

Aus dem Biochemischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Stefan Rose-John)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# FUNKTIONSANALYSE DES LYSOSOMALEN MEMBRANPROTEINS TMEM192

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Thuy Linh Nguyen**  
aus Bremervörde

Kiel (2021)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Saftig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Adam

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2021

Zum Druck genehmigt Kiel, den 07.10.2021

gez.:

(Vorsitzende\*r der Prüfungskommission)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Endosomen-Lysosomen-System .....	1
1.1.1 Die Physiologie der Lysosomen .....	1
1.1.2 (Makro-)Autophagie .....	3
1.1.3 Lysosomale Exozytose .....	4
1.1.4 Regulation des Energiehaushalts durch Lysosomen.....	5
1.1.5 Lysosomale Speicherung bei Dysfunktionen des lysosomalen Systems.....	6
1.2 Proteine der lysosomalen Membran .....	7
1.3 Das lysosomale Membranprotein 192 (TMEM192) .....	10
1.4 Mögliche klinische Bedeutung einer TMEM192-R39T-Mutation.....	12
<b>2. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
3.1 Material.....	14
3.1.1 Chemikalien .....	14
3.1.2 Verwendete Geräte .....	15
3.1.3 Verwendete Zelllinien und Patientenzellen .....	15
3.1.4 Verwendete Mäuse .....	16
3.1.5 Verwendete Antikörper.....	18
3.2 Methoden.....	21
3.2.1 Zellbiologische Methoden .....	21
3.2.1.1 Zellkultur .....	21
3.2.1.2 Transiente Transfektion.....	21
3.2.1.3 Autophagie-Assay .....	22
3.2.1.4 Quantifizierung lysosomaler Exozytose.....	23
3.2.1.5 Differenzierung von Makrophagen aus murinen Knochenmark.....	23
3.2.1.6 Durchflusszytometrische Quantifizierung von Immunzellen.....	24
3.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	26
3.2.2.1 Zellernte und Herstellung von Zelllysaten .....	26
3.2.2.2 Herstellung von Organlysaten .....	26
3.2.2.3 Proteinbestimmung.....	27
3.2.2.4 Deglykosylierung von Proteinen mittels PNGase F .....	28
3.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	28
3.2.2.6 Semi-Dry Westernblot.....	29
3.2.2.7 Ponceau S Färbung .....	30
3.2.2.8 Immundetektion auf Westernblots .....	30
3.2.2.9 Re-Detektion von Westernblots .....	31
3.2.2.10 Bestimmung der $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität .....	31

3.2.3	Mikroskopische Methoden .....	32
3.2.3.1	Immunfluoreszenz .....	32
3.2.3.2	Präparation und Fixation von murinen Organen .....	33
3.2.3.2.1	Licht- und elektromikroskopische Untersuchungen.....	33
3.2.3.2.2	Immunhistologische und -fluoreszenz Untersuchungen .....	34
3.2.3.3	X-Gal-Färbung .....	34
3.2.3.4	Immunhistofluoreszenz-Färbung von murinen Gewebeschnitten.....	36
3.2.3.5	Immunhistochemie mit 3,3'-Diaminobenzidin-Färbung (= DAB).....	36
3.2.3.6	Histologie .....	37
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
4.1	Einfluss der R39T-Mutation auf das humane TMEM192.....	38
4.1.1	Einfluss der R39T-Mutation auf die Lokalisation des Proteins TMEM192 und die Dimerisation in Überexpression .....	39
4.1.2	Einfluss der R39T-Mutation auf die Morphologie und Funktion des endosomal-lysosomalen Systems .....	40
4.2	Untersuchungen des murinen TMEM192 .....	43
4.2.1	Biochemische Charakterisierung des murinen TMEM192-Proteins.....	43
4.2.2	Biochemische Charakterisierung des endogenen murinen TMEM192-Proteins....	46
4.2.3	Analysen zur Generierung des NTFs.....	48
4.3	Die Charakterisierung von TMEM192-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (= MEF).....	50
4.3.1	Darstellung der Morphologie des Endosomen-Lysosomen-Systems .....	50
4.3.2	Auswirkung der TMEM192-Defizienz auf die Funktion des lysosomalen Systems in MEF.....	51
4.3.3	Einfluss der TMEM192-Defizienz auf die lysosomale Exozytose.....	52
4.4	Untersuchung der TMEM192-defizienten Mauslinie .....	54
4.4.1	Phänotypische Untersuchungen an TMEM192 <sup>-/-</sup> -Mäuse.....	56
4.4.2	Untersuchungen des Nervensystems von TMEM192 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	57
4.4.3	Auswirkungen der TMEM192-Defizienz auf das Immunsystem.....	59
4.4.4	Effekte der TMEM192-Deletion auf weitere Organe der Maus.....	61
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>75</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>82</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>83</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>84</b>
	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>85</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AMRF	Action Myoclonus Renal Failure Syndrom
Atg	Autophagy-related Protein
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovines Serum-Albumin
BMDM	Bone marrow derived macrophages
CA 1–3	Cornu ammonis 1–3
CAU	Christian-Albrechts Universität
ClC-7	Chloride channel protein 7
CLN	ceroid lipofuscinosis neuronal
CPS $\alpha$	Cystein String Protein $\alpha$
CTSB	Cathepsin B
CTSL	Cathepsin L
CTSS	Cathepsin S
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DIRC2	Disrupted in renal carcinoma 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	Early Endosome Antigen 1
eEF2	eukaryotic elongation factor 2
FLAG®	Sequenz aus 8 Aminosäuren (DYKDDDDK)
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
FCS	Fetal calf serum
FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	full length
FoxO4	Forkhead box-O transcription factor 4

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GD	Gyrus dentatus
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLUT 4	Glukosetransporter 4
HA-Epitop	Teil des Hämagglutinins (Position 98–106)
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEK	Human Embryo Kidney
HGSNAT	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase
HSF	heat shock factor
iPSC	induced pluripotent stem cells
KDEL	Peptidsequenz als Marker für das Endoplasmatische Retikulum: Lysin-Aspartatsäure-Glutamatsäure-Leucin
LAMP1	lysosome-associated membrane glycoprotein 1
LAMP2	lysosome-associated membrane glycoprotein 2
LacZ	Lactose-Operon für die $\beta$ -Galactosidase
LBPA	Lysobisphosphatidsäure (Marker für spätes Endosomen)
LC3-I/II	microtubule-associated protein I und II light chain 3
LC3-PE	microtubule-associated protein light chain 3/ Phosphatidyl-Ethanolamin
LIMP2	lysosome integral membrane protein 2
LKB1	Leberkinase B1
LLOMe	L-Leucyl-L-Leucin-Methylester
LMBD1	Lysosomal cobalamin transport escort protein 1
LPS	Lipopolysaccharide
LSD	Lysosomale Speichererkrankung
rmM-CSF	(rekombinante murine) Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MBP	Myelin-Basische Protein
MEF	murine embryonic fibroblasts
MPS-III A	Mucopolysaccharidose Type III A
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin Complex 1
NeuN	Neuraminidase N
NIH	National Institutes of Health

NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NPC1	Niemann-Pick C 1
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
NTF	N-terminales Fragment
OSTM1	Osteopetrosis-associated transmembrane protein 1
p62 (= SQSTM1)	Sequestosom 1
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3KC3	Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNGase F	Peptid:N-Glycosidase F
PP	Phosphatpuffer
rpm	revolutions per minute
SA	Splice acceptor
siRNA	Small interfering RNA
SCARB2	Scavenger Receptor Class B Member 2
SDS	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TBS(/T)	Tris Buffered Saline (with Tween)
TIG1	Tazarotene-induziertem Gen 1
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFEB	Transcription factor EB
TMEM192	Membranprotein 192
t-SNARE	target SNARE
ULK1/ULK2	unc-51-like-kinase 1/ unc-51-like-kinase 2
VAMP	vesikel-assoziierten Membranproteinen
vATPase	vacuolar-type H <sup>+</sup> -ATPase
v-SNARE	vesicle SNARE
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indonyl-β-D-Galactopyranosid

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Endosomen-Lysosomen-System

Endosomen (griech. *endo* = „innen“ und *soma* = „Körper“) und Lysosomen (griech. *lysis* = „Lösung“ und *soma* = „Körper“) sind eng verwandte Zellorganellen von Eukaryoten und werden als Endosomen-Lysosomen-System zusammengefasst.

Endosomen werden in frühe und späte Endosomen eingeteilt. Die frühen Endosomen entstehen durch Endozytose, das Einstülpen der Plasmamembran. Durch Ansäuern mittels membranständigen Protonenpumpen reifen sie zu späten Endosomen heran. Dadurch werden nicht-kovalente Verbindungen wie Rezeptor-Substrat-Bindungen aufgespalten und für den weiteren Abbau vorbereitet (Kornfeld & Mellman 1989).

Lysosomen sind von einer Membran umgebende Zellorganellen, die in ihrem Inneren eine hohe Protonenkonzentration (pH 4–5) und über 60 verschiedene hydrolytische Enzyme aufweisen: Phosphatasen, Lipasen, Glykosidasen und Proteasen (De Duve et al. 1955; De Duve & Wattiaux 1966; Samie & Xu 2014). In ihrer Membran wurden über 100 lysosomale membranständige und Membranproteine gefunden, deren Funktionen weitgehend unbekannt sind (Schröder et al. 2010b; Bagshaw et al. 2005; Zhang et al. 2007). Des Weiteren verfügt sie über einen hohen Kohlenhydratenanteil, welche über O- oder N-Glykosylierung an den Phospholipiden und an den lysosomalen Membranproteinen gekoppelt sind und in ihrer Gesamtheit die Glykokalyx bilden (Kornfeld & Mellman 1989). Dieser Schicht wird eine protektive Funktion zugesprochen, welche die lysosomale Membran vor der Autodigestion bewahrt. Die Dicke der lysosomalen Glykokalyx wird auf ca. 8 nm geschätzt, welche deutlich geringer ist als die auf der Zelloberfläche. So beträgt die Glykokalyx von Endothelzellen zwischen 0,5–4,5 µm (Schwake et al. 2013; Reitsma et al. 2007).

### 1.1.1 Die Physiologie der Lysosomen

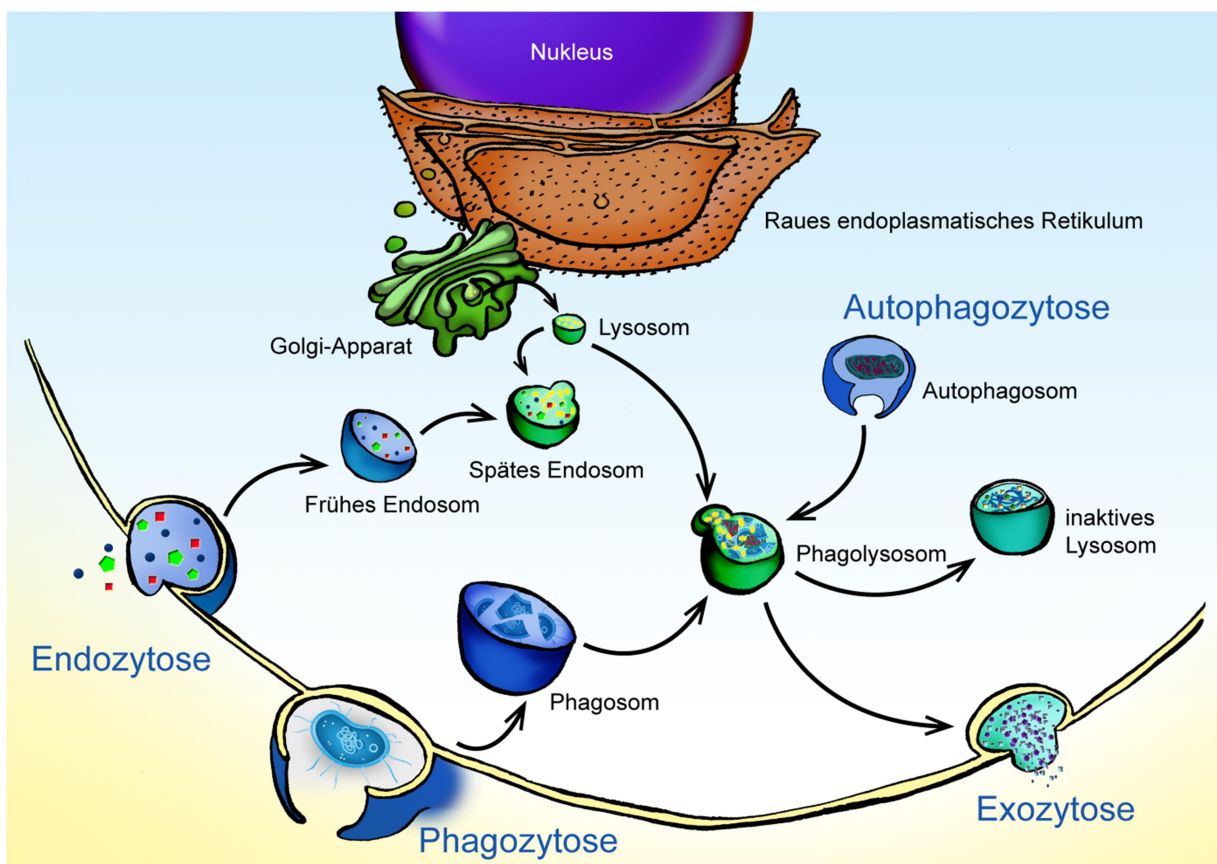
Eine zentrale Funktion der Lysosomen ist der Abbau von defekten und nicht mehr funktionsfähigen Proteinen und Zellorganellen. Das abzubauen Material kann über mehrere Wege dem Lysosomen zugeführt werden: zum einen extrazelluläres Material über die Endozytose oder Phagozytose, zum anderen zelleigene Bestandteile über Autophagie.

Das Lysosom sequestriert mit einer Doppellipidmembran über 60 saure Hydrolasen vom restlichen Zytosol und verhindert dadurch, dass die sauren Enzyme die eigenen Zellbestandteile unkontrolliert abbauen. Nach Fusion der endozytotischen, phagozytotischen oder autophagischen Vesikel mit dem Lysosomen werden die Makromoleküle den



lysosomalen Enzymen ausgesetzt, welche durch Reaktion mit Wasser ihre Substrate in die einzelnen monomeren Bestandteile abbauen (De Duve & Wattiaux 1966). Die Bausteine wie Aminosäuren, Monosaccharide und freie Fettsäuren werden über spezifische Exporter oder durch Vesikeltransport aus den Lysosomen befördert und stehen der Zelle als Nährstoffe zur Verfügung (Samie & Xu 2014). Damit repräsentiert das Lysosom neben dem Proteasom das zweite große Abbausystem der Zelle.

