

**Charakterisierung des lysosomalen
Transmembranproteins TMEM55B und seiner Rolle
im Lysosomen-Transport**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Eingereicht von

Sönke Rudnik

Kiel, April 2020

Erstgutachter

Prof. Dr. Paul Saftig

Zweitgutachter

Prof. Dr. Eric Beitz

Datum der Disputation

23.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VII
Zusammenfassung	XII
Summary	XIV
1. Einleitung	1
1.1. Lysosomen	1
1.2. Lysosomen als „ <i>Recycling-Center</i> “	1
1.2.1. Endozytose	2
1.2.2. Phagozytose	3
1.2.3. Makroautophagie	3
1.3. Lysosomen als zentrale Plattform für zelluläre Signalwege	5
1.3.1. Funktionen von mTORC1	5
1.4. Intrazellulärer Transport von Proteinen zu Lysosomen	6
1.4.1. Sortierungsrezeptoren für lösliche luminalen lysosomale Proteine	6
1.4.2. Sortierung von lysosomalen Membranproteinen	7
1.5. S-Palmitoylierung	8
1.6. Phosphatidylinositole	9
1.7. Transmembran Protein 55 A und B (TMEM55A und B)	9
1.8. Zellulärer Transport von Lysosomen	12
1.9. Auswirkungen der lysosomalen Lokalisation auf die Zelle	14
1.10. Neurone – Zellen mit besonderen Ansprüchen an den Transport von Lysosomen	15
2. Zielsetzung	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Material	20
3.1.1. Chemikalien	20
3.1.2. Antikörper	20
3.1.3. Enzyme	22
3.1.4. Oligonukleotide	23

3.1.5. siRNA	23
3.1.6. Plasmide und Expressions-Konstrukte	23
3.1.7. Protein und DNA Standards.....	23
3.1.8. Kits.....	24
3.1.9. Bakterien-Stämme	24
3.1.10. Transgene Mausstämmе	24
3.1.11. Zelllinien	25
3.1.12. Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur	25
3.1.13. Häufig verwendete Pufferlösungen	26
3.1.14. Zusätzliche Materialien	27
3.2. Molekularbiologische Methoden	27
3.2.1. Generierung von elektrokompetenten <i>Escherichia coli</i>	27
3.2.2. Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i>	27
3.2.3. Aufreinigung von Plasmid DNA aus XL-1 <i>blue E. coli</i>	28
3.2.4. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	28
3.2.5. Mutagenes PCR.....	28
3.2.6. RNA-Extraktion aus murinen Gehirnen	29
3.2.7. cDNA Synthese.....	29
3.2.8. RNA-Sequenzierung	29
3.2.9. Agarose-Gelelektrophorese	29
3.2.10. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	30
3.3. Zellbiologische Methoden.....	30
3.3.1. Allgemeine Zellkultur.....	30
3.3.2. Kryokonservierung von Zellen.....	30
3.3.3. Isolation von primären Maus embryonalen Fibroblasten (MEFs).....	31
3.3.4. Isolation von primären Neuronen	31
3.3.5. Transiente Transfektion von Zellen	32
3.3.6. siRNA-vermittelter <i>knockdown</i>	32
3.3.7. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	32
3.3.8. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von PIPs	33

3.3.9.	Bestimmung des Autophagieflusses in Zellen	34
3.3.10.	mTORC1 Reaktivierung in Zellen.....	34
3.4.	Proteinbiochemische Methoden	34
3.4.1.	Isolation von Proteinen aus Zellen	34
3.4.2.	Isolation von Proteinen aus Geweben.....	34
3.4.3.	Membranpräparation aus Zellen	35
3.4.4.	Membranpräparation aus Mausorganen	35
3.4.5.	Immunpräzipitation von Proteinen.....	35
3.4.6.	Aktivitätsassays von lysosomalen Hydrolasen	36
3.4.7.	Isolation von Detergenz-resistenten Membranen	36
3.4.8.	Acetonfällung von Proteinen	37
3.4.9.	AcylRac Assay.....	37
3.4.10.	Acyl-PEG-Austausch Assay.....	38
3.4.11.	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA	40
3.4.12.	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	40
3.4.13.	Proteindetektion mittels Immunoblot im Amersham™ Imager 680	40
3.4.14.	Proteindetektion und Quantifizierung mittels Immublot in einem Odyssey® Fc Dual-Mode Imaging System.....	41
3.4.15.	Erneute Entwicklung eines Immunoblot	42
3.5.	Histologische Methoden	42
3.5.1.	Herstellung von semi-dünnen Kryoschnitten von PFA-fixierten Organen.....	42
3.5.2.	Immunfluoreszenzfärbung von Organkryoschnitten.....	42
3.5.3.	Myelinscheidenfärbung	43
3.6.	Tierversuche.....	43
3.6.1.	Haltung von Mäusen	43
3.6.2.	CRISPR/Cas9-vermittelte Proteindeletion	43
3.6.3.	Schwanzbiopsie und Isolation von genomischer DNA.....	43
3.6.4.	Genotypisierungs-PCR	43
3.6.5.	Anästhesie von Versuchstieren.....	44
3.6.6.	Perfusion von Versuchstieren mit PFA.....	44

3.6.7. Euthanasie von Versuchstieren.....	44
3.6.8. Gewichtsbestimmung von Mäusen.....	44
3.6.9. Griffstärke	45
3.6.10. Rotierender Zylinder	45
3.6.11. Vertikale Stange.....	45
3.6.12. Schwebebalken	45
3.6.13. Laufband.....	46
3.6.14. Offenes-Feld-Test.....	46
4. Ergebnisse	47
4.1. TMEM55B ist ein lysosomales Membranprotein.....	47
4.2. Überexpression von TMEM55B führt zu einer perinukleären Akkumulation von Lysosomen	49
4.3. Das lysosomale Membranprotein TMEM55A ist nicht an der Positionierung von Lysosomen beteiligt	51
4.4. Generierung von TMEM55A- und TMEM55B-defizienten Mäusen	51
4.5. Die Verteilung von Lysosomen in TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten MEFs ist unverändert.....	53
4.6. TMEM55A und TMEM55B werden mittels Dileucinmotiv zu Lysosomen transportiert	55
4.7. Die beschriebene Phosphataseaktivität von TMEM55B ist nicht zu reproduzieren .	57
4.8. Autophagie ist in TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten MEFs nicht verändert	59
4.9. Der mTORC1-Signalweg ist in TMEM55B-defizienten MEFs nicht verändert	62
4.10. TMEM55B ist an mehreren Cysteinresten palmitoyliert	64
4.11. Die Palmitoylierung von überexprimiertem TMEM55B-HA kann mit 2-Bromopalmitat (2BP) inhibiert werden	67
4.12. TMEM55B ist in Detergenz-resistenten Membranen lokalisiert.....	68
4.13. Die Deletion aller Cysteinreste aus TMEM55B führt zu Retention im Golgi-Apparat	70
4.13.1. Die Mutation einzelner Cysteinreste von TMEM55B führt schon zu einer Retention im Golgi-Apparat.....	71

4.13.2. Palmitoylierung von zytosolischen Cysteinresten	73
4.13.3. Der Transport von TMEM55B ist nicht unter Adaptor-Protein-Komplex Defizienz verändert	75
4.14. Die Rolle von TMEM55B <i>in vivo</i> in murinen Neuronen	78
4.14.1. TMEM55B Expression in Mausorganen	78
4.14.2. TMEM55B wird in Neuronen exprimiert.....	79
4.14.3. TMEM55B-Defizienz führt zu einer Akkumulation von Lysosomen in Neuronen.	81
4.14.4. TMEM55B-Defizienz führt zu Degeneration von Axonen im zentralen und peripheren Nervensystem.....	85
4.14.5. Konditionale Defizienz von <i>JNK-interacting protein</i> (JIP4) führt ebenfalls zu einer Akkumulation von Lysosomen im AIS	86
4.15. TMEM55B-Defizienz führt zu keiner veränderten Assoziation von JIP4 an Membranen und Lysosomen.....	88
4.15.1. TMEM55B-Defizienz hat keinen deutlichen Einfluss auf die lysosomale Funktion im Gehirn	89
4.15.2. Eine Defizienz von TMEM55B führt zu keinen motorischen Auffälligkeiten in Mäusen.....	93
4.15.3. Die doppelte Defizienz von TMEM55B und TMEM55A führt zu einem verringerten Wachstum von Mäusen.....	97
5. Diskussion	99
5.1. Das lysosomale Transmembranprotein TMEM55B ist am Transport von Lysosomen beteiligt	99
5.2. Eine TMEM55B-Defizienz ist nicht grundsätzlich letal in Mäusen	100
5.3. Die Phosphatase Aktivität von TMEM55B ist <i>in cellulo</i> nicht zu reproduzieren	101
5.4. Dileucinmotiv	102
5.5. mTORC1-Aktivität unter Abhängigkeit von TMEM55B.....	103
5.6. Autophagie in TMEM55B-defizienten Maus embryonalen Fibroblasten	105
5.7. Palmitoylierung von TMEM55B	106
5.8. Die Palmitoylierung von TMEM55B ist nicht ursächlich für die Lokalisierung in Detergenz-resistenten Membranen.....	107
5.9. Die Mutation von Cysteinen führt unabhängig von einer möglichen Palmitoylierung zu einer Retention von TMEM55B im Golgi-Apparat.....	108

5.10.	Die Golgi-Retention verhindert nicht den unspezifischen Gesamtfluss von TMEM55B vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran	113
5.11.	TMEM55B vermittelt den Mikrotubuli-abhängigen Transport von Lysosomen in Neuronen.....	113
5.12.	Eine Defizienz von TMEM55B hat keinen Effekt auf die Expression von lysosomalen Genen und keinen Effekt auf die Motorik von Mäusen	118
5.13.	TMEM55A und TMEM55B könnten eine redundante Funktion ausüben.....	120
5.14.	Ausblick.....	120
6.	Referenzen	122
7.	Anhang	138
7.1.	Angehängte Abbildungen	138
7.2.	Abbildungsverzeichnis.....	143
7.3.	Tabellenverzeichnis.....	144
7.4.	Verzeichnis der angehängten Abbildungen	145
8.	Erklärung.....	146
9.	Curriculum Vitae	147
9.1.	Ausbildung	147
9.2.	Publikationen.....	148
9.3.	Präsentationen	148
10.	Danksagungen	149

Abkürzungen

2BP	2-Bromopalmitat
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
AIS	<i>Axon Initial Segment</i>
ALG2	<i>Apoptosis-linked gene 2</i>
ALR	<i>Autophagic lysosome reformation</i>
AnkG	Ankyrin G
AP	<i>Adaptor Protein</i>
ARFs	<i>ADP-ribosylation factors</i>
Arl8b	<i>ADP-ribosylation factor-like protein 8B</i>
ATG13	<i>Autophagy-related 13</i>
BafA1	Bafilomycin A1
BORC	<i>BLOC-one-related complex</i>
CC	<i>Coiled-coil</i>
CCV	<i>Clathrin-coated Vesicles</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CtsB	Cathepsin B
CtsD	Cathepsin D
CLEAR	<i>Coordinated Lysosomal Expression and Regulation</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHHC	<i>(Asp-His-His-Cys)-containing protein acyltransferasen</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRMs	Detergenz-resistente Membranen
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4B	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4B</i>
EGFL7	EGFL7
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
ER	Endoplasmatischen Retikulum
Erk	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
FCS	Fetalen Kälberserum
FYCO1	<i>FYVE and coiled-coil (CC) domain-containing protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GGAs	<i>Gamma-ear-containing, ARF-binding proteins</i>
HA-Tag	<i>Human influenza hemagglutinin-Tag</i>
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IM	Isolationsmembran
IVC	Individuell ventilierte Käfige
JIP4	<i>JNK-interacting protein</i>
KD	<i>knockdown</i>
KIF5B	<i>Kinesin family 5B</i>
KO	<i>knockout</i>
LAMP1/2	<i>Lysosomal associated membrane proteins</i>
LAMTOR	Late endo-/lysosomal adaptor and MAPK and mTOR activator
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>

LIMP2	<i>Lysosomal integral membrane proteins</i>
LZ	<i>Leucin-Zipper</i>
M6P	Mannose-6-phosphat
M6PR	Mannose-6-Phosphat Rezeptoren
MAPK	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAPs	Mikrotubuli assoziierende Proteine
MEFs	Maus embryonale Fibroblasten
mLST8	<i>Mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>
MMTS	Methyl-methanthiosulfonat
MT1-MMP	<i>Membrane type 1-matrix metalloproteinase</i>
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
NEM	N-Ethylmaleinimid
OD	Optische Dichte
PI(3)P-Kinase	Phosphatidylinositol-3-phosphat-Kinase
PI(4,5)P ₂	Phosphatidyinositol(4,5)bisphosphat
PAEZ	<i>Pre-Axonal Exclusion Zone</i>
PAR1	<i>Protease-activated receptor-1</i>
PB	<i>Phosphate Buffer</i>
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
PTMs	Posttranslationale Modifikationen

RAP7	<i>Ras-related protein 7</i>
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
Raumtemperatur	RT
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RILP	<i>Rab-interacting lysosomal protein</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
S6K	<i>Ribosomal protein 26 kinase beta-1</i>
SHIP2	<i>SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2</i>
SKAR	<i>S6K1 Aly/REF-like target</i>
SKIP	<i>SifA and kinesin-interacting protein</i>
SLC38A9	<i>Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9</i>
SREBP	<i>Sterol responsive element binding protein</i>
Syt VII	Synaptotagmin VII
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TFEB	<i>Transcription factors EB</i>
TFR	Transferrin Rezeptor
TGN	Trans-Golginetzwerk
TMEM55A/B	<i>Transmembrane protein 55A/B</i>
TRPML1	<i>Transient receptor potential mucolipin 1</i>
ULK1	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WIPI2	<i>WD-repeat protein Interacting with Phospholinositides 2</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

ü/N

über Nacht

Zusammenfassung

Das lysosomale Transmembranprotein TMEM55B ist an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Initial als Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-4-phosphatase beschrieben wurden weitere Funktionen bei der Cholesterin-Homöostase, im mTORC1-Signalweg und im retrograden Transport von Lysosomen offengelegt. TMEM55B interagiert mit dem zytosolischen Protein JIP4. Zusammen vermitteln sie eine Bindung der Lysosomen an den Motorproteinkomplex Dynein/Dynactin und führen so zu einem retrograden Transport der Lysosomen entlang von Mikrotubuli.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Überexpressions-Experimenten die Rolle von TMEM55B im retrograden Lysosomen-Transport bestätigt. Jedoch widersprachen in dieser Arbeit durchgeführte *knockout*- und *knockdown*-Experimente von TMEM55B den bisher publizierten Daten, dass eine Defizienz von TMEM55B zu einer Akkumulation von Lysosomen in der Peripherie der Zelle führt. Es stellte sich die Frage, ob und wie der retrograde Transport von Lysosomen in der Zelle hierarchisch reguliert ist.

Darüber hinaus wurde die S-Palmitoylierung als posttranslationale Modifikation von TMEM55B und deren Funktion in der Sortierung von TMEM55B zu den Lysosomen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TMEM55B an mehreren Cysteinresten S-palmitoyliert wird und dass sowohl eine Mutation aller Cysteinreste, als auch die Mutationen einzelner für den Transport essenzieller Cysteinreste zu Serinresten eine Retention von TMEM55B im Golgi-Apparat zur Folge hatte. Es konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Palmitoylierung der mutierten Cysteinreste und ihrer Funktion im korrekten Transport von TMEM55B zu den Lysosomen dargelegt werden. Am Transport von TMEM55B in die Lysosomen ist auch ein N-terminal lokalisiertes Dileucinmotiv beteiligt, das eine Interaktion von TMEM55B mit Adaptor-Protein-Komplexen ermöglicht. Die Mutation dieses Sortierungsmotives führte im Wildtyp und in den Cystein-Mutanten von TMEM55B, die im Golgi-Apparat verbleiben, zu einer Fehlsortierung an die Zellmembran. Dies belegt sowohl eine Rolle des Dileucinmotivs, als mutmaßlich auch von Adaptor-Proteinen an der Retention von TMEM55B im Golgi-Apparat.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Analyse der physiologischen Funktion von TMEM55B. Dabei wurde insbesondere die Rolle von TMEM55B im Transport von Lysosomen in Neuronen anhand eines *knockout*-Mausmodells und daraus isolierten primären Neuronen untersucht. Eine Defizienz von TMEM55B führte in allen untersuchten Neuronen zu einer Akkumulation von Lysosomen im Axon Initial Segment (AIS) und in der *pre axonal exclusion zone* (PAEZ). Dieser Phänotyp war mit einer Degeneration von Axonen verbunden. Der gleiche Phänotyp wurde in JIP4-defizienten Neuronen beobachtet. Dies deutet auf eine

gemeinsame Rolle von TMEM55B und JIP4 innerhalb des neuronalen Transportes von Lysosomen hin. Die Akkumulation der Lysosomen im AIS und der PAEZ kann jedoch nicht mit dem bisherigen Verständnis des TMEM55B-abhängigen retrograden Transports von Lysosomen erklärt werden. Möglich ist, dass TMEM55B in Neuronen nicht nur am retrograden im Zellkörper stattfindenden Transport, sondern auch an einem anterograden in den Axonen stattfindenden Transport von Lysosomen und einem damit zusammenhängenden Wechsel von anterograden und retrograden Motorproteinen beteiligt ist. Obwohl die Akkumulation der Lysosomen unter TMEM55B-defizienten Bedingungen in allen untersuchten Neuronen und somit auch in Motoneuronen detektiert wurde, zeigten Mäuse im Alter von acht Monaten keine Veränderungen in ihrer Motorik und bei weiteren Verhaltenstests. Auch wurde keine veränderte Expression von lysosomalen Genen und keine deutlich veränderte Aktivität lysosomaler Hydrolasen im Gehirn detektiert. Daraus lässt sich ableiten, dass TMEM55B unter physiologischen Bedingungen eine Rolle im Transport von Lysosomen in Neuronen spielt, diese aber offenbar nicht ausgeprägt genug sind die Vitalität und das Verhalten von Mäusen zu beeinflussen.

Summary

TMEM55B is a lysosomal transmembrane protein that is involved in diverse cellular processes. Initially TMEM55B was described as a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-4-phosphatase, but recently additional functions were revealed, like cholesterol homeostasis, mTORC1 signalling and the retrograde transport of lysosomes. TMEM55B interacts with the cytosolic protein JIP4. Combined they mediate the binding of lysosomes to the motor-protein complex dynein/dynactin, which retrogradely transports lysosomes alongside microtubules within the cell.

In the present study, the role of TMEM55B in the retrograde transport of lysosomes was confirmed in over-expression experiments of TMEM55B. Though, knockout- and knockdown-experiments of TMEM55B showed contradictory results by comparison to the so far published data. It was published that TMEM55B-deficient cells show peripheral accumulating lysosomes. Because of this discrepancy the question came up, if and how retrograde lysosomal transport is hierarchically regulated.

Moreover, S-palmitoylation was investigated as a posttranslational modification of TMEM55B. Its function in lysosomal trafficking of TMEM55B was analysed. It was shown that TMEM55B is S-palmitoylated at several cysteine residues. Both mutation of all cysteine residues as well as mutation of particular single cysteine residues led to a retention of TMEM55B in the Golgi-apparatus. However, there was no correlation found between a potential palmitoylation of the mutated cysteine residues and their ability to retain TMEM55B in the Golgi. The transport of TMEM55B to lysosomes is also mediated by an N-terminal located di-leucine motif, which interacts with adaptor-protein complexes. The mutation of this sorting motif resulted in a missorting to the plasma membrane of both wild type and Golgi-retained TMEM55B mutants. This proves a role of the di-leucine motif and also potentially of adaptor-protein complexes in the retention of TMEM55B in the Golgi-apparatus.

Another focus of this thesis was the analysis of the physiologic function of TMEM55B. Particular the role of TMEM55B in the lysosomal transport in neurons was investigated on the basis of mouse models and isolated primary neurons. A knockout of TMEM55B led to an accumulation of lysosomes in the axonal initial segment (AIS) and the pre axonal exclusion zone (PAEZ) of neurons. This phenotype was linked to a degeneration of axons. The same phenotype was observed in conditional JIP4-knockout neurons. This indicates a common function of TMEM55B and JIP4 in the transport of lysosomes in neuronal cells. However, the accumulation of the lysosomes within the AIS and PAEZ could not be explained by the current knowledge of TMEM55B-mediated retrograde transport of lysosomes. It is possible that TMEM55B not only mediates retrograde transport of lysosomes in the cell body of neurons,

but is also involved in the anterograde transport of lysosomes within the axons. Furthermore, it is likely, that a TMEM55B-dependent switch of anterograde and retrograde motor protein complexes takes place in the AIS and PAEZ at the lysosomal surface. While the accumulation of lysosomes was observed in all neurons, including motor-neurons, no altered motor-function and behaviour was detected in eight month old mice. In addition, no altered expression of lysosomal genes and no significant changes in activity of lysosomal hydrolases were identified in murine brain. Altogether, TMEM55B has a role in neuronal transport of lysosomes. Though this function of TMEM55B is apparently not required for vitality and the behaviour of mice.

1. Einleitung

1.1. Lysosomen

Die Lysosomen wurden erstmals 1955 von Christian de Duve als Membran-umschlossene zelluläre Organellen beschrieben, die Hydrolasen mit einem Aktivitätsoptimum im sauren pH-Bereich aufwiesen (De Duve, Pressman, Gianetto, Wattiaux, & Appelmans, 1955). Nach mehr als 60 Jahren Grundlagenforschung ist weiterhin bekannt, dass Lysosomen von einer Lipiddoppelschicht vom Zytosol abgegrenzt sind, mehr als 60 Enzyme und Cofaktoren beinhalten und einen pH-Wert von 4,5 bis 5,5 aufweisen. Das Lysosom ist das zelluläre Kompartiment, das überwiegend für den Abbau von Makromolekülen in deren Grundbestandteile zuständig ist. Neben den löslichen luminalen Proteinen wie z.B. Proteinasen, Peptidasen, Phosphatasen, Nukleasen, Glycosidasen, Sulfatasen und Lipasen, sind die Lysosomen durch eine Reihe von Membranproteinen charakterisiert (Eskelinen, Tanaka, & Saftig, 2003). Die hoch glycosylierten *lysosomal integral membrane proteins* (LIMPs) und *lysosomal associated membrane proteins* (LAMPs) bilden die Gruppe der abundantesten Membranproteine. Daneben gibt es weitere Membranproteine, die z.B. Protonen aus dem Zytosol in das Lumen der Lysosomen pumpen, um den sauren pH zu generieren, die Ionen zum Erhalt des Membranpotentials austauschen, die Produkte der lysosomalen Degradation der Zelle bereitstellen, die Positionierung der Lysosomen innerhalb der Zelle regulieren und die Kommunikationsplattform für Signalwege des Anabolismus und Katabolismus in der Zelle bilden. Zum Schutz vor ihrem eigenen potentiellen Abbau sind die meisten lysosomalen Membranproteine komplex glykosyliert (Fukuda, 1991; Schwake, Schroder, & Saftig, 2013).

1.2. Lysosomen als „Recycling-Center“

Eine zentrale Funktion der Lysosomen ist der Abbau von biologischen Polymeren in ihre einzelnen Bestandteile, wie z.B. Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Polysaccharide. Die Makromoleküle können auf unterschiedlichen Wegen ins Lysosom gelangen. Jeder Weg erfüllt dabei eine spezifische Funktion (**Abb. 1**). So werden z.B. zytosolische Bestandteile und zu degradierende Organellen über Makroautophagie zu den Lysosomen transportiert. Extrazelluläre Bestandteile werden mittels Endozytose und Pinozytose aufgenommen und gelangen über den endozytotischen Weg zu den Lysosomen. Mikroorganismen können als Abwehrmechanismus über Phagozytose aufgenommen werden, um nach Fusion mit Endosomen und Lysosomen dort degradiert zu werden. Die generierten Abbauprodukte

Einleitung

können anschließend für biosynthetische Prozesse oder Energiegewinnung verwendet oder über Exozytose von der Zelle ausgeschieden werden (Perera & Zoncu, 2016).

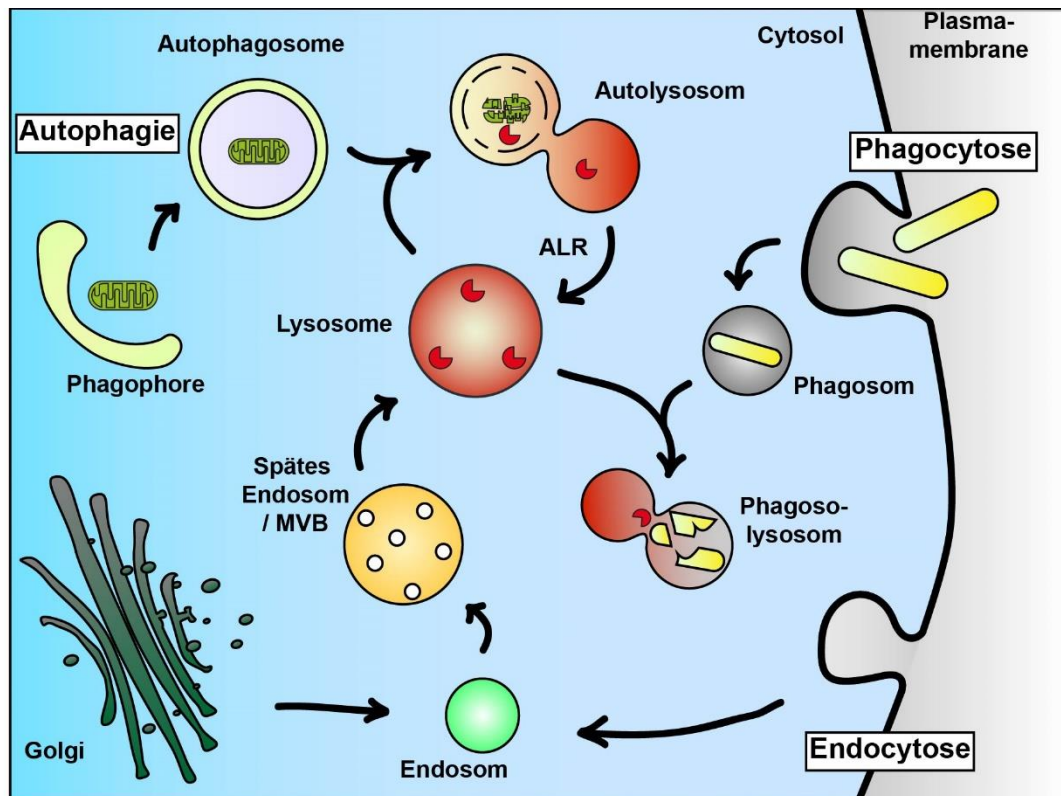


Abb. 1 Schematische Darstellung des endolysosomalen Systems.

Das degradative Zentrum des endolysosomalen Systems sind die Lysosomen. Abzubauendes Material erreicht die Lysosomen über unterschiedliche Wege. Extrazelluläre Bestandteile oder Pathogene werden endocytotiert oder phagozytiert und über Endosomen oder Phagosomen zu den Lysosomen transportiert. Intrazelluläre Bestandteile werden während der Autophagie durch eine Phagophore umschlossen und erreichen über Autophagosomen die Lysosomen. Verändert nach (Perera & Zoncu, 2016).

1.2.1. Endozytose

Als Endozytose wird ein Prozess bezeichnet, bei dem extrazelluläre Komponenten wie Flüssigkeiten, Nährstoffe oder auch Bestandteile der Plasmamembran durch Invagination aufgenommen und über endosomale Vesikel in der Zelle verteilt werden (Abb. 1). Dabei wird Endozytose in drei Arten unterteilt, die sich in der Größe der endocytotierten Vesikel und auch der daran beteiligten Proteine unterscheiden: Clathrin-vermittelte Endozytose, Calveolin/Flotillin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose (Kaksonen & Roux, 2018; Lim & Gleeson, 2011). In der Clathrin-vermittelten Endozytose werden erst durch transient gebundene Proteine die zu endocytotierenden *Cargos* sortiert. Anschließend wird die Membran abhängig von Clathrin geformt und Vesikel abgeschnürt. Die durch Calveolin/Flotillin-vermittelte Endozytose beginnt mit der Calveolin abhängigen Ausbildung von

Einleitung

Membraneinstülpungen, den Calveolen. Eine Anhäufung von *Cargo* in den Calveolen führt zu einer *Src-family* Kinase und Dynamin-abhängigen Destabilisierung und Abschnürung der Calveolen zu Endosomen (Sverdlov, Shajahan, & Minshall, 2007). Makropinozytose ist auch eine Clathrin unabhängige, aber von Aktin-vermittelte Wellung der Plasmamembran, die durch Wachstumsfaktoren ausgelöst wird. Einige der so gebildeten Lamellipodien können sich so falten, dass sie wieder mit der Plasmamembran fusionieren und im inneren der Zelle Makropinosomen bilden, die zu Endosomen reifen (Hansen & Nichols, 2009). In frühen Endosomen werden die aufgenommenen Bestandteile geordnet, wobei sich entscheidet, ob sie zurück an die Plasmamembran transportiert oder final degradiert werden sollen. Durch Ubiquitylierung markierte Membranproteine werden abhängig vom *Endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) in intraluminalen Vesikel partitioniert, wobei *multivesicular bodies* (MVB)/ späte Endosomen entstehen (Henne, Stenmark, & Emr, 2013). Durch weitere Fusionsprozesse mit Endosomen, lysosomalen Hybridorganellen und Lysosomen schreitet die Reifung der späten Endosomen zum Lysosom voran und das aufgenommene *Cargo* wird degradiert.

1.2.2. Phagozytose

Die endozytische Aufnahme von extrazellulären Partikeln und Pathogenen wird Phagozytose genannt. Pathogene werden durch Rezeptoren auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran von spezialisierten Zellen, den Phagozyten, erkannt und gebunden (Brubaker, Bonham, Zanoni, & Kagan, 2015). Nach der Aufnahme des Pathogens in einem Phagosom unterläuft das Phagosom eine Reifung, vergleichbar mit der von frühen zu späten Endosomen (**Abb. 1**). Am Ende der Reifung steht die Bildung eines Phagolysosoms durch Fusionsprozesse mit Lysosomen (Desjardins, Huber, Parton, & Griffiths, 1994; Desjardins, Nzala, Corsini, & Rondeau, 1997). Die Inaktivierung des Pathogens erfolgt dann durch die lysosomalen Hydrolasen, antimikrobielle Peptide und reaktive Sauerstoffspezies (Kissing, Saftig, & Haas, 2018).

1.2.3. Makroautophagie

Makroautophagie (im späteren nur Autophagie) ist ein Prozess, in dem zytosolische Bestandteile und auch ganze Organellen, die dysfunktional sind oder nicht mehr benötigt werden, durch eine Doppelmembran umschlossen werden und den Lysosomen zur Degradierung zugeführt werden (**Abb. 1**). Initiiert wird Autophagie durch eine Inhibition des *mechanistic Target of Rapamycin Complex 1* (mTORC1) Komplexes (siehe unten), der im aktiven Zustand Teile eines Komplexes aus *Unc-51 like autophagy activating kinase* (ULK1),

Einleitung

FIP200 und *Autophagy-related 13* (ATG13) durch Phosphorylierung inhibiert (Hara et al., 2008; Hosokawa et al., 2009). Unter Hungerbedingungen ist mTORC1 inaktiv und der ULK1 Komplex kann an der ER Membran den Phosphatidylinositol-3-phosphat-Kinase (PI(3)P-Kinase) Komplex für die Generierung von PI(3)P rekrutieren (Itakura & Mizushima, 2010). Die so gebildete Subdomäne wird Omegasom genannt. An diese lokal gebildeten PI(3)P kann *WD-repeat protein Interacting with Phospholinositides 2* (WIPI2) binden und den *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (im weiteren nur noch LC3)-Konjugations Komplex, bestehend aus ATG5, ATG12, ATG16 und ATG3 rekrutieren (Dooley et al., 2014). Der Komplex führt dann zu einer Lipidierung und einer dadurch bedingten Assoziierung von zytosolischem LC3-I durch Phosphatidylethanolamin, genannt LC3-II, welches zu einer Krümmung und Expansion der Membran führt (Fujita et al., 2008; Kabeya et al., 2000). Das Omegasom bildet so die Plattform für die Ausbildung einer Isolationsmembran (IM), die auch Phagophore genannt wird (**Abb. 1**). Die Phagophore umschließt in der Folge teils unspezifisch, teils durch sqstm1/p62 und weitere Autophagie-Rezeptoren spezifisch markierte zytosolische Bestandteile (Komatsu et al., 2007; Pankiv et al., 2007). Es bildet sich ein Autophagosom, das sich durch eine Doppelmembran auszeichnet. Die Reifung des Autophagosoms beinhaltet eine Vielzahl von SNARE-abhängigen Fusionsprozessen mit Endosomen, die u.a. die v-ATPase zur Ansäuerung des Lumens liefern. Diese Vesikel werden Amphisomen genannt (in **Abb. 1** nicht gezeigt). Schlussendlich fusionieren Amphisomen mit Lysosomen (Zhao & Zhang, 2019). Die so entstandenen Autolysosomen beinhalten lysosomale Hydrolasen, einen sauren pH-Wert und eine nahezu vollständig degradierte innere Membran der autophagosomalen Doppelmembran (Zhao & Zhang, 2019).

Der finale Schritt der Autophagie ist die *Autophagic lysosome reformation* (ALR), ein Prozess, der die lysosomale Homöostase aufrecht erhält. Während der Autophagie fusionieren eine große Anzahl von Autophagosomen mit Lysosomen, sodass bei andauernder Autophagie zu einem gewissen Zeitpunkt alle freien Lysosomen aufgebraucht wären. ALR stellt die Zahl der freien Lysosomen während der Autophagie wieder her (Yu et al., 2010). Inhibition von mTORC1 unter Hungerbedingungen führt zur Aktivierung der Autophagie. Unter anhaltender Autophagie kommt es zu einer Reaktivierung des mTORC1, gefolgt von einer Ausbildung von Tubuli an Autolysosomen, an denen kleine Vesikel abgeschnürt werden, die sogenannten Proto-Lysosomen (Rong et al., 2011; J. Zhang et al., 2016). Die Ausbildung der Tubuli ist abhängig von Clathrin und *Adaptor Protein 2* (AP2), die von PIP5K gebildetes PI(4,5)P₂ in Mikrodomänen des Autolysosoms anreichern. Das Motorprotein *Kinesin family 5B* (KIF5B) bindet direkt an PI(4,5)P₂ und bildet durch Ziehen Tubuli aus (Du et al., 2016; Rong et al., 2012). An den Spitzen der ausgebildeten tubulären Strukturen wird durch eine weitere Phosphatidylinositolkinase, PIP5K1A, erneut PI(4,5)P₂ gebildet (Rong et al., 2012). Das Abschnüren der Proto-Lysosomen wird durch die GTPase *Dynamain 2* (DNM2) und eine

Einleitung

modifizierte Version der Proteinmaschinerie, die auch für Clathrin-abhängige Endozytose zuständig ist, vorangetrieben (Schulze et al., 2013). Die Proto-Lysosomen weisen anfänglich einen neutralen pH-Wert und lysosomale Membranproteine auf, jedoch keine luminalen löslichen Proteine. Während der Entwicklung zu reifen Lysosomen erlangen die Proto-Lysosomen den sauren pH-Wert und die lysosomalen Hydrolasen (Chen & Yu, 2017; Yu et al., 2010).

1.3. Lysosomen als zentrale Plattform für zelluläre Signalwege

Nachdem Lysosomen anfänglich nur im Kontext des degradierenden und speichernden Organells gesehen wurden, zeigten sich in den letzten zehn Jahren immer mehr Funktionen in Signalwegen, die den zellulären Metabolismus regulieren. Einer dieser Signalwege beinhaltet als zentrale Serin/Threonin Kinase den *mechanistic Target of Rapamycin Complex 1* (mTORC1), bestehend aus den drei Kernkomponenten mTOR, *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor) und *mammalian lethal with SEC13 protein 8* (mLST8). mTORC1 verknüpft in der Zelle Anabolismus und Katabolismus, in dem er die Verfügbarkeit von Aminosäuren und Energielevel misst und entsprechend Protein- und Lipidbiosynthese und Autophagie reguliert (Saxton & Sabatini, 2017). Die Aktivierung von mTORC1 erfolgt über zwei Achsen. Zum einen wird mTORC1 zu Lysosomen rekrutiert. Die Rekrutierung von mTORC1 an das Lysosom wird durch einen Super-Komplex reguliert, der aus der v-ATPase, dem Aminosäuretransporter *Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9* (SLC38A9) und dem Regulator-Rag Komplex besteht. Dieser Superkomplex detektiert Aminosäuren im lysosomalen Lumen sowie im Zytosol und rekrutiert mTORC1 in Abhängigkeit der vorhandenen Aminosäuren. Zum anderen muss der Aktivator von mTORC1, *Ras homolog enriched in brain* (Rheb), zum Lysosom rekrutiert und aktiviert werden (Angarola & Ferguson, 2019; Lamming & Bar-Peled, 2019).

1.3.1. Funktionen von mTORC1

Der mTOR Komplex 1 reguliert abhängig von den oben beschriebenen Signalen das Zellwachstum über die Proteinbiosynthese, den Metabolismus von Lipiden, Nukleotiden und Glucose sowie die Degradation und die Wiederverwertung von zellulären Bestandteilen (Zusammengefasst in (Saxton & Sabatini, 2017)).

Die Proteinbiosynthese wird beeinflusst, indem aktives mTORC1 direkt die *Ribosomal protein 26 kinase beta-1* (S6K1) phosphoryliert. Zu den Substraten von S6K gehören *eukaryotic translation initiation factor 4B* (eIF4B), ein positiver Regulator der 5'Cap abhängigen

Einleitung

Translation und *S6K1 Aly/REF-like target* (SKAR), das die Effizienz der Translation von gesplittenen mRNAs erhöht (Holz, Ballif, Gygi, & Blenis, 2005; Ma, Yoon, Richardson, Julich, & Blenis, 2008). Weiterhin inhibiert mTORC1 durch Phosphorylierung *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1) und ermöglicht eine Dissoziation von eIF4E, das anschließend 5'Cap-abhängige Translation ermöglicht (Gingras et al., 1999). Einfluss auf den Lipidmetabolismus nimmt mTORC1 durch das *Sterol responsive element binding protein* (SREBP), abhängig von S6K oder Lipin1, einem Inhibitor von SREBP (Duvel et al., 2010; Peterson et al., 2011). SREBP selbst initiiert anschließend die Fettsäure- und Cholesterolsynthese (Porstmann et al., 2008). Den Abbau und die Wiederverwertung von zellulären Bestandteilen steuert mTORC1 sowohl durch die oben beschriebene Inhibition des ULK1/FIP200/ATG13 Komplexes, der Autophagie initiiert, als auch durch eine Inhibition des Transports des *Transcription factors EB* (TFEB) in den Nukleus (Settembre et al., 2012). TFEB reguliert dabei die Expression von Genen, die das *Coordinated Lysosomal Expression and Regulation* (CLEAR) Motiv aufweisen. Diese Gene kodieren für eine Vielzahl von Proteinen, die an der Biogenese von Lysosomen und Autophagie beteiligt sind (Palmieri et al., 2011). Die hier beschriebenen Substrate und Regulationsmechanismen von mTORC1 zeigen nur Beispiele einer viel komplexeren Maschinerie, die Zellwachstum in Abhängigkeit von äußeren und inneren Einflüssen reguliert und die Lysosomen als zentrale Plattform benötigt.

1.4. Intrazellulärer Transport von Proteinen zu Lysosomen

Die Sortierung von neu synthetisierten löslichen lysosomalen Proteinen und lysosomalen Membranproteinen in Lysosomen ist fundamental für die Biogenese und Funktion von Lysosomen. Lösliche Proteine werden von Rezeptoren anhand von Glykanmodifikationen erkannt und gebunden. Die Rezeptoren vermitteln zusammen mit einer Transportmaschinerie die Sortierung der löslichen luminalen Proteine in die Lysosomen. Lysosomale Membranproteine können selbst mit der Transportmaschinerie interagieren und so vom ER über den Golgi-Apparat und Endosomen zu der lysosomalen Membran transportiert werden.

1.4.1. Sortierungsrezeptoren für lösliche luminal lysosomale Proteine

Die Rezeptoren, die lösliche Proteine in das Lumen von Lysosomen sortieren, teilen sich strukturelle Ähnlichkeiten. Sie besitzen eine einzelne Transmembrandomäne, eine große luminal Domäne, welche die Interaktion mit dem *Cargo* vermittelt und in ihrem zytosolischen C-Terminus lysosomale Sortierungssignale, die den Transport von dem Rezeptor mit dem gebundenen *Cargo* in die Lysosomen vermitteln (Bajaj et al., 2019). Die Sortierungsrezeptoren unterscheiden sich jedoch in der Art, wie sie ihr *Cargo* binden. Die Mannose-6-Phosphat

Einleitung

Rezeptoren (M6PR) erkennen lösliche Proteine an einer Glykanmodifikation, einem Mannose-6-phosphat (M6P). Die Modifizierung der zu sortierenden Proteine beginnt Ko-translational im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit einer N-Glykosylierung, die im Golgi-Apparat zum M6P-Signal modifiziert wird (Braulke & Bonifacino, 2009). Im Trans-Golgi werden die M6P-modifizierten Proteine bei einem neutralen pH-Wert von M6PRs gebunden, in Endosomen sortiert und dort bei einem leicht sauren pH-Wert von 5 bis 6 freigesetzt. Der anterograde Transport der M6PRs mit ihrem gebundenen *Cargo* wird über *Golgi-localized, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation factor (ARF)-binding proteins* (GGAs) vermittelt. GGAs erkennen Dileucin-Motive im zytosolischen C-Terminus der M6PRs (Puertollano, Aguilar, Gorshkova, Crouch, & Bonifacino, 2001). Nachdem die M6PRs ihr *Cargo* in Endosomen entlassen haben, werden sie zurück zum Golgi transportiert (Zusammengefasst in (Bajaj et al., 2019)). LIMP2 und Sortillin erkennen ihr *Cargo* hingegen anhand von kurzen gefalteten Polypeptidsequenzen innerhalb der Proteine, wobei eine generelle Konsensussequenz bisher nicht bekannt ist (Bajaj et al., 2019; Blanz et al., 2010).

1.4.2. Sortierung von lysosomalen Membranproteinen

Lysosomale Membranproteine werden hauptsächlich über Tyrosin-basierte (NPXY oder YXX Φ) oder Dileucin-basierte Motive ([DE]XXXL[LI] oder DXXLL), die in den zytosolischen Domänen der Membranproteine lokalisiert sind, mittels Clathrin-beschichteten Vesikeln (*Clathrin-coated Vesicles* (CCV)) und Adaptor Proteinen (AP) oder GGAs zu Lysosomen transportiert. Der Transport kann dabei entweder direkt über den endosomalen Weg vom Trans-Golginetzwerk (TGN) über frühe und späte Endosomen zu den Lysosomen oder indirekt aus dem TGN zur Plasmamembran und von dort durch Internalisierung zu Endosomen und schließlich in die Lysosomen erfolgen (Zusammengefasst in (Bajaj et al., 2019; Braulke & Bonifacino, 2009)). Die Bildung von CCVs für die Sortierung der lysosomalen Membranproteine beginnt mit der Rekrutierung von AP zum TGN durch die Interaktion mit *ADP-ribosylation factors* (ARFs) und Phosphatidylinositolphosphaten (PIPs). Die AP interagieren mit den Sortierungssignalen in den zytosolischen Domänen der zu transportierenden Membranproteine und veranlassen die Polymerisierung von Clathrin. Es folgt eine Krümmung der Membran und ein Abschnüren von Clathrin-beschichteten Vesikeln, die angereichert mit den zu transportierenden Membranproteinen sind (Canagarajah, Ren, Bonifacino, & Hurley, 2013). Für den Transport zwischen unterschiedlichen Membranen sind verschiedene AP von Bedeutung. An dem Transport von Proteinen zwischen TGN und Endosomen ist besonders AP-1 beteiligt, für den Transport von Membranproteinen von der Zellmembran zu Endosomen spielt AP-2 eine Rolle und AP-3 reguliert den Transport zwischen frühen und späten Endosomen (Zusammengefasst in (Bonifacino & Traub, 2003)). Die Entfernung der

Einleitung

Sortierungssignale der Transmembranproteine zur Membran ist wahrscheinlich ausschlaggebend für eine Interaktion mit den AP. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Transmembranprotein Mucolipin-1 ein N- und ein C-terminales Dileucinmotiv aufweist. Das C-terminale Dileucinmotiv ist dabei weiter von der Membran entfernt, als es bei den meisten lysosomalen Membranproteinen mit Dileucinmotiv üblich ist. Es wurde für dieses Dileucinmotiv beschrieben, dass eine Annäherung zur Membran durch reversible Palmitoylierung von Cysteinen in der Nähe des Dileucinmotivs erreicht wird, potentiell eine Interaktion mit AP stattfinden kann und so eine Regulation des Transportes von Mucolipin-1 ermöglicht wird (Vergarajauregui & Puertollano, 2006).

1.5. S-Palmitoylierung

S-Palmitoylierung ist eine reversible posttranslationale Modifikation, bei der eine gesättigte C16 Fettsäure durch Veresterung an die Thiolgruppe des zyttoplasmatischen Restes eines Cysteinrestes gebunden wird (Chamberlain & Shipston, 2015). In Säugetieren wird die S-Palmitoylierung von Enzymen aus einer Familie aus 23 *Transmembran Zinc Finger DHHC (Asp-His-His-Cys)-containing protein acyltransferasen* und die Spaltung des Palmitylrestes vom Cystein durch Thioesterasen katalysiert (Chamberlain & Shipston, 2015). S-Palmitoylierung ermöglicht die reversible Assoziierung von löslichen Proteinen an Membranen und für Transmembranproteine die Änderung des chemischen Verhaltens innerhalb und an der Membran. In Eukaryoten können auch Serin-, Threonin- und Lysinresten palmitoyliert, die als Ester (O-Palmitoylierung) oder Amid gebunden (N-Palmitoylierung) vorliegen (Thinon & Hang, 2015). Im Menschen wurde für 12% des Proteoms eine Palmitoylierung gezeigt oder zumindest vorhergesagt (Blanc et al., 2015). Auch wenn in Proteinen bisher keine eindeutige Konsensussequenz für Palmitoylierung gezeigt werden konnte, bestehen weiterhin Bemühungen, verlässliche Algorithmen zur Vorhersage von putativen Palmitoylierungsstellen zu erstellen (Kumari, Kumar, & Kumar, 2014; Y. X. Li, Shao, & Deng, 2011; J. Ren et al., 2008).

Die Funktionen der Palmitoylierung sind divers. So ist Palmitoylierung an der Regulation der subzellulären Verteilung und dem Transport von Proteinen beteiligt. Palmitoylierung organisiert Proteine in Lipiddomänen, hat Einfluss auf die Stabilität von Proteinen, reguliert Protein-Protein Interaktionen und ist Teil von Signalwegen (Zusammengefasst in (Charollais & Van Der Goot, 2009) und (Daniotti, Pedro, & Valdez Taubas, 2017)).

1.6. Phosphatidylinositole

Phosphatidylinositole (PIP) sind eine Familie der Phosphoglyceride, bei denen der Inositolrest in den Positionen drei, vier und fünf einzeln, doppelt oder dreifach phosphoryliert vorliegen kann. Sie bilden eine kleine Gruppe der Membranlipide von Zellen, die auch nur in geringer Häufigkeit vorkommen und unterliegen einer kontrollierten und dynamischen Synthese, Fluktuation und Umwandlung zwischen den unterschiedlich phosphorylierten PIPs. Sie prägen die Identität der Membran, dienen als Plattformen für die Bindung von Proteinen und verbinden Prozesse in der Membran mit zellulären Signalwegen. Bisher sind im menschlichen Organismus 90 verschiedene Kinasen und Phosphatasen bekannt, die PIPs ineinander umwandeln (Ebner, Koch, & Haucke, 2019).

In der lysosomalen Membran sind hauptsächlich PI(3)P, PI(3,5)P₂ und PI(5)P vorzufinden, doch auch geringe Mengen von PI(4)P und PI(4,5)P₂ sind dort lokalisiert (Wallroth & Haucke, 2018). Die Funktion der PIPs in Lysosomen reicht von der Regulation von Signalwegen über lysosomale Positionierung, Cholesterintransport innerhalb der Membran und ALR bis hin zur Fusion von Autophagosomen und Lysosomen (Ebner et al., 2019).

1.7. Transmembran Protein 55 A und B (TMEM55A und B)

Transmembrane protein 55A (TMEM55A) und TMEM55B sind paraloge Proteine mit einer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz im Menschen von 51%. Beide Proteine sind jeweils in allen Säugetieren hoch konserviert und weisen eine ubiquitäre mRNA Expression auf (Ungewickell et al., 2005). Die humane Form von TMEM55A ist 257 Aminosäuren lang, die humane Form von TMEM55B besitzt 277 Aminosäuren. Beide weisen in der Vorhersage der Struktur einen langen, zytosolischen N-terminus, zwei putative Transmembrandomänen mit einer kurzen Verbindungsschleife (~10-15 Aminosäuren) und einen kurzen, zytosolischen C-Terminus auf (**Abb. 2**).

TMEM55A und TMEM55B wurden initial als die ersten Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat-4-phosphatasen in Säugetieren beschrieben (Ungewickell et al., 2005). Sie wurden in einem systematischen Suchverfahren nach homologen Proteinen des Virulenzfaktors BopB aus *Burkholderia pseudomallei* als Proteine mit konserviertem, putativem CX₅R Phosphatase-Motiv gefunden. *In vitro* wurde für beide rekombinanten Proteine eine Phosphataseaktivität für PI(4,5)P₂ am 4-Phosphat gezeigt, jedoch für keines der anderen PIPs (Ungewickell et al., 2005). Es wurde unter Überexpressionsbedingungen und für TMEM55B auch endogen eine Lokalisation der Proteine in späten Endosomen und Lysosomen gezeigt (Ungewickell et al., 2005). In einer Folgestudie zeigte die Arbeitsgruppe von Majerus und Ungewickell, dass TMEM55B unter DNA-schädigenden Stressbedingungen in den Zellkern transportiert wird und

Einleitung

dort die PI(5)P-Level erhöht, was zu einer Stabilisierung des Tumorprotein p53 durch Acetylierung führt und schließlich Apoptose zur Folge hat (Zou, Marjanovic, Kisseleva, Wilson, & Majerus, 2007). Anzumerken ist jedoch, dass in anderen Studien die Phosphataseaktivität von TMEM55A und B nicht reproduziert werden konnte (Takemasu et al., 2019; Willett et al., 2017).

In einer Studie, in der Expressionsdaten von 480 Lymphoblastoid Zelllinien auf Korrelation mit dem Expressionslevel der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR) als Marker für eine genetische Regulation der zellulären Cholesterin Homöostase untersucht wurden, tauchte TMEM55B als ein bisher unbekannter Kandidat des Cholesterin Metabolismus auf (Medina et al., 2014). Es wurde gezeigt, dass die Expression von TMEM55B von den Sterol-abhängigen Transkriptionsfaktoren SREBF1 und SREBF2 reguliert wird. Auch wurde gezeigt, dass TMEM55B den intrazellulären Transport des *Low density lipoprotein receptor* (LDLR) zwischen der Plasmamembran und Endosomen beeinflusst und somit die Cholesterinlevel in der Zelle regulieren soll (Medina et al., 2014).

In einer jüngst erschienenen Studie wurde eine Funktion von TMEM55B unabhängig von der initial gezeigten PIP-Phosphataseaktivität gezeigt (Willett et al., 2017). Es wurde eine Interaktion von dem in Lysosomen lokalisierten TMEM55B mit dem *JNK-interacting protein* (JIP4) nachgewiesen, einem zytosolischen Protein, das zahlreiche Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht. JIP4 führt zusammen mit TMEM55B zu einer Kopplung der Lysosomen an den Motorproteinkomplex Dynein/Dynactin, der einen retrograden Transport der Lysosomen entlang der Mikrotubuli vermittelt (**Abb. 2**). Dieser retrograde Transport findet auch unabhängig vom *Ras-related protein 7* (RAP7) / *Rab-interacting lysosomal protein* (RILP) Komplex statt, der auch Lysosomen zum Minus-Ende von Mikrotubuli transportiert (Jordens et al., 2001; Willett et al., 2017).

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression von TMEM55B unter Aminosäure-armen Bedingungen von dem Transkriptionsfaktoren TFEB und unter Sterol-armen Bedingungen von SREBF2 abhängig ist (Medina et al., 2014). Unter den genannten Hungerbedingungen erhöht sich die Expression von TMEM55B und es erfolgt ein verstärkter Transport von Lysosomen zu einer perinukleären Lokalisation (Willett et al., 2017).

Hashimoto *et al.* zeigten, dass TMEM55B den mTORC1-Signalweg moduliert. In einer Analyse des Interaktom von FLAG markiertem TMEM55B in Neuro2A Zellen fanden sie diverse Proteine aus dem mTORC1-Signalweg, davon mehrere Untereinheiten der v-ATPase, die Untereinheiten des RAGULATOR/Rag-Komplexes LAMTOR1, LAMTOR3 und RagC, und auch mTOR selbst. Eine Deletion von TMEM55B führte zu einer geringeren Reaktivierung von mTORC1 durch Aminosäuren. Die Ursache dafür liegt im mTORC1-Signalweg oberhalb der Regulation der mTORC1-Rekrutierung an Lysosomen durch RagA/C. Weiter zeigten sie, dass

Einleitung

TMEM55B in Detergenz-resistenten Microdomänen der Membran (DRMs) mit LAMTOR1 und der Membran-integralen V_0 -Domäne der v-ATPase interagiert und die Assemblierung der V_0 -Domäne mit der zytosolischen V_1 -Domäne der v-ATPase reguliert. Da die v-ATPase an der Reaktivierung von mTORC1 beteiligt ist, schlossen Hashimoto *et al.*, dass TMEM55B über die Assemblierung der v-ATPase Einfluss auf den mTORC1-Signalweg nimmt (Hashimoto, Shirane, & Nakayama, 2018; Zoncu *et al.*, 2011).

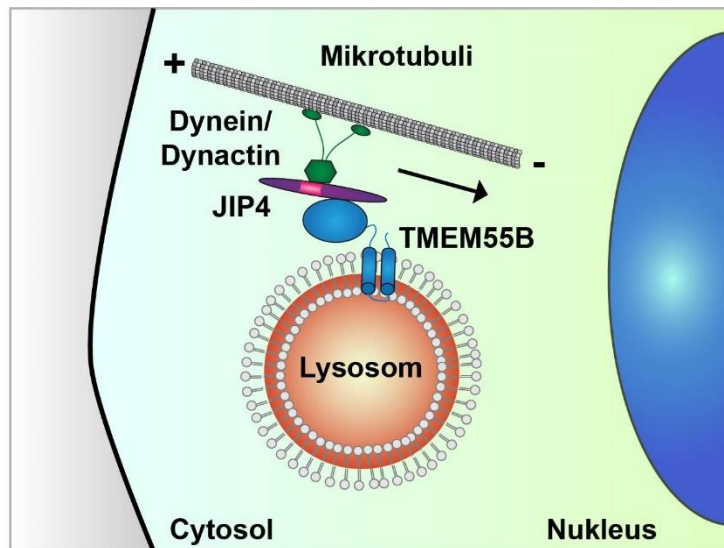


Abb. 2 TMEM55B/JIP4-vermittelter Transport von Lysosomen entlang von Mikrotubuli.

Das lysosomale Membranprotein TMEM55B interagiert mit dem zytosomatischen Protein JIP4, das eine Kopplung an den Motorproteinkomplex Dynein/Dynactin vermittelt. Dynein/Dynactin vermittelt einen retrograden Transport der so gebundenen Lysosomen entlang von Mikrotubuli in Richtung von deren Minus-Ende in Proximität des Nukleus. Abgeändert aus (Willett *et al.*, 2017).

Neben den bislang beschriebenen Regulationsmechanismen von TMEM55B auf der transkriptionellen Ebene, zeigten Takemasu *et al.* auch eine Regulation von TMEM55B auf der posttranslationalen Ebene. So demonstrierten sie eine Phosphorylierung von TMEM55B an Serin 76 und Serin 169 in Makrophagen, die mutmaßlich eine Regulation für die Positionierung der Lysosomen darstellt. Die dafür verantwortliche Kinase ist *Extracellular-signal Regulated Kinases (Erk)/mitogen-activated protein (MAPK)*. Auch wenn es nicht direkt gezeigt wurde, spekulieren die Autoren, dass die Phosphorylierung von TMEM55B einen Einfluss auf die Bindung von JIP4 hat und die Positionierung der Lysosomen so auf Proteinebene reguliert wird (Takemasu *et al.*, 2019).

1.8. Zellulärer Transport von Lysosomen

Da Willet *et al.* eine Rolle von TMEM55B in der Migration von Lysosomen innerhalb der Zelle gezeigt haben (Willett et al., 2017), wird im Folgenden ein kurzer Überblick von bisher bekannten Mechanismen des vesikulären und Mikrotubuli-abhängigen Transports in der Zelle gegeben. Auch wird das Neuron als eine Zelle mit speziellen Anforderungen für lysosomalen Transport vorgestellt.

Der Gleichgewichtszustand der Verteilung von Organellen innerhalb der Zelle ist das Resultat von stark regulierten und hoch dynamischen Transportprozessen. Die Direktion dieser Transportprozesse wird durch das Zytoskelett vermittelt. Kurze Strecken werden entlang des Aktinzytoskeletts von Myosin-Motorproteinen, lange Strecken entlang von Mikrotubuli von Kinesinen und Dynein zurückgelegt. Adapterproteine vermitteln die Bindung der Organellen an die jeweiligen Motorproteine (Bonifacino & Neefjes, 2017).

Mikrotubuli verlaufen in nicht polarisierten Zellen radial von ihren Minus-Enden am juxt nukleär gelegenen Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) zu ihren in der Peripherie gelegenen Plus-Enden. An den polaren Mikrotubuli findet ein bidirektionaler Transport von Vesikeln statt. Dabei vermitteln Kinesine hauptsächlich den anterograden Transport zu den Plus-Enden der Mikrotubuli in der Peripherie der Zelle, Dynein hingegen den retrograden Transport zu den Minus-Enden in das Zentrum der Zelle (Bonifacino & Neefjes, 2017). Der Transport in polaren Zellen wie z.B. Neuronen ist komplexer und abhängig von der Organisation der Mikrotubuli in den entsprechenden Zellen (Britt, Farias, Guardia, & Bonifacino, 2016; Cabukusta & Neefjes, 2018).

An allen bekannten retrograden Transportprozessen von Lysosomen entlang von Mikrotubuli ist das Motorprotein Dynein-1 beteiligt. Zusammen mit dem Multiproteinkomplex Dynactin vermittelt es den Transport von Lysosomen und anderem *Cargo* zu den Minus-Enden der Mikrotubuli (**Abb. 3 A**). Die Rekrutierung des Motorprotein-Komplexes kann dabei variieren. Eine Möglichkeit ist, dass die lysosomale GTPase Rab7 das *Rab-interacting lysosomal proteine* (RILP) zu Lysosomen rekrutiert. Dort bindet RILP an die p150^{glued} Untereinheit von Dynactin und vermittelt so einen Transport der Lysosomen (**Abb. 3 A**) (Johansson et al., 2007; Rocha et al., 2009; S. C. Tan, Scherer, & Vallee, 2011). Andere mit Dynein/Dynactin interagierende Adapterproteine sind der oben beschriebene Komplex aus JIP4 und TMEM55B (**Abb. 2**) sowie ein Komplex aus dem lysosomalen Calciumtransporter *Transient receptor potential mucolipin 1* (TRPML1) und *Apoptosis-linked gene 2* (ALG2) (X. Li et al., 2016; Willett et al., 2017). Das während der Autophagieinitiation gebildete PI(3,4)P₂ aktiviert eine TRPML1-vermittelte lokale Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytosol. Der Calciumsensor ALG2 bildet anschließend einen Komplex mit TRPML1 und Dynein/Dyactin und führt so zu einem retrograden Transport der Lysosomen (**Abb. 3 A**) (X. Li et al., 2016).

Einleitung

Der anterograde Transport von Lysosomen wird über drei bisher bekannte Kombinationen aus Adapterproteinen und Motorproteinen vermittelt. Einer dieser Transportmechanismen wird durch Rab7 initiiert, welches auch am retrograden Transport beteiligt ist. Aktiviertes Rab7 führt zusammen mit PI(3)P zu einer Rekrutierung des *FYVE and coiled-coil (CC) domain-containing protein* (FYCO1), das an Kinesin-1 bindet, sodass ein anterograde Transport der Lysosomen stattfindet (**Abb. 3 B**) (Pankiv et al., 2010). Ein weiterer Transport wird durch den Multiproteinkomplex *BLOC-one-related complex* (BORC) arrangiert. BORC assoziiert peripher mit der lysosomalen Membran und führt zu der Aktivierung der kleinen GTPase *ADP-ribosylation factor-like protein 8B* (Arl8b). Zusammen mit dem Effektorprotein *SifA and kinesin-interacting protein* (SKIP) erfolgt eine Bindung an Kinesin-1 und die Lysosomen werden zum peripheren Plus-Ende der Mikrotubuli transportiert (**Abb. 3 B**) (Pu et al., 2015; Rosa-Ferreira & Munro, 2011). Weiter können BORC und Arl8b, unabhängig von SKIP, auch eine Interaktion mit dem Motorprotein Kinesin-3 eingehen, um einen anterograden Transport zu ermöglichen (**Abb. 3 B**) (Guardia, Farias, Jia, Pu, & Bonifacino, 2016). Der Hauptunterschied zwischen der BORC-vermittelten Migration der Lysosomen durch Kinesin-1 und Kinesin-3 ist sowohl die Lokalisierung der Lysosomen innerhalb der Zelle, als auch die posttranslationalen Modifikationen der für den Transport benötigten Mikrotubuli. Während Kinesin-1 perinukleäre Lysosomen entlang von mit acetyliertem α -Tubulin angereicherten Mikrotubuli bewegt, vermittelt Kinesin-3 den Transport von Lysosomen an peripheren Mikrotubuli, die tyrosiniertes α -Tubulin aufweisen (Guardia et al., 2016).

Die hier vorgestellten Mechanismen des Transports von Lysosomen zeigen eine komplexe Maschinerie, die retrograde und anterograde Migration von Lysosomen ermöglicht. Warum die Zelle verschiedene Komplexe verwendet, ist bisher nicht eindeutig geklärt. So könnte auf unterschiedlichen Populationen von Lysosomen verschiedene Adapterproteine vorhanden sein. Auch können unterschiedliche Reize wie z.B. Nährstoffmangel oder die Verteilung spezifischer Lipide in der Membran verschiedene Transportkomplexe aktivieren oder deaktivieren. Beides scheint jedoch einen Einfluss auf den Transport von Lysosomen innerhalb der Zelle zu haben (Cabukusta & Neefjes, 2018).

