

Der endosomale pH-Wert ist eine entscheidende Einflussgröße im Prozess der endosomalen Degradation, da er im Verlauf der Reifung des Endosoms die einzelnen Kompartimente voneinander abgrenzt. In der Entwicklung vom frühen bis zum späten Endosom sinkt der endoluminale pH und definiert die jeweilige Funktion des Endosoms (Yamashiro & Maxfield, 1984; Maxfield & Yamashiro, 1987). Während das leicht saure Milieu im frühen Endosom dazu beiträgt, endozytierte Rezeptoren und deren Liganden voneinander zu trennen, dient der saurere pH-Wert um 5,5 im späten Endosom bereits dem enzymatischen Abbau von endosomalem Cargo, der im Lysosom bei einem pH-Wert um 4,5 schließlich fortgesetzt wird (Yamashiro & Maxfield, 1984; Tjelle et al., 1996).

Festgelegt wird der jeweilige endoluminale pH-Wert durch die Kompartiment-spezifische Struktur der membranständigen V-ATPase, welche als Protonenpumpe fungiert und deren Aktivität von der Anzahl miteinander assoziierter V_1 - und V_0 -Domänen abhängt (Yamashiro & Maxfield, 1984; Kane, 1995). Hemmt man die V-ATPase durch Einsatz eines Inhibitors wie Bafilomycin A_1 , verhindert man nicht nur die Ansäuerung von Lysosomen, sondern greift auch in das endosomale Milieu ein, sodass sämtliche Reifungs- und Transportprozesse beeinträchtigt sind (Lafourcade et al., 2008).

Mittels der angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener endosomaler Marker sowie Retromer- und Autophagie-assoziiierter Proteine konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von DNAJC13 das System anfälliger zu machen scheint und die Auswirkungen einer endosomalen Dysfunktion, z.B. aufgrund einer Hemmung der V-ATPase, aggraviert. Nur in den beiden DNAJC13-Knockout-Klonen kam es bei Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A_1 zur Bildung von großen Aggregaten, die EEA1, den TfR und den M6PR, aber auch die Retromer-Proteine VPS35 und SNX1 und das autophagische Transmembranprotein ATG9A enthielten. All diese Proteine verloren ihr disseminiertes Verteilungsmuster in der gesamten Zelle und ballten sich in vereinzelt, kondensierten Konglomeraten zusammen. Auch die intrazelluläre Verteilung des TGN-Markers TGN46 und des Autophagie-assoziierten Proteins LC3B änderte sich. Diese kolokalisierten nicht mit den anderen untersuchten Markerproteinen, akkumulierten jedoch auch in räumlicher Nähe des großen

Aggregats. Der spezifische Effekt der inhibierten V-ATPase wurde durch Anwendung eines zweiten Inhibitors, Concanamycin A, bestätigt.

Die Auswirkungen einer Erhöhung des endosomalen pH-Werts in naiven Zellen auf Marker des TGN sowie den M6PR wurden bereits durch Reaves und Banting beschrieben. Sie zeigten, dass sowohl bei Behandlung der Zellen mit Chloroquin, welches durch seine basischen Eigenschaften den endoluminalen pH-Wert in Zellorganellen unspezifisch anhebt, als auch mit Bafilomycin A₁ die untersuchten TGN-Marker auf Ebene des frühen Endosoms akkumulierten, was zu einer Veränderung des intrazellulären Verteilungsmusters führte. Der M6PR akkumulierte unter denselben Bedingungen (Reaves & Banting, 1994). Auch wenn nicht der Einfluss von DNAJC13 untersucht wurde, bestätigt es dennoch die hier erhobenen Ergebnisse, dass die Verteilung der untersuchten Proteine auch in den naiven Zellen bei Bafilomycin A₁-Behandlung bereits kondensierter war.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der saure pH-Wert im frühen Endosom für die Bildung von intraluminalen Vesikeln erforderlich ist, die schließlich den MVB bzw. das späte Endosom bilden (Felder et al., 1990; Clague et al., 1994; Katzmann et al., 2001). Wird die Ansäuerung inhibiert, akkumuliert endosomales Cargo wie der M6PR oder auch der TfR im frühen Endosom. Somit könnte das in den Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesene Aggregat am ehesten ein kollabiertes frühes endosomales Kompartiment darstellen, welches auch die Retromer-Komponenten VPS35 und SNX1 enthält, da der Retromer-Komplex ebenfalls mit dem frühen Endosom assoziiert ist.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich eine eingeschränkte Ansäuerung auch auf das endosomale Recycling auswirkt. Sie verhindert den Transport von endosomalem Cargo wie z.B. Transferrin zum Recycling-Endosom nicht gänzlich, geht jedoch mit einer Verlangsamung des Prozesses einher (Johnson et al., 1993; Baravalle et al., 2005). Erforderlich für das Recycling ist die Bildung endosomaler Tubuli, vermittelt durch die Retromer-Komponente SNX1 in Interaktion mit DNAJC13 und dem WASH-Komplex (Freeman et al. 2014). SNX1 und DNAJC13 definieren an der Membran des frühen Endosoms Mikrodomänen für den retrograden Transport, in denen SNX1 durch Assoziation mit der Membran für die Tubulibildung verantwortlich ist. Zugleich stellt DNAJC13 das Bindeglied zwischen SNX1 und dem WASH-Komplex dar, welcher endosomales Cargo in diesen Mikrodomänen bzw. Tubuli sammelt und so dem

retrograden Transportweg zuführt (Popoff et al., 2009; Shi et al., 2009; Freeman et al. 2014; Norris et al., 2017).

Harbour et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass eine Hemmung der V-ATPase durch Bafilomycin A₁ die SNX1-vermittelte Bildung von endosomalen Tubuli fast vollständig unterbindet (Harbour et al., 2012), was einen Erklärungsansatz für den Effekt von Bafilomycin A₁ auf endosomale Transportprozesse und insbesondere das Recycling von endosomalem Cargo darstellt.

DNAJC13 hat ebenfalls Einfluss auf die Tubulibildung, indem es die Assoziation von SNX1 mit der endosomalen Membran reguliert. Im Gegensatz zu Bafilomycin A₁ führt ein Knockdown von DNAJC13 zu einer gesteigerten Bildung von Tubuli, da SNX1 länger an der Membran des frühen Endosoms verbleibt (Freeman et al. 2014). Kombiniert man die Auswirkungen einer Depletion von DNAJC13 mit denen einer Bafilomycin A₁-Behandlung, könnte Bafilomycin A₁ den Tubuli-fördernden Effekt von DNAJC13 vermindern, während die Mobilität von SNX1 und womöglich des gesamten Retromer-Komplexes am frühen Endosom durch das Fehlen von DNAJC13 eingeschränkt sind. Dies könnte ebenfalls erklären, warum Retromer-assoziierte Proteine in den beobachteten Aggregaten akkumulierten und darüber hinaus, warum Bafilomycin A₁ vor allem in den DNAJC13-Knockout-Zellen zum Kollaps des frühen Endosoms führte.

Daneben ist ATG9A ebenfalls Bestandteil des gebildeten Aggregats in Bafilomycin A₁-behandelten Knockout-Zellen. Grund hierfür könnte der intrazelluläre Transportweg dieses Proteins sein. ATG9A wird im rauen ER synthetisiert und gelangt anschließend über das TGN zur Plasmamembran. Dort wird es endozytiert und wird über das frühe Endosom zum Recycling-Endosom transportiert, welches den Ausgangspunkt für den Membrantransport zur Phagophore darstellt (Ohashi & Munro, 2010; Longatti et al., 2012; Zhen & Stenmark, 2023). Auch ATG9A durchläuft also den frühen endosomalen Transportweg und könnte dort akkumulieren, da der Transport zum Recycling-Endosom durch Bafilomycin A₁ beeinträchtigt wird.