Nehmen die Lysosomen Material auf, das sie nicht verarbeiten können, so werden sie in der Organelle gesammelt und verweilen in inaktiven Lysosomen (De Duve & Wattiaux 1966; Luzio et al. 2014).



**Abb. 1.1: Wege in und aus dem Lysosomen**

Schematische Darstellung der möglichen Wege in und aus dem Lysosomen. Es existieren drei Hauptwege, Inhalte zu den Lysosomen zu bringen: Endozytose, Phagozytose und Autophagie. Abgebaute Bestandteile werden über Exporter und Vesikeltransport der Zelle zur Verfügung gestellt. Über die Exozytose gelangen die abgebauten Bestandteile aus der Zelle. Werden dem Lysosomen nicht abbaubare Bestandteile zugeführt, wird aus dem Lysosomen ein inaktives Lysosomen.

### 1.1.2 (Makro-)Autophagie

Die Autophagie ist ein kataboler Prozess, mit der die Zelle ihre Nährstoffversorgung durch Degradierung von nicht essentiellen zytosolischen Bestandteilen aufrechterhalten kann. Autophagie findet konstitutionell statt; unter Hungerbedingungen wird ihr Umsatz um das Vielfache gesteigert. Anhand der Substratzufuhr können drei Arten von Autophagie unterschieden werden: die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (Damme et al. 2015).

An dieser Stelle wird nur die Makroautophagie näher erläutert: Zu ihren physiologischen Funktionen gehören u.a. das Aufrechterhalten einer ausreichenden Aminosäureversorgung (Wu et al. 2015). Die Makroautophagie ist ein streng reguliertes System, das über *mammalian Target of Rapamycin* (= mTOR)-abhängige und -unabhängige Mechanismen gesteuert wird. Neben dem *mTOR-Kinase-Komplex* (= mTORC1) spielen die *autophagy-related-Proteine* (= Atg-Proteine) eine große Rolle. An der Bildung der Autophagosomen sind u.a. folgende Proteinkomplexe beteiligt: *unc-51-like-kinase 1/unc-51-like-kinase 2* (= ULK1/ULK2), bestehend aus *ULK1-Atg13-focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD* (= UK1-Atg13-FIP200)-, *Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase-Atg9* (= PI3KC3-Atg9)-, Atg12-Atg5- und *microtubule-associated protein light chain 3-Phosphatidyl-Ethanolamin-Komplex* (= LC3-PE).

Unter Stressbedingungen, zum Beispiel bei ATP-Mangel, nimmt die Aktivität von mTORC1 in den Zellen ab; das führt zur Aktivierung des von ihm inhibierten ULK1. ULK1 kann weitere Komponenten des ULK1-Atg13-FIP200-Komplexes phosphorylieren und damit die Autophagie-Kaskade aktivieren (Damme et al. 2015): Es entsteht das Phagophor, eine flache Membranzisterne, die das zu autophagozytierende zytosolische Material sequestriert. Für die Elongation der Membran sind zwei ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme essentiell, die Atg5-Atg12- und die LC3-PE-Konjugation (Damme et al. 2015).

Das LC3, welches als lösliche, nicht-lipidierte Form *microtubule-associated protein I light chain 3* (= LC3-I) im Zytosol vorliegt, muss für die Membran-Elongation zu *microtubule-associated protein light chain 3* (= LC3-II) lipidiert werden. Über PE bindet es auf der inneren Seite der Autophagosomen-Membran und im Gegensatz zum Atg5-Atg12-Atg16-Komplex wird LC3-II mit dem Inhalt zum Lysosomen transportiert (Damme et al. 2015). Die Menge an gebildetem LC3-II in einer Zelle bzw. das Verhältnis von LC3-II zu LC3-I ist ein etablierter Marker für die Abschätzung der Autophagie-Aktivität.

Ein weiterer Marker für die Autophagie-Aktivität ist das *Sequestosom 1* (= p62). Da p62 ebenfalls eine Rolle bei der Apoptose spielt, bildet dieses Protein eine Schnittstelle zwischen

den beiden biochemischen Vorgängen. Das Protein verfügt über viele Motive wie die Keap1-interagierende Region, die LC3-interagierende Region und die ubiquitin-assoziierte Region (Wu et al. 2015). Über die ubiquitin-assoziierte Region bindet sie ubiquitinierte Proteine und interagiert über ihre LC3-Region mit LC3-II, dadurch werden die abzubauenen Proteine in die Autophagosomen transportiert.

Um den Inhalt der Autophagosomen abzubauen, fusionieren diese mit Lysosomen, die den sauren pH und die Hydrolasen mitbringen (De Duve & Wattiaux 1966). Über lysosomale Transportsysteme werden die einzelnen Bausteine wieder in das Zytosol entlassen.

### 1.1.3 Lysosomale Exozytose

Exozytose wird der Prozess genannt, mit der der Inhalt von vesikulären Strukturen durch Fusion ihrer Membran mit der Plasmamembran in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird. Für diesen Prozess sind die *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*-Komplexe (= SNARE) essentiell. Sie vermitteln die Interaktion zwischen Membranen und ermöglichen die Fusion (Edwardson 1998; Weber et al. 1998).

Der SNARE-Komplex setzt sich aus den *vesicle*-SNARE (= v-SNARE), die *vesikel-assoziierten Membranprotein* (= VAMP) oder Synaptobrevin heißen, und zwei *target*-SNARE (= t-SNARE) zusammen, welche SNAP25/23/29 und Syntaxin genannt werden (Zucker 1996; Paumet et al. 2000). Früher wurde angenommen, dass nur spezialisierte sekretorische Zellen mit Granula in der Lage wären, ihren Inhalt in die extrazelluläre Matrix zu sezernieren. Es wurde festgestellt, dass auch Zellen der hämatopoetischen Reihe und Fibroblasten zur Sekretion aus vesikulären Strukturen fähig sind. Studien zeigen durch eine Überlappung der Signale (Ko-Lokalisation) mit *lysosome-associated membrane glycoprotein 1* (= LAMP1), dass es sich bei diesen Vesikel um Lysosomen handelt (Jung et al. 2014; Sundler 1997; Chen et al. 2012; Masur & Holtzman 1969; Andrews 2000; Blott & Griffiths 2002).

Die lysosomale Exozytose ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Prozess. Nach einem exogenen Reiz wird intrazelluläres Kalzium mobilisiert und beim Überschreiten eines kritischen Wertes (10–150  $\mu\text{M}$  je nach Zelltyp) ein Pool von Lysosomen entlang des Mikrotubulin-Systems zur Plasmamembran transportiert. Diese fusionieren über Interaktionen von SNARE-Proteinen mit der Plasmamembran, um den lysosomalen Inhalt in die extrazelluläre Matrix abzugeben (Rodriguez et al. 1999). Es kann zwischen konventionellen und sekretorischen Lysosomen unterschieden werden (Andrews 2000). Initial wurde vermutet, dass die sekretorische Funktion der Lysosomen als Membranersatz bei Membrandefekten diene. Weitere

Untersuchungen zeigen, dass der Membranersatz vor allem durch konventionelle Lysosomen gewährleistet wird (Reddy et al. 2001). Die sekretorischen Lysosomen verfügen über ein Repertoire von spezifischen, zelltyp-abhängigen und sekretorischen Bestandteilen wie Melanin, Perforin oder Histamin, die bei den konventionellen Lysosomen fehlen. So nutzen die T-Zellen die sekretorischen Lysosomen zur Tötung ihrer Zielzellen, Thrombozyten um die Gerinnung zu aktivieren oder Melanozyten, um das Melanin freizusetzen (Reddy et al. 2001; Andrews 2000; Blott & Griffiths 2002). Dass sich der molekulare Mechanismus der Exozytose beider Lysosomenarten unterscheidet, zeigen genetische Erkrankungen wie das *Chediak-Higashi-Syndrom*, die die Exozytose von sekretorischen, aber nicht die von konventionellen Lysosomen beeinträchtigen (Blott & Griffiths 2002).

#### **1.1.4 Regulation des Energiehaushalts durch Lysosomen**

Die Zelle verfügt über viele Mechanismen, um ihren Energiezustand zu bestimmen. Einer davon ist das aminosäuremessende System an der lysosomalen Membran. Dieses System ermöglicht es der Zelle, bei Hungerzustand durch Induktion von (Makro-)Autophagie Nährstoffe bereitzustellen (Luzio et al. 2014; Samie & Xu 2014).

Der Proteinkomplex mTORC1 ist eine Serin-Threonin-Kinase und hat eine zentrale Rolle in vielen Stoffwechselwegen, um das Zellwachstum zu sichern (Bar-Peled & Sabatini 2014; Damme et al. 2015). Eine wichtige Aufgabe des mTORC1-Komplexes ist die Messung des zellulären Aminosäurebestands und die Anpassung der Autophagie-Aktivität an den Bedarf der Zelle. Was die molekularen Mechanismen für das Messen der Aminosäuren sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass durch eine erhöhte intralysosomale Konzentration von Aminosäuren die *vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase* (= V-ATPase) einen Komplex mit Ragulator und Heterodimere mit den kleinen Rag-GTPasen formt. Dieser Komplex rekrutiert mTORC1 an die lysosomale Membran. Das nun membranständige mTORC1 inhibiert die ULK1/ULK2-Aktivität durch Phosphorylierung und unterdrückt damit die Formation von Autophagosomen, sodass die Autophagie nicht induziert wird. Zusätzlich phosphoryliert mTORC1 den *Transcription factor EB* (= TFEB) und verhindert so seine Translokation in den Nucleus.

Fehlen die intralysosomalen Aminosäuren oder ist deren Konzentration zu niedrig, so verhindert die v-ATPase die Guaninnukleotidaustausch-Aktivität des Ragulator-Komplexes und mTORC1 wird nicht an die lysosomale Membran rekrutiert. Nachrangige Effektoren des mTORC1 werden nicht phosphoryliert, sodass deren Aktivität pausiert und die Autophagie induziert wird (Damme et al. 2015). In der unphosphorylierten Form transloziert TFEB in den

Nucleus, bindet dort an seiner Promotorsequenz und induziert die Expression von lysosomalen und Autophagie-relevanten Genen (Damme et al. 2015).

### **1.1.5 Lysosomale Speicherung bei Dysfunktionen des lysosomalen Systems**

Lange Zeit wurden Lysosomen nur als „Müllabfuhr“ der eukaryotischen Zellen betrachtet. Forschungen der letzten Jahrzehnte zeigten, dass die Lysosomen Einfluss auf die Homöostase der Zelle und auf die physiologische Aufrechterhaltung von komplexen Organismen haben (Luzio et al. 2014; Samie & Xu 2014). Lysosomale Speicherkrankheiten (= LSD), ein Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe von angeborenen Stoffwechselstörungen, zeigen, wie wichtig die Lysosomen für den Organismus sind. Die meisten LSD werden autosomal rezessiv vererbt, wobei auch x-chromosomale rezessive Vererbung wie bei *M. Fabry* bekannt ist. Die einzelnen Krankheitsbilder sind mit einer Prävalenz um die 1:100.000 sehr selten. Die häufigste LSD ist der *M. Gaucher* mit ca. 1:57.000. Betrachtet man die Gesamtheit der LSD, beträgt die Prävalenz jedoch ca. 1:7.700 (Meikle et al. 1999).

Alle LSD zeichnen sich durch eine primäre oder sekundäre Akkumulation von unverdauten Makromolekülen in den Lysosomen aus, welche eine lysosomale Dysfunktion verursachen und konsekutiv bis zum Zelltod führen kann. In komplexen Organismen führt die lysosomale Dysfunktion zu pathologischen Symptomen in unterschiedlichen Geweben und Organen. Der Defekt einzelner lysosomaler Hydrolasen und/oder ineffiziente Transportvorgänge in oder aus dem Lysosomen, sowie Proteine außerhalb der Lysosomen konnten als Ursachen für die Pathologien identifiziert werden (Boustany 2013; Samie & Xu 2014). Typische Symptome von LSD sind Knochenabnormitäten, vergrößerte Organe, v.a. Hepatosplenomegalie und Störungen des zentralen Nervensystems mit mentaler Retardierung, Taubheit, Blindheit und Demenz (Meikle et al. 1999).

Viele der lysosomalen Enzyme spalten spezifisch ihr Substrat. Die angeborene Stoffwechselkrankheit *M. Gaucher* lässt sich auf Defekte des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -Glucocerebrosidase zurückführen. Die fehlende Funktionalität des Enzyms verursacht eine lysosomale Akkumulation seines (Haupt-)Substrates, ein Sphingolipid der Zellmembran, mit weitreichenden Folgen für den gesamten Organismus. Durch die Prädominanz der Glucocerebrosid-Speicherung in Makrophagen wird die Krankheit durch den Nachweis von sogenannten Gaucher-Zellen pathognomisch bewiesen. Ausgehend vom heutigen Wissenstand wird angenommen, dass neben den gestörten zellulären Funktionen aufgrund der Akkumulation und des fehlenden Abbaus von Glucocerebrosiden in Lysosomen, auch

immunologische Prozesse der Glucocerebrosid-speichernden Zellen zur Pathologie des *M. Gaucher* beitragen (Baris et al. 2014).

Weitere Beispiele für spezifische Enzyme sind die  $\beta$ -Hexosaminidase A,  $\beta$ -Galactosidase und  $\alpha$ -Mannosidase. So verursacht das Fehlen von  $\beta$ -Hexosaminidase A die *Tay-Sachs-Erkrankung*,  $\beta$ -Galactosidase die diätisch behandelbare *familiäre Galaktosämie* und  $\alpha$ -Mannosidase die *Mannosidose* (Berry 1993; Fernandes Filho & Shapiro 2004; Malm & Nilssen 2008). Neben spezifischen Enzymen gibt es auch Enzyme wie das Legumain, welches proteolytische Reaktionen im Lysosomen katalysieren kann (Dall & Brandstetter 2016).

Im Gegensatz zu den sauren Hydrolasen blieb die Rolle der lysosomalen Membranproteine lange Zeit unbekannt. Forschungen der letzten Jahrzehnte offenbarten, dass die Membranproteine essentiell für die Funktionen der Lysosomen sind (Saftig & Klumperman 2009; Boustany 2013).

## 1.2 Proteine der lysosomalen Membran

Die lysosomale Membran ist eine einfache Doppellipidmembran von ca. 7–10 nm Dicke mit über 100 membranständige und Membranproteinen, deren Funktionen zum größten Teil noch unbekannt sind (Schwake et al. 2013; Schröder et al. 2010b). Die meisten der lysosomalen Membranproteine sind reich an Kohlenhydraten und bilden in ihrer Gesamtheit die lysosomale Glykokalyx (Fukuda 1991).