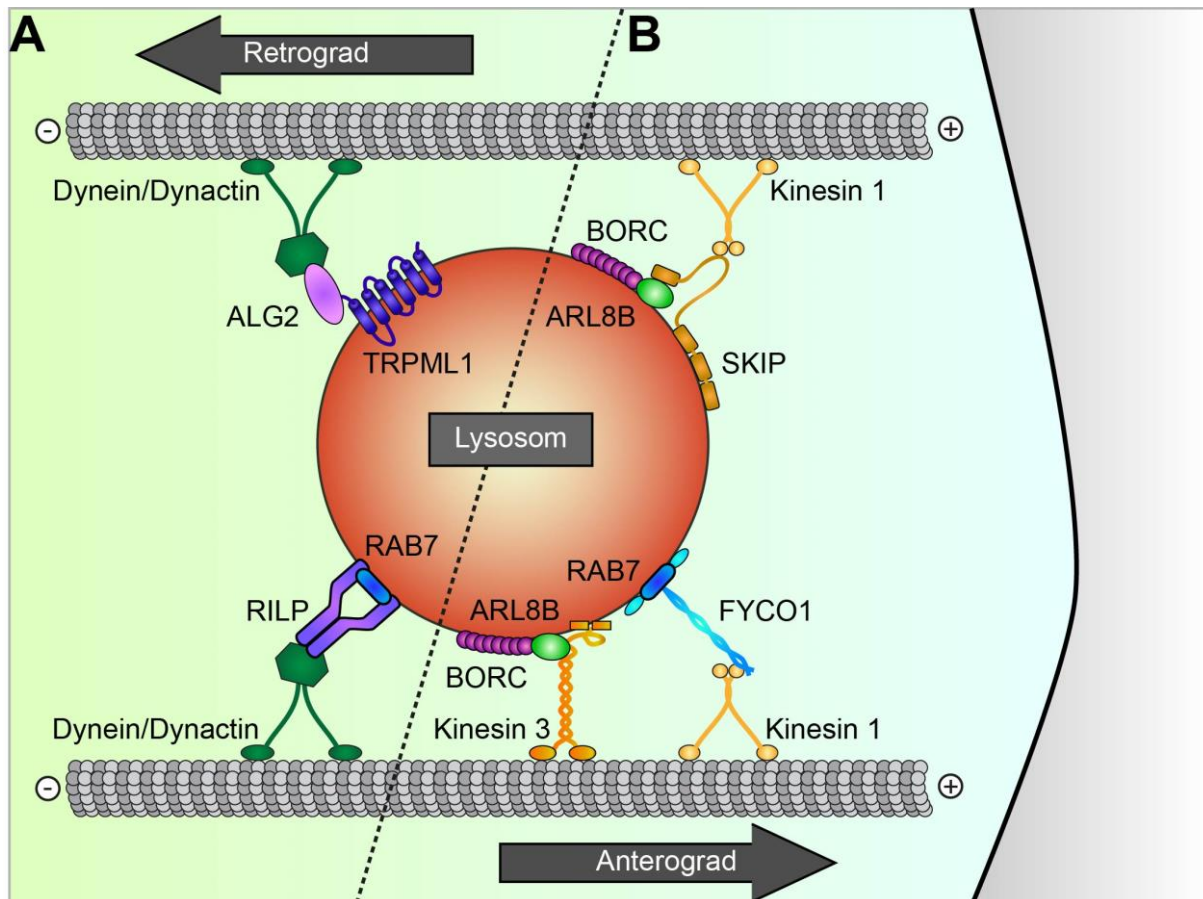


Abb. 3 Übersicht der am Transport von Lysosomen beteiligten Motorproteine und deren Adapter.

(A) Darstellung des am retrograden Transport der Lysosomen beteiligten Proteinkomplexe. Oben gezeigt ist TRPML1, das über ALG2 eine Bindung an Dynein/Dynactin vermittelt. Unten ist dargestellt, wie RAB7 und RILP Dynein/Dynactin binden. Der auch am retrograden Transport beteiligte Komplex aus TMEM55B und JIP4 wird in **Abb. 2** gezeigt. (B) Darstellung der am anterograden Transport von Lysosomen beteiligten Proteinkomplexe. Oben ist die BORG-, ARL8B- und SKIP-abhängige Bindung an Kinesin-1 gezeigt. Unten werden die RAB7- und FYCO1-abhängige Bindung an Kinesin 1 und die BORG-, ARL8B-abhängige an Bindung an Kinesin-3 dargestellt. Abgeändert nach (Ballabio & Bonifacino, 2020).

1.9. Auswirkungen der lysosomalen Lokalisation auf die Zelle

Der Transport und auch die Position von Lysosomen innerhalb der Zelle ist ausschlaggebend für verschiedene zelluläre Funktionen. Nach Induktion von Autophagie werden z.B. in der Peripherie gebildete Autophagosomen und Lysosomen Dynein-abhängig in das Zentrum der Zelle transportiert, wo durch Fusion Autolysosomen entstehen und das *Cargo* degradiert wird (Kimura, Noda, & Yoshimori, 2008; Korolchuk et al., 2011). Weiter wurde beschrieben, dass die Lokalisation von Lysosomen einen Einfluss auf die Azidität der Lysosomen und somit möglicherweise auch auf die Aktivität der lysosomalen Hydrolasen hat. So weisen juxtannukleäre Lysosomen einen geringeren pH-Wert auf, als periphere Lysosomen. Auch die Aktivität von Cathepsin L ist eine höhere, als in peripheren Lysosomen (Johnson, Ostrowski, Jaumouille, & Grinstein, 2016). Der letzte Schritt der Autophagie, die ALR, ist nicht direkt von

Einleitung

der Migration von Lysosomen entlang von Mikrotubuli abhängig, jedoch wird der Verlängerungsprozess der Tubuli, von denen die Proto-Lysosomen abknospen, durch Kinesin-1 getrieben (Du et al., 2016).

Auch auf die Aktivierung von mTORC1 hat die Positionierung der Lysosomen einen Einfluss. So wurde beschrieben, dass eine periphere Lokalisation der Lysosomen zu einer erhöhten mTORC1-Aktivität und einer schnelleren Reaktivierung des Komplexes führt. Dies geschieht mutmaßlich aufgrund von kürzeren Wegen in den Signalkaskaden der plasmamembranständigen Rezeptoren, die mTORC1 abhängig von Wachstumsfaktoren aktivieren. Weiterhin wurde auch der Effekt einer geringeren mTORC1-Aktivität und einer langsameren Reaktivierung von mTORC1 in Zellen mit perinukleären Lysosomen beobachtet (Hong et al., 2017; Jia & Bonifacino, 2019; Korolchuk et al., 2011). Es wurden jedoch auch die gegenteiligen Effekte beschrieben: eine höhere mTORC1 Aktivität in Zellen mit perinukleären Lysosomen und eine geringere mTORC1 Aktivität mit peripheren Lysosomen (Diskutiert in (Jia & Bonifacino, 2019)).

Die Position und Migration der Lysosomen innerhalb der Zelle spielt bei der phagozytotischen Beseitigung von Erregern eine Rolle. Bakterien haben, um der lysosomalen Degradation zu entgehen, Mechanismen entwickelt, in denen sie die Transportmaschinerie der Zelle für Lysosomen unterbrechen und eine Fusion mit Lysosomen verhindern. *Salmonella enterica* besitzt z.B. die zwei Effektoren SopD2 und SifA. SopD2 verhindert die Positionierung von Lysosomen, indem es die Interaktion von Rab7 mit RILP und FYCO1 inhibiert (D'Costa et al., 2015). SifA interagiert mit SKIP und Kinesin-1 und führt zu einem anterograden Transport von abgeschnürten Vesikeln von der *Salmonella* Vakuole (Dumont et al., 2010). Dass Bakterien den Transport von Lysosomen gezielt nutzen, um der Degradation zu entgehen und innerhalb der Zelle zu überleben, verdeutlicht die Relevanz der Lokalisation der Lysosomen und der Migration der Lysosomen innerhalb der Zelle für eine funktionelle Immunabwehr.

1.10. Neurone – Zellen mit besonderen Ansprüchen an den Transport von Lysosomen

Eine besondere Rolle spielt der intrazelluläre Transport von Lysosomen jedoch in Neuronen, die aufgrund ihres Zellkörpers, der Dendriten und des Axons einen asymmetrischen und polaren Aufbau aufweisen. Auch müssen wegen der möglichen Länge des Axons deutlich größere Strecken überwunden werden als in anderen Zelltypen. Im Folgenden soll der generelle Aufbau von Neuronen erläutert werden.

Einleitung

Neuronen sind Zellen des Nervensystems, die auf Erregungsleitung und Erregungsübertragung spezialisiert sind. Ihr struktureller Aufbau wird aus drei unterschiedlichen Kompartimenten gebildet. Einem rundlichen Zellkörper, auch Soma genannt, und zwei unterschiedlichen Zellfortsätzen, den Dendriten und einem Neurit, auch Axon genannt. Die Dendriten sind verästelte und sich verjüngende Zellfortsätze, welche die Kontaktstellen für andere Neuronen bilden und der Signalaufnahme dienen. Das Axon ist ein anfänglich linearer, von Gliazellen umhüllter Zellfortsatz, der sich terminal in unterschiedliche Enden verzweigt und der Signalweiterleitung dient. Auch wenn sich das Soma und die Dendriten in Form und Verteilung der zellulären Bestandteile wie z.B. den Organellen ER und Golgi unterscheiden, werden sie oft gemeinsam als somatodendritische Domäne zusammengefasst. Neurone sind sehr heterogene Zellen und werden je nach Anzahl und Form von Dendriten und dem Axon morphologisch in unipolare, bipolare, multipolare und pseudounipolare Nervenzellen eingeteilt.

Die Kompartimentierung von Neuronen spiegelt sich auch in der Organisation der Mikrotubuli wieder. So unterscheidet sich die Struktur und Polarisierung der Mikrotubuli zwischen Soma, Dendriten und Axon, angepasst an die entsprechende Funktion der Signalaufnahme und Signalweiterleitung des Kompartiments. Mikrotubuli verlaufen im Soma von Neuronen, vergleichbar mit anderen Zellarten, von ihrem Minus-Ende vom *Microtubuli organizing center* (MTOC) zu ihrem Plus-Ende in der Peripherie der Zelle. Im Gegensatz zu anderen Zellarten entspringen jedoch nicht alle Mikrotubuli dem MTOC. So ist es möglich, dass abhängig vom Neuronentyp und Organismus in Dendriten keine einheitliche polare Anordnung von Mikrotubuli vorzufinden ist (Kelliher, Saunders, & Wildonger, 2019). Mikrotubuli mit gleicher Ausrichtung lagern sich in Bündeln zusammen und zeichnen sich durch andere posttranslationale Modifikationen (PTMs) aus, als die in die entgegengesetzte Richtung zeigenden Mikrotubuli. Die unterschiedliche Ausrichtung und die unterschiedlichen PTMs führen zu einer Favorisierung einer entsprechenden Richtung von bestimmten Motorproteinkomplexen (Tas et al., 2017). Im Axon sind die Mikrotubuli uniform angeordnet, beginnend von ihrem Minus-Ende am Anfang des Axons zu ihrem Plus-Ende in Richtung des terminalen Axons (Kelliher et al., 2019) (**Abb. 4**).

Einleitung

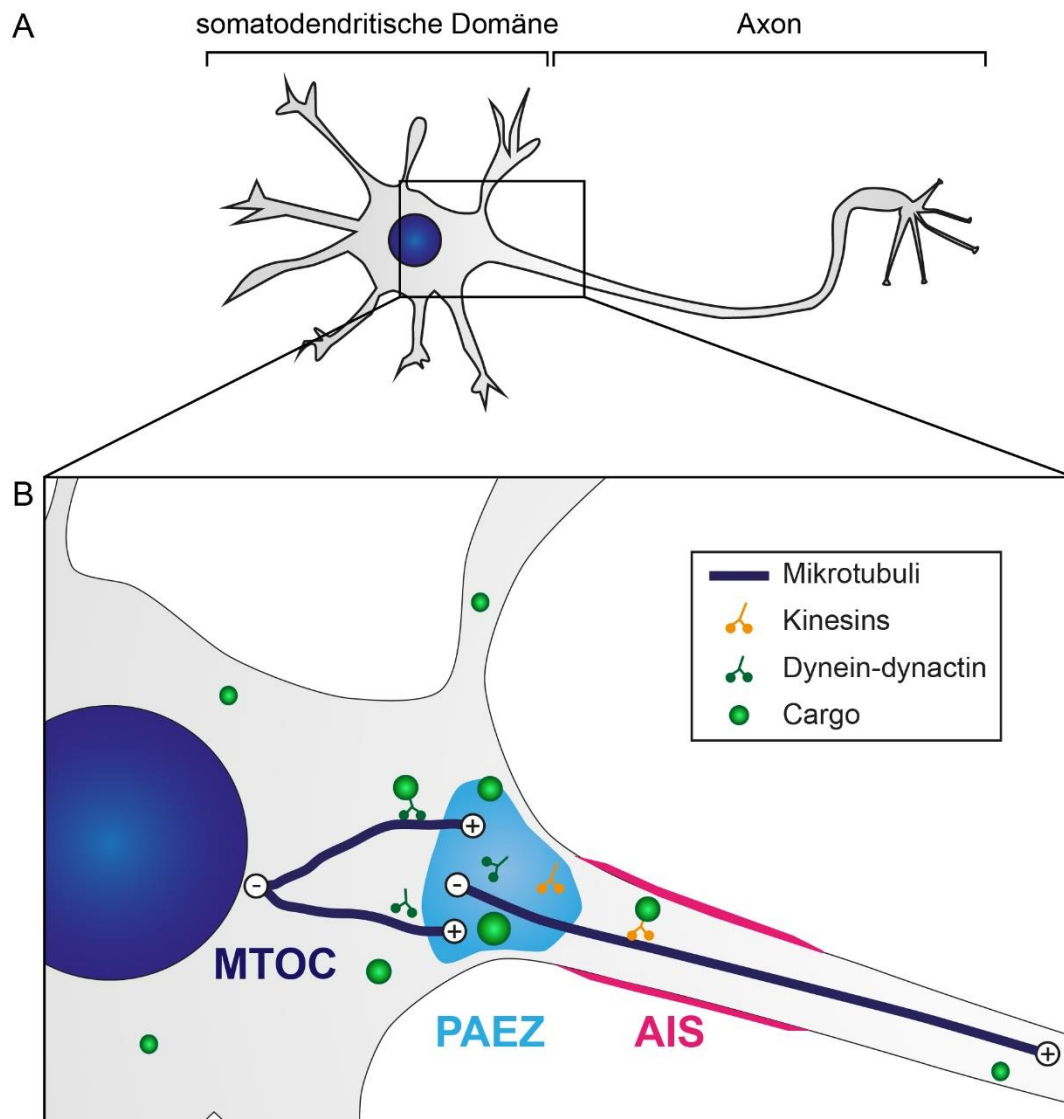


Abb. 4 Schematische Darstellung eines multipolaren Neurons.

(A) Schematische Darstellung der Morphologie eines multipolaren Neurons. Gezeigt sind das Axon und der rundliche Zellkörper (Soma), der zusammen mit den Dendriten die somatodendritische Domäne bildet. (B) Schematische Darstellung der Lage der *Pre-Axonal Exclusion Zone* (PAEZ) und des *Axon Initial Segments* (AIS) sowie der Verteilung von Mikrotubuli innerhalb des PAEZ und AIS. Die PAEZ liegt auf der zytosolischen Seite des Axonhügels. Auf der axonalen Seite folgt das AIS. Mikrotubuli im Axon sind nicht mehr mit dem MTOC verbunden. Kinesin-Motorproteine und Dynein/Dynactin transportieren *Cargo* retro- und anterograd Abgeändert aus (Britt et al., 2016).

Um die polare Organisation der Plasmamembran und der zytoplasmatischen Kompartimente in Neuronen aufrecht zu erhalten, müssen selektive Transport- und Sortierungsprozesse von Organellen und Proteinen zu ihrem Ziel stattfinden. Für Transmembranproteine und Lipide, die entweder nur im Soma oder Axon lokalisiert sind, findet diese Selektion innerhalb des *Axon Initial Segment* (AIS) statt (Abb. 4). Das AIS ist eine Struktur, die meist in den ersten 20 bis 60 μm des Axons liegt und eine einzigartige, geschichtete Organisation von Proteinen aufweist. Natrium- und Kalium-Ionenkanäle binden hier an ein zytosolisches, modulares Komplex aus Ankyrin G und β -IV Spectrin, der die Membranproteine mit den Mikrotubuli und

Einleitung

den ringförmigen Aktinstrukturen im AIS verbindet (zusammengefasst in (Leterrier, 2018)). Die im AIS organisierten Proteine und Lipide bilden für andere Transmembranproteine und Lipide eine Diffusionsbarriere, vergleichbar mit einem „Lattenzaun“ und ermöglichen so die Polarität zwischen somatodendritischer Membran und axonaler Membran (zusammengefasst in (Britt et al., 2016) und (Kusumi et al., 2012)). Weiterhin wird diskutiert, ob das AIS auch als Selektionsfilter für zytoplasmatische Organellen dient, wobei dabei das Aktinzytoskelett im AIS die Rolle einer physikalischen Barriere einnimmt. Dieser Theorie widerspricht jedoch der Befund, dass erste Sortierungen von polar angeordneten Zellbestandteilen in Neuronen vor der Ausbildung des AIS stattfinden (in Gänze diskutiert in (Britt et al., 2016)).

Kürzlich wurde eine weitere Domäne beschrieben, in der somatodendritische Organellen spezifisch in das Axon sortiert werden. Diese Domäne wird als *Pre-axonal exclusion zone* (PAEZ) bezeichnet. Sie befindet sich proximal zum AIS im Axonhügel und zeichnet sich an der Grenze zum Zellkörper durch einen deutlich abfallenden Gehalt an spezifischen somatodendritischen Vesikeln aus sowie durch die Anwesenheit von Proteinen des AIS an der distalen Grenze (**Abb. 4**). Die hier stattfindende Sortierung basiert auf der Bindung des *Cargos* an entsprechende Motorproteine, die das *Cargo* entlang von Mikrotubuli in Richtung Soma oder Axon transportieren (Farias, Guardia, Britt, Guo, & Bonifacino, 2015). Das PAEZ ermöglicht ein Modell, in dem statt oder zusätzlich zu einer physikalischen Barriere die polare Sortierung von zytosolischem *Cargo* in Neuronen durch eine spezifische Interaktion des *Cargos* mit Motorproteinen erreicht wird (Britt et al., 2016).

Nicht nur die Interaktion zwischen *Cargo* und Motorproteinen hat in der PAEZ einen Einfluss auf die Sortierung von Vesikeln, sondern auch die Interaktion zwischen Motorproteinen und spezifischen Mikrotubuli, die sich in den PTMs und Mikrotubuli assoziierenden Proteinen (MAPs) unterscheiden. So bindet z.B. Kinesin-1 bevorzugt an Mikrotubulibündel, die reich an GTP-Tubulin und acetyliertem Tubulin sind, und vom PAEZ bis ins Axon reichen (Farias et al., 2015; Nakata, Niwa, Okada, Perez, & Hirokawa, 2011). Die posttranslationale Modifizierung der Mikrotubuli könnte somit ein weiterer Mechanismus sein, um Motorproteine, und mit ihnen auch deren gebundener *Cargo*, erst ins PAEZ und anschließend in das Axon selbst zu rekrutieren und zu transportieren. Es wird sogar über einen allgemein gültigen „MAP-PTM-Kinesin Code“ diskutiert, der jedoch aufgrund der diversen beteiligten Proteine bei weitem nicht aufgeklärt ist (Atherton, Houdusse, & Moores, 2013; Britt et al., 2016; J. S. Liu et al., 2012).

2. Zielsetzung

Lysosomen sind membranumschlossene Organellen und beteiligt an einer Vielzahl von zellulären Prozessen. Sie dienen der Degradierung und dem Recycling von Makromolekülen und Organellen sowie als Plattform für zelluläre Signalkaskaden, die Anabolismus und Katabolismus regulieren. Die Positionierung der Lysosomen innerhalb der Zelle ist dabei von besonderer Bedeutung für ihre Funktion. Der Transport der Lysosomen wird über verschiedene Ankerproteine vermittelt. Eines dieser Ankerproteine ist das lysosomale Transmembranprotein TMEM55B.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Zell- und Maus-basierten Modellen die Funktion von Lysosomen unter TMEM55B-defizienten Bedingungen untersucht, um Rückschlüsse auf eine generelle Funktion von TMEM55B zu ziehen. Insbesondere in Neuronen ist der Transport von Lysosomen angesichts ihrer polaren Struktur und beachtlichen Größe von besonderer Bedeutung. Es sollte untersucht werden, ob und wie TMEM55B am Transport von Lysosomen in Neuronen beteiligt ist, was für Auswirkungen eine Defizienz von TMEM55B auf die Funktion von Lysosomen in Neuronen hat und ob neurologische Prozesse und das Verhalten von Mäusen unter diesen Umständen verändert sind. Ein zweiter Fokus dieser Arbeit lag auf der Analyse einer posttranslationalen Modifikation, genauer einer S-Palmitoylierung, von TMEM55B. Die funktionelle Rolle der S-Palmitoylierung von TMEM55B wurde anhand von verschiedenen Mutanten von TMEM55B nach Expression in zellbasierten Systemen genauer untersucht. Da S-Palmitoylierung für den Transport von palmitoylierten Proteine innerhalb der Zelle essentiell sein kann, wurde insbesondere der Transport von TMEM55B zu den Lysosomen analysiert.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, Carl Roth, AppliChem oder Merck mit einem Reinheitsgrad von *pro analysi* (p.a.) erworben.

3.1.2. Antikörper

Tab. 1 Auflistung der verwendeten primären Antikörper.

Antigen		Wirt	Verdünnung	Quelle
Ankyrin G	Monoklonal	Maus	1:500 (IF)	NeuroMAb #75-146
β-actin	Polyklonal	Kaninchen	1:2000 (WB)	Sigma-Aldrich #A2066
Cathepsin D	Polyklonal	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Prof Dr Stefan Höning (Universität Köln) #sII10
CD63	Polyklonal	Kaninchen	1:300 (IF)	Eurogentec
Flotillin	Monoklonal	Maus	1:2000 (WB)	BD #610820
GAPDH	Polyklonal	Kaninchen	1:4000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology #sc- 25778
GOLGA2	Polyklonal	Kaninchen	1:300 (IF)	Abnova #H00002801- D01P
Golgin97	Monoklonal	Maus	1:300 (IF)	Thermo Fisher #A- 21270
HA	Monoklonal	Ratte	1:2000 (WB) 1:300 (IF)	Sigma-Aldrich #3F10
JIP4	Monoklonal	Kaninchen	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology #5519
LAMP-1	Monoklonal	Ratte	1:300 (IF)	DSHB #1D4B
LAMP-2	Monoklonal	Ratte	1:2000 (WB)	DSHB #AbI93
hLAMP2	Monoklonal	Maus	1:2000 (WB) 1:300 (IF)	DSHB #H4B4
LAMTOR1	Monoklonal	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology #8975

Material und Methoden

LIMP2	Polyklonal	Kaninchen	1:2000 (WB) 1:300 (IF)	Pineda Antibody Service #L2T2 (Zunke et al., 2016)
LC3	Polyklonal	Kaninchen	1:2000 (WB) 1:300 (IF)	MBL #PM036
mTOR	Monoklonal	Kaninchen	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology #2983
NaK-ATPase	Monoklonal	Maus	1:2000 (WB)	Millipore #05-369
NeuN	Monoklonal	Maus	1:300 (IF)	Millipore #MAB377
NPC1	Monoklonal	Kaninchen	1:2000 (WB)	Abcam #ab134113
PI(4,5)P2	Monoclonal	Maus	1:100 (IF)	echelon® Z-P045
p62	Polyklonal	Kaninchen	1:2000 (WB)	EnzoLife Science #BHL-PW-9860
p70S6K	Monoklonal	Kaninchen	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology #9202
Phospho-p70S6K (Thr389)	Monoklonal	Kaninchen	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology #9205
TMEM55A	Polyklonal	Kaninchen	1:500 (WB)	Pineda Antibody Service
TMEM55B	Polyklonal	Kaninchen	1:500 (WB)	Pineda Antibody Service
TMEM55B	Polyklonal	Kaninchen	1:4000 (WB) 1:300 (IF)	Proteintech #23992-I-AP
Transferrinrezeptor	Polyklonal	Kaninchen	1:2000 (WB)	Abcam #ab84036

Tab. 2 Auflistung der im Immunoblot verwendeten sekundären Antikörper.

Antikörper	Gebunden an	Wirt	Verdünnung	Quelle
α-Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	1:15000	Dianova #111-035-144
α-Maus	Meerrettich-Peroxidase	Schaf	1:15000	Dianova #515-035-062

Material und Methoden

α-Ratte	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	1:15000	Dianova #112-035- 143
α-Kaninchen	IRDye® 800CW	Esel	1:10000	LiCore® #926-32213

Tab. 3 Auflistung der für die Immunfluoreszenz verwendeten sekundären Antikörper.

Antikörper	Gebunden an	Wirt	Verdünnung	Quelle
α-Kaninchen	AlexaFluor®488, 594,647	Esel	1:500	Thermo Fisher: A21206, A21207, A31573
α-Kaninchen		Ziege	1:500	Thermo Fisher: A11034, A11037, A21245
α-Maus		Esel	1:500	Thermo Fisher: A21202, A21203, A31571
α-Maus		Ziege	1:500	Thermo Fisher: A11029, A11032, A21236
α-Ratte		Esel	1:500	Thermo Fisher: A21208, A21209, A21447
α-Ratte		Ziege	1:500	Thermo Fisher: A11006, A11007, A21247

3.1.3. Enzyme

Tab. 4 Auflistung der verwendeten Enzyme.

Enzym	Quelle
BamHI	Thermo Fisher Scientific
DPN1	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq™ DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
HindIII	Thermo Fisher Scientific
Phusion DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Roche
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific
XbaI	Thermo Fisher Scientific

3.1.4. Oligonukleotide

Tab. 5 Liste der Primer für Genotypisierung.

Primer	Sequenz 5'-3'
Tmem55a fwd	GCCACTTACCGTAGCTTCAT
Tmem55a rev	CCACCTCCGTATACAGCCAT
Tmem55b fwd	CTTCGTTGCAGACACCACAT
Tmem55b rev	CCCTTGACTAGCCCGGATAG

3.1.5. siRNA

Tab. 6 Auflistung der verwendeten siRNAs.

Ziel der siRNA	Name	Quelle
Humanes TMEM55B	Silencer™ Select	Thermo Fisher Scientific #s40499
Negativ Kontrolle	Silencer™ Select	Thermo Fisher Scientific #4390843

3.1.6. Plasmide und Expressions-Konstrukte

Tab. 7 Auflistung der verwendeten Expressions-Konstrukte.

Plasmid	Insert	Referenz
pcDNA3.1/Hygro +	LAMTOR1-HA	Konstrukte wurden im Verlauf dieser Doktorarbeit generiert
pcDNA3.1/Hygro +	TMEM55A-HA	
pcDNA3.1/Hygro +	TMEM55A-HA LL/AA	
pcDNA3.1/Hygro +	TMEM55B-HA	
pcDNA3.1/Hygro +	TMEM55B-HA LL/AA	
pcDNA3.1/Hygro +	TMEM55B-HA diverse Cysteinrest-Mutanten	
pcDNA3.1/Hygro +	TMEM55B-HA „NoCys“	Synthetisiert durch GeneScript, Niederlande
pEGFP-N1	PH-PLCD1-GFP	(Varnai & Balla, 1998)

3.1.7. Protein und DNA Standards

Tab. 8 Auflistung der verwendeten Standards.

Standard	Quelle
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific

3.1.8. Kits

Tab. 9 Auflistung der verwendeten Kits.

Kit	Quelle
ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey Nagel
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific

3.1.9. Bakterien-Stämme

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden *Escherichia coli* XL1-bue Bakterien verwendet.

Genotyp:

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]

3.1.10. Transgene Mausstämme

Tab. 10 Auflistung der verwendeten transgenen Mausstämme.

Mausstamm	Mutation	Generiert durch
<i>Tmem55a</i>	Deletion von 8 Nukleotiden in Exon 2 von <i>Tmem55a</i> .	Radislav Sedlacek Czech Centre for Phenogenomics (BIOCEV/IMG)
<i>Tmem55b</i>	Deletion von 4 Nukleotiden in Exon 2 von <i>Tmem55b</i> .	Radislav Sedlacek Czech Centre for Phenogenomics (BIOCEV/IMG)

3.1.11. Zelllinien

Tab. 11 Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
Hela	Humane Zervixkarzinom-Zellen	DMSZ
MEF Cathepsin D^{-/-}	Maus embryonale Fibroblasten die mit dem <i>SV40 large T antigene</i> immortalisiert wurden	(Saftig et al., 1995)
MEF TMEM55B WT	Maus embryonale Fibroblasten	Diese Zellelinien wurden im Verlauf dieser Arbeit generiert
MEF TMEM55B KO	Maus embryonale Fibroblasten	
MEF Ctrl	Maus embryonale Fibroblasten die mit dem <i>SV40 large T antigene</i> immortalisiert wurden	
MEF TMEM55A & TMEM55B knockout	Maus embryonale Fibroblasten die mit dem <i>SV40 large T antigene</i> immortalisiert wurden	

3.1.12. Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur

Tab. 12 Auflistung der für die Zellkultur verwendeten Medien und Zusätze.

Medien und Zusätze	Quelle
Accutase	Sigma-Aldrich
Bafilomycin A1	Calbiochem
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)	Sigma-Aldrich
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies
Torin 1	Cayman Chemicals
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Life Technologies
2BP	Sigma-Aldrich

3.1.13. Häufig verwendete Pufferlösungen

Tab. 13 Auflistung einiger häufig verwendeter Pufferlösungen.

Puffer	Inhaltsstoffe
„Eindeckel“-Medium für Immunofluoreszenz	1x PBS pH 7,4 17% w/v Mowiol 4-88 33% (v/v) Glycerol 20mg/mL 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)
<i>lysogeny broth</i> (LB) Medium	1% Trypton/Pepton (w/v) 1% NaCl (w/v) 0.5% Yeast extract pH 7.0
LB Agar	1.5% Agar-agar in LB medium
Phosphate buffered solution (PBS)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ 1.4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
Phosphate Buffer (PB)	19% (v/v) 0.2 M NaH ₂ PO ₄ 81% (v/v) 0.2 M Na ₂ HPO ₄ pH 7.4
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	2 mM Tris/HCl 5,5% (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0
Tris-buffered saline (TBS)	13,7 mM NaCl 0,27 mM 2,5 mM Tris Base pH 7,4

3.1.14. Zusätzliche Materialien

Tab. 14 Auflistung zusätzlicher Materialien.

Material	Quelle
Magnetische G-Protein gekoppelte Dynabeads	Thermo Fisher Scientific
Maleimide- Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich
Thiosepharose Beads	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenyl β-D-glucuronide	Sigma-Aldrich

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Generierung von elektrokompetenten *Escherichia coli*

Die Internalisierung von Plasmid-DNA durch *Escherichia coli* (*E. coli*) kann mit elektrischen Impulsen stimuliert werden. Dafür müssen *E. coli*s in einer Lösung mit einer geringen Leitfähigkeit vorbereitet werden. *E. coli* XL1-blue wurden auf LB-Agar mit 20 mg/mL Tetracyclin ausgestrichen. Eine Kolonie wurde in 50 mL LB-Medium mit 20 mg/mL Tetracyclin überführt und über Nacht (ü/N) bei 37°C als Vorkultur kultiviert. 20 mL der Vorkultur wurden am nächsten Tag in einen Liter LB-Medium mit 20 mg/mL Tetracyclin überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD) zwischen 0,5 und 0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden für 15 min bei 31000xg und 4°C pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde zweimal mit je 250 mL eiskaltem vollentsalzten Wasser (VE-Wasser) und einmal in 100 mL 10% (v/v) Glycerollösung gewaschen und bei 2210xg für 20 min bei 4°C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in vier Milliliter 10% (v/v) Glycerollösung aufgenommen und Aliquots von 50 μ L abgefüllt und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.2. Transformation von elektrokompetenten *E. coli*

Zur bakteriellen Vervielfältigung von Plasmiden wurden elektrokompetente *E. coli* Bakterien mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Dazu wurden 0,1 bis 1 μ g DNA (maximal in 3 mL) zu einem Aliquot von eiskalten elektrokompetenten *E. coli* Bakterien gegeben und in eine vorgekühlte Küvette überführt. Mit einem Elektroporator wurde die Zellmembran mit einer Spannung von 2,5 kV permeabilisiert (C=25 μ F und R=400 Ω). Die Bakterien wurden anschließend in 1 mL 37°C warmes LB-Medium überführt und für 30 bis 60 min auf 37°C inkubiert. Abhängig von der weiteren Verwendung wurden die Bakterien unterschiedlich verdünnt auf LB-Agar Platten mit Plasmid-abhängigem Antibiotikum ausgestrichen.

3.2.3. Aufreinigung von Plasmid DNA aus XL-1 *blue E. coli*

E. coli Bakterien wurden mit einem endsprechenden Plasmid transformiert und ausplattiert. Davon wurde ein Einzelklon in 2,5 mL („Mini“) oder 200 mL („Midi“) LB-Medium mit einem Antibiotikum entsprechend zu einer Resistenz auf dem Plasmid überführt und vervielfältigt. Die Bakterien wurden pelletiert und entsprechend der Protokolle der Kits PureYield™ Plasmid Midiprep System (für Midis) oder GeneJet Plasmid Miniprep Kit (für Minis) weiterverarbeitet. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser eluiert.

3.2.4. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA oder RNA wurde photometrisch mit einem Synergy HT (BioTek) *Microplate-Reader* gemessen. Dafür wurde das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm verwendet. Eine mögliche Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen wurde bei 280 nm gemessen. Dabei sollte die Ratio von A_{260}/A_{280} zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

3.2.5. Mutagenes PCR

Um Mutationen in Plasmid DNA einzuführen, wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Dabei wird ausgenutzt, dass bakteriell vervielfältigte DNA methyliert wird und durch eine PCR vervielfältigte DNA nicht. Methylierte DNA kann mit dem Restriktionsenzym DPN1 gezielt abgebaut werden. So bleibt nur die in der PCR amplifizierte Plasmid DNA mit der eingeführten Mutation erhalten. Dafür wurden ungefähr 33 bp große Primer erstellt, in deren Mitte die einzuführende Mutation vorhanden war. Mit diesen Primern und dem entsprechenden Ausgangs-Plasmid wurde die folgende PCR durchgeführt.

Tab. 15 Auflistung der Bestandteile des Mutagenese-PCR Reaktionsansatzes.

	Volumen
5x GC oder HF Puffer	10 µL
dNTPs	6,25 µL
DMSO	1,5 µL
10 µM Primer forward	1 µL
10 µM Primer reverse	1 µL
50 ng/µL Plasmid	1 µL
Phusion Polymerase	0,75 µL
H₂O	Ad 50 µL

Tab. 16 Programm der Mutagenese-PCR.

	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 sek	34x
Annealing	54-64°C	30 sek	
Elongation	72°C	195 sek (2000 bp/min)	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Ende	4°C	∞	

Anschließend wurde das Ausgangs-Plasmid verdaut. Dazu wurde in die Lösung 1 µL DPN1 zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dabei verdaut DPN1 bakteriell vervielfältigte und dabei methylierte DNA, nicht aber die während der PCR generierte DNA. Danach wurden Bakterien mit dem Produkt der verdauten DNA elektrophoretisch transformiert und auf Platten ausgestrichen. Es wurden einzelne Klone nach Insertion der Mutation analysiert und von positiven Klonen Midipreps erstellt.

3.2.6. RNA-Extraktion aus murinen Gehirnen

Um RNA aus Gehirnen zu isolieren, wurden gefrorene halbe Gehirne in flüssigem Stickstoff zu Pulver zermahlen. Das homogenisierte Gehirn wurde als Ausgangsmaterial für einer RNA-Extraktion nach den Anweisungen des Protokolls des NucleoSpin® RNA Plus Kits der Macherei Nagel verwendet.

3.2.7. cDNA Synthese

Komplementäre DNA (*complementary DNA* (cDNA)) wurde mit Hilfe des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* nach Anweisung des Protokolls synthetisiert. 1-2 µg RNA wurden zusammen mit „*Random hexamer*“ Primern (Thermo Fisher Scientific) für die Synthese verwendet.

3.2.8. RNA-Sequenzierung

Die quantitative RNA-Sequenzierung und Auswertung wurde von Robert Häsler vom Institut der klinischen Molekularbiologie der CAU-Kiel angeleitet und durchgeführt.

3.2.9. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von Plasmid DNA oder DNA-PCR-Produkten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proben wurden mit 6xDNA *loading dye* (Thermo Fisher Scientific) versetzt, um die Dichte der Proben zu erhöhen und um die Migration der Proben im

Material und Methoden

Agarose-Gel zu visualisieren. Agarose-Gele wurden mit 1x TAE-Puffer mit einer Konzentration von 1-3% (w/v) Agarose und 500 ng/mL Ethidiumbromid erstellt. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophorese-Gelkammer in 1x TAE Puffer durch das Anlegen einer Spannung von 120 V und zeitlich in Abhängigkeit der Größe des zu analysierenden DNA-Produkts. Als Größenmarker wurde der *100 bp Plus DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die DNA konnte aufgrund des Ethidiumbromids durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda=312$ nm sichtbar gemacht und mit dem Gel Jet Imager (Intas®) dokumentiert werden.

3.2.10. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Klonierung von Expressionsplasmiden wurden DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen aufgereinigt. Dies erfolgte nach dem Protokoll des verwendeten *High Pure PCR-Purification Kit* von Roche.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Allgemeine Zellkultur

Arbeiten mit Zellen wurden mit sterilen Materialien unter biologischen Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Alle Zellen wurden zum Erhalt bei 37°C und 7,5% CO₂ Luftgehalt gelagert. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen in DMEM mit 10% fetalen Kälberserum (FCS) inkubiert. Zur Passagierung wurden die Zellen zweimal wöchentlich je nach Zelllinie bei einer Konfluenz von 80-100% einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA oder Accutase bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, bis die Zellen sich ablösten. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und je nach Bedarf 1:5 bis 1:25 ausgesät. Primären Zellen wurde 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt, um eine bakterielle Kontamination zu unterbinden.

3.3.2. Kryokonservierung von Zellen

Zum Erhalt von Zelllinien wurden diese wie beschrieben abgelöst (3.3.1) und für 5 min bei 220xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in DMEM/20% FCS/10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren und anschließend in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung der Zellen wurden sie aufgetaut, in vorgelegtes DMEM/10% FCS Medium überführt und bei 220xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in entsprechende Volumina DMEM/10% FCS ausgesät und wie beschrieben weiter kultiviert (3.3.1).

3.3.3. Isolation von primären Maus embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Zur Isolation von Maus embryonalen Fibroblasten wurden tragende Mäuse an Tag 13,5 *post coitum* euthanasiert und der Uterus in eine Petrischale mit PBS überführt. Jeder Embryo wurde von der Plazenta und der Fruchtblase getrennt und in eine neue Petrischale mit PBS überführt. Die Köpfe der Embryos wurden entfernt und für eine spätere Genotypisierung verwendet. Weiter wurden alle roten Organe entfernt. Die übrigen Organe wurden in einer 3,5 mL Zellkulturschale in 2 mL Trypsin/EDTA zerkleinert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Organe mit einer 1 mL Pipette resuspendiert und in 12 mL 37°C warmes DMEM/10%FCS/1%Pen/Strep aufgenommen und bei 200xg für 5 min sedimentiert. Das Zellpellet von je einem Embryo wurde in 10 mL DMEM/10%FCS/1%Pen/Strep aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und bei 37°C und 7,5% CO₂ Luftgehalt bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

3.3.4. Isolation von primären Neuronen

Tab. 17 Auflistung der für die Isolation von primären Neuronen verwendeten Puffer.

Puffer	Inhalt
HBSS -/-	HBSS ohne bivalente Kationen
Ausplattierungsmedium	DMEM 10% FCS 1% Pen/strep
Wachstumsmedium	Neurobasal A 1x B27 4mM Glutamax 1mM NatriumPyruvat
Beschichtungspuffer	100 µg/mL Poly-L-Lysin (PLL) 0,15 M Borat pH 8,5

Zur Kultivierung von primären murinen Neuronen wurden die *Cortex cerebri* von 1 bis 3 Tage alten Mäusen präpariert und in 450 µL eiskaltem HBSS -/- gesammelt. Es wurde 50 µL Trypsin mit einer Endkonzentration von 0,025% Trypsin zugegeben und für 15 min bei 37°C mit zwischenzeitlichem Mischen inkubiert. Die *Cortices* wurden zweimal mit 500 µL HBSS -/- bei RT gewaschen und mittels Kanülen (erst 20 G, dann 26 G) durch je 3-5 wiederholtes auf- und abpipettieren in 1 mL warmen Ausplattierungsmedium vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Tryphanblau gezählt, mit Ausplattierungsmedium in die gewünschte Konzentration verdünnt (80000 Zellen/mL pro 12 Well) und auf PLL beschichtete Deckgläschen ausgesät. In Wartezeiten wurden die Zellen stets bei 37°C gelagert. Die

Material und Methoden

ausgesäten Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert, sodass sie sich absetzten. Anschließend wurde das Medium mit Wachstumsmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden an Tag 7 der Differenzierung mit 4% PFA fixiert und für die Immunfluoreszenz verwendet (3.3.7).

Beschichtung der Deckgläschen:

Deckgläschen wurden für 4 h bei RT mit Beschichtungspuffer inkubiert und anschließend viermal mit Wasser und einmal mit HBSS -/- gewaschen. Beschichtete und gewaschene Deckgläschen können bis zu einer Woche gelagert und genutzt werden.

3.3.5. Transiente Transfektion von Zellen

Zur transienten Expression von Proteinen in Zellen wurden diese mittels Polyethylenimin (PEI) mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Je nach Zelllinie und Maßstab wurden 1 bis 5 µg Plasmid in 300-1000 µL DMEM only mit der 2,5 fachen Menge an PEI vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde auf die mit DMEM/10%FCS bedeckten Zellen getropft. Nach 4 h wurde das Medium mit DMEM/10%FCS gewechselt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen nach 24 h weiterverarbeitet.

3.3.6. siRNA-vermittelter *knockdown*

Um einen transienten *knockdown* von Proteinen in Zellen einzuführen, wurden diese mit Lipofectamine und einer siRNA, die gegen das Gen von Interesse gerichtet war, transfiziert. Dafür wurden für 6-Well Format in Reaktionsgefäßen 150 µL DMEM mit 9 µL Lipofectamine und 150 µL DMEM mit 3 µL 10 µM siRNA-Lösung vorgelegt und anschließend vermischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 250 µL der Lösung auf die Zellen geträufelt. An Versuchstag 1 und 3 wurde transfiziert, die Ernte und Analyse der Zellen erfolgte an Tag 5.

3.3.7. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Zur mikroskopischen Analyse von Proteinen in Zellen wurde eine indirekte Färbung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden Zellen auf Deckgläschen in 6 Well Schalen ausgesät und je nach Versuch behandelt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 20 min in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, für 5 min in 0,2% Saponin in PBS permeabilisiert. Für 10 min wurde in 0,2% Saponin/0,12% Glycin in PBS das übrige PFA abreagiert und danach wurden die Zellen einmal mit 0,2% Saponin gewaschen und für eine Stunde in 10% FCS/0,2% Saponin in PBS blockiert. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten zeigend auf einen 30 µL großen Tropfen von in 10% FCS/0,2% Saponin in PBS gelöstem primären Antikörper ü/N inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen

mit den Zellen fünfmal in 0,2% Saponin in PBS gewaschen und in sekundären Antikörper in 10% FCS/0,2% Saponin in PBS inkubiert, fünfmal mit 0,2% Saponin in PBS und zweimal mit Wasser. Zuletzt wurden die Deckgläschen kopfüber mit Mowiol/Dapco/Dapi auf Objektträgern fixiert.

3.3.8. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von PIPs

Tab. 18 Auflistung der für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von PIPs verwendeten Puffer.

Puffer	Inhalt
Puffer A	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 20 mM Pipes pH 6,8
Blockierpuffer	Puffer A 5% Normal Goat Serum (NGS) 50 mM NH ₄ Cl 0,5% Saponin
AK-Puffer	Puffer A 5% Normal Goat Serum (NGS) 0,1% Saponin

Zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung von PIPs wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden für 15 min bei RT fixiert, indem auf ein Volumen Medium das gleiche Volumen PBS/8% Formaldehyd/0,4% Glutaraldehyd gegeben wurde, sodass eine Endkonzentration von 4% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd erreicht wurde. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 50 mM NH₄Cl in PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden mit eisgekühlten Lösungen auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in einem zusammengefassten Schritt für 45 min in Blockierpuffer blockiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen in AK-Puffer zusammen mit primärem Antikörper für 1 h inkubiert, gefolgt von zwei Waschschritten mit Puffer A. Die Zellen wurden für 45 min mit sekundärem Antikörper in AK-Puffer inkubiert und viermal mit Puffer A gewaschen. Anschließend wurde eine weitere Fixierung mit 2% Formaldehyd in PBS für 10 min auf Eis und für 5 min bei RT durchgeführt, dreimal mit 50mM NH₄Cl in PBS und einmal entionisiertem Wasser gewaschen. Die Deckgläschen wurden kopfüber mit Mowiol/Dapco/Dapi auf Objektträgern fixiert.

3.3.9. Bestimmung des Autophagieflusses in Zellen

Um den Ablauf der Autophagie zu untersuchen, wurde der Autophagiefluss bestimmt. Dafür wurden Zellen zur Induktion der Autophagie das Serum und die Aminosäuren für 2 h entzogen. Dies wurde durch Inkubation in *Earles Balanced Salt Solution* (EBSS) erreicht. Auch wurde zusätzlich die lysosomale Degradation durch Zugabe von 100 μ M des v-ATPase Inhibitor Bafilomycin A1 gehemmt. Der Autophagiefluss wurde anschließend per Immunoblot (3.4.1, 3.4.12, 3.4.13) aus dem Verhältnis von LC3-II und GAPDH bestimmt.

3.3.10. mTORC1 Reaktivierung in Zellen

Zur Modulierung der mTORC1 Aktivität wurden Zellen für 2 h gehungert. Dafür wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Serum und Aminosäure freien *Earles Balanced Salt Solution* (EBSS) inkubiert. Anschließend wurden sie für 60, 90 oder 120 min in DMEM only inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 250 nM des mTORC1 Inhibitors Torin1 für 120 min behandelt. Die Zellen wurden geerntet, Proteinextrakte wurden generiert (3.4.1), über SDS-PAGE (3.4.12) aufgetrennt und die Proben im Immunoblot (3.4.13) analysiert.

3.4. Proteinbiochemische Methoden

3.4.1. Isolation von Proteinen aus Zellen

Zur Lyse von Zellen wurden geerntete Zellen mit PBS + cOmplete™ + ggf. Detergenz (meist 1% Triton X-100) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde für 20 sek sonifiziert. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Vom Überstand wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (3.4.11) bestimmt und das Lysat je nach Verwendung weiterverarbeitet.

3.4.2. Isolation von Proteinen aus Geweben

Um Proteine aus Geweben zu isolieren, wurden die Gewebe mit in einem Masse-Volumen Verhältnis von 1:10 in Lysepuffer (250 mM Sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH=7,4, cOmplete™) in einem Potter mit 6 bis 12 Stößen bei 600-1200 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 1000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei Bedarf mit fünf weiteren Stößen in der Hälfte des verwendeten Lysepuffer ein weiteres Mal homogenisiert und zentrifugiert. Die Lysate wurden vereint. Je nach Bedarf wurden Teile des Lysats mit 1% Triton X-100 versehen. Die Proteinlösung wurde entsprechend des geplanten Versuchs weiterverarbeitet.

3.4.3. Membranpräparation aus Zellen

Um Membranen und membranassoziierte Proteine von löslichen Proteinen zu trennen, wurde eine Membranpräparation durchgeführt. Dafür wurden Zellen von ein oder zwei 10 cm Ø Schalen in PBS + cOmplete™ geerntet, für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µL 10 mM Tris pH 7,5, 140 mM NaCl, 250 mM Sucrose, cOmplete™ resuspendiert und dreimal 20 sek sonifiziert. 100 µL wurden zur Erstellung von Lysatkontrollen verwendet. Dafür wurden sie auf 1% Triton X-100 eingestellt, 30 min auf Eis inkubiert, sonifiziert und 10 min bei 4°C bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Immunoblot-Analyse vorbereitet.

400 µL der Lösung wurden für die eigentliche Membranpräparation verwendet. Dafür wurde das Lysat für eine Stunde bei 4°C bei 100.000xg zentrifugiert. Der Überstand ergab die löslichen Proteine, das Pellet bestand aus der Membranfraktion. Je nach benötigter Reinheit wurde die lösliche Fraktion erneut zentrifugiert. Das Membranpellet wurde ein bis zweimal mit 400 µL 10 mM Tris pH=7,5, 140 mM NaCl, 250 mM Sucrose, cOmplete™ resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer + 1% Triton X-100 resuspendiert. Von den Fraktionen wurde die Konzentration mittels BCA bestimmt. Die Proben wurden per Immunoblot analysiert.

3.4.4. Membranpräparation aus Mausorganen

Es wurden Lysate aus Geweben (3.4.2) erstellt (ohne TritonX-100) und für eine Stunde bei 100.000xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in Lysepuffer erneut resuspendiert. Sowohl Überstand als auch resuspendiertes Pellet wurden erneut für eine Stunde bei 100.000xg und 4 °C zentrifugiert, um reinere Fraktionen zu generieren. Der Überstand wurde mit 1% Triton X-100 versehen und das Pellet in Lysepuffer mit 1% Triton X-100 resuspendiert. Die Proben wurden anschließend mit 5x-Lämmli Puffer SDS-PAGE vorbereitet.

3.4.5. Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Analyse der Interaktion von Proteinen wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden Zelllysate in EBC Puffer (120 mM NaCl, 0,2 mM Natriumorthovanadat, 100 mM NaF, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4)) mit 1% (v/v) NP-40 erstellt. Auf 500 µL Zelllysate mit einer Proteinkonzentration von 0,5-1,5 µg/µL wurde 1 µL Antikörper gegen das zu präzipitierende Antigen gegeben und ü/N bei 4°C im Drehrad inkubiert. Zur gleichen Zeit wurden 50 µL pro Probe Protein G gekoppelte Dynabeads (Thermo Fisher Scientific) dreimal in EBC Puffer gewaschen und ü/N bei 4°C mit 5% BSA in EBC Puffer blockiert. Am nächsten Tag wurden die Dynabeads weitere dreimal mit EBC Puffer gewaschen und in entsprechendem Volumen EBC Puffer aufgenommen. Die Beads und die Proben wurden für 1-2 h bei RT im Drehrad

inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe eines Magnetständers die Dynabeads sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden dreimal mit EBC Puffer mit 1% (v/v) NP-40 für je 5 min im Drehrad gewaschen und anschließend in Lämmli-Puffer aufgenommen und für SDS-PAGE vorbereitet.

3.4.6. Aktivitätsassays von lysosomalen Hydrolasen

Die *in vitro* Aktivität von den lysosomalen Hydrolasen α -Mannosidase, β -Galactosidase, β -Glucuronidase und β -Hexosaminidase wurden in Zell- oder Organlysaten mit Hilfe der artifiziellen und chromogenen Substrate p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid und 4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid gemessen. Die Enzym-vermittelte Hydrolyse der Substrate führt zur Bildung von 4-Nitrophenol, das bei einem alkalischen pH-Wert bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch detektiert und quantifiziert werden kann.

Die Messung wurde in Duplikaten von je 10 μ L Zell- oder Organlysate (mit einer Proteinkonzentration von \sim 10 μ g/ μ L) in 0,2 M Trisnatriumcitrat, pH=4,6, 0,4% (w/v) BSA und 0,08% (w/v) NaN₃ für 5 min bis 6 h bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500-1000 μ L 0,4 M Glycin-Lösung, pH=10,4 gestoppt und die nicht-löslichen Aggregate bei 16000xg bei RT für 10 min pelletiert. Die Überstände wurden für die photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm (A_{405}) mit einem Synergy HAT (BioTek) verwendet. Jede Lysat-Probe wurde als Negativkontrolle auch ohne das zugehörige Substrat inkubiert und gemessen. Mit der folgenden Gleichung wurde aus den Messdaten die Aktivität der Enzyme in den Proben errechnet:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{mU}{mL} \right] = \frac{(A_{Probe} - A_{Kontrolle}) * 10^6}{\epsilon_{405} \left[\frac{l}{mol * cm} \right] * d[cm] * t[min]} * \frac{V_{Total}}{V_{Probe}}$$

$$\text{spezifische Aktivität} \left[\frac{mU}{mg} \right] = \frac{\text{Aktivität} \left[\frac{mU}{mL} \right]}{c_{Probe} \left[\frac{mg}{mL} \right]}$$

Mit der Absorption A, dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{405}=18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und der Schichtdicke $d=1 \text{ cm}$.

3.4.7. Isolation von Detergenz-resistenten Membranen

Um DRMs zu isolieren, wurden vier konfluente 10 cm Kulturschalen mit Hela oder MEFs zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen in PBS cComplete™ geerntet und für 10 min bei

Material und Methoden

3000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500 μ L Solution A (50 mM Tris/HCl, pH=7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM NaF) mit 0,25% (w/v) Titon X-100 für eine Stunde bei 4°C am Drehrad inkubiert. Die Proben wurden mit Solution A + 63,75% (w/v) Sucrose auf eine Endkonzentration von 42,5% (w/v) Sucrose eingestellt. Es wurde der folgende diskontinuierliche Sucrosegradient gegossen: 1,5 mL 42,5% (w/v) Sucrose (beinhaltet die Probe), 7 mL 35% (w/v) Sucrose und 2 mL 5% (w/v) Sucrose. Der Gradient wurde mit einem SW41 Ti Rotor der Firma Beckmann bei 38.000 rpm für 16 h bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden mit einer Rotationspumpe Fraktionen mit einem Volumen von 1 mL genommen und für die SDS-PAGE (3.4.12) vorbereitet.

3.4.8. Acetonfällung von Proteinen

Um Proteine in andere Puffer und Lösungen zu überführen, wurde eine Acetonfällung durchgeführt. Dafür wurde die Proteinlösung mit dem dreifachen Volumen -20°C kaltem Aceton versetzt und für 20 min bei -20°C inkubiert. Die Probe wurde bei 16.000xg für 6 min bei 1°C pelletiert. Das Pellet wurde fünfmal mit je einem Milliliter eiskalter 70%iger Aceton-Lösung gewaschen und jeweils wieder bei 16.000xg für 2 min pelletiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.9. AcylRac Assay

Zellen (2x 10 cm Schalen) wurden in PBS cOmplete™ geerntet und bei 3000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 500 μ L Blockier-Puffer (100 mM HEPES, 1.0 mM EDTA, 2.5% SDS, pH=7.5) resuspendiert und für zweimal 30 sek sonifiziert. Anschließend wurde 0,1% Methylmethanthiosulfonat (MMTS) hinzugegeben und die Proben für 4 h bei 40°C geschüttelt. Hierauf wurden die Proteine in eine Acetonfällung präzipitiert (3.4.8).

Thiol Sepharose® 4B Beads wurden für 30 min in 2 mL Binde-Puffer (100 mM HEPES, 1.0 mM EDTA, 1% SDS, pH 7.5) rotierend inkubiert und bei 16.000xg für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads in der entsprechenden Menge Binde-Puffer aufgenommen (55mg Beads + 275 μ L Binde-Puffer = 550 μ L Bead-Suspension).

Das durch Aceton gefällte Pellet mit den blockierten Proteinen wurde in 300 μ L Binde-Puffer bei 40°C für bis zu 60 min resuspendiert und bei 16.000xg für eine Minute zentrifugiert und nicht gelöste Bestandteile zu Pelletieren. Vom Überstand wurden 30 μ L für eine Input-Kontrolle abgenommen. Vom restlichen Überstand wurden zweimal je 120 μ L in neue Reaktionsgefäße überführt und 50-80 μ L Bead-Suspension hinzugegeben. Eine der Probe wurde mit 19 μ L 2 M NH₂OH, pH 7,0-7,5 versetzt, um die Palmitylreste abzuspalten, und die andere zur Kontrolle mit 19 μ L 2 M NaCl. Die Proben wurden 3 h bei RT schüttelnd inkubiert und anschließend bei 16.000xg pelletiert. Der Überstand enthielt die nicht gebundenen Proteine und wurde mit Lämmli-puffer für eine Analyse mittel SDS-PAGE vorbereitet. Das Pellet wurde

fünfmal mit je 1 mL Binde-Puffer gewaschen und am Schluss in einem gleichen Volumen 2xLämmli-puffer aufgenommen und für SDS-PAGE (3.4.12) vorbereitet. Die Beads-Fraktion enthielt die S-Palmitoylierten Proteine.

Protokoll abgeändert nach (Forrester et al., 2011).

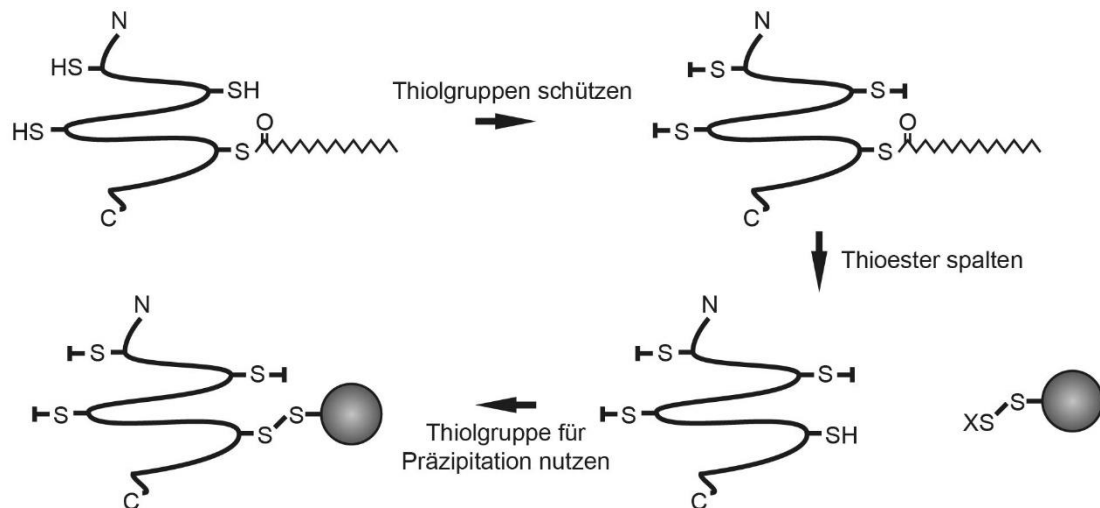


Abb. 5 Schematische Darstellung des Acyl-Rac Assays.

In einem ersten Schritt werden alle freien Thiolgruppen eines Proteins geschützt. Dann werden Palmitatreste durch Spaltung der Thioesterbindung entfernt und neue freie Thiolgruppen generiert. Diese Thiolgruppen werden anschließend für eine Präzipitation mit Thiol-Sepharose durch Ausbildung von Disulfidbrücken verwendet. Abbildung abgeändert nach (Forrester et al., 2011).

3.4.10. Acyl-PEG-Austausch Assay

Der Acyl-(Polyethylenglykol)PEG-Austausch (*acyl-PEG exchange* = APE) Assay beruht auf dem Gleichen Prinzip wie der Acyl-Rac-Assay. Im Unterschied zum Acyl-Rac-Assay wird im letzten Schritt keine Präzipitation mit Thiol-Sepharose durchgeführt, sondern Maleimid-PEG (mPEG) an die freien Thiolgruppen gebunden (Percher et al., 2016). Durch das gebundene PEG verändert sich das Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE und palmitoylierte Proteine können so identifiziert werden.

Für den APE-Assay wurden pro Probe zwei zehn Zentimeter Zellkulturschalen verwendet. Die Zellen wurden in PBS + cOmplete™ geerntet und pelletiert. Das Pellet wurde in 125 µL Puffer A für 10 min bei 37°C gelöst und anschließend mit 375 µL Puffer B versetzt. Die Lösung wurde dreimal für je 20 sek sonifiziert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Assay bestimmt (3.4.11) und mit Puffer D auf 0,5 mg/µL eingestellt. Dieses erstellte Lysat diente auch als Input-Kontrolle. Für jede Probe wurden zweimal 500 µL des Lysats mit 10 µL 0,5 M Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) versetzt (final 10 mM TCEP) und für 30 min bei RT im Drehrad

Material und Methoden

inkubiert, um mögliche Disulfidbrücken zu reduzieren. Anschließend wurde 10 μL 2 M N-Ethylmaleinimid (NEM) in Ethanol (final 40 mM NEM) hinzugegeben und für 3 h bei RT im Drehrad inkubiert, um freie Thiolgruppen zu schützen. Die Proteine wurden in einer Acetonfällung präzipitiert (3.4.8).

Tab. 19 Auflistung der für den Acyl-PEG-Austausch Assay verwendeten Puffer.

Puffer	Inhalt
Puffer A	4% (w/v) SDS 5 mM EDTA in PBS cOmplete™
Puffer B	5 mM EDTA In PBS cOmplete™
Puffer C	2% (w/v) SDS
Puffer D	1% (w/v) SDS cOmplete™
Puffer H	1,33 M Hydroxylamine 5 mM EDTA 13 mM TCEP pH=7
Puffer T	1,33 M Tris-HCl 5 mM EDTA 13 mM TCEP pH=7

Das Proteinpellet wurde für bis zu eine Stunde bei 37°C in 125 μL Puffer A gelöst. Entweder wurde als Kontrolle 375 μL Puffer T, oder um die Palmitylreste zu schneiden 375 μL Puffer H hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C ohne Rotation inkubiert. Anschließend folgte eine Acetonfällung (3.4.8).

Das Pellet wurde für bis zu eine Stunde bei 37°C in 110 μL Puffer C gelöst und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu pelletierten. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt (3.4.11). Mit Puffer C wurden pro Reaktion 100 μL einer 0,5 mg/mL Proteinlösung erstellt, die mit 2 μL 0,5 M TCEP und entweder mit 10 μL 200 mM mPEG oder als Kontrolle mit 10 μL 200 mM NEM versetzt wurde. Die Lösung wurde für eine

Stunde bei RT inkubiert. Es folgte eine Acetonfällung (3.4.8). Die Pellets wurden anschließend in 50 µL 1x Laemmli Puffer aufgenommen und für 2 min bei 99°C für die SDS-PAGE mittels Tank-Blot-Transfer vorbereitet (3.4.12 und 3.4.13).

3.4.11. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zell- und Gewebehomogenaten wurde mit Hilfe und nach Anweisungen des Pierce™ BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt.

3.4.12. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zu analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem apparenten Molekulargewicht wurde eine SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Proben wurden mit 5x Laemmli Puffer (625 mM Tris/HCl pH=6,8, 50% (v/v) Glycerin, (5% (w/v) SDS, 100 mM DTT, Bromphenolblau) und der endsprechenden Mengen von verwendetem Lysepuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 - 2 µg/µL eingestellt und für 5 min bei 95°C oder 10 min bei 60°C denaturiert. Dabei lagert sich das anionische SDS an die denaturierten Proteine an, die so abhängig von der Proteinoberfläche negative Ladungen erhalten. Dadurch wird das Laufverhalten der SDS-bleadenen Proteine im elektrischen Feld abhängig von der Größe des Proteins. Die Proteine wurden über 10%ige oder 12,5%ige Trenngele (Trenngelbuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS) mit einem 4,5%igen Sammelgel (Sammelgelbuffer: 0,5 M Tris/HCl 6,8 0,4% (w/v) SDS) in Laufpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycine, 01% (w/v) SDS) bei einer konstanten Spannung zwischen 80 V und 120 V aufgetrennt. Als Kontrolle wurde der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* von Thermo Fisher Scientific verwendet.