Hinzu kommt, dass auch DNAJC13 mit ATG9A assoziiert ist und insbesondere für den bidirektionalen Transport von ATG9A zwischen dem Recycling-Endosom und der Phagophore von Bedeutung ist (Besemer et al., 2021). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Transportprozesse bei einem DNAJC13-Knockdown so beeinträchtigt sind, dass der autophagische Flux abnimmt (Besemer et al., 2021;

Swords et al., 2023). Auch dies könnte zu einer Akkumulation von ATG9A auf Ebene des frühen Endosoms beitragen und demonstrieren, wie sich die Auswirkungen einer Behandlung mit Bafilomycin A₁ und einer Depletion von DNAJC13 wechselseitig verstärken.

Ist der ATG9A-vermittelte Membrantransport gestört, hat das womöglich auch Auswirkungen auf die Verteilung von LC3B. Am Recycling-Endosom kommt es normalerweise zu einer Fusion von ATG9A- mit ATG16L1-Vesikeln (Puri et al., 2014). ATG16L1 ist ein Bestandteil des E3-Ligase-Komplexes, der an der Lipidierung von LC3B beteiligt ist (Ichimura et al., 2000; Hanada et al., 2007; Fujita et al., 2008). Die Lokalisation von ATG16L1 an der Phagophore ist folglich von ATG9A abhängig. Ist der ATG9A-Transport unter Einfluss von Bafilomycin A₁ bzw. einem DNAJC13-Knockout gestört, gelangt ATG16L1 nicht zusammen mit ATG9A zur Phagophore. Eine Reduktion der Rekrutierung von ATG16L1 zur Phagophore bei einem Knockdown von DNAJC13 wurde bereits beobachtet (Besemer et al., 2021). Dies könnte die Lipidierung und damit die Rekrutierung von LC3B zur PAS negativ beeinflussen und somit auch das intrazelluläre Verteilungsmuster von LC3B verändern, sodass es sich in der Nähe des Aggregats ansammelt. Zugleich wird der lysosomale Abbau von bereits lipidiertem LC3B-II durch Bafilomycin A₁ inhibiert, was zu einem Auflaufen des Proteins und zu einem verstärkten Fluoreszenzsignal führt (Klionsky et al. 2016).

Die aus den Immunfluoreszenz-Versuchen abgeleiteten Ergebnisse sprechen folglich dafür, dass DNAJC13 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der endosomalen Kompartimentierung spielt, insbesondere wenn dieses durch Faktoren wie die Veränderung des pH-Werts beeinflusst wird. Darüber hinaus ließ sich interessanterweise ein Recovery-Effekt in DNAJC13-Knockout-Zellen feststellen, welche mittels Transfektion des entsprechenden Plasmids das Protein DNAJC13 wieder exprimierten. Die Wiederaufnahme der DNAJC13-Expression konnte die Auswirkungen der Bafilomycin A₁-Behandlung so effektiv kompensieren, dass die intrazelluläre Verteilung der untersuchten Proteine wieder weitgehend der in den naiven Zellen entsprach. In den transfizierten Zellen waren die vereinzelt endosomalen Aggregate nicht mehr nachweisbar, stattdessen waren sowohl die Retromer-assoziierten Proteine SNX1 und VPS35 als auch ATG9A wieder disseminiert in der Zelle verteilt. Der Effekt eines DNAJC13-Knockouts könnte also potenziell reversibel sein.

In diesem Zusammenhang war eine weitere relevante Beobachtung, dass sich bezüglich des Recovery-Effekts Unterschiede zwischen einer Transfektion des DNAJC13-Wildtyps und der Parkinson-assoziierten N855S-Mutante feststellen ließen. In DNAJC13-Knockout-Zellen, die mit der Mutante transfiziert worden waren, blieben die Aggregate weiterhin bestehen, was darauf hinweist, dass das endosomale Milieu und somit die Kompartimentierung des endosomalen Systems nicht oder zumindest nicht ausreichend wiederhergestellt werden konnten. Dies könnte einen weiteren pathophysiologischen Mechanismus darstellen, über den die N855S-Mutante zur Krankheitsentstehung beiträgt. Eine verminderte Fähigkeit der Mutante, den Effekt einer Änderung des endosomalen pH-Werts oder womöglich auch weiterer Milieufaktoren zu kompensieren, könnte z.B. mit einer erhöhten Vulnerabilität von Neuronen gegenüber äußeren Einflüssen einhergehen. Sind folglich in den betroffenen Zellen das endosomale bzw. autophagische Degradationssystem beeinträchtigt, würde dies die Akkumulation aggregationsanfälliger Proteine wie α -Synuklein im Rahmen der Parkinson-Erkrankung begünstigen.