Anfänglich wurde den Membranproteinen nur die Funktion zugeschrieben, die lysosomale Membran sowie das restliche Zytosol vor den aggressiven sauren Hydrolasen zu schützen. Aber bereits mit der Entdeckung der Membranproteine wurden Hypothesen aufgestellt, dass diese Proteine spezifische Funktionen wie den Transport von Substraten in und aus dem Lysosomen innehaben, für die Fusion mit weiteren Membranen z.B. von Endosomen, Phagosomen und der Plasmamembran benötigt werden und in Interaktionen mit anderen zellulären Organellen treten können (Fukuda 1991). Vorstellbar ist, dass der transmembrane Anteil an dem Transport von Metaboliten durch die Membran beteiligt ist und der meist sehr kurze zytosolische Anteil mit zytosolischen Proteinen interagieren könnte. Diese Annahme für den zytosolischen Anteil wird durch die Beteiligung lysosomaler Membranproteine bei Prozessen wie der lysosomalen Motilität, der lysosomalen Exozytose und der Makroautophagie bestärkt (Schwake et al. 2013).

Vor ungefähr vierzig Jahren stieg das Interesse an den lysosomalen Membranproteinen. Klinisch interessant wurde es, als man erste Krankheiten auf Defekte in den lysosomalen

Membranproteinen zurückführen konnte (Boustany 2013). In den 1980er Jahren wiesen Gahl et al. nach, dass die *Cytinose* auf einen Defekt eines lysosomalen Membranproteins, den Cysteintransporter Cystinosin, zurückzuführen ist (Gahl et al. 1982). Ein weiteres historisches Beispiel ist die Entdeckung der Mutation im SLC17A5-Gen, welches das lysosomale Transportprotein Sialin kodiert, das die *Salla-Erkrankung* auslöst (Ruivo et al. 2009). Die im Jahre 1981 von Danon beschriebene *Danon-Krankheit* zeichnet sich durch eine Trias aus geistiger Retardierung, Kardiomegalie und proximal betonter Myopathie aus. Die pathohistologischen Befunde entsprachen einer lysosomalen Speicherkrankheit vergleichbar bei einer  $\alpha$ -Glucosidase-Defizienz, doch konnte bei diesen Patienten kein Defekt der lysosomalen Enzyme gefunden werden (Danon et al. 1981). Erst 20 Jahre später entdeckte man, dass die X-rezessiv vererbte Erkrankung auf Mutationen im *lysosome-associated membrane glycoprotein 2*-Gen (= LAMP2), ein lysosomales Membranprotein, zurückzuführen ist (Nishino et al. 2000; Tanaka et al. 2000).

Somit rückten die lysosomalen Membranproteine immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Im Gegensatz zu dem zuvor genannten lysosomalen Membranproteinen sind die physiologischen Funktionen von LAMP2 nicht vollständig geklärt. Das Protein spielt bei den Prozessen der Autophagie, der lysosomalen Fusion und lysosomaler Motilität eine wichtige Rolle (Nishino et al. 2000; Tanaka et al. 2000). Ein weiteres Beispiel für Erkrankungen, die durch lysosomale Membranproteine verursacht werden, ist das *Action Myoclonus Renal Failure Syndrom* (= AMRF). Als Ursache konnten Mutationen im *Scavenger Receptor Class B Member 2*-Gen (= SCARB2), welches für *lysosome integral membrane protein 2* (= LIMP2) kodiert, gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass LIMP2 u.a. als Transportprotein für das lysosomale Enzym  $\beta$ -Glucocerebrosidase dient. Durch den Verlust von LIMP2 kommt es zum Fehltransport des Enzyms (Reczek et al. 2007; Rothaug et al. 2014; Schwake et al. 2013). Weitere Erkrankungen, die durch Defekte von lysosomalen Membranproteinen verursacht werden, sind in der folgenden Tabelle Tab 1.1 zusammengefasst.

**Tab 1.1: Lysosomale Speichererkrankung aufgrund von defekten lysosomalen Membranproteinen (modifiziert nach Saftig & Klumperman 2009)**

Krankheit	Klinik	Vererbung	Defektes Protein	Funktion des Proteins
<b>Action Myoclonus and Renal Failure Syndrom</b>	Progressive myoklonische Epilepsie mit Nierenversagen	Autosomal rezessiv	LIMP2	Transportiert $\beta$ -GC zum Lysosomen, lysosomale Biogenese und Sortierung von Vesikel zur apikalen Membranen
<b>Cystinose</b>	Diabetes mellitus, Hypothyreose und terminale Nierenversagen mit Pathologie in Nieren, Leber, Pankreas, Muskel, Auge, Gehirn und Leukozyten	Autosomal rezessiv	Cystinosin	H+/Aminosäure-Symport
<b>Danon-Krankheit</b>	vakuoläre Kardiomyopathie, Myopathie und variable mentale Retardierung	X-chromosomal dominant	LAMP2	Lysosomenfusion und -mobilität; Chaperonvermittelte Autophagie
<b>Infantile maligne Osteopetrose</b>	Panzytopenie, Blindheit, Taubheit, pathologische Frakturen und Infektanfälligkeit	Autosomal rezessiv	CIC-7	H+/Anion-Antiport
		Autosomal rezessiv	OSTM1	CIC-7 akzessorische Untereinheit
<b>Homocysteinurie Typ F</b>	Verzögerte geistige Entwicklung, Stomatitis, Glossitis, Epilepsie und minimale Methylmalonazidurie	Autosomal rezessiv	LMBD1	Membrantransport (vermutlich)
<b>Mucopolipidose IV</b>	Verzögerte psychomotorische Entwicklung und Veränderungen der Augen	Autosomal rezessiv	TRPML1 (Mucolipin-1, MLN1)	Kationkanal



<b>Mucopolysaccharidose Type IIIC (Sanfilippo Syndrom C)</b>	Progressive Demenz, mentaler Zerfall ab der Kindheit, Hyperaktivität, Schlafstörung und Verlust der Sprechfähigkeit	Autosomal rezessiv	HGSNAT (TMEM76)	Acetyl-Transferase
<b>Neuronale Ceroid-Lipofuszinose, infantile Variante</b>	Ataxie und Epilepsie mit rapiden mentalen Zerfall	Autosomal rezessiv	CLN7	Membrantransport (vermutlich)
<b>Neuronale Ceroid-Lipofuszinose, juvenile Form</b>	Frühe progressive Erblindung, Epilepsie und Ataxie	Autosomal rezessiv	CLN3 (Battenin)	Unbekannt
<b>Niemann-Pick Typ C</b>	Hepatosplenomegalie Thrombozytopenie, Ataxie, Dysarthrie, Dysphagie, Dystonie, Demenz und Epilepsie	Autosomal rezessiv	NPC1	unbekannt (bindet Sterole)
<b>Salla-Erkrankung</b>	Nystagmus, kognitive Defizite und muskuläre Hypotonie	Autosomal rezessiv	Sialin	Exporter von Sialin- und Glucuronsäure, Import von Aspartat und Glutamin

*LIMP2*: lysosome integral membrane protein 2, *β-GC*: β-Glucocerebrosidase, *LAMP2*: lysosome-associated membrane glycoprotein 2, *CIC-7*: Chloride channel protein 7, *OSTM1*: Osteopetrosis-associated transmembrane protein 1, *LMBD1*: Lysosomal cobalamin transport escort protein 1, *TRPML1*: Transient receptor potential-mucopolipin 1, *HGSNAT*: heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase, *CLN*: ceroid lipofuscinosis neuronal, *NPC1*: Niemann-Pick C 1.

### 1.3 Das lysosomale Membranprotein 192 (TMEM192)

Als Proteom, ein von den australischen Forschern Marc Wilkins und Keith Williams 1995 geprägter Begriff, wird die Gesamtheit aller exprimierten Proteine in einer Zelle oder einem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt bezeichnet, die durch das Genom codiert werden (Wilkins et al. 1996; Aslam et al. 2017; Lubke et al. 2009). Mit verbesserten Methoden können nun spezifischere Proteome untersucht werden, zum Beispiel das Proteom einer speziellen Zelle, einer speziellen Organelle oder sogar einer Organellenmembran wie die lysosomale Membran (Schröder et al. 2010b; Bagshaw et al. 2005; Zhang et al. 2007). In der Proteomanalyse von Schröder et al. wurden putative lysosomale Membranproteine bestimmt. Dafür suchte die Arbeitsgruppe in den Proteinsequenzen der neuentdeckten Proteine nach bekannten lysosomalen Sortierungsmotiven. Ein weiterer Hinweis auf eine lysosomale

Herkunft ist die Induzierbarkeit der Expression dieser Proteine durch den Transkriptionsfaktor TFEB (Schröder et al. 2010b).

Das *Membranprotein 192* (= TMEM192) wurde im Rahmen einer Proteomstudie der Lysosomen identifiziert (Schröder et al. 2010b). TMEM192 ist ein lysosomales Membranprotein, welches keine Homologien zu bekannten Protein(Super)familien aufweist. Es besitzt vier Transmembrandomänen, seine N- und C-Termini zeigen zur zytosolischen Seite und es liegt als Homodimer, welcher mittels den C-terminalen Cysteinresten kovalente Disulfidbrücken bilden kann, vor. Im Gegensatz zu vielen lysosomalen Membranproteinen ist TMEM192 nicht glykosyliert (Schröder et al. 2010a).

Aufgrund der fehlenden signifikanten Homologie zu bekannten Proteinfamilien und seiner ubiquitären Expression wurde es zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Zusätzlich zeigte sich, dass das TMEM192-Gen hoch konserviert ist. In der *NCBI HomoloGene* Datenbank werden über 300 Vertebraten aufgelistet, die orthologe Gene zum humanen TMEM192-Gen zeigen (Stand: April 2021). Darüber hinaus wurden in über 600 Spezies Proteine mit Ähnlichkeiten zum humanen TMEM192 gefunden. Diese Proteine werden als TMEM192-Familie zusammengefasst. Orthologe Proteine des humanen TMEM192 werden in Säugetieren wie *M. musculus* und Pflanzen wie *A. thaliana* näher charakterisiert (Geraldo et al. 2009; Nguyen et al. 2017). Trotz dieser Untersuchungen sind die Funktionen der Membranproteine weiterhin unbekannt. Die Untersuchungen des murinen Genprodukts zeigen unter anderem, dass die murine Orthologie des TMEM192 ebenfalls im lysosomalen Kompartiment lokalisiert ist (Nguyen et al. 2017). Auch in der Rattenleber wurde ein Ortholog des humanen TMEM192 beschrieben, welches Bestandteil der lysosomalen Membran ist (Bagshaw et al. 2005).

Der Transport des humanen Proteins zum Lysosomen wird über zwei benachbarte N-terminale Dileucinmotiven vom DXXLL-Typ gesteuert, doch reicht ein intaktes Dileucinmotiv aus, um einen korrekten Transport sicherzustellen. Erst beim Verlust beider Motive kommt es zum Fehltransport zur Plasmamembran. In Übereinstimmung mit der gefundenen lysosomalen Lokalisation sind sowohl in der Maus als auch in der Ratte N-terminal zwei Sortierungsmotive konserviert, welche unabhängig voneinander verantwortlich für den Transport zum Lysosomen sind (Behnke et al. 2011). Das N-terminale Motiv ist hochkonserviert, das zweite, weiter C-terminale Motiv weicht jedoch vom humanen Protein ab (DAQLL, *H. sapiens*; DTQPL, *M. musculus*, *R. norvegicus*).

Außerdem wird TMEM192 zur Isolierung von Lysosomen genutzt. Die Gruppe um Abu-Remaileh entwickelte das LysoIP-Verfahren, mit dem durch Immunpräzipitation des

überexprimierten 3xHA-gekoppelten TMEM192-Proteins in *Human Embryo Kidney*-Zellen (= HEK-293T) Lysosomen in kurzer Zeit isoliert werden können (Abu-Remaileh et al. 2017).

## **1.4 Mögliche klinische Bedeutung einer TMEM192-R39T-Mutation**

Dr. Ami Mankodi, *National Institute of Neurological Disorders and Stroke/ National Institutes of Health* (= NINDS/NIH), Rockville, USA stellte die Kasuistik eines Patienten vor. Dieser Patient berichtete von unspezifischen neurologischen Symptomen. Darüber hinaus bestand eine familiäre Belastung: Sein Vater und seine Schwester zeigten ähnliche Symptome.

Der Indexpatient (männlich, im 4. Lebensjahrzehnt) berichtete von progressiver Visusbeeinträchtigung beidseits und symmetrisch brennenden, strumpfförmigen Dysästhesien von den Fußsohlen bis in die Unterschenkel. Darüber hinaus gab er Konzentrationsschwierigkeiten, Muskelkrämpfe, einschießende Schmerzen und Faszikulationen in den unteren Extremitäten an. Auf Nachfrage erzählte er von Hörstörungen, Fatigue und urologischen Problemen wie Harndrang und erektile Dysfunktion.

In der dort durchgeführten bildgebenden Diagnostik mit MRT des Schädels fielen Hyperintensitäten periventrikulär, in der subkortikalen weißen Substanz, bilateral in den oberen Pedunculi cerebelli und der linken medullären Pyramidenbahn im FLAIR-Modus auf, als Ausdruck einer a.e. entzündlichen Veränderungen. In der optischen Kohärenztomografie stellte sich eine abnorme Ausdünnung der nervösen Retinaschicht dar. Liquor- und Blutuntersuchungen zeigten keine Auffälligkeiten. Genetische Tests auf Peripheral Myelin Protein 22, Mitofusin und Connexin 32 wiesen Normalbefunde nach. Provokationsuntersuchungen bei Verdacht auf Myopathien präsentierten normale Laktat- und Pyruvatwerte.

Eine humangenetische Exom-Sequenzierung wies unter anderem eine heterozygote Punktmutation im TMEM192-Gen (= TMEM192-R39T) auf. In der Zusammenschau mit den Symptomen des Indexpatienten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Mutation des lysosomalen Membranproteins TMEM192 für die Erkrankung ursächlich sein könnte. Ob eine Kausalität zwischen der Klinik und dem humangenetischen Befund besteht, soll im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden.

## 2. Zielsetzung

Das lysosomale Membranprotein 192 (TMEM192) wurde im Rahmen einer Proteomanalyse der lysosomalen Membran identifiziert (Schröder et al. 2010b). Aufgrund der fehlenden signifikanten Homologie zu den bekannten Proteinfamilien und seiner ubiquitären Expression wurde es zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Es wurden ein Indexpatient und zwei weitere Familienmitglieder gefunden, die eine heterozygote Punktmutation im TMEM192-Gen (R39T-Mutation) aufweisen und unter einer familiären progredienten peripheren Polyneuropathie, progressiver Demenz und Visusbeeinträchtigung leiden. Von diesem Indexpatient und seiner Familienmitglieder wurden Zellen isoliert und für die Analyse aufgearbeitet. Als zweites experimentelles System soll eine neu generierte TMEM192<sup>-/-</sup>-Maus untersucht werden. Nach der strukturellen Analyse des humanen TMEM192-Proteins und der Untersuchung zum intrazellulären Transport von TMEM192 widmet sich diese Dissertation der Funktionsanalyse des bis jetzt unzureichend charakterisierten Proteins.