3.4.13. Proteindetektion mittels Immunoblot im Amersham™ Imager 680

Die spezifische Detektion von Proteinen nach der Auftrennung durch SDS-PAGE (2.4.12) erfolgte im Immunoblot. Dafür wurden die Proteine im Semi-Dry- oder Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Im Semi-Dry-Verfahren wurden auf einer Anode zwei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere (6*9 cm), eine Nitrocellulosemembran (6*9 cm), das zu transferierende Acrylamidgel und zwei weitere in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere (6*9 cm) geschichtet und mit der Kathode abgeschlossen. Der Transfer wurde für 90 min bei 80 mA pro Blot durchgeführt. Im Tank-Blot-Verfahren wurden ein Whatmanpapier, eine Nitrocellulosemembran, das zu transferierende Acrylamidgel und ein weiteres Whatmanpapier in einer entsprechenden Halterung eingespannt und die Proteine in einer Tank-Blot-Kammer mit eiskaltem 1x Transferpuffer bei konstanten 825 mA für 2 h bei 4°C transferiert.

Material und Methoden

Nach dem Transfer wurde der Blot für eine Stunde in Blockierpuffer blockiert und ü/N mit Antikörper gelöst in Blockierpuffer inkubiert, oder dreimal je 5 min mit TBST gewaschen und ü/N bei 4°C mit Antikörper gelöst in 5% BSA in TBST inkubiert. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBST mit Peroxidase-gekoppeltem sekundärem Antikörper in Blockierpuffer für eine Stunde bei RT, gefolgt von weiterem dreimaligen Waschen. Die Detektion des Sekundären Antikörpers erfolgte mit 300 µL ECL pro Blot in einem Amersham™ Imager 680. Die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale wurde mit der Software ImageJ durchgeführt.

Tab. 20 Auflistung der für den Immunoblot verwendeten Puffer.

Puffer	Inhalt
Transfer-Puffer	20% (v/v) Methanol 25 mM Tris 200 mM Glycin ddH ₂ O
Tris-budded Saline – Tween (TBS-T)	20 mM Tris/HCl pH 7,0 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween20 ddH ₂ O
Blockierpuffer	5% (w/v) Milchpulver TBST
Detektionslösung A	0,1 M TrisHCl pH 8,6 0,025% (w/v) Luminol
Detektionslösung B	0,11% (w/v) p-Cumarsäure in DMSO
ECL	1 mL Detektionslösung A 100 µL Detektionslösung B 50µL ECL Advance Wsternblotting Kit Lsg1 50µL ECL Advance Wsternblotting Kit Lsg2 3µL 30% H ₂ O ₂ ECL Advance Wsternblotting Kit

3.4.14. Proteindetektion und Quantifizierung mittels Immunoblot in einem Odyssey® Fc Dual-Mode Imaging System

Zur Quantifizierung von phosphoryliertem und totalem p70S6K wurde ein Immunoblot mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern in einem Odyssey® Fc Dual-Mode Imaging System (LI-

Material und Methoden

COR®) durchgeführt. Der Proteintransfer verlief analog zu 3.4.13. Nach erfolgtem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran jedoch eine Stunde getrocknet und anschließend in TBS rehydriert. Die Membran wurde für eine Stunde in einer 1:2 Lösung von *Odyssey® blocking buffer* (LI-COR®) in TBS blockiert. Primäre Antikörper wurden bei 4°C ü/N in 5% BSA in TBS mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und mit IRDye® 800CW-gekoppeltem sekundären Antikörper in einer 1:2 Lösung von *Odyssey® blocking buffer* (LI-COR®) in TBS-T blockiert für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde zweimal in TBS-T und einmal in TBS für je 10 min gewaschen. Die Detektion und Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Odyssey® Fc Dual-Mode Imaging System (LI-COR®).

3.4.15. Erneute Entwicklung eines Immunoblot

Um weitere Proteine auf Immunoblots nachzuweisen wurde erst entweder der sekundäre Antikörper mit Glycin-Stripping-Puffer bei RT für 30 s – 2 min entfernt, oder sowohl der primäre, als auch der sekundäre Antikörper mit SDS-Stripping-Puffer (62,5 mM Tris/HCL pH=6,8, 2% (w/v) SDS, 0,83% (v/v) β -Mercaptoethanol) bei 90°C für 30 min.

3.5. Histologische Methoden

3.5.1. Herstellung von semi-dünnen Kryoschnitten von PFA-fixierten Organen

PFA-fixierte Organe (3.6.6) wurden ü/N in 30% (w/v) Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer inkubiert. Kryoschnitte wurden in gefrorenem 30% (w/v) Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer, gekühlt durch Trockeneis, mit einem *Leica SM 2000 R sliding microtome* (Leica Microsystems) in einer Dicke von 35 μ m angefertigt. Die Kryoschnitte wurden in 0,1 M Phosphatpuffer und 0,02% (w/v) Natriumazid bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.5.2. Immunfluoreszenzfärbung von Organkryoschnitten

Organkryoschnitte (3.5.1) wurden mit Phosphatpuffer (PB) gewaschen und 90 min in 4% Ziegen Serum und 0,5% TX-100 in PB bei RT blockiert. Die Schnitte wurden mit primärem Antikörper in Blockierpuffer ü/N bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PB gewaschen und für 2 h mit sekundärem Antikörper in Blockierpuffer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in PB gewaschen. Die Zellkerne wurden für 10 min mit DAPI (1:1000) in PB gefärbt und die Kryoschnitte ein weiteres Mal mit PB gewaschen. Die Kryoschnitte wurden mit Mowiol/Dabco auf Objektträgern fixiert.

3.5.3. Myelinscheidenfärbung

Die Myelinscheidenfärbungen mittels Toluidin Blau wurden durch R. Lüllmann-Rauch and D. Niemeier vom Anatomischen Institut der CAU Kiel durchgeführt.

3.6. Tierversuche

3.6.1. Haltung von Mäusen

Mäuse wurden in einer definiert pathogenfreien Umgebung in individuell ventilierten Käfigen (IVC) gehalten. Die RT betrug bei $21 \pm 2^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit 45-60% und es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h eingehalten. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser und standardisiertem Futter für Labortiere (ssniff Spezialdiät GmbH). Alle Tierversuche wurden nach dem Tierschutzgesetz (TierSchG), der Tierschutzversuchstierverordnung (TierSchVersV) und den Anweisungen des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein und in der Zusammenarbeit mit dem Tierschutzzentrum der CAU-Kiel durchgeführt.

3.6.2. CRISPR/Cas9-vermittelte Proteindeletion

Die CRISPR/Cas-vermittelte Deletion von TMEM55A und TMEM55B in Mäusen wurde von Radislav Sedlacek im *Czech Centre for Phenogenomics* (BIOCEV/IMG) durchgeführt.

3.6.3. Schwanzbiopsie und Isolation von genomischer DNA

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde von drei bis fünf Wochen alten Mäusen eine Schwanzbiopsie durchgeführt. Das Gewebe wurde mit dem DirectPCR® Lysis Reagent Tail der Firma Peqlab und 0,3 mg/mL Proteinase K bei 55°C ü/N verdaut. Die Proteinase K wurde für 10 min bei 85°C inaktiviert. Die Proben wurden zentrifugiert und als Template für die Genotypisierungs-PCR verwendet (3.6.4).

3.6.4. Genotypisierungs-PCR

Zur Bestimmung des Genotyps von Mäusen wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt. Die PCR erfolgte nach den folgenden Schemata:

Tab. 21 Auflistung des Genotypisierungs-PCR Reaktionsansatzes.

	Volumen
10x DreamTaq	5 μL
dNTPs 10 mM	1 μL
10 μM Primer forward	1 μL

Material und Methoden

10 μM Primer reverse	1 μ L
Template (3.6.3)	1 μ L
DreamTaq	0,4 μ L
H₂O	ad 50 μ L

Tab. 22 Programm der Genotypisierungs-PCR.

	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 sek	
Annealing	60°C	30 sek	40x
Elongation	72°C	30 sek	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Ende	4°C	∞	

Die generierten DNA-Fragmente wurden mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt.

3.6.5. Anästhesie von Versuchstieren

Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 10 mg/ml Ketamin und 6 mg/mL Rompun® in 0,9% NaCl-Lösung anästhetisiert. Es wurden 10 μ L pro Gramm Körpergewicht der Mäuse verwendet.

3.6.6. Perfusion von Versuchstieren mit PFA

Anästhetisierte Mäuse wurden durch den linken Herzventrikel mit 30 mL PB, gefolgt von 30 mL 4% PFA in PB mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 mL/min perfundiert. Verwendet wurde eine *Plus Syringe Pump* der Firma Harvard apparatus. Die Organe wurden nach Entnahme für weitere 3 h in 4%PFA in PB bei 4°C nachfixiert.

3.6.7. Euthanasie von Versuchstieren

Zur Organentnahme wurde Versuchtieren durch zervikale Dislokation oder Perfusion (3.6.6) euthanasiert.

3.6.8. Gewichtsbestimmung von Mäusen

Das Gewicht der Mäuse wurde mit einer EMB Präzisionswaage (Kern & Sohn GmbH) in einer sterilen biologischen Sicherheitswerkbank bestimmt.

3.6.9. Griffstärke

Die Griffstärke von Mäusen wurde bestimmt, indem die Kraft gemessen wurde, mit der sie sich an Stangen festhielten, während eine Zugkraft auf ihren Schwanz ausgeübt wurde. Die T-förmige Stange war mit einem Digitalen Dynamometer (Ugo Basile, Gemonio, Italien) verbunden. Die Quantifizierung erfolgte durch den Mittelwert von zehn Wiederholungen. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

3.6.10. Rotierender Zylinder

Die motorische Koordination und das Gleichgewicht von Mäusen wurde mittels Rotarod-Test ermittelt. Dafür wurde die Latenz gemessen, von einem rotierenden Zylinder zu Fallen. Die Tiere wurden zuerst zwei Mal bei einer Geschwindigkeit von 5 rpm auf dem Gerät trainiert (Ugo Basile, Gemonio, Italien). Anschließend erfolgten vier gemessene Versuche, mit jeweils 10 min Pause, bei einer steigenden Geschwindigkeit von 5-40 rpm innerhalb von 5 min. Nach maximal 5 min wurden die Versuche beendet. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

3.6.11. Vertikale Stange

Motorische Funktionen von Mäusen wurden gemessen, indem die Tiere mit dem Kopf nach oben an die obere Spitze einer hölzernen, angerauten, vertikalen Stange mit einer Länge von 55 cm und einem Durchmesser von 1,5 cm gesetzt wurden. Es wurde die Latenz gemessen, die die Tiere benötigten, sich zu drehen, und die Latenz des Abstiegs. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

3.6.12. Schwebebalken

Zur Analyse der Sensomotorik von Mäusen wurde eine Schwebebalken-Test durchgeführt. Dafür wurden die Tiere trainiert, über verschiedene je ein Meter lange Schwebebalken in 50 cm Höhe zu gehen. Verwendet wurden quadratische Balken mit Querschnitten von 28, 12 und 5 mm und runde Balken mit Durchmessern von 28, 17 und 11 mm. In der Trainingsphase lernten die Mäuse den quadratischen zwölf Millimeter Balken ohne zu zögern zu überqueren. Es wurde die Überquerungszeit und die Anzahl an Schrittfehlern für je zwei aufeinanderfolgende Überquerungen von jedem Balken gemessen. Der Mittelwert beider Versuche wurde für die weitere Auswertung verwendet. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

3.6.13. Laufband

Die Untersuchung des motorischen Laufverhaltens von Mäusen wurde mittels einer automatisierten Quantifizierung des Schrittmusters auf einem Laufband durch ventrale Videoanalyse durchgeführt (Digigait, Mouse SPecifics Inc, USA). Dazu wurden Mäuse an das Laufen auf einem Laufband mit einer Geschwindigkeit von 10 cm/s gewöhnt. Im Versuch wurde die Geschwindigkeit auf 20 cm/s angehoben und für 45 s Messdaten erhoben. Gemessen wurde die Häufigkeit, die die Mäuse nicht mit der Geschwindigkeit des Laufbandes mithalten konnten. Aus einem Teil des Videos, indem die Tiere dauerhaft unter der Kamera liefen wurde die Gangsymmetrie, Standbreite, Schrittwinkel, Schrittlänge und Schrittdauer der Mäuse mit der Digigait Analyse Software ermittelt. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

3.6.14. Offenes-Feld-Test

Für Rückschlüsse auf das Erkundungsverhalten von Mäusen, wurde ihre Bewegung im Offenen-Feld-Test untersucht. Dazu wurden nach einer ein minütigen Eingewöhnungsphase in einer 50 cm x 50cm c 30 cm großen Arena die zurückgelegte Laufstrecke und die Zeit an definierten Aufenthaltsorten gemessen. Als Zentrum wurde ein zentraler Kreis mit einem Durchmesser von 30 cm definiert, als Peripherie ein Abstand von <5cm von den Wänden der Arena. Die Messung wurde für 10 min durchgeführt und mit der ANY-maze™ Video Tracking System Software (Stoelting Co., USA) aufgezeichnet. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

4. Ergebnisse

Die lysosomalen Transmembranproteine TMEM55B und TMEM55A wurden initial als Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-4-phosphatasen charakterisiert (Ungewickell et al., 2005). Erst Jahre nach der ersten Beschreibung wurden andere Funktionen der Proteine beschrieben. So konnten für TMEM55B Funktionen im Cholesterinmetabolismus, beim retrograden Transport von Lysosomen und im *mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1* (mTORC1)-Signalweg gezeigt werden (Hashimoto et al., 2018; Medina et al., 2014; Takemasu et al., 2019; Willett et al., 2017). TMEM55A hingegen wurde eine Rolle in der Regulation der Phagozytose in Makrophagen zugeschrieben (Morioka et al., 2018).

In den genannten Studien wurden dabei die Mehrzahl der Experimente *in vitro* durchgeführt. Weiterhin ungeklärt ist die Funktion von TMEM55A und TMEM55B *in vivo*. Aber auch grundsätzlichere Fragen sind noch nicht geklärt: Wird TMEM55B neben der beschriebenen Phosphorylierung (Takemasu et al., 2019) und der TFEB- (Willett et al., 2017) und SREBF2- (Medina et al., 2014) abhängigen Transkription anderweitig auf der Expressionsebene oder posttranslational reguliert? Falls TMEM55B posttranslational modifiziert wird, welche Funktionen haben diese möglichen Modifikationen genau? Wie wird TMEM55B zu den Lysosomen transportiert? Diese Fragen sollen in der folgenden Arbeit bearbeitet werden.

4.1. TMEM55B ist ein lysosomales Membranprotein

In der vorliegenden Arbeit sollten bekannte und neue Funktionen des Membranproteins TMEM55B untersucht werden. Die vorgeschlagene Topologie von TMEM55B weist einen zytosolischen N-Terminus, zwei Transmembrandomänen mit einer kurzen luminalen Schleife und einen kurzen zytosolischen C-Terminus auf (**Abb. 6 A** und (Gouw et al., 2018)). In einer ersten Charakterisierung wurde die intrazelluläre Lokalisation des Proteins analysiert. In Hela-Zellen (**Abb. 6 B**) und Maus embryonalen Fibroblasten (MEF) (**Abb. 6 D**) wurden Koimmunfluoreszenzfärbungen (3.3.7) von endogenen TMEM55B und dem Lysosomen-assoziierten Membranprotein 2 (LAMP2) angefertigt. In beiden Zelltypen lag eine Kolo-kalisation von TMEM55B mit dem lysosomalen Marker besonders in Kern-nahen Vesikeln vor. LAMP2 positive Vesikel in der Zellperipherie wiesen in beiden Zellarten im Vergleich zu LAMP2 weniger TMEM55B auf (**Abb. 6 B** und **C**).

Ergebnisse

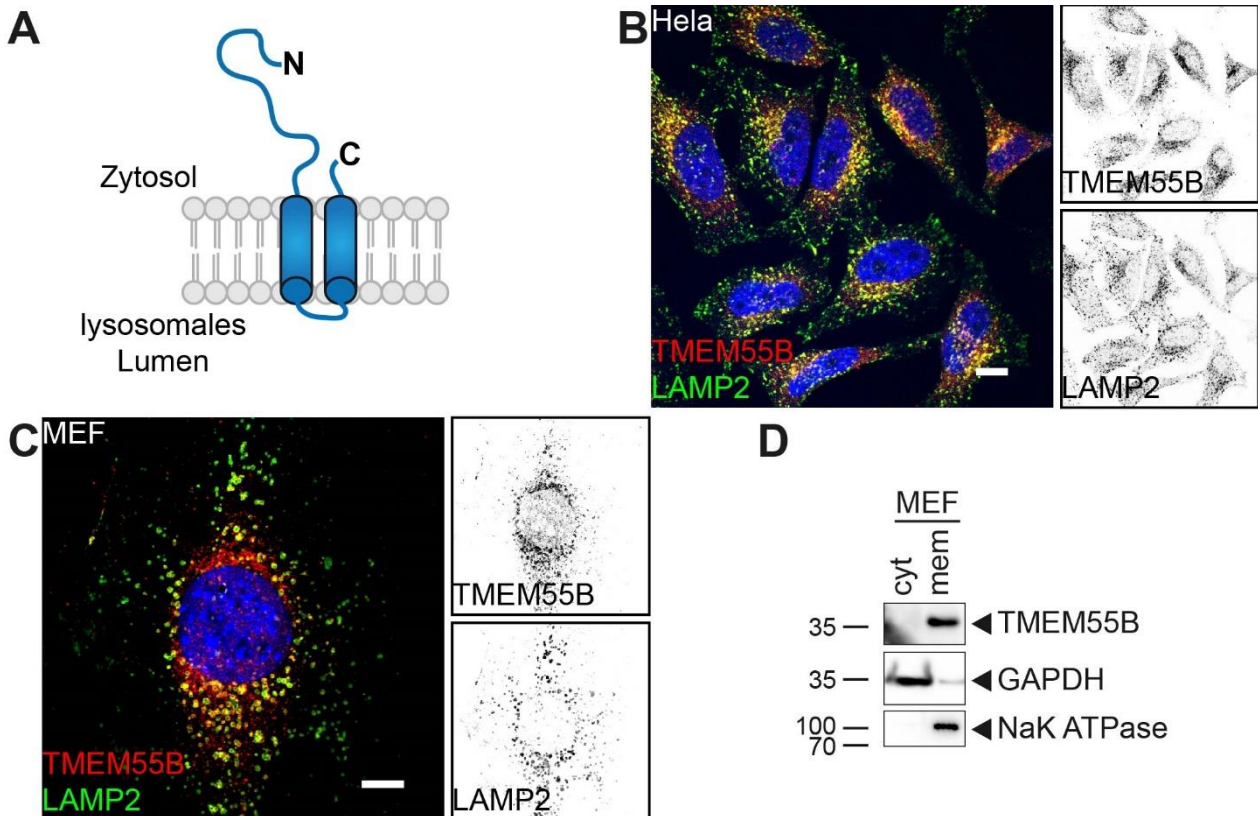


Abb. 6 TMEM55B ist ein lysosomales Membranprotein.

(A) Putative Topologie von TMEM55B. Vorhergesagt mit der *Eukaryotic Linear Motif* Vorhersagesoftware (Gouw et al., 2018). (B) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von TMEM55B (rot), zusammen mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP2 (grün) in HeLa-Zellen. Maßstab = 10 μm. (C) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von TMEM55B (rot), zusammen mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP2 (grün) in MEF Zellen. Maßstab = 10 μm. (D) Immunoblot Analyse einer Membranfraktionierung von MEF Zellen. Als Marker für die zytosolische lösliche Fraktion wurde GAPDH und für die Membranfraktion Na⁺K⁺-ATPase verwendet.

Um zu untersuchen, ob TMEM55B ein integrales Membranprotein ist, wurde mittels Ultrazentrifugation eine Membrananreicherung (3.4.3) vorgenommen. Als Kontrolle für die Anreicherung Membran-assoziiertes Proteins diente der Immunoblot-Nachweis der Na⁺K⁺ ATPase und für lösliche Proteine der Nachweis von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). In einer Immunoblotanalyse der Fraktionen war ausschließlich in der Membranfraktion ein Signal von TMEM55B zu finden (**Abb. 6 D**).

In diesen ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass TMEM55B in murinen und menschlichen Zellen ein integrales, lysosomales Membranprotein ist.

4.2. Überexpression von TMEM55B führt zu einer perinukleären Akkumulation von Lysosomen

Die Auswirkungen der Überexpression von TMEM55B in HeLa-Zellen wurde von Willett *et al.* beschrieben (Willett *et al.*, 2017). Dabei zeigte sich eine indirekte Interaktion von TMEM55B mit Dynein/Dynactin und ein dadurch initiiertes retrogrades Transport von Lysosomen entlang von Mikrotubuli. Die Überexpression von TMEM55B führte folglich zu einer perinukleären Akkumulation von Lysosomen.

Um zu überprüfen, ob auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Zell- und Expressionssystem eine solche Umverteilung von Lysosomen erfolgt, wurde zunächst TMEM55B als Fusionsprotein mit einem C-terminalen *Human influenza hemagglutinin*-Tag (HA-Tag) kloniert (TMEM55B-HA). Anschließend wurden HeLa-Zellen mit TMEM55B-HA transfiziert und die Verteilung der Lysosomen mittels Immunfluoreszenz analysiert. Im Immunoblot der Lysate von untransfizierten und mit TMEM55B-HA transfizierten HeLa-Zellen konnte mit Antikörper gegen den HA-Tag, als auch mit Antikörpern gegen TMEM55B eine Doppelbande von ~35 kDa gezeigt werden. Die Banden wiesen die erwartete Größe von TMEM55B auf (**Abb. 7 A**). In nicht-transfizierten HeLa-Zellen konnten in Immunofluoreszenzfärbungen über das ganze Zytosol verteilt Lysosomen detektiert werden (**Abb. 7 B oben**), wohingegen Zellen, die TMEM55B-HA exprimierten, eine Häufung von Lysosomen in der Nähe des Zellkernes aufwiesen (**Abb. 7 B unten**).

Weiter beschrieben Willett *et al.* unter Bedingungen mit verminderter TMEM55B Biosynthese (im späteren auch *knockdown* genannt) einen gegenteiligen Effekt. Bei starker Reduktion der Translation von TMEM55B ist der retrograde Transport von Lysosomen stark verringert oder sogar inhibiert und es kommt zur peripheren Akkumulation von Lysosomen im Bereich der Plus-Enden der Mikrotubuli. Auch dieser Effekt sollte für das hier verwendete Zellsystem geprüft werden. Dafür wurde eine Reduktion von TMEM55B mit Hilfe von siRNA (3.3.6) in HeLa-Zellen erreicht und mittels Immunoblot überprüft. Die Intensität der TMEM55B-spezifischen 35 kDa Bande nahm in den behandelten Zellen im Gegensatz zu der Kontrolle deutlich ab (**Abb. 7 C**). Somit wurde ein effizienter *knockdown* von TMEM55B in den Zellen erreicht. In diesen Zellen wurde im Folgenden die Verteilung der Lysosomen mikroskopisch analysiert. Dazu wurde mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltem Phalloidin das Aktinzytoskelett gefärbt, um den ganzen Zellkörper zu markieren. Die Lysosomen wurden mit Antikörper gegen LAMP2 gefärbt. Im Vergleich der Kontrolle zum TMEM55B *knockdown* zeigten sich keine Unterschiede in der eher perinukleären Lokalisation von Lysosomen. Die Lysosomen waren im ganzen Zytoplasma vorzufinden, ein Großteil in der Nähe des Kerns. Akkumulationen von Lysosomen in der Zellperipherie konnten nicht festgestellt werden.

Ergebnisse

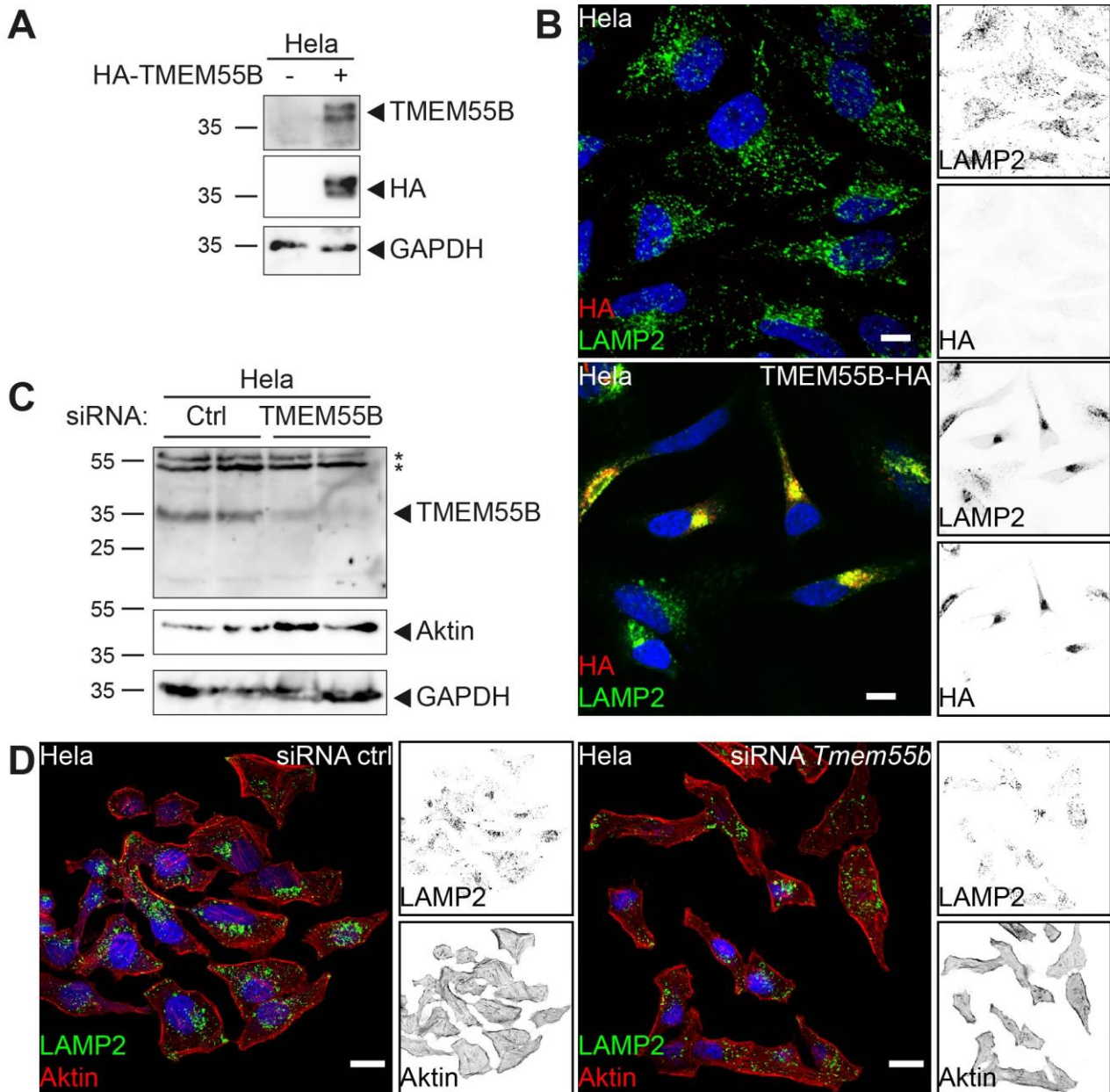


Abb. 7 Analyse der Verteilung von Lysosomen unter TMEM55B überexpressions- und *knockdown* Bedingungen in HeLa-Zellen.

(A) HeLa-Zelle wurden nicht oder mit TMEM55B-HA transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mittels Immunoblot analysiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. (B) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von TMEM55B-HA (rot) und dem lysosomalen Markerprotein LAMP2 (grün) in HeLa-Zellen, unbehandelt oder TMEM55B-HA überexprimierend. Maßstab = 10 µm. (C) HeLa-Zellen wurden über fünf Tage zweimal mit siRNA transfiziert und anschließend mittels Immunoblot auf Vorhandensein von TMEM55B analysiert. Als Ladekontrolle dienen Aktin und GAPDH. Unspezifische Banden wurden mit * markiert. (D) Die siRNA behandelten HeLa-Zellen wurden in einer Immunfluoreszenzfärbung zur Analyse der Lysosomendistribution LAMP2 und Aktin gefärbt. Maßstab = 20 µm.

In den gezeigten Experimenten konnte die von Willett *et al.* beschriebene perinukleäre Akkumulation von Lysosomen unter TMEM55B Überexpression reproduziert werden. Der *knockdown* führte jedoch nicht zu dem publizierten Ergebnis der peripheren Positionierung von Lysosomen, sondern zeigte keinen Unterschied zu den Kontrollzellen.

4.3. Das lysosomale Membranprotein TMEM55A ist nicht an der Positionierung von Lysosomen beteiligt

TMEM55A ist ein paraloges Protein zu TMEM55B und weist eine zu 51% identische Aminosäuresequenz auf. Um zu überprüfen, ob TMEM55A unter Überexpressionsbedingungen einen redundanten Effekt in der lysosomalen Positionierung aufweist, wurde auch von TMEM55A ein am C-Terminus mit HA-Tag markiertes Fusionsprotein kloniert und in HeLa-Zellen überexprimiert (TMEM55A-HA). Die Zellen wurden auf Lokalisation des Proteins und auf die Verteilung der Lysosomen mittels Immunfluoreszenz analysiert (3.3.7). Es zeigte sich, dass TMEM55A-HA mit LAMP2 deutlich kolokalisiert und dass die Verteilung der Lysosomen unter Überexpression von TMEM55A-HA im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (weißer Pfeil) nicht verändert ist (**Abb. 8**).

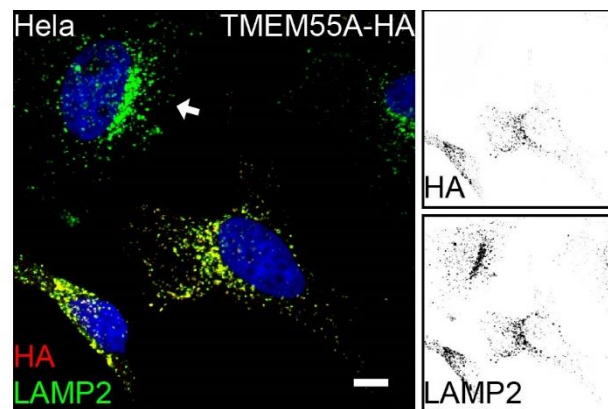


Abb. 8 Immunfluoreszenzfärbungen von TMEM55A-HA in HeLa-Zellen.

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen, die TMEM55A-HA überexprimieren. Gefärbt wurden HA (rot) und als lysosomaler Marker LAMP2 (grün). Der weiße Pfeil markiert eine nicht überexprimierende Zelle. Maßstab = 10µm.

Das Experiment belegt, dass auch TMEM55A in der lysosomalen Membran lokalisiert ist. Auch zeigt es, dass unter Überexpression von TMEM55A-HA keine Veränderung der Verteilung von Lysosomen im Zytoplasma hervorgerufen wird. Es kann also geschlossen werden, dass TMEM55A und TMEM55B, trotz hoher Ähnlichkeit, zumindest teilweise unterschiedliche Funktionen in der Zelle erfüllen können.

4.4. Generierung von TMEM55A- und TMEM55B-defizienten Mäusen

Um die Rolle von TMEM55B *in vivo* zu untersuchen, wurde in Mäusen CRISPR/Cas9 vermittelt eine Deletion von TMEM55B eingeführt (im Folgenden auch *knockout* (KO) genannt) (3.6.2). Die Generierung der *knockout*-Mäuse erfolgte durch Radislav Sedlacek im *Czech Centre for Phenogenomics* (BIOCEV/IMG). Da eine redundante Funktion von TMEM55A aufgrund der

Ergebnisse

beschriebenen hohen Ähnlichkeit bisher nicht ausgeschlossen werden kann, wurden auch TMEM55A-defiziente Mäuse generiert. Die Ziel-Sequenzen für die leitende *Guide* RNA (sgRNA) im CRISPR/Cas9 Verfahren umfassten für beide Proteine 17 Nukleotide und zielten auf eine Sequenz in Exon 2 der Gene (**Abb. 9 A**). Für TMEM55A konnte eine Deletion von acht Nukleotiden nachgewiesen werden, die nach dem Codon für die 55. Aminosäure elf mit dem Wildtypprotein nicht identische Aminosäuren mit einem anschließenden Stopcodon zur Folge hat. Dieser Größenunterschied konnte mittels Genotypisierungs-PCR und Kapillargelelektrophorese (3.6.4) gezeigt werden (**Abb. 9 B**). Aus den Mäusen wurden im folgenden MEFs isoliert (3.3.3), Zellextrakte generiert (3.4.1) und im Immunoblot (3.4.12, 3.4.13) auf die Anwesenheit von TMEM55A untersucht. Mit einem Peptid-spezifischen gegen TMEM55A generierten (3.1.2) Antikörper konnte eine Bande bei ~27 kDa gezeigt werden, die sowohl in TMEM55A-defizienten als auch in TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten MEFs nicht zu detektieren war (**Abb. 9 C**). Eine ähnliche Vorgehensweise wurde für die Generierung von TMEM55B-defizienten Mäusen gewählt. Hier konnte eine Deletion von vier Nukleotiden in Exon 2 nachgewiesen werden, die zu veränderten Aminosäuren nach dem Codon für Aminosäure 87 und einem frühzeitigen Stopcodon nach Aminosäure 106 führte. Die Analyse der bei der Genotypisierung entstandenen DNA Fragmente per Kapillargelelektrophorese zeigte den Unterschied von vier Basenpaaren zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen. In heterozygoten Tieren wurden mehrere Banden detektiert, die vermutlich aufgrund von Heterodimeren der PCR-Produkte des Wildtypgens und des deletierten Gens entstanden (**Abb. 9 D**). In der Immunoblot Analyse der MEFs konnte auch für TMEM55B ein funktioneller *knockout* gezeigt werden. Es konnte in den TMEM55B-defizienten Zellen keine spezifische 35 kDa Bande mehr detektiert werden (**Abb. 9 D**).

Die Analysen der Mäuse und der MEFs zeigten, dass mittels CRISPR/Cas9 erfolgreich TMEM55A und TMEM55B deletiert wurde. Dies ermöglicht weitergehende Studien *in vivo* und in primären Zellen dieser Maus.

Ergebnisse

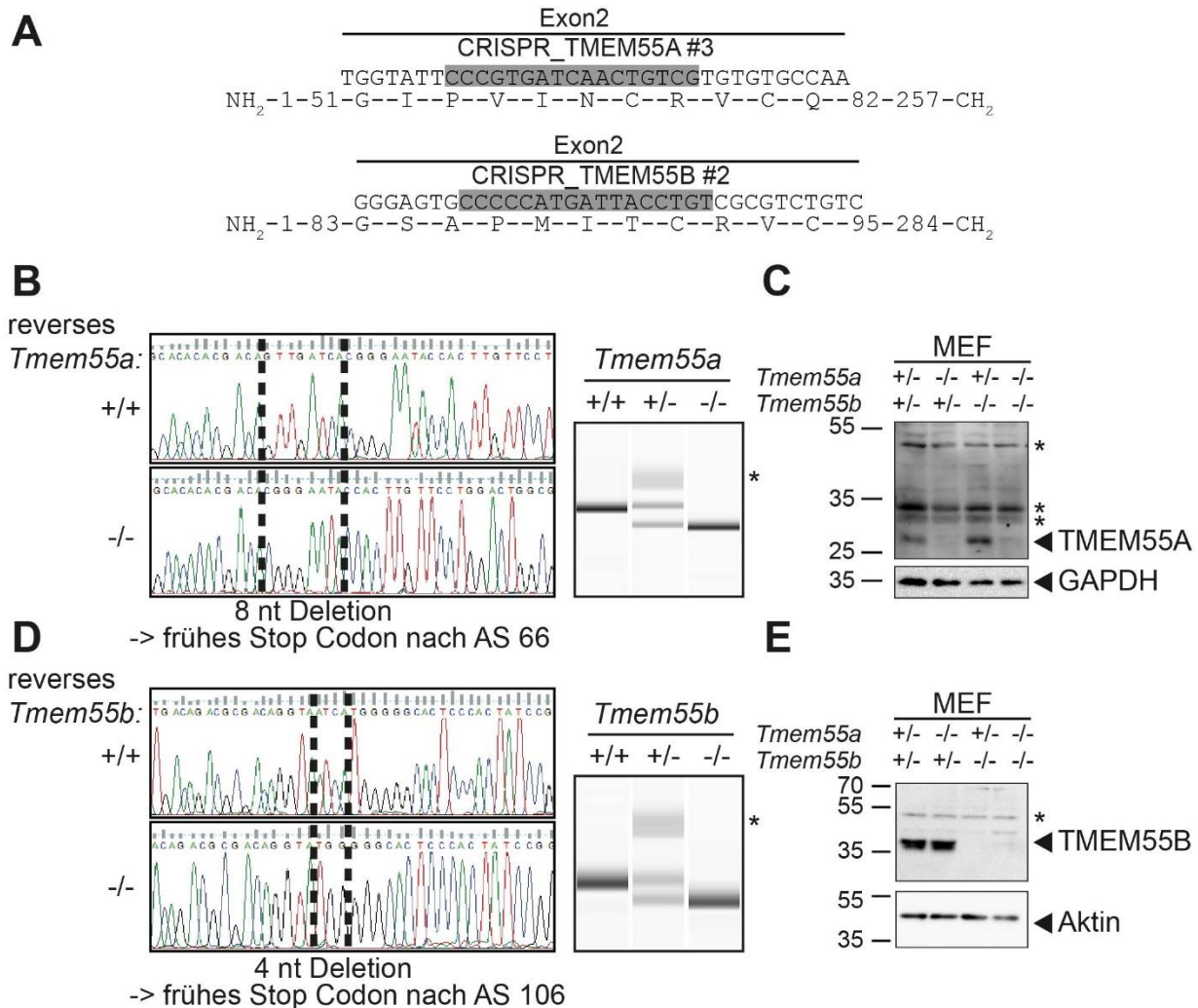


Abb. 9 CRISPR/Cas9-vermittelter KO von TMEM55A und TMEM55B in Mäusen und MEF Isolation.

(A) Verwendete Leit-Sequenzen für *Tmem55a* und *Tmem55b* (B) Vergleich der Wildtyp Sequenz von *Tmem55a* zum generierten *knockout* und die daraus resultierende Auftrennung einer Genotypisierungs-PCR mittels Kapillargelelektrophorese. (C) MEFs wurden isoliert, lysiert und per Immunoblot auf Anwesenheit von TMEM55A analysiert. Als Ladekontrolle dient GAPDH. Unspezifische Banden wurden mit * markiert. (D) Vergleich der Wildtyp Sequenz von *Tmem55b* zum generierten *knockout* und die daraus resultierende Auftrennung einer Genotypisierungs-PCR mittels Kapillargelelektrophorese. (E) MEFs wurden isoliert, lysiert und per Immunoblot auf Anwesenheit von TMEM55B analysiert. Als Ladekontrolle dient Aktin. Unspezifische Banden wurden mit * markiert.

4.5. Die Verteilung von Lysosomen in TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten MEFs ist unverändert

Die von Willet *et al.* (Willet *et al.*, 2017) unter TMEM55B-verminderten Bedingungen (*knockdown*) beschriebene Repositionierung von Lysosomen in die Peripherie der Zelle konnte nicht reproduziert werden. Deshalb sollte die Verteilung der Lysosomen innerhalb der Zelle auch unter TMEM55B-defizienten Bedingungen untersucht werden. Eine Rolle von TMEM55A ist in diesem Kontext zwar nicht sehr wahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden die Experimente in MEFs durchgeführt, die sowohl für TMEM55B, als auch TMEM55A defizient waren (Abb. 9 C und E), um eine potentielle redundante Funktion der beiden Proteine auszuschließen.

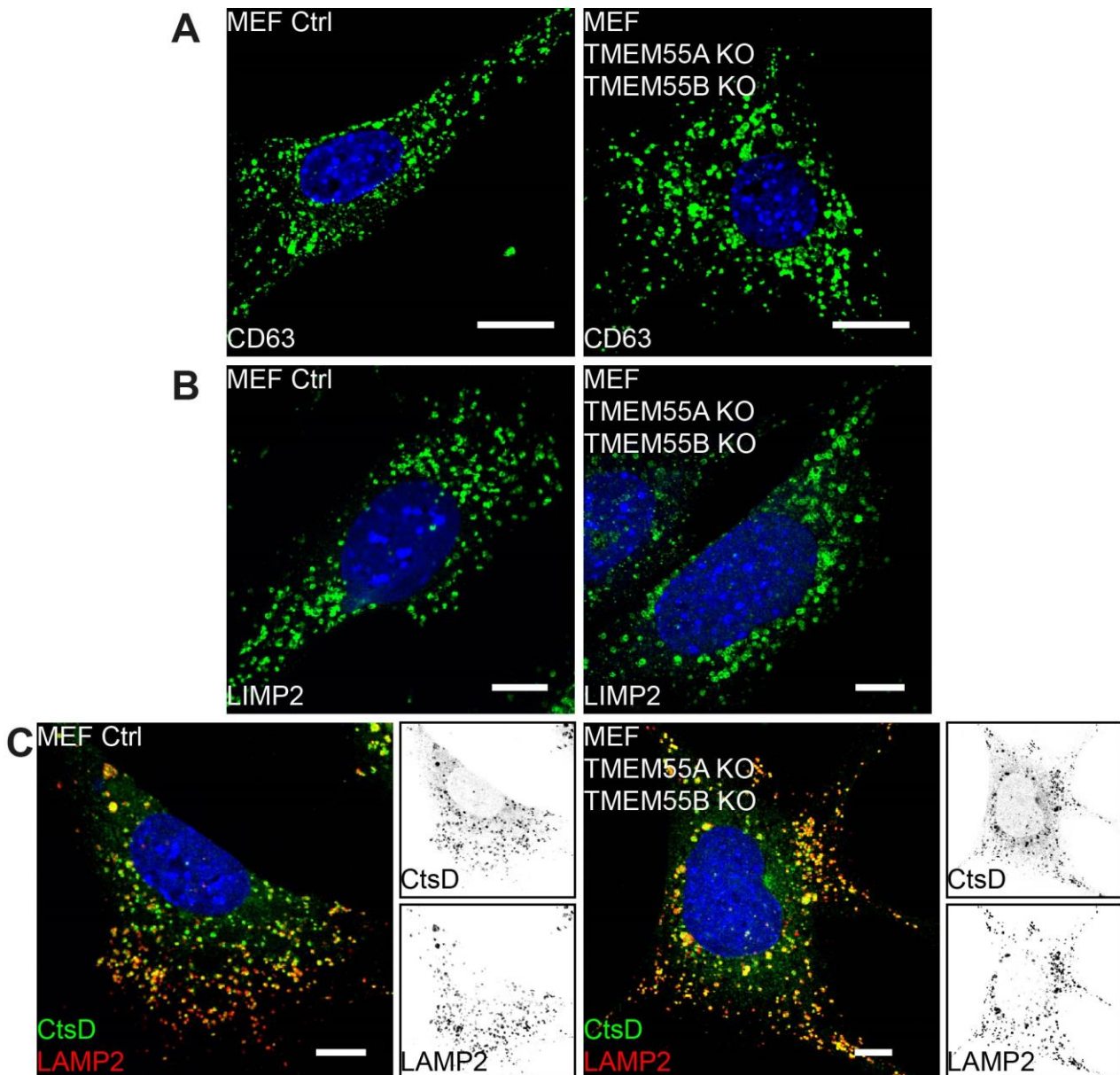


Abb. 10 Indirekte Immunfluoreszenz Analyse der Verteilung der Lysosomen in TMEM55A- und TMEM55B-doppel-defizienten MEFs.

Kontroll- und TMEM55A- und TMEM55B-doppel-defiziente Zellen wurden fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Verteilung lysosomaler Marker untersucht. **(A)** Färbung von CD63 (grün). **(B)** Färbung von LIMP2 (grün) **(C)** Färbung von Cathepsin D (CtsD) (grün) und LAMP2 (rot). Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab = 10 μ M.

Die Immunfluoreszenz-Analyse (3.3.7) der zellulären Verteilung des Tetraspanin CD63, das besonders in Lysosomen und Endosomen lokalisiert ist, zeigte keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten Zellen. Über das gesamte Zytosol der Zellen erstreckten sich Vesikel-förmige Signale. Es konnte dabei keine periphere Akkumulation gezeigt werden (**Abb. 10 A**). Auch mit Färbungen der Lysosomen mit Antikörpern gegen die lysosomalen Membranproteinen LAMP2 und *lysosomal integral membrane proteins 2* (LIMP2) war keine veränderte Verteilung oder Anhäufungen von Lysosomen in den defizienten

Ergebnisse

Zellen zu sehen. Die Größe der Lysosomen war zwischen den Kontrollzellen und den defizienten Zellen vergleichbar (**Abb. 10 B und C**). Eine Kofärbung von LAMP2 und Cathepsin D zeigte, dass zumindest Cathepsin D in den Vesikeln vorhanden war. Eine Kolo­kalisierung beider Fluoreszenzsignale konnte in den Kontrollzellen und in den doppelt-defizienten Zellen beobachtet werden (**Abb. 10 C**). Ein normaler Transport von Cathepsin D als lösliches lysosomales Protein findet ohne TMEM55A und TMEM55B also weiterhin statt.

Die Untersuchungen zeigen, dass in MEF-Zellen, denen TMEM55A und TMEM55B fehlen, die Positionierung der Lysosomen innerhalb der Zelle nicht verändert ist und so auch keine Lysosomen in der Peripherie der Zelle akkumulieren. Zusammen mit den Befunden aus den Experimenten, in denen die TMEM55B Biosynthese per siRNA in Hela-Zellen reduziert wurde, stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu dem von Willett *et al.* (Willett *et al.*, 2017) publizierten Model.

4.6. TMEM55A und TMEM55B werden mittels Dileucinmotiv zu Lysosomen transportiert

Die Analyse der Sequenzen von TMEM55B und TMEM55A in über 20 Spezies zeigten hoch konservierte Aminosäuren im Bereich des N-Terminus der Proteine (**Abb. 11 A**). Innerhalb dieser Region befindet sich jeweils ein Dileucinmotiv ([D/E]XXXLL) (**Abb. 11 A**), welches mittels Adaptor-Protein-Komplexen potentiell den Transport vom Golgi Komplex zum Lysosom vermitteln kann. Um die Funktionalität des Dileucinmotivs in TMEM55A und TMEM55B zu untersuchen, wurden Mutanten der cDNA der HA-markierten Fusionsproteine generiert, bei denen die beiden Leucinreste gegen Alaninreste ausgetauscht wurden (im Folgenden als LL/AA abgekürzt). Die Expressionsvektoren wurden in Hela-Zellen überexprimiert (3.3.5) und in indirekter Immunfluoreszenz (3.3.7) auf Lokalisation der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp analysiert.

TMEM55B ist wie oben beschrieben in Lysosomen lokalisiert, die nach Überexpression von TMEM55B in der Nähe des Nukleus akkumulieren (**Abb. 11 B links**). Die Expression der LL/AA-Mutante hingegen zeigte eine deutliche Färbung der Plasmamembran, verschiedener intrazellulärer Vesikel, aber auch von Lysosomen. Die LAMP2 positiven Vesikel häuften sich, wie bei der Überexpression des Wildtyps proximal zum Zellkern an (**Abb. 11 B rechts**). Daraus lässt sich schließen, dass der Transport zum Lysosom weiterhin funktioniert. TMEM55B wird jedoch jetzt entweder auch zur Plasmamembran transportiert oder aber nicht mehr von der Plasmamembran wegtransportiert. Auch TMEM55A lässt sich durch die Mutation der Leucinreste zu Alaninresten an die Plasmamembran leiten (**Abb. 11 C**).

Ergebnisse

Dieser Versuch zeigt, dass gewisse Abschnitte des Transports von TMEM55A und TMEM55B abhängig vom N-terminalen Dileucinmotiv sind. Es besteht jedoch anscheinend ein weiterer Transportmechanismus, der die Proteine z.B. über Endozytose ins Lysosom transportiert.

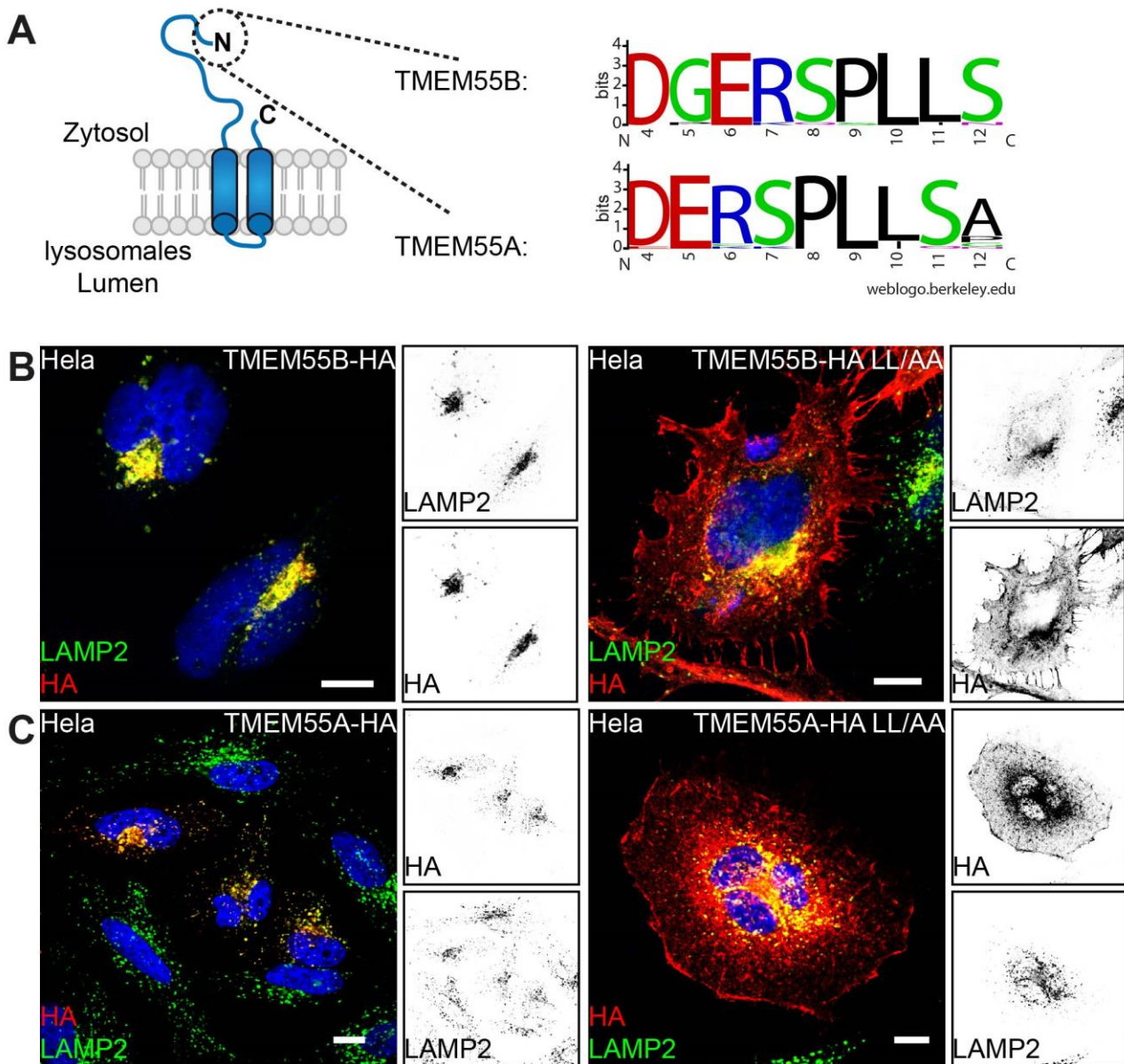


Abb. 11 Dileucinmotiv-vermittelter Transport von TMEM55B und TMEM55A zu Lysosomen.

(A) Putative Topologie von TMEM55B und TMEM55A. Das Maß an Konservierung des im N-Terminus liegenden Dileucinmotivs ([D/E]XXXLL) beider Proteine wurde mit „weblogo“ dargestellt. Größe der Buchstaben korreliert mit dem Grad an Konservierung. Aminosäuren wurde je nach chemischen Eigenschaften eingefärbt: Polar = grün, basisch = blau, sauer = rot, hydrophob = schwarz. (B) Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen, die TMEM55B-HA (links) oder TMEM55B-HA LL/AA (rechts) überexprimieren. Gefärbt wurde der HA-Tag (rot) und als Marker für Lysosomen diente LAMP2 (grün). (C) Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen, die TMEM55A-HA (links) oder TMEM55A-HA LL/AA (rechts) überexprimieren. Gefärbt wurde HA (rot) und als Marker für Lysosomen diente LAMP2 (grün). Maßstab = 10 µm.

4.7. Die beschriebene Phosphataseaktivität von TMEM55B ist nicht zu reproduzieren

TMEM55B wurde initial von Ungewickell *et al.* als Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat-4-phosphatase (PI(4,5)P₂) beschrieben (Ungewickell *et al.*, 2005). PI(4,5)P₂ ist ein Phosphatidylinositol, das hauptsächlich an der Plasmamembran, zu geringen Teilen aber auch in der Membran des Lysosoms vorkommt (Tan, Thapa, Choi, & Anderson, 2015). Es sollte untersucht werden, ob trotz geringer übereinstimmender Lokalisation des Phosphatidylinositols mit TMEM55B die Defizienz von TMEM55B in MEF Zellen einen Einfluss auf das Vorkommen von PI(4,5)P₂ hat.

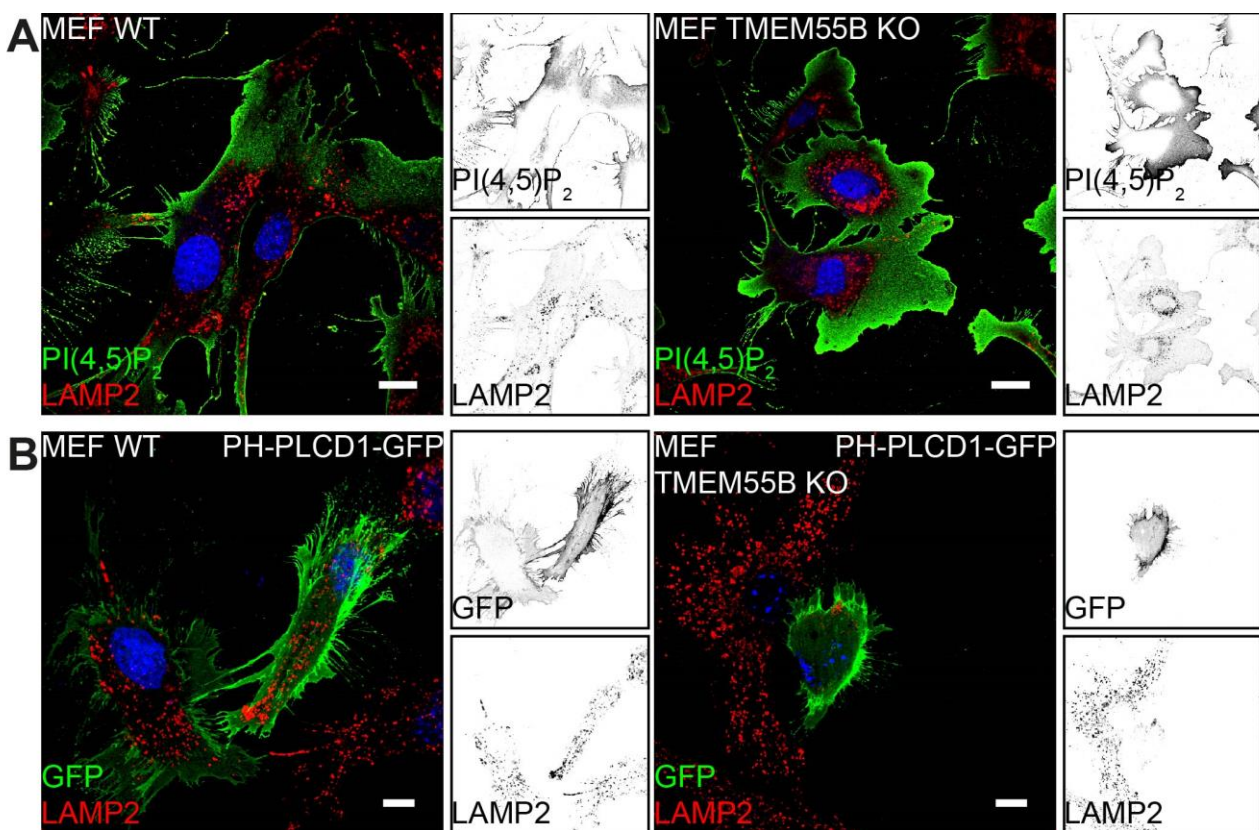


Abb. 12 Analyse der Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PI(4,5)P₂) Verteilung in TMEM55B *knockout* MEFs.

(A) Wildtyp und TMEM55B KO MEFs wurden fixiert, um mit Antikörpern PIPs zu detektieren. Die Zellen wurden auf PI(4,5)P₂ (grün) und als LAMP2 (rot) als lysosomalen Marker gefärbt. (B) Wildtyp und TMEM55B KO MEFs wurden mit PH-PLCD1-GFP transfiziert, das an PI(4,5)P₂ bindet und indirekt in der Immunfluoreszenz sichtbar macht. Als lysosomaler Marker wurde LAMP2 gefärbt. Maßstab = 10 µm.

Dafür wurden MEF Wildtyp und TMEM55B-defiziente Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung fixiert (3.3.7) und anschließend die Zellen mit Antikörpern gegen PI(4,5)P₂ (grün) und LAMP2 (rot) gefärbt. Für PI(4,5)P₂ war eine klare Plasmamembranlokalisierung zu erkennen, sowohl in Wildtyp als auch in TMEM55B-defizienten Zellen. PI(4,5)P₂ konnte weder in den Kontrollzellen noch in

Ergebnisse

TMEM55B-defizienten Zellen in vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle, inklusive der Lysosomen detektiert werden (**Abb. 12 A**).

In einem zweiten methodisch unabhängigen Ansatz, wurden die Zellen mit einem Fusionsprotein aus einer PI(4,5)P₂-bindedomäne des Proteins PLCD1 an GFP gekoppelt transfiziert (3.3.5). Die Domäne interagiert mit dem Phosphatidylinositolphosphat und das GFP führte zu einer indirekten Markierung des Phosphatidylinositols (Varnai & Balla, 1998). Lysosomen wurden wieder mit Antikörper gegen LAMP2 gefärbt. Auch in diesem Ansatz konnte für PI(4,5)P₂ eine Plasmamembranlokalisierung gezeigt werden, jedoch keine Kolo-kalisation mit Lysosomen oder eine Lokalisation in anderen zytosolisch lokalisierten Vesikeln (**Abb. 12 B**).

Da eine Kolo-kalisation des lysosomalen Proteins TMEM55B mit dem putativen Substrat PI(4,5)P₂ nicht gezeigt werden konnte, fällt es schwer, Schlüsse auf eine Phosphataseaktivität des Proteins zu ziehen. Um Enzym und Substrat *in cellulo* an einen gemeinsamen Reaktionsort zu bringen, wurden in HeLa-Zellen TMEM55B-HA LL/AA, das an die Plasmamembran transportiert wird (**Abb. 11**), zusammen mit PH-PLCD1-GFP überexprimiert (3.3.5). Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz analysiert (3.3.7).

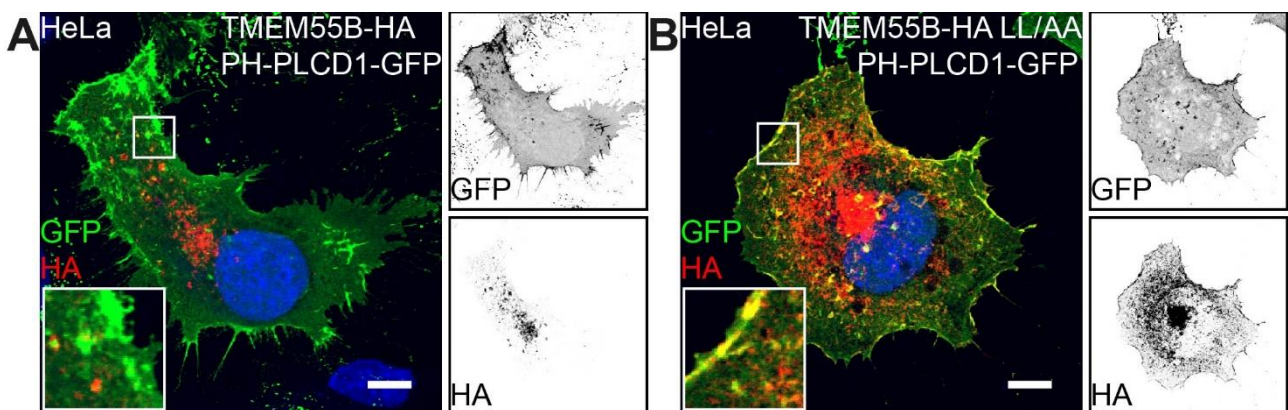


Abb. 13 Indirekte Immunfluoreszenz der Wechselwirkung zwischen TMEM55B und PI(4,5)P₂.

HeLa-Zellen wurden mit (A) TMEM55B-HA oder (B) TMEM55B-HA LL/AA und zur Detektion von PI(4,5)P₂ mit PH-PLCD1-GFP transfiziert und nach 24 Stunden fixiert. Die Zellen wurden gegen HA (rot) gefärbt. GFP ist grün dargestellt. Maßstab = 10 µm.

Die Überexpression von TMEM55B-HA zeigte, wie die Analyse der MEF Zellen, keine Kolo-kalisation von TMEM55B und PI(4,5)P₂ (**Abb. 13 A**). Wurde jedoch TMEM55B-HA LL/AA überexprimiert, war eine deutliche Kolo-kalisation des Proteins mit PI(4,5)P₂ an der Zellmembran zu erkennen. Dabei veränderte sich die Signalintensität von PI(4,5)P₂ nicht im Vergleich zur WT-Kontrolle. Eine Expression von TMEM55B und seinem putativen Substrat PI(4,5)P₂ an einem gemeinsamen

Ergebnisse

zellulären Kompartiment führte zu keiner offensichtlichen Verringerung des PI(4,5)P₂ Signals (**Abb. 13 A & B**).

In diesen Experimenten konnte keine gemeinsame Lokalisation von TMEM55B und PI(4,5)P₂ endogen und unter Überexpression von TMEM55B gezeigt werden. Die Defizienz von TMEM55B hatte auch keine ersichtlichen Auswirkung auf die PI(4,5)P₂-Level. Der Transport von TMEM55B-HA LL/AA an die Plasmamembran konnte auch keine Abnahme der PI(4,5)P₂ Konzentration bewirken. Die Ergebnisse stehen konträr zur initialen Charakterisierung von TMEM55B durch Ungewickell *et al.* und stellen die beschriebene Phosphataseaktivität in Frage (Ungewickell *et al.*, 2005).