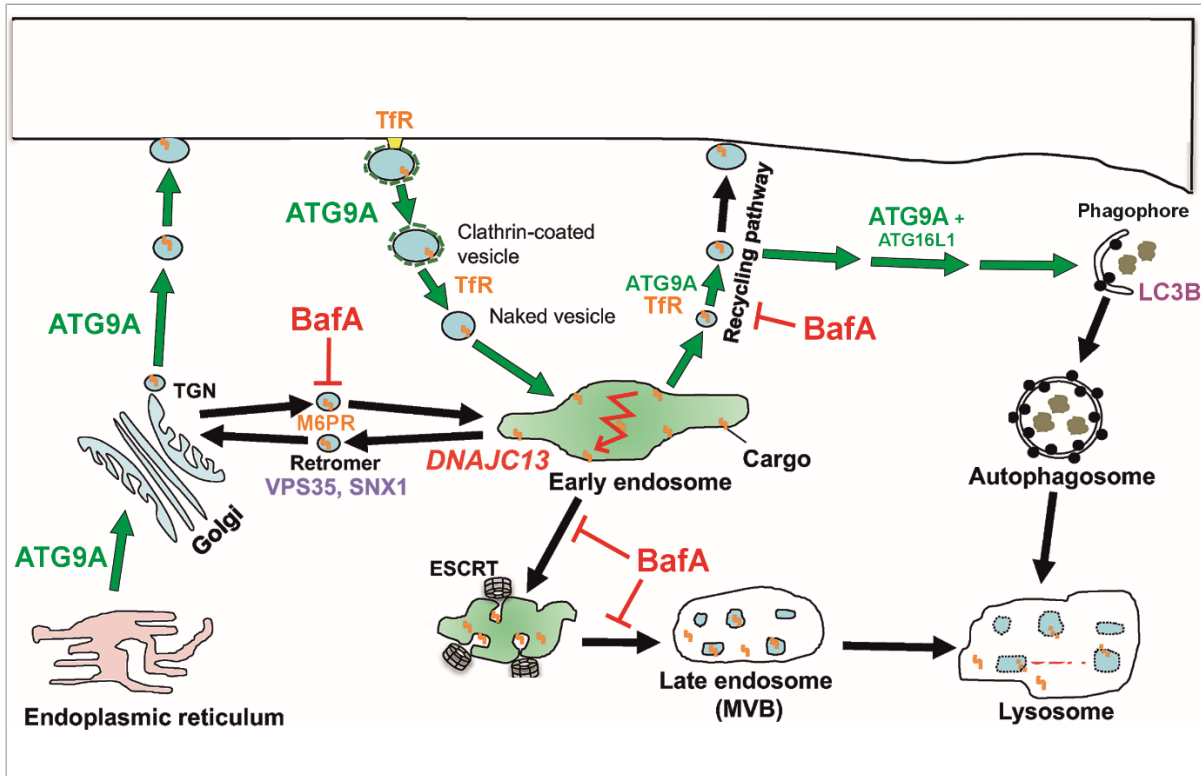


Abbildung 22: Einfluss der Bafilomycin A₁-Behandlung und der Depletion von DNAJC13 auf verschiedene Proteine im endosomalen und autophagischen System. Bafilomycin A₁ beeinträchtigt insbesondere in DNAJC13-Knockout(KO)-Zellen die Aufrechterhaltung endosomaler Subdomänen sowie die endosomale Reifung. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation verschiedener Proteine des endosomalen und autophagischen Systems im frühen endosomalen Kompartiment, u.a. VPS35 und SNX1 als Retromer-assoziierte Proteine, der M6PR und TfR als Cargoproteine und ATG9A. Der Knockout von DNAJC13 beeinträchtigt die Mobilisation von ATG9A zur Phagophore und hemmt die Dissoziation von SNX1 von der Membran des frühen Endosoms, während Bafilomycin A₁ den damit einhergehenden Tubuli-fördernden Effekt von SNX1 vermindert (verändert nach Hasegawa et al., 2017).

6 Zusammenfassung

DNAJC13 ist eines von bisher 23 identifizierten Proteinen, das bei Vorliegen einer Mutation mit der heterogenen Gruppe der familiären Parkinson-Syndrome assoziiert wird, die sich in ihren Vererbungsmodi und klinischen Ausprägung unterscheiden. Um die Rolle von DNAJC13 im endosomalen und autophagischen System bzw. die Auswirkungen der Parkinson-assoziierten DNAJC13(N855S)-Mutante zu charakterisieren, wurden verschiedene Versuche mithilfe zellbiologischer, biochemischer und molekulargenetischer Methoden durchgeführt. Aufbauend auf den Ergebnissen von Besemer et al. konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von DNAJC13 mit einer signifikanten Reduktion des autophagischen Flusses einhergeht (Besemer et al., 2021). Auf die Spiegel von Proteinen des endosomalen bzw. autophagischen Systems hatte der Knockout von DNAJC13 dabei keinen Einfluss, weder unter basalen noch unter Autophagie-stimulierenden Bedingungen. Der verminderte autophagische Flux in Abwesenheit von DNAJC13 hat eine gesteigerte Aggregation krankheitsassoziiierter Proteinen zur Folge, was exemplarisch anhand der ALS-assoziierten SOD1(G85R)-Mutante im Rahmen einer Zentrifugation-basierten Fraktionierung nachgewiesen werden konnte. Die DNAJC13(N855S)-Mutante selbst zeigte kein gesteigertes Aggregationsverhalten.

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse von Besemer et al., welche zeigten, dass DNAJC13 maßgeblich für den intrazellulären Transport von ATG9A erforderlich ist (Besemer et al., 2021), wurden beide Proteine auf eine mögliche funktionelle oder direkte Interaktion untersucht. Eine Kompensation des Fehlens von DNAJC13 durch eine Überexpression von ATG9A und somit eine Steigerung des autophagischen Fluxes in den Knockout-Zelllinien konnte nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus ergab die durchgeführte Co-Immunpräzipitation keine direkte Interaktion zwischen DNAJC13 und ATG9A, was darauf hindeutet, dass DNAJC13 entweder vermittelt durch andere Proteine oder durch eine gestörte Integrität der endosomalen Kompartimente den zellulären ATG9A-Transport beeinflusst. Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von DNAJC13 insbesondere bei Veränderung des endosomalen pH-Werts Auswirkungen auf das endosomale und autophagische System hat. Bei einer Störung der Ansäuerung der endosomalen Kompartimente konnte in DNAJC13-Knockout-Zellen die Integrität der endosomalen Subdomänen nicht aufrechterhalten werden. Interessanterweise konnte

dieser Phänotyp durch die Expression des DNAJC13-Wildtyps, nicht aber durch die DNAJC13(N855S)-Variante kompensiert werden.

Mit zunehmender Kenntnis über die vielfältigen Funktionen von DNAJC13 wird deutlich, dass die Rolle dieses Proteins in intrazellulären Transport- und Degradationsprozessen weitreichender ist, als bisher angenommen und über dessen Assoziation mit dem Retromer- und WASH-Komplex hinausgeht. DNAJC13 ist nicht nur in das endosomale System eingebunden, sondern spielt auch für die Autophagie eine wesentliche Rolle, insbesondere über die Beeinflussung der Lokalisation von ATG9A, wobei die Art der Interaktion dieser beiden Proteine noch weiter zu untersuchen ist.

Als Parkinson-assoziiertes Protein ist die Charakterisierung der Funktion von DNAJC13 von besonderer Bedeutung. Die hier dargestellten Ergebnisse sollen einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung und womöglich auch weiterer neurodegenerativer Krankheiten leisten, welche auf einer dysregulierten Proteinhomöostase und somit einer Akkumulation von Proteinen wie α -Synuklein beruhen. Ein besseres ganzheitliches Verständnis der involvierten intrazellulären Prozesse ebnet den Weg für spezifischere, effektivere und in Zukunft vielleicht sogar kausale Therapiemöglichkeiten im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen.

7 Literaturverzeichnis

- Agarraberes, F. A., & Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*, 114(Pt 13), 2491-2499. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.13.2491>
- Antón, Z., Betin, V. M. S., Simonetti, B., Traer, C. J., Attar, N., Cullen, P. J., & Lane, J. D. (2020). A heterodimeric SNX4--SNX7 SNX-BAR autophagy complex coordinates ATG9A trafficking for efficient autophagosome assembly. *J Cell Sci*, 133(14). <https://doi.org/10.1242/jcs.246306>
- 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(13), 1684-1687. <https://doi.org/10.1002/mds.26019>
- Arai, H., Terres, G., Pink, S., & Forgac, M. (1988). Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem*, 263(18), 8796-8802.
- 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(1), 123-133. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312055>
- Axe, E. L., Walker, S. A., Maniava, 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(4), 685-701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., & Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*, 152(4), 879-884.
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., & Ohsumi, Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol*, 124(6), 903-913. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.6.903>
- Baravalle, G., Schober, D., Huber, M., Bayer, N., Murphy, R. F., & Fuchs, R. (2005). Transferrin recycling and dextran transport to lysosomes is differentially affected by bafilomycin, nocodazole, and low temperature. *Cell Tissue Res*, 320(1), 99-113. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1060-x>
- Bekbulat, F., Schmitt, D., Feldmann, A., Huesmann, H., Eimer, S., Juretschke, T., Beli, P., Behl, C., & Kern, A. (2020). RAB18 Loss Interferes With Lipid Droplet Catabolism and Provokes Autophagy Network Adaptations. *J Mol Biol*, 432(4), 1216-1234. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.031>
- Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T., & Seglen, P. O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of

- autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*, 273(34), 21883-21892. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21883>
- Besemer, A. S., Maus, J., Ax, M. D. A., Stein, A., Vo, S., Freese, C., Nalbach, K., von Hilchen, C., Pfalzgraf, I. F., Koziollek-Drechsler, I., Silva, B., Huesmann, H., Boukhallouk, F., Florin, L., Kern, A., Behl, C., & Clement, A. M. (2021). Receptor-mediated endocytosis 8 (RME-8)/DNAJC13 is a novel positive modulator of autophagy and stabilizes cellular protein homeostasis. *Cell Mol Life Sci*, 78(2), 645-660. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03521-y>
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., & Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171(4), 603-614. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>
- Bowman, B. J., & Bowman, E. J. (2002). Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J Biol Chem*, 277(6), 3965-3972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109756200>
- Bowman, E. J., Siebers, A., & Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21), 7972-7976. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.7972>
- Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Cleveland, D. W. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 18(2), 327-338. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80272-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80272-x)
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., & Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70(5), 715-728. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90306-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90306-w)
- Bugarcic, A., Vetter, I., Chalmers, S., Kinna, G., Collins, B. M., & Teasdale, R. D. (2015). Vps26B-retromer negatively regulates plasma membrane resensitization of PAR-2. *Cell Biol Int*, 39(11), 1299-1306. <https://doi.org/10.1002/cbin.10508>
- Bugarcic, A., Zhe, Y., Kerr, M. C., Griffin, J., Collins, B. M., & Teasdale, R. D. (2011). Vps26A and Vps26B subunits define distinct retromer complexes. *Traffic*, 12(12), 1759-1773. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01284.x>
- Burman, C., & Ktistakis, N. T. (2010). Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin Immunopathol*, 32(4), 397-413. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0222-z>
- Butor, C., Griffiths, G., Aronson, N. N., Jr., & Varki, A. (1995). Co-localization of hydrolytic enzymes with widely disparate pH optima: implications for the regulation of lysosomal pH. *J Cell Sci*, 108 (Pt 6), 2213-2219. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.6.2213>
- Carlton, J., Bujny, M., Peter, B. J., Oorschot, V. M., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H. T., & Cullen, P. J. (2004). Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of

- high- curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr Biol*, 14(20), 1791-1800. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.077>
- 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(7), 1055-1064. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311084>
- Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J., & Rothman, J. E. (1986). Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell*, 45(1), 3-13. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90532-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90532-5)
- Chen, Y., & Klionsky, D. J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*, 124(Pt 2), 161-170. <https://doi.org/10.1242/jcs.064576>
- Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., & Dice, J. F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*, 246(4928), 382-385. <https://doi.org/10.1126/science.2799391>
- Chin, L. S., Raynor, M. C., Wei, X., Chen, H. Q., & Li, L. (2001). Hrs interacts with sorting nexin 1 and regulates degradation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 276(10), 7069-7078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004129200>
- Chumpen Ramirez, S., Gómez-Sánchez, R., Verlhac, P., Hardenberg, R., Margheritis, E., Cosentino, K., Reggiori, F., & Ungermann, C. (2023). --Atg9 interactions via its transmembrane domains are required for phagophore expansion during autophagy. *Autophagy*, 19(5), 1459-1478. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2136340>
- Clague, M. J., Urbé, S., Aniento, F., & Gruenberg, J. (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem*, 269(1), 21-24.
- Collins, B. M., Skinner, C. F., Watson, P. J., Seaman, M. N., & Owen, D. J. (2005). Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 12(7), 594-602. <https://doi.org/10.1038/nsmb954>
- Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T., Jr. (2000). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 39(10), 2552-2563. <https://doi.org/10.1021/bi991447r>
- Cozier, G. E., Carlton, J., McGregor, A. H., Gleeson, P. A., Teasdale, R. D., Mellor, H., & Cullen, P. J. (2002). The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem*, 277(50), 48730-48736. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206986200>
- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*, 14(2), 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.12.002>
- Dengjel, J., Høyer-Hansen, M., Nielsen, M. O., Eisenberg, T., Harder, L. M., Schandorff, S., Farkas, T., Kirkegaard, T., Becker, A. C., Schroeder, S., Vanselow, K., Lundberg, E., Nielsen, M. M., Kristensen, A. R., Akimov, V., Bunkenborg, J., Madeo, F., Jäättelä, M., & Andersen, J. S. (2012).

- Identification of autophagosome-associated proteins and regulators by quantitative proteomic analysis and genetic screens. *Mol Cell Proteomics*, 11(3), M111.014035. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014035>
- 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(5), 712-723. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.010>
- Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., & Lee, S. J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31), 13010-13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106>
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 15(8), 305-309. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8)
- Djouder, N., Tuerk, R. D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R. F., Scholz, R., Vaahtomeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R. A., Viollet, B., Mäkelä, T. P., Wallimann, T., Neumann, D., & Krek, W. (2010). PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. *Embo j*, 29(2), 469-481. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.339>
- Dröse, S., Bindseil, K. U., Bowman, E. J., Siebers, A., Zeeck, A., & Altendorf, K. (1993). Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry*, 32(15), 3902-3906. <https://doi.org/10.1021/bi00066a008>
- Eriksen, J. L., Dawson, T. M., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2003). Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron*, 40(3), 453-456. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00684-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00684-6)
- Fang, F., Yang, W., Florio, J. B., Rockenstein, E., Spencer, B., Orain, X. M., Dong, S. X., Li, H., Chen, X., Sung, K., Rissman, R. A., Masliah, E., Ding, J., & Wu, C. (2017). Synuclein impairs trafficking and signaling of BDNF in a mouse model of Parkinson's disease. *Sci Rep*, 7(1), 3868. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04232-4>
- Fecto, F., Yan, J., Vemula, S. P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., Zheng, J. G., Shi, Y., Siddique, N., Arrat, H., Donkervoort, S., Ajroud-Driss, S., Sufit, R. L., Heller, S. L., Deng, H. X., & Siddique, T. (2011). SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 68(11), 1440-1446. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.250>
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J., & Hopkins, C. R. (1990). Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell*, 61(4), 623-634. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90474-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90474-s)
- Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K., & Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 447(7148), 1121-1125. <https://doi.org/10.1038/nature05925>

- Follett, J., Bugarcic, A., Yang, Z., Ariotti, N., Norwood, S. J., Collins, B. M., Parton, R. G., & Teasdale, R. D. (2016). Parkinson Disease-linked Vps35 R524W Mutation Impairs the Endosomal Association of Retromer and Induces α -Synuclein Aggregation. *J Biol Chem*, 291(35), 18283-18298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.703157>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.043>
- 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(2), 230-244. <https://doi.org/10.1111/tra.12136>
- Foo, J. N., Liany, H., Tan, L. C., Au, W. L., Prakash, K. M., Liu, J., & Tan, E. K. (2014). DNAJ mutations are rare in Chinese Parkinson's disease patients and controls. *Neurobiol Aging*, 35(4), 935.e931-932. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.018>
- Forgac, M. (1999). Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem*, 274(19), 12951-12954. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.12951>
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11), 917-929. <https://doi.org/10.1038/nrm2272>
- 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(Pt 9), 2053-2070. <https://doi.org/10.1242/jcs.144659>
- 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(1), 35-50.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*, 19(5), 2092-2100. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1257t>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.06.004>
- Gamerding, M., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Clement, A. M., & Behl, C. (2011). BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep*, 12(2), 149-156. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.203>
- Gialluisi, A., Reccia, M. G., Modugno, N., Nutile, T., Lombardi, A., Di Giovannantonio, L. G., Pietracupa, S., Ruggiero, D., Scala, S., Gambardella, S., Iacoviello, L.,