Was sind seine physiologischen Funktionen in einem komplexen Organismus? Welche zelluläre Bedeutung hat das TMEM192-Protein auf den lysosomalen/endosomalen Apparat und spielt es eine Rolle in der Pathogenese von Neuropathien?

Die Hautfibroblasten und *induced pluripotent stem cells*-Neurone (= iPSC-Neurone) des Patienten und seiner gesunden Familienmitglieder sollen daraufhin analysiert werden, welchen Einfluss die heterozygote Punktmutation auf die subzelluläre Lokalisation des TMEM192 hat. Außerdem sollen mögliche Auswirkungen auf die Fähigkeit der Dimerisierung des TMEM192-Proteins und die Funktionalität des lysosomalen/endosomalen Apparats untersucht werden. Im Mausmodell sollen biochemische Analysen (Westernblot-Analysen und  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität) von Organlysaten Aufschlüsse über die Veränderungen des lysosomalen Systems sowie eine mögliche lysosomale Speicherung geben. In besonderer Weise soll dabei eine Beeinflussung der Autophagie analysiert werden. Neben zellbasierten Experimenten sollen histologische und immunhistochemische sowie durchflusszytometrische Untersuchungen von Geweben TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse durchgeführt werden. Auf diese Weise sollen mögliche durch das Fehlen von TMEM192 induzierte Veränderungen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie des Immunsystems aufgedeckt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad pro analysi (= p.a.) und stammen von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Hamburg). Wurden Chemikalien von anderen Firmen bezogen, so wird es gesondert vermerkt. Wenn kein Lösungsmittel angegeben wird, wurden alle Lösungen unter Verwendung von doppeldestilliertem Wasser (= ddH<sub>2</sub>O) hergestellt.

**Tab 3.1: Zielkonzentrationen der verwendeten Inhibitoren**

Inhibitor	gelöst in	Wirkung	Zielkonzentration	Herkunft
<b>Bafilomycin A1</b>	DMSO	vATPase-Inhibitor	30 nM	Sigma
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	H <sub>2</sub> O	verhindert die lysosomale Ansäuerung	25 mM	Roth
<b>Leupeptin</b>	H <sub>2</sub> O	unspez. Proteaseinhibitor	100 µM	Sigma
<b>E64</b>	H <sub>2</sub> O	Cysteinprotease-Inhibitor	40 µM	Enzo
<b>Pepstatin A</b>	DMSO	Aspartatprotease-Inhibitor	1 µg/ml	Sigma
<b>Marimastat</b>	H <sub>2</sub> O	unselektiver Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor	10 µM	Sigma
<b>Brefeldin A</b>	DMSO	Induktion des retrograden Transport zum Golgi-Apparat/ER	1 µg/ml	Enzo

DMSO: Dimethylsulfoxid

**Tab 3.2: Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Kodiertes Protein	Tag	Herkunft
hTMEM192-R39T-HA-pcDNA3.1/Hygro+	TMEM192-R39T	HA	AG Schröder
hTMEM192-HA-pcDNA3.1/Hygro+	TMEM192	HA	AG Schröder
mTMEM192-HA-pcDNA3.1/Hygro+	mTMEM192	HA	AG Schröder
mCTSL-pcDNA3.1/Hygro+	mCathepsin L		AG Schröder
mCTSB-pcDNA3.1/Hygro+	mCathepsin B		AG Schröder
mCTSS-pcDNA3.1/Hygro+	mCathepsin S		AG Schröder

**Tab 3.3: Häufig verwendete Puffer**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<b>TBS/T</b>	Tris	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1%
	pH 7,6	
<b>Natriumphosphatpuffer (= PBS)</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
	pH 7,4	
<b>Phosphatpuffer (= PP) nach Dagmar</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lösung 1)	5 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (Lösung 2)	95 mM
	pH 7,2–7,4	

TBS/T: Tris Buffered Saline with Tween, PBS: Phosphate-buffered saline, PP: Phosphatpuffer

### 3.1.2 Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Chemilumineszenzkamera</b>	ImageQuant LAS 4000	GE-Healthcare
<b>Dispergiergerät/Homogenisierer</b>	Ultra-Turrax	Xenox
<b>Multimode-Mikroplatte-Reader</b>	Synergy HT	BioTek Instruments Inc.
<b>Inkubator</b>	HERA cell 150	Heraeus, Thermo Electron Corporation
<b>Konfokales Fluoreszenzmikroskop</b>	FluoView1000	Olympus
<b>Lichtmikroskop</b>	BX50 Mikroskop	Olympus
<b>Reinstwasseranlage</b>	Milli-Q Plus	Millipore
<b>SDS-PAGE-Elektrophoresekammer</b>	Mini-Protean™	BioRad
<b>Spannungsquelle</b>	PowerPac 300/200/HC/Basic	BioRad
<b>Ultraschallbad</b>	Branson Sonifier 450	Branson

### 3.1.3 Verwendete Zelllinien und Patientenzellen

In Kooperation mit den behandelnden Ärzten und Wissenschaftler vom NINDS/NIH, Rockville wurden kryokonservierte Zellen zur Verfügung gestellt, die aus den drei Patienten und zwei nicht betroffenen Familienmitgliedern gewonnen wurden. An den genannten Zelllinien wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um einen Einfluss der R39T-Mutation auf Morphologie und Funktion des Lysosomen-Endosomen-Systems zu analysieren.

**Tab 3.4: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
<b>BMDM</b>	aus murinem Knochenmark differenzierte murine Makrophagen	Eigene Herstellung (3.2.1.5)
<b>HeLa</b>	humane Zervixkarzinomzellen	DMSZ (Braunschweig)
<b>MEF TMEM192<sup>-/-</sup></b> (283/8, 288/7, 319/8)	primäre murine embryonale Fibroblasten	AG Schröder
<b>MEF TMEM192<sup>+/+</sup></b> (283/9, 288/6, 319/6)	primäre murine embryonale Fibroblasten	AG Schröder

BMDM: bone marrow derived macrophages, MEF: murine embryonic fibroblasts

Zusätzlich differenzierten sie aus iPSC von einem gesunden und zwei erkrankten Familienmitgliedern Neurone mit den Zelllinienbezeichnungen Linie 1, 2 und 3. Für Westernblot-Analysen wurden die iPSC-Neurone in schockgefrorener Form und für mikroskopische Untersuchungen adhärent an Deckgläschen mit 4% Paraformaldehyd (= PFA) fixiert zur Verfügung gestellt.

**Tab 3.5: Patientenzelllinien mit der heterozygoten R39T-Mutation und Kontrollzelllinien gesunder Familienmitglieder**

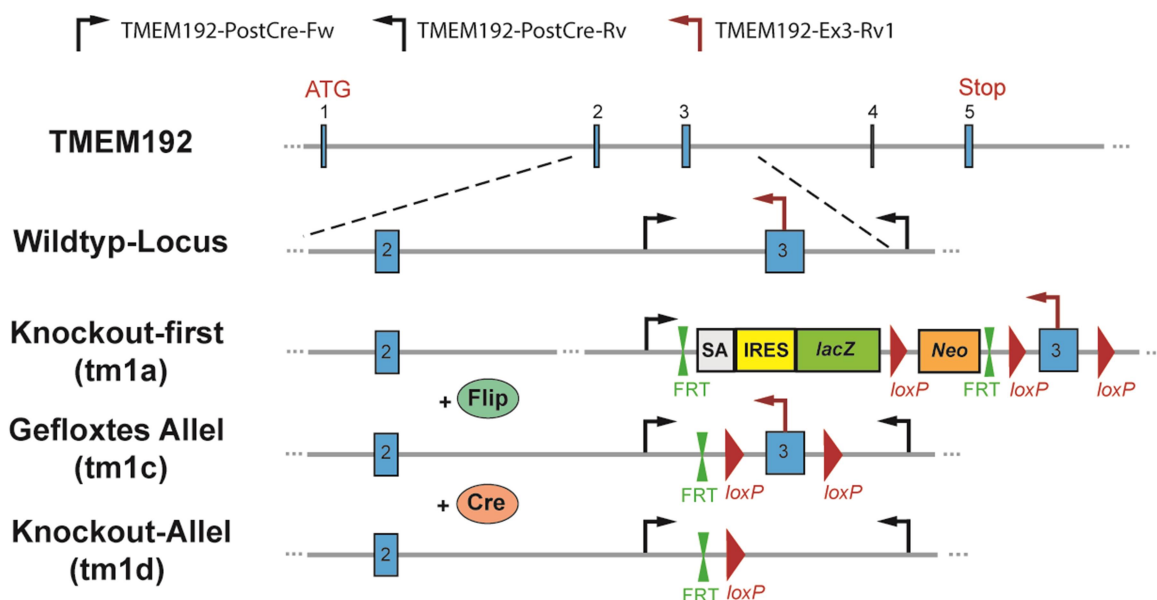
Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
<b>Indexpatient</b>	primäre Hautfibroblasten	Dr. Ami Mankodi, NINDS/NIH, Rockville, USA
<b>Betroffene Schwester</b>	primäre Hautfibroblasten	
<b>Betroffener Vater</b>	primäre Hautfibroblasten	
<b>Gesunde Mutter</b>	primäre Hautfibroblasten	
<b>Gesunder Bruder</b>	primäre Hautfibroblasten	
<b>Linie 1</b>	iPSC-Neurone	
<b>Linie 2</b>	iPSC-Neurone	
<b>Linie 3</b>	iPSC-Neurone	

### 3.1.4 Verwendete Mäuse

Die Generierung der TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse, deren Zucht und Tötung zur Perfusion und Organentnahme entsprachen den nationalen Richtlinien und wurden von den lokalen Ämtern (Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, Hamburg, No. 59/13; Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume, Kiel, V 312-72241.121-3) genehmigt. Für die Generierung dieser Mäuse wurden im Vorfeld vom EUCOMM Konsortium (Project ID 37139, Clone HEPD0785\_6\_G07) konditional getargete embryonale Stammzellen (JM8A1.N3) bezogen und vom Helmholtz Zentrum,

München, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die in dem TMEM192-Locus eingebrachte Kassetten (Abb. 3.1) beinhaltete neben einem *splice acceptor* (= SA) im Intron zwischen den Exon 2 und 3 auch das unter der Kontrolle des endogenen TMEM192-Promoters stehenden Lactose-Operongen (= LacZ-Reportergen) (tm1a-Allel). Durch eine unvollständige Nutzung des SA könnte es vorkommen, dass das TMEM192-Protein noch zu einem geringen Teil funktionsfähig gebildet wurde. Um diese Möglichkeit in den weiteren Untersuchungen auszuschließen, wurden die Mäuse mit den tm1a-Allelen nur für die Untersuchungen auf das TMEM192-Expressionsmuster genutzt. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten ausschließlich an Mäusen mit dem homozygoten tm1d-Allel, welche in Folge als TMEM192<sup>-/-</sup> bezeichnet werden.

Für diese Arbeit wurden die TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse freundlicherweise von der AG Schröder zur Verfügung gestellt.



**Abb. 3.1: Gene-Targeting Schema zur Generierung von TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Um die TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse zu generieren, wurden wie oben beschrieben embryonale Stammzellen bestellt, die im intronischen Bereich zwischen den Exon 2 und 3 die *gene trapping*-Kassetten besaßen (Knockout-first). Diese beinhaltete neben dem *splice acceptor* (SA) auch das LacZ-Gen, welches für die  $\beta$ -Galaktosidase des *E. coli* codiert und unter der Kontrolle des endogenen TMEM192-Promoters steht. Durch sukzessive Verpaarungen mit Flip-Deleter- und Cre-Deleter-Mäusen entstand das Knockout-Allel (tm1d). Die Positionen der Genotypisierungsprimer (TMEM192-PostCre-Fw, TMEM192-PostCre-Rv, TMEM192-Ex3-Rv1) sind schematisch in den Wildtyp- und Knockout-Allelen dargestellt.

Zur Erstellung dieses Allels wurde die eingebrachte Kassetten durch Verpaarung mit Mäusen, welche die Flip-Rekombinase konditionell exprimieren, entfernt. Als Resultat verblieb ein Allel mit von loxP eingerahmten Exon 3 (tm1c). Durch die Verpaarung mit konditionell Cre-Rekombinasen exprimierenden Mäusen wurde das Exon 3 ausgeschnitten und ein konstitutives Knockout-Allel (tm1d, TMEM192<sup>-/-</sup>) erschaffen.



Um den Genotyp zu bestimmen, wurde eine Multiplex-PCR zur Amplifikation der spezifischen Produkte von 600 bp und 333 bp Größe mit den folgenden drei Primern durchgeführt:

TMEM192-PostCre-Fw: 5'-TGATGCTTTTGGCAAACAAATCTA-3';

TMEM192-PostCre-Rv: 5'-AGGAGTGCCAGCCTATAAGACACG-3';

TMEM192-Ex3-Rv1: 5'-GATTAGGATACAAACACGGCACA-3'.

**Tab 3.6: Pipettierschema für die TMEM192-Genotypisierung**

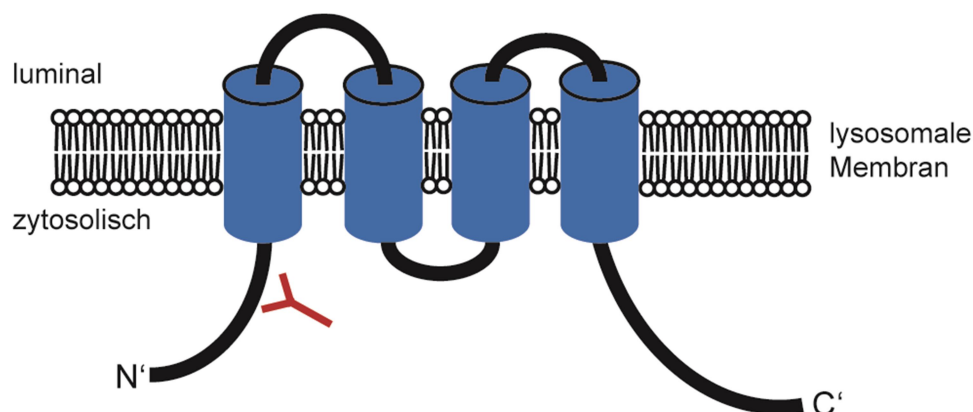
Isolierte genomische DNA	1 µg
TMEM192-PostCre-Fw	1,0 µl
TMEM192-Ex3-Rv1	1,0 µl
TMEM192-Post-Cre-Rv	1,0 µl
10 x Dream Taq Puffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
Dream Taq Polymerase	0,5 µl
DMSO	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad. 50 µl

**Tab 3.7: Einstellung für die Multiplex-PCR**

	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	95	5 min	
Denaturierung	96	15 s	} 35
Annealing	55	30 s	
Elongation	72	1 min	
Finale Elongation	72	10 min	

### 3.1.5 Verwendete Antikörper

Für die Herstellung der Antikörper gegen murines TMEM192 wurden Hasen mit einem synthetischen Peptid bestehend aus den Aminosäuren 21–42 des murinen TMEM192 (DPLLDTQPLPHHSLQAQFRPRF) immunisiert und anschließend gegen immobilisierte Peptide affinitätsgereinigt (Pineda Antikörper-Service, Berlin).