4.8. Autophagie ist in TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten MEFs nicht verändert

TMEM55B ist ein lysosomales Protein, beteiligt an lysosomalem Transport und sein putatives Substrat PI(4,5)P₂ wurde mit „*Autophagic Lysosome Reformation (ALR)*“, der Neubildung von Lysosomen während laufender Autophagie, in Zusammenhang gebracht (Rong *et al.*, 2012; Willett *et al.*, 2017). Sowohl ein gestörter lysosomaler Transport, als auch eine verminderte Neubildung von Lysosomen kann Einfluss auf die Anzahl an freien Lysosomen in der Zelle haben. Deshalb wurde mittels Immunoblot (3.4.13) untersucht, ob die Defizienz von TMEM55B oder auch des Paralogs TMEM55A die Level von lysosomalen Markern verändert. Wie schon in Immunfluoreszenzfärbungen angedeutet (**Abb. 10 C**), veränderte sich die Intensität des LAMP2 Signals nicht zwischen den verschiedenen Genotypen (**Abb. 14 A**). Auch auf die Level von LIMP2 hatte das Fehlen von TMEM55A und TMEM55B keinen Effekt (**Abb. 14 B**).

Als Indikator für veränderte Reifung und Azidifizierung von Lysosomen kann die lysosomale Hydrolase Cathepsin D genutzt werden, da die Bildung der maturen Form von Cathepsin D maßgeblich von der Ansäuerung und Funktionalität der Lysosomen abhängt (Gieselmann, Hasilik, & von Figura, 1985). Im Immunoblot konnten drei Banden nachgewiesen werden. Eine Bande bei ~ 48 kDa zeigt die Proform, eine bei ~47 kDa zeigt eine intermediäre Form und eine dritte bei ~30 kDa bildet die schwere Kette des reifen Cathepsin D ab. Zwischen den Kontrollzellen, den TMEM55A- und TMEM55B-einzel-defizienten und den doppel-defizienten Zellen unterschieden sich die Intensitäten der Banden nicht (**Abb. 14 B**). In MEFs war also eine veränderte Reifung von Cathepsin D unter TMEM55A und TMEM55B defizienten Bedingungen nicht nachweisbar. Es kann folglich geschlossen werden, dass sich wahrscheinlich auch die Reifung von Lysosomen durch das Fehlen von TMEM55B nicht wesentlich verändert.

Ergebnisse

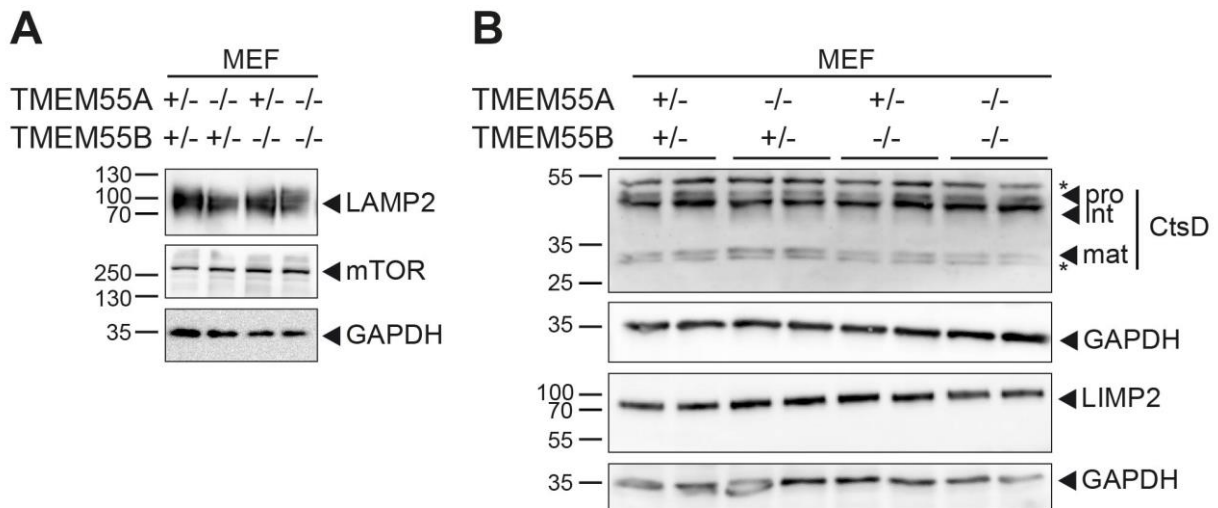


Abb. 14 Immunoblot Analyse von lysosomalen Markern.

MEF Zellen wurden lysiert und per Immunoblot analysiert. **(A)** Verwendet wurden Antikörper gegen LAMP2 und mTOR. GAPDH diente als Ladekontrolle **(B)** Es wurden auf einem Immunoblot mit technischen Replikaten Antikörper gegen Cathepsin D (CtsD) und LIMP2 verwendet. Für Cathepsin D wurden die Proform (pro), die intermediäre Form (int) und die mature Form (mat) gekennzeichnet. Unspezifische Banden wurden mit „*“ gekennzeichnet. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Die Experimente zeigen keine Veränderungen in der Konzentration von Membranproteinen und löslichen Proteinen des Lysosoms in TMEM55-defizienten MEFs und deuten darauf hin, dass die Reifung der Lysosomen nicht beeinträchtigt ist.

Auch für den Ablauf von Autophagie ist ein funktionierender retrograder Transport von Lysosomen erforderlich, da die Fusionsprozesse von Autophagosomen und Lysosomen insbesondere perinukleär ablaufen (Korolchuk et al., 2011). Ohne funktionierende Fusion und damit Reifung der Autophagosomen würde keine Degradation des autophagozytierten *Cargo* mehr stattfinden. Der Autophagiefluss wäre gestört. Um zu überprüfen, ob das Gleichgewicht der Autophagie unter basalen Bedingungen verändert ist, wurden Kontroll- und TMEM55A&B-doppelt-defiziente MEF Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert. Dafür wurde sie fixiert und mit Antikörpern gegen LC3 und LAMP2 gefärbt (3.3.7). Sowohl Wildtyp, als auch die defizienten Zellen zeigten eine gleichmäßige Verteilung von LAMP2 positiven Vesikel in der Zelle. LC3 war überwiegend diffus im Zytosol verteilt. Es konnte aber auch in einigen vesikulären Strukturen detektiert werden. Die LC3 Vesikel kolokalisierten teilweise mit den LAMP2 Vesikeln. Ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen war nicht zu erkennen (**Abb. 15 A**).

Ergebnisse

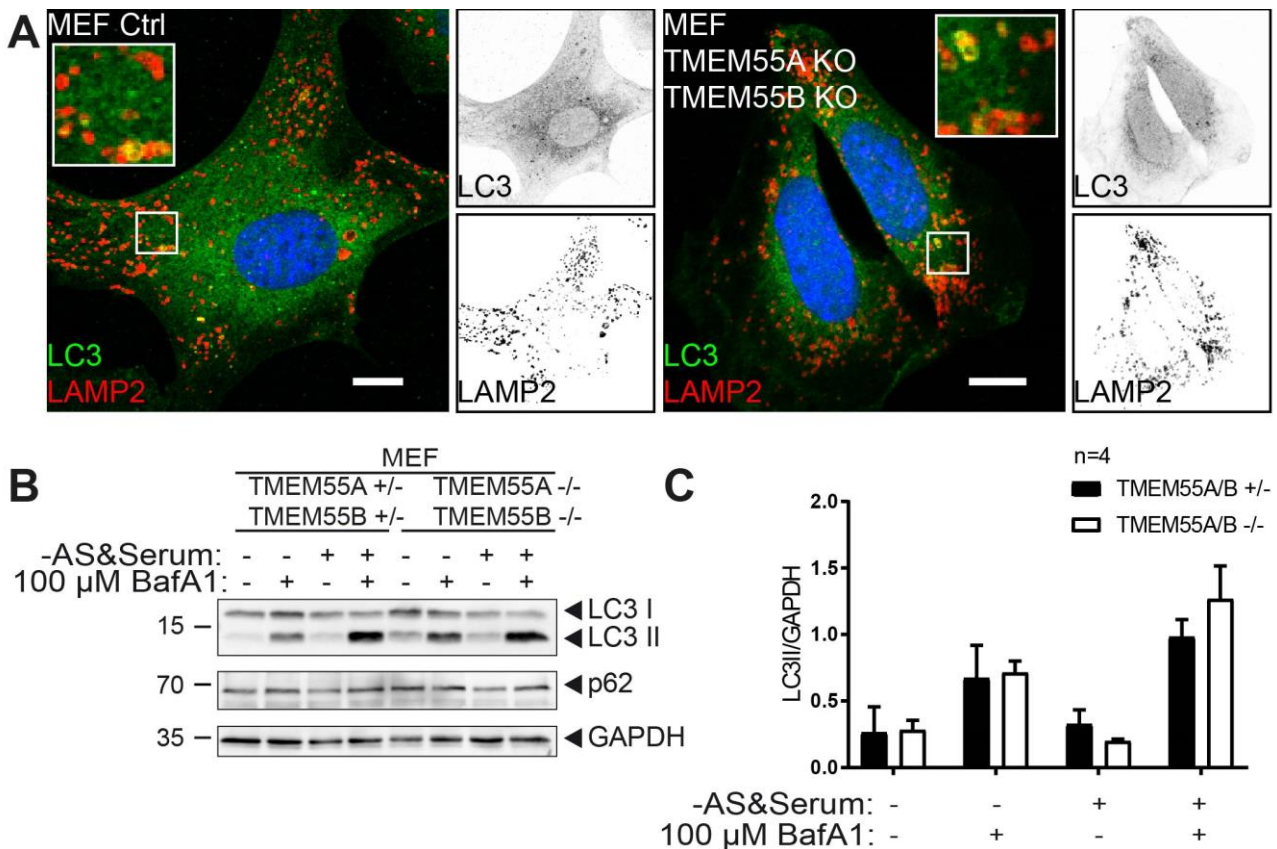


Abb. 15 Analyse des Autophagieflusses in TMEM55A und TMEM55B doppel-*knockout* MEFs.

(A) Indirekte Immunfluoreszenz von Kontroll- und TMEM55A und TMEM55B doppel-*knockout* MEFs. Gefärbt wurden LC3 (grün) und LAMP2 (rot). Maßstab = 10 μm. (B) Immunoblotanalyse des Autophagieflusses. WT und doppel-*knockout* MEFs wurden mit DMSO oder 100 μM Bafilomycin A1 in DMEM/FCS oder EBSS Medium inkubiert, lysiert und per Immunoblot auf die Autophagiemarker LC3 und p62 untersucht. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (C) Quantifizierung des Autophagieflusses in MEF Zellen.

Um zu untersuchen, ob der Autophagiefluss in TMEM55A- und TMEM55B-doppel-defizienten Zellen verändert ist, wurden MEF Zellen zur Induktion von Autophagie für zwei Stunden Serum und Aminosäuren entzogen (3.3.9). Der Verlauf der Autophagie wird dabei über die Lipidierung von LC3 an Phosphatidylethanolamine, also der Bildung von LC3-II, verfolgt. Lösliches LC3-I und Membran-assoziiertes LC3-II können im Immunoblot anhand von unterschiedlichem Laufverhalten während der SDS-PAGE unterschieden werden. Da während der Autophagie laufend LC3-II degradiert wird, kann die Autophagieinduktion nicht ohne Weiteres exakt analysiert werden. Die Zellen wurden deshalb zusätzlich mit Bafilomycin A1, einem Inhibitor der v-ATPase, behandelt (Drose & Altendorf, 1997). Durch den steigenden pH-Wert im Lysosom werden die Hydrolasen inaktiv, und LC3-II und alle anderen Proteine nicht mehr abgebaut. So kann die gesamte Menge an neu generiertem LC3-II gemessen werden (Klionsky et al., 2016). In den Kontrollzellen führte eine Behandlung mit Bafilomycin A1 zu einer stärkeren Intensität von LC3-II im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, da auch basal ablaufende Autophagie beobachtet werden kann. Der alleinige Entzug von Serum und Aminosäuren führte nur zu einem sehr geringen Anstieg der LC3-II Intensität. Das stärkste

Ergebnisse

Signal war bei gleichzeitiger Inhibition der v-ATPase und unter Hungerbedingungen zu sehen (**Abb. 15 B**). In TMEM55A&B-doppel-defizienten Zellen verhielt es sich vergleichbar. Hunger führte zu stärkerer LC3-II Bildung, was unter Bafilomycin A1 Behandlung auch im Immunoblot gesehen werden konnte. Die Intensitäten der jeweiligen Behandlungen unterschied sich nicht zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten Zellen (**Abb. 15 B**). In der Quantifizierung der beschriebenen Signale im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH wurden keine statistischen Unterschiede gezeigt (**Abb. 15 C**).

Die Versuche zeigten, dass sowohl unter basalen Bedingungen, als auch unter Hungerbedingungen keine Unterschiede in der Bildung und dem Abbau von LC3-II zwischen den Kontrollzellen, als auch den TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten MEF Zellen vorlagen.

4.9. Der mTORC1-Signalweg ist in TMEM55B-defizienten MEFs nicht verändert

TMEM55B besitzt einen ungefähr 220 Aminosäure-großen zytosolischen N-Terminus (**Abb. 6 A**), der potentiell Interaktionen mit zytosolischen Proteinen und Proteinkomplexen der Zelle vermitteln kann. Das Lysosom erlangte in den letzten Jahren immer mehr den Status einer Schaltstelle für zelluläre Signalwege (Lamming & Bar-Peled, 2019). Einer dieser Signalwege ist der mTORC1-Signalweg, der Anabolismus und Katabolismus verbindet. Die Regulation der mTORC1-Aktivität ist vielschichtig und verläuft über mehrere Achsen. Zentraler Bestandteil der Aktivierungsmaschinerie ist der Ragulator Komplex. Er besteht aus fünf Untereinheiten, LAMTOR1-5, und ist an der Rekrutierung von mTORC1 an das Lysosom beteiligt. Am Lysosom findet dann die Aktivierung von mTORC1 statt (Zoncu et al., 2011). TMEM55B und LAMTOR1 besitzen Gemeinsamkeiten. So sind beide Proteine lysosomal lokalisiert, beide sind am Transport von Lysosomen beteiligt und interagieren mit Elementen der MAP-Kinasen Kaskade (Filipek et al., 2017; C. M. Lee, Onesime, Reddy, Dhanasekaran, & Reddy, 2002; Magee & Cygler, 2011; Willett et al., 2017). Die Überschneidungen der Funktionen und ihrer lysosomalen Lokalisation könnten auf eine direkte Wechselwirkung beider Proteine hindeuten. Um zu überprüfen, ob TMEM55B und LAMTOR1 direkt interagieren, wurde ein Ko-Immunopräzipitations Experiment durchgeführt. Dafür wurden C-terminal HA markiertes TMEM55B mit C-terminal HA markiertem LAMTOR1 in Hela-Zellen überexprimiert und eine Präzipitation mit Antikörper gegen TMEM55B durchgeführt (3.4.5). Die Immunpräzipitations-Fraktion wurde mittels Immunoblot analysiert. Als Kontrolle für ein nicht interagierendes lysosomales Membranprotein wurde LAMP1 gewählt. In den Proteinextraktkontrollen waren die Banden der überexprimierten Proteine zu erkennen, TMEM55B bei ~36 kDa, LAMTOR1 bei ~18 kDa und LAMP1 bei ~100 kDa. Aus der Präzipitation war ersichtlich, dass LAMTOR1 mit TMEM55B kopräzipitiert, LAMP1 jedoch nicht (**Abb. 16**).

Ergebnisse

Der Versuch zeigt, dass eine Interaktion zwischen TMEM55B und der zentralen Untereinheit des LAMTOR Komplexes, LAMTOR1, besteht.

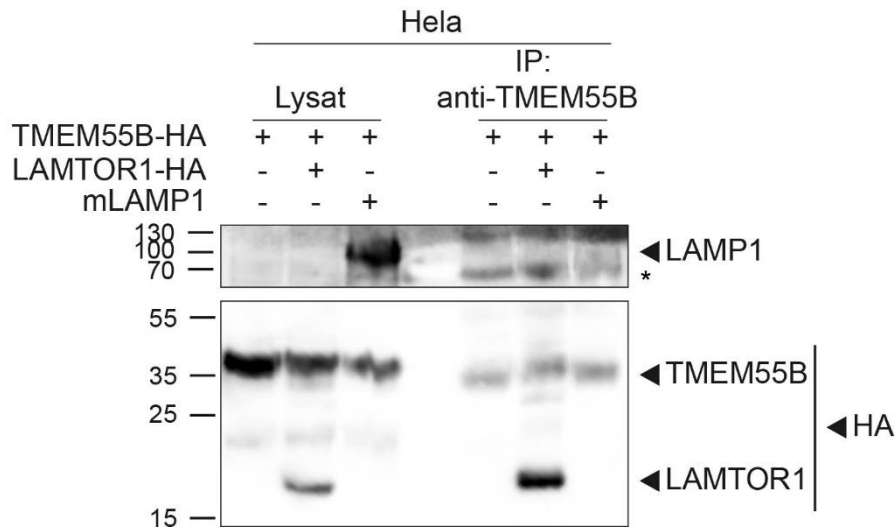


Abb. 16 Ko-Immunopräzipitation von TMEM55B und LAMTOR1.

HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA allein, zusammen mit LAMTOR1-HA und als Kontrolle mit mLAMP1 transfiziert. Nach 24 h wurde eine Immunpräzipitation mit Antikörper gegen TMEM55B durchgeführt und per Immunoblot analysiert. Die Präzipitation und Kopräzipitation wurde mit HA-Antikörper und LAMP1 Antikörper geprüft.

Anschließend sollte überprüft werden, ob diese Interaktion von TMEM55B mit LAMTOR1 auch einen Effekt auf die Kinase-Aktivität von mTORC1 hat. Dafür wurde ein Reaktivierungs-Assay mit TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten MEFs durchgeführt (3.3.10). Dabei wurde durch zweistündigen Entzug von Aminosäuren und Serum mTORC1 deaktiviert und durch die Zugabe eines definierten Aminosäuregemischs wieder aktiviert (**Abb. 17 A** und siehe 3.3.10). Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Torin1, einem mTORC1-Inhibitor, behandelt (Q. Liu et al., 2010). Die Aktivität von mTORC1 wurde über den Phosphorylierungsstatus des Substrats p70S6K verfolgt.

In den Kontrollzellen war nach dem Entzug von Aminosäuren und Serum kein Signal von phosphoryliertem p70S6K zu detektieren, vergleichbar mit den Torin1-behandelten Zellen. 60 Minuten nach der Zugabe von Aminosäuren war wieder ein Signal von phosphoryliertem S6K mit einer Intensität von ~ 10% des Ausgangswertes zu detektieren. Über die nächste Stunde stieg die Intensität nur schwach weiter an. Die Intensität der Signale für das gesamte p70S6K blieb zu allen Zeitpunkten gleich. Derselbe Verlauf der Intensitätsänderungen war auch in TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten Zellen zu erkennen (**Abb. 17 B**). Die Quantifizierung des Verhältnisses zwischen phosphoryliertem und totalem p70S6K zeigte zwischen Kontrolle und defizienten Zellen keinen signifikanten Unterschied (**Abb. 17 C**).

Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass TMEM55B mit LAMTOR1, einem Teil der mTORC1-Maschinerie, interagiert, aber auch, dass diese Interaktion wahrscheinlich keinen funktionellen Einfluss auf die Reaktivierung von mTORC1 mit Aminosäuren hat.

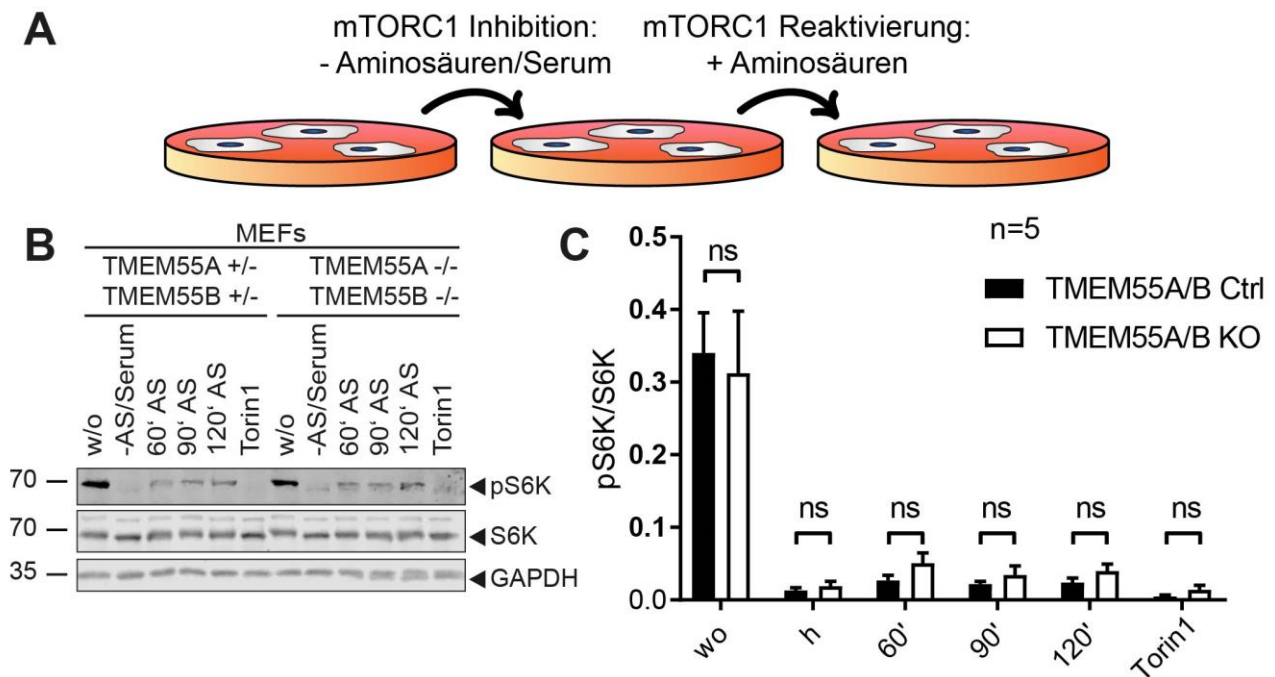


Abb. 17 Immunoblot Analyse von Aminosäure-vermittelter mTORC1-Reaktivierung in MEFs

(A) Schematische Darstellung der mTORC1-Reaktivierung. MEF Zellen wurde für zwei Stunden Serum und Aminosäuren entzogen. Anschließend wurden sie für die angegebene Zeit in DMEM Medium inkubiert. (B) Die Zellen wurden lysiert und im Immunoblot auf den Phosphorylierungsstatus von p70S6K (S6K) untersucht. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (C) Relation der Quantifizierung der phospho-p70S6K und p70S6K Signale. Gezeigt ist der Mittelwert aus fünf technischen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwerts.

4.10. TMEM55B ist an mehreren Cysteinresten palmitoyliert

In verschiedenen massenspektrometrischen Studien mit dem Ziel, Proteom-weit Palmitoyl-modifizierte Proteine zu identifizieren, wurde mehrfach TMEM55B als palmitoyliertes Protein nachgewiesen (Sanders et al., 2015). Auch das interagierende Protein LAMTOR 1 (**Abb. 16**), das potentiell in einem funktionellen Zusammenhang steht, ist palmitoyliert (Martin & Cravatt, 2009). Palmitoylierung ist eine posttranslationale Modifikation in der reversibel und dynamisch eine Palmitinsäure an Cysteinreste kovalent gebunden wird. Palmitoylierungen kann dabei eine Rolle im zellulären Transport des Proteins aufweisen, eine Interaktion von Proteinen vermitteln oder, für Proteine ohne Transmembrandomäne, eine Assoziation an Membranen ermöglichen (Charollais & Van Der Goot, 2009). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob TMEM55B palmitoyliert ist, wie oft es palmitoyliert ist und welche Cysteinreste palmitoyliert sind. Im Weiteren sollte eine Rolle der Palmitoylierung von TMEM55B auf die bislang bekannten Funktionen des Proteins gezeigt werden.

Ergebnisse

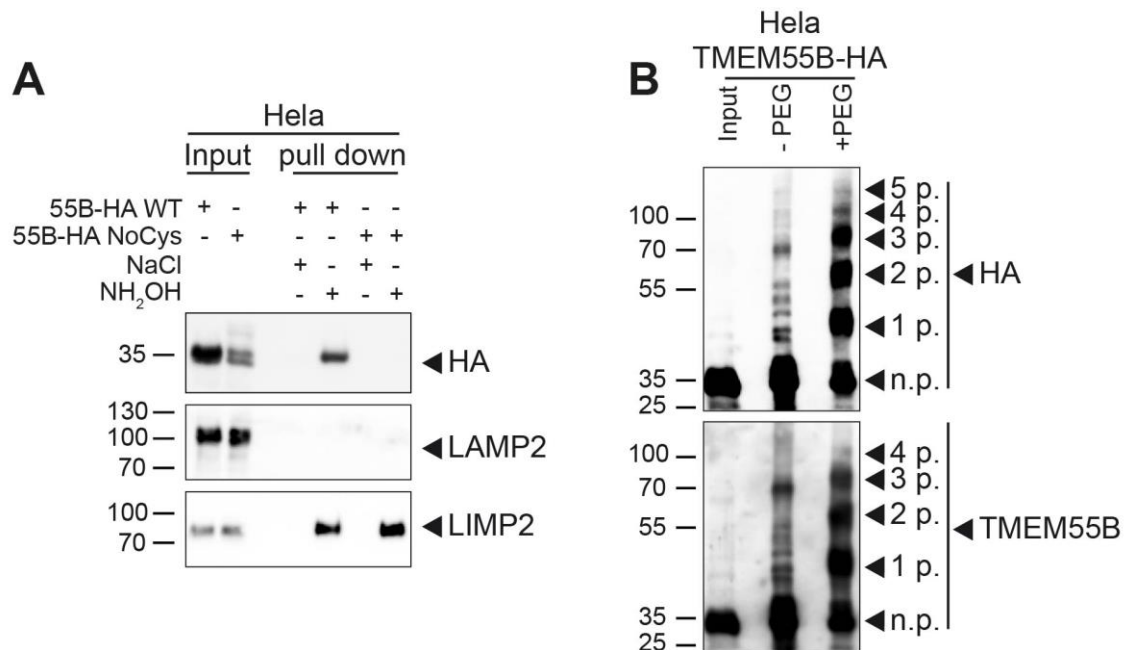


Abb. 18 TMEM55B ist an mehreren Cysteinresten palmitoyliert.

(A) HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA Wildtyp oder TMEM55B-HA NoCys transfiziert und nach 24 Stunden in einem AcylRac Assay weiterverarbeitet. Die pull-down Fraktionen des Assays wurden im Immunoblot analysiert. Die überexprimierten Proteine wurden mit Antikörper gegen HA-Tag nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente LAMP2, als Positivkontrolle LIMP2. (B) HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA transfiziert und es wurde nach 24 Stunden ein Acyl-PEG-Austausch-Assay mit PEG einer mittleren Molaren Masse von $M_n = 5000$ g/mol durchgeführt. Die Analyse erfolgte im Immunoblot, mit Antikörpern gegen den HA-Tag und gegen TMEM55B. Markiert wurden die unterschiedlich häufig palmitoylierten Formen des Proteins.

Um zu untersuchen, ob Cysteinreste in TMEM55B S-palmitoyliert vorliegen, wurde als Kontrolle eine Mutante von TMEM55B-HA generiert, in der alle 19 Cysteinreste mit Serinresten ausgetauscht wurden (im Folgenden TMEM55B-HA NoCys). TMEM55B-HA Wildtyp und NoCys wurden in HeLa-Zellen überexprimiert (3.3.5). Mit den Zelllysaten wurde ein AcylRac-Assay durchgeführt (3.4.9). Das Prinzip eines AcylRac-Assays basiert darauf, erst alle freien Thiol-Gruppen der Proteine zu schützen, durch Entfernen von Palmitatresten mit Hydroxylamin neue freie Thiolgruppen zu generieren und diese für eine Affinitätsreinigung zu nutzen (Forrester et al., 2011). So befinden sich in der präzipitierten Fraktion nur Proteine, die palmitoyliert im Lysat vorlagen. Als Kontrolle für den erfolgreichen Schutz der Thiolgruppen wurde mit Zellextrakten, die nur mit Natriumchlorid inkubiert wurden, eine Präzipitation durchgeführt. Diese Zellextrakte wurden also nicht depalmitoyliert. Somit wurden bei ihnen keine freien Thiolgruppen generiert, die für eine Affinitätsreinigung verwendet werden könnten. In der Immunoblotanalyse des AcylRac-Assays von TMEM55B-HA Wildtyp war in der präzipitierten Fraktion ein Signal in der gleichen Höhe zu sehen, wie auch im ursprünglichen Proteinextrakt (**Abb. 18 A**). In der nicht mit Hydroxylamin behandelten Kontrolle war kein Signal detektierbar. Die „NoCys“-Mutante von TMEM55B zeigte hingegen kein Signal nach Inkubation mit Hydroxylamin. Als Kontrolle für nicht palmitoylierte Proteine wurde endogenes LAMP2 getestet, das in den präzipitierten Fraktionen nicht zu detektieren war (**Abb. 18 A**). Die Positiv.Kontrolle LIMP2

Ergebnisse

(unpublizierte Daten, Saskia Heybrock) zeigte für die mit Hydroxylamin behandelten Proben Signale. Daraus lässt sich schließen, dass überexprimiertes TMEM55B an Cysteinresten zumindest teilweise S-palmitoyliert in der Zelle vorliegt.

Im Weiteren wurde analysiert, wie häufig TMEM55B palmitoyliert ist. Dafür wurde ein Acyl-Polyethylenglykol (PEG)-Austausch-Assay durchgeführt (3.4.10). Dieser Assay basiert chemisch auf dem AcylRac-Assay, endet im letzten Schritt jedoch nicht mit einer Affinitätsreinigung, sondern mit einer kovalenten Verknüpfung von PEG von bekannter Größe ($M_n = 5000$ g/mol) an die freien Thiolgruppen. Da Palmitoylierung reversibel und dynamisch ist, können verschieden häufig palmitoylierte Varianten der Proteine in den Zellextrakten vorliegen. Das führt zu unterschiedlich PEG-modifizierten Proteinen. Die Bindung von PEG an Proteine verändert das Laufverhalten während der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Daraus resultiert in der Immunoblot-Analyse eine Leiter von Banden, welche die verschieden häufig palmitoylierten Varianten des Proteins anzeigen. In der Immunoblot-Analyse zeigte sich in der Kontrolle des Ausgangsmaterial sowohl mit Antikörper gegen den HA-Tag, als auch mit Antikörper gegen TMEM55B die für TMEM55B beschriebene Bande bei ~35 kDa (**Abb. 18 B**). In der mit PEG behandelten Probe ist mit beiden Antikörpern eine Leiter zu sehen, mit einer starken Bande bei ~35 kDa, welche die nicht mit PEG behandelte Probe auch anzeigte, und weiteren intensiven Banden bei ~40 kDa, ~60 kDa und ~80 kDa, die TMEM55B darstellt, das einfach, zweifach und dreifach PEG kovalent gebunden hat. Weiter war mit beiden Antikörpern eine schwache Bande bei ~100 kDa detektierbar. Mit dem Antikörper gegen den HA-Tag war eine sechste Bande bei ~120 kDa zu sehen. Es könnten also geringe Mengen von TMEM55B auch viermal oder fünfmal PEG binden. In der Kontrolle von Proteinen, die nicht mit PEG behandelt wurden, waren im Bereich von 35-70 kDa schwache Banden zu erkennen, die jedoch nicht in den mit PEG behandelten Proteinextrakten detektiert wurden und somit als unspezifisch zu deuten waren (**Abb. 18 B**).

Die Versuche zeigten, dass überexprimiertes TMEM55B unterschiedlich häufig an Cysteinresten palmitoyliert wird. Die Anzahl der potentiell palmitoylierten Cysteinreste war jedoch nicht eindeutig. So war eine Palmitoylierung von mindestens drei Resten in unterschiedlich modifizierten Formen von TMEM55B nachweisbar. Vierfach oder fünffach palmitoyliertes TMEM55B schien auch möglich zu sein, aber im prozentualen Vorkommen eher selten.

4.11. Die Palmitoylierung von überexprimiertem TMEM55B-HA kann mit 2-Bromopalmitat (2BP) inhibiert werden

Palmitoylierung von Proteinen wird in Zellen durch Palmitoyltransferasen katalysiert, die eine DHHC(Asp-His-His-Cys)-Domäne gemein haben. Depalmitoylierung wird durch Acyl-Protein Thioesterasen vermittelt (Chamberlain & Shipston, 2015). 2-Bromopalmitat (2BP) wurde als potenter Inhibitor aller DHHC-Palmitoyltransferasen und einiger Acyl-Protein Thioesterasen beschrieben (Jennings et al., 2009; Pedro et al., 2013). Es sollte untersucht werden, ob auch die Palmitoylierung von TMEM55B-HA unter Überexpressionsbedingungen durch 2BP inhibiert werden kann.

Dafür wurden Hela-Zellen mit TMEM55B-HA transfiziert (3.3.5) und drei Stunden nach Transfektion für 16 Stunden mit 100 μ M 2BP inkubiert, um die Palmitoylierung des neu-synthetisierten TMEM55B-HA zu inhibieren. Anschließend wurden mit den Zellen ein AcylRac-Assay durchgeführt (3.4.9). Im Immunoblot mit einem gegen den HA-Tag gerichteten Antikörper konnte im Input zwischen den nicht behandelten und mit 2BP inkubierten Zellen kein Unterschied in der Signalintensität detektiert werden. Die Menge an neu biosynthetisierten TMEM55B-HA war folglich in beiden Proben gleich (**Abb. 19 A**). In den präzipitierten Fraktionen war das Signal von TMEM55B-HA in den mit 2BP behandelten Zellen deutlich geringer als in der Kontrolle (**Abb. 19 A**). Die Quantifizierung der Verhältnisse des gebundenen TMEM55B-HA zum Ausgangsproteinextrakt ergab zwischen unbehandelten und mit 2BP behandelten Zellen einen signifikanten Unterschied (**Abb. 19 B**). Die Palmitoylierung von überexprimierten TMEM55B konnte folglich mit 2BP inhibiert werden.

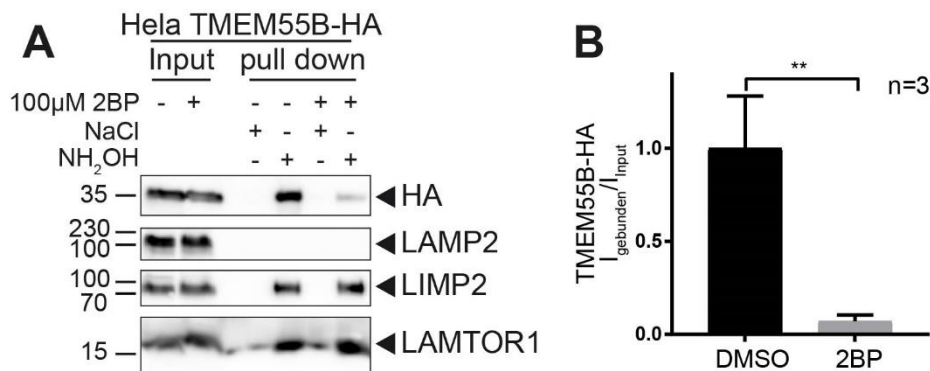


Abb. 19 Inhibition der Palmitoylierung von neugebildetem TMEM55B mit 2-Bromopalmitate.

(A) Hela-Zellen wurden mit TMEM55B-HA transfiziert. Drei Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 16 Stunden mit DMSO oder 100 μ M 2BP inkubiert. Anschließend wurde ein AcylRac-Assay durchgeführt und per Immunoblot analysiert. (B) Quantifizierung des Verhältnisses des Input zu der palmitoylierten Fraktion. Gezeigt ist der normalisierte Mittelwert aus drei technischen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwerts.

4.12. TMEM55B ist in Detergenz-resistenten Membranen lokalisiert

Eine beschriebene Funktion der Palmitoylierung von Proteinen ist die Organisation des palmitoylierten Proteins in bestimmten Membranbereichen, die sich durch eine relative Stabilität gegen bestimmte Detergenzien auszeichnen (Shogomori et al., 2005). Aufgrund dieser Stabilität werden diese Membranbereiche auch „Detergenz-resistente Membrane“ (DRM) genannt (Lichtenberg, Goni, & Heerklotz, 2005).

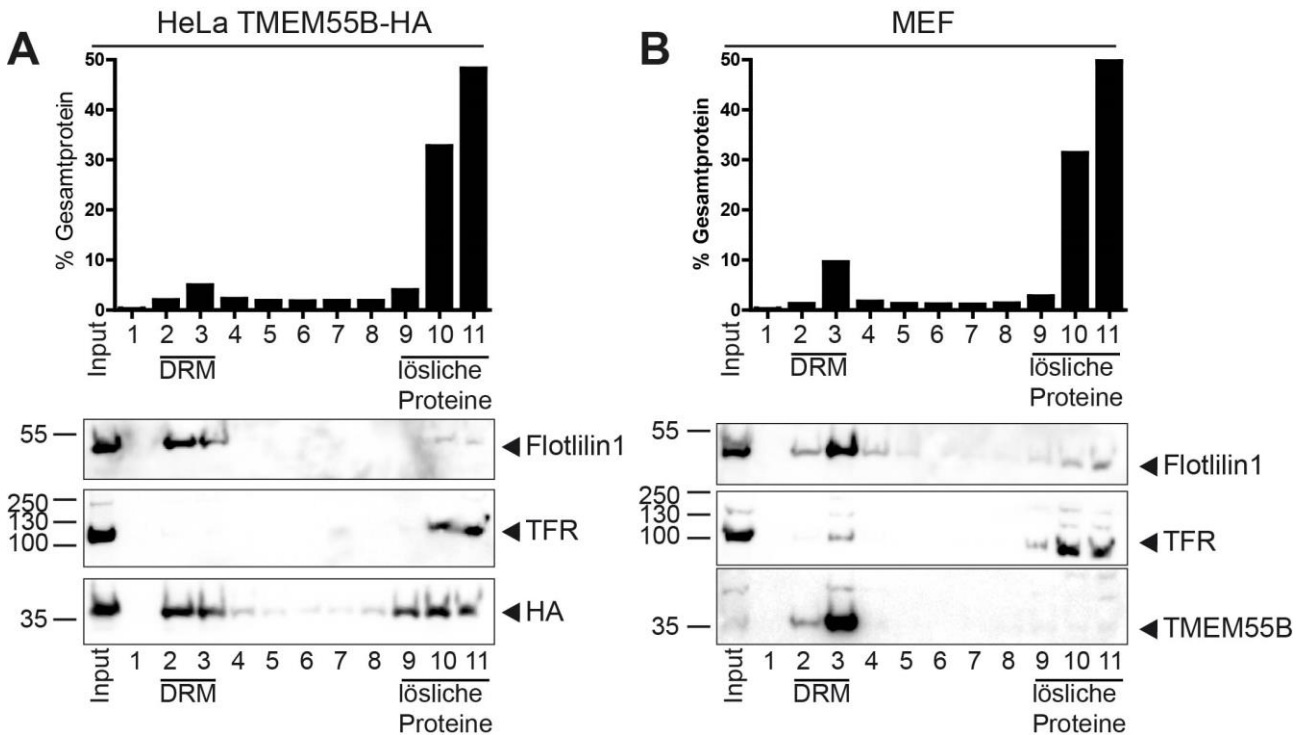


Abb. 20 TMEM55B ist in Detergenz-resistenten Membranen (DRMs) lokalisiert.

(A) Hela-Zellen wurden mit TMEM55B-HA transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. Mit diesen Zellen oder mit (B) MEFs wurde eine DRM-Isolation durch Gradientenzentrifugation durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen im Immunoblot analysiert. Als Kontrolle für DRM-lokalisierte Membranproteine wurde Flotillin1 verwendet, für lösliche Membranproteine Transferrinrezeptor. Das überexprimierte Protein wurde mit HA Antikörper detektiert.

Es sollte untersucht werden, ob TMEM55B in DRMs lokalisiert ist und ob die Palmitoylierung des Proteins einen Einfluss auf diese Lokalisation hat. Dazu wurde TMEM55B-HA in Hela-Zellen überexprimiert (3.3.5) und nach 24 Stunden eine DRM-Isolation mittels Gradientenzentrifugation durchgeführt (3.4.7). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.4.12) und durch Immunoblot analysiert (3.4.13). Als Kontrolle für DRM-lokalisierte Membranproteine wurde Flotillin1 verwendet und für lösliche Membranproteine Transferrin Rezeptor (TFR) (Bickel et al., 1997). Im Vergleich zu den Kontrollen befand sich das überexprimierte TMEM55B-HA sowohl in den DRM-Fractionen, als auch in den Fraktionen der unter diesen Bedingungen löslichen Membranproteine (**Abb. 20 A**). Der prozentuale Anteil am Gesamtprotein betrug für die DRM-Fraktion ~7%. Da die

Ergebnisse

Signalintensität des TMEM55B-HA in der DRM-Fraktion und der Fraktion der löslichen Membranproteine gleich war, die Gesamteproteinkonzentration in der DRM-Fraktion aber deutlich geringer war, ist TMEM55B-HA folglich überwiegend in DRMs lokalisiert. Die DRM-Lokalisation zeigte sich beim Nachweis des endogen exprimierten TMEM55B in MEF Zellen noch deutlicher. So war TMEM55B in MEF Zellen vollständig in der DRM-Fraktion vorzufinden (**Abb. 20 B**).

Es wurde beschrieben, dass Palmitoylierung Proteine in bestimmten Subdomänen in Membranen organisieren kann (Charollais & Van Der Goot, 2009). Ob die Lokalisation von TMEM55B in DRMs mit der Palmitoylierung zusammenhängt, sollte untersucht werden, indem TMEM55B-HA in HeLa-Zellen überexprimiert (3.3.5) wurde und die Palmitoyltransferasen mittels 2BP inhibiert wurden (4.11). Anschließend wurde mittels Immunoblot (3.4.13) analysiert, ob TMEM55B weiterhin in isolierten DRMs (3.4.7) vorzufinden ist. Wieder wurde Flotillin-1 als Markerprotein für DRMs und TFR für lösliche Membranproteine verwendet. Trotz Inhibition der Palmitoylierung durch 2BP wurde TMEM55B-HA weiterhin in DRMs vorgefunden (**Abb. 21 A**). Weiter wurde untersucht, ob die nicht mehr palmitoylierte Mutante TMEM55B-HA NoCys (**Abb. 18 A**) auch in DRMs vorzufinden ist. Wie im Immunoblot zu sehen war, scheinen sowohl die palmitoylierten als auch die nicht palmitoylierten Cysteinereste nicht ursächlich für die Organisation von TMEM55B-HA in DRMs zu sein (**Abb. 21 B**).

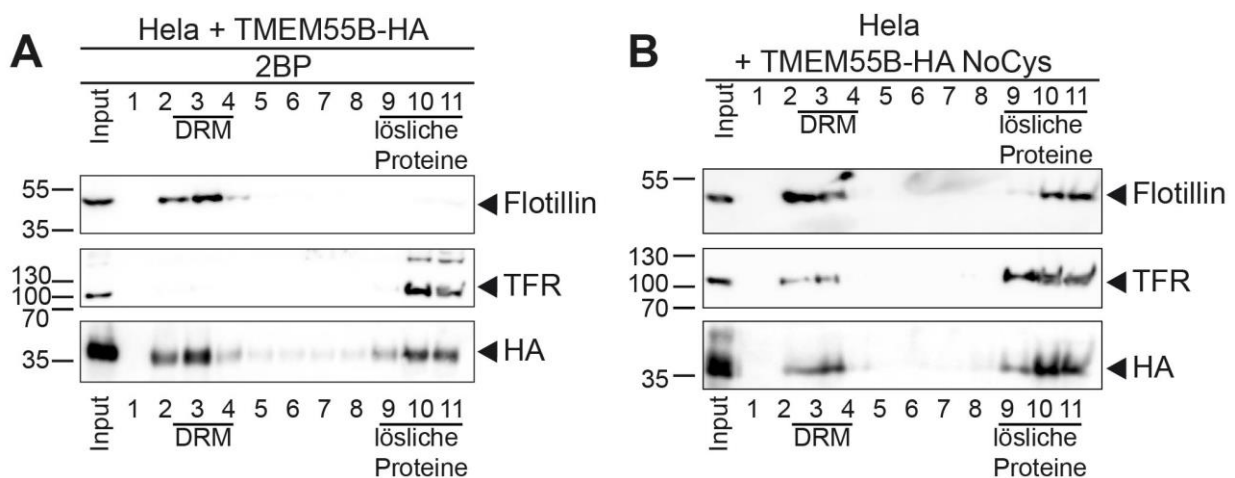


Abb. 21 Die Palmitoylierung verändert nicht die Organisation von TMEM55B in DRMs.

(A) TMEM55B-HA wurde in HeLa-Zellen überexprimiert. Drei Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 μ M 2BP für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die DRMs isoliert und im Immunoblot analysiert. (B) TMEM55B-HA NoCys wurde in HeLa-Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die DRMs isoliert und im Immunoblot analysiert. Als Kontrolle für DRM-lokalisierte Membranproteine wurde Flotillin1 verwendet, für lösliche Membranproteine Transferrinrezeptor. Das überexprimierte Protein wurde mit Antikörper gegen den HA-Tag detektiert.

4.13. Die Deletion aller Cysteinreste aus TMEM55B führt zu Retention im Golgi-Apparat

TMEM55B ist ein palmitoyliertes, lysosomales Protein, das am lysosomalen Transport beteiligt ist. Die Mutation aller Cysteinreste führt dazu, dass TMEM55B nicht mehr palmitoyliert wird (4.10). Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die TMEM55B-HA NoCys Mutante aus dem ER weiter in den sekretorischen Weg sortiert wird. Das kann indirekt darauf hindeuten, dass das Protein korrekt gefaltet wird und die Qualitätskontrollen im ER passieren kann (Amm, Sommer, & Wolf, 2014). Auch sollte überprüft werden, ob TMEM55B-HA NoCys in die lysosomale Membran sortiert wird und ob weiterhin eine Umpositionierung der Lysosomen unter Überexpression erfolgt.

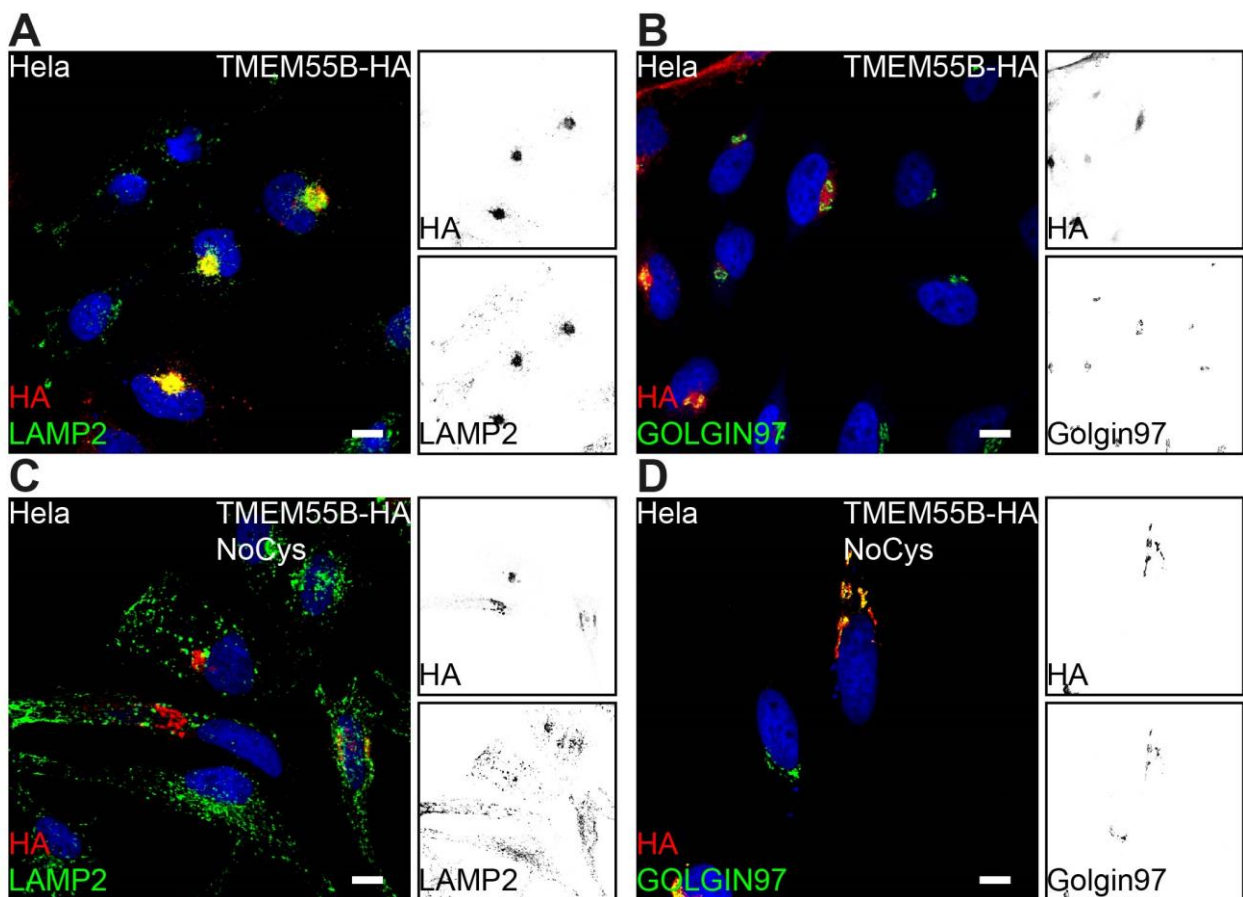


Abb. 22 Deletion aller Cysteinreste von TMEM55B führt zu einer Golgi-Retention.

HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA transfiziert und die Lokalisation des Proteins wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse mit Antikörpern gegen den HA-TAG und (A) LAMP2 oder (B) Golgin97 bestimmt. Weiter wurden HeLa-Zellen mit der Cysteine-depletierten Mutante TMEM55B-HA NoCys transfiziert und ebenfalls mit Antikörpern gegen den HA-TAG und (C) LAMP2 oder (D) Golgin97 gefärbt. Maßstab = 10 µm.

Dafür wurden TMEM55B-HA Wildtyp und NoCys in HeLa-Zellen überexprimiert (3.3.5) und die Zellen mittels Immunfluoreszenz (3.3.7) hinsichtlich der Lokalisation des Proteins und die Positionierung

Ergebnisse

der Lysosomen innerhalb der Zelle untersucht. Überexprimiertes Wildtyp TMEM55B-HA ist im Lysosom lokalisiert und führt zu einer retrograden Verteilung der Lysosomen in die Nähe des Zellkerns (**Abb. 22 A**). Auch war keine deutliche Golgi-Färbung von überexprimierten TMEM55B zu erkennen (**Abb. 22 B**). TMEM55B-HA NoCys zeigte keine Kolo-kalisation mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP2 (**Abb. 22 C**). Eine deutliche Ko-Lokalisation mit dem Trans-Golgi lokalisierten Protein Golgin97 war jedoch festzustellen (**Abb. 22 D**). Eine Umverteilung der Lysosomen fand unter TMEM55B-HA NoCys Überexpression ebenfalls nicht statt. Die LAMP2-enthaltenden Lysosomen verteilten sich über das ganze Zytosol (Vgl. **Abb. 22 A** und **C**), vergleichbar mit nicht transfizierten Zellen.

Die Mutation aller Cysteinreste in TMEM55B führte nicht zu einer Fehlfaltung und damit zu keiner Degradation nach der Biosynthese im ER, sondern zu einer Retention im Golgi-Apparat. Die TMEM55B NoCys-Mutante wurde nicht wie der Wildtyp zu den Lysosomen transportiert und konnte so unter Überexpressionsbedingungen auch keinen retrograden Transport der Lysosomen initiieren.

4.13.1. Die Mutation einzelner Cysteinreste von TMEM55B führt schon zu einer Retention im Golgi-Apparat

Die Mutation aller Cysteinreste in TMEM55B führt zu einer Retention des Proteins im Golgi-Apparat. Um zu untersuchen, ob diese Retention auf einzelne mutierte Cysteinreste zurückzuführen ist oder aus der Akkumulation aller Mutationen hervorgeht, wurden Mutanten von TMEM55B-HA generiert, in denen einzelne zytosolische Cysteinreste zu Serinresten mutiert wurden. Diese Mutanten wurden in Hela-Zellen überexprimiert (3.3.5) und mittels Immunfluoreszenz (3.3.7) auf die Lokalisation des Proteins untersucht.

Es zeigte sich, dass ein vergleichbarer Phänotyp der TMEM55B-HA NoCys Mutante (**Abb. 22**) auch durch die Mutation einzelner ausgewählter Cysteinreste erreicht werden kann (**Abb. 23**). Beispielhaft dargestellt sind die Mutanten TMEM55B-HA C114S und TMEM55B-HA C154S, die beide kein Kolo-kalisation mit LAMP2 und keine perinukleäre Akkumulation der Lysosomen aufweisen (**Abb. 23 A** und **C**). Die überexprimierten Mutanten sind hingegen fast ausschließlich im Golgi-Apparat lokalisiert (**Abb. 23 C** und **D**). Eine Übersicht über alle zytosolischen Cysteinreste und deren Einfluss auf die Lokalisation von TMEM55B ist in **Tab. 23** aufgelistet. Die Bilder aller Mutanten sind im Anhang gezeigt (siehe Anhang).

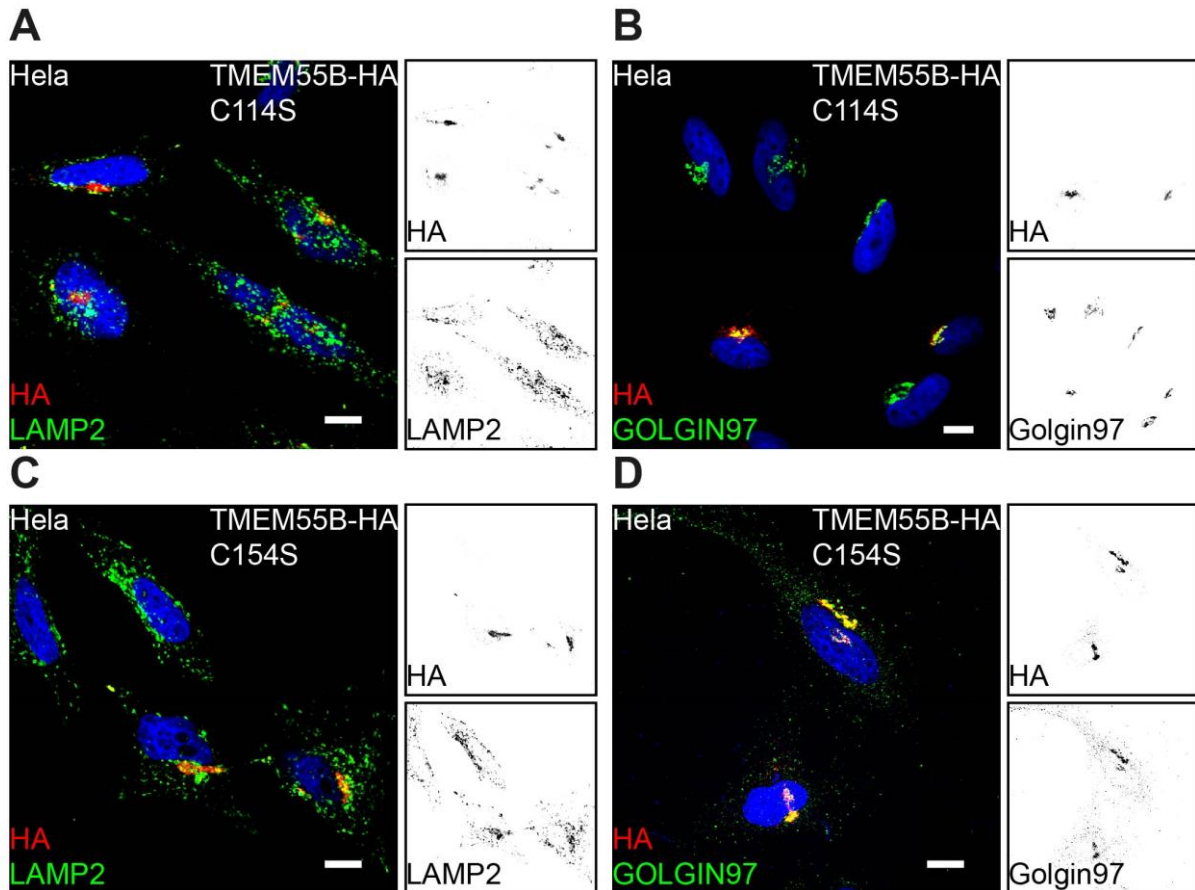


Abb. 23 Mutation einzelner Cysteinreste führt zu einer Retention im Golgi-Apparat.

HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA C114S (A und B) oder TMEM55B-HA C154S (C und D) transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Gefärbt wurde das überexprimierte Protein mit Antikörper gegen den HA-Tag (rot) und das lysosomale Transmembranprotein LAMP2 (grün) oder das Trans-Golgi Protein Golgin97 (grün). Maßstab = 10 μm.

Tab. 23 Übersicht über die Lokalisation von TMEM55B-HA Mutanten mit einzelnen mutierten Cysteinresten.

Cysteinrest	Lokalisation	Cysteinrest	Lokalisation
<i>Wildtyp</i>	Lysosom	C140S	Lysosom
<i>NoCys</i>	Golgi	C149S	Golgi/Lysosom
C91S	Golgi/Lysosom	C154S	Golgi
C94S	Golgi	C181S	Golgi
C111S	Golgi	C184S	Golgi/Lysosom
C114S	Golgi	C201S	Golgi/Lysosom
C132S	Golgi	C204S	Lysosom
C134S	Golgi	C273S	Golgi/Lysosom
C136S	Lysosom		

Sieben der insgesamt 15 untersuchten Cysteinreste führten durch Mutation zu einer Retention von TMEM55B im Golgi-Apparat. Bei fünf Mutanten war zumindest ein größerer Anteil des überexprimierten Proteins im Golgi lokalisiert als im Wildtyp und nur drei Cysteinreste zeigten nach einer Mutation eine Lokalisation in Lysosomen, die mit dem Wildtyp vergleichbar war.

4.13.2. Palmitoylierung von zytosolischen Cysteinresten

TMEM55B ist ein S-palmitoyliertes Protein (**Abb. 18**), welches in der nicht mehr S-palmitoylierten Form anstatt einer lysosomalen Lokalisation eine Golgi-Retention aufweist (**Abb. 22**). Auch führt die Mutation von einzelnen Cysteinresten zu Serinresten zu einer vergleichbaren Golgi-Retention (**Abb. 22** und **Abb. 23**). Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Cysteinreste in TMEM55B tatsächlich S-Palmitoyliert sind und ob eine Korrelation zwischen der Golgi-Retention und der S-Palmitoylierung besteht. Dafür wurden mittels Mutagenese-PCR (3.2.5) in die TMEM55B-HA NoCys Mutante einzelne Cysteine wiedereingeführt und diese TMEM55B Mutanten, die nur einen einzigen potentiell zu palmitoylierenden Cysteinrest aufwiesen, mittels AcylRac-Assay (3.4.9) auf den Palmitoylierungsstatus überprüft (**Abb. 24**).

Die Immunoblotanalyse der Kontroll-Lysate des AcylRac-Assays des Wildtyps und der NoCys Mutante von TMEM55B-HA zeigte eine deutlich geringere Expression von TMEM55B-HA NoCys im Vergleich zum Wildtyp. Auch zeigte sich, dass TMEM55B-HA Wildtyp S-palmitoyliert vorliegt und präzipitiert werden kann. TMEM55B-HA NoCys kann nicht im AcylRac-Assay präzipitiert werden und ist somit auch nicht S-palmitoyliert (**Abb. 24 A**). Die Analyse des Inputs aller verwendeten Mutanten zeigte, dass alle Mutanten mit einem einzelnen Cysteinrest eine vergleichbare Expressionshöhe wie die NoCys Mutante aufweisen, also eine deutlich geringere als TMEM55B-HA Wildtyp (**Abb. 24 B**). Auch wurde eine gleichmäßige Expression des Kontrollproteins NPC1 in allen überexprimierenden Zellen nachgewiesen (**Abb. 24 B**). In allen TMEM55B Mutanten war eine Doppelbande zu erkennen, bei der die untere der beiden Banden ein deutlich stärkeres Signal zeigt. Es ist jedoch nicht ersichtlich, ob im Wildtyp auch zwei Banden vorliegen und diese aufgrund der höheren Expression und der daraus resultierenden stärkeren Intensität des detektierten Signals im Immunoblot nicht in zwei Signale aufgetrennt vorliegen (**Abb. 24 B**). Die Positivkontrolle des AcylRac-Assays NPC1 zeigt in der Immunoblotanalyse der Präzipitierten S-Palmitoylierten Proteine über alle Proben Signale von vergleichbarer Intensität. Folglich wurde in allen Proben eine vergleichbare Menge an S-palmitoylierten Proteinen präzipitiert. TMEM55B-HA Wildtyp zeigt das mit Abstand stärkste Signal, während die NoCys Mutante nicht zu detektieren war. Bei den Einzel-Cystein-Mutanten waren eindeutige Signale bei C94, C111, C132, C149, C181, C201 und C273 zu erkennen. Weiter wurden schwächere Signale bei C114, C154 und C204 detektiert. Die Ratio im Input zwischen dem Wildtypsignal und den Signalen der Mutanten war deutlich höher als die gleiche Ratio im Präzipitat.

Ergebnisse

Das lässt schließen, dass in den Mutanten nur eine kleine Population der vorhandenen TMEM55B Proteine palmitoyliert vorlagen.