- Gianfrancesco, F., Acampora, D., D'Esposito, M., Simeone, A., Ciullo, M., & Esposito, T. (2021). Identification of sixteen novel candidate genes for late onset Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 16(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00455-2>
- Girard, M., Poupon, V., Blondeau, F., & McPherson, P. S. (2005). The DnaJ-domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking. *J Biol Chem*, 280(48), 40135-40143. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505036200>
- Gitler, A. D., Bevis, B. J., Shorter, J., Strathearn, K. E., Hamamichi, S., Su, L. J., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Rochet, J. C., McCaffery, J. M., Barlowe, C., & Lindquist, S. (2008). The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(1), 145-150. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710685105>
- Gokool, S., Tattersall, D., Reddy, J. V., & Seaman, M. N. (2007). Identification of a conserved motif required for Vps35p/Vps26p interaction and assembly of the retromer complex. *Biochem J*, 408(2), 287-295. <https://doi.org/10.1042/bj20070555>
- Gomez, R. C., Wawro, P., Lis, P., Alessi, D. R., & Pfeffer, S. R. (2019). Membrane association but not identity is required for LRRK2 activation and phosphorylation of Rab GTPases. *J Cell Biol*, 218(12), 4157-4170. <https://doi.org/10.1083/jcb.201902184>
- Gomez, T. S., & Billadeau, D. D. (2009). A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell*, 17(5), 699-711. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.009>
- Gomez-Lamarca, M. J., Snowdon, L. A., Seib, E., Klein, T., & Bray, S. J. (2015). Rme-8 depletion perturbs Notch recycling and predisposes to pathogenic signaling. *J Cell Biol*, 210(2), 303-318. <https://doi.org/10.1083/jcb.201411001>
- Gómez-Suaga, P., Rivero-Ríos, P., Fdez, E., Blanca Ramírez, M., Ferrer, I., Aiastui, A., López De Munain, A., & Hilfiker, S. (2014). LRRK2 delays degradative receptor trafficking by impeding late endosomal budding through decreasing Rab7 activity. *Hum Mol Genet*, 23(25), 6779-6796. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu395>
- Gustavsson, E. K., Guella, I., Trinh, J., Szu-Tu, C., Rajput, A., Rajput, A. H., Steele, J. C., McKeown, M., Jeon, B. S., Aasly, J. O., & Farrer, M. J. (2015). Genetic variability of the retromer cargo recognition complex in parkinsonism. *Mov Disord*, 30(4), 580-584. <https://doi.org/10.1002/mds.26104>
- 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(2), 273-278. <https://doi.org/10.1002/mds.26064>
- Haack, T. B., Ignatius, E., Calvo-Garrido, J., Iuso, A., Isohanni, P., Maffezzini, C., Lönnqvist, T., Suomalainen, A., Gorza, M., Kremer, L. S., Graf, E., Hartig, M., Berutti, R., Paucar, M., Svenningsson, P., Stranneheim, H., Brandberg, G., Wedell, A., Kurian, M. A., . . . Klopstock, T. (2016). Absence of the Autophagy Adaptor SQSTM1/p62 Causes Childhood-Onset Neurodegeneration with Ataxia, Dystonia, and Gaze Palsy. *Am J Hum Genet*, 99(3), 735-743. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.026>

- Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., & Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*, 282(52), 37298-37302. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700195200>
- 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(1), 209-220. <https://doi.org/10.1042/bj20111761>
- Harbour, M. E., Breusegem, S. Y., Antrobus, R., Freeman, C., Reid, E., & Seaman, M. N. (2010). The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci*, 123(Pt 21), 3703-3717. <https://doi.org/10.1242/jcs.071472>
- 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(1), 267-272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316482111>
- Harterink, M., Port, F., Lorenowicz, M. J., McGough, I. J., Silhankova, M., Betist, M. C., van Weering, J. R. T., van Heesbeen, R., Middelkoop, T. C., Basler, K., Cullen, P. J., & Korswagen, H. C. (2011). A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nat Cell Biol*, 13(8), 914-923. <https://doi.org/10.1038/ncb2281>
- Hasegawa, M., Fujiwara, H., Nonaka, T., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Mann, D., & Iwatsubo, T. (2002). Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem*, 277(50), 49071-49076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208046200>
- Hasegawa, T., Sugeno, N., Kikuchi, A., Baba, T., & Aoki, M. (2017). Membrane Trafficking Illuminates a Path to Parkinson's Disease. *Tohoku J Exp Med*, 242(1), 63-76. <https://doi.org/10.1620/tjem.242.63>
- He, C., Baba, M., Cao, Y., & Klionsky, D. J. (2008). Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol Biol Cell*, 19(12), 5506-5516. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0544>
- Helfer, E., Harbour, M. E., Henriot, V., Lakisic, G., Sousa-Blin, C., Volceanov, L., Seaman, M. N. J., & Gautreau, A. (2013). Endosomal recruitment of the WASH complex: active sequences and mutations impairing interaction with the retromer. *Biol Cell*, 105(5), 191-207. <https://doi.org/10.1111/boc.201200038>
- Hierro, A., Rojas, A. L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A. V., Steven, A. C., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2007). Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature*, 449(7165), 1063-1067. <https://doi.org/10.1038/nature06216>
- Horazdovsky, B. F., Davies, B. A., Seaman, M. N., McLaughlin, S. A., Yoon, S., & Emr, S. D. (1997). A sorting nexin-1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor. *Mol Biol Cell*, 8(8), 1529-1541. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.8.1529>

- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J. L., Oshiro, N., & Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20(7), 1981-1991. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *Embo j*, 30(17), 3481-3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Hurley, J. H. (2010). The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45(6), 463-487. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.502516>
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gassel, M., Droese, S., Zeeck, A., Altendorf, K., & Wiczorek, H. (2002). Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J Biol Chem*, 277(43), 40544-40548. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207345200>
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811), 488-492. <https://doi.org/10.1038/35044114>
- 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(20), 3781-3791. <https://doi.org/10.1242/jcs.196196>
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, 6(6), 764-776. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12709>
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*, 19(12), 5360-5372. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0080>
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 151(6), 1256-1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., & Eskelinen, E. L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci*, 117(Pt 20), 4837-4848. <https://doi.org/10.1242/jcs.01370>
- Jia, D., Gomez, T. S., Billadeau, D. D., & Rosen, M. K. (2012). Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer. *Mol Biol Cell*, 23(12), 2352-2361. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1059>
- 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms13305>
- Jimenez-Orgaz, A., Kvainickas, A., Nägele, H., Denner, J., Eimer, S., Dengjel, J., & Steinberg, F. (2018). Control of RAB7 activity and localization through the

- retromer-TBC1D5 complex enables RAB7-dependent mitophagy. *Embo j*, 37(2), 235-254. <https://doi.org/10.15252/emboj.201797128>
- Johnson, L. S., Dunn, K. W., Pytowski, B., & McGraw, T. E. (1993). Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol Biol Cell*, 4(12), 1251-1266. <https://doi.org/10.1091/mbc.4.12.1251>
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D. H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 20(7), 1992-2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j*, 19(21), 5720-5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>
- 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(Pt 13), 2805-2812. <https://doi.org/10.1242/jcs.01131>
- Kane, P. M. (1995). Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase in vivo. *J Biol Chem*, 270(28), 17025-17032.
- Katzmann, D. J., Babst, M., & Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2), 145-155. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00434-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00434-2)
- Kerr, M. C., Bennetts, J. S., Simpson, F., Thomas, E. C., Flegg, C., Gleeson, P. A., Wicking, C., & Teasdale, R. D. (2005). A novel mammalian retromer component, Vps26B. *Traffic*, 6(11), 991-1001. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00328.x>
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 152(3), 519-530. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.519>
- Kim, E., Lee, Y., Lee, H. J., Kim, J. S., Song, B. S., Huh, J. W., Lee, S. R., Kim, S. U., Kim, S. H., Hong, Y., Shim, I., & Chang, K. T. (2010). Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 403(2), 167-171. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.121>
- Kim, J., Huang, W. P., Stromhaug, P. E., & Klionsky, D. J. (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J Biol Chem*, 277(1), 763-773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109134200>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2), 132-141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>