**Abb. 3.2: Generierung der murinen TMEM192-Antikörper**

Schematische Darstellung der mutmaßlichen Membrantopologie und Orientierung des murinen TMEM192. Ein N-terminales Epitop (DPLLDTQPLPHHSLQAQFRPRF) wurde als Antigen für die Immunisierung verwendet. Die Bindungsstelle ist in der Schemazeichnung dargestellt.

**Tab 3.8: Primäre Antikörper**

Antigen	Bezeichnung	aus [Spezies]	Herkunft	Verdünnung	
				WB	IF
<b>Cathepsin B</b>	AF965	Ziege	R&D Systems	1:1000	1:100
<b>Cathepsin D (human)</b>	-	Kaninchen	Andrej Hasilik, Marburg	1:3000	1:100
<b>Cathepsin D (murin)</b>	SII.10	Kaninchen	-	1:3000	
<b>Cathepsin L</b>	AF1515	Ziege	R&D Systems	1:1000	1:100
<b>Cathepsin S</b>	ab18822	Ziege	abcam	1:500	
<b>EEA1 (human)</b>	610457	Maus	BD Biosciences	1:300	
<b>eEF2</b>	ab33523	Kaninchen	abcam	1:1000	
<b>GAPDH</b>	FL-335	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	
<b>GFAP</b>	G9269	Kaninchen	Sigma Aldrich		1:500
<b>GFAP</b>	G-A-5	Maus	Sigma Aldrich	1:5000	
<b>HA-Epitop</b>	3F10	Ratte	Roche Applied Sciences	1:2000	1:500
<b>Iba1</b>	GTX100042	Kaninchen	GeneTex		1:500
<b>KDEL</b>	10C3	Maus	Enzo Life Sciences	1:200	
<b>LAMP1 (murin)</b>	1D4B	Ratte	DSHB		1:50
<b>LAMP2 (human)</b>	2D5	Maus	DSHB	1:3000	1:500
<b>LAMP2 (murin)</b>	Abl93	Ratte	DSHB	1:500	1:50
<b>LAMP2 (murin)</b>	Abl93c	Ratte	DSHB	1:1000	1:500
<b>LBPA</b>	6C4	Maus	University of Geneva		1:50
<b>LC3</b>	PM036	Kaninchen	MBL	1:1000	1:500
<b>LIMP2</b>	T2L2	Kaninchen	Pineda	1:2000	1:100
<b>MBP</b>	A0623	Kaninchen	Dako	1:5000	
<b>NeuN</b>	MAB377	Maus	Merck Millipore	1:1000	1:200
<b>NSE</b>	ab53025	Kaninchen	abcam	1:1000	
<b>P0</b>	P07	Maus	J.J. Archelos, Graz	1:2000	
<b>p62</b>	BML-PW9860-0100	Kaninchen	Enzo Life Sciences	1:1000	1:2000
<b>TMEM192 (human)</b>	BS10#1870	Kaninchen	Biol Chem	1:1000	1:200
<b>TMEM192 (murin)</b>	TMEM192-Rabbit 1	Kaninchen	Pineda	1:1000	
<b>TMEM192 (murin)</b>	TMEM192-Rabbit 2	Kaninchen	Pineda	1:1000	

Antigen	Bezeichnung	aus [Spezies]	Herkunft	Verdünnung	
				WB	IF
<b>TMEM192 (murin)</b>	TMEM192-Rabbit 3	Kaninchen	Pineda	1:1000	
<b>Tubulin</b>	E7	Maus	DSHB	1:500	

*EEA1*: Early Endosome Antigen 1, *GAPDH*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, *GFAP*: glial fibrillary acidic protein, *HA-Epitop*: Teil des Hämagglutinins (Position 98–106), *KDEL*: Peptidsequenz als Marker für das Endoplasmatische Retikulum: Lysin-Aspartat-säure-Glutamat-säure-Leucin, *LBPA*: Lysobisphosphatidsäure, *MBP*: Myelin-Basische Protein, *NSE*: Neuronen-spezifische Enolase

**Tab 3.9: Sekundärantikörper**

Antigen (F <sub>c</sub> )	Spezies	Herkunft	Verdünnung	Konjugation
<b>Kaninchen</b>	Esel	Molecular Probes	IF: 1/500	Alexa Fluor 488
<b>Maus</b>	Esel	Molecular Probes	IF: 1/500	Alexa Fluor 594
<b>Ratte</b>	Esel	Molecular Probes	IF: 1/500	Alexa Fluor 594
<b>Kaninchen</b>	Ziege	Dianova	WB: 1/10000	Meeretichperoxidase
<b>Maus</b>	Schaf	Dianova	WB: 1/10000	Meeretichperoxidase
<b>Ratte</b>	Ziege	Dianova	WB: 1/10000	Meeretichperoxidase
<b>Ziege</b>	Kaninchen	Dianova	WB: 1/10000	Meeretichperoxidase

**Tab 3.10: Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Antigen	Bezeichnung	Herkunft	Fluorophor	Verdünnung
<b>B220</b>	RA3-6B2	eBioscience	FITC	1:100
<b>B220</b>	S4401	ImmunoTools	APC	1:100
<b>CD11b</b>	M1/70	BD	PE	1:100
<b>CD11c</b>	N418	eBioscience	PE	1:100
<b>CD21</b>	eBio4E3	eBioscience	PE	1:100
<b>CD23</b>	B3B4	BioLegend	FITC	1:100
<b>CD24</b>	M1/69	BioLegend	APC	1:200
<b>CD3e</b>	145-2C11	eBioscience	FITC	1:100
<b>CD4</b>	220 126	ImmunoTools	PE	1:100
<b>CD43</b>	eBioR2/60	eBioscience	PE	1:100
<b>CD8a</b>	150 898	ImmunoTools	APC	1:100
<b>F4/80</b>	BM8	eBioscience	APC	1:100
<b>Gr1</b>	220 220	ImmunoTools	FITC	1:100
<b>IgD</b>	11-26c.2a	BD	PE	1:100
<b>IgM</b>	II/41	eBioscience	FITC	1:100
<b>MHCII</b>	M5/114.15.2	eBioscience	PE	1:100
<b>NK-cells</b>	S4241	ImmunoTools	PE	1:100

*APC*: Allophycocyanin, *FITC*: Fluoresceinisothiocyanat, *PE*: Phycoerythrin

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Zellkultur

Nährmedium	DMEM
	+ 10% (v/v) FCS
	+ 100 U/ml Penicillin
	+ 100 µg/ml Streptomycin

Für diese Arbeit wurde sowohl mit primären als auch immortalisierten Säugertierzelllinien gearbeitet. Die Handhabung der Zellen erfolgte an der Sterilbank unter Einhaltung aller Vorgaben für steriles Arbeiten. Wenn es nicht anders angegeben ist, wurden alle Zelllinien im Nährmedium kultiviert und in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre gelagert. Das Passagieren erfolgte je nach Zelllinie alle drei Tage oder einmal pro Woche. Nach Abnahme des Nährmediums bestehend aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (= DMEM), *fetal calf serum* (= FCS) und den beiden Antibiotika wurden die Zellen zur Entfernung der restlichen FCS einmal mit sterilem PBS gewaschen. Als Nächstes wurde 1 ml Lösung mit dem Enzym Accutase hinzugefügt, um die Zellen im Inkubator für 5–15 min enzymatisch von der Kulturschale abzulösen. Um die Accutase zu deaktivieren, wurde 9 ml frisches und auf 37°C erwärmtes Nährmedium hinzugegeben. Nach gründlicher Suspension der Zellen mit einer 10 ml Pipette wurde ein Anteil der Suspension in eine frische Kulturschale pipettiert und mit frischem Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt. Sollten die Zellen für Experimente ausgesät werden, so wurden die lebenden Zellen durch Zugabe von 0,4% Trypanblau (Gibco/Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:10 in einer Zählkammer (C-Chip Neubauer Improved, NanoEnTek) unter dem Lichtmikroskop gezählt und die gewünschte Zellanzahl ausgesät.

#### 3.2.1.2 Transiente Transfektion

Für transiente Transfektionen wurde das Transfektionsreagenz *TurboFect* (Thermo Scientific) genutzt. Dieses enthält kationische Polymere, die mit Nukleinsäuren (z.B. DNA) einen kompakten und stabilen positiv-geladenen Komplex bilden. Diese Komplexe schützen die Nukleinsäuren vor extrazelluläre Degradation und ermöglichen den Transport in die eukaryotische Zellen. Für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie eine 40–60% Konfluenz aufwiesen. Die benötigte Menge der einzelnen Komponente ist abhängig von der genutzten Kulturschale (vgl. Tab 3.11).

**Tab 3.11: Benötigte DNA-Menge für transiente Transfektion bezogen auf die Größe der Kulturschalen**

Kulturschale	Volumen [ml]	DMEM [ $\mu$ l]	DNA [ $\mu$ g]	Turbofect [ $\mu$ l]
6-well Platte/ 3,5 cm Schale	2	50	0,5	1
6 cm Schale	5	100	1	2
10 cm Schale	10	250	2,5	5

Als Erstes wurde in einem gesonderten Gefäß DMEM vorgelegt und die zu transfizierende DNA hinzugegeben. Dann folgte das *TurboFect* als Transfektionsreagenz. Nach gründlicher Durchmischung wurde der Ansatz für 15–20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Etwa 6 bis 8 h nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS wurde frisches, auf 37°C gewärmtes Nährmedium den Zellen hinzugefügt. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mindestens über Nacht im Inkubator kultiviert und meistens 24 Stunden nach Transfektion nach Standardprotokoll geerntet (3.2.2.1.).

### 3.2.1.3 Autophagie-Assay

Durch Aminosäuren-Depletion wurde die Makroautophagie in Zellen induziert. Die Hautfibroblasten wurden in 6 cm-Schalen und die *murinen embryonalen Fibroblasten* (= MEF) in 6-well Platten bis zu 80% Konfluenz ausgesät. Für jede untersuchte Zelllinie wurden vier separate Kulturschalen vorbereitet. Zwei davon hatten als Basis DMEM und zwei das aminosäurefreie Medium *Earle's Balanced Salt Solution* (= EBSS, Gibco, ThermoFisher Scientific). Es wurde je ein Ansatz der zwei verwendeten Medien mit 30 nM Bafilomycin A1 oder mit Dimethylsulfoxid (= DMSO) als Negativkontrolle versetzt und auf 37°C erwärmt:

- DMEM + DMSO
- DMEM + Bafilomycin A1
- EBSS + DMSO
- EBSS + Bafilomycin A1

Nach zweimaligem Waschen der zu untersuchenden Zelllinien mit PBS, wurden die vorbereiteten Medien zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre für einen fest definierten Zeitraum inkubiert. Für eine differenzierte Untersuchung der Makroautophagie wurden so vorbereitete Zellen für 1 h, 2 h, 3 h oder 4 h in den jeweiligen Medien inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen nach Standardprotokoll geerntet (3.2.2.1)

### 3.2.1.4 Quantifizierung lysosomaler Exozytose

Für die Versuchsansätze wurde zunächst phenolrotfreies DMEM im begasten Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigtem Wasserdampf erwärmt. Dann wurde dem Medium entweder 10 µM Ionomycin, 10 µM Ionomycin + 50 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (= PMA) oder 150 µg/ml Zymosan als Stimulator der lysosomalen Exozytose hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente jeweils das Lösungsmittel des Stimulators. Für den Versuch wurden in einer 24-well Platte pro Vertiefung 300.000 MEF bzw. 50.000 BMDM am Vortag ausgesät.

**Tab 3.12: Zusammenfassung der Stimulatoren für die Quantifizierung der lysosomalen Exozytose**

	gelöst in	Zielkonzentration	Inkubationszeit	Wirkung
<b>Ionomycin</b>	DMSO	10 µM	10 min	Ca <sup>2+</sup> -Ionophor, unspezifischer Calciueinstrom induziert lysosomale Exozytose
<b>PMA</b>	DMSO	50 nM	10 min	Aktivator von Proteinkinase C
<b>Zymosan</b>	H <sub>2</sub> O	150 µg/ml	1 h	Zellwandbestandteil von Hefen

Um das Phenolrot des Nährmediums zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl der o.g. Ansätze behandelt. Die Zellen wurden dann für 10 min mit Ionomycin bzw. für 1 h mit Zymosan bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Das Medium wurde unmittelbar nach der Inkubationszeit in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 *revolutions per minute* (= rpm) für 5 min bei 4°C zentrifugiert, um etwaige Zellbestandteile abzutrennen, und anschließend in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt.

Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl phenolrotfreiem Medium in Gegenwart von 1% Triton-X100 für 30 min auf Eis lysiert, dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Zur Auswertung wurde sowohl in dem Medium als auch im Zelllysat die Aktivität des lysosomalen Enzyms β-Hexosaminidase spektrophotometrisch bestimmt (3.2.2.10.).

### 3.2.1.5 Differenzierung von Makrophagen aus murinem Knochenmark

Makrophagenmedium	DMEM
	+ 20% FCS
	+ 100 U/ml Penicillin
	+ 100 µg/ml Streptomycin
	+ 50 ng/ml rmM-CSF

Um Knochenmark zu gewinnen, wurden die Hinterläufe der durch zervikale Dislokation getöteten Maus am Hüftgelenk luxiert und grob von Weichteilen befreit. Die Knochen (Femur und Tibia) wurden in kaltem, steril abgefülltem PBS zwischengelagert. Alle weiteren Schritte fanden unter einer Sterilbank statt:

Die Knochen wurden vollständig von dem Muskelgewebe befreit. Um das Knochenmark zu gewinnen, wurden die Knochen vorsichtig kurz hinter den Gelenken eröffnet. Mithilfe einer 23 G Kanüle und ca. 5 ml kaltem, sterilem PBS wurde das Knochenmark in eine 6 cm Schale gespült. Dann wurden die Knochenmarkzellen mit derselben Kanüle durch Auf- und Abpipettieren und anschließend durch ein 100 µm Nylon-Zellsieb (Falcon) vereinzelt. Das Sieb wurde zusätzlich noch mit PBS nachgespült, um die letzten, im Sieb verbliebenden Zellen zu lösen. Dann wurde die Zellsuspension mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt und 10 min bei 210xg (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde entsorgt und Zellen wurden vorsichtig in 5–10 ml Makrophagenmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer (C-Chip) manuell bestimmt, in dem eine 1:10 Verdünnung hergestellt und der Suspension 1 µl Trypanblau hinzugefügt wurde. Anschließend wurden  $3,5 \times 10^7$  Zellen pro 10 cm Suspensionszellen-Schalen ausgesät.