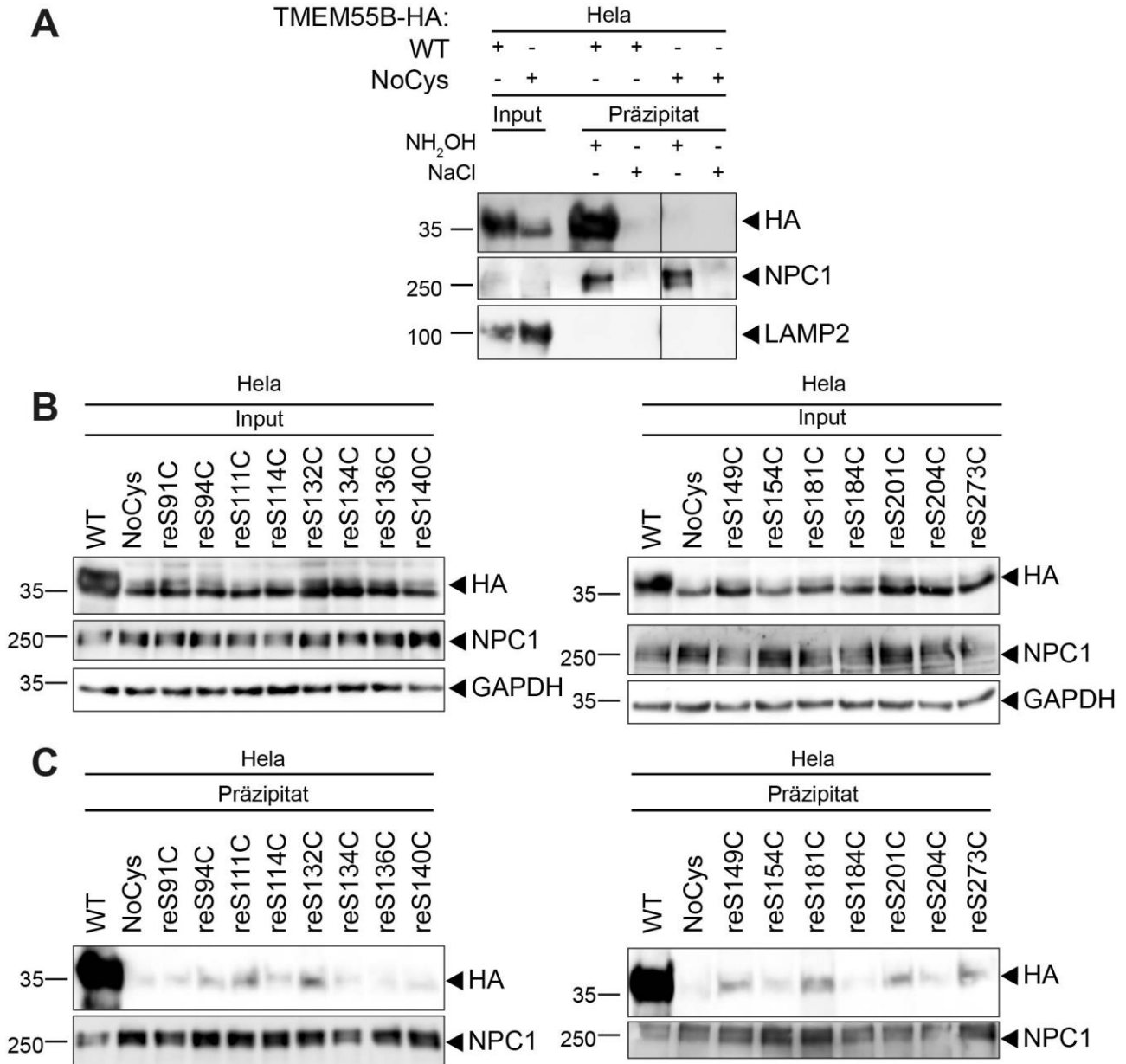


Abb. 24 Analyse der Palmitoylierung einzelner zytosolische Cysteinreste von TMEM55B.

Zur Analyse der S-Palmitoylierung einzelner zytosolischer Cysteinreste von TMEM55B wurden in die TMEM55B-HA NoCys Mutante einzelne Cysteinreste mittels Mutagenese-PCR wiedereingeführt. Diese Mutanten wurden in Hela-Zellen überexprimiert und mittels AcylRac-Assay auf S-Palmitoylierung untersucht. (A) Immunoblot der TMEM55B-HA Wildtyp und TMEM55B-HA NoCys Kontrolle des Assays. (B) Immunoblots des Inputs der Untersuchten überexprimierten Mutanten von TMEM55B-HA. (C) Immunoblots des S-palmitoylierten Anteil der Untersuchten TMEM55B-HA Mutanten.

Der Versuch zeigt, dass einzelne zytosolische Cysteine von TMEM55B in kleinen Populationen S-palmitoyliert vorliegen können.

4.13.3. Der Transport von TMEM55B ist nicht unter Adaptor-Protein-Komplex Defizienz verändert

Es wurde gezeigt, dass die Migration von TMEM55B abhängig von einem N-Terminalem Dileucinmotiv ist und somit AP-Proteinen am Transport von TMEM55B zwischen Golgi-Apparat und Lysosomen beteiligt sein müssen (4.6). Auch wurde gezeigt, dass die Mutation von einzelnen putativ palmitoylierten Cysteinresten zu Serinresten zu einer Retention des überexprimierten Proteins im Golgi-Apparat führte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese Cystein-abhängige Golgi-Retention von TMEM55B durch eine veränderte Interaktion mit AP-Komplexen hervorgerufen wird. Dafür wurde HA-markiertes TMEM55B in HeLa-Zellen überexprimiert, die defizient für AP1 γ 1, AP2 μ 2 oder AP3 δ sind. Die Defizienz der Untereinheiten der Adapter-Protein-Komplexe führt zu einem Verlust der Funktion des jeweiligen Komplexes (Chen, Gershlick, Park, & Bonifacino, 2017). Die Lokalisation von TMEM55B-HA wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen (3.3.7) untersucht (**Abb. 25**).

In den TMEM55B-HA überexprimierenden Wildtyp HeLa-Zellen ist die oben beschriebene lysosomale Lokalisation von TMEM55B und die perinukleäre Akkumulation der Lysosomen zu erkennen (4.2 und **Abb. 25 A**). Die AP1-, AP2- und AP3-defizienten HeLa-Zellen zeigten auch wie die Wildtyp-Zellen eine Kollokalisierung von TMEM55B-HA mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP2 und perinukleär akkumulierende Lysosomen (**Abb. 25 B, C und D**). Daraus lässt sich schließen, dass die Defizienz eines einzelnen AP-Komplexes nicht ausreicht, um den Transport von überexprimiertem TMEM55B-HA zur lysosomalen Membran deutlich zu verändern. Eine Beteiligung von mehreren AP-Komplexen am Transport von TMEM55B zur lysosomalen Membran schließt dieses Experiment jedoch nicht aus.

In den TMEM55B-HA überexprimierenden Wildtyp HeLa-Zellen ist die oben beschriebene lysosomale Lokalisation von TMEM55B und die perinukleäre Akkumulation der Lysosomen zu erkennen (4.2 und **Abb. 25 A**). Die AP1, AP2 und AP3 defizienten HeLa-Zellen zeigten auch wie die Wildtyp-Zellen eine Kollokalisierung von TMEM55B-HA mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP2 und perinukleär akkumulierende Lysosomen (**Abb. 25 B, C und D**). Daraus lässt sich schließen, dass die Defizienz eines einzelnen AP-Komplexes nicht ausreicht, um den Transport von überexprimiertem TMEM55B-HA zur lysosomalen Membran deutlich zu verändern. Eine Beteiligung von mehreren AP-Komplexen am Transport von TMEM55B zur lysosomalen Membran schließt dieses Experiment jedoch nicht aus.

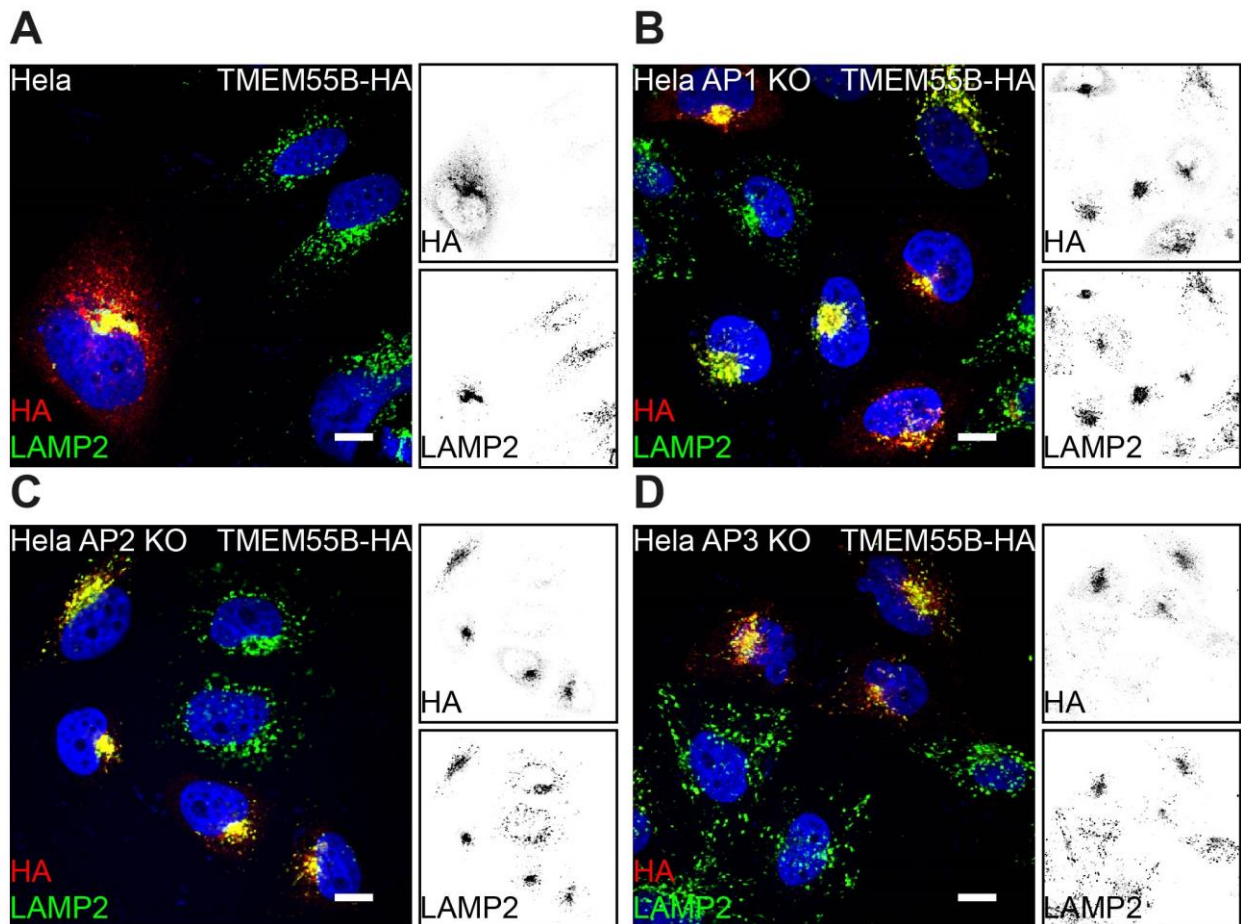


Abb. 25 Der Transport von TMEM55B zur lysosomalen Membran ist nicht abhängig von einzelnen AP-Komplexen.

(A) Wildtyp, (B) AP1 γ 1-defiziente, (C) AP2 μ 2-defiziente, (D) AP3 δ -defiziente HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA transfiziert und die Lokalisation es Proteins wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Gefärbt wurde mittels Antikörper gegen HA-Tag (rot) und gegen LAMP2 (grün). Die Zellen wurden von J.S. Bonifacino zur Verfügung gestellt. (Chen et al., 2017) Maßstab = 10 μ m.

Da die Defizienz einzelner AP-Komplexe keinen Einfluss auf den Transport von TMEM55B in AP-defizienten HeLa-Zellen hatte (**Abb. 25**), sollte untersucht werden, ob das Dileucinmotiv und somit die Bindung von AP-Komplexen an TMEM55B einen Einfluss auf die Golgi-Lokalisation der TMEM55B-HA NoCys Mutante hat. Dafür wurden TMEM55B-HA Wildtyp und NoCys mit intaktem Dileucinmotiv oder mit mutiertem Dileucinmotiv, in dem die Leucinreste zu Alaninresten geändert wurden, in HeLa-Zellen überexprimiert und die Lokalisation von TMEM55B mittels Immunfluoreszenz analysiert.

TMEM55B-HA wird durch die Mutation des Dileucinmotivs und die somit wegfallende Interaktion mit AP-Komplexen nicht nur in die Lysosomen transportiert, sondern ist auch an der Plasmamembran zu detektieren (**Abb. 26 A** und **B**, siehe auch 4.6). Der Transport von TMEM55B-HA zur lysosomalen Membran ist jedoch nicht vollständig blockiert, da ein geringer Anteil von TMEM55B-HA weiterhin mit LAMP2 kolokalisiert (**Abb. 26 B**, siehe auch 4.6). Die TMEM55B-HA NoCys Mutante ist wie oben beschrieben nahezu vollständig im Golgi-Apparat lokalisiert (**Abb. 26 C** und 4.13). Ist jedoch

Ergebnisse

zusätzlich das Dileucinmotiv mutiert, kann das Protein auch an der Plasmamembran detektiert werden (**Abb. 26 D**). Eine Kollokalisierung von TMEM55B-HA NoCys LL/AA mit LAMP2 ist nicht zu erkennen. Ein geringer Anteil des überexprimierten Proteins ist jedoch weiterhin im Golgi-Apparat oder in vesikulären Strukturen im gesamten Zytoplasma lokalisiert (**Abb. 26 D**).

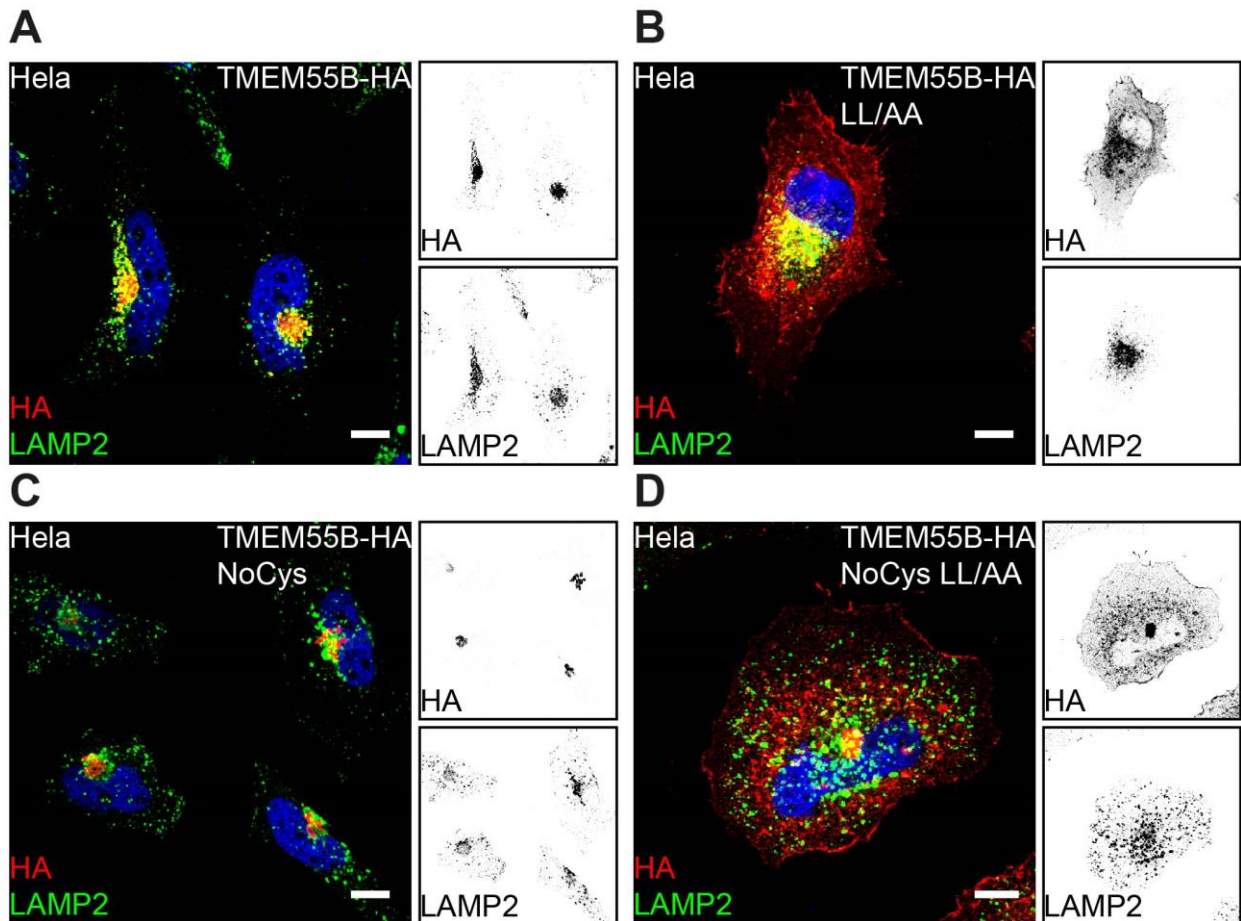


Abb. 26 Cysteinrest und AP-Komplex abhängiger Transport von TMEM55B in die Lysosomen.

HeLa-Zellen wurden mit (A) TMEM55B-HA (B) TMEM55B-HA LL/AA (C) TMEM55B-HA NoCys oder (D) TMEM55B-HA NoCys LL/AA transfiziert und mittels Immunfluoreszenz auf Lokalisation von TMEM55B untersucht. Die Überexprimierten Proteine wurden mittels Antikörper gegen HA-Tag gefärbt (rot) und Lysosomen wurden mittels Antikörper gegen das lysosomale Transmembranprotein LAMP2 gefärbt (grün). Maßstab = 10 µm.

In diesem Experiment zeigte sich, dass die Mutation des Dileucinmotivs von TMEM55B zu einer teilweisen Lokalisation an der Plasmamembran führt, unabhängig von einem vorherig funktionierenden Transport in die Lysosomen (TMEM55B-HA Wildtyp) oder einer Golgi-Retention (TMEM55B-HA NoCys). Die Retention im Golgi-Apparat der NoCys-Mutante scheint folglich unabhängig von einer Interaktion von TMEM55B mit AP-Komplexen zu sein.

4.14. Die Rolle von TMEM55B *in vivo* in murinen Neuronen

4.14.1. TMEM55B Expression in Mausorganen

Die Rolle von TMEM55B wurde bislang *in vitro* analysiert. TMEM55B-defiziente Mäuse wurden kürzlich von Hashimoto *et al.* als embryonal letal beschrieben (Hashimoto *et al.*, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch TMEM55A- und TMEM55B-defiziente Mäuse gezüchtet werden (4.4). Um die physiologischen Funktionen von TMEM55B weiter zu untersuchen und um abzuschätzen, in welchem Organsystem TMEM55B eine besondere Relevanz haben könnte, wurde zunächst die Expression von TMEM55B in verschiedenen Organen von 15 Wochen alten Mäusen überprüft.

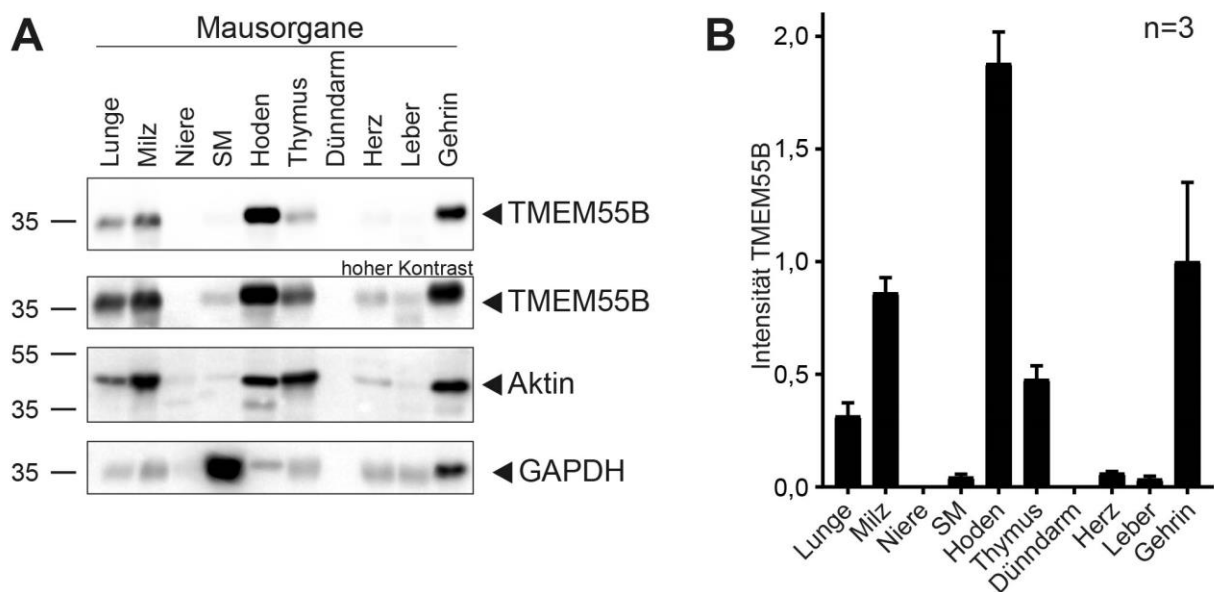


Abb. 27 Expression von TMEM55B in verschiedenen Mausorganen.

(A) Proteinextrakte wurden aus Organen von 15 Wochen alten Mäusen gewonnen, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit Antikörper gegen TMEM55B analysiert. Als Ladekontrolle dienten Aktin und GAPDH. SM = Skelettmuskel. (B) Quantifizierung der Intensität des TMEM55B Immunoblot-Signals. Normalisiert wurde auf die Intensität des Gehirns. Gezeigt ist der normalisierte Mittelwert aus Replikaten von drei Mäusen im Alter von 15 Wochen mit dem Standardfehler des Mittelwerts.

Dafür wurden Proteinextrakte aus Mausorganen hergestellt (3.4.2) und im Immunoblot (3.4.13) mit einem Antikörper gegen TMEM55B untersucht. Da die Expressionshöhe der Proteine, die für eine Ladekontrolle genutzt werden, zwischen unterschiedlichen Organextrakten schwankt, wurde sowohl Aktin, als auch GAPDH als Ladekontrolle genutzt. Es zeigte sich, dass sich das Expressionsniveau von TMEM55B zwischen den Organen stark unterschied (**Abb. 27 A**). Das Organ mit der höchsten Expression war der Hoden, mit einer ~1,8-fachen Intensität im Vergleich zum Gehirn. Das Gehirn zeigte die zweithöchste Expression, gefolgt von der Milz, dem Thymus und der Lunge. Im Skelettmuskel, dem Herzen und der Leber war mittels Immunoblot nur ein sehr

Ergebnisse

schwaches TMEM55B Signal nachweisbar. In der Niere und dem Dünndarm lagen die TMEM55B Level unter der Detektionsgrenze (**Abb. 27 B**). Die Leber ist das einzige Organ, in dem neben der Bande bei ~36 kDa noch eine weitere Bande bei ~34 kDa zu erkennen ist (**Abb. 27 A**).

Es zeigte sich, dass TMEM55B nicht ubiquitär exprimiert wird und sich die Expressionslevel zwischen unterschiedlichen Organen unterscheiden.

4.14.2. TMEM55B wird in Neuronen exprimiert

Die zweithöchste gemessene Expressionsrate von TMEM55B in Mäuse wurde im Gehirn festgestellt. Daher sollte im Weiteren die Verteilung von TMEM55B in den verschiedenen Hirnregionen und unterschiedlichen Zelltypen untersucht werden. Dafür wurden Organschnitte des Gehirns mit Antikörpern gegen TMEM55B, LAMP1 und dem neuronalen Marker NeuN für Immunfluoreszenz gefärbt.

Im Cortex des Cerebellums (**Abb. 28 A**), im Thalamus (**Abb. 28 B**) und im Cerebralen Cortex (**Abb. 28 C**) zeigten besonders Zellen, die positiv für den neuronalen Marker NeuN waren, eine Expression von TMEM55B. Auch die im *Cerebellar Cortex* liegenden Purkinje-Zellen, spezialisierte Neuronen die NeuN negativ sind, zeigten intensive Signale für TMEM55B. In allen beobachteten Neuronen konnte eine Kolo-kalisation von TMEM55B mit dem lysosomalen Marker LAMP1 beobachtet werden. Neuronen zeichnen sich u.a. durch polar organisierte Mikrotubuli im Axon aus. Gerade im Hinblick auf die spezifische Sortierung von Organellen in das Axon und die Länge der Axone, ergibt sich so eine besondere Bedeutung für den Transport von Organellen im Axon, wie z.B. von Lysosomen (Farias, Guardia, De Pace, Britt, & Bonifacino, 2017; Lasiecka & Winckler, 2011). Neben den *in situ* Untersuchungen mittels Immunhistochemie sollte untersucht werden, wie das in Neuronen exprimierte TMEM55B innerhalb der Zelle verteilt ist. Dazu wurden primäre corticale Neuronen aus einem Tag alten Mäusen isoliert und kultiviert. An Tag sieben der Differenzierung wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen TMEM55B und LAMP1 als lysosomalen Marker gefärbt. Die Neuronen zeigten sowohl LAMP1-positive Vesikel im gesamten Zellkörper, als auch teilweise in Dendriten und im Axon. Bei fast allen LAMP1-positiven Organellen konnte eine Kolo-kalisation mit TMEM55B festgestellt werden (**Abb. 28 D**).

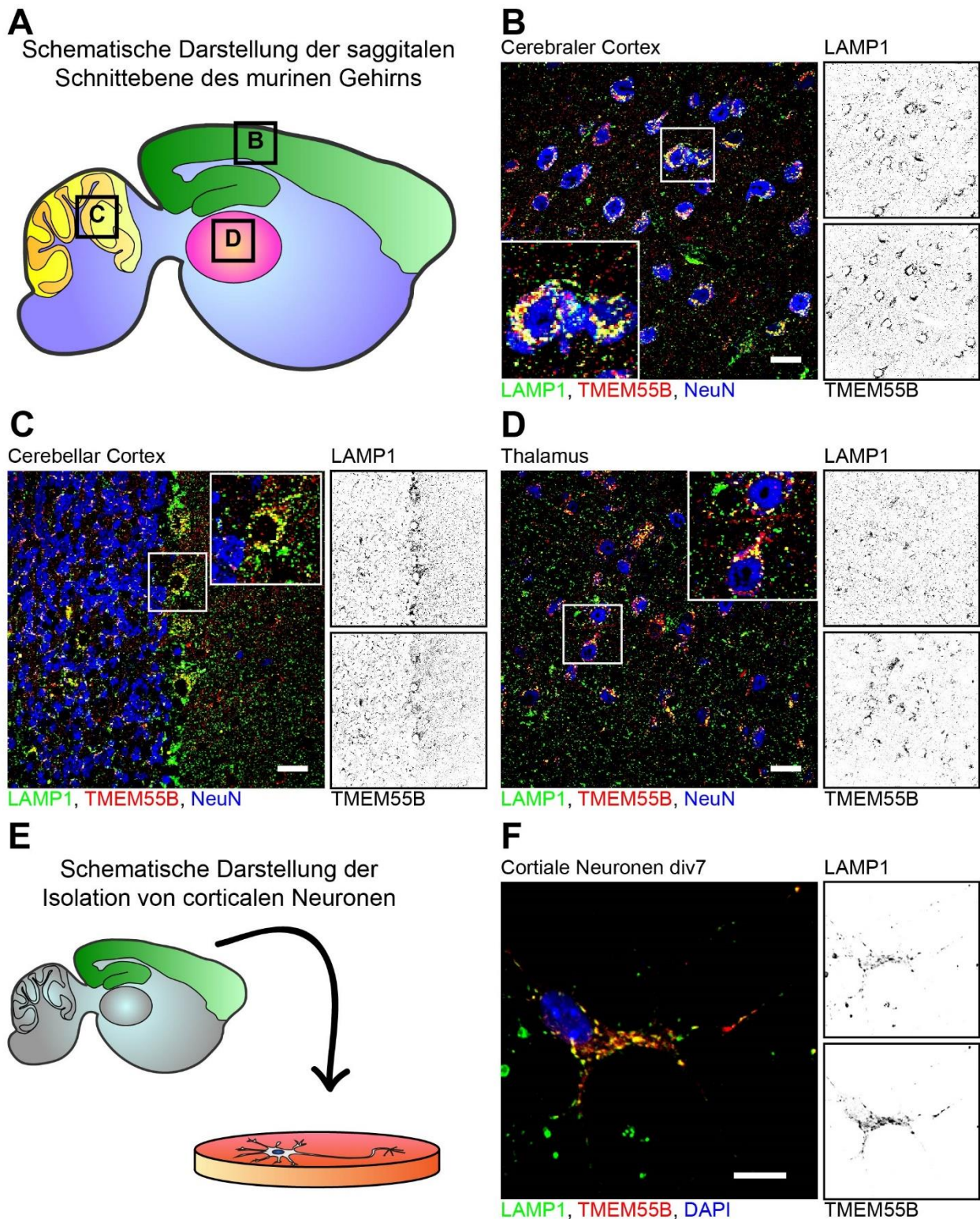


Abb. 28 TMEM55B ist in murinen Neuronen in der lysosomalen Membran lokalisiert.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten sagittalen Schnittenebene des murinen Gehirns. Hervorgehoben sind die in B, C und D gefärbten Hirnregionen. Es wurden histologische Gehirnschnitte (B) des Cerebralen Cortex, (C) des Cortex des Cerebellums und (D) des Thalamus erstellt. Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen LAMP1 (grün), TMEM55B (rot) und NeuN (blau). Maßstab = 20 µm. (E) Schematische Darstellung der Isolation von corticalen Neuronen. (F) Primäre Neuronen wurden aus einem Tag alten Mäusen isoliert, kultiviert und an Tag sieben der Differenzierung fixiert und mit Antikörper gegen endogenes TMEM55B (rot) und LAMP1 (grün) gefärbt. Maßstab = 10 µm. Die Präparation der Neuronen wurde in Zusammenarbeit mit Julia Baer vom ZMNH in Hamburg durchgeführt.

4.14.3. TMEM55B-Defizienz führt zu einer Akkumulation von Lysosomen in Neuronen

TMEM55B ist an der Positionierung von Lysosomen in Hela-Zellen beteiligt und in murinen Neuronen exprimiert. Daher sollte im Weiteren untersucht werden, ob eine Defizienz von TMEM55B im Gehirn die Verteilung der Lysosomen verändert und sich Auswirkungen auf die Physiologie des zentralen Nervensystems zeigen. Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine doppelte Defizienz von TMEM55B und TMEM55A einen ausgeprägteren Phänotyp aufweist, um Rückschlüsse auf eine potentiell redundante Funktion der beiden Proteine zu ziehen.

Dafür wurden Wildtyp, TMEM55B-defiziente und TMEM55A- und TMEM55B-doppel-defiziente Mäuse zur Fixierung des Gehirns mit PFA perfundiert (3.6.6), Organschnitte vom Gehirn erstellt (3.5.1), Gehirnschnitte mit Antikörper gegen LAMP1 gefärbt (3.5.2) und auf die Verteilung von LAMP1-positiven Vesikeln im Gewebe untersucht. Im cerebralen Cortex von Wildtyp-Tieren zeichneten sich Neuronen durch eine gleichmäßige Verteilung von Lysosomen im Soma um den Zellkern aus (**Abb. 29 A**). In den TMEM55B-defizienten Organschnitten konnten weniger im neuronalen Zellkörper befindliche LAMP1-positive Vesikel gefunden werden. Stattdessen waren pyramidenförmig angehäufte LAMP1-positive Vesikel zu erkennen, die neben dem Zellkern lokalisiert waren (**Abb. 29 A**). Die Form, in der die LAMP1-positiven Vesikel angehäuft waren, könnten auf das Axon-Initial-Segment (AIS) hindeuten. In den Gehirnschnitten doppel-defizienter Mäuse wurde eine vergleichbare Mislokalisierung der LAMP1-positiven Vesikeln beobachtet. Die Intensität der akkumulierenden Signale war zwischen einzel- und doppel-defizienten Mäusen ähnlich stark ausgeprägt (**Abb. 29 A**). Diese Anhäufung von LAMP1-positiven Vesikeln war nicht nur in Neuronen im cerebralen Cortex zu beobachten, sondern auch im Thalamus (**Abb. 29 B**) und in nahezu allen anderen Neuronen im Gehirn (nicht gezeigt).

Die oben beschriebene Defizienz von TMEM55B führt in Neuronen zu einer Akkumulation von LAMP1-positiven Vesikeln. Das könnte durch einen fehlerhaften Transport der Lysosomen erklärt werden.

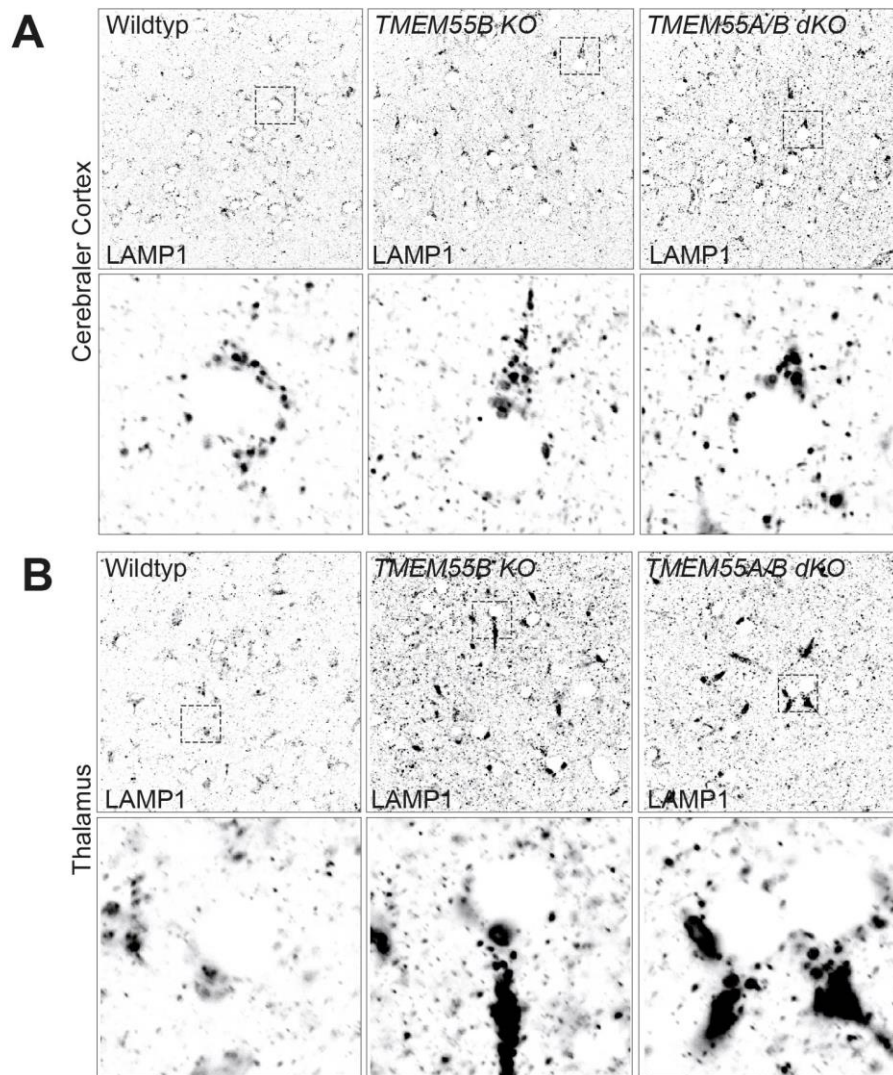


Abb. 29 Lysosomen kumulieren in Neuronen in TMEM55B-defizienten Mäusen.

Mäuse wurden mit 4% PFA perfundiert, um die Organe zu fixieren (3.6.6), Gehirnschnitte wurden erstellt (3.5.1) und die Lysosomen mit Antikörper gegen LAMP1 gefärbt (3.5.2). Bilder wurden (A) vom cerebralen Cortex und (B) vom Thalamus erstellt.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die in den Gehirnschnitten beschriebene Akkumulation von LAMP1-positiven Vesikeln auch *ex vivo* zu beobachten ist. Dafür wurden aus Wildtypmäusen und TMEM55B-defizienten Mäusen primäre Neuronen isoliert (3.3.4) und an Differenzierungstag sieben fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz (3.3.7) gegen das lysosomale Membranprotein LAMP1 und das im AIS lokalisierte Ankyrin G (AnkG) gefärbt. Zur Visualisierung der gesamten Zellen wurde das Aktinzytoskelett mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltem Phalloidin gefärbt.

In Wildtyp Neuronen sind die LAMP1-positiven Vesikel hauptsächlich im Zellkörper vorzufinden. Teilweise sind jedoch auch LAMP1-positive Signale in den Dendriten oder im Axon zu erkennen (**Abb. 30 A**). TMEM55B-defiziente Neuronen zeigten hingegen deutlich weniger LAMP1 Signale im

Ergebnisse

Zellkörper. Die meisten Signale konnten zwischen dem Zellkern und dem Anfang des AIS detektiert werden (**Abb. 30 B**). Es wurden die Intensität der Signale der LAMP1-positiven Vesikel vom Mittelpunkt des Zellkerns bis zum Ende des AIS in Neuronen (n=15) quantifiziert. Als Kontrolle wurde für den Kern das DAPI Signal und für das AIS das AnkG Signal quantifiziert. Im Wildtyp konnten zwei getrennte Populationen von LAMP1-positiven Vesikeln gezeigt werden. Eine Population liegt in Kern-Nähe, die zweite am Anfang des AIS (**Abb. 30 C**). Im Vergleich zu der TMEM55B-defizienten Zellen zum Wildtyp, ist eine deutlich höhere Signalstärke der zweiten Population von Vesikeln zu erkennen. Auch scheint eine dritte Population innerhalb des AIS hinzuzukommen (**Abb. 30 C**).

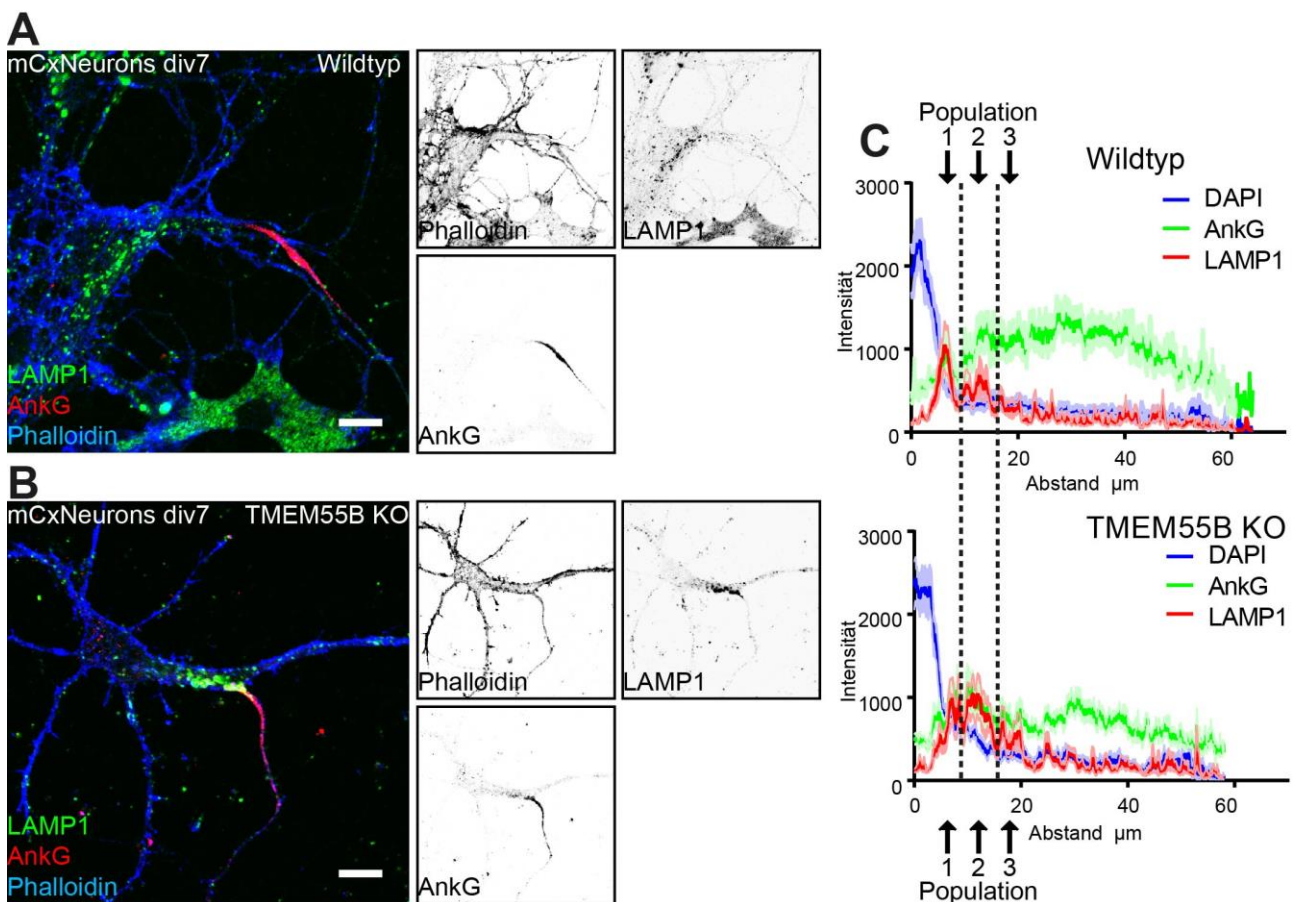


Abb. 30 Lysosomen akkumulieren im Axon Initial Segment von TMEM55B-defizienten primären Neuronen.

Primäre Neuronen wurden aus (**A**) Wildtyp und (**B**) TMEM55B-defizienten Mäusen isoliert und an Differenzierungstag sieben fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen LAMP1 (grün) und AnkG (rot) gefärbt. Das Aktinzytoskelett wurde mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltem Phalloidin angefärbt (blau). Maßstab = 10 μm . (**C**) Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Neuronen vom Mittelpunkt des Zellkerns bis zum Ende des AIS. Quantifiziert wurden das DAPI Signal des Zellkerns (nur Quantifizierung gezeigt), das AnkG Signal des AIS und das LAMP1 Signal der Lysosomen. Eingezeichnet sind Hilfslinien zur besseren Erkennung der beobachteten Populationen von Lysosomen. n=15. Die Präparation der Neuronen wurde in Zusammenarbeit mit Julia Baer vom ZMNH in Hamburg durchgeführt.

Es konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass in TMEM55B-defizienten Neuronen LAMP1-positive Vesikel am Anfang des AIS akkumulieren. TMEM55B scheint folglich auch in kultivierten

Ergebnisse

Neuronen eine Rolle im lysosomalen Transport in Neuronen zu spielen, die aus murinen Embryonen isolierten und kultiviert wurden.

Für Neuronen wurde beschrieben, dass die Verteilung und Intensität von LAMP1-positiven Organellen nicht zwangsläufig mit der Verteilung von degradativen Lysosomen korreliert. So wurden neben hydrolytisch aktiven Lysosomen, die lysosomale Hydrolasen wie Cathepsin D (CtsD), Cathepsin B (CtsB) oder β -Glucocerebrosidase beinhalten, auch nicht degradative LAMP1-positive Vesikel beschrieben, die keine der untersuchten lysosomalen Hydrolasen aufwiesen (Cheng et al., 2018). Um zu untersuchen, um welche der von Cheng *et al.* beschriebenen Subpopulation von LAMP1-positiven Vesikeln es sich bei den in Neuronen akkumulierenden Vesikeln handelt, wurde eine Kofärbung von LAMP1 und CtsD, einer löslichen lysosomalen Hydrolase, durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl in Wildtyp als auch in TMEM55B-defizienten Neuronen CtsD mit LAMP1 kolokalisiert, unabhängig von der Lage des Vesikels innerhalb der Zelle (**Abb. 31**).

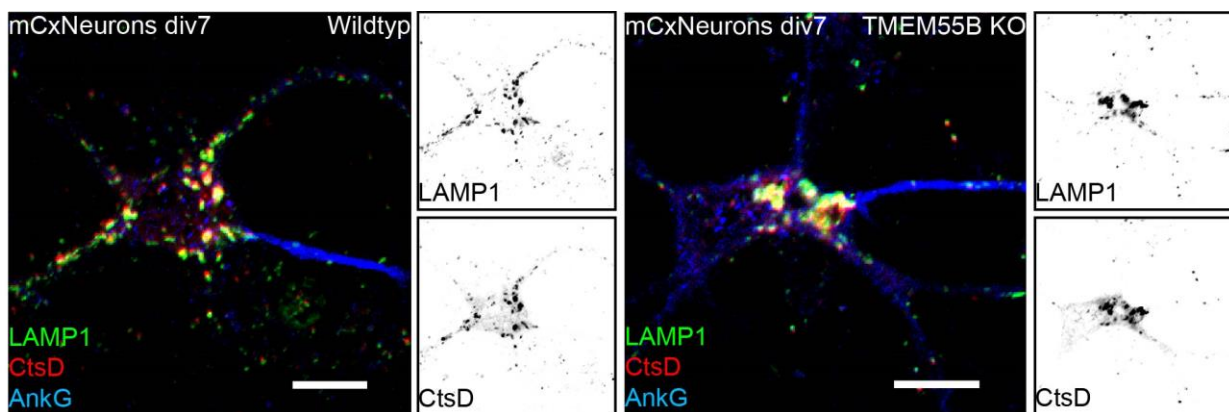


Abb. 31 In TMEM55B-defizienten Neuronen im AIS akkumulierende LAMP1-positive Vesikel sind auch CtsD-positiv.

Primäre Neuronen wurden aus Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen isoliert und an Differenzierungstag sieben fixiert und in indirekter Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen LAMP1 (grün) und CtsD (rot) und AnkG (blau) gefärbt. Maßstab = 10 μ m. Die Präparation der Neuronen wurde in Zusammenarbeit mit Julia Baer vom ZMNH in Hamburg durchgeführt.

Anhand dieses Versuches kann geschlossen werden, dass es sich bei den im AIS akkumulierenden Vesikeln wahrscheinlich um funktionelle und hydrolytisch aktive Lysosomen handelt. Es kann daher vermutet werden, dass die von Lysosomen ausgeführten Funktionen im Axon oder im Zellkörper unter TMEM55B-defizienten Bedingungen fehlerhaft oder verzögert ablaufen, da die Organellen nicht mehr korrekt an den Ort ihrer funktionellen Bestimmung transportiert werden.

4.14.4. TMEM55B-Defizienz führt zu Degeneration von Axonen im zentralen und peripheren Nervensystem

Es konnte gezeigt werden, dass TMEM55B im Transport von Lysosomen in Neuronen beteiligt ist und eine Defizienz von TMEM55B zu einer Akkumulation von Lysosomen innerhalb des AIS führt. Um zu untersuchen, ob diese Fehlsortierung von Lysosomen einen Einfluss auf die Vitalität von Neuronen hat, wurden transversale Semidünnschnitte (3.5.1) von der weißen Substanz des Rückenmarks (zentrales Nervensystem (ZNS)) und vom Ischiasnerv (peripheres Nervensystem (PNS)) von zwölf Monate alten Mäusen erstellt. Es wurde eine Myelinscheidenfärbung mittels Toluidin Blau (3.5.3) der Semidünnschnitte vorgenommen, um die Vitalität der Axone zu überprüfen.

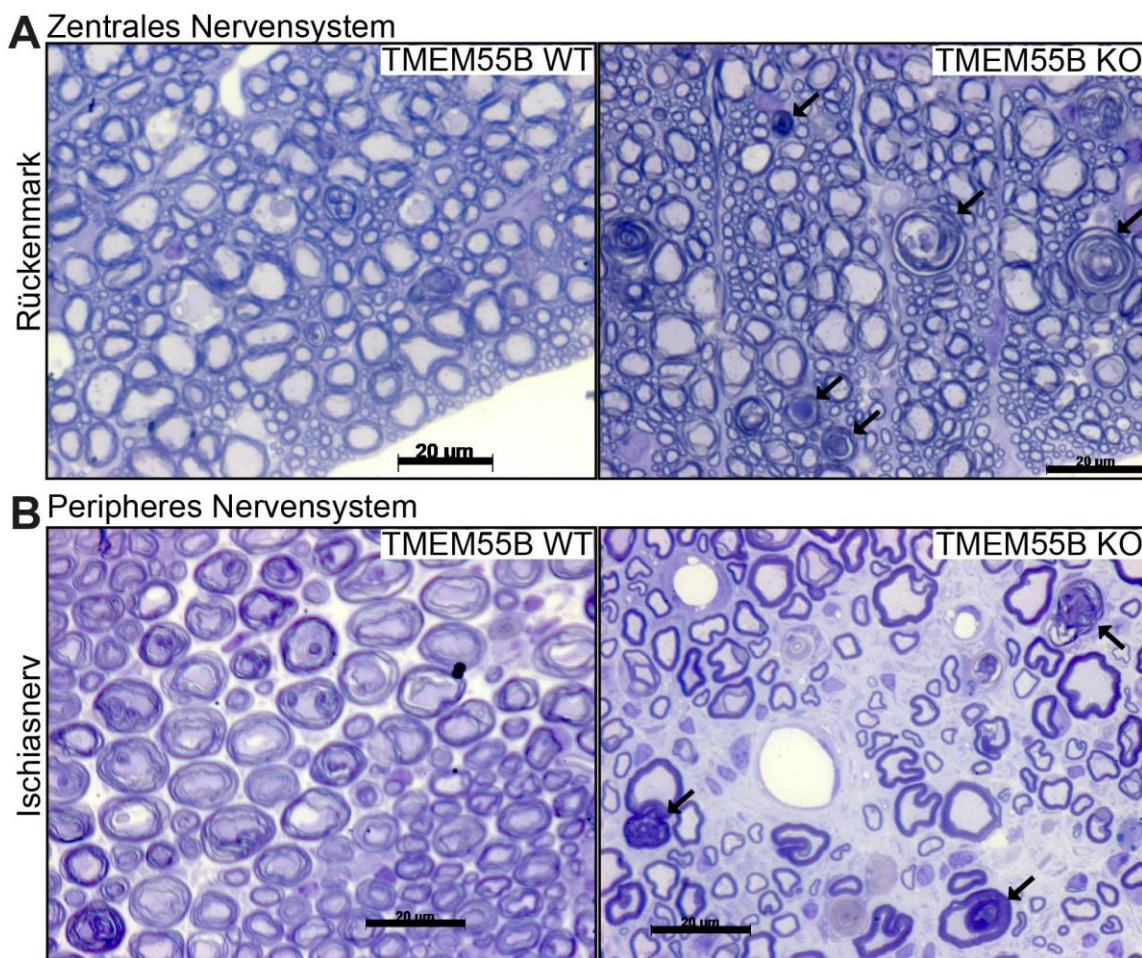


Abb. 32 Myelinscheidenfärbung im zentralen und peripheren Nervensystem.

Von zwölf Monate alten Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen wurden (A) die weiße Substanz des Rückenmarks und (B) Ischiasnerv präpariert, Organschnitte erstellt und eine Myelinscheidenfärbung durchgeführt. Die Toluidin-Blau Färbung der Semidünnschnitte und die Bilder entstanden in Zusammenarbeit mit R.Lüllmann-Rauch aus dem Anatomischen Institut der CAU Kiel. Die Pfeile zeigen auf degenerierte Axone. Maßstab = 20 µm.

Ergebnisse

Im Vergleich zum TMEM55B Wildtyp konnte in Semidünnschnitten des Rückenmarks von TMEM55B-defizienten Mäusen deutlich mehr degenerierte Axone anhand der Morphologie der Myelinscheiden beobachtet werden (siehe Pfeile **Abb. 32 A**). Auch im Ischiasnerv, einem peripheren Nerv, konnten mehr degenerierte Axone in den Semidünnschnitten der TMEM55B-defizienten Mäuse detektiert werden (siehe Pfeile **Abb. 32 B**). Auch war eine generell verminderte Anzahl an myelinisierten Axonen in TMEM55B-defizienten Ischiasnerv zu erkennen (**Abb. 32 B**).

Anhand der Semidünnschnitte des Rückenmarks und Ischiasnervs von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen konnte eine Degeneration von Axonen nachgewiesen werden, die im Zusammenhang mit der ebenfalls in TMEM55B-defizienten Neuronen auftretenden Mislokalisierung von Lysosomen stehen könnte.

4.14.5. Konditionale Defizienz von *JNK-interacting protein* (JIP4) führt ebenfalls zu einer Akkumulation von Lysosomen im AIS

Willett *et al.* zeigten, dass der TMEM55B bedingte Transport von Lysosomen entlang von Mikrotubuli abhängig von dem löslichen zytosolischen Protein *JNK-interacting protein* (JIP4) ist – ein Protein, das zahlreiche Protein-Protein Interaktionen eingeht (Ikonomov *et al.*, 2009; Kelkar, Standen, & Davis, 2005; C. M. Lee *et al.*, 2002; Montagnac *et al.*, 2009). Dabei vermittelt JIP4 laut Willett *et al.* eine indirekte Assoziation von TMEM55B an Dynein/Dynactin und ermöglicht so den Transport von Lysosomen entlang der Mikrotubuli in Richtung Plus-Ende (Willett *et al.*, 2017). Es sollte untersucht werden, ob JIP4 auch in Neuronen für die indirekte Interaktion von TMEM55B und Dynein/Dynactin essenziell ist.

Zunächst wurde untersucht, ob eine mögliche Korrelation der Expression von JIP4 und TMEM55B in verschiedenen Mausorganen besteht. Dafür wurde JIP4 mittels Immunoblot quantifiziert (3.4.13) und mit dem Expressionsmuster von TMEM55B verglichen (**Abb. 33 A + B**). JIP4 wird am höchsten in Hoden und Lunge exprimiert, gefolgt von Thymus, Hirn, Milz und Skelettmuskel. Geringere Expressionshöhen waren in Herz und Leber zu sehen, während JIP4 in der Niere und im Dünndarm nicht detektiert werden konnte (**Abb. 33 B**). Im Vergleich des Expressionsmusters von JIP4 mit TMEM55B (**Abb. 27 A**) zeigte sich eine Ähnlichkeit. So überschneiden sich die Organe mit einer hohen Expression der untersuchten Proteine und die Organe, in denen die Proteine nicht mittels Immunoblot nachgewiesen werden konnten (**Abb. 33 A**). Da JIP4 und TMEM55B ein vergleichbares Expressionsmuster in den untersuchten Mausorganen aufwiesen, könnte dies auf eine gemeinsame Funktion in diesen Geweben hinweisen.

Ergebnisse

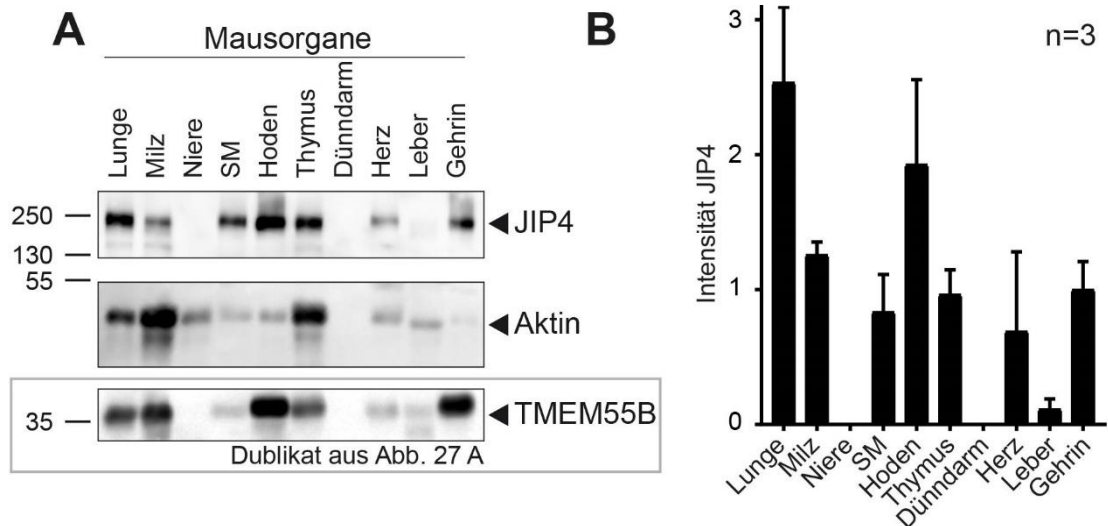


Abb. 33 Expression von JIP4 in verschiedenen Mausorganen.

(A) Proteinextrakte wurden aus murinen Organen gewonnen, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit Antikörper gegen JIP4 und TMEM55B analysiert (TMEM55B Immunoblot wurde schon in **Abb. 27** gezeigt). Als Ladekontrolle dienten Aktin. SM = Skelettmuskel. (B) Quantifizierung der Intensität des JIP4 Immunoblot-Signals. Normalisiert wurde auf die Intensität des Gehirns. Gezeigt ist der normalisierte Mittelwert aus Replikaten von drei Mäusen mit dem Standardfehler des Mittelwerts.

Im Folgenden wurden Hirnschnitte (3.5.1) von drei Monate alten Mäusen angefertigt, deren *Jip4*-Gen flankiert von loxP-Stellen war und die das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Regulation des EMX Transkriptionsfaktors besaßen. Der EMX Transkriptionsfaktor führte u.a. zu einer Expression der Cre-Rekombinase im cerebralen Cortex und im Hippocampus und damit zu einer JIP4-Defizienz in endsprechenden Hirnregionen (Sato, Ishikawa, Mochizuki, et al., 2015). Die Hirnschnitte wurden mit Antikörpern gegen LAMP1 gefärbt (3.5.2) und auf die Lokalisation von Lysosomen hin analysiert. In den Cre-negativen Kontrollmäusen konnte eine gleichmäßige Verteilung der Lysosomen im cerebralen Cortex (**Abb. 34 A**) und im Hippocampus (**Abb. 34 B**) gezeigt werden. In den JIP4-defizienten Mäusen zeigten sich Anhäufungen von Lysosomen im AIS (**Abb. 34**), wie auch schon in der Analyse der Verteilung der Lysosomen in TMEM55B-defizienten Mäusehirnen dargestellt (**Abb. 29**).

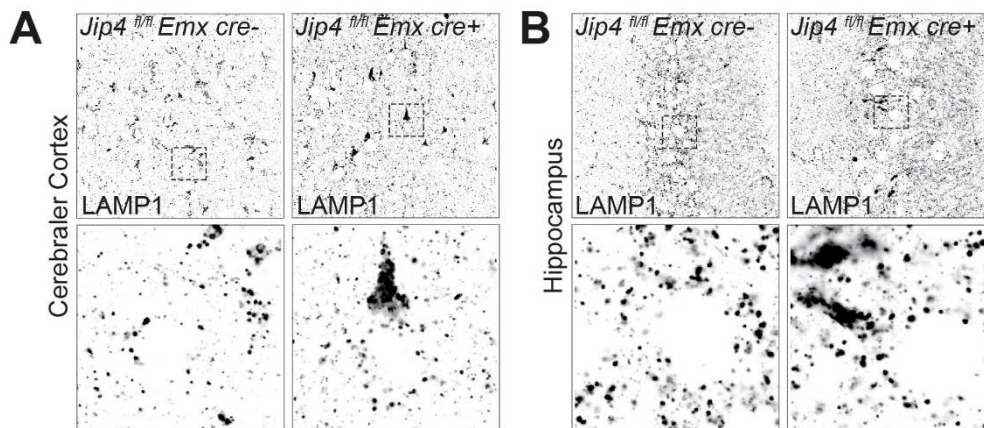


Abb. 34 Konditionale Defizienz von JIP4 führt zu Akkumulation von Lysosomen im AIS.

Drei Monate alte Mäuse wurden mit 4% PFA perfundiert, um die Organe zu fixieren (3.6.6), Gehirnschnitte wurden erstellt (3.5.1) und die Lysosomen mit Antikörper gegen LAMP1 gefärbt (3.5.2). Bilder wurden (A) vom cerebralen Cortex und (B) vom Hippocampus erstellt. Die Proben wurden von Katsuji Yoshioka vom *Cancer Research Institute* der Kanazawa Universität zur Verfügung gestellt.

Die Ähnlichkeit der beobachteten Phänotypen der akkumulierenden Lysosomen in Neuronen in den konditionalen JIP4-defizienten Mäusen und den TMEM55B-defizienten Mäusen deutet darauf hin, dass TMEM55B und JIP4 auch in Neuronen den Transport von Lysosomen zusammen vermitteln.

4.15. TMEM55B-Defizienz führt zu keiner veränderten Assoziation von JIP4 an Membranen und Lysosomen

Für TMEM55B und JIP4 wurde in Neuronen eine Beteiligung am lysosomalen Transport gezeigt (**Abb. 34**) und für beide Proteine wurde *in vitro* eine direkte Interaktion nachgewiesen (Willett et al., 2017). Aufgrund dieser Befunde sollte untersucht werden, ob eine Defizienz des Transmembranproteins TMEM55B zu einer veränderten Assoziation des löslichen JIP4 mit Membranen führt oder ob JIP4 weiterhin über andere Interaktoren mit zellulären Membranen assoziiert wird.

Um diese Frage zu untersuchen, wurde eine Membrananreicherung aus Gehirnextrakten mittels Ultrazentrifugation durchgeführt (3.4.4). Als Kontrollen wurden für die löslichen Proteine GAPDH und für membranassoziierte Proteine die NaK-ATPase verwendet. Im Wildtyp zeigte sich JIP4 hauptsächlich zytosolisch und nur ein geringer Teil an Membranen assoziiert (**Abb. 35 A**). Auch in TMEM55B-defizienten Mäusehirnextrakten war JIP4 nur in geringem Maße in der Membranfraktion zu detektieren, jedoch im gleichen Maße, wie im Wildtyp (**Abb. 35 A**).

Ergebnisse

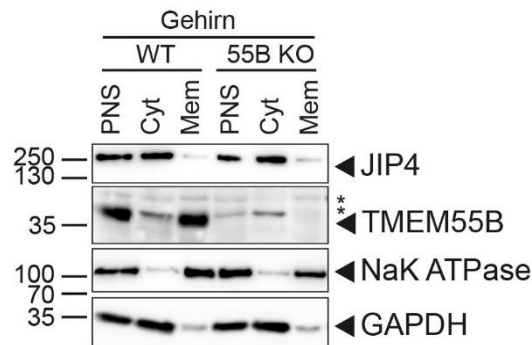


Abb. 35 Membranen-Anreicherung mittels Ultrazentrifugation.

Proteinextrakte wurden von halben Gehirnen generiert und für eine Membrananreicherung mittels Ultrazentrifugation verwendet. Als Marker der Immunoblotanalyse für Membranproteine wurde die NaK-ATPase verwendet, für lösliche Proteine wurden GAPDH verwendet. Auch wurden TMEM55B und JIP4 mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Unspezifische Banden wurden mittels „**“ markiert.

Aus diesem Versuch geht hervor, dass die Defizienz von TMEM55B keinen großen Effekt auf die Assoziation von JIP4 mit Membranen hat.

4.15.1. TMEM55B-Defizienz hat keinen deutlichen Einfluss auf die lysosomale Funktion im Gehirn

Es konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz von TMEM55B zu einer Mislokalisierung von Lysosomen im AIS von Neuronen führt und dass diese Mislokalisierung zu einer Degeneration von Axonen führt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob diese Akkumulation der Lysosomen mit einer Veränderung ihrer Funktionalität verbunden ist.