- King, J. S., Gueho, A., Hagedorn, M., Gopaldass, N., Leuba, F., Soldati, T., & Insall, R. H. (2013). WASH is required for lysosomal recycling and efficient autophagic and phagocytic digestion. *Mol Biol Cell*, *24*(17), 2714-2726. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-02-0092>
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*, *147*(2), 435-446. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.435>
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol*, *151*(2), 263-276. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.263>
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, *392*(6676), 605-608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adhietty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., . . . Zughair, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, *12*(1), 1-222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
- Klumperman, J., & Raposo, G. (2014). The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *6*(10), a016857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016857>
- Knorr, R. L., Lipowsky, R., & Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy*, *11*(11), 2134-2137. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091552>
- Körschgen, H., Baeken, M., Schmitt, D., Nagel, H., & Behl, C. (2023). Co-chaperone BAG3 enters autophagic pathway via its interaction with microtubule associated protein 1 light chain 3 beta. *Traffic*, *24*(12), 564-575. <https://doi.org/10.1111/tra.12916>
- Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2018). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(41), 10363-10368. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806727115>
- Kouli, A., Torsney, K. M., & Kuan, W. L. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Codon Publications. Copyright: The Authors. <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch1>
- Kuusisto, E., Salminen, A., & Alafuzoff, I. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport*, *12*(10), 2085-2090. <https://doi.org/10.1097/00001756-200107200-00009>

- Kvainickas, A., Nägele, H., Qi, W., Dokládal, L., Jimenez-Orgaz, A., Stehl, L., Gangurde, D., Zhao, Q., Hu, Z., Dengjel, J., De Virgilio, C., Baumeister, R., & Steinberg, F. (2019). Retromer and TBC1D5 maintain late endosomal RAB7 domains to enable amino acid-induced mTORC1 signaling. *J Cell Biol*, 218(9), 3019-3038. <https://doi.org/10.1083/jcb.201812110>
- Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J., & van der Goot, F. G. (2008). Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One*, 3(7), e2758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002758>
- Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., & Johansen, T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle*, 8(13), 1986-1990. <https://doi.org/10.4161/cc.8.13.8892>
- Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J., Lee, J. H., Paik, S. R., & Lee, S. J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(9), 1835-1849. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.017>
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D., & Polymeropoulos, M. H. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 395(6701), 451-452. <https://doi.org/10.1038/26652>
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), 672-676. <https://doi.org/10.1038/45257>
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., & Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, 10(3), 457-468. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00636-6)
- 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(5), 659-675. <https://doi.org/10.1083/jcb.201111079>
- Lorenzo-Betancor, O., Ogaki, K., Soto-Ortolaza, A. I., Labbe, C., Walton, R. L., Strongosky, A. J., van Gerpen, J. A., Uitti, R. J., McLean, P. J., Springer, W., Siuda, J., Opala, G., Krygowska-Wajs, A., Barcikowska, M., Czyzewski, K., McCarthy, A., Lynch, T., Puschmann, A., Rektorova, I., . . . Ross, O. A. (2015). DNAJC13 p.Asn855Ser mutation screening in Parkinson's disease and pathologically confirmed Lewy body disease patients. *Eur J Neurol*, 22(9), 1323-1325. <https://doi.org/10.1111/ene.12770>
- Lucas, M., Gershlick, D. C., Vidaurrazaga, A., Rojas, A. L., Bonifacino, J. S., & Hierro, A. (2016). Structural Mechanism for Cargo Recognition by the Retromer Complex. *Cell*, 167(6), 1623-1635.e1614. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.056>
- Luk, K. C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J. R., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells.

- Proc Natl Acad Sci U S A, 106(47), 20051-20056.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908005106>
- 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(3), 425-439.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.033>
- Maeda, S., Yamamoto, H., Kinch, L. N., Garza, C. M., Takahashi, S., Otomo, C., Grishin, N. V., Forli, S., Mizushima, N., & Otomo, T. (2020). Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A. *Nat Struct Mol Biol*, 27(12), 1194-1201. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00520-2>
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, 8(8), 2804-2815. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-08-02804.1988>
- Maruyama, T., & Noda, N. N. (2021). Delineating the lipidated Atg8 structure for unveiling its hidden activity in autophagy. *Autophagy*, 17(10), 3271-3272. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1961075>
- Maruzs, T., Lőrincz, P., Szatmári, Z., Széplaki, S., Sándor, Z., Lakatos, Z., Puska, G., Juhász, G., & Sass, M. (2015). Retromer Ensures the Degradation of Autophagic Cargo by Maintaining Lysosome Function in *Drosophila*. *Traffic*, 16(10), 1088-1107. <https://doi.org/10.1111/tra.12309>
- Marzella, L., Ahlberg, J., & Glaumann, H. (1980). In vitro uptake of particles by lysosomes. *Exp Cell Res*, 129(2), 460-466. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(80\)90515-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(80)90515-7)
- Matoba, K., Kotani, T., Tsutsumi, A., Tsuji, T., Mori, T., Noshiro, D., Sugita, Y., Nomura, N., Iwata, S., Ohsumi, Y., Fujimoto, T., Nakatogawa, H., Kikkawa, M., & Noda, N. N. (2020). Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nat Struct Mol Biol*, 27(12), 1185-1193. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00518-w>
- Maxfield, F. R., & Yamashiro, D. J. (1987). Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol*, 225, 189-198. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5442-0_16
- McGough, I. J., & Cullen, P. J. (2013). Clathrin is not required for SNX-BAR-retromer-mediated carrier formation. *J Cell Sci*, 126(Pt 1), 45-52. <https://doi.org/10.1242/jcs.112904>
- 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(14), 1670-1676. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.024>
- McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., West, M., & Smythe, E. (1998). A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol*, 8(1), 34-45. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70018-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70018-1)

- McNaught, K. S., & Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 297(3), 191-194. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01701-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01701-8)
- Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7), 673-682. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733>
- Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *Embo j*, 18(14), 3888-3896. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.14.3888>
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700), 395-398. <https://doi.org/10.1038/26506>
- 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(6), 1691-1703. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu582>
- Nair, U., Yen, W. L., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2012). A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 8(5), 780-793. <https://doi.org/10.4161/auto.19385>
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 130(1), 165-178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.021>
- Noda, T., & Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273(7), 3963-3966. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3963>
- 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(3), 465-480. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.465>
- Norris, A., McManus, C. T., Wang, S., Ying, R., & Grant, B. D. (2022). Mutagenesis and structural modeling implicate RME-8 IWN domains as conformational control points. *PLoS Genet*, 18(10), e1010296. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010296>
- 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(3), E307-e316. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612730114>
- Nothwehr, S. F., Ha, S. A., & Bruinsma, P. (2000). Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J Cell Biol*, 151(2), 297-310. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.297>

- Ohashi, Y., & Munro, S. (2010). Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Mol Biol Cell*, 21(22), 3998-4008. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-05-0457>
- 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(10), 1860-1873. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0746>
- Panaretou, C., Domin, J., Cockcroft, S., & Waterfield, M. D. (1997). Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *J Biol Chem*, 272(4), 2477-2485. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2477>
- Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C. A., Maiolica, A., Hansmann, I., Pfaffenwimmer, T., Kijanska, M., Stoffel, I., Lee, S. S., Brezovich, A., Lou, J. H., Turk, B. E., Aebersold, R., Ammerer, G., Peter, M., & Kraft, C. (2014). Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol Cell*, 53(3), 471-483. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.011>
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2), 223-236; discussion 222. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20(3), 460-473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927-939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8392-8396. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8392>
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, 303(5657), 495-499. <https://doi.org/10.1126/science.1092586>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Popoff, V., Mardones, G. A., Bai, S. K., Chambon, V., Tenza, D., Burgos, P. V., Shi, A., Benaroch, 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(12), 1868-1880. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00993.x>