Um die Stammzellen zu Makrophagen zu differenzieren, wurden 50 ng/ml *rekombinanter muriner Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor* (= rmM-CSF, ImmunoTools) direkt in das Medium gegeben. Die Schalen wurden im Inkubator für sieben Tage inkubiert, wobei am 3. Tag zusätzlich 5 ml frisches Medium mit 50 ng/ml rmM-CSF hinzugefügt wurden. Die differenzierten Makrophagen wurden wie in 3.2.1.1. beschrieben in Kultur gehalten und für weitere Experimente mit der Neubauer-Zählkammer (1:10 Verdünnung) ausgezählt.

### 3.2.1.6 Durchflusszytometrische Quantifizierung von Immunzellen

MACS-Puffer	2 mM Ethylendiamintetraacetat (= EDTA)	Erythrozyten-Lysepuffer	150 mM NH <sub>4</sub> Cl
	0,5% (w/v) bovines Serum-Albumin (= BSA)		15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	in PBS		0,1 mM EDTA
			pH (HCl) 7,3

Die Mäuse wurden zunächst durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet. Zur Gewinnung von Peritonealzellen wurde vorsichtig die Haut des Abdomens ohne Verletzung des Peritoneums eröffnet. Dann wurden 7 ml *Magnetic Activated Cell Sorting* (= MACS)-Puffer mit einer 5 ml Spritze und 20 G Kanüle in den Peritonealraum injiziert und die Zellen durch leichtes Massieren des Abdomens in den Puffer gelöst. Anschließend wurden die in MACS-Puffer

suspendierten Zellen in einem 50 ml Gefäß gesammelt. Die Gewinnung von Knochenmarkszellen erfolgte wie unter 3.2.1.5. beschrieben mit der Ausnahme, dass das Knochenmark statt mit PBS mit dem MACS-Puffer gespült wurde. Zusätzlich wurden axilläre und inguinale Lymphknoten, die Milz und der Thymus entnommen.

Die Lymphknoten und das Knochenmark wurden einmal, die Milz und der Thymus zweimal mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt. Alle Einzelzellsuspensionen wurden anschließend bei 210xg für 10 min und 4°C sedimentiert. Die Lymphknoten und die Peritonealzellen wurden dann in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Die blutreichen Organe (Milz, Thymus und Knochenmark) wurden für 12 min bei Raumtemperatur im Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 210xg für 10 min und bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Knochenmarksproben wurden auf 5 ml, die Proben der Milz und des Thymus auf 10 ml aufgefüllt.

Für die Charakterisierung der Immunzellen wurde eine Färbung mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker (Tab 3.10) durchgeführt. Dafür wurden je nach Zelldichte 100–200 µl der Einzelzellsuspensionen in eine Vertiefung einer 96-well-Rundbodenplatte pipettiert und bei 210xg für 10 min und 4°C sedimentiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden 100 µl der Antikörperverdünnung hinzugefügt und die Zellen darin resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 4°C im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut sedimentiert und die Antikörperverdünnung entfernt. Bevor die Zellen in einer Propidiumiodid (= PI)-Lösung resuspendiert wurden, wurden die Zellen mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Das PI ist ein DNA-Interkalator, welcher nur durch perforierte Zellmembranen in den Zellkern gelangen kann. Zellen, die nicht mit PI angefärbt werden, sind vital. Dann wurden die Zellen erneut sedimentiert und die PI-Lösung entfernt. Für die Analyse im FACSCanto Durchflusszytometer (BD Biosciences) wurden die Zellen in 100–200 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Daten wurden mit der FACSDiva (BD Biosciences) aufgezeichnet und mit diesem Programm oder der FlowJo Software (TreeStar Inc., Ashland, OR) ausgewertet.



## 3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.2.1 Zellernte und Herstellung von Zelllysaten

Zellerntepuffer	je 1 ml PBS + complete Stock (1:25) + 4 mM EDTA pH 8,0	Lysispuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 150 mM NaCl + 1% (w/v) Triton X-100 + 0,1% (w/v) SDS + complete Stock (1:25) + 4 mM Pefabloc + 1 µg/ml Pepstatin A + 4 mM EDTA pH 8,0 + PhosStop (Roche) (1:20)
-----------------	--	-------------	--

Um die Zellen für biochemische Untersuchungen zu gewinnen, wurden die Kulturschalen mit den adhären Zellen zunächst auf Eis gekühlt. Alle benötigten Lösungen und Puffer wurden ebenfalls eiskühlt. Die Proteinase-Inhibitoren wurden immer frisch zum Lysispuffer hinzugefügt.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Zellerntepuffer wurden die Zellen mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 rpm für 5 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch Lysispuffer ersetzt. Wenn die konfluierenden Zellen aus 10 cm Schale geerntet wurden, wurde 100 µl Lysispuffer hinzugefügt. Bei geringeren Zellmengen wurde das Volumen des Lysispuffers entsprechend reduziert. Nach Durchmischen mithilfe einer 100 µl Pipette wurde die Suspension dann für 20 s im Ultraschallbad auf Stufe 4 mechanisch homogenisiert. Es folgte eine einstündige Inkubation auf Eis. Nach der Inkubationszeit wurde die Suspension bei 13.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Lysat wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

### 3.2.2.2 Herstellung von Organlysaten

Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl + complete Stock (1:25) + 4 mM Pefabloc + 1 µg/ml Pepstatin A + 4 mM EDTA	Detergenz-Lösung 1	20% (w/v) Triton-X-100
		Detergenz-Lösung 2	10% (w/v) SDS

Die Mäuse wurden mittels CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Sollte das Rückenmark entnommen wurde, verzichtete man auf die traumatische Dislokation und tötete die Maus nur durch CO<sub>2</sub>-Inhalation. Folgende Organe wurden entnommen:

das Gehirn, das Rückenmark, der Thymus, die Lunge, das Herz, die Milz, die Leber, die Nieren und die Nn. ischiadici. Für die Entnahme des Rückenmarks wurden dorsal die Wirbelbögen entfernt und die Spinalwurzel vom Rückenmark durchtrennt. Das Rückenmark wurde vorsichtig aus dem Spinalkanal von kranial nach kaudal gelöst. Zur Identifikation des N. ischiadicus wurden von dorsal die Oberschenkelmuskeln stumpf präpariert, dann wurde der Verlauf des Nerven nach proximal zum Plexus lumbalis und distal zur Kniebeuge verfolgt und reseziert. Die restlichen Organe wurden nach gängigem Vorgehen gewonnen. Die entnommenen Organe wurden in beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis für sofortige Weiterbearbeitung bzw. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im -80°C Gefrierfach zur späteren Aufarbeitung aufbewahrt.

Zur Herstellung der Organlysate wurden die Organe gewogen. Pro 1 mg Organgewicht wurde 9 µl Lysispuffer hinzugefügt. Dann wurde das Organ in dem Lysispuffer mit einem Ultra-Turrax (Xenox) zerkleinert. Nach Erhalten einer homogenen Suspension wurden die Organlysate auf 1% (w/v) Triton-X-100- und 0,1% Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid (= SDS)-Endkonzentration eingestellt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden sie zweimal für je 20 s auf Stufe 4 im Ultraschallbad (Branson Sonifier 450) dissoziiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Organlysate bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Lysat wurde in einem neuen Reaktionsgefäß überführt und stand nun für biochemische Untersuchungen zur Verfügung.

### 3.2.2.3 Proteinbestimmung

Das *bicinchoninic acid* (= BCA) *protein assay kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL) wurde zur Proteinbestimmung genutzt (Smith et al. 1985). Proteine verfügen über die Fähigkeit in alkalischer Lösung  $\text{Cu}^{2+}$  auf  $\text{Cu}^{1+}$  zu reduzieren (Biuret-Reaktion). Hauptverantwortlich für diese Fähigkeit sind die Aminosäurenreste Cystein oder Cystin, Tyrosin und Tryptophan der Proteine. Das reduzierte Kupfer reagiert mit BCA und es entsteht eine violette Lösung, deren Intensität linear zum Proteingehalt der Probe ist. Es wurde eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe von 0–2 mg/ml BSA (Pierce, Rockford, IL) hergestellt.

Die zu untersuchenden Proben wurden 1:10 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurden jeweils 25 µl der Probenverdünnung als Doppelbestimmung in die Vertiefungen einer 96-well Platte vorgelegt und mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15–30 min bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm in einem Multimode-Mikroplatte-Reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc.) bestimmt. Anhand der Standardkurve wurde der Proteingehalt der jeweiligen Proben mithilfe der gemessenen Absorption (Lambert-Beer'sches Gesetz) berechnet.

### 3.2.2.4 Deglykosylierung von Proteinen mittels PNGase F

5 x Denaturierungspuffer	2,5% (w/v) SDS 10% $\beta$ -Mercaptoethanol	5 x Triton-Lösung	250 mM PBS, pH 8 7,5% (v/v) Triton X-100 1% (w/v) SDS 50 mM EDTA 4% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
--------------------------	--	-------------------	--

Um eine mögliche N-Glykosylierung des murinen TMEM192-Proteins zu untersuchen, wurden 40  $\mu$ g Protein aus verschiedenen Organlysaten (Gehirn, Milz, Thymus, Leber) mit dem Enzym Peptid:N-Glycosidase F (= PNGase F) behandelt. Durch die Behandlung mit PNGase F werden alle N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratketten eines Glykoproteins abgespalten.

Im ersten Schritt wurde in dem Organlysat eine einfache Konzentration des Denaturierungspuffers eingestellt und anschließend wurde er für 5 min bei 95°C denaturiert. Danach wurden 8  $\mu$ l der 5-fachen Triton-Lösung, 1,6  $\mu$ l vom 25-fachen *c0mplete* Stock und 2  $\mu$ l PNGase F bzw. als Negativkontrolle 2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O dazu gegeben und die Probe mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 40  $\mu$ l aufgefüllt. Diese Proben wurden dann 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend für eine SDS-Gelelektrophorese vorbereitet.

### 3.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5 x SDS-Ladepuffer	5% SDS (w/v) 625 mM Tris-HCl pH 6,8 50% Glycerin (v/v) 500 mM Dithiothreitol (= DTT) Bromphenolblau	10 x SDS-Elektrodenpuffer	1,93 M Glycin 250 mM Tris 35 mM SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4% SDS (w/v) pH 6,8	Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4% SDS (w/v) pH 8,8

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts wurde das SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem Tris-Glycin-Puffersystem genutzt (Laemmli 1970). Je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins wurde das Trenngel mit einer Gesamtkonzentration von 10% oder 12,5% Acrylamid-Bisacrylamid verwendet. Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm und verfügen über 10 bis 15 Ladetaschen. Die Ladetaschen wurden mit 20 bis 40  $\mu$ g Protein je nach Probenart und des zu detektierenden Proteins beladen. Bevor die Proteine auf das Gel aufgetragen wurden, wurden

die Proben mit reduzierendem SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Elektrodenpuffer bei konstanter Spannung zwischen 80 und 120 V mit Hilfe des Mini-Protean Elektrophorese-Systems (BioRad).

**Tab 3.13: Pipettierschema zur Herstellung der SDS-Sammel- und Trenngele**

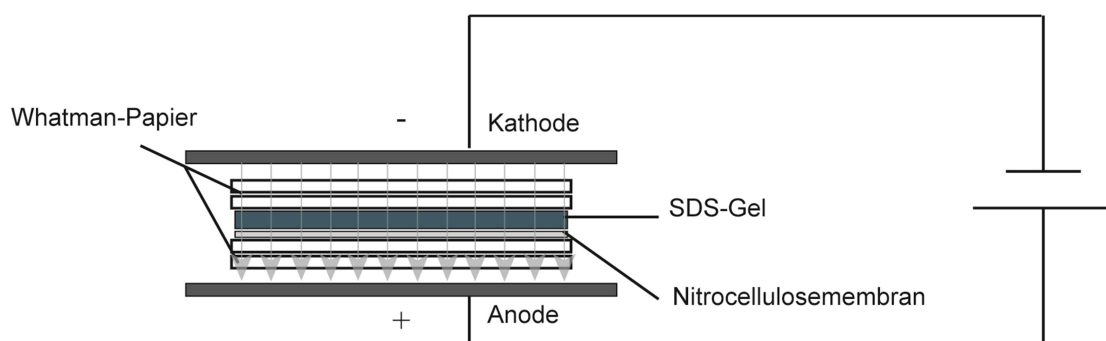
Stammlösung	Sammelgel 4,5%	Trenngel 10%	Trenngel 12, 5%
30% Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))	1,75 ml	3,3 ml	4,2 ml
Sammelgelpuffer	1,35 ml	/	/
Trenngelpuffer	/	2,6 ml	2,6 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,85 ml	4,0 ml	3,1 ml
10% (w/v) APS	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

APS: Ammoniumperoxodisulfat, TEMED: Tetramethylethylendiamin

### 3.2.2.6 Semi-Dry Westernblot

Transferpuffer    192 mM Glycin  
                           25 mM Tris  
                           20% (v/v) Methanol

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran (Westernblot) erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich mit dem Semi-dry Blot-Verfahren. Für dieses Verfahren wurde die Blotting-Kammer (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) genutzt.



**Abb. 3.3: Aufbau der Komponente für die Semi-Dry Westernblot**

Auf die Anode werden zwei Lagen Whatman-Papier gelegt. Anschließend wird die Nitrocellulosemembran luftblasenfrei aufgelegt und mit Transferpuffer befeuchtet. Danach wird das SDS-Gel aufgeschichtet, gefolgt von zwei weiteren Lagen Whatman-Papier. Nun wird die Kathode des Plattenkondensators aufgelegt und ein Gleichstrom von 65 mA/Membran angelegt.

Die auf Größe der SDS-Gele zugeschnittene Nitrocellulosemembran (Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Porengröße 0,2 µm, Whatman GmbH), das SDS-Gel und 4 Lagen Whatman-Papier (Gel Blotting Papier, Whatman GmbH) wurden dann in Transferpuffer equilibriert. Anschließend wurden die einzelnen Bestandteile unter Luftausschluss zusammengesetzt (Abb. 3.3).

Die Übertragung der Proteine vom Gel Richtung Anode auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mit Gleichstrom von 65 mA/Membran über einen Zeitraum von 2 h.