Dazu wurden aus Gehirnen von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen Proteinextrakte erstellt und mittels Immunoblot (3.4.13) analysiert. Mit Antikörpern gegen TMEM55B konnte bestätigt werden, dass eine Defizienz von TMEM55B vorlag (**Abb. 36 A**). Weiter wurde die Expression des lysosomalen Membranproteins LIMP2 als indirektes Maß für Menge und Anzahl an Lysosomen untersucht. Die Expression von LIMP2 wies in den TMEM55B-defizienten Mäusen vergleichbare Intensitäten mit dem Wildtyp auf (**Abb. 36 B**). Weiter wurden die Proteinextrakte auf Cathepsin D untersucht. Wie schon beschrieben, ist die Reifung von Cathepsin D abhängig vom Transport ins Lysosom und dessen pH-Wert. Da zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen keine Intensitätsunterschiede im Immunoblot der Proteinextrakte der Gehirne in der Proform, der Intermediärform und der maturen Form von Cathepsin D gezeigt wurden, kann geschlossen werden, dass die lysosomale Reifung und der pH-Wert nicht entscheidend verändert waren (**Abb. 36 B**). Anschließend wurden LC3 untersucht. Sowohl die Signale für LC3-I als auch LC3-II waren im Wildtyp und in den TMEM55B-defizienten Mausgehirnen vergleichbar. Sowohl Autophagie generell, als auch die Degradation von LC3-II im Lysosom scheint durch die Defizienz von TMEM55B im

Ergebnisse

Gehirn folglich nicht verändert zu sein (**Abb. 36 B**). Darüber hinaus wurden die Aktivität der lysosomalen Hydrolasen β -Galactosidase, β -Hexosaminidase, β -Glucuronidase und α -Mannosidase in den Proteinextrakten der Mausgehirne bestimmt (3.4.6). Hier zeigte sich für die β -Galactosidase und die β -Hexosaminidase ein moderater, jedoch signifikanter Anstieg der Aktivität in den Gehirnextrakten der TMEM55B-defizienten Mäuse von $\sim 10\%$ zur Wildtypkontrolle. Die β -Glucuronidase und die α -Mannosidase zeigten keinen signifikanten Unterschied der *in vitro* Aktivität. Die Messwerte waren in den Gehirnextrakten der TMEM55B-defizienten Mäuse jedoch leicht erhöht.

Aus den Experimenten geht hervor, dass die Defizienz von TMEM55B keinen gravierenden Effekt auf die Funktionalität der Lysosomen im Gehirn hat, wenn auch die *in vitro* Aktivität einiger lysosomaler Hydrolasen leicht anstieg.

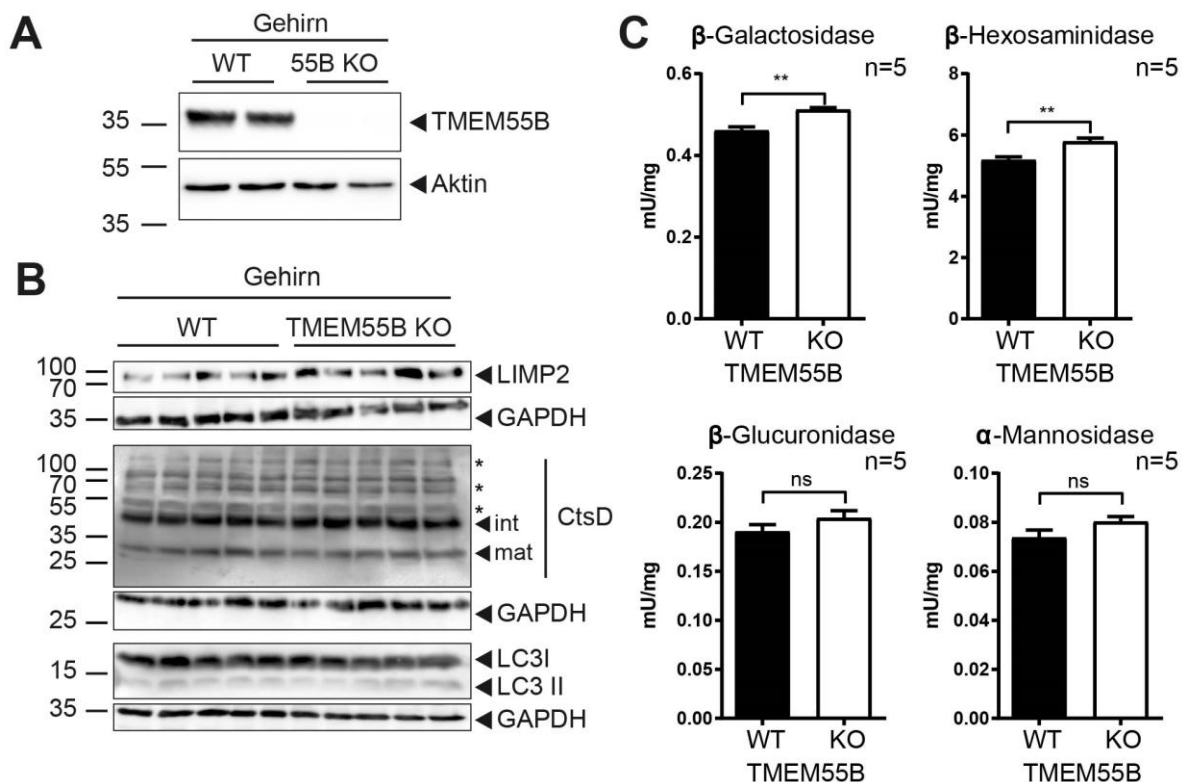


Abb. 36 Analyse von Gesamthirnextrakten von TMEM55B-defizienten Mäusen.

(A) Proteinextrakte von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen wurden mittels Immunoblot auf TMEM55B Expression untersucht. (B) Immunoblotanalyse von Proteinextrakten aus Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusegehirnen mit Antikörpern gegen LIMP2, Cathepsin D (CtsD) und LC3. Int = Intermediärform, Mat = Maturform. Sternchen („**“) markieren unspezifische Signale. (C) Aktivitätsassays verschiedener lysosomale Hydrolasen. Gezeigt ist der Mittelwert aus Replikaten von je fünf Mäusen mit dem Standardfehler des Mittelwerts.

In einem Pilotexperiment sollte die gesamt RNA Expression des Gehirns untersucht werden und ob die Defizienz von TMEM55B die Expression von *Tmem55a* und von anderen lysosomalen Genen verändert. Dafür wurden RNA aus Gesamtgehirn von 39 Wochen alten Mäusen extrahiert (3.2.6), in

Ergebnisse

cDNA transkribiert (3.2.7) und sequenziert. Die sequenzierten DNA-Fragmente wurden in einem Alignmentverfahren einem Referenzgenom zugeordnet (Mausgenom GRCm38.p6 von *Ensembl Genes 92*). Dabei wurden nicht kodierende RNAs aussortiert. Anhand der Häufigkeit der Fragmente konnte anschließend ein Wert für die differentielle Expression der zugehörigen detektierten Gene ausgegeben werden, der einen Vergleich zwischen den zu analysierenden Mäusen ermöglichte. Die Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Robert Häsler vom Institut der klinischen Molekularbiologie der CAU-Kiel durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurde die allgemeine Ähnlichkeit zwischen der gesamten Genexpression der Mäuse bestimmt. Zum einen um zu überprüfen, ob es einen generellen Unterschied zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen gibt und zum anderen, um mögliche Extremwerte zu identifizieren. Um die Ähnlichkeit zu bestimmen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt (3.2.8). Dabei werden die in der RNA-Sequenzierung generierten Datensätze an korrelierenden Variablen in einer orthogonalen Transformation in Werte von nicht korrelierenden Variablen konvertiert, den sogenannten Hauptkomponenten. Die Werte der Hauptkomponenten sind abhängig von der gesamten Genexpression der einzelnen Mäuse. Die Hauptkomponenten werden gegeneinander aufgetragen, um so generelle Unterschiede zwischen den Mäusen grafisch darzustellen.

Die Hauptkomponentenanalyse zeigte für Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäuse jeweils eigene Populationen, was auf einen grundsätzlichen Unterschied der gesamten RNA Expression im Gehirn der beiden Genotypen hinweist (**Abb. 37 A**). Für die grafische Analyse der relativen Expressionshöhe der lysosomalen Gene wurden die Werte der einzelnen Mäuse in Bezug zum Median aller Wildtypiere gesetzt und in einer *Heatmap* dargestellt. Eine höhere Expression im Vergleich zum Median des Wildtyps wird mit einer roten Färbung, gleichbleibende Expression mit einer Graufärbung und eine Reduktion mit einer Blaufärbung angezeigt. Die Reihenfolge der Auflistung der Gene wird durch die Ratio aus dem Median der TMEM55B-defizienten Mäuse und dem Median der Wildtypiere ermittelt. Mit den Daten konnte gezeigt werden, dass unter TMEM55B-Defizienz keine veränderte Regulation der Expression von *Tmem55a* erfolgt (nicht gezeigt). Für die Analyse der Expression aller bekannten lysosomalen Gene wurden sie in die Gene für lösliche Proteine (**Abb. 37 C**) und die Gene für Membran-assoziierte Proteine (**Abb. 37 D**) aufgeteilt. Sowohl für die löslichen, als auch die Membran-assoziierten lysosomalen Gene konnte keine eindeutige Änderung der Genexpression in den TMEM55B-defizienten Mäusen gezeigt werden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass eine statistische Signifikanz mit der verwendeten Probenzahl nicht errechnet werden kann, da sie in diesem Experiment zu klein war.

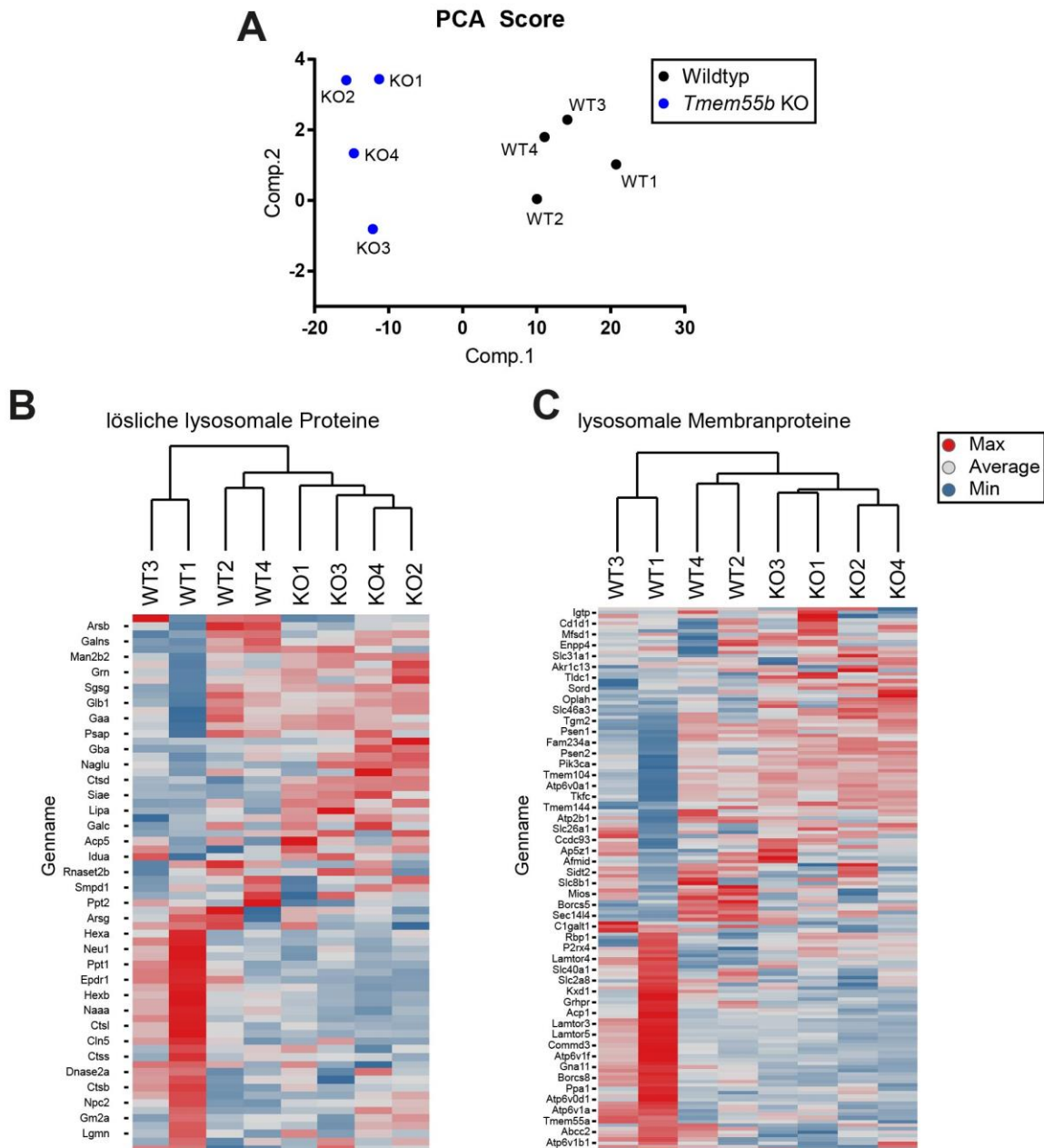


Abb. 37 RNA Sequenzierungen von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mausgehirnen.

Aus je vier Mausgehirne von 39 Wochen alten Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen wurde die gesamte RNA isoliert. Die RNA wurde von Robert Häsler vom Institut der klinischen Molekularbiologie der CAU-Kiel quantitativ sequenziert und die Daten ausgewertet. **(A)** Hauptkomponentenanalyse der Mäuse **(B)** *Heatmap* der Expressionen von TMEM55A und TMEM55B im Vergleich **(C)** *Heatmap* der Genexpression aller bekannten löslichen lysosomalen Proteine **(D)** *Heatmap* der Genexpression aller bekannten lysosomalen Membranproteine. Für die Auswahl der lysosomalen Proteine wurden folgende Publikationen verwendet: (Chapel et al., 2013; Markmann et al., 2017).

Aus dem Pilotexperiment der RNA Sequenzierung konnte geschlossen werden, dass eine Defizienz von TMEM55B in Mausgehirnen Veränderungen hervorruft, diese sich nicht in der Expression von lysosomalen Genen widerspiegeln. Auch konnte gezeigt werden, dass *Tmem55a* mRNA nicht kompensierend für TMEM55B im Gehirn stärker exprimiert wird.

4.15.2. Eine Defizienz von TMEM55B führt zu keinen motorischen Auffälligkeiten in Mäusen

In den bisher beschriebenen Ergebnissen konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Defizienz von TMEM55B zu einer Umverteilung von Lysosomen in Neuronen führt, genauer zu einer Akkumulation der Lysosomen im AIS (4.14.2). Diese Akkumulation führt höchstwahrscheinlich zu der beobachteten Axondegeneration (4.14.4). Nun sollte untersucht werden, ob diese Degeneration der Axone, mutmaßlich auch Axone von motorischen Neuronen, zu einer Verhaltensänderung von Mäusen führt, mit dem Fokus auf motorischen Fähigkeiten. Dazu wurden je 14 weibliche Wildtyp und TMEM55B-defiziente Mäuse mit einem Alter von 31 bis 33 Wochen zur Durchführung der Versuche zu *Mouse Behavior Core Facility* nach Leuven geschickt und dort eingehend von Stijn Stroobants untersucht.

Da das Gewicht einen Einfluss auf den Ausgang der Verhaltenstest der Mäuse hat, wurde in einem ersten Schritt das Gewicht der Mäuse bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen mit ~29 g kein grundsätzlicher Unterschied im Gewicht bestand (**Abb. 38 A**). In einer Griffstärkeanalyse zeigte sich auch kein Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen (**Abb. 38 B**). Weiter wurde ein Rotarod-Test (3.6.10) durchgeführt, in dem Mäuse in mehreren Versuchen auf einem rotierenden Zylinder balancieren. Es wird die Zeit gemessen, bis die Maus von dem Zylinder fällt. Die Zeit, welche die Wildtypmäuse auf dem Rotarod-Messgerät verweilten, stieg vom ersten Versuch von ~150 Sekunden bis zu 200 Sekunden im dritten Versuch an. Der vierte Versuch zeigte eine leichte Abnahme der Verweildauer im Vergleich zum dritten. Die TMEM55B-defizienten Mäuse hatten unabhängig vom Versuch eine leicht erhöhte Latenz zu fallen. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (**Abb. 38 C**). Darüber hinaus wurde ein Abstiegstest an einer vertikalen Stange durchgeführt (3.6.11). Dabei wurden Mäuse mit dem Kopf nach oben ans obere Ende einer vertikalen Stange gesetzt. Darauf hin wurde die Zeit gemessen, bis die Mäuse sich erst drehten und dann den Abstieg vollendet hatten. Die Latenz bis zur Drehung im Wildtyp betrug ~ 14 Sekunden, die des Abstiegs ~ 38 Sekunden (**Abb. 38 D**). Die TMEM55B-defizienten Mäuse wiesen keinen signifikanten Unterschied in der Latenz der Drehung und in der Latenz des Abstiegs auf (**Abb. 38 D**).

Ergebnisse

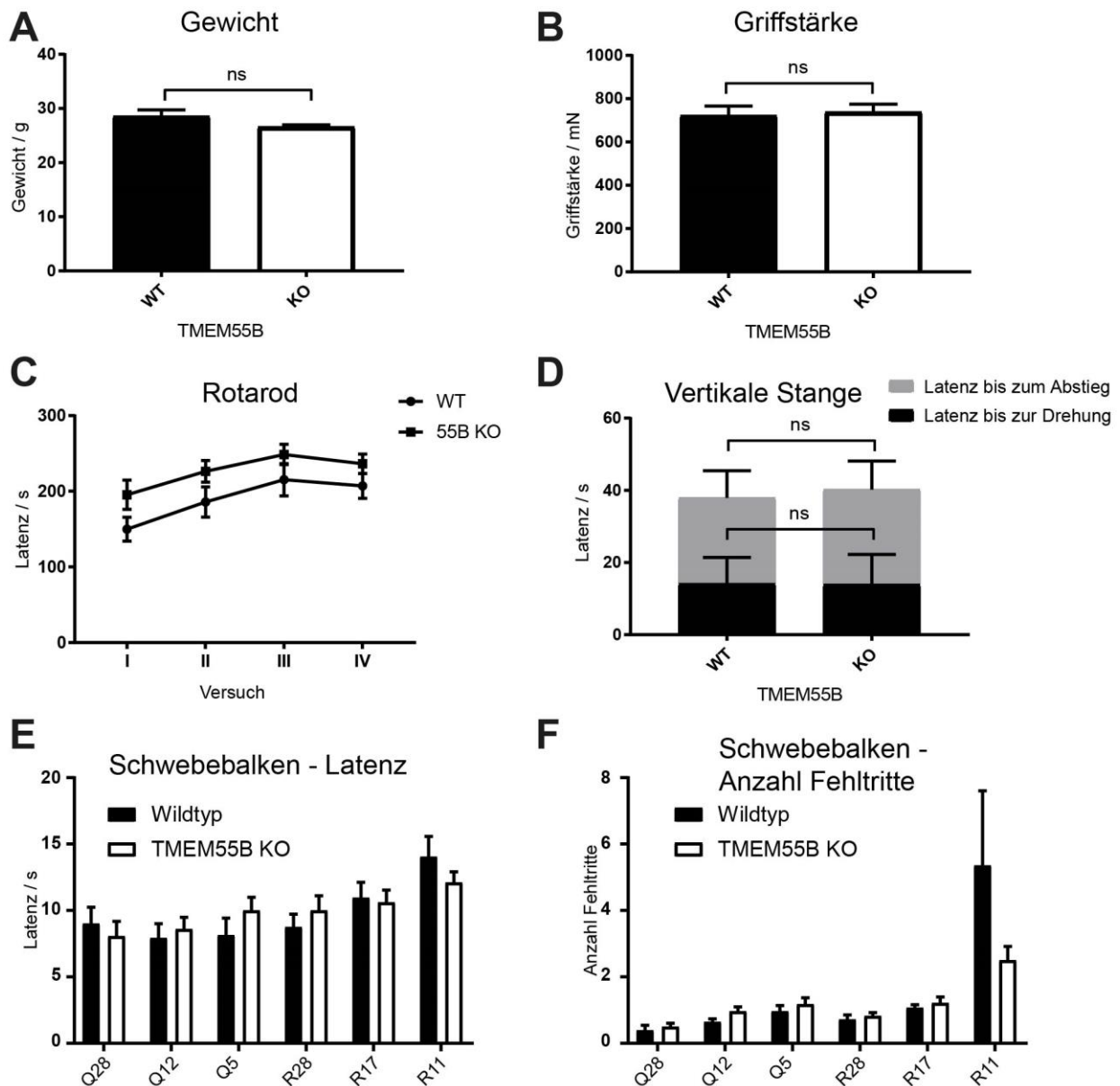


Abb. 38 Motorische Verhaltenstest von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen.

Zur Analyse der motorischen Fähigkeiten von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen wurde (A) das Gewicht gemessen, (B) die Griffstärke bestimmt, (C) ein Rotarod-Leistungstest und (D) ein Test an der vertikalen Stange durchgeführt. Weiter wurde die Zeit (E) und die Anzahl (F) der Überquerung eines Schwebebalkens gemessen (Q=quadratisch mit Querschnitten von 28, 12 und 5 mm; R = rund mit Durchmessern von 28, 17 und 11 mm). Gezeigt sind die Mittelwerte aus Replikaten von je 14 Mäusen mit dem Standardfehler des Mittelwerts. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

Weiter wurde ein Balanciertest auf einem Schwebebalken durchgeführt (3.6.12). Hier wurde die Zeit gemessen, die Mäuse benötigen, um über einen ein Meter langen Schwebebalken zu laufen (quadratisch (Q) mit Querschnitten von 28, 12 oder 5 mm; rund (R) mit Durchmessern von 28, 17 oder 11 mm) (Abb. 38 E). Auch wurde die Anzahl an Fehlritten gemessen (Abb. 38 F). Die Zeit, die die Mäuse zur Überquerung benötigten, betrug bei allen quadratischen Stangen ungefähr neun Sekunden, unabhängig vom Querschnitt. Die Latenz der Überquerung nahm bei den runden

Ergebnisse

Schwebebalken mit abnehmendem Querschnitt zu. Ein Unterschied der Latenzen lag zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen nicht vor (**Abb. 38 E**). Anders als bei der Latenz der Überquerung nahm die Anzahl an Fehlritten mit abnehmendem Querschnitt der quadratischen Schwebebalken zu, im Wildtyp wie auch in den TMEM55B-defizienten Mäusen (**Abb. 38 F**). Eine Zunahme der Fehlritte war auch auf den runden Schwebebalken zu detektieren. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen, bis auf die Fehlrittsanzahl am kleinsten Schwebebalken, die im Wildtyp deutlich erhöht war. Hierbei muss angemerkt werden, dass diese hohe Anzahl an Fehlritten der Wildtypmäuse eine Verzerrung der Messung war, die durch zwei Wildtypmäuse mit erhöhtem Gewicht hervorgerufen wurde (**Abb. 38 F**).

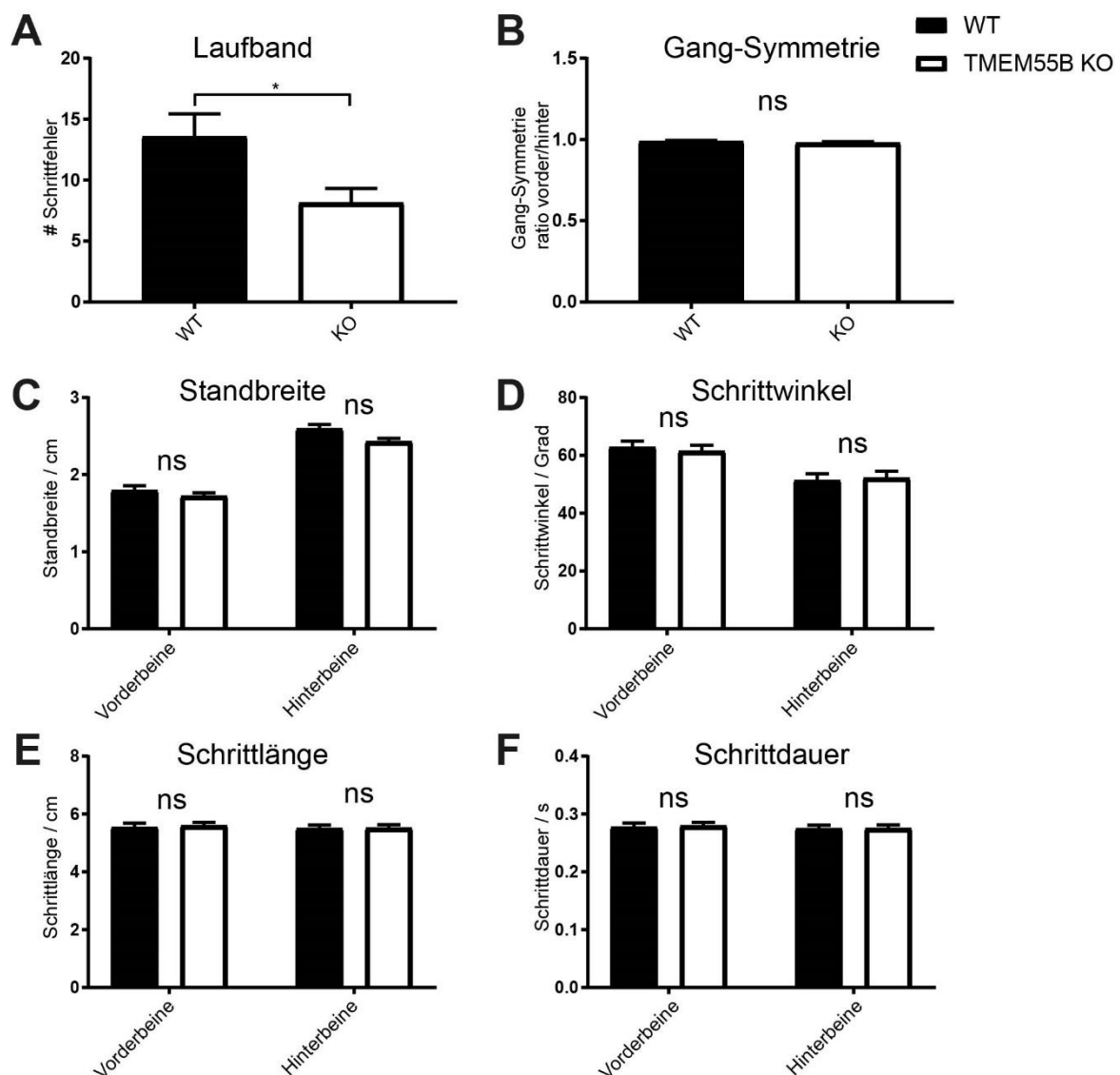


Abb. 39 Laufbandanalyse von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen.

Das Laufverhalten von Wildtyp und TMEM55B-defiziente Mäusen wurde mittels einer Laufbandanalyse untersucht. Dabei wurden (**A**) die Schrittfehler gezählt, (**B**) die Gangsymmetrie bestimmt und die (**C**) Standbreite, (**D**) der Schrittwinkel, (**E**) die Schrittlänge und (**F**) die Schrittdauer gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Replikaten von je 14 Mäusen mit dem Standardfehler des Mittelwerts. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

Ergebnisse

Zur weiteren Analyse der motorischen Funktionen unter TMEM55B-defizienten Bedingungen wurde die Gangart der Mäuse auf einem Laufband durch ventrale Videoverfolgung mit Software und Hardware der Firma *DigiGait* untersucht (3.6.13). Dabei wurden Mäuse für 45 Sekunden auf einem Laufband laufen gelassen. Es wurden gemessen, wie häufig die Mäuse nicht mit der Geschwindigkeit mithalten konnten. Auch wurde die Gangsymmetrie, Standbreite, Schrittwinkel, Schrittlänge und Schrittdauer der Mäuse bestimmt. Beim Wildtyp konnten im Durchschnitt 14 Fehlritte während der Laufzeit detektiert werden. Die TMEM55B-defizienten Mäuse zeigten mit ungefähr 7 Schrittfehlern eine leicht signifikant bessere Leistung und konnten sich dem Tempo des Laufbandes besser anpassen als der Wildtyp (**Abb. 39 A**). Jedoch spiegelte sich diese bessere Adaption an das Laufbandtempo nicht in der Gangsymmetrie (**Abb. 39 B**), der Standbreite (**Abb. 39 C**), dem Schrittwinkel Hinterbeine (**Abb. 39 D**), der Schrittlänge (**Abb. 39 E**) oder der Schrittdauer (**Abb. 39 F**) der Vorder- oder Hinterbeine wieder. Dort wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen nachgewiesen.

Die Versuche belegten, dass keine motorische Beeinträchtigung in den TMEM55B-defizienten Mäusen vorlag. Vielmehr zeigten sie im Rotarod-Test den Trend einer höheren Latenz das Gleichgewicht zu verlieren und eine leicht signifikant höhere Adaption an das Laufen auf einem Laufband. Insgesamt wurde jedoch kein ausgeprägter motorischer Verhaltensphänotyp beschrieben.

Über die Analyse des motorischen Verhaltens hinaus wurde auch das Erkundungsverhalten in einem *open-field*-Test untersucht (3.6.14). Dabei wurden die Laufstrecke und der Aufenthaltsort der Mäuse über zehn Minuten in einer offenen Arena gemessen. Es zeigte sich, dass Wildtyp und TMEM55B-defiziente Mäuse ähnlich weite Strecken in der Zeit zurücklegten (**Abb. 40 A**) und das auch keine Unterschiede in der Zeit, welche die Mäuse in der Peripherie oder dem Zentrum der Arena verbrachten, vorlag (**Abb. 40 B**). *Heatmaps* des Aufenthaltsortes von Wildtyp (**Abb. 40 C**) und von TMEM55B-defizienten Mäusen (**Abb. 40 D**) zeigten auch eine ähnliche Verteilung, mit der höchsten Aufenthaltszeit in den Ecken der Arena, gefolgt von einer hohen Aufenthaltsdauer an den Wänden und dem kürzesten Aufenthalt in der Mitte der Arena.

Der Versuch zeigt, dass die Defizienz von TMEM55B zu keiner Veränderung des Erkundungsverhaltens in neuen Gebieten führt und somit die Neugier, die Bereitschaft zur motorischen Aktivität und die Angst vor Unbekanntem unverändert ist.

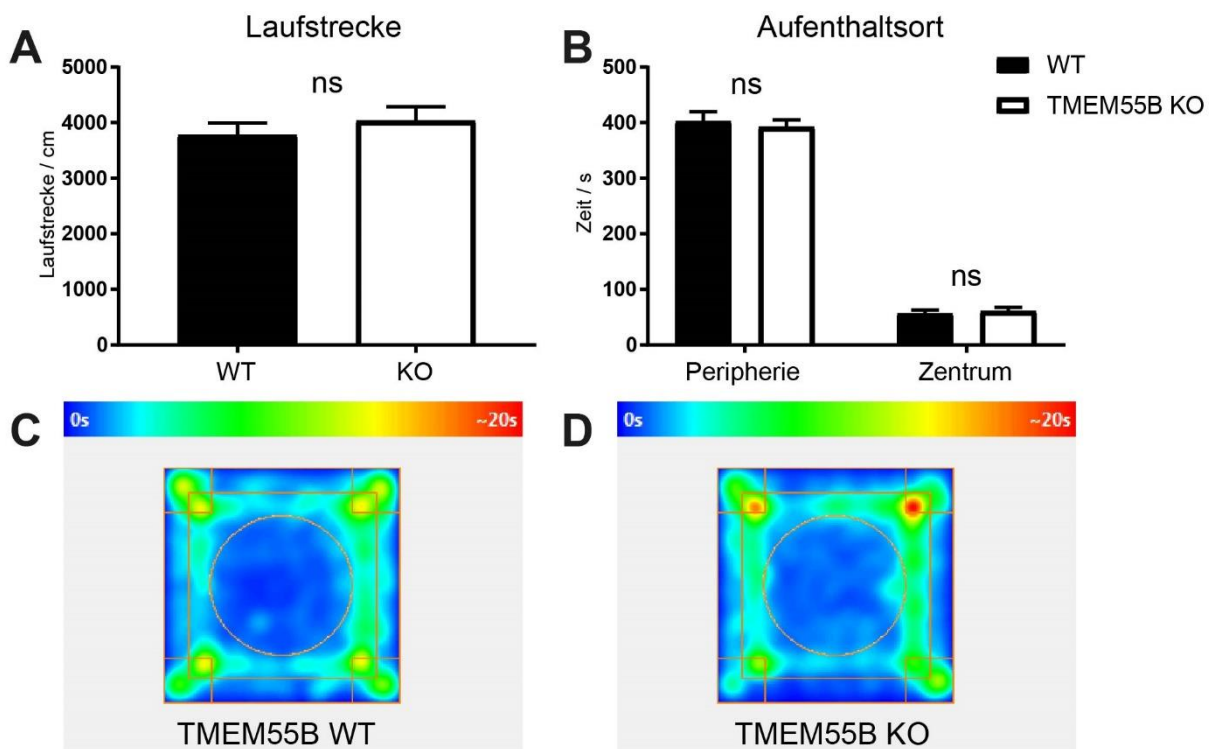


Abb. 40 Analyse des Verhaltens von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen im *open-field*-Test.

Mäuse wurden für 30 Minuten bei Dunkelheit gehalten und anschließend in ein 50x50x30 cm Arena gesetzt. Nach einminütiger Adaption wurden (A) die Gesamtlaufstrecke und (B) der Aufenthaltsort bestimmt. (Peripherie = <5cm von der Wand entfernt, Zentrum = Kreis mit 30 cm Durchmesser im Zentrum). Von dem Aufenthaltsort von Wildtyp (C) und TMEM55B-defizienten Mäusen (D) wurden auch *Heatmaps* erstellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Replikaten von je 14 Mäusen mit dem Standardfehler des Mittelwerts. Durchgeführt wurden die Versuche von Stijn Stroobants aus der *Mouse Behavior Core Facility* in Leuven.

4.15.3. Die doppelte Defizienz von TMEM55B und TMEM55A führt zu einem verringerten Wachstum von Mäusen

In den bisherigen Untersuchungen konnte in TMEM55B-defizienten Mäusen eine Akkumulation von Lysosomen im AIS gezeigt werden, die zur Degeneration von Axonen führt, aber keinen deutlichen Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten der Mäuse hat. Wie auch schon in den *in cellulo* Studien erläutert (4.3), besteht eine Möglichkeit, dass die paralogen Proteine TMEM55A und TMEM55B eine redundante Funktion teilen und so eine einzelne Defizienz kompensiert werden könnte. Um den Effekt einer doppelten Defizienz von TMEM55A und TMEM55B zu untersuchen, wurden aus den einzel-defizienten Mäusen doppel-defiziente Mäuse gezüchtet und eine Gewichtskurve der männlichen Mäuse bestimmt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich, wie schon für weibliche Mäuse im Verhaltenstest (Abb. 38 A) beschrieben, dass die TMEM55B-einzel-defizienten Mäuse keinen Unterschied in der Gewichtszunahme in einem Alter von drei bis zwölf Wochen aufwiesen (Abb. 41 A). Auch die TMEM55A-defizienten Mäuse zeigten, bis auf eine Ausnahme, einen identischen

Ergebnisse

Verlauf (**Abb. 41 A**). Wird jedoch das Gewicht des Wildtyps mit dem der TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten Mäusen verglichen, zeigte sich über den gesamten gemessenen Zeitraum von drei bis zwölf Wochen ein deutlich geringeres Gewicht der doppelt-defizienten Mäuse (**Abb. 41 B**). Während der Zucht zeigte sich auch, dass ein Wildtypallel von TMEM55A ausreicht, um die Ausprägung des Phänotyps zu verhindern (**Abb. 41 C und D**).

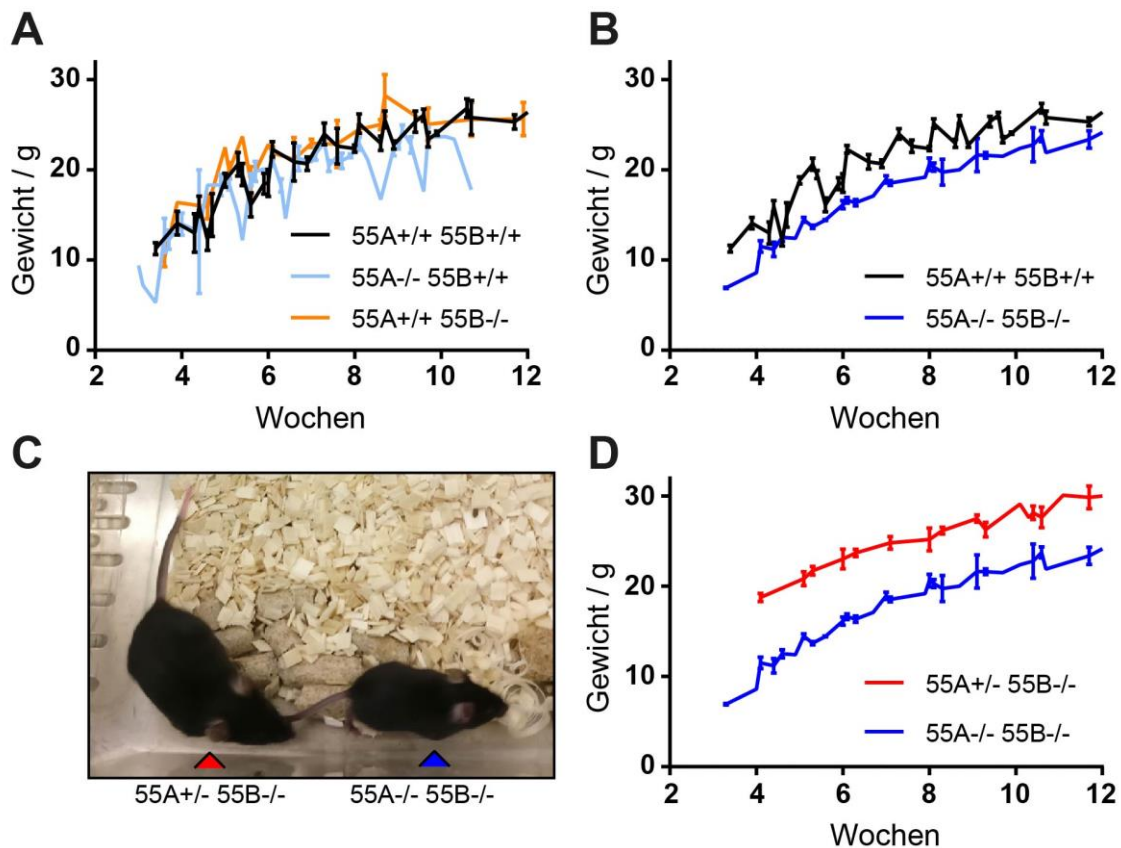


Abb. 41 Gewichtsbestimmung von TMEM55A- und TMEM55B-defizienten männlichen Mäusen.

Es wurde von Mäusen in einem Alter von drei bis zwölf Wochen wöchentlich das Gewicht und so eine Kurve der Gewichtszunahme bestimmt. Dies wurde für (A) Wildtyp (schwarz), TMEM55A-defiziente (hell blau) und TMEM55B-defiziente Mäuse (orange), (B) Wildtyp (schwarz) und TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defiziente Mäuse (blau) durchgeführt. (C) Foto des Größenvergleichs von *Tmem55a*^{+/-} *Tmem55b*^{-/-} (rot) und *Tmem55a*^{-/-} *Tmem55b*^{-/-} (blau) Mäusen und (D) deren Gewichtskurve.

Die Gewichtskurve der TMEM55A- und TMEM55B-doppelt-defizienten Mäuse zeigt, dass beide Proteine für die Entwicklung der Mäuse eine redundante oder aber additive Funktion besitzen.

5. Diskussion

5.1. Das lysosomale Transmembranprotein TMEM55B ist am Transport von Lysosomen beteiligt

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass endogenes TMEM55B in Hela- und MEF-Zellen mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP2 kolokalisiert und in einer Membrananreicherung in der Fraktion der Membranproteine vorzufinden ist (**Abb. 6**). Zusammen mit der vorhergesagten Topologie, die zwei Transmembrandomänen beinhaltet, kann TMEM55B als lysosomales Transmembranprotein eingeordnet werden, wie es so schon in der ersten Charakterisierung durch Ungewickell *et al.* basierend auf Immunfluoreszenzfärbungen beschrieben wurde (Ungewickell *et al.*, 2005).

Willett *et al.* publizierten während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit, dass TMEM55B am retrograden Transport von Lysosomen innerhalb von Zellen beteiligt ist (Willett *et al.*, 2017). Sie zeigten, dass die Überexpression von TMEM55B zu einer Anhäufung von perinuklear lokalisierten Lysosomen führte und dass eine durch siRNA-Behandlung reduzierte Expression von TMEM55B die Lysosomen in der Peripherie der Zelle akkumulieren lässt. Der Phänotyp unter Überexpressionsbedingungen konnte in der hier vorliegenden Studie reproduziert werden (**Abb. 7**). Widersprüche ergaben sich jedoch unter TMEM55B-verminderten und auch TMEM55B-defizienten Bedingungen. In beiden experimentell unabhängigen Systemen, in denen die Expression von TMEM55B verringert wurde, konnten keine Anhäufungen von Lysosomen in der Peripherie der Zelle nachgewiesen werden (**Abb. 7** und **Abb. 10**). Eine Begründung für die hier normal verteilten Lysosomen könnte eine Adaption sein. Besonders in TMEM55B-defizienten MEF-Zellen können über die Zeit andere zelluläre Mechanismen die Funktion übernehmen. Im Zebrafisch wurde anhand des *EGF-like domain-containing protein 7* (EGFL7) gezeigt, dass eine Deletionsmutante keinen Phänotyp aufwies, ein *knockdown* der mRNA durch RNA Interferenz jedoch schon. Erklärt wurde dieses Phänomen durch die schon länger bekannte genetische Kompensation, einem Puffersystem, das nach genomischen Deletionen aktiviert wird, um den Organismus am Leben zu erhalten. Dieses System wird jedoch nicht nach einer Behandlung mit siRNA aktiviert (Rossi *et al.*, 2015). Im Gegensatz zum Fall von EGFL7 konnte in der hier vorliegenden Arbeit auch mit siRNA gegen TMEM55B keine Veränderung der Lokalisation der Lysosomen beobachtet werden. Dies könnte durch eine hohe funktionelle Effizienz des Proteins erklärt werden. Damit würden wenige TMEM55B Moleküle ausreichen, um den retrograden Transport noch aufrecht zu erhalten (Zimmer, Pan, Chandrapalan, Kwong, & Perry, 2019). In diesem Fall wäre der in dieser Arbeit erreichte *knockdown* von TMEM55B weniger effektiv gewesen, als der von Willett *et al.* (Willett *et al.*, 2017). Auch könnte eine Kompensation auf Proteinebene stattfinden, sodass

Proteinkomplexe, die auch für den retrograden Transport zuständig sind, wie z.B. RILP oder TRPML1/ALG2, den fehlenden Transport von TMEM55B übernehmen. Grundsätzlich stellt sich dabei die Frage, warum in der Zelle mehrere verschiedene Komplexe von Adaptoren (RILP/Rab7, TRPML1/ALG2 und TMEM55B/JIP4) den Dynein/Dynactin-abhängigen retrograden Transport von Lysosomen vermitteln. Unter welchen Umständen wird welcher Komplex bevorzugt bzw. benötigt und unter welchen Umständen kann eine Defizienz ausgeglichen werden. Möglich ist etwa, dass die von Willett *et al.* publizierten Daten nicht valide sind.

Das zu TMEM55B paraloge Protein TMEM55A hat mit TMEM55B eine 51% identische Aminosäuresequenz und ist auch ein lysosomales Membranprotein, das initial in einem *Screen* für mögliche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-4-phosphatasen in Säugetieren beschrieben wurde (**Abb. 8** und (Ungewickell *et al.*, 2005)). Es besteht also potentiell die Möglichkeit, dass beide Proteine ähnliche oder sogar redundante Funktionen in der Zelle übernehmen. Eine Kompensation des TMEM55B-vermittelten Transports in TMEM55B-defizienten Zellen durch TMEM55A ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da eine Überexpression von TMEM55A zu keiner perinukleären Akkumulation von Lysosomen führt (**Abb. 8** und (Willett *et al.*, 2017)). Auch eine doppelte Defizienz von TMEM55A und TMEM55B brachte keine veränderte Positionierung der Lysosomen hervor (**Abb. 10**). Das zeigt, dass TMEM55A und TMEM55B wahrscheinlich keine vollständig redundante Funktion im lysosomalen Transport ausüben.

5.2. Eine TMEM55B-Defizienz ist nicht grundsätzlich letal in Mäusen

Hashimoto *et al.* beschrieben, dass eine TMEM55B-Defizienz in C57BL/6 Mäusen während der Embryogenese letal sei (Hashimoto *et al.*, 2018). Der *knockout* wurde dabei durch eine Deletion der Exons 2-6 mittels einer IRES-lacZ und PGK-neo-poly(A)-loxP Kasette eingeführt. Während heterozygote Nachkommen in der Häufigkeit und im Phänotyp nicht von Wildtypmäusen zu unterscheiden waren, entwickelten sich die TMEM55B-Mäuse nur bis zum embryonalen Tag 8,5 normal. An Tag 9,5 zeigte sich schon eine deutliche Wachstumsverzögerung. Aufgrund der Interaktion mit dem RAGULATOR-Rag Komplex und einer zeitlich vergleichbaren Wachstumsverzögerung in LAMTOR1-defizienten, LAMTOR2-defizienten oder RagA-defizienten Mäusen schlossen Hashimoto *et al.*, dass die Letalität der TMEM55B-defizienten Mäusen direkt auf einer essentiellen Interaktion von TMEM55B mit diesem Komplex beruht (Hashimoto *et al.*, 2018).

In dieser Arbeit wurden jedoch C57BL/6 Mäuse beschrieben, die einen funktionellen *knockout* für TMEM55B aufwiesen und vital waren (**Abb. 9**). Die Generierung einer TMEM55B-Defizienz

in der vorliegenden Arbeit unterschied sich jedoch von Hashimoto *et al.* Es wurden mittels CRISPR/Cas9 vier Nukleotide in Exon 2 deletiert und so eine veränderte Sequenz nach Aminosäure 87 sowie ein frühzeitiges Stopp-Codon nach Aminosäure 106 eingeführt (**Abb. 9**). Das frühzeitige Stopp-Codon könnte zu einem löslichen Fragment von TMEM55B führen, da die erste Transmembrandomäne erst ab Aminosäure 219 beginnt. Warum sind also die hier verwendeten Mäuse nicht letal? Könnte das potentiell exprimierte TMEM55B Fragment die Funktion des volllängen TMEM55B partiell kompensieren? Der in dieser Arbeit verwendete kommerzielle Antikörper gegen TMEM55B (ProteinTech) wurde mit einem Peptid aus den Aminosäuren 15-83 des humanen TMEM55B erzeugt (siehe Produktbeschreibung: ProteinTech #23992-1-AP). Der Antikörper sollte also das mögliche trunkierte N-terminale TMEM55B Fragment erkennen. Da kein Protein-Fragment in TMEM55B-defizienten Zellen und Organen mittels Immunoblot oder mRNA-Fragmente in einer quantitativen RNA-Sequenzierung detektiert wurde (**Abb. 8** und **Abb. 36**, RNA-Sequenzierung nicht gezeigt), kann geschlossen werden, dass das Fragment direkt degradiert oder gar nicht erst exprimiert wird, weil die mRNA mittels *nonsense-mediated decay* direkt abgebaut wird (Kishor, Fritz, & Hogg, 2019). Keine Fragmente von TMEM55B können also die von Hashimoto *et al.* beschriebene letale Wirkung der TMEM55B-Defizienz kompensieren. Dagegen könnte ein trunkiertes TMEM55B Fragment in den von Hashimoto *et al.* verwendeten Mäusen der Qualitätskontrolle des ER entgangen sein und eine toxische und somit letale Wirkung auf die Mäuse gehabt haben. Da Hashimoto *et al.* keine Gesamtgenom-Analyse ihrer TMEM55B-defizienten Mäuse angefertigt haben, könnte die Sterblichkeit ihrer Mäuse auf einen *Off-target* Effekt der Genkassette hindeuten.

5.3. Die Phosphatase Aktivität von TMEM55B ist *in cellulo* nicht zu reproduzieren

TMEM55B wurde initial als Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-4-phosphatase beschrieben (Ungewickell et al., 2005). Diese Studie basiert auf der Suche nach humanen Homologen zur Phosphatase BopB und der *in vitro* Analyse der Phosphatase-Aktivität der gefundenen Kandidaten TMEM55A und TMEM55B gegen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂). Willett *et al.* konnten diese Phosphatase Aktivität nicht reproduzieren. Sie inkubierten den gereinigten GST-markierten rekombinanten N-terminus von TMEM55B, der das CX₅R Phosphatasemotiv einschließt, mit dem putativen Substrat PtdIns(4,5)P₂ und maßen colorimetrisch mit einem Malachitgrün-Phosphat-Assay das durch die Phosphatase neu generierte freie Phosphat. Als Positivkontrolle wurde die *SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2* (SHIP2) mitgeführt. Sie konnten keine Aktivität von TMEM55B gegen dieses Substrat messen (Willett et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden die PtdIns(4,5)P₂

Level in MEF- und Hela-Zellen mikroskopisch mithilfe von Antikörpern gegen PtdIns(4,5)P₂ oder eines GFP-markierten Fusionsproteins mit einer PtdIns(4,5)P₂-Bindedomäne des Proteins PLCD1 untersucht. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp, TMEM55B-Defizienz oder der Überexpression von TMEM55B detektiert werden (**Abb. 12** und **Abb. 13**). Der überwiegende Anteil von PtdIns(4,5)P₂ ist jedoch nicht in der lysosomalen Membran lokalisiert, sondern in der Plasmamembran (Di Paolo & De Camilli, 2006; Wallroth & Haucke, 2018). Durch Mutation des Dileucin-Motivs von TMEM55B konnte eine Plasmamembran-ständige Mutante von TMEM55B generiert werden. Diese hatte jedoch ebenfalls keinen Effekt auf die detektierten PtdIns(4,5)P₂-Level (**Abb. 13**). Willet *et al.* zeigten ein ähnliches Experiment. Sie führten eine Rapamycin-induzierte Dimerisierung eines Konstrukts bestehend aus der cytosolischen Domäne des N-terminus von TMEM55B, *Red fluorescent protein* (RFP) und *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* (FKBP1A) (RFP-FKBP-TMEM55B) mit einem Konstrukt des Plasmamembran-Markers Lyn₁₁ mit *infra red fluorescent protein* (iRFP) und der FRB-Domäne von mTOR (Lyn₁₁-FRB-iRFP) durch. Somit erreichten auch sie eine Lokalisation von TMEM55B an der Plasmamembran. Doch auch Willett *et al.* konnten keine Änderung in den PtdIns(4,5)P₂-Leveln nachweisen (Willett *et al.*, 2017).

Sowohl die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, als auch die von Willett *et al.* publizierten Experimente deuten darauf hin, dass die hauptsächliche Funktion von TMEM55B *in cellulo* nicht die Dephosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂ ist. Sie stellen die publizierte Phosphataseaktivität von TMEM55B generell in Frage.

5.4. Dileucinmotiv

TMEM55A und TMEM55B besitzen hoch konservierte Dileucinmotive mit sauren Aminosäuren in ihren N-termini (**Abb. 11**). Dileucinmotive sind Bindestellen für Adaptor-Protein-Komplexe (AP) und vermitteln mit den AP einen Transport zu den Lysosomen (1.4.2). Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der kritischen Leucinreste in den Dileucinmotiven von TMEM55A und TMEM55B zu Alaninresten zu einem veränderten Transport der Proteine führt und die Proteine durch eine partiellen Fehlsortierung neben der lysosomalen Membran auch an der Plasmamembran detektiert werden können (**Abb. 11**). Auch Willet *et al.* zeigten, dass der Transport von TMEM55B in die lysosomale Membran abhängig vom Dileucinmotiv ist (Willett *et al.*, 2017). Darüber hinaus inhibierten sie mittels Überexpression der dominant-negativen Mutante von Dynamin, genauer Dynamin-K44A, Endozytose und konnten auch so TMEM55B an der Plasmamembran akkumulieren lassen (Willett *et al.*, 2017). Diese Befunde deuten darauf hin, dass TMEM55B zumindest mit dem Plasmamembran-assoziierten AP2 interagiert und eine der Transportrouten von TMEM55B zu den Lysosomen indirekt über die Plasmamembran verläuft. Von der Plasmamembran wird TMEM55B dann über Clathrin-

vermittelte Endozytose wieder aufgenommen und zu den Lysosomen transportiert (Beacham, Partlow, & Hollopeter, 2019). Es ist jedoch auch möglich, dass TMEM55B nur dann vermehrt durch den unspezifischen Gesamtfluss im sekretorischen Weg von der Golgi-Membran zu der Plasmamembran transportiert wird, wenn der Dileucinmotiv-abhängige direkte Transport zu den Lysosomen wegfällt (Boncompain & Perez, 2013; Burgess & Kelly, 1987). So wäre dann zu erklären, dass endogenes (**Abb. 6**) und überexprimiertes TMEM55B (**Abb. 7**) nicht an der Plasmamembran detektiert wird. Das Adaptor-Protein AP2 würde in diesem Fall nur die Endozytose von fehlsortiertem TMEM55B von der Plasmamembran vermitteln. AP2 wäre dann nicht am direkten Transport des hauptsächlichen Anteils von TMEM55B aus dem Golgi-Apparat in die Lysosomen beteiligt. Außerdem besteht die Möglichkeit eines weiteren, vom untersuchten Dileucinmotiv unabhängigen Transportweges, da TMEM55B weiterhin die lysosomale Membran erreicht.

5.5. mTORC1-Aktivität unter Abhängigkeit von TMEM55B

TMEM55B und die zentrale Untereinheit des RAGULATOR-Komplexes LAMTOR1 sind lysosomale Proteine. Beide Proteine werden palmitoyliert (**Abb. 18** und (Nada et al., 2009)), sind in Detergenz-resistenten Membranen (DRMs) lokalisiert (Hashimoto et al., 2018; Nada et al., 2009) und besitzen zytoplasmatische Domänen, denen eine Rolle an zellulären Signalwegen, wie dem *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg, zugeschrieben wird (C. M. Lee et al., 2002; Magee & Cygler, 2011; Willett et al., 2017). Außerdem sind beide Proteine am Transport von Lysosomen innerhalb der Zelle beteiligt (Filipek et al., 2017; Willett et al., 2017). Deshalb wurde angenommen, dass beide Proteine potentiell interagieren könnten (4.9). Es konnte tatsächlich anhand einer Koimmunopräzipitation gezeigt werden, dass beide Proteine unter Überexpressionsbedingungen interagieren (**Abb. 16**). Dieser Befund führte zu der Vermutung, dass die Interaktion von TMEM55B und LAMTOR1 eine Relevanz innerhalb des mTORC1-Signalwegs haben könnten. LAMTOR1 ist als Teil des RAGULATOR-Komplexes an der Aktivierung von mTORC1 beteiligt, in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Aminosäuren im Lumen der Lysosomen oder im Zytosol (Bar-Peled et al., 2013; Jung, Genau, & Behrends, 2015; Zoncu et al., 2011). Der durchgeführte mTORC1-Reaktivierungsassay in MEF-Zellen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied in der mTORC1-Aktivität zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten MEF-Zellen (**Abb. 17**).

Hashimoto *et al.* zeigten massenspektrometrisch in einer Interaktionsstudie von TMEM55B, das aus Neuro2A-Zellen immunpräzipitiert wurde, eine Bindung von TMEM55B mit LAMTOR1, LAMTOR3, mit Untereinheiten der v-ATPase und auch mit mTOR, der zentralen Kinase-Untereinheit von mTORC1 (Hashimoto et al., 2018). Sie zeigten, dass TMEM55B über die Transmembrandomänen eine Interaktion mit der v-ATPase eingeht und mutmaßlich darüber

Diskussion

die Assemblierung der peripheren V1- und der integralen V₀-Domäne in Detergenz-resistenten Membranen (DRMs) reguliert. Unter TMEM55B-reduzierten und TMEM55B-defizienten Bedingungen zeigten sie eine verlangsamte Reaktivierung von mTORC1 im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Hashimoto et al., 2018). Sie erklärten diese Beobachtung mit der Regulation der Assemblierung der v-ATPase durch TMEM55B und mit der Interaktion von LAMTOR1 und TMEM55B. Diese Ergebnisse stehen konträr zu dem in dieser Arbeit durchgeführten mTORC1-Reaktivierungsexperiment.

Die von Hashimoto *et al.* durchgeführten Experimente unterschieden sich von denen dieser Arbeit im Zellkultur-Medium, mit dem mTORC1 deaktiviert und reaktiviert wurde. Hashimoto *et al.* setzten Medium mit 10% Serum ein, während in der vorliegenden Arbeit ohne Serum gearbeitet wurde. Auch wurde von Hashimoto *et al.* die Reaktivierung über einen kürzeren Zeitraum verfolgt. Die Reaktivierung von mTORC1 mit Aminosäuren ohne Serum/Wachstumsfaktoren ist deutlich geringer, als mit Aminosäuren und Serum/Wachstumsfaktoren, da die Rheb-Kinase an Lysosomen weniger aktiv ist (Jia & Bonifacino, 2019; Saucedo et al., 2003). Sie war jedoch ausreichend, um in MEFs die Rolle der v-ATPase auf die mTORC1-Reaktivierung zu zeigen (Kissing et al., 2017). Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Experimente in dieser Arbeit und denen von Hashimoto *et al.* können nicht durch Zelltyp-spezifische Mechanismen erklärt werden, da in beiden Fällen mit MEF-Zellen gearbeitet wurde. Ein weiterer Grund für die Unterschiede in den Experimenten könnte die Lethalität des von Hashimoto *et al.* verwendeten *knockout*-Mausmodells sein, aus dem die MEFs generiert wurden. Die Lethalität wurde möglicherweise durch *Off-target* Effekte hervorgerufen, die auch einen Einfluss auf den mTORC1-Signalweg haben könnten.

Ein Effekt der Lokalisation der Lysosomen innerhalb der Zelle auf die Reaktivierung von mTORC1 wird von Hashimoto *et al.* nicht adressiert (Hashimoto et al., 2018). So wurde von Korolchuk *et al.* beschrieben, dass juxtanukleäre Lysosomen zu einer geringeren mTORC1-Aktivität und Reaktivierung führen würden und periphere Lysosomen zu einer höheren Aktivität und schneller Reaktivierung von mTORC1 beitragen (Korolchuk et al., 2011). Da die TMEM55B-Defizienz zu einer veränderten Verteilung der Lysosomen in der Zelle führen kann, könnte dies auch einen relevanten Effekt auf die gemessene mTORC1-Reaktivierung haben (Konträre Ergebnisse dieser Arbeit zu (Willett et al., 2017); (Hashimoto et al., 2018)). Da in dieser Arbeit keine periphere Akkumulation der Lysosomen in den TMEM55B-defizienten MEFs nachgewiesen werden konnte, die Verteilung der Lysosomen also nicht verändert war (**Abb. 10**), könnte dies das unveränderte mTORC1-Signaling erklären (**Abb. 17**).

5.6. Autophagie in TMEM55B-defizienten Maus embryonalen Fibroblasten

Die Lokalisation von Lysosomen hat einen Einfluss auf deren Funktion und ist insbesondere ausschlaggebend für die Fusion mit perinukleär gebildeten Autophagosomen (Korolchuk et al., 2011). So wurde unter JIP4-defizienten Bedingungen gezeigt, dass eine Akkumulation von Lysosomen in der Zellperipherie zu einer verminderten Fusion mit Autophagosomen und somit zu einem verminderten Abbau von autophagozytiertem *Cargo* führte (Suzuki et al., 2020). Die Akkumulation von Lysosomen unter JIP4-defizienten Bedingungen entsteht jedoch unabhängig vom JIP4- und TMEM55B-vermittelten Transport der Lysosomen (Suzuki et al., 2020; Willett et al., 2017). Trotzdem zeigt sich in diesem Modell, wie eine veränderte Positionierung der Lysosomen einen Einfluss auf die Autophagie nehmen kann. In TMEM55B-defizienten MEF Zellen wurde in dieser Studie jedoch keine veränderte Expression von den lysosomalen Membranproteinen LAMP2 und LIMP2 sowie der löslichen lysosomalen Hydrolase Cathepsin D detektiert (**Abb. 14**), und auch der Autophagie-Flux war nicht verändert (**Abb. 15**). Da in den untersuchten MEFs auch keine Veränderung in der Positionierung der Lysosomen innerhalb der Zelle detektiert wurde (**Abb. 10**), könnte dies erklären, warum keine Änderungen der Autophagie gemessen werden konnten. Auch die putative Rolle von TMEM55B als PtdIns(4,5)P₂-Phosphatase in der *Autophagic lysosome reformation* (ALR) hätte einen Einfluss auf Autophagie haben können (Du et al., 2016; Rong et al., 2012). Es könnten jedoch auch zellspezifische Faktoren relevant sein. Suzuki *et al.* verwendeten HeLa-Zellen in ihrer Studie, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendet MEF-Zellen. Auch wurde der Autophagie-Flux von Suzuki *et al.* mit Chloroquin und in dieser Arbeit mit Bafilomycin A1 inhibiert. Bafilomycin A1 inhibiert direkt die v-ATPase getriebene Azidifizierung des lysosomalen Lumens und somit die Degradierung von Material im lysosomalen Lumen, wie z.B. LC3-II (Yoshimori, Yamamoto, Moriyama, Futai, & Tashiro, 1991). Für Chloroquin wurde lange angenommen, dass es ähnlich wie Bafilomycin A1 eine Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes bewirkt und so den Autophagie-Flux inhibiert. Deshalb wird es auch weiterhin in den *Autophagy-Guidelines* aufgeführt (Klionsky et al., 2016). Kürzlich wurde aber publiziert, dass Chloroquin den Autophagie-Flux über eine Inhibition der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen verhindert (Mauthe et al., 2018). Auch wurde gezeigt, dass Chloroquin unabhängig von der Autophagie zu einer Disorganisation des endo-lysosomalen-Systems und des Golgi-Apparates führt, was einen Einfluss auf die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen haben könnte (Mauthe et al., 2018). Diese Unterschiede des Wirkmechanismus zwischen Bafilomycin A1 und Chloroquin könnten auch eine Auswirkung auf die Ergebnisse haben und eine möglicher Erklärung der Unterschiede zwischen den Befunden dieser Arbeit und denen von Suzuki *et al.* sein (Suzuki et al., 2020).

Zusammengefasst scheint TMEM55B keine ausschlaggebende Rolle in der Autophagie in MEFs zu spielen.

5.7. Palmitoylierung von TMEM55B

TMEM55B wurde in einer Reihe von proteomweiten Studien mit dem Ziel der Identifikation von palmitoylierten Proteinen, die in einer Metastudie zusammengefasst wurden, aufgeführt (Sanders et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte experimentell gezeigt werden, dass TMEM55B an Cysteinresten S-palmitoyliert wird (**Abb. 18**). Murines TMEM55B besitzt 19 Cysteinreste. Es sollte geklärt werden, welche und wie viele Cysteinreste tatsächlich palmitoyliert werden. Durch die Assoziation von Polyethylenglykol (PEG) konnten mindestens drei unterschiedlich häufig S-palmitoylierte Isoformen von überexprimiertem TMEM55B dargestellt werden (**Abb. 18**). Auch unter endogenen Bedingungen in Gehirn-, Hoden- und Milzproteinextrakten konnten neben einer unpalmitoylierten ebenfalls drei unterschiedlich häufig palmitoylierte Isoformen detektiert werden. Die Intensität der verschiedenen Isoformen war vergleichbar mit denen des in Hela-Zellen überexprimierten TMEM55B (Daten nicht gezeigt). Nicht S-palmitoyliertes TMEM55B machte dabei einen großen Anteil des gesamten TMEM55B aus. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Palmitoylierung nicht dauerhaft notwendig für TMEM55B ist, sondern eine regulatorische Funktion erfüllt. Dabei wäre denkbar, dass TMEM55B durch Thioesterasen depalmitoyliert wird. Andere Proteine, wie z.B. die GTPase HRas (auch transforming protein p21 genannt), liegen ausschließlich in ihren palmitoylierten Isoformen vor (Percher et al., 2016). Die Dynamik der Palmitoylierung von TMEM55B bleibt jedoch weiterhin unklar.