- Popoff, V., Mardones, G. A., Tenza, D., Rojas, R., Lamaze, C., Bonifacino, J. S., Raposo, G., & Johannes, L. (2007). The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *J Cell Sci*, 120(Pt 12), 2022-2031. <https://doi.org/10.1242/jcs.003020>
- Popovic, D., & Dikic, I. (2014). TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO Rep*, 15(4), 392-401. <https://doi.org/10.1002/embr.201337995>
- Popovic, D., Akutsu, M., Novak, I., Harper, J. W., Behrends, 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(9), 1733-1744. <https://doi.org/10.1128/mcb.06717-11>
- Priya, A., Kalaidzidis, I. V., Kalaidzidis, Y., Lambright, D., & Datta, S. (2015). Molecular insights into Rab7-mediated endosomal recruitment of core retromer: deciphering the role of Vps26 and Vps35. *Traffic*, 16(1), 68-84. <https://doi.org/10.1111/tra.12237>
- Puri, C., Renna, M., Bento, C. F., Moreau, K., & Rubinsztein, D. C. (2014). ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes: additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 10(1), 182-184. <https://doi.org/10.4161/auto.27174>
- Purlyte, E., Dhekne, H. S., Sarhan, A. R., Gomez, R., Lis, P., Wightman, M., Martinez, T. N., Tonelli, F., Pfeffer, S. R., & Alessi, D. R. (2018). Rab29 activation of the Parkinson's disease-associated LRRK2 kinase. *Embo j*, 37(1), 1-18. <https://doi.org/10.15252/emboj.201798099>
- Puthenveedu, M. A., Lauffer, B., Temkin, P., Vistein, R., Carlton, P., Thorn, K., Taunton, J., Weiner, O. D., Parton, R. G., & von Zastrow, M. (2010). Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. *Cell*, 143(5), 761-773. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.003>
- Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E., & Stenmark, H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol*, 4(5), 394-398. <https://doi.org/10.1038/ncb791>
- Raiborg, C., Bache, K. G., Mehlum, A., Stang, E., & Stenmark, H. (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *Embo j*, 20(17), 5008-5021. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.5008>
- Raiborg, C., Wesche, J., Malerød, L., & Stenmark, H. (2006). Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *J Cell Sci*, 119(Pt 12), 2414-2424. <https://doi.org/10.1242/jcs.02978>
- 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(6), 887-888. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.164>
- Ravikumar, B., Duden, R., & Rubinsztein, D. C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet*, 11(9), 1107-1117. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1107>

- Ravussin, A., Brech, A., Tooze, S. A., & Stenmark, H. (2021). The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding protein SNX4 controls ATG9A recycling and autophagy. *J Cell Sci*, 134(3). <https://doi.org/10.1242/jcs.250670>
- Reaves, B., & Banting, G. (1994). Vacuolar ATPase inactivation blocks recycling to the trans-Golgi network from the plasma membrane. *FEBS Lett*, 345(1), 61-66. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00437-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00437-4)
- 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(1), 79-90. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00402-7)
- Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M., & Sabatini, D. D. (1998). Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6187-6192. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6187>
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), 735-749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>
- Rocha, E. M., De Miranda, B. R., Castro, S., Drolet, R., Hatcher, N. G., Yao, L., Smith, S. M., Keeney, M. T., Di Maio, R., Kofler, J., Hastings, T. G., & Greenamyre, J. T. (2020). LRRK2 inhibition prevents endolysosomal deficits seen in human Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 134, 104626. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104626>
- Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., Heck, A. J., Raposo, G., van der Sluijs, P., & Bonifacino, J. S. (2008). Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol*, 183(3), 513-526. <https://doi.org/10.1083/jcb.200804048>
- Ross, J. P., Dupre, N., Dauvilliers, Y., Strong, S., Ambalavanan, A., Spiegelman, D., Dionne-Laporte, A., Pourcher, E., Langlois, M., Boivin, M., Leblond, C. S., Dion, P. A., Rouleau, G. A., & Gan-Or, Z. (2016). Analysis of DNAJC13 mutations in French-Canadian/French cohort of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 45, 212.e213-212.e217. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.04.023>
- Rott, R., Szargel, R., Haskin, J., Shani, V., Shainskaya, A., Manov, I., Liani, E., Avraham, E., & Engelender, S. (2008). Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells. *J Biol Chem*, 283(6), 3316-3328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704809200>
- Roy, S., Leidal, A. M., Ye, J., Ronen, S. M., & Debnath, J. (2017). Autophagy-Dependent Shuttling of TBC1D5 Controls Plasma Membrane Translocation of GLUT1 and Glucose Uptake. *Mol Cell*, 67(1), 84-95.e85. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.020>
- Rubino, M., Miaczynska, M., Lippé, R., & Zerial, M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem*, 275(6), 3745-3748. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.3745>

- Ruck, A., Attonito, J., Garces, K. T., Nunez, L., Palmisano, N. J., Rubel, Z., Bai, Z., Nguyen, K. C., Sun, L., Grant, B. D., Hall, D. H., & Melendez, A. (2011). The Atg6/Vps30/Beclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*, *7*(4), 386-400. <https://doi.org/10.4161/auto.7.4.14391>
- Sahagian, G. G., & Neufeld, E. F. (1983). Biosynthesis and turnover of the mannose 6-phosphate receptor in cultured Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, *258*(11), 7121-7128.
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., & Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem*, *275*(35), 27447-27456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001394200>
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., . . . Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*, *41*(12), 1303-1307. <https://doi.org/10.1038/ng.485>
- Schmelzle, T., & Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, *103*(2), 253-262. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00117-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00117-3)
- Schmitt, D., Bozkurt, S., Henning-Domres, P., Huesmann, H., Eimer, S., Bindila, L., Behrends, C., Boyle, E., Wilfling, F., Tascher, G., Münch, C., Behl, C., & Kern, A. (2022). Lipid and protein content profiling of isolated native autophagic vesicles. *EMBO Rep*, *23*(12), e53065. <https://doi.org/10.15252/embr.202153065>
- Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D., & Emr, S. D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science*, *260*(5104), 88-91. <https://doi.org/10.1126/science.8385367>
- Seaman, M. N. (2004). Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol*, *165*(1), 111-122. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312034>
- Seaman, M. N. (2012). The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci*, *125*(Pt 20), 4693-4702. <https://doi.org/10.1242/jcs.103440>
- Seaman, M. N., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E., & Bright, N. (2009). Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci*, *122*(Pt 14), 2371-2382. <https://doi.org/10.1242/jcs.048686>
- Seaman, M. N., Marcusson, E. G., Cereghino, J. L., & Emr, S. D. (1997). Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J Cell Biol*, *137*(1), 79-92. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.1.79>
- Seaman, M. N., McCaffery, J. M., & Emr, S. D. (1998). A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol*, *142*(3), 665-681. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.3.665>