### 3.2.2.7 Ponceau S Färbung

Ponceau S Färbelösung 0,1% (w/v) Ponceau S  
in 5% (v/v) Essigsäure

Waschlösung 5% (v/v) Essigsäure

Um eine erfolgreiche Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran zu überprüfen oder eine gleichmäßige Proteinbeladung v.a. bei Multitissues-Westernblots nachzuweisen, wurde die Ponceau S Färbung durchgeführt. Der Azofarbstoff Ponceau S bindet reversibel an Aminogruppen von Proteinen. Der Farbstoff wird vor allem für auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran geblottete Proteine (Westernblot) genutzt, da sie keine störende Interferenz mit späteren Immundetektion aufweist.

Die Membranen wurden direkt nach dem Blotten in der Ponceau S Färbelösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen zweimal für 5 min in 5% (v/v) Essigsäure gewaschen, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren. Falls notwendig wurden die Membranen noch mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Dokumentation der Färbung z.B. durch Fotografie mit der Chemilumineszenzkamera (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) wurde die Membran mit destilliertem H<sub>2</sub>O solange gewaschen, bis sie völlig entfärbt war. Nun stand die Membran uneingeschränkt für die Immundetektion zur Verfügung.

### 3.2.2.8 Immundetektion auf Westernblots

Blockier-Lösung 5% (w/v) Milchpulver in TBS/T  
oder  
5% (w/v) BSA in TBS/T

Waschpuffer TBS/T

Um Proteine mittels Antikörpern spezifisch auf den Membranen nachzuweisen, wurde die indirekte Chemilumineszenz genutzt. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden in der Blockier-Lösung verdünnt. Zunächst wurde die Membran für mindestens 1 h in Blockier-Lösung geschwenkt, um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Danach

wurde die Membran im primären Antikörper (Tab 3.8) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 5 min im Waschpuffer gewaschen, bevor die Meerrettichperoxidase (= HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab 3.9) hinzugefügt wurden. Die Membran wurde dann in der Sekundärantikörper-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde sie viermal für je 15 min im Waschpuffer gewaschen, um die ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Die HRP-Aktivität des gebundenen Sekundärantikörpers wurde mit Hilfe des Luminols (Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare) und der Chemilumineszenzkamera (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) detektiert. Anschließend wurden die Bilder digital gespeichert und mit Adobe Photoshop CS 3 sowie Adobe Illustrator CS6 bearbeitet.

### 3.2.2.9 Re-Detektion von Westernblots

Antikörper-Elution-Puffer    100 mM Glycin  
   20 mM Magnesiumacetat  
   50 mM Kaliumchlorid  
   pH (mit HCl) 2,20

Diese Methode diente der Entfernung von gebundenen Antikörpern, um auf derselben Membran eine erneute Protein-Immundefektion zu ermöglichen. Die Membran wurde im Antikörper-Elution-Puffer für mindestens 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt, dann dreimal für 5 min in TBS/T gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockier-Lösung (3.2.2.8) inkubiert, bevor eine Detektion mit einem weiteren Primärantikörper erfolgte.

### 3.2.2.10 Bestimmung der $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität

Substratlösung	10 mM p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucosaminid	Stopplösung	0,4 M Glycin
	100 mM Citratpuffer		pH (mit NaOH) 10,4
	0,2% Triton X-100		
	0,2% BSA		
	0,02% NaN <sub>3</sub>		

In den Organlysaten wurde die Aktivität des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -Hexosaminidase quantitativ gemessen. Die Organlysate (3.2.2.2) wurden mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) im 1,5 ml Reaktionsgefäß vorverdünnt.

Die Vorverdünnung variiert je nach Organ und beträgt z.B. für die Milz 1:100, für die Leber und das Gehirn 1:50. Dann wurde 25 µl der Kochsalzlösung in die Vertiefung der 96-well Platte vorgelegt und ebenfalls 25 µl der vorverdünnten Proben als Doppelbestimmung hinzugefügt, gefolgt von der Zugabe von 50 µl Substratlösung. Nach einstündiger Inkubationszeit bei 37°C wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 200 µl der Stopplösung abgebrochen. Durch die Zugabe der Stopplösung wurde die Lösung alkalisiert und das gespaltene p-Nitrophenyl fiel aus und färbte die Lösung gelb. Die Intensität der Gelbfärbung ist proportional zum umgesetzten Substrat, sodass durch die Bestimmung der Extinktion bei 405 nm auf die Enzymaktivität der Probe zurückrechnen werden kann (Lambert-Beer'sches Gesetz). Man erhält die Enzymaktivität in U/ml. Um die spezifische Enzymaktivität in mU/mg zu erhalten, wurde die Proteinkonzentration der Lysate (3.2.2.3.) bestimmt und die jeweilige Enzymaktivität der Probe durch ihre Proteinkonzentration geteilt.

### 3.2.3 Mikroskopische Methoden

#### 3.2.3.1 Immunfluoreszenz

Fixierungslösung	4% PFA in PBS	Blockier-Lösung	0,2% Saponin 10% FCS in PBS
Permeabilisationslösung 1	0,2% Saponin in PBS	DABCO/Mowiol/DAPI	1,7 g/ml Mowiol 20 mg/ml DABCO 1 µg/ml DAPI
Permeabilisationslösung 2	0,12% Glycin 0,2% Saponin in PBS		

Für die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Nach Absaugen des Nährmediums wurden die Zellen vorsichtig dreimal mit eiskühlem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen durch die Zugabe der Fixierungslösung für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Entfernen der Fixierlösung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Nach fünfminütiger Inkubation in Permeabilisationslösung 1 wurden die Zellen in Permeabilisationslösung 2 für weitere 10 min inkubiert. Dann folgte eine einstündige Inkubation in Blockier-Lösung bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen in einer feuchten, lichtgeschützten Kammer mit den primären Antikörpern (Tab 3.8) behandelt. Je nach Qualität der Antikörper

wurden die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in primären Antikörpern belassen. Nach der Inkubation wurden die Zellen fünfmal mit der Permeabilisationslösung 1 gewaschen und die Immunfluoreszenzfärbung durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit den Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpern (Tab 3.9) vervollständigt. Als letzten Schritt wurden die Zellen fünfmal in Permeabilisationslösung 1 und zweimal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Mowiol/1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (= DABCO)/ 4,6-Diamidin-2-phenylindol (= DAPI) auf den Objektträgern eingebettet. Bis zur Auswertung wurden die Präparate dunkel und kühl gelagert. Die so angefertigten Präparate wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (FluoView1000, Olympus) untersucht und fotodokumentiert.

### 3.2.3.2 Präparation und Fixation von murinen Organen

Als Erstes wurden die Mäuse mit 10 µl/g Körpergewicht eines kombinierten Anästhetikums bestehend aus 12 mg/ml Ketamin und 1,6 mg/ml Xylazin durch intraperitoneale Injektion betäubt. Dann erfolgte das Eröffnen des Peritoneums mit Präparation bis zum Diaphragma und Absetzen dessen vom Rippenbogen. Durch das Verlagern des Brustschildes durch bilaterale Abtrennen der parasternalen Rippen nach kranial konnte der linke Ventrikel mit einem 21 G Butterfly punktiert und der rechte Vorhof mit einer Schere vorsichtig eröffnet werden, sodass ein offenes Perfusionssystem entsteht. Für histologische oder Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden die murinen Organe unterschiedlich fixiert.

#### 3.2.3.2.1 Licht- und elektromikroskopische Untersuchungen

Vorperfusionslösung 1	0,1 M PP + 1% Procain	Fixationslösung 1	6 % Glutaraldehyd/PP
		Nachfixationslösung 1	3% Glutaraldehyd/PP

Für licht- und elektromikroskopische Untersuchungen wurden die Mäuse zuerst mit ca. 10–15 ml Vorperfusionslösung 1 perfundiert, dann mit ca. 20–25 ml Fixationslösung 1 fixiert, anschließend über Nacht bei 4°C in der Nachfixationslösung 1 immersionsfixiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Lüllmann-Rauch und dem Anatomischen Institut, Christian-Albrechts Universität (= CAU) zu Kiel.



### 3.2.3.2 Immunhistologische und -fluoreszenz Untersuchungen

Vorperfusionslösung 2	PBS	Entwässerungslösung	30% Saccharose/ PP
Fixationslösung 2	4% PFA/PBS	Aufbewahrung	0,1 M PP + 0,02% NaN <sub>3</sub>
Nachfixation 2	4% PFA/PBS		

Für immunhistologische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden die Gewebe analog wie oben beschrieben aber mit den Lösungen 2 fixiert. Nach der Immersionsfixation wurden die Organe entnommen und in 30% Saccharose bis zur weiteren Verarbeitung konserviert.

Zur Herstellung der Gewebeschnitte wurde das Kryomikrotom mit Trockeneis gekühlt. Auf die kalte Arbeitsplatte wurde 5% Saccharose aufgespritzt und geebnet. Auf diese ebene 5% Saccharose-Schicht wurde das zu schneidende Organ platziert, mit 30% Saccharose fixiert und durch das Trockeneis vollständig durchgefroren. Im biochemischen Institut wurden mit dem Kryomikrotom 35 µm dicke Gewebeschnitte für X-Gal- und Immunhistofluoreszenz-Färbungen hergestellt. Die Gewebsschnitte wurden in 0,1 M Phosphatpuffer + 0,02% NaN<sub>3</sub> in einer 24-well-Platte aufbewahrt. So konnten die Schnitte für ca. vier Wochen bei 4°C gelagert werden.

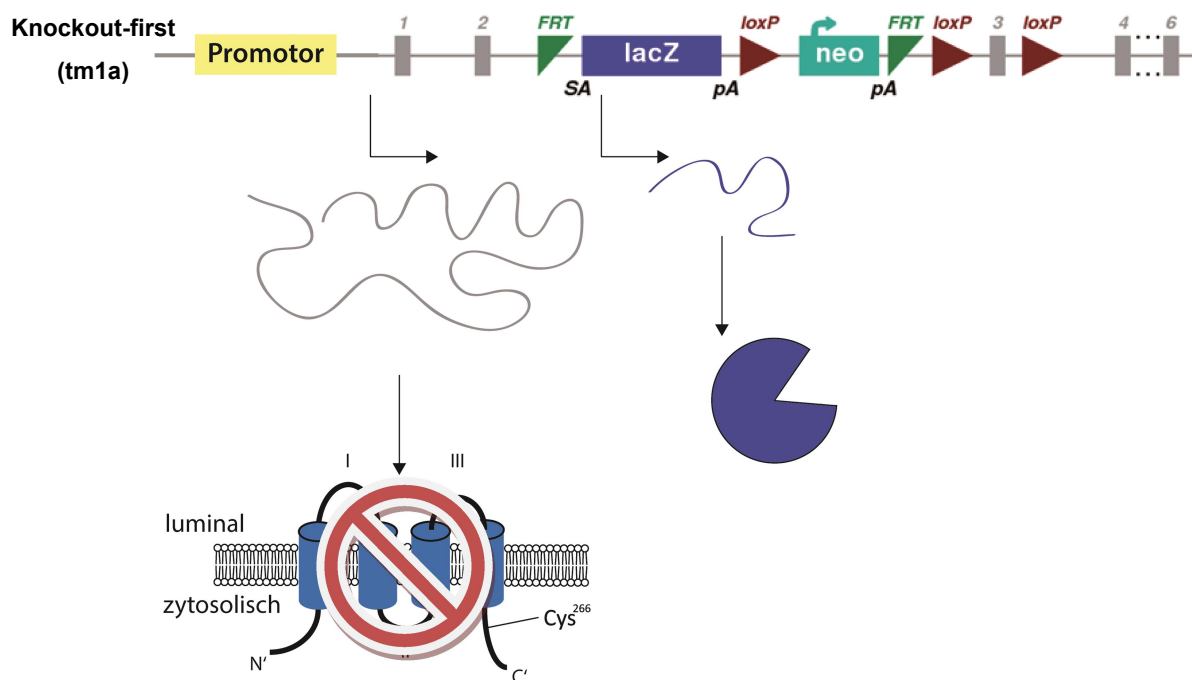
### 3.2.3.3 X-Gal-Färbung

Permeabilisationslösung	0,01% Na-Deoxycholat 0,02% NP-40 in PBS	X-Gal-Färbelösung	5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 5 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 2 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mg/ml X-Gal in PBS
-------------------------	---	-------------------	---

Das *tmla*-Allel, welches bei der Zucht der TMEM192-defizienten Mauslinie entsteht, beinhaltet ein LacZ-Gen, welches für das Enzym β-Galaktosidase (aus dem *E. coli*) kodiert. Bei der Aktivierung des TMEM192-Promotors kommt es daher zur Transkription beider Gene. Aufgrund des eingebrachten SA entsteht dabei ein Fusionstranskript aus der bakteriellen β-Galaktosidase und einem nicht-funktionellen TMEM192-Protein. Das unter dem endogenen TMEM192-Promotor stehende Produkt des LacZ-Gens kann somit als indirekter Expressionsmarker genutzt werden.

Als Erstes wurden die zu färbenden Gewebsschnitte zweimal für je 10 min in 0,1 M Phosphatpuffer in den Vertiefungen der 24-well Platten gewaschen. Dann wurden die Gewebsschnitte für weitere 10 min bei Raumtemperatur in Permeabilisationslösung inkubiert

und danach für 10 min in PBS gewaschen. Die Gewebsschnitte wurden für ungefähr 3 h oder über Nacht mit dem Substrat *5-Bromo-4-Chloro-3-Indonyl-β-D-Galactopyranosid* (= X-Gal) bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe des Substrats zum Gewebsschnitt färbte sich das Gewebe durch die katalytische Wirkung des Enzyms blau. Als Kontrolle für endogene β-Galaktosidase-Aktivität wurde immer Wildtypgewebe als Kontrolle mitgefärbt und die Inkubationszeit so gewählt, dass die Kontrolle keine oder nur eine geringe Blaufärbung (Hintergrundfärbung) zeigte. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger überführt und mit Mowiol fixiert. Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte an dem Lichtmikroskop (BX50 Mikroskop, Olympus).



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Prinzips, das TMEM192-Expressionsmuster durch den indirekten Nachweis von β-Galactosidase mithilfe des tm1a-Allels darzustellen**

Für die Expressionsanalyse wurden Mäuse mit dem Genotyp  $TMEM192^{A/+}$  bzw.  $TMEM192^{A/A}$  verwendet. Das A-Allel besteht aus einer Genkassette, die neben einem SA sowie mehreren Schnittstellen für flp- und Cre-Rekombinasen auch über das unter dem TMEM192-Promoter stehende LacZ-Reportergen verfügt, sodass die Menge der translatierten bakteriellen β-Galactosidase der Expressionsrate des TMEM192-Proteins entspricht. SA: splice acceptor, LacZ: Lactose-Operon.