Die Palmitoylierung von TMEM55B kann durch eine Inkubation mit 2-Bromopalmitat (2BP) inhibiert werden (**Abb. 19**). 2BP ist ein potenter Inhibitor aller DHHC(Asp-His-His-Cys)-Palmitoyltransferasen und auch von Acyl-Protein Thioesterasen (Jennings et al., 2009; Pedro et al., 2013). Eine Reduktion von palmitoyliertem endogenem TMEM55B konnte mit 2BP jedoch nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Das liegt vermutlich daran, dass die Palmitoylierung hauptsächlich an neu synthetisiertem TMEM55B stattfindet. Die Zeitspanne der 2BP-Behandlung war nicht ausreichend, damit die Zellen ausreichend endogenes TMEM55B synthetisieren, um einen Unterschied der Palmitoylierung von endogenem TMEM55B zu detektieren. Die Mehrzahl der DHHCs sind im ER und im Golgi-Apparat lokalisiert und einige auch in der Plasmamembran (Y. Ohno, Kihara, Sano, & Igarashi, 2006). Es konnten zwar eine DHHC-Palmitoyltransferase in der Membran der Hefe-Vakuole nachgewiesen werden, jedoch wurde bislang keine humane DHHC-Palmitoyltransferase in der lysosomalen Membran nachgewiesen (Y. Ohno et al., 2006). Da TMEM55B während des Transports in die Lysosomen alle zellulären Organellen, in denen potentiell DHHC-

Palmitoyltransferasen lokalisiert sind, durchqueren kann, ist ein Rückschluss auf den Ort der Palmitoylierung von TMEM55B nicht möglich (**Abb. 11** und (Willett et al., 2017)).

5.8. Die Palmitoylierung von TMEM55B ist nicht ursächlich für die Lokalisierung in Detergenz-resistenten Membranen

Palmitoylierung kann zu einer Organisation von Proteinen in bestimmten Membranabschnitten führen (Charollais & Van Der Goot, 2009). Diese Membranabschnitte zeichnen sich aufgrund ihrer Lipidkomposition durch eine Resistenz gegen bestimmte Detergenzien aus und werden deshalb auch Detergenz-resistente Membranen (DRMs) genannt (Lichtenberg et al., 2005). Diese Bezeichnung beruht jedoch rein auf den physikalischen Eigenschaften der Membranen und es können keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die Funktionen von Proteinen mit einer Lokalisation innerhalb der DRMs getätigt werden. Für die GTPase HRas wurde eine Lokalisation in solchen Membranstrukturen gezeigt. Andere nicht palmitoylierte Isoformen von HRas waren jedoch nicht in diesen Membrandomänen zu finden (Parton & Hancock, 2004). Auch für das Typ I Transmembranprotein *linker for activation of T cells* (LAT), das Teil von T-Zell-Rezeptor-Signalwegen ist, wurde eine Palmitoylierung als wichtige Voraussetzung für eine Organisation in DRMs nachgewiesen (W. Zhang, Tribble, & Samelson, 1998). Andere bekannte palmitoylierte Proteine werden jedoch nicht in DRMs organisiert. Der Transferrinrezeptor (TFR) dient z.B. als Marker für nicht-DRM-Moleküle und ist palmitoyliert (Alvarez, Girones, & Davis, 1990). Es sollte untersucht werden, ob die Palmitoylierung von TMEM55B eine Sortierung in DRMs begünstigt.

Für TMEM55B konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es unter Überexpressionsbedingungen und endogen in DRMs lokalisiert ist (**Abb. 20**). Auch Hashimoto *et al.* verorteten TMEM55B in den DRMs (Hashimoto et al., 2018). Da bisher nicht geklärt werden konnte, welche Cysteinreste genau palmitoyliert sind, wurde mit der nicht mehr palmitoylierten TMEM55B „NoCys“ Mutante und unter Inhibition der Palmitoylierung von überexprimierten TMEM55B durch 2BP untersucht, ob eine DRM-Lokalisation abhängig vom Palmitoylierungsstatus von TMEM55B ist (**Abb. 21**). Es konnte gezeigt werden, dass eine solche Palmitoylierung nicht notwendig für eine Lokalisation von TMEM55B innerhalb von DRMs ist (**Abb. 21**). Dass die Sortierung von TMEM55B in DRMs für dessen Funktion eine Rolle spielt und dass z.B. TMEM55B spezifisch in DRMs mit anderen Proteinen, wie z.B. LAMTOR1 oder der v-ATPase, interagieren kann, ist denkbar (Hashimoto et al., 2018; Nada et al., 2009). Dies konnte bislang jedoch nicht abschließend geklärt werden.

5.9. Die Mutation von Cysteinen führt unabhängig von einer möglichen Palmitoylierung zu einer Retention von TMEM55B im Golgi-Apparat

Die Lokalisation von TMEM55B NoCys zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine Retention im Golgi-Apparat (**Abb. 23**). Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Retention nicht durch eine Fehlfaltung des Proteins hervorgerufen wird, da die Qualitätskontrolle von sekretorischen Proteinen im ER stattfindet (Amm et al., 2014). Bei Fehlfaltung wird das Protein direkt durch das Proteasom abgebaut. Da TMEM55B NoCys aber weiter bis in den Golgi transportiert wird, scheint es trotz der 19 mutierten Aminosäuren weiterhin korrekt gefaltet zu werden.

Dass Palmitoylierung für den anterograden Transport sowohl von löslichen als auch von membranassoziierten Proteinen von Bedeutung ist, zeigen verschiedene Studien. So wird die GTPase H-Ras im Golgi palmitoyliert und an die Membran assoziiert. Abhängig vom Palmitoylierungsstatus wird H-Ras dann über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert (Apolloni, Prior, Lindsay, Parton, & Hancock, 2000). Vermutlich durch eine Thioesterase-vermittelte Depalmitoylierung wird H-Ras in das Zytosol entlassen und in einem nicht-vesikulären Mechanismus zurück zum Golgi transportiert (Dekker et al., 2010; Goodwin et al., 2005; Rocks et al., 2005). Palmitoylierung beeinflusst nicht nur den Transport von H-Ras, sondern auch die Lokalisation im Golgi selbst. H-Ras besitzt eine Isoform mit einem hohen Grad an struktureller Ähnlichkeit, N-Ras. H-Ras ist an zwei Cysteinresten palmitoyliert, N-Ras hingegen nur einmal. Beide Proteine sind im Golgi lokalisiert, jedoch ist H-Ras eher im zentralen Golgi-Apparat und N-Ras im *cis*-Golgi zu finden. Wird entweder die zweite Palmitoylierungsstelle (für H-Ras) entfernt oder eine zweite eingeführt (bei N-Ras), wird die Lokalisation des anderen Ras-Proteins erreicht (Lynch et al., 2015). Erklärt wird diese Beobachtung mit den physikalischen Eigenschaften von gesättigten Acyl-Ketten und deren begünstigte Einordnung in geordnete Nanostrukturen, die reich an Sterolen und Sphingolipiden sind, und der Membranarchitektur im gesamten Golgi-Apparat (Lynch et al., 2015). Diese Beispiele zeigen, dass Palmitoylierung einen Einfluss auf den Transport von Proteinen innerhalb und nach dem Golgi haben kann. Es könnte als eine Begründung für die Retention von TMEM55B NoCys im Golgi-Apparat dienen.

Für Transmembranproteine wurde gezeigt, dass eine Palmitoylierung den Transport innerhalb des Golgi-Apparats, von *cis* zu *trans*, beschleunigt und so die Proteine insgesamt schneller post-Golgi zu ihrem finalen zellulären Kompartiment gebracht werden (Ernst et al., 2018). Die Palmitoylierung führt laut Ernst *et al.* zu einer Konzentrierung der Proteine in gekrümmten Randbereichen der Golgi-Membran, an denen auch die Vesikeltransport-Maschinerie von Bedeutung sind (Farquhar, 1985; Orci, Glick, & Rothman, 1986). Auch hier dient die intrinsische Präferenz von Acyl-Ketten für gekrümmte Membranen als Begründung für diese

Diskussion

Beobachtung. Ob jedoch erst die Krümmung der Membran und dann die Anreicherung der palmitoylierten Proteine geschieht oder aber die palmitoylierten Proteine die Krümmung der Membran selbst bedingen, ist nicht klar (Ernst et al., 2018).

All diese Studien zeigen den Effekt von Palmitoylierung sowohl auf die Lokalisierung innerhalb der (Golgi-)Membran als auch auf den Transport der Proteine in post-Golgi Kompartimente. Palmitoylierung könnte also den post-Golgi Transport von TMEM55B beeinflussen. Es wurde jedoch in keiner der hier vorgestellten Studien eine exklusive Retention im Golgi-Apparat gezeigt, der durch Fehlen einer Palmitoylierung hervorgerufen wird.

Der Transport von TMEM55B wird u.a. über ein N-terminales Dileucinmotiv vermittelt (**Abb. 11** und (Willett et al., 2017)). Durch die Mutation aller Cysteinreste kann eine Palmitoylierung von TMEM55B verhindert werden (**Abb. 18**). Das Transmembranprotein Mucolipin-1 ist ein lysosomaler Kationenkanal, dessen C- und N-Termini im Zytosol liegen. Mucolipin-1 besitzt sowohl N- als auch C-terminal je ein Dileucinmotiv. Beide für den Transport in die Lysosomen benötigt werden (Vergarajauregui & Puertollano, 2006). Vergarajauregui *et al.* zeigten eine reversible Palmitoylierung von Mucolipin-1, die einen regulatorischen Einfluss auf den Transport des Proteins innerhalb der Zelle hatte. Sie erklärten diese Beobachtung damit, dass die Palmitoylierung des Proteins eines der Dileucinmotive in Proximität zur Membran bringen würde. Sie zogen die Schlussfolgerung, dass die Distanz von Dileucinmotiven zur Membran ein kritischer Faktor für die Interaktion mit Adaptor-Proteinen darstellt. Nur in der korrekten Entfernung von der Membran könnten Adaptor-Proteine die Motive binden und einen Transport vermitteln (Vergarajauregui & Puertollano, 2006). Bei dem Kationen-abhängigen M6PR wurde Ähnliches beobachtet. Hier wurde gezeigt, dass eine Palmitoylierung des Proteins essentiell für den lysosomalen Transport ist. Es wurde vermutet, dass die Palmitoylierung das N-terminale Dileucinmotiv des M6PR näher an die Membran bringt. Diese Nähe sei für einen korrekten Transport notwendig (Schweizer, Kornfeld, & Rohrer, 1996).

Neben den oben genannten Dileucin-basierten Motiven nutzen AP auch Tyrosin-basierte Motive zur Erkennung und Sortierung von *Cargo*-Proteinen (Bonifacino & Traub, 2003). Die Bindestellen für die Dileucinmotive liegen für AP1 und AP2 in den γ - σ 1 bzw. α - σ 2 Untereinheiten der Komplexe (Chaudhuri, Lindwasser, Smith, Hurley, & Bonifacino, 2007; Doray, Lee, Knisely, Bu, & Kornfeld, 2007; Janvier et al., 2003; Kelly et al., 2008; Mattera, Boehm, Chaudhuri, Prabhu, & Bonifacino, 2011). Die Tyrosin-basierten Motive binden an die μ 1 bzw. μ 2 Untereinheit (Boll et al., 1996; H. Ohno, Fournier, Poy, & Bonifacino, 1996; H. Ohno et al., 1995; Owen & Evans, 1998). Kristallstrukturen zeigen, dass Tyrosin-basierte Motive im Vergleich zu Dileucinmotiven näher an der Membran lokalisiert sein müssen, um erkannt zu werden ((X. Ren, Farias, Canagarajah, Bonifacino, & Hurley, 2013)). Beispielhaft kann LAMP1 genannt werden: Im elf Aminosäuren langen C-Terminus liegt ein YXXI-Motiv. Wird die

Diskussion

Position des Motivs innerhalb des C-Terminus durch das Entfernen einer Aminosäure oder durch Hinzufügen von fünf Aminosäuren verändert, so wird LAMP1 nicht mehr korrekt zu den Lysosomen transportiert (Rohrer, Schweizer, Russell, & Kornfeld, 1996).

Es wurden auch schon regulatorische Zusammenhänge von Palmitoylierung und Tyrosinmotiv-vermitteltem Transport von Proteinen gezeigt. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor *Protease-activated receptor-1* (PAR1) besitzt hoch konservierte palmitoylierte Cysteinreste im cytosolischen C-Terminus. Zudem besitzt PAR1 zwei Tyrosin-basierte Signalsequenzen im C-Terminus, eines davon distal und das andere proximal zur Transmembrandomäne. AP2 bindet an das distale Motiv und führt zu einer Internalisierung des Proteins (Paing, Johnston, Siderovski, & Trejo, 2006). Wird PAR1 jedoch nicht mehr palmitoyliert, wird anstelle des distalen Motivs jedoch das proximale Motiv für eine AP3-vermittelte Internalisierung und eine erhöhte lysosomale Degradation verwendet (Canto & Trejo, 2013). Dieser Befund wurde durch strukturelle Änderungen erklärt, welche die Palmitoylierung hervorruft und die eine korrekte Bindung von AP2 an das Sortierungsmotiv ermöglichen.

Aufgrund der genannten Publikationen wurde für TMEM55B die Hypothese entwickelt, dass TMEM55B spätestens im Golgi durch DHHCs palmitoyliert wird. Die Palmitoylierung bringt das N-Terminale Dileucinmotiv von TMEM55B in die Nähe der Membran und kann dann dort mit AP oder anderen Faktoren interagieren (**Abb. 42**). Wird TMEM55B nicht mehr palmitoyliert, wie es z.B. in der TMEM55B NoCys Mutante der Fall ist, ist das Dileucinmotiv zu weit entfernt von den AP an der Membran und TMEM55B verbleibt im Golgi-Apparat.

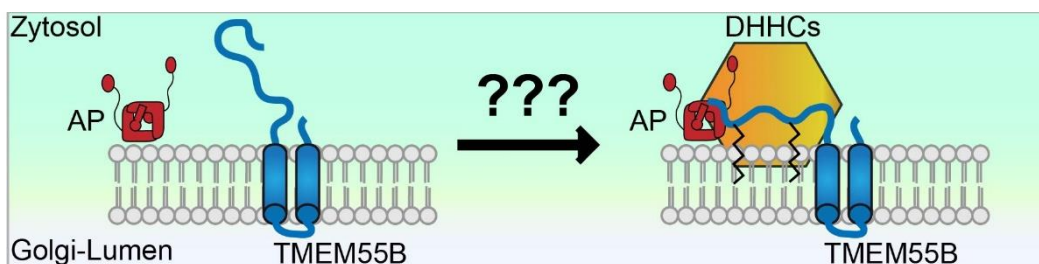


Abb. 42 Schematische Darstellung der Hypothese, dass durch Palmitoylierung eine Interaktion von TMEM55B mit AP initiiert wird.

Wenn TMEM55B nicht palmitoyliert ist, zeigt das im N-Terminus gelegene Dileucinmotiv in das Zytosol und ist so zu weit von AP entfernt, um zu interagieren. TMEM55B wird nicht zu den Lysosomen transportiert. DHHC (Asp-His-His-Cys)-Palmitoyltransferasen palmitoylieren TMEM55B und bringen das Dileucinmotiv in Proximität zur Membran. Dort können Adaptor-Proteine (AP) binden und den Transport von TMEM55B aus dem Golgi vermitteln.

Diskussion

Zur exakten Bestimmung, welche Cysteinreste palmitoyliert werden und ob die Golgi Retention auch durch die Mutation einzelner Cysteinreste erreicht werden konnte, wurde die Lokalisation von Mutanten von TMEM55B analysiert, in denen einzelne Cysteinreste durch jeweils ein Serinrest ausgetauscht wurden. Dabei wurden nur Cysteinreste mutiert, die im Zytosol lagen, da angenommen wurde, dass nur eine Palmitoylierung zytosolsicher Cysteinreste den N-terminus in Proximität zur Membran bringen könnte. Es zeigte sich, dass die Mutation von sieben verschiedenen Cysteinresten, die über die gesamten zytosolische N-terminale Domäne von TMEM55B verteilt waren, eine Golgi-Retention hervorriefen (**Abb. 23** und **Tab. 23**). Die Vielzahl und die Lage der Cysteinreste sprechen gegen die oben genannte Hypothese, dass das Dileucinmotiv von TMEM55B für einen korrekten Transport durch Palmitoylierung in Membrannähe gebracht werden muss (**Abb. 42**).

Welche Cysteinreste palmitoyliert werden, wurde gezeigt, indem in die TMEM55B NoCys Mutante einzelne Cysteinreste wiedereingeführt wurden (**Abb. 24**). Im Vergleich mit den Cysteinen, die eine Retention im Golgi aufwiesen, wird deutlich, dass nicht jeder Cysteinrest, der palmitoyliert wird, durch Mutation eine Golgi-Retention hervorruft (z.B. C136; siehe **Tab. 23** und **Abb. 24**). Auch nicht jeder Cysteinrest, der durch Mutation eine Golgi-Retention auslöst, ist palmitoyliert (z.B. C91; siehe **Tab. 23** und **Abb. 24**). Dieses Experiment zeigt, dass wahrscheinlich kein direkter Zusammenhang zwischen der Palmitoylierung von Cysteinresten und der Golgi-Retention von TMEM55B besteht. Es offenbart aber, dass anscheinend einige Cysteinreste für einen korrekten Transport von TMEM55B benötigt werden. Ob sich durch die veränderte Primärstruktur von TMEM55B auch die Tertiärstruktur verändert und so z.B. die Position des Dileucinmotivs zur Membran oder sich eine Interaktionsstelle für ein bisher unbekanntes Protein verändert, ist nicht ausgeschlossen.

Die hier verwendete Methode, die palmitoylierten Cysteinreste zu detektieren, ist jedoch auch kritisch zu betrachten. So sind die Signale der Einzelmutanten deutlich schwächer als die des Wildtyps (**Abb. 24**). Der AcylRac-Assay ist ein quantitativer Nachweis und beruht darauf, palmitoylierte sProtein zu präzipitieren, unabhängig von der Anzahl der palmitoylierten Cysteine (3.4.9). Wenn also jedes TMEM55B-Molekül eine Palmitoylierung an den detektierten Cysteinresten aufweisen würde, müssten die Signale stärker sein. Da dies nicht der Fall ist, könnte es bedeuten, dass a) das Palmitoylierungsmuster von TMEM55B überaus komplex ist und verschiedenste Cysteinreste zu unterschiedlichen Zeiten an unterschiedlichen Subpopulationen von TMEM55B palmitoyliert werden, b) eine Hierarchie in der Abfolge der Palmitoylierungen besteht und dass das erste palmitoylierte Cystein nicht im Zytosol liegt oder c) dass keiner der palmitoylierten Cysteinreste im Zytosol liegt und es sich um falsch positive Signale handelt. Es ist jedoch weiterhin auch möglich, dass d) die Ursache der Golgi-Retention unabhängig von Palmitoylierung ist.

Diskussion

Cysteinreste können durch Ausbildung von Disulfidbrücken die Tertiärstruktur von Proteinen maßgeblich bestimmen. Disulfidbrücken werden jedoch hauptsächlich in der oxidativen Umgebung des ER-Lumens ausgebildet und nicht im Zytosol (Thornton, 1981). Auch wird die Ausbildung von Disulfidbrücken im Zytosol durch die zwei Thiol-reduzierende Systeme Glutathion und Thioredoxin verhindert (Sevier & Kaiser, 2002). Disulfidbrückenbildung im Zytosol wird daher meist unter oxidativem Stress beobachtet, wenn die Kapazität der Redox-Schutzmechanismen erschöpft ist (Cumming et al., 2004). Trotzdem sind Proteine bekannt, die zytosolische Disulfidbrücken aufweisen, wie z.B. TMEM192 oder das *cutaneous fatty acid-binding protein* (Odani, Namba, Ishii, Ono, & Fujii, 2000; Schroder, Wrocklage, Hasilik, & Saftig, 2010). SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen im Vergleich zu reduzierenden Bedingungen zeigte jedoch keinen Unterschied im Laufverhalten von TMEM55B (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst scheint eine Ausbildung und Beteiligung von Disulfidbrücken am Transport von TMEM55B post-Golgi eher unwahrscheinlich.

Wenn eine Palmitoylierung den post-Golgi Transport von TMEM55B durch eine Bindung mit AP vermitteln würde, dann müsste anders herum ein ähnlicher Phänotyp in Zellen auftreten, die keine funktionellen AP-Komplexe mehr aufweisen. Insbesondere der am Golgi lokalisierte AP1 Komplex muss bei dieser Annahme in Betracht gezogen werden. In AP1-, AP2- und AP3-defizienten Zellen konnte jedoch keine veränderte Lokalisation von TMEM55B nachgewiesen werden (**Abb. 25** und (Chen et al., 2017)). Auch wenn unterschiedliche AP unterschiedliche [D/E]XXXL[L/I] Motive in Abhängigkeit der X-Aminosäuren bevorzugen, so kann eine Kompensation durch die jeweils anderen AP nicht ausgeschlossen werden (Sitaram et al., 2012).

Das einzige bekannte lysosomal-assoziierte Protein, das aufgrund einer fehlenden Palmitoylierung nicht mehr korrekt in das Lysosom transportiert wird und exklusiv im Golgi verbleibt, ist Synaptotagmin VII (Syt VII) (Flannery, Czibener, & Andrews, 2010). In diesem Fall vermittelt S-Palmitoylierung keine Interaktion von einer klassischen lysosomalen Signalsequenz mit einem AP oder GGA, da Syt VII selbst kein solches Sortierungssignal besitzt, sondern eine Assoziierung an das lysosomale Tetraspanin CD63. CD63 weist eine Tyrosin-basierte Signalsequenz, die mittels AP2 und AP3 den Transport in die Lysosomen vermittelt (Rous et al., 2002). Die Assoziation von Syt VII an CD63 findet im Golgi statt und hat einen Ko-Transport von Syt VII in die Lysosomen zur Folge (Flannery et al., 2010). Warum Syt VII unpalmitoyliert quantitativ im Golgi-Apparat verbleibt und nicht mit dem unsortierten Membranfluss des TGN zur Plasmamembran transportiert wird, wurde nicht geklärt. Für TMEM55B könnte also auch die Interaktion mit einem weiteren Protein für den Transport post-Golgi notwendig sein (**Abb. 22**). Weitere Experimente, wie z.B. Ko-Immunopräzipitationen, müssen klären, ob ein ko-transportiertes Protein existiert.

5.10. Die Golgi-Retention verhindert nicht den unspezifischen Gesamtfluss von TMEM55B vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran

TMEM55B wird abhängig von einem C-terminalen Dileucinmotiv zu den Lysosomen sortiert. Wird dieses Dileucinmotiv mutiert, wird TMEM55B neben den Lysosomen auch an der Plasmamembran detektiert (**Abb. 11**). Außerdem kann durch Mutation einzelner Cysteinreste eine Retention von TMEM55B im Golgi erreicht werden (**Abb. 22** und **Abb. 23**). Werden in TMEM55B sowohl das Dileucinmotiv als auch die Cysteine mutiert, kann es sowohl im Golgi, als auch in Vesikeln und an der Plasmamembran detektiert werden (**Abb. 25**).

Aus diesen Beobachtungen können unterschiedliche Schlüsse gezogen werden. 1. Die Retention im Golgi-Apparat ist in Abhängigkeit von AP-Komplexen. Fällt die Dileucinmotiv-vermittelte Interaktion mit AP im Golgi weg, wird TMEM55B wahrscheinlich unspezifisch an die Plasmamembran sortiert. Es scheint also, als ob AP-Komplexe die TMEM55B „NoCys“-Mutante aktiv im Golgi zurückhalten. 2. TMEM55B erreicht auch ohne Dileucinmotiv teilweise die Lysosomen. Werden zusätzlich die Cysteinreste mutiert, ist TMEM55B jedoch nicht mehr in Lysosomen zu detektieren. Das könnte darauf hindeuten, dass die Mutation der Cysteinreste eine Interaktion mit einem weiteren lysosomalen Signalmotiv neben dem bekannten Dileucinmotiv verhindert. Mit Hilfe der *eukaryotic linear motif* (ELM) Vorhersagesoftware für funktionale Domänen in Proteinen kann auch eine Tyrosin-basierte Signalsequenz (YXXΦ → YSPL) ab Aminosäure 75 vorhergesagt werden (Gouw et al., 2018). Ob diese in der Zelle tatsächlich funktionell ist, müssen weitere Studien zeigen. 3. Wenn die Funktionalität der in Punkt 2 genannten Tyrosin-basierte Signalsequenz gezeigt werden kann, könnte eine Palmitoylierung essentiell für die Proximität des Sortierungssignals zu Membran sein.

5.11. TMEM55B vermittelt den Mikrotubuli-abhängigen Transport von Lysosomen in Neuronen

Die Analyse der Expression von TMEM55B in verschiedenen murinen Organen zeigte, dass TMEM55B u.a. besonders stark im Gehirn exprimiert wird (**Abb. 27**). Im Gehirn selbst wird TMEM55B sowohl in NeuN-positiven Neuronen, als auch in NeuN-negativen Neuronen (z.B. Purkinje Zellen) detektiert (**Abb. 28**). Im Hinblick auf die von Willett *et al.* publizierte und in dieser Arbeit in der Überexpression gezeigte Funktion von TMEM55B beim Transport von Lysosomen sind Neuronen als hoch spezialisierte und polarisierte Zellen von besonderem Interesse (Willett et al., 2017) (siehe 1.10). Der Transport von Organellen über die langen Distanzen der Axone ist essentiell für Neuronen. Eine Dysfunktion kann hier zu einer Vielzahl von Krankheiten führen (siehe auch Abschnitt 5.12). Aus diesem Grund wurde der Fokus auf

die Verteilung von Lysosomen in Neuronen gelegt. In histologischen Schnitten des Gehirns von TMEM55B-defizienten Mäusen zeigte sich eine Akkumulation von Lysosomen im *Axon Initial Segment* (AIS) (**Abb. 29**). Auch in kultivierten primären Neuronen zeigte sich dieser Phänotyp (**Abb. 30**). In Semidünnschnitten des Rückenmarks und des Ischiasnervs konnten degenerierende Axone gezeigt werden (**Abb. 32**). Die Degeneration der Nerven ist vermutlich eine Folge der Akkumulation sowie des gestörten lysosomalen Transports von Lysosomen.

Warum akkumulieren die Lysosomen unter TMEM55B-defizienten Bedingungen in der *pre axonal exclusion zone* (PAEZ) und im *Axon Initial Segment* (AIS) von Neuronen? Sollte TMEM55B, wie von Willett *et al.* beschrieben, ausschließlich retrograden Transport von Lysosomen entlang von Mikrotubuli vermitteln, müssten sich in Neuronen die Lysosomen unter TMEM55B-defizienten Bedingungen an allen Plus-Enden der Mikrotubuli sammeln (Willett *et al.*, 2017). Die Plus-Enden liegen in der Peripherie des Zellkörpers, am proximalen und distalen Ende von Dendriten und im distalen Axon-Terminus. Die Lysosomen wurden aber fast ausschließlich im AIS detektiert. Dieser Befund kann durch die Interaktion von TMEM55B mit dem Protein JIP4 erklärt werden. JIP4 bindet TMEM55B und vermittelt eine Bindung an Dynein/Dynactin (Willett *et al.*, 2017). Die Bindung erfolgt über eine Bindestelle in der N-terminalen Hälfte von JIP4 mit der zytosolischen C-terminalen Domäne von TMEM55B (Suzuki *et al.*, 2020; Willett *et al.*, 2017). JIP4 zeigt in unterschiedlichen Mausorganen eine vergleichbare Expressionshöhe wie TMEM55B (**Abb. 33**), was auf eine Zelltyp-übergreifende funktionelle Abhängigkeit hindeuten könnte. In histologischen Färbungen von Gehirnschnitten aus konditional JIP4-defizienten Mäusen wurde ein vergleichbarer Phänotyp von akkumulierenden Lysosomen im *Axon Initial Segment* (AIS) beobachtet, wie in den TMEM55B-defizienten Mäusen (**Abb. 34**). Auch dies ist ein Indiz für einen funktionellen Zusammenhang beider Proteine. In Gehirnextrakten von TMEM55B-defizienten Mäusen konnte jedoch keine veränderte Bindung von JIP4 an Membranen gezeigt werden (**Abb. 35**). Das könnte entweder dadurch erklärt werden, dass TMEM55B und JIP4 nur eine transiente und möglicherweise schwache Bindung eingehen oder dass der Großteil von JIP4 nicht nur mit TMEM55B an der lysosomalen Membran, sondern auch mit anderen Proteinen an anderen Membranen interagiert und ein Effekt dadurch maskiert wird. So ist z.B. eine Rolle von JIP4 im Transport von Mitochondrien in Neuronen bekannt (Sato, Ishikawa, Mochizuki, *et al.*, 2015). Dabei ist der direkte Interaktionspartner an der mitochondrialen Membran noch unbekannt. In Brustkrebszellen interagiert JIP4 sowohl mit *membrane type 1-matrix metalloproteinase* (MT1-MMP) positiven Endosomen, als auch mit plasmamembranständigem *ADP-ribosylation factor 6* (ARF6) (Isabet *et al.*, 2009; Marchesin *et al.*, 2015). Es können also weitere Membraninteraktionspartner von JIP4 im Gehirn nicht ausgeschlossen werden. Die Membrananreicherung von Gehirnhomogenaten spricht folglich nicht gegen eine Interaktion von TMEM55B und JIP4 in Neuronen. Ein funktioneller Zusammenhang im Transport von

Diskussion

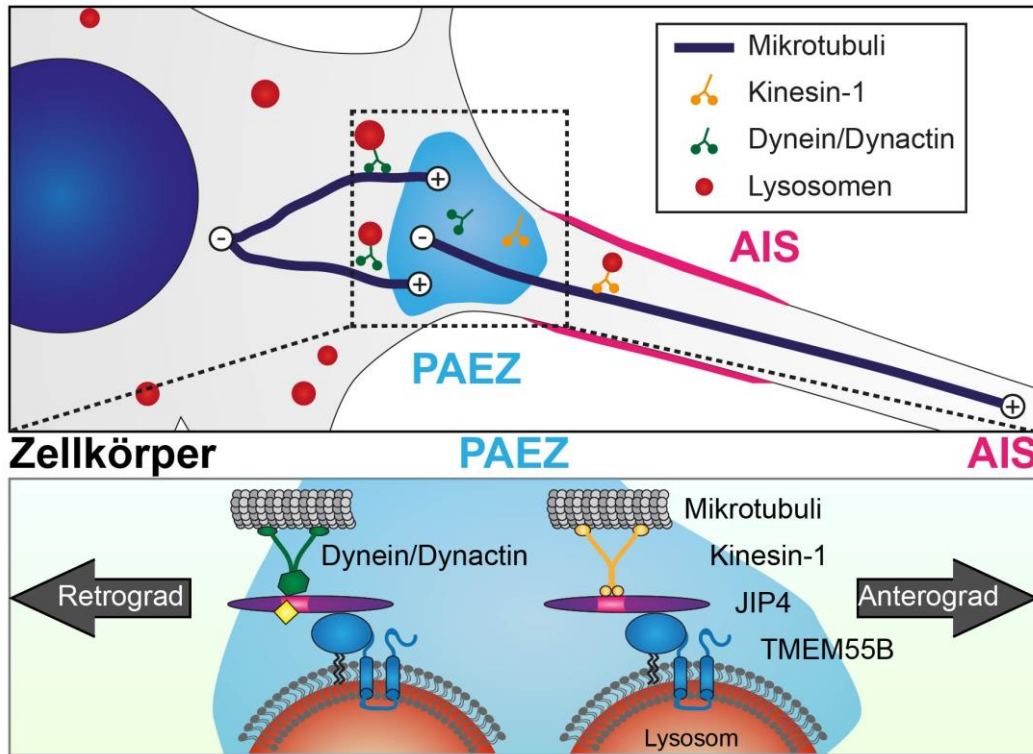
neuronalen Lysosomen kann weiterhin angenommen werden. Für eine mikroskopische Untersuchung der Lokalisation von JIP4 im *TMEM55B-knockout* in Neuronen stehen bislang jedoch keine spezifischen JIP4 Antikörper zur Verfügung, die solche Untersuchungen ermöglichen können.

Eine mögliche Erklärung, warum in *TMEM55B*- und in *JIP4*-defizienten Neuronen Lysosomen im *Axon Initial Segment (AIS)* und in der *pre axonal exclusion zone (PAEZ)* akkumulieren, ist, dass *JIP4* in Neuronen bisher als ein Kinesin-1 bindendes Protein beschrieben wurde (Nguyen, Lee, Le, & Reddy, 2005; Sato, Ishikawa, Mochizuki, et al., 2015). *JIP4* kann folglich sowohl mit Dynein/Dynactin, als auch mit Kinesin interagieren. *JIP4* wurde *in vivo* und *in vitro* als positiver Regulator des Kinesin-1-abhängigen axonalen Transportes beschrieben. Dabei besitzt *JIP4* mit dem strukturell verwandten *JIP3* eine redundante Funktion. Mäuse mit einem konditionalen Doppel-*knockout* im dorsalen Telencephalon von *JIP3* und *JIP4* wiesen eine progressive Degeneration von Neuronen auf. In kultivierten *JIP3/4*-defizienten Neuronen wurden Axonschwellungen mit Akkumulationen von Mitochondrien und *amyloid precursor protein (APP)*-positiven Vesikeln beschrieben (Sato, Ishikawa, Mochizuki, et al., 2015). Beide Organellentypen sind *Cargo* für Kinesin-1 (Kamal, Stokin, Yang, Xia, & Goldstein, 2000; Tanaka et al., 1998). *JIP3* und *JIP4* vermitteln die Bindung von Kinesin-1 an Mikrotubuli, wahrscheinlich jedoch ohne die Bindung des *Cargos* an Kinesin-1 zu beeinflussen (Sato, Ishikawa, Mochizuki, et al., 2015). Der gleiche Phänotyp von in Neuronen akkumulierendem Kinesin-1 *Cargo* wurde in konditionalen *JIP3/JIP4* doppelt defizienten Purkinje-Zellen beschrieben (Sato, Ishikawa, Yoshihara, et al., 2015). Dies deutet darauf hin, dass *JIP4* den Kinesin-1-abhängigen axonalen Transport in den meisten Neuronen beeinflusst.

Weiter wurde für *JIP4* beschrieben, dass es während der Zytokinese den Transport von Endosomen über einen Wechsel der an Endosomen assoziierten Motorproteine reguliert (Montagnac et al., 2009). Während der Zytokinese wird die Zellmembran durch einen kontraktile Actomyosin-Ring zusammengezogen, bis die beiden Tochterzellen nur noch durch eine schmale zytoplasmatische Brücke miteinander verbunden sind (Glotzer, 2005). Der gezielte Transport von sekretorischen und endozytotischen Vesikeln innerhalb dieser Brücke ist von besonderer Bedeutung für die finale Zellteilung (Montagnac, Echard, & Chavrier, 2008). *JIP4* besitzt zwei *Leucine-Zipper (LZ)* Domänen, *LZ-I* und *LZ-II*. *LZ-II* wurde als Bindestelle für die *tetratricopeptide repeat (TRP)* Domäne der leichten Kette von Kinesin-1 beschrieben (Bowman et al., 2000; Kelkar et al., 2005; Nguyen et al., 2005). Es wurde aber auch gezeigt, dass die p50 Untereinheit des Dynactin-Komplexes mit der *LZ-II* interagiert (Montagnac et al., 2009). Abhängig von einer Bindung von aktivem GTP-ARF6 an die *LZ-II* von *JIP4* wird eine Bindung von *JIP4* an Dynactin stabilisiert, die einer Bindung mit Kinesin-1 entgegenwirkt. Diese Bindung an GTP-ARF6 findet wahrscheinlich an der Plasmamembran innerhalb der

zytoplasmatischen Brücke statt, sodass Endosomen zuerst mittels Kinesin-1 in die Brücke hinein transportiert werden. Erst bindet GTP-ARF6 an JIP4 und anschließend Dynactin. Die Endosomen werden wieder aus der Brücke heraus transportiert (Montagnac et al., 2009).

A Wildtyp Neuronen



B TMEM55B-defiziente Neuronen

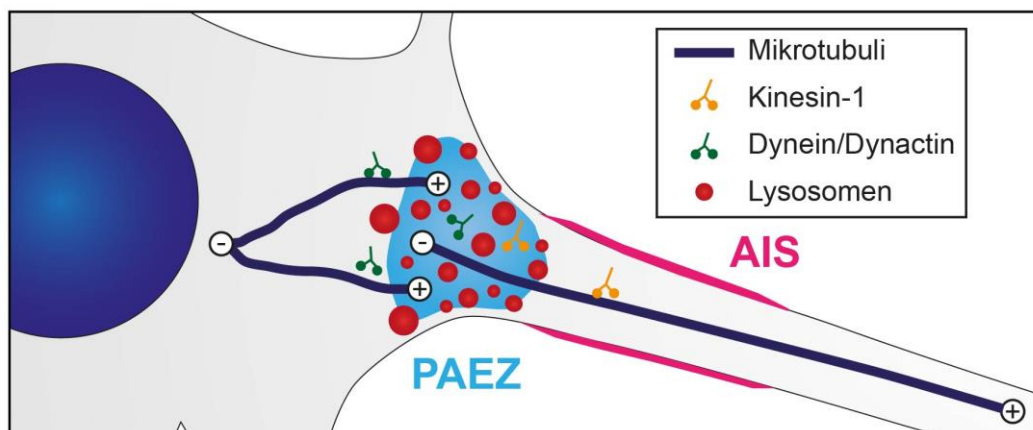


Abb. 43 Schematische Darstellung des TMEM55B-abhängigen Transports von Lysosomen in der PAEZ.

(A) In Wildtyp Neuronen werden Lysosomen entlang von Mikrotubuli retrograd an Dynein/Dynactin und anterograd an Kinesin-1 aus der PAEZ/AIS heraus transportiert. Als Ankerprotein dient TMEM55B. JIP4 vermittelt über den Leucin-Zipper II (rosa hervorgehoben) eine Bindung an die Motorproteine, wahrscheinlich unter Regulation eines weiteren Effektorproteins (gelb). (B) In TMEM55B-defizienten Neuronen fehlt TMEM55B als Ankerprotein für den JIP4-vermittelten Transport der Lysosomen. Diese werden nicht mehr aus der PAEZ/AIS heraus transportiert und akkumulieren.

JIP4 kann sowohl mit Dynein/Dynactin, als auch mit Kinesin-1 interagieren und einen Wechsel der Motorproteine in der Zytokinese in der Nähe der Plasmamembran vermitteln. Der Grund für Akkumulation von Lysosomen im AIS und in der PAEZ von TMEM55B-defizienten Neuronen ist deshalb möglicherweise nicht nur ein Ausfall des retrograden Transports, wie er von Willett *et al.* beschrieben wurde, sondern auch des anterograden Transports von Lysosomen im Axon, beginnend an der PAEZ und abhängig von TMEM55B als lysosomales Ankerprotein und abhängig von JIP4, das über TMEM55B eine Bindung von Lysosomen an die Motorproteine vermittelt (**Abb. 43 A**) (Willett et al., 2017). In der Wildtyp-Situation werden Lysosomen in die PAEZ transportiert. Abhängig von TMEM55B und JIP4 werden sie je nach Bestimmungsort retrograd an Dynein/Dynactin zurück in den Zellkörper oder anterograd an Kinesin-1 in das Axon transportiert. Die Richtung des Transports wird über einen Wechsel der Motorproteine reguliert, ähnlich wie es für JIP4 während der Zytokinese beschrieben wurde (Montagnac et al., 2009).

Während der Regulation ist es wahrscheinlich, dass ein weiteres Effektorprotein die Affinität der Bindung von JIP4 an eines der Motorproteine moduliert, analog zu GTP-ARF6. Welches Protein im Axon diese Rolle übernimmt, ist noch unklar. Auch ARF6 selbst könnte eine Rolle spielen. ARF6 ist z.B. an einer Regulation des Transports von Recycling-Endosomen beteiligt, Integrine zu transportieren (Eva et al., 2012). Aktives GTP-ARF6 führt zu einem erhöhten retrograden Transport der Recycling-Endosomen. Während der Zytokinese kommt ARF6 mit JIP4 wahrscheinlich in der Nähe der Plasmamembran in Kontakt (Montagnac et al., 2009). Eine solche Nähe des Proteins zur Membran könnte auch im AIS gegeben sein. Es wäre also denkbar, dass ARF6 auch den Transport und die Sortierung von Lysosomen im Axon beeinflusst. Folglich kommt es zu der beschriebenen Akkumulation von Lysosomen in der PAEZ und im AIS unter TMEM55B-defizienten Bedingungen, da JIP4 Lysosomen nicht mehr TMEM55B-abhängig an Motorproteine koppelt. Andere JIP4 und TMEM55B unabhängige Transportmechanismen würden Lysosomen weiter in die PAEZ transportieren. Heraustransportiert aus der PAEZ würden die Lysosomen jedoch nicht mehr (**Abb. 43 B**).

Gegen diese Theorie spricht ein JIP4-abhängiger Transport von Lysosomen, der jedoch unabhängig von TMEM55B ist (Suzuki et al., 2020). In der Studie wurde gezeigt, dass ein JIP4 *knockdown* zu einer Akkumulation in der Peripherie der Zellen kommt, vergleichbar mit dem von Willett *et al.* beschriebenen Effekt (Willett et al., 2017). In *Rescue*-Experimenten wurde jedoch gezeigt, dass die TMEM55B bindende Domäne von JIP4 nicht notwendig war, um diese Mislokalisierung der Lysosomen zu retten (Suzuki et al., 2020). Das könnte darauf hindeuten, dass der Phänotyp, der in den konditionalen JIP4-defizienten Neuronen beobachtet wurde (**Abb. 34**), über einen TMEM55B-unabhängigen Mechanismus ausgelöst wird. Ob ein direkter

funktioneller Zusammenhang von TMEM55B und JIP4 im lysosomalen Transport in Neuronen besteht, muss in weiteren Studien gezeigt werden.

In der hier beschriebenen Theorie spielt der anterograde Transport von Lysosomen in Axonen eine wichtige Rolle. Jedoch ist die Richtung des Transports von Lysosomen und späten Endosomen im Axon umstritten. Autophagie läuft in Neuronen anders als in anderen Zelltypen stärker örtlich reguliert ab. So ist im Gegensatz zum proximalen Axon und dem Zellkörper eine erhöhte Bildung von Autophagosomen im distalen Axon zu detektieren (Maday & Holzbaur, 2014; Maday, Wallace, & Holzbaur, 2012). Distale axonale Autophagosomen erlangen schnell durch Fusionsprozesse mit späten Endosomen endolysosomale Marker wie LAMP1 und Rab7 und so auch eine Bindung an Motorproteine, die für einen schnellen Transport über lange Strecken benötigt werden (Cheng, Zhou, Lin, Cai, & Sheng, 2015; S. Lee, Sato, & Nixon, 2011). Die entstandenen Amphisomen werden hauptsächlich retrograd entlang von Mikrotubuli transportiert. Auf dem Weg zum Zellkörper reifen die Amphisomen zu Lysosomen (Cheng et al., 2015; S. Lee et al., 2011; Maday et al., 2012). Reife hydrolytisch aktive Lysosomen selbst sind fast ausschließlich im Zellkörper zu finden (S. Lee et al., 2011; Overly, Lee, Berthiaume, & Hollenbeck, 1995). Diese Studien argumentieren gegen einen anterograden Transport von Lysosomen im Axon. Doch bei den in TMEM55B-defizienten Neuronen akkumulierenden Lysosomen handelte es sich um Cathepsin D positive und somit wahrscheinlich hydrolytische aktive Lysosomen im Gegensatz zu den von Cheng *et al.* in Neuronen beschriebenen LAMP1 positiven Vesikeln ohne Hydrolasen (**Abb. 31**) (Cheng et al., 2018). Das ist auch ein Hinweis darauf, dass diese Lysosomen aus dem Soma der Neuronen stammen und wahrscheinlich anterograd in das Axon sortiert werden sollten. Auch spricht für einen potentiellen anterograden Transport von Lysosomen im Axon eine Studie von Farias *et al.*, in der ein bidirektionaler Transport von sauren LAMP1 positiven Vesikeln beschrieben wurde (Farias et al., 2017). Es könnte jedoch sein, dass Lysosomen unter Wildtyp-Bedingungen nicht bis in das distale Axon transportiert werden, sondern frühzeitig mit retrograd transportierten Amphisomen oder anderen Vesikeln fusionieren, so zum Reifungsprozess beitragen und nur sehr transient im Axon zu detektieren sind.

5.12. Eine Defizienz von TMEM55B hat keinen Effekt auf die Expression von lysosomalen Genen und keinen Effekt auf die Motorik von Mäusen

Die Defizienz von TMEM55B führt zu einer Akkumulation von Lysosomen in der PAEZ und im AIS (**Abb. 30**). Vermutlich ist diese Akkumulation von Lysosomen ursächlich für die beobachtete Degeneration von Axonen (**Abb. 32**). Es scheint jedoch keinen grundlegend gravierenden Effekt auf die Funktion von Lysosomen in murinen Gehirnen zu geben. Die

Diskussion

Expression des lysosomalen Transmembranproteins LIMP2, der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D und des an der Autophagie beteiligten LC3-II sind unverändert (**Abb. 36**). Nur ein leichter Anstieg der *in vitro* Enzymaktivität von vier lysosomalen Hydrolasen war zu verzeichnen (**Abb. 36**). Auch wurde in der Expressionshöhe der Gene von löslichen und Membran-assoziierten lysosomalen Proteinen im Gehirn kein Unterschied zwischen Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen gefunden (**Abb. 37**).

Da alle untersuchten TMEM55B-defizienten Neuronen, darunter auch Motorneuronen, eine Akkumulation der Lysosomen im Bereich des AIS aufzeigten, wurden Verhaltenstest mit dem Fokus auf motorische Fähigkeiten mit Mäusen in einem Alter von 31-33 Wochen durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch keine veränderte Motorik in TMEM55B-defizienten Mäusen (**Abb. 38** und **Abb. 39**). Auch das explorative Verhalten, definiert durch den *Open-Field*-Test, war nicht verändert (**Abb. 40**). Das war ein unerwarteter Befund, da in anderen Fällen eine veränderte Sortierung von Cargo, darunter auch späte Endosomen und Lysosomen, ein Teil des Phänotyps von neurodegenerativen Krankheiten mit einer Vielzahl von Symptomen war. So führt der gestörte axonale Transport in JIP3/JIP4-defizienten Mäusen schon kurz nach der Geburt zum Tod der Tiere (Kelkar et al., 2003). Bei der Alzheimer-Krankheit ist der Dynein/Dynactin-abhängige retrograde Transport in Axonen gestört. Mechanistisch wird vermutet, dass intrazelluläres Amyloid- β ($A\beta$) die Snapin-abhängige Dynein-Rekrutierung an Amphisomen inhibiert und so eine Akkumulation der Amphisomen im distalen Axon auslöst (Tammineni, Ye, Feng, Aikal, & Cai, 2017). Auch bei der familiären amyotrophen Lateralsklerose und bei der Huntington-Krankheit wird ein beeinträchtigter axonaler Transport und damit zusammenhängende Akkumulation von autophagischen Vesikeln beobachtet (Wong & Holzbaur, 2014; Xie et al., 2015). Es sind für die Ausbildung der genannten Krankheiten in Axonen zwar andere Faktoren ausschlaggebender als der veränderte Vesikeltransport, wie z.B. die Plaque-Bildung aus fehlerhaft gefaltetem $A\beta$ bei der Alzheimer-Krankheit. Trotzdem scheint ein defekter axonaler Transport eine wichtige Komponente in der Pathogenese dieser Erkrankungen zu sein (Lie & Nixon, 2019). Die genannten Krankheiten weisen alle einen nicht-funktionalen retrograden Transport von autophagischen Vesikeln auf. Trotzdem können Lysosomen, die in Abhängigkeit von TMEM55B anterograd transportiert werden, in diesen Kontext integriert werden. Die so in das Axon transportierten Lysosomen könnten für die Reifung der Amphisomen benötigt werden. Der Befund, dass eine Defizienz von TMEM55B keine gravierenden neurologischen Effekte in der Maus hat, obwohl der axonale Transport in mehreren neurologischen Krankheiten von besonderer Bedeutung ist, ist beachtlich. Möglicherweise ist die Rolle des TMEM55B-vermittelten Transports von Lysosomen nicht von ausgeprägter Bedeutung für die Funktion bestimmter Neuronen.

5.13. TMEM55A und TMEM55B könnten eine redundante Funktion ausüben

TMEM55B ist am retrograden Transport von Lysosomen entlang von Mikrotubuli beteiligt (Vorliegende Arbeit und (Willett et al., 2017)). Für das paraloge TMEM55A konnte kein solcher Effekt auf die Verteilung von Lysosomen gezeigt werden (**Abb. 8** und (Willett et al., 2017)). Die bisher publizierte Funktion von TMEM55A ist unabhängig von TMEM55B (Morioka et al., 2018). Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Funktionen beider Proteine hin. Jedoch wurde in Gewichtskurven von Wildtyp, TMEM55A-defizienten, TMEM55B-defizienten und TMEM55A und TMEM55B doppelt-defizienten Mäusen gezeigt, dass ein doppelter *knockout* zu einem verringerten Wachstum der Mäuse führt (**Abb. 41**). Dieser Phänotyp war in keiner der Einzel-Defizienzen zu detektieren und konnte durch ein Wildtypallel von TMEM55A kompensiert werden. Dieser Befund wirft die Frage auf, ob es für TMEM55A und TMEM55B weitere, bisher nicht beschriebene Funktionen in der Zelle und im gesamten Organismus gibt, die beide Proteine gleichermaßen ausführen können. Eine andere Möglichkeit ist, dass beide Proteine unabhängige Funktionen voneinander besitzen. Eine Defizienz in Mäusen würde zu einem jeweiligen Phänotyp führen. Die Wachstumsverringering in den doppelt-defizienten Mäusen könnte dann auch nur ein additives Ergebnis von zwei unabhängigen Funktionen sein. Ob eine redundante Funktion von TMEM55A und TMEM55B oder ein additiver Effekt der Phänotypen von defizienten Mäusen ursächlich für die beobachtete Veränderung im Wachstum der doppelt-defizienten Mäuse ist, bleibt Gegenstand weiterführender Studien.

5.14. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die S-Palmitoylierung von TMEM55B und der N-terminalen zytosolischen Domäne von TMEM55B präsentiert werden. Auch wurde gezeigt werden, dass die Mutation aller und auch einzelner Cysteinreste eine Retention von TMEM55B im Golgi-Apparat zur Folge hat. Fraglich bleibt jedoch, ob tatsächlich der Palmitoylierungsstatus oder eine andere Eigenschaft der Cysteinreste zu dieser Retention beiträgt. Eine umfangreiche Analyse der bisher nicht isoliert untersuchten Cysteinreste, die innerhalb der Membran liegen, könnte Aufschluss über diese Frage geben. Auch bleibt unklar, welcher Adaptor-Protein-Komplex genau am Transport von TMEM55B in die Lysosomen beteiligt ist, ob das vorhergesagte Tyrosin-basierte Sortierungsmotiv funktional ist und welche Rolle Adaptor-Protein-Komplexe und Sortierungsmotive in der Retention von TMEM55B im Golgi-Apparat spielen. Weiterführende Immunfluoreszenz-Studien mit überexprimierten Tyrosinmotiv-Mutanten, kombiniert mit der Dileucinmotiv-Mutante und der „NoCys“-Mutante

Diskussion

von TMEM55B in Wildtyp und Adaptor-Protein-Komplex-defizienten Zellen könnten Antworten für diese offenen Fragen geben.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit eine Rolle von TMEM55B im Transport von Lysosomen in Neuronen gezeigt und eine potentiell mögliche Funktion im axonalen anterograden Transport vorgestellt werden. Auch wenn bisher keine Rolle des paralogen TMEM55A im Transport von Lysosomen gezeigt werden konnte, wäre interessant, ob eine Überexpression von TMEM55A den Phänotyp in den TMEM55B-defizienten Neuronen kompensieren könnte. Um die Richtung des Transports von Lysosomen in Axonen zu untersuchen, müsste *Live-Cell-Imaging* von primären Neuronen unter Wildtyp- und TMEM55B-defizienten Bedingungen durchgeführt werden. Dieses Experiment könnte auch zeigen, ob unter TMEM55B-defizienten Bedingungen gar keine Lysosomen mehr in das Axon sortiert werden oder ob dieser Prozess nur drastisch verlangsamt abläuft. Die Interaktion von TMEM55B und JIP4 in Neuronen sollte außerdem näher analysiert werden. Es ist bisher nicht hinreichend geklärt, ob die unter TMEM55B- oder JIP4-defizienten Bedingungen beobachteten Akkumulationen von Lysosomen im AIS mit einer direkten Interaktion zwischen TMEM55B und JIP4 zusammenhängen.

Schließlich sind die Untersuchungen zur Redundanz von TMEM55A und TMEM55B nicht abschließend geklärt. Bisher konnten keine überschneidenden Funktionen von TMEM55A und TMEM55B gezeigt werden. Die in dieser Arbeit beschriebene verringerte Gewichtszunahme in TMEM55A und TMEM55B doppel-*knockout* Mäusen gibt Anlass zu der Annahme, dass eine gemeinsame Funktion der Proteine zumindest möglich ist. Eine weiterführende Analyse der Mäuse und deren Entwicklung könnte eine putative Rolle von TMEM55A und TMEM55B aufdecken.

6. Referenzen

- Alvarez, E., Girones, N., & Davis, R. J. (1990). A point mutation in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor inhibits endocytosis. *Biochem J*, 267(1), 31-35. doi:10.1042/bj2670031
- Amm, I., Sommer, T., & Wolf, D. H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta*, 1843(1), 182-196. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.031
- Angarola, B., & Ferguson, S. M. (2019). Weak membrane interactions allow Rheb to activate mTORC1 signaling without major lysosome enrichment. *Mol Biol Cell*, 30(22), 2750-2760. doi:10.1091/mbc.E19-03-0146
- Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. G., & Hancock, J. F. (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol*, 20(7), 2475-2487. doi:10.1128/mcb.20.7.2475-2487.2000
- Atherton, J., Houdusse, A., & Moores, C. (2013). MAPping out distribution routes for kinesin couriers. *Biol Cell*, 105(10), 465-487. doi:10.1111/boc.201300012
- Bajaj, L., Lotfi, P., Pal, R., Ronza, A. D., Sharma, J., & Sardiello, M. (2019). Lysosome biogenesis in health and disease. *J Neurochem*, 148(5), 573-589. doi:10.1111/jnc.14564
- Ballabio, A., & Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(2), 101-118. doi:10.1038/s41580-019-0185-4
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A. D., Chen, W. W., Ottina, K. A., Grabiner, B. C., . . . Sabatini, D. M. (2013). A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*, 340(6136), 1100-1106. doi:10.1126/science.1232044
- Beacham, G. M., Partlow, E. A., & Hollopeter, G. (2019). Conformational regulation of AP1 and AP2 clathrin adaptor complexes. *Traffic*, 20(10), 741-751. doi:10.1111/tra.12677
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., & Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem*, 272(21), 13793-13802. doi:10.1074/jbc.272.21.13793
- Blanc, M., David, F., Abrami, L., Migliozzi, D., Armand, F., Burgi, J., & van der Goot, F. G. (2015). SwissPalm: Protein Palmitoylation database. *F1000Res*, 4, 261. doi:10.12688/f1000research.6464.1
- Blanz, J., Groth, J., Zachos, C., Wehling, C., Saftig, P., & Schwake, M. (2010). Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Hum Mol Genet*, 19(4), 563-572. doi:10.1093/hmg/ddp523

Referenzen

- Boll, W., Ohno, H., Songyang, Z., Rapoport, I., Cantley, L. C., Bonifacino, J. S., & Kirchhausen, T. (1996). Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J*, *15*(21), 5789-5795.
- Boncompain, G., & Perez, F. (2013). The many routes of Golgi-dependent trafficking. *Histochem Cell Biol*, *140*(3), 251-260. doi:10.1007/s00418-013-1124-7
- Bonifacino, J. S., & Neefjes, J. (2017). Moving and positioning the endolysosomal system. *Curr Opin Cell Biol*, *47*, 1-8. doi:10.1016/j.ceb.2017.01.008
- Bonifacino, J. S., & Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, *72*, 395-447. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800
- Bowman, A. B., Kamal, A., Ritchings, B. W., Philp, A. V., McGrail, M., Gindhart, J. G., & Goldstein, L. S. (2000). Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein. *Cell*, *103*(4), 583-594. doi:10.1016/s0092-8674(00)00162-8
- Braulke, T., & Bonifacino, J. S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, *1793*(4), 605-614. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.016
- Britt, D. J., Farias, G. G., Guardia, C. M., & Bonifacino, J. S. (2016). Mechanisms of Polarized Organelle Distribution in Neurons. *Front Cell Neurosci*, *10*, 88. doi:10.3389/fncel.2016.00088
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*, *33*, 257-290. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- Burgess, T. L., & Kelly, R. B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol*, *3*, 243-293. doi:10.1146/annurev.cb.03.110187.001331
- Cabukusta, B., & Neefjes, J. (2018). Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic*, *19*(10), 761-769. doi:10.1111/tra.12587
- Canagarajah, B. J., Ren, X., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2013). The clathrin adaptor complexes as a paradigm for membrane-associated allostery. *Protein Sci*, *22*(5), 517-529. doi:10.1002/pro.2235
- Canto, I., & Trejo, J. (2013). Palmitoylation of protease-activated receptor-1 regulates adaptor protein complex-2 and -3 interaction with tyrosine-based motifs and endocytic sorting. *J Biol Chem*, *288*(22), 15900-15912. doi:10.1074/jbc.M113.469866
- Chamberlain, L. H., & Shipston, M. J. (2015). The physiology of protein S-acylation. *Physiol Rev*, *95*(2), 341-376. doi:10.1152/physrev.00032.2014
- Chapel, A., Kieffer-Jaquinod, S., Sagne, C., Verdon, Q., Ivaldi, C., Mellal, M., . . . Journet, A. (2013). An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Mol Cell Proteomics*, *12*(6), 1572-1588. doi:10.1074/mcp.M112.021980

Referenzen

- Charollais, J., & Van Der Goot, F. G. (2009). Palmitoylation of membrane proteins (Review). *Mol Membr Biol*, 26(1), 55-66. doi:10.1080/09687680802620369
- Chaudhuri, R., Lindwasser, O. W., Smith, W. J., Hurley, J. H., & Bonifacino, J. S. (2007). Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol*, 81(8), 3877-3890. doi:10.1128/JVI.02725-06
- Chen, Y., Gershlick, D. C., Park, S. Y., & Bonifacino, J. S. (2017). Segregation in the Golgi complex precedes export of endolysosomal proteins in distinct transport carriers. *J Cell Biol*, 216(12), 4141-4151. doi:10.1083/jcb.201707172
- Chen, Y., & Yu, L. (2017). Recent progress in autophagic lysosome reformation. *Traffic*, 18(6), 358-361. doi:10.1111/tra.12484
- Cheng, X. T., Xie, Y. X., Zhou, B., Huang, N., Farfel-Becker, T., & Sheng, Z. H. (2018). Characterization of LAMP1-labeled nondegradative lysosomal and endocytic compartments in neurons. *J Cell Biol*, 217(9), 3127-3139. doi:10.1083/jcb.201711083
- Cheng, X. T., Zhou, B., Lin, M. Y., Cai, Q., & Sheng, Z. H. (2015). Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes. *J Cell Biol*, 209(3), 377-386. doi:10.1083/jcb.201412046
- Cumming, R. C., Andon, N. L., Haynes, P. A., Park, M., Fischer, W. H., & Schubert, D. (2004). Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem*, 279(21), 21749-21758. doi:10.1074/jbc.M312267200
- D'Costa, V. M., Braun, V., Landekic, M., Shi, R., Proteau, A., McDonald, L., . . . Brumell, J. H. (2015). Salmonella Disrupts Host Endocytic Trafficking by SopD2-Mediated Inhibition of Rab7. *Cell Rep*, 12(9), 1508-1518. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.063
- Daniotti, J. L., Pedro, M. P., & Valdez Taubas, J. (2017). The role of S-acylation in protein trafficking. *Traffic*, 18(11), 699-710. doi:10.1111/tra.12510
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., & Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*, 60(4), 604-617. doi:10.1042/bj0600604
- Dekker, F. J., Rocks, O., Vartak, N., Menninger, S., Hedberg, C., Balamurugan, R., . . . Waldmann, H. (2010). Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat Chem Biol*, 6(6), 449-456. doi:10.1038/nchembio.362
- Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G., & Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol*, 124(5), 677-688. doi:10.1083/jcb.124.5.677
- Desjardins, M., Nzala, N. N., Corsini, R., & Rondeau, C. (1997). Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci*, 110 (Pt 18), 2303-2314.