- Seaman, M., & Freeman, C. L. (2014). Analysis of the Retromer complex-WASH complex interaction illuminates new avenues to explore in Parkinson disease. *Commun Integr Biol*, 7, e29483. <https://doi.org/10.4161/cib.29483>
- Sekito, T., Kawamata, T., Ichikawa, R., Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2009). Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes Cells*, 14(5), 525-538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01299.x>
- 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(36), 9678-9687. <https://doi.org/10.1021/bi800699v>
- 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(21), 3290-3302. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.272>
- Shi, H., Rojas, R., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2006). The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol*, 13(6), 540-548. <https://doi.org/10.1038/nsmb1103>
- Statistisches Bundesamt. (2023, 7. Juni). *Demografischer Wandel: Anteil der Bevölkerung ab 65 Jahren von 1950 bis 2021 von 10 % auf 22 % gestiegen* [Pressemeldung]. Zitiert nach de.statista.com. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/548267/umfrage/anteil-der-bevoelkerung-ab-65-jahren-und-aelter-in-deutschland/>
- Stavoe, A. K. H., & Holzbaur, E. L. F. (2019). Autophagy in Neurons. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 35, 477-500. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125242>
- Steger, M., Tonelli, F., Ito, G., Davies, P., Trost, M., Vetter, M., Wachter, S., Lorentzen, E., Duddy, G., Wilson, S., Baptista, M. A., Fiske, B. K., Fell, M. J., Morrow, J. A., Reith, A. D., Alessi, D. R., & Mann, M. (2016). Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12813>
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., & Herman, P. K. (2010). The Tor and cAMP-dependent protein kinase signaling pathways coordinately control autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 6(2), 294-295. <https://doi.org/10.4161/auto.6.2.11129>
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo j*, 20(21), 5971-5981. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5971>
- Swords, S., Jia, N., Norris, A., Modi, J., Cai, Q., & Grant, B. D. (2023). A Conserved Requirement for RME-8/DNAJC13 in Neuronal Autolysosome Reformation. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.02.27.530319>
- Temkin, P., Lauffer, B., Jäger, S., Cimermancic, P., Krogan, N. J., & von Zastrow, M. (2011). SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol*, 13(6), 715-721. <https://doi.org/10.1038/ncb2252>

- Tjelle, T. E., Brech, A., Juvet, L. K., Griffiths, G., & Berg, T. (1996). Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J Cell Sci*, 109 (Pt 12), 2905-2914. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.12.2905>
- Tooze, J., Hollinshead, M., Ludwig, T., Howell, K., Hoflack, B., & Kern, H. (1990). In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J Cell Biol*, 111(2), 329-345. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.2.329>
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S. E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L. E., & Eisenberg, E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 378(6557), 632-635. <https://doi.org/10.1038/378632a0>
- Vadlamudi, R. K., Joung, I., Strominger, J. L., & Shin, J. (1996). p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem*, 271(34), 20235-20237. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20235>
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Mâle, P., Goud, B., & Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, 70(5), 729-740. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90307-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90307-x)
- van Vliet, A. R., Chiduzza, G. N., Maslen, S. L., Pye, V. E., Joshi, D., De Tito, S., Jefferies, H. B. J., Christodoulou, E., Roustan, C., Punch, E., Hervás, J. H., O'Reilly, N., Skehel, J. M., Cherepanov, P., & Tooze, S. A. (2022). ATG9A and ATG2A form a heteromeric complex essential for autophagosome formation. *Mol Cell*, 82(22), 4324-4339.e4328. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.10.017>
- van Weering, J. R., Sessions, R. B., Traer, C. J., Kloer, D. P., Bhatia, V. K., Stamou, D., Carlsson, S. R., Hurley, J. H., & Cullen, P. J. (2012). Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *Embo j*, 31(23), 4466-4480. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.283>
- Vanlandingham, P. A., & Ceresa, B. P. (2009). Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem*, 284(18), 12110-12124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809277200>
- Vargas, K. J., Makani, S., Davis, T., Westphal, C. H., Castillo, P. E., & Chandra, S. S. (2014). Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci*, 34(28), 9364-9376. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4787-13.2014>
- 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., . . . Farrer, M. J. (2014). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 23(7), 1794-1801. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt570>
- Vilariño-Güell, 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., . . . Farrer, M. J. (2011). VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89(1), 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.001>
- 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(32), 30442-30451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102342200>
- Wang, S., Ma, Z., Xu, X., Wang, Z., Sun, L., Zhou, Y., Lin, X., Hong, W., & Wang, T. (2014). A role of Rab29 in the integrity of the trans-Golgi network and retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptor. *PLoS One*, 9(5), e96242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096242>
- Wassmer, T., Attar, N., Bujny, M. V., Oakley, J., Traer, C. J., & Cullen, P. J. (2007). A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J Cell Sci*, 120(Pt 1), 45-54. <https://doi.org/10.1242/jcs.03302>
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., & Rubinsztein, D. C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*, 278(27), 25009-25013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300227200>
- Wild, J., Altman, E., Yura, T., & Gross, C. A. (1992). DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 6(7), 1165-1172. <https://doi.org/10.1101/gad.6.7.1165>
- Xhabija, B., & Vacratsis, P. O. (2015). Receptor-mediated Endocytosis 8 Utilizes an N-terminal Phosphoinositide-binding Motif to Regulate Endosomal Clathrin Dynamics. *J Biol Chem*, 290(35), 21676-21689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.644757>
- Xhabija, B., Taylor, G. S., Fujibayashi, A., Sekiguchi, K., & Vacratsis, P. O. (2011). Receptor mediated endocytosis 8 is a novel PI(3)P binding protein regulated by myotubularin-related 2. *FEBS Lett*, 585(12), 1722-1728. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.016>
- Xia, P., Wang, S., Du, Y., Zhao, Z., Shi, L., Sun, L., Huang, G., Ye, B., Li, C., Dai, Z., Hou, N., Cheng, X., Sun, Q., Li, L., Yang, X., & Fan, Z. (2013). WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. *Embo j*, 32(20), 2685-2696. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.189>
- Xie, Z., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2008). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19(8), 3290-3298. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1292>
- Yamada, T., Carson, A. R., Caniggia, I., Umebayashi, K., Yoshimori, T., Nakabayashi, K., & Scherer, S. W. (2005). Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J Biol Chem*, 280(18), 18283-18290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413957200>
- 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(2), 219-233. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202061>

- Yamashiro, D. J., & Maxfield, F. R. (1984). Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors. *J Cell Biochem*, 26(4), 231-246. <https://doi.org/10.1002/jcb.240260404>
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2(Suppl 2), 1542-1552. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401765>
- 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(5), 823-836. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy003>
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., & Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*, 266(26), 17707-17712.
- Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Köchl, 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(Pt 18), 3888-3900. <https://doi.org/10.1242/jcs.03172>
- Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D. W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E. H., & Lenardo, M. J. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465(7300), 942-946. <https://doi.org/10.1038/nature09076>
- 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms4828>
- Zhang, J., Feng, Y., & Forgac, M. (1994). Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase. *J Biol Chem*, 269(38), 23518-23523.
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J. S., & Zhang, J. (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *Faseb j*, 19(6), 533-542. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>
- 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(7), 2011-2021. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.7.2011>
- Zhen, Y., & Stenmark, H. (2023). Autophagosome Biogenesis. *Cells*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/cells12040668>
- Zimprich, A., Benet-Pagès, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S. H., Offman, M. N., Haubenberger, D., Spielberger, S., Schulte, E. C., Lichtner, P., Rossle, S. C., Klopp, N., Wolf, E., Seppi, K., Pirker, W., Presslauer, S., Mollenhauer, B., Katzenschlager, R., Foki, T., . . . Strom, T. M. (2011). A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson

disease. Am J Hum Genet, 89(1), 168-175.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.008>

8 Danksagung