Referenzen

- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, *443*(7112), 651-657. doi:10.1038/nature05185
- Dooley, H. C., Razi, M., Polson, H. E., Girardin, S. E., Wilson, M. I., & Tooze, S. A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell*, *55*(2), 238-252. doi:10.1016/j.molcel.2014.05.021
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G., & Kornfeld, S. (2007). The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol Biol Cell*, *18*(5), 1887-1896. doi:10.1091/mbc.e07-01-0012
- Drose, S., & Altendorf, K. (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol*, *200*(Pt 1), 1-8.
- Du, W., Su, Q. P., Chen, Y., Zhu, Y., Jiang, D., Rong, Y., . . . Yu, L. (2016). Kinesin 1 Drives Autolysosome Tubulation. *Dev Cell*, *37*(4), 326-336. doi:10.1016/j.devcel.2016.04.014
- Dumont, A., Boucrot, E., Drevensek, S., Daire, V., Gorvel, J. P., Pous, C., . . . Meresse, S. (2010). SKIP, the host target of the Salmonella virulence factor SifA, promotes kinesin-1-dependent vacuolar membrane exchanges. *Traffic*, *11*(7), 899-911. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01069.x
- Duvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., . . . Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, *39*(2), 171-183. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022
- Ebner, M., Koch, P. A., & Haucke, V. (2019). Phosphoinositides in the control of lysosome function and homeostasis. *Biochem Soc Trans*, *47*(4), 1173-1185. doi:10.1042/BST20190158
- Ernst, A. M., Syed, S. A., Zaki, O., Bottanelli, F., Zheng, H., Hacke, M., . . . Rothman, J. E. (2018). S-Palmitoylation Sorts Membrane Cargo for Anterograde Transport in the Golgi. *Dev Cell*, *47*(4), 479-493 e477. doi:10.1016/j.devcel.2018.10.024
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., & Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, *13*(3), 137-145. doi:10.1016/s0962-8924(03)00005-9
- Eva, R., Crisp, S., Marland, J. R., Norman, J. C., Kanamarlapudi, V., French-Constant, C., & Fawcett, J. W. (2012). ARF6 directs axon transport and traffic of integrins and regulates axon growth in adult DRG neurons. *J Neurosci*, *32*(30), 10352-10364. doi:10.1523/JNEUROSCI.1409-12.2012
- Farias, G. G., Guardia, C. M., Britt, D. J., Guo, X., & Bonifacino, J. S. (2015). Sorting of Dendritic and Axonal Vesicles at the Pre-axonal Exclusion Zone. *Cell Rep*, *13*(6), 1221-1232. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.074
- Farias, G. G., Guardia, C. M., De Pace, R., Britt, D. J., & Bonifacino, J. S. (2017). BORC/kinesin-1 ensemble drives polarized transport of lysosomes into the axon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(14), E2955-E2964. doi:10.1073/pnas.1616363114

Referenzen

- Farquhar, M. G. (1985). Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu Rev Cell Biol*, 1, 447-488. doi:10.1146/annurev.cb.01.110185.002311
- Filipek, P. A., de Araujo, M. E. G., Vogel, G. F., De Smet, C. H., Eberharter, D., Rebsamen, M., . . . Huber, L. A. (2017). LAMTOR/Ragulator is a negative regulator of Arl8b- and BORG-dependent late endosomal positioning. *J Cell Biol*, 216(12), 4199-4215. doi:10.1083/jcb.201703061
- Flannery, A. R., Czibener, C., & Andrews, N. W. (2010). Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca²⁺ sensor synaptotagmin VII to lysosomes. *J Cell Biol*, 191(3), 599-613. doi:10.1083/jcb.201003021
- Forrester, M. T., Hess, D. T., Thompson, J. W., Hultman, R., Moseley, M. A., Stamler, J. S., & Casey, P. J. (2011). Site-specific analysis of protein S-acylation by resin-assisted capture. *J Lipid Res*, 52(2), 393-398. doi:10.1194/jlr.D011106
- 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. doi:10.1091/mbc.E07-12-1257
- Fukuda, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*, 266(32), 21327-21330.
- Gieselmann, V., Hasilik, A., & von Figura, K. (1985). Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J Biol Chem*, 260(5), 3215-3220.
- Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., . . . Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 13(11), 1422-1437. doi:10.1101/gad.13.11.1422
- Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science*, 307(5716), 1735-1739. doi:10.1126/science.1096896
- Goodwin, J. S., Drake, K. R., Rogers, C., Wright, L., Lippincott-Schwartz, J., Philips, M. R., & Kenworthy, A. K. (2005). Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol*, 170(2), 261-272. doi:10.1083/jcb.200502063
- Gouw, M., Michael, S., Samano-Sanchez, H., Kumar, M., Zeke, A., Lang, B., . . . Gibson, T. J. (2018). The eukaryotic linear motif resource - 2018 update. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D428-D434. doi:10.1093/nar/gkx1077
- Guardia, C. M., Farias, G. G., Jia, R., Pu, J., & Bonifacio, J. S. (2016). BORG Functions Upstream of Kinesins 1 and 3 to Coordinate Regional Movement of Lysosomes along Different Microtubule Tracks. *Cell Rep*, 17(8), 1950-1961. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.062
- Hansen, C. G., & Nichols, B. J. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci*, 122(Pt 11), 1713-1721. doi:10.1242/jcs.033951

Referenzen

- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J. L., & Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol*, *181*(3), 497-510. doi:10.1083/jcb.200712064
- Hashimoto, Y., Shirane, M., & Nakayama, K. I. (2018). TMEM55B contributes to lysosomal homeostasis and amino acid-induced mTORC1 activation. *Genes Cells*, *23*(6), 418-434. doi:10.1111/gtc.12583
- Henne, W. M., Stenmark, H., & Emr, S. D. (2013). Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *5*(9). doi:10.1101/cshperspect.a016766
- Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, *123*(4), 569-580. doi:10.1016/j.cell.2005.10.024
- Hong, Z., Pedersen, N. M., Wang, L., Torgersen, M. L., Stenmark, H., & Raiborg, C. (2017). PtdIns3P controls mTORC1 signaling through lysosomal positioning. *J Cell Biol*, *216*(12), 4217-4233. doi:10.1083/jcb.201611073
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., . . . Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, *20*(7), 1981-1991. doi:10.1091/mbc.E08-12-1248
- Ikonomov, O. C., Fligger, J., Sbrissa, D., Dondapati, R., Mlak, K., Deeb, R., & Shisheva, A. (2009). Kinesin adapter JLP links PIKfyve to microtubule-based endosome-to-trans-Golgi network traffic of furin. *J Biol Chem*, *284*(6), 3750-3761. doi:10.1074/jbc.M806539200
- Isabet, T., Montagnac, G., Regazzoni, K., Raynal, B., El Khadali, F., England, P., . . . Menetrey, J. (2009). The structural basis of Arf effector specificity: the crystal structure of ARF6 in a complex with JIP4. *EMBO J*, *28*(18), 2835-2845. doi:10.1038/emboj.2009.209
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, *6*(6), 764-776. doi:10.4161/auto.6.6.12709
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J. R., Martina, J. A., Kim, B. Y., . . . Bonifacino, J. S. (2003). Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J Cell Biol*, *163*(6), 1281-1290. doi:10.1083/jcb.200307157
- Jennings, B. C., Nadolski, M. J., Ling, Y., Baker, M. B., Harrison, M. L., Deschenes, R. J., & Linder, M. E. (2009). 2-Bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo[b]thiophen-3-one inhibit DHHC-mediated palmitoylation in vitro. *J Lipid Res*, *50*(2), 233-242. doi:10.1194/jlr.M800270-JLR200
- Jia, R., & Bonifacino, J. S. (2019). Lysosome Positioning Influences mTORC2 and AKT Signaling. *Mol Cell*, *75*(1), 26-38 e23. doi:10.1016/j.molcel.2019.05.009

Referenzen

- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., . . . Neefjes, J. (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J Cell Biol*, 176(4), 459-471. doi:10.1083/jcb.200606077
- Johnson, D. E., Ostrowski, P., Jaumouille, V., & Grinstein, S. (2016). The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J Cell Biol*, 212(6), 677-692. doi:10.1083/jcb.201507112
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., . . . Neefjes, J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol*, 11(21), 1680-1685. doi:10.1016/s0960-9822(01)00531-0
- Jung, J., Genau, H. M., & Behrends, C. (2015). Amino Acid-Dependent mTORC1 Regulation by the Lysosomal Membrane Protein SLC38A9. *Mol Cell Biol*, 35(14), 2479-2494. doi:10.1128/MCB.00125-15
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., . . . Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19(21), 5720-5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(5), 313-326. doi:10.1038/nrm.2017.132
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., & Goldstein, L. S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron*, 28(2), 449-459. doi:10.1016/s0896-6273(00)00124-0
- Kelkar, N., Delmotte, M. H., Weston, C. R., Barrett, T., Sheppard, B. J., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2003). Morphogenesis of the telencephalic commissure requires scaffold protein JNK-interacting protein 3 (JIP3). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17), 9843-9848. doi:10.1073/pnas.1733944100
- Kelkar, N., Standen, C. L., & Davis, R. J. (2005). Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cell Biol*, 25(7), 2733-2743. doi:10.1128/MCB.25.7.2733-2743.2005
- Kelliher, M. T., Saunders, H. A., & Wildonger, J. (2019). Microtubule control of functional architecture in neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 57, 39-45. doi:10.1016/j.conb.2019.01.003
- Kelly, B. T., McCoy, A. J., Spate, K., Miller, S. E., Evans, P. R., Honing, S., & Owen, D. J. (2008). A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*, 456(7224), 976-979. doi:10.1038/nature07422
- Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct*, 33(1), 109-122. doi:10.1247/csf.08005

Referenzen

- Kishor, A., Fritz, S. E., & Hogg, J. R. (2019). Nonsense-mediated mRNA decay: The challenge of telling right from wrong in a complex transcriptome. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *10*(6), e1548. doi:10.1002/wrna.1548
- Kissing, S., Rudnik, S., Damme, M., Lullmann-Rauch, R., Ichihara, A., Kornak, U., . . . Saftig, P. (2017). Disruption of the vacuolar-type H(+)-ATPase complex in liver causes MTORC1-independent accumulation of autophagic vacuoles and lysosomes. *Autophagy*, *13*(4), 670-685. doi:10.1080/15548627.2017.1280216
- Kissing, S., Saftig, P., & Haas, A. (2018). Vacuolar ATPase in phago(lyso)some biology. *Int J Med Microbiol*, *308*(1), 58-67. doi:10.1016/j.ijmm.2017.08.007
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., . . . Zughayer, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, *12*(1), 1-222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., . . . Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, *131*(6), 1149-1163. doi:10.1016/j.cell.2007.10.035
- Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., . . . Rubinsztein, D. C. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol*, *13*(4), 453-460. doi:10.1038/ncb2204
- Kumari, B., Kumar, R., & Kumar, M. (2014). PalmPred: an SVM based palmitoylation prediction method using sequence profile information. *PLoS One*, *9*(2), e89246. doi:10.1371/journal.pone.0089246
- Kusumi, A., Fujiwara, T. K., Chadda, R., Xie, M., Tsunoyama, T. A., Kalay, Z., . . . Suzuki, K. G. (2012). Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *28*, 215-250. doi:10.1146/annurev-cellbio-100809-151736
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Lamming, D. W., & Bar-Peled, L. (2019). Lysosome: The metabolic signaling hub. *Traffic*, *20*(1), 27-38. doi:10.1111/tra.12617
- Lasiecka, Z. M., & Winckler, B. (2011). Mechanisms of polarized membrane trafficking in neurons -- focusing in on endosomes. *Mol Cell Neurosci*, *48*(4), 278-287. doi:10.1016/j.mcn.2011.06.013
- Lee, C. M., Onesime, D., Reddy, C. D., Dhanasekaran, N., & Reddy, E. P. (2002). JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(22), 14189-14194. doi:10.1073/pnas.232310199

Referenzen

- Lee, S., Sato, Y., & Nixon, R. A. (2011). Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J Neurosci*, *31*(21), 7817-7830. doi:10.1523/JNEUROSCI.6412-10.2011
- Leterrier, C. (2018). The Axon Initial Segment: An Updated Viewpoint. *J Neurosci*, *38*(9), 2135-2145. doi:10.1523/JNEUROSCI.1922-17.2018
- Li, X., Rydzewski, N., Hider, A., Zhang, X., Yang, J., Wang, W., . . . Xu, H. (2016). A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation. *Nat Cell Biol*, *18*(4), 404-417. doi:10.1038/ncb3324
- Li, Y. X., Shao, Y. H., & Deng, N. Y. (2011). Improved prediction of palmitoylation sites using PWMs and SVM. *Protein Pept Lett*, *18*(2), 186-193. doi:10.2174/092986611794475084
- Lichtenberg, D., Goni, F. M., & Heerklotz, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci*, *30*(8), 430-436. doi:10.1016/j.tibs.2005.06.004
- Lie, P. P. Y., & Nixon, R. A. (2019). Lysosome trafficking and signaling in health and neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis*, *122*, 94-105. doi:10.1016/j.nbd.2018.05.015
- Lim, J. P., & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*, *89*(8), 836-843. doi:10.1038/icb.2011.20
- Liu, J. S., Schubert, C. R., Fu, X., Fourniol, F. J., Jaiswal, J. K., Houdusse, A., . . . Walsh, C. A. (2012). Molecular basis for specific regulation of neuronal kinesin-3 motors by doublecortin family proteins. *Mol Cell*, *47*(5), 707-721. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.025
- Liu, Q., Chang, J. W., Wang, J., Kang, S. A., Thoreen, C. C., Markhard, A., . . . Gray, N. S. (2010). Discovery of 1-(4-(4-propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benz o[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one as a highly potent, selective mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem*, *53*(19), 7146-7155. doi:10.1021/jm101144f
- Lynch, S. J., Snitkin, H., Gumper, I., Philips, M. R., Sabatini, D., & Pellicer, A. (2015). The differential palmitoylation states of N-Ras and H-Ras determine their distinct Golgi subcompartment localizations. *J Cell Physiol*, *230*(3), 610-619. doi:10.1002/jcp.24779
- Ma, X. M., Yoon, S. O., Richardson, C. J., Julich, K., & Blenis, J. (2008). SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*, *133*(2), 303-313. doi:10.1016/j.cell.2008.02.031
- Maday, S., & Holzbaur, E. L. (2014). Autophagosome biogenesis in primary neurons follows an ordered and spatially regulated pathway. *Dev Cell*, *30*(1), 71-85. doi:10.1016/j.devcel.2014.06.001

Referenzen

- Maday, S., Wallace, K. E., & Holzbaur, E. L. (2012). Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol*, *196*(4), 407-417. doi:10.1083/jcb.201106120
- Magee, J., & Cygler, M. (2011). Interactions between kinase scaffold MP1/p14 and its endosomal anchoring protein p18. *Biochemistry*, *50*(18), 3696-3705. doi:10.1021/bi101972y
- Marchesin, V., Castro-Castro, A., Lodillinsky, C., Castagnino, A., Cyrtta, J., Bonsang-Kitzis, H., . . . Chavrier, P. (2015). ARF6-JIP3/4 regulate endosomal tubules for MT1-MMP exocytosis in cancer invasion. *J Cell Biol*, *211*(2), 339-358. doi:10.1083/jcb.201506002
- Markmann, S., Krambeck, S., Hughes, C. J., Mirzaian, M., Aerts, J. M., Saftig, P., . . . Damme, M. (2017). Quantitative Proteome Analysis of Mouse Liver Lysosomes Provides Evidence for Mannose 6-phosphate-independent Targeting Mechanisms of Acid Hydrolases in Mucopolysaccharidosis II. *Mol Cell Proteomics*, *16*(3), 438-450. doi:10.1074/mcp.M116.063636
- Martin, B. R., & Cravatt, B. F. (2009). Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nat Methods*, *6*(2), 135-138. doi:10.1038/nmeth.1293
- Mattera, R., Boehm, M., Chaudhuri, R., Prabhu, Y., & Bonifacino, J. S. (2011). Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. *J Biol Chem*, *286*(3), 2022-2030. doi:10.1074/jbc.M110.197178
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., . . . Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, *14*(8), 1435-1455. doi:10.1080/15548627.2018.1474314
- Medina, M. W., Bauzon, F., Naidoo, D., Theusch, E., Stevens, K., Schilde, J., . . . Krauss, R. M. (2014). Transmembrane protein 55B is a novel regulator of cellular cholesterol metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *34*(9), 1917-1923. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302806
- Montagnac, G., Echard, A., & Chavrier, P. (2008). Endocytic traffic in animal cell cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol*, *20*(4), 454-461. doi:10.1016/j.ccb.2008.03.011
- Montagnac, G., Sibarita, J. B., Loubery, S., Daviet, L., Romao, M., Raposo, G., & Chavrier, P. (2009). ARF6 Interacts with JIP4 to control a motor switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. *Curr Biol*, *19*(3), 184-195. doi:10.1016/j.cub.2008.12.043
- Morioka, S., Nigorikawa, K., Okada, E., Tanaka, Y., Kasuu, Y., Yamada, M., . . . Hazeki, K. (2018). TMEM55a localizes to macrophage phagosomes to downregulate phagocytosis. *J Cell Sci*, *131*(5). doi:10.1242/jcs.213272
- Nada, S., Hondo, A., Kasai, A., Koike, M., Saito, K., Uchiyama, Y., & Okada, M. (2009). The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *EMBO J*, *28*(5), 477-489. doi:10.1038/emboj.2008.308

Referenzen

- Nakata, T., Niwa, S., Okada, Y., Perez, F., & Hirokawa, N. (2011). Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *J Cell Biol*, *194*(2), 245-255. doi:10.1083/jcb.201104034
- Nguyen, Q., Lee, C. M., Le, A., & Reddy, E. P. (2005). JLP associates with kinesin light chain 1 through a novel leucine zipper-like domain. *J Biol Chem*, *280*(34), 30185-30191. doi:10.1074/jbc.M505499200
- Odani, S., Namba, Y., Ishii, A., Ono, T., & Fujii, H. (2000). Disulfide bonds in rat cutaneous fatty acid-binding protein. *J Biochem*, *128*(3), 355-361. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022761
- Ohno, H., Fournier, M. C., Poy, G., & Bonifacino, J. S. (1996). Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem*, *271*(46), 29009-29015. doi:10.1074/jbc.271.46.29009
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., . . . Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, *269*(5232), 1872-1875. doi:10.1126/science.7569928
- Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T., & Igarashi, Y. (2006). Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochim Biophys Acta*, *1761*(4), 474-483. doi:10.1016/j.bbali.2006.03.010
- Orci, L., Glick, B. S., & Rothman, J. E. (1986). A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell*, *46*(2), 171-184. doi:10.1016/0092-8674(86)90734-8
- Overly, C. C., Lee, K. D., Berthiaume, E., & Hollenbeck, P. J. (1995). Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratiometric imaging with pyranine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(8), 3156-3160. doi:10.1073/pnas.92.8.3156
- Owen, D. J., & Evans, P. R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science*, *282*(5392), 1327-1332. doi:10.1126/science.282.5392.1327
- Paing, M. M., Johnston, C. A., Siderovski, D. P., & Trejo, J. (2006). Clathrin adaptor AP2 regulates thrombin receptor constitutive internalization and endothelial cell resensitization. *Mol Cell Biol*, *26*(8), 3231-3242. doi:10.1128/MCB.26.8.3231-3242.2006
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., & Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet*, *20*(19), 3852-3866. doi:10.1093/hmg/ddr306
- Pankiv, S., Alemu, E. A., Brech, A., Bruun, J. A., Lamark, T., Overvatn, A., . . . Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol*, *188*(2), 253-269. doi:10.1083/jcb.200907015

Referenzen

- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., . . . Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, *282*(33), 24131-24145. doi:10.1074/jbc.M702824200
- Parton, R. G., & Hancock, J. F. (2004). Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol*, *14*(3), 141-147. doi:10.1016/j.tcb.2004.02.001
- Pedro, M. P., Vilcaes, A. A., Tomatis, V. M., Oliveira, R. G., Gomez, G. A., & Daniotti, J. L. (2013). 2-Bromopalmitate reduces protein deacylation by inhibition of acyl-protein thioesterase enzymatic activities. *PLoS One*, *8*(10), e75232. doi:10.1371/journal.pone.0075232
- Percher, A., Ramakrishnan, S., Thinon, E., Yuan, X., Yount, J. S., & Hang, H. C. (2016). Mass-tag labeling reveals site-specific and endogenous levels of protein S-fatty acylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(16), 4302-4307. doi:10.1073/pnas.1602244113
- Perera, R. M., & Zoncu, R. (2016). The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *32*, 223-253. doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125125
- Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., . . . Sabatini, D. M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, *146*(3), 408-420. doi:10.1016/j.cell.2011.06.034
- Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., . . . Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab*, *8*(3), 224-236. doi:10.1016/j.cmet.2008.07.007
- Pu, J., Schindler, C., Jia, R., Jarnik, M., Backlund, P., & Bonifacino, J. S. (2015). BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning. *Dev Cell*, *33*(2), 176-188. doi:10.1016/j.devcel.2015.02.011
- Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J., & Bonifacino, J. S. (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science*, *292*(5522), 1712-1716. doi:10.1126/science.1060750
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., & Yao, X. (2008). CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel*, *21*(11), 639-644. doi:10.1093/protein/gzn039
- Ren, X., Farias, G. G., Canagarajah, B. J., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2013). Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. *Cell*, *152*(4), 755-767. doi:10.1016/j.cell.2012.12.042
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., . . . Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol*, *185*(7), 1209-1225. doi:10.1083/jcb.200811005

Referenzen

- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P. J., Koerner, C., Lumbierres, M., . . . Bastiaens, P. I. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science*, *307*(5716), 1746-1752. doi:10.1126/science.1105654
- Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D., & Kornfeld, S. (1996). The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol*, *132*(4), 565-576. doi:10.1083/jcb.132.4.565
- Rong, Y., Liu, M., Ma, L., Du, W., Zhang, H., Tian, Y., . . . Yu, L. (2012). Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nat Cell Biol*, *14*(9), 924-934. doi:10.1038/ncb2557
- Rong, Y., McPhee, C. K., Deng, S., Huang, L., Chen, L., Liu, M., . . . Lenardo, M. J. (2011). Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(19), 7826-7831. doi:10.1073/pnas.1013800108
- Rosa-Ferreira, C., & Munro, S. (2011). Arl8 and SKIP act together to link lysosomes to kinesin-1. *Dev Cell*, *21*(6), 1171-1178. doi:10.1016/j.devcel.2011.10.007
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Holper, S., Kruger, M., & Stainier, D. Y. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, *524*(7564), 230-233. doi:10.1038/nature14580
- Rous, B. A., Reaves, B. J., Ihrke, G., Briggs, J. A., Gray, S. R., Stephens, D. J., . . . Luzio, J. P. (2002). Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell*, *13*(3), 1071-1082. doi:10.1091/mbc.01-08-0409
- Saftig, P., Hetman, M., Schmahl, W., Weber, K., Heine, L., Mossmann, H., . . . et al. (1995). Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J*, *14*(15), 3599-3608.
- Sanders, S. S., Martin, D. D., Butland, S. L., Lavalley-Adam, M., Calzolari, D., Kay, C., . . . Hayden, M. R. (2015). Curation of the Mammalian Palmitoylome Indicates a Pivotal Role for Palmitoylation in Diseases and Disorders of the Nervous System and Cancers. *PLoS Comput Biol*, *11*(8), e1004405. doi:10.1371/journal.pcbi.1004405
- Sato, T., Ishikawa, M., Mochizuki, M., Ohta, M., Ohkura, M., Nakai, J., . . . Yoshioka, K. (2015). JSAP1/JIP3 and JLP regulate kinesin-1-dependent axonal transport to prevent neuronal degeneration. *Cell Death Differ*, *22*(8), 1260-1274. doi:10.1038/cdd.2014.207
- Sato, T., Ishikawa, M., Yoshihara, T., Nakazato, R., Higashida, H., Asano, M., & Yoshioka, K. (2015). Critical role of JSAP1 and JLP in axonal transport in the cerebellar Purkinje cells of mice. *FEBS Lett*, *589*(19 Pt B), 2805-2811. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.024
- Saucedo, L. J., Gao, X., Chiarelli, D. A., Li, L., Pan, D., & Edgar, B. A. (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol*, *5*(6), 566-571. doi:10.1038/ncb996

Referenzen

- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 169(2), 361-371. doi:10.1016/j.cell.2017.03.035
- Schroder, B., Wrocklage, C., Hasilik, A., & Saftig, P. (2010). Molecular characterisation of 'transmembrane protein 192' (TMEM192), a novel protein of the lysosomal membrane. *Biol Chem*, 391(6), 695-704. doi:10.1515/BC.2010.062
- Schulze, R. J., Weller, S. G., Schroeder, B., Krueger, E. W., Chi, S., Casey, C. A., & McNiven, M. A. (2013). Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *J Cell Biol*, 203(2), 315-326. doi:10.1083/jcb.201306140
- Schwake, M., Schroder, B., & Saftig, P. (2013). Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic*, 14(7), 739-748. doi:10.1111/tra.12056
- Schweizer, A., Kornfeld, S., & Rohrer, J. (1996). Cysteine34 of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting. *J Cell Biol*, 132(4), 577-584. doi:10.1083/jcb.132.4.577
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., . . . Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J*, 31(5), 1095-1108. doi:10.1038/emboj.2012.32
- Sevier, C. S., & Kaiser, C. A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(11), 836-847. doi:10.1038/nrm954
- Shogomori, H., Hammond, A. T., Ostermeyer-Fay, A. G., Barr, D. J., Feigenson, G. W., London, E., & Brown, D. A. (2005). Palmitoylation and intracellular domain interactions both contribute to raft targeting of linker for activation of T cells. *J Biol Chem*, 280(19), 18931-18942. doi:10.1074/jbc.M500247200
- Sitaram, A., Dennis, M. K., Chaudhuri, R., De Jesus-Rojas, W., Tenza, D., Setty, S. R., . . . Marks, M. S. (2012). Differential recognition of a dileucine-based sorting signal by AP-1 and AP-3 reveals a requirement for both BLOC-1 and AP-3 in delivery of OCA2 to melanosomes. *Mol Biol Cell*, 23(16), 3178-3192. doi:10.1091/mbc.E11-06-0509
- Suzuki, R., Gunarta, I. K., Boldbaatar, J., Erdenebaatar, P., Odongoo, R., & Yoshioka, K. (2020). Functional role of c-Jun NH2-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in lysosome localization and autophagy. *Drug Discov Ther*. doi:10.5582/ddt.2020.01001
- Sverdlov, M., Shajahan, A. N., & Minshall, R. D. (2007). Tyrosine phosphorylation-dependence of caveolae-mediated endocytosis. *J Cell Mol Med*, 11(6), 1239-1250. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00127.x
- Takemasu, S., Nigorikawa, K., Yamada, M., Tsurumi, G., Kofuji, S., Takasuga, S., & Hazeki, K. (2019). Phosphorylation of TMEM55B by Erk/MAPK regulates lysosomal positioning. *J Biochem*, 166(2), 175-185. doi:10.1093/jb/mvz026

Referenzen

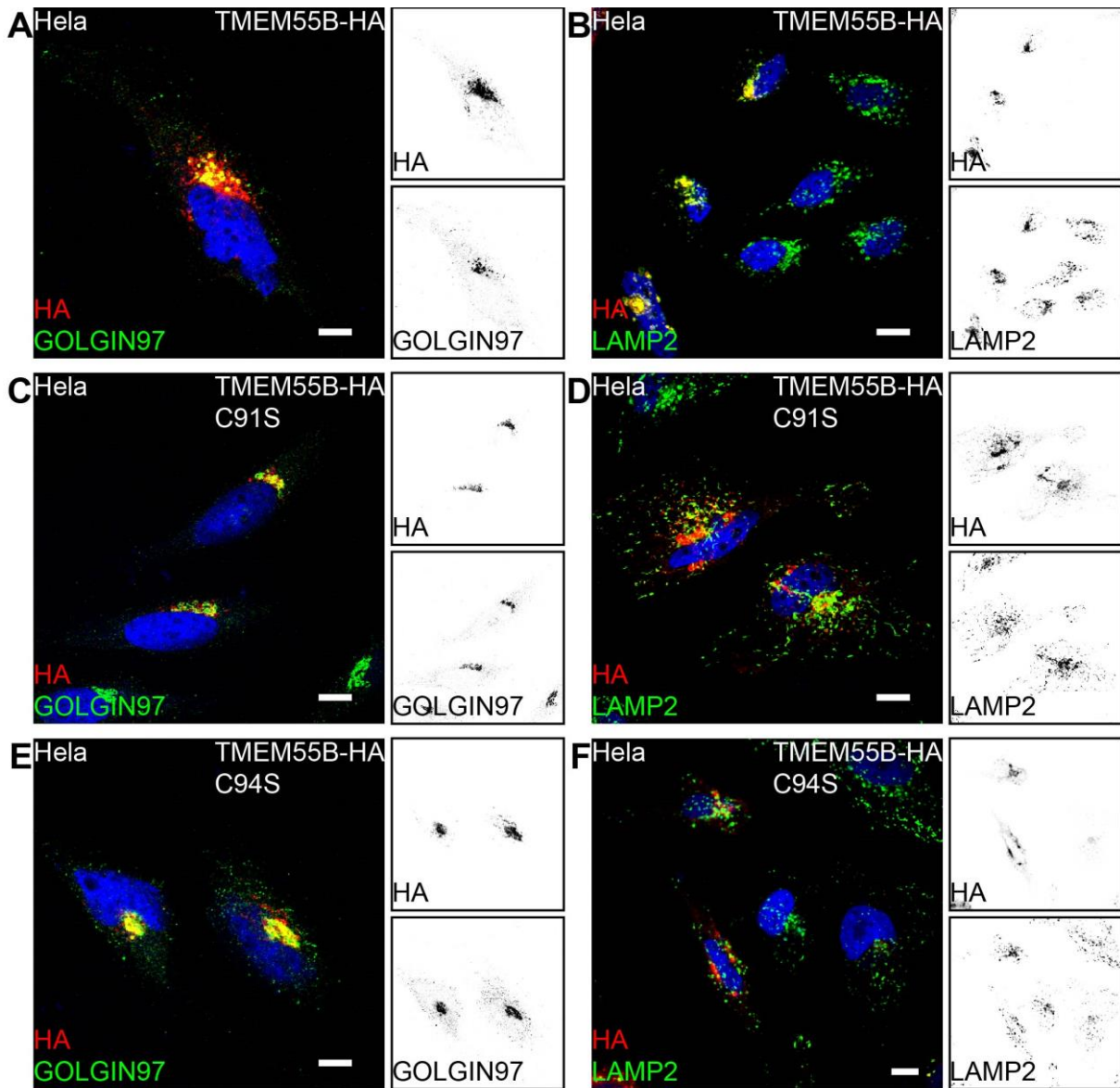
- Tammineni, P., Ye, X., Feng, T., Aikal, D., & Cai, Q. (2017). Impaired retrograde transport of axonal autophagosomes contributes to autophagic stress in Alzheimer's disease neurons. *Elife*, 6. doi:10.7554/eLife.21776
- Tan, Thapa, N., Choi, S., & Anderson, R. A. (2015). Emerging roles of PtdIns(4,5)P₂--beyond the plasma membrane. *J Cell Sci*, 128(22), 4047-4056. doi:10.1242/jcs.175208
- Tan, S. C., Scherer, J., & Vallee, R. B. (2011). Recruitment of dynein to late endosomes and lysosomes through light intermediate chains. *Mol Biol Cell*, 22(4), 467-477. doi:10.1091/mbc.E10-02-0129
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., & Hirokawa, N. (1998). Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell*, 93(7), 1147-1158. doi:10.1016/s0092-8674(00)81459-2
- Tas, R. P., Chazeau, A., Cloin, B. M. C., Lambers, M. L. A., Hoogenraad, C. C., & Kapitein, L. C. (2017). Differentiation between Oppositely Oriented Microtubules Controls Polarized Neuronal Transport. *Neuron*, 96(6), 1264-1271 e1265. doi:10.1016/j.neuron.2017.11.018
- Thinon, E., & Hang, H. C. (2015). Chemical reporters for exploring protein acylation. *Biochem Soc Trans*, 43(2), 253-261. doi:10.1042/BST20150004
- Thornton, J. M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol*, 151(2), 261-287. doi:10.1016/0022-2836(81)90515-5
- Ungewickell, A., Hugge, C., Kisseleva, M., Chang, S. C., Zou, J., Feng, Y., . . . Majerus, P. W. (2005). The identification and characterization of two phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), 18854-18859. doi:10.1073/pnas.0509740102
- Varnai, P., & Balla, T. (1998). Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[³H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol*, 143(2), 501-510. doi:10.1083/jcb.143.2.501
- Vergarajauregui, S., & Puertollano, R. (2006). Two di-leucine motifs regulate trafficking of mucolipin-1 to lysosomes. *Traffic*, 7(3), 337-353. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00387.x
- Wallroth, A., & Haucke, V. (2018). Phosphoinositide conversion in endocytosis and the endolysosomal system. *J Biol Chem*, 293(5), 1526-1535. doi:10.1074/jbc.R117.000629
- Willett, R., Martina, J. A., Zewe, J. P., Wills, R., Hammond, G. R. V., & Puertollano, R. (2017). TFEB regulates lysosomal positioning by modulating TMEM55B expression and JIP4 recruitment to lysosomes. *Nat Commun*, 8(1), 1580. doi:10.1038/s41467-017-01871-z
- Wong, Y. C., & Holzbaur, E. L. (2014). The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to

Referenzen

- defective cargo degradation. *J Neurosci*, 34(4), 1293-1305. doi:10.1523/JNEUROSCI.1870-13.2014
- Xie, Y., Zhou, B., Lin, M. Y., Wang, S., Foust, K. D., & Sheng, Z. H. (2015). Endolysosomal Deficits Augment Mitochondria Pathology in Spinal Motor Neurons of Asymptomatic fALS Mice. *Neuron*, 87(2), 355-370. doi:10.1016/j.neuron.2015.06.026
- 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.
- Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., . . . Lenardo, M. J. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465(7300), 942-946. doi:10.1038/nature09076
- Zhang, J., Zhou, W., Lin, J., Wei, P., Zhang, Y., Jin, P., . . . Wen, L. (2016). Autophagic lysosomal reformation depends on mTOR reactivation in H₂O₂-induced autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 70, 76-81. doi:10.1016/j.biocel.2015.11.009
- Zhang, W., Tribble, R. P., & Samelson, L. E. (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, 9(2), 239-246. doi:10.1016/s1074-7613(00)80606-8
- Zhao, Y. G., & Zhang, H. (2019). Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J Cell Biol*, 218(3), 757-770. doi:10.1083/jcb.201810099
- Zimmer, A. M., Pan, Y. K., Chandrapalan, T., Kwong, R. W. M., & Perry, S. F. (2019). Loss-of-function approaches in comparative physiology: is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing? *J Exp Biol*, 222(Pt 7). doi:10.1242/jeb.175737
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., & Sabatini, D. M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science*, 334(6056), 678-683. doi:10.1126/science.1207056
- Zou, J., Marjanovic, J., Kisseleva, M. V., Wilson, M., & Majerus, P. W. (2007). Type I phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatase regulates stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(43), 16834-16839. doi:10.1073/pnas.0708189104
- Zunke, F., Andresen, L., Wesseler, S., Groth, J., Arnold, P., Rothaug, M., . . . Schwake, M. (2016). Characterization of the complex formed by beta-glucocerebrosidase and the lysosomal integral membrane protein type-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(14), 3791-3796. doi:10.1073/pnas.1514005113

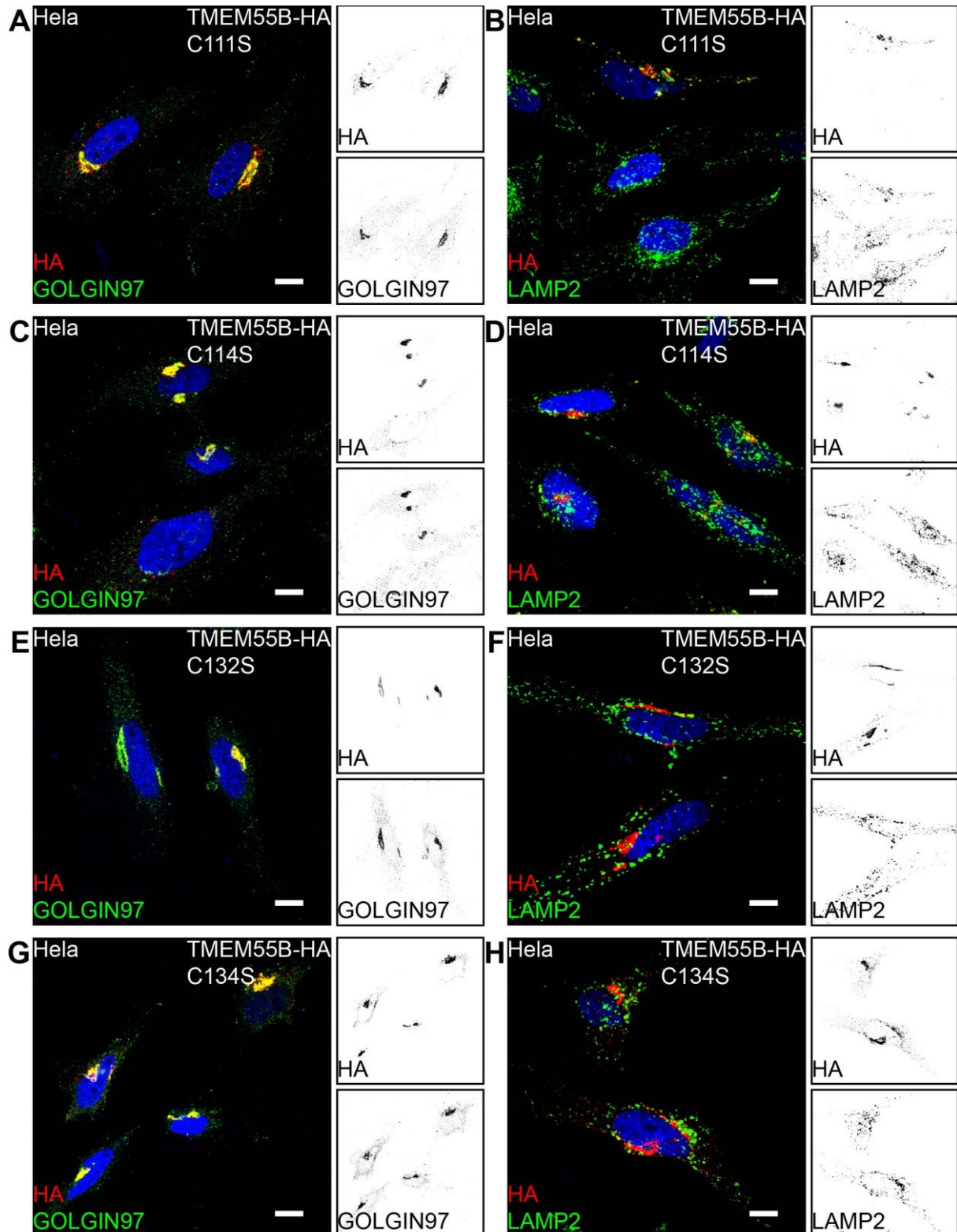
7. Anhang

7.1. Angehängte Abbildungen



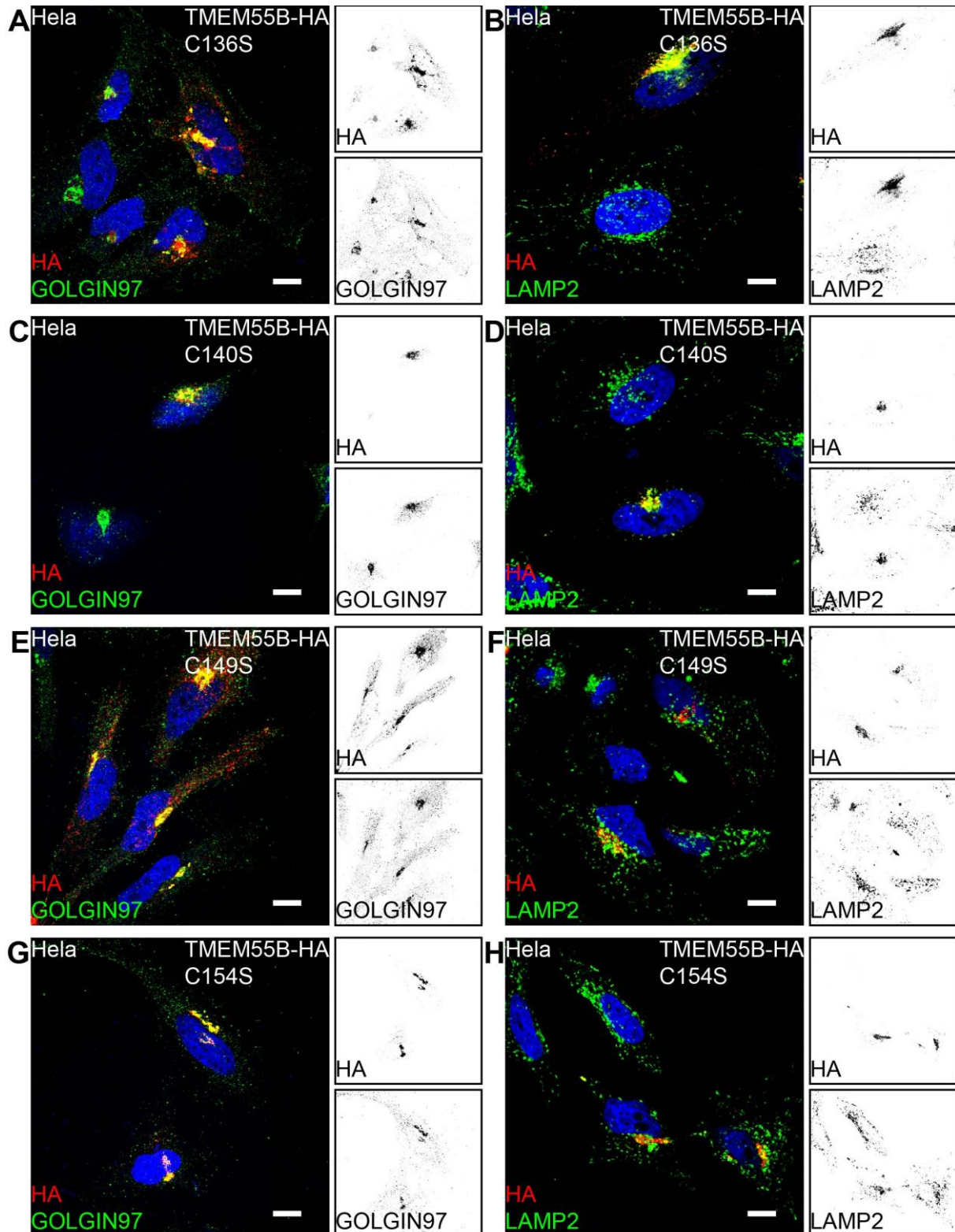
Angehängte Abb. 1 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA Wildtyp, C91S und C94S.

HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA (A und B), TMEM55B-HA C91S (C und D) oder TMEM55B-HA C94S (E und F) transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Gefärbt wurde das überexprimierte Protein mit Antikörper gegen den HA-Tag (rot) und das Trans-Golgi Protein Golgin97 (grün) oder das lysosomale Transmembranprotein LAMP2 (grün). Maßstab = 10 µm.



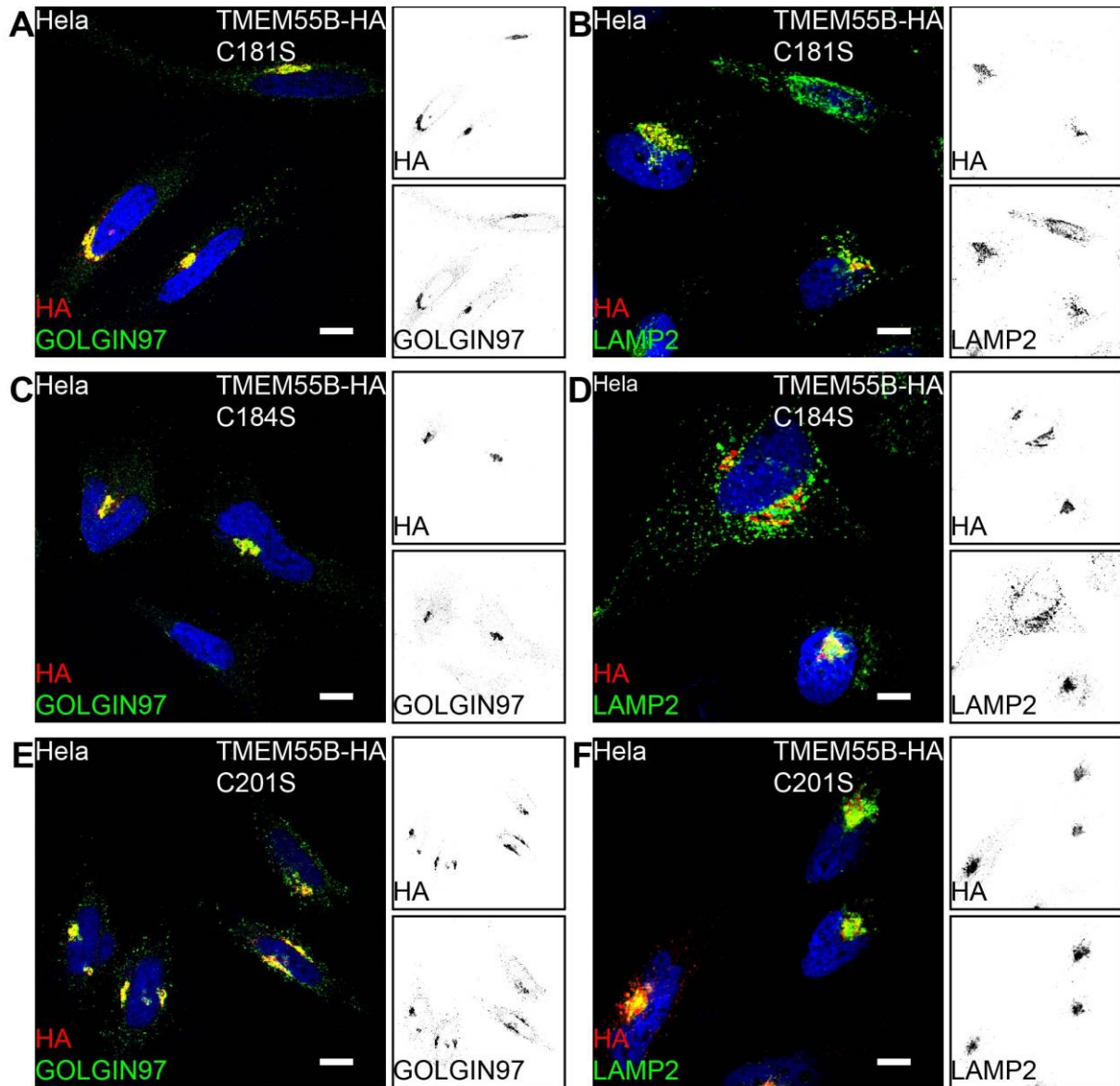
Angehängte Abb. 2 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA C111S, C114S, C132S und C134S.

HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA C111S (A und B), TMEM55B-HA C114S (C und D), TMEM55B-HA C132S (E und F) oder TMEM55B-HA C134S (G und H) transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Gefärbt wurde das überexprimierte Protein mit Antikörper gegen den HA-Tag (rot) und das Trans-Golgi Protein Golgin97 (grün) oder das lysosomale Transmembranprotein LAMP2 (grün). Maßstab = 10 µm.



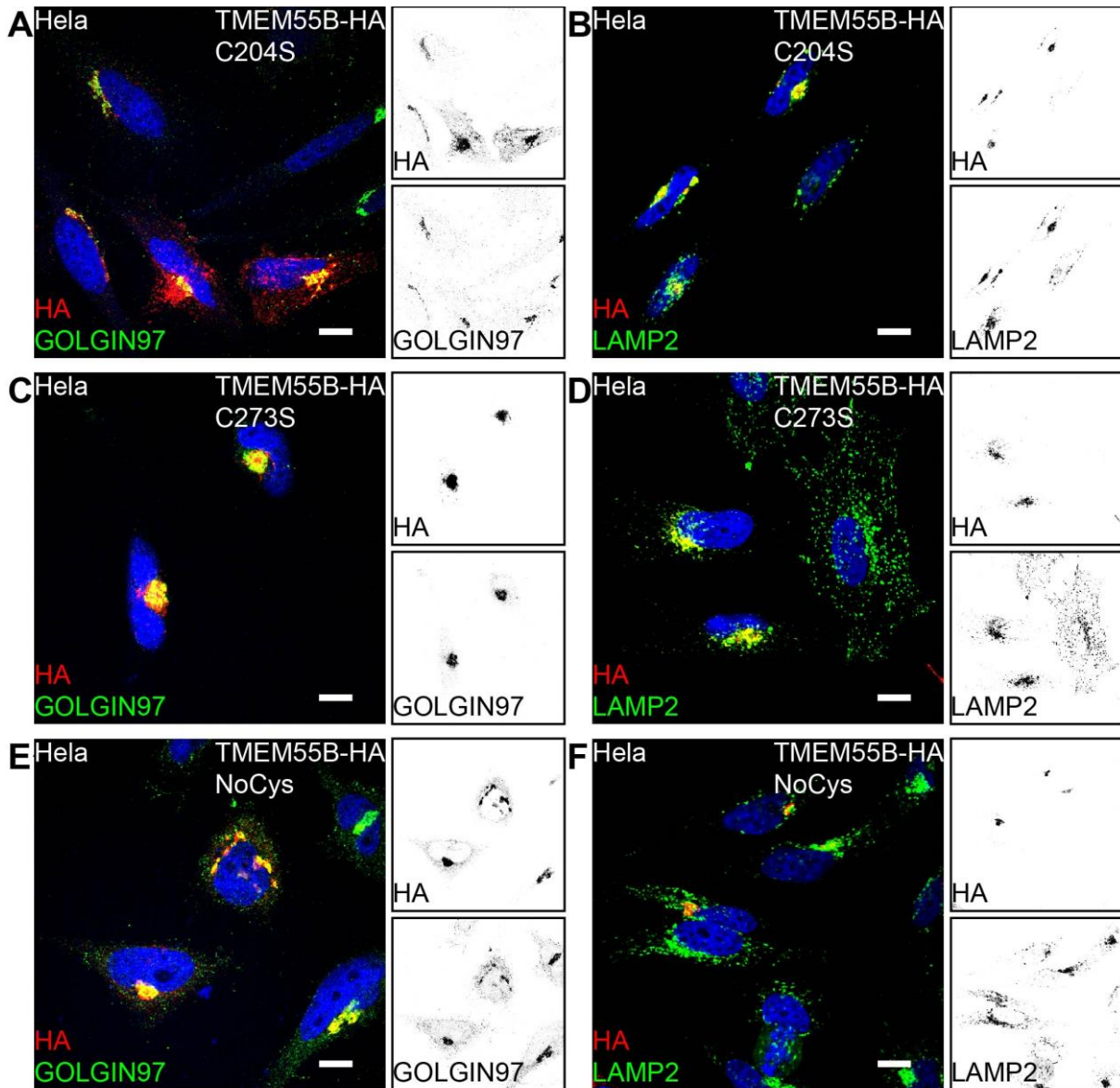
Angehängte Abb. 3 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA C136S, C140S, C149S und C154S.

HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA C136S (A und B), TMEM55B-HA C140S (C und D), TMEM55B-HA C149S (E und F) oder TMEM55B-HA C154S (G und H) transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Gefärbt wurde das überexprimierte Protein mit Antikörper gegen den HA-Tag (rot) und das Trans-Golgi Protein Golgin97 (grün) oder das lysosomale Transmembranprotein LAMP2 (grün). Maßstab = 10 µm.



Angehängte Abb. 4 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA C181S, C184S und C201S.

HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA C181S (A und B), TMEM55B-HA C184S (C und D) oder TMEM55B-HA C201S (E und F) transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Gefärbt wurde das überexprimierte Protein mit Antikörper gegen den HA-Tag (rot) und das Trans-Golgi Protein Golgin97 (grün) oder das lysosomale Transmembranprotein LAMP2 (grün). Maßstab = 10 µm.



Angehängte Abb. 5 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA C204S, C273S und NoCys.

HeLa-Zellen wurden mit TMEM55B-HA C204S (A und B), TMEM55B-HA C273S (C und D) oder TMEM55B-HA NoCys (E und F) transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Gefärbt wurde das überexprimierte Protein mit Antikörper gegen den HA-Tag (rot) und das Trans-Golgi Protein Golgin97 (grün) oder das lysosomale Transmembranprotein LAMP2 (grün). Maßstab = 10 µm.

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung des endolysosomal Systems.	2
Abb. 2 TMEM55B/JIP4-vermittelter Transport von Lysosomen entlang von Mikrotubuli.	11
Abb. 3 Übersicht der am Transport von Lysosomen beteiligten Motorproteine und deren Adapter.....	14
Abb. 4 Schematische Darstellung eines multipolaren Neurons.....	17
Abb. 5 Schematische Darstellung des Acyl-Rac Assays.....	38
Abb. 6 TMEM55B ist ein lysosomales Membranprotein.....	48
Abb. 7 Analyse der Verteilung von Lysosomen unter TMEM55B überexpressions- und <i>knockdown</i> Bedingungen in Hela-Zellen.....	50
Abb. 8 Immunfluoreszenzfärbungen von TMEM55A-HA in Hela-Zellen.....	51
Abb. 9 CRISPR/Cas9-vermittelter KO von TMEM55A und TMEM55B in Mäusen und MEF Isolation.....	53
Abb. 10 Indirekte Immunfluoreszenz Analyse der Verteilung der Lysosomen in TMEM55A- und TMEM55B-doppel-defizienten MEFs.	54
Abb. 11 Dileucinmotiv-vermittelter Transport von TMEM55B und TMEM55A zu Lysosomen.	56
Abb. 12 Analyse der Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PI(4,5)P ₂) Verteilung in TMEM55B <i>knockout</i> MEFs.....	57
Abb. 13 Indirekte Immunfluoreszenz der Wechselwirkung zwischen TMEM55B und PI(4,5)P ₂	58
Abb. 14 Immunoblot Analyse von lysosomalen Markern.....	60
Abb. 15 Analyse des Autophagieflusses in TMEM55A und TMEM55B doppel- <i>knockout</i> MEFs.	61
Abb. 16 Ko-Immunopräzipitation von TMEM55B und LAMTOR1.....	63
Abb. 17 Immunoblot Analyse von Aminosäure-vermittelter mTORC1-Reaktivierung in MEFs	64
Abb. 18 TMEM55B ist an mehreren Cysteinresten palmitoyliert.	65
Abb. 19 Inhibition der Palmitoylierung von neugebildetem TMEM55B mit 2-Bromopalmitate.	67
Abb. 20 TMEM55B ist in Detergenz-resistenten Membranen (DRMs) lokalisiert.....	68
Abb. 21 Die Palmitoylierung verändert nicht die Organisation von TMEM55B in DRMs.....	69
Abb. 22 Deletion aller Cysteinreste von TMEM55B führt zu einer Golgi-Retention.	70
Abb. 23 Mutation einzelner Cysteinreste führt zu einer Retention im Golgi-Apparat.	72
Abb. 24 Analyse der Palmitoylierung einzelner zytosolische Cysteinreste von TMEM55B. ...	74
Abb. 25 Der Transport von TMEM55B zur lysosomalen Membran ist nicht abhängig von einzelnen AP-Komplexen.	76

Anhang

Abb. 26 Cysteinrest und AP-Komplex abhängiger Transport von TMEM55B in die Lysosomen.	77
Abb. 27 Expression von TMEM55B in verschiedenen Mausorganen.	78
Abb. 28 TMEM55B ist in murinen Neuronen in der lysosomalen Membran lokalisiert.	80
Abb. 29 Lysosomen kumulieren in Neuronen in TMEM55B-defizienten Mäusen.	82
Abb. 30 Lysosomen akkumulieren im Axon Initial Segment von TMEM55B-defizienten primären Neuronen.	83
Abb. 31 In TMEM55B-defizienten Neuronen im AIS akkumulierende LAMP1-positive Vesikel sind auch CtsD-positiv.	84
Abb. 32 Myelinscheidenfärbung im zentralen und peripheren Nervensystem.	85
Abb. 33 Expression von JIP4 in verschiedenen Mausorganen.	87
Abb. 34 Konditionale Defizienz von JIP4 führt zu Akkumulation von Lysosomen im AIS.	88
Abb. 35 Membranen-Anreicherung mittels Ultrazentrifugation.	89
Abb. 36 Analyse von Gesamthirnextrakten von TMEM55B-defizienten Mäusen.	90
Abb. 37 RNA Sequenzierungen von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mausgehirnen.	92
Abb. 38 Motorische Verhaltenstest von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen.	94
Abb. 39 Laufbandanalyse von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen.	95
Abb. 40 Analyse des Verhaltens von Wildtyp und TMEM55B-defizienten Mäusen im <i>open-field</i> -Test.	97
Abb. 41 Gewichtsbestimmung von TMEM55A- und TMEM55B-defizienten männlichen Mäusen.	98
Abb. 42 Schematische Darstellung der Hypothese, dass durch Palmitoylierung eine Interaktion von TMEM55B mit AP initiiert wird.	110
Abb. 43 Schematische Darstellung des TMEM55B-abhängigen Transports von Lysosomen in der PAEZ.	116

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Auflistung der verwendeten primären Antikörper.	20
Tab. 2 Auflistung der im Immunoblot verwendeten sekundären Antikörper.	21
Tab. 3 Auflistung der für die Immunfluoreszenz verwendeten sekundären Antikörper.	22
Tab. 4 Auflistung der verwendeten Enzyme.	22
Tab. 5 Liste der Primer für Genotypisierung.	23
Tab. 6 Auflistung der verwendeten siRNAs.	23
Tab. 7 Auflistung der verwendeten Expressions-Konstrukte.	23
Tab. 8 Auflistung der verwendeten Standards.	23

Anhang

Tab. 9 Auflistung der verwendeten Kits.	24
Tab. 10 Auflistung der verwendeten transgenen Mausstämme.	24
Tab. 11 Auflistung der verwendeten Zelllinien.	25
Tab. 12 Auflistung der für die Zellkultur verwendeten Medien und Zusätze.	25
Tab. 13 Auflistung einiger häufig verwendeter Pufferlösungen.	26
Tab. 14 Auflistung zusätzlicher Materialien.	27
Tab. 15 Auflistung der Bestandteile des Mutagenese-PCR Reaktionsansatzes.	28
Tab. 16 Programm der Mutagenese-PCR.	29
Tab. 17 Auflistung der für die Isolation von primären Neuronen verwendeten Puffer.	31
Tab. 18 Auflistung der für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von PIPs verwendeten Puffer.	33
Tab. 19 Auflistung der für den Acyl-PEG-Austausch Assay verwendeten Puffer.	39
Tab. 20 Auflistung der für den Immunoblot verwendeten Puffer.	41
Tab. 21 Auflistung des Genotypisierungs-PCR Reaktionsansatzes.	43
Tab. 22 Programm der Genotypisierungs-PCR.	44
Tab. 23 Übersicht über die Lokalisation von TMEM55B-HA Mutanten mit einzelnen mutierten Cysteinresten.	72

7.4. Verzeichnis der angehängten Abbildungen

Angehängte Abb. 1 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA Wildtyp, C91S und C94S.	138
Angehängte Abb. 2 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA C111S, C114S, C132S und C134S.	139
Angehängte Abb. 3 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA C136S, C140S, C149S und C154S.	140
Angehängte Abb. 4 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA C181S, C184S und C201S.	141
Angehängte Abb. 5 Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von TMEM55B-HA C204S, C273S und NoCys.	142

Erklärung

8. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch die Betreuer PD Dr. Markus Damme und Prof. Dr. Paul Saftig – nach Inhalt und Form eine eigenständige und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasste Arbeit von mir, Sönke Rudnik, ist.

Außerdem wurden bisher weder die Arbeit, noch Teile von ihr an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Ich erkläre weiter, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Zum Schluss bestätige ich, dass mir kein akademischer Grad entzogen wurde.

Kiel, den _____

Sönke Rudnik

9. Curriculum Vitae

9.1. Ausbildung

Promotion im Bereich Biochemie

Christian-Albrechts-Universität Kiel

Arbeitsgruppe für Zellbiologie und Transgene Forschung

LysoFor2526

PD Dr. Markus Damme & Prof. Dr. Paul Saftig

9.2. Publikationen

Kissing, S.*, Rudnik, S.*, Damme, M., Lüllmann-Rauch, R., Ichihara, A., Kornak, U., Eskelinen, E.L., Jabs, S., Heeren, J., De Brabander, J., Haas, A. and Saftig, P. (2017) Disruption of the vacuolar-type H(+)-ATPase complex in liver causes MTORC1-independent accumulation of autophagic vacuoles and lysosomes. *Autophagy*, 13(4), 670-685.

Nguyen, T.L., Schneppenheim, J., Rudnik, S., Lullmann-Rauch, R., Bernreuther, C., Hermans-Borgmeyer, I., Glatzel, M., Saftig, P., Schroder, B. (2017) Functional characterization of the lysosomal membrane protein TMEM192 in mice. *Oncotarget* 8(27): 43635-43652.

Bartsch, K., Knittler, K., Borowski, C., Rudnik, S., Damme, M., Aden, K., Spehlmann, M.E., Frex, N., Saftig, P., Chalaris, A., Rabe, B. (2017) Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Hum Mol Gen*, 26(20): 3960-3972

* geteilte Erstautorenschaft

9.3. Präsentationen

April 2017

International Meeting on Intracellular Niches of Pathogens., SPP1580, Glashütten, Deutschland (Posterpräsentation)

Juni 2017

4. International Symposium on Protein Trafficking in Health and Disease., GRK1459, Hamburg, Deutschland (Posterpräsentation)

September 2017

21. ESGLD Workshop and Graduate course., Lyon, Frankreich (Posterpräsentation)

10. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich alle Menschen hervorheben, die mich in den letzten fünf Jahren bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Besonders möchte ich mich bei meinen Betreuern – PD Dr. Markus Damme und Prof. Dr. Paul Saftig – dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit bekam, meine Doktorarbeit in ihrem Labor anzufertigen. Auch für den wissenschaftlichen Input, die regen Diskussionen, die Ratschläge und die Ideen möchte ich mich bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Eric Beitz für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Auch möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Forschergruppe LysoFor2625 und besonders bei der Koordinatorin Dr. Dorthe Labonthé bedanken. Die gemeinsamen Retreats und Seminare haben auch neben dem wissenschaftlichen Teil sehr viel Freude bereitet.

Ich möchte mich bei allen KooperationspartnerInnen bedanken, die einen Anteil an dieser Arbeit hatten. Mein Dank gilt Prof. Dr. Renate Lüllmann-Rauch, Dagmar Niemeier, Dr. Stijn Stroobants und Dr. Robert Häsler.

Den MitarbeiterInnen des Viktor-Hensen-Hause möchte ich für die kompetente Haltung und Pflege unserer Mauslinien danken – insbesondere Mandy, Melissa und Max.

Ich danke der gesamten AG-Saftig für die gute Arbeitsatmosphäre, die tolle Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und den allgemeinen Input. Besonders die Heiß- und Kaltgetränke neben der Arbeit haben zu einem tollen Zusammenhalt in der Arbeitsgruppe beigetragen. Namentlich in ungeordneter Reihenfolge: Marlies, SEB, Maike, Annika, Sophie, Lisa, Sandra, Basti, Mara, Maria, Saskia, Meryem, Markus, Cedric, Adriana, David, Torben, ACL, FloC, Niklas, André, Moritz, Wolfi, Alessandro, die zweiten Lisa, Florian, Rita und Paul.

Besonders möchte ich die „alten“ Mitglieder des Labor 105 („TKNO BNKR 105“) hervorheben. Ich danke euch für alles, was ich von euch gelernt habe, die tolle Zeit, den musikalischen Input, die Memes, die externen Aktivitäten und die Freundschaften über den Arbeitsplatz hinaus! Danke Sandra, Lisa und Basti!

Auch die P&P-Spielegruppe soll Erwähnung finden. Danke Mara, Sophie, Cedric und SEB für die fantastischen und amüsanten Stunden/Tage inner- und außerhalb des Labors. „Würfel mal auf Aufmerksamkeit ...“

Ich bedanke mich ausdrücklich bei den beiden Azubis Sophie Reiher und Annika Detje für die fantastische Unterstützung, die ich von ihnen bekommen habe. Es hat sehr viel Spaß gemacht, Teile eure Ausbildung begleiten zu dürfen!

Danksagungen

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die bedingungslose Unterstützung und die gelegentlichen Nachfragen, wann und ob ich denn bald fertig sei. Dank gilt meinen Geschwistern, der „Dänemark-Truppe“ – insbesondere meinen Mitbewohnern Helge, Daniel und Sö – für den Alltag jenseits der Arbeit. Meiner Exfreundin Jojo danke ich für die Geduld in der Anfangsphase und meiner jetzigen Freundin Fini für die Geduld in der finalen Phase. Ihr seid alle klasse!