### 3.2.3.4 Immunohistofluoreszenz-Färbung von murinen Gewebeschnitten

Blockier-/ Antikörperlösung	4% Normal Goat Serum 0,5% Triton-X100 in PP	Waschpuffer	0,25% Triton-X100 in PP
DABCO/Mowiol	1,7 g/ml Mowiol 20 mg/ml DABCO		

Als Erstes wurden die Gewebeschnitte (3.2.3.2.2) für 5 min in PBS gewaschen, um das  $\text{NaN}_3$  zu entfernen. Dann wurden sie in Blockierlösung für 2 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Als Nächstes wurden die Schnitte über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in primären Antikörpern (Tab 3.8) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte viermal für ca. 10 min im Waschpuffer gewaschen und dann in den im Waschpuffer verdünnten Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpern für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abdunkelung wurde die 24-well Platte mit Aluminiumfolie lichtdicht abgedeckt. Danach wurden die Schnitte noch einmal für 10 min im Waschpuffer gewaschen, um anschließend in der  $1\ \mu\text{g/ml}$  DAPI-Lösung für 10 min zu inkubieren. Der folgende ein- bis zweimal für 10 min im Waschpuffer durchgeführte Waschschrift befreite die Gewebeschnitte vom überschüssigen DAPI. Als letzten Schritt wurden die Gewebeschnitte vorsichtig mit einem Haarpinsel Größe 2 auf den Objektträger überführt. Nach optimaler Positionierung und Antrocknen der Gewebeschnitte wurden sie mit Mowiol/DABCO eingebettet und dunkel bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die so angefertigten Gewebeschnitte wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (FluoView1000, Olympus) untersucht und fotodokumentiert.

### 3.2.3.5 Immunhistochemie mit 3,3'-Diaminobenzidin-Färbung (= DAB)

Verdünnungslösung	1,5% Normal Goat Serum 0,5% Triton X-100 in PBS	Avidin-Biotin-Complex (= ABC)-Puffer  DAB-Färbelösung
-------------------	---	---

Es wurde das *DAB Peroxidase Substrate Kit* (Vector Labs) benutzt, um die immunohistologische Färbung zu visualisieren. Als ersten Schritt wurden die Gewebeschnitte zweimal für 5 min in PBS gewaschen, um das  $\text{NaN}_3$  zu entfernen. Dann wurden die Gewebeschnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit 1,6%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /TBS behandelt, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu unterdrücken. Nach diesem Schritt wurden die Gewebeschnitte viermal für 10 min mit Waschpuffer (3.2.3.4) gewaschen und dann in Blockier-Lösung (3.2.3.4) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Prozedur wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in primären Antikörpern (Tab 3.8), welche in

Verdünnungslösung verdünnt wurden, inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten die weiteren Schritte: Zunächst wurden die Gewebeschnitte erneut viermal für 10 min im Waschpuffer gewaschen und dann mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Daran schlossen sich fünf Waschschritte je 10 min mit Waschpuffer an. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte dann in der ABC-Lösung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten vier Waschschritte je 10 min mit PBS, bevor die DAB-Färbelösung hinzugefügt wurde. Nach Erreichen einer ausreichenden Braunverfärbung der Gewebeschnitte wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von PBS gestoppt. Vor Aufzug der Gewebeschnitte auf Objektträger und Versiegeln mit Mowiol/DABCO wurden sie zweimal in PBS und einmal in Wasser für je 5 min gewaschen. Als Kontrolle wurden immer Gewebeschnitte des Wildtyps zeitgleich gefärbt. Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte anschließend am Lichtmikroskop (BX50 Mikroskop, Olympus).

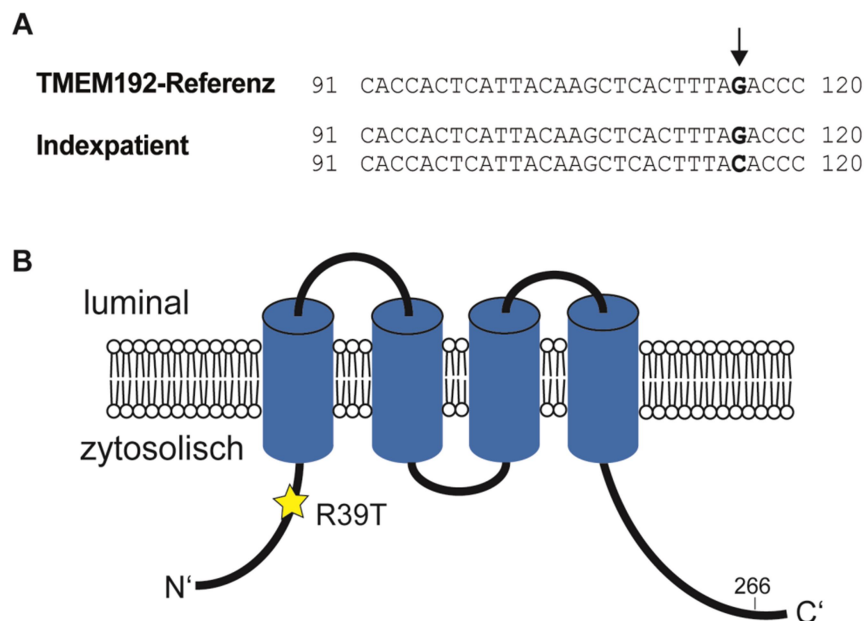
### **3.2.3.6 Histologie**

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Lüllmann-Rauch (Anatomisches Institut, CAU, Kiel), Dr. Bernreuther (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) und dem Hämatopathologischen Institut, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Standort Kiel wurden die murinen Organe histologisch aufgearbeitet. Dafür wurden die Organe perfusionsfixiert (3.2.3.2.) und zusätzlich in 4% PFA über Nacht bei 4°C immersionsfixiert. Von mehreren Organen fertigte Prof. Dr. Lüllmann-Rauch Toluidinblaufärbungen und elektromikroskopische Untersuchungen an und stellte hochauflösende digitale Aufnahmen zur Verfügung. Dr. Bernreuther stellte die hochauflösenden digitalen Aufnahmen von Gehirnschnitten mit Spezialfärbungen wie Luxol Fast Blue (Darstellung von Myelin) und Immunhistochemie, u.a. *glial fibrillary acidic protein* (= GFAP) zur Verfügung. Das Hämatopathologische Institut färbte Milzschnitte mit der Hämatoxylin und Eosin (= HE)-Färbung und stellte ebenfalls hochauflösende digitale Aufnahmen zur Verfügung.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der R39T-Mutation auf das humane TMEM192

Bei drei Mitgliedern einer Familie, die an progredienten neurologischen Symptomen leiden, konnte eine heterozygote Punktmutation im TMEM192-Gen gefunden werden. Die Mutation befindet sich an Position 116 der mRNA und führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin durch Threonin an der Position 39 (R39T) der Aminosäurekette (Abb. 4.1 A). Die R39T-Mutation befindet sich am N-Terminus vom TMEM192 (Abb. 4.1 B).



#### Abb. 4.1: Charakterisierung der R39T-Mutation

(A) Sequenz-Alignment einer TMEM192-Genreferenz mit den TMEM192-Allelen des Indexpatienten. Man sieht einen Basenaustausch an Position 116. Diese Punktmutation führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (R) zu Threonin (T) an Position 39 der Aminosäurekette (R39T-Mutation). Punktmutation: Pfeil. Basenaustausch: fett markiert. (B) Schematische Darstellung der Topologie des TMEM192 wie durch TMHMM (<http://www.expasy.org>) vorhergesagt. Der Stern markiert die Position der R39T-Mutation. Außerdem ist die Position des für die Dimerisation notwendigen Cysteins (C266) markiert.

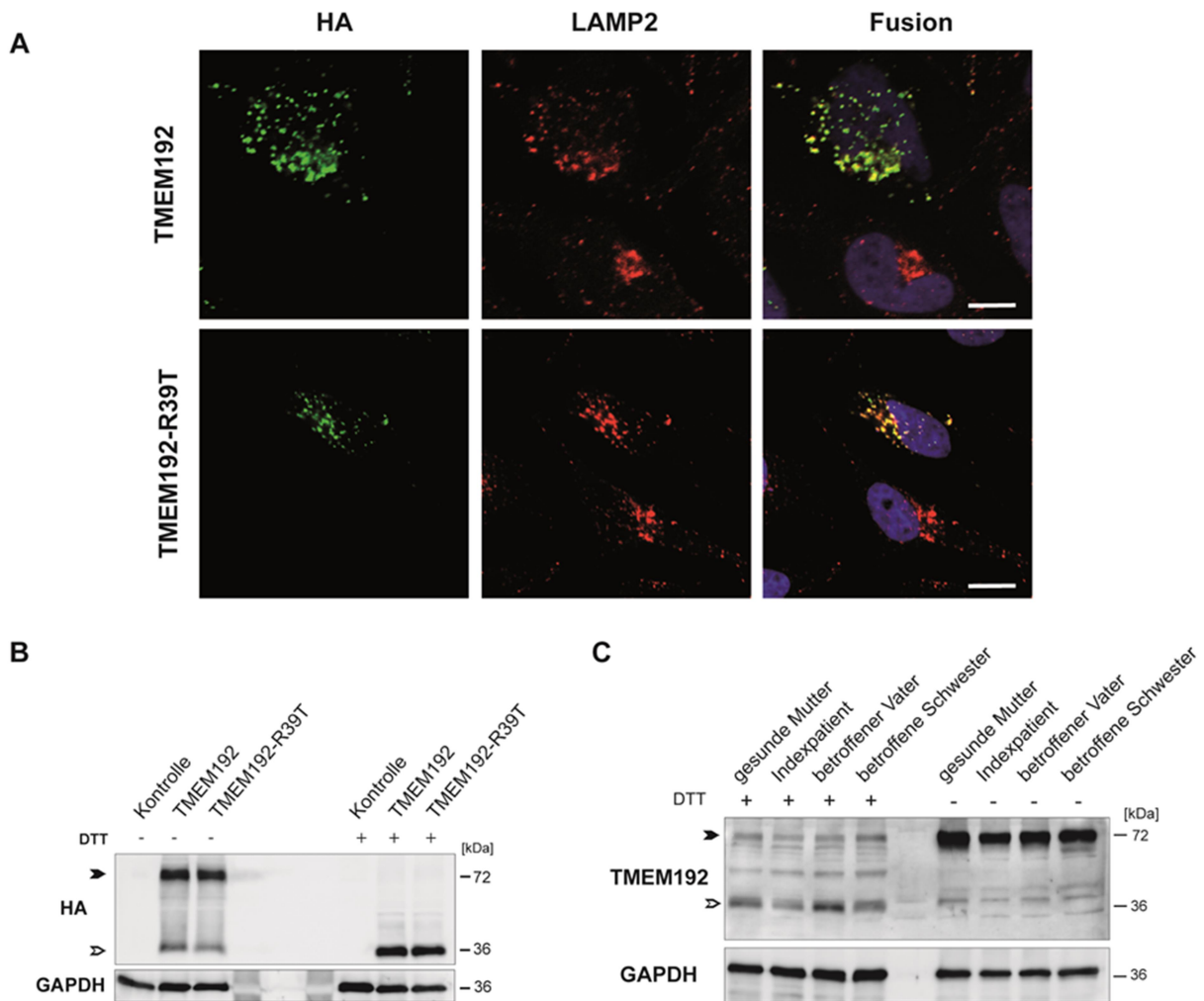
Von Kooperationspartnern am NINDS/NIH, Rockville wurden Zellen vom Indexpatienten, dessen Vater und Schwester (heterozygote TMEM192-R39T-Mutationsträger) und von zwei nicht betroffenen Familienmitgliedern (Mutter und Bruder) zur Verfügung gestellt. In einem vorgeschalteten Versuch wurde die DNA der zugesendeten Hautfibroblasten sequenziert (Sanger et al. 1977) und die heterozygote R39T-Mutation bestätigt. Es soll untersucht werden, ob die R39T-Mutation die Funktion des TMEM192-Proteins bzw. des endosomal-lysosomalen Systems beeinträchtigt.

#### **4.1.1 Einfluss der R39T-Mutation auf die Lokalisation des Proteins TMEM192 und die Dimerisation in Überexpression**

Da die Mutation im zytosolischen N-Terminus von TMEM192 liegt und die Arbeit von Behnke et al. zeigte, dass zwei N-terminale Dileucin-Motive (DXXLL) an den Positionen 23/24 und 27/28 entscheidend für den Transport des neu synthetisierten Proteins TMEM192 zu den Lysosomen sind, wurde die Immunfluoreszenz angewendet, um die Lokalisation des mutierten TMEM192 unter Überexpressionsbedingungen in HeLa-Zellen zu untersuchen (Behnke et al. 2011).

Das TMEM192-Protein und die TMEM192-R39T-Mutante wiesen eine vesikuläre, perinukleäre Verteilung in der Zelle auf. Durch die Ko-Lokalisation mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP2 wurde der Transport in die Lysosomen bestätigt. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die N-terminale R39T-Mutation nicht den intrazellulären Transport des Proteins beeinflusst. Darüber hinaus hatte die Überexpression des Wildtyp und der R39T-Mutante keinen Einfluss auf die Morphologie und intrazelluläre Verteilung der Lysosomen (Abb. 4.2 A).

TMEM192 bildet Homodimere aus, welche über die C-terminalen Cysteinreste (C266) stabilisiert werden (Schröder et al. 2010a). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die R39T-Mutation auf die Fähigkeit der Bildung von Homodimeren hat, wurden das TMEM192 und die R39T-Mutante in HeLa-Zellen überexprimiert. Als Reduktionsmittel diente das Reagenz DTT, welches die Fähigkeit hat, Disulfidbrücken zu spalten. Auf dem Westernblot war das Laufverhalten des TMEM192 im 10% SDS-Gel nicht durch die Mutation verändert worden. Durch die Zugabe von DTT sah man sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante nur eine spezifische Proteinbande auf Höhe von 36 kDa, in Abwesenheit von DTT war eine weitere Proteinbande auf Höhe von 72 kDa nachweisbar, welche dem TMEM192-Dimer entsprach (Abb. 4.2 B). Zur Bestätigung der Ergebnisse unter Überexpressionsbedingungen wurden die Patientenzellen auf dieselbe Weise untersucht. Analog konnte sowohl in den primären Hautfibroblasten als auch in den aus iPSC-generierten Neuronen (Daten nicht gezeigt) unabhängig vom Genotyp, eine Proteinbande bei 72 kDa nachgewiesen werden, wenn im Probenpuffer kein DTT vorhanden war. Mit Zugabe von DTT zeigte sich nur eine Proteinbande bei 36 kDa (Abb. 4.2 C).



**Abb. 4.2: Einfluss der R39T-Mutation auf die Lokalisation und Dimerisierung des TMEM192 in Überexpression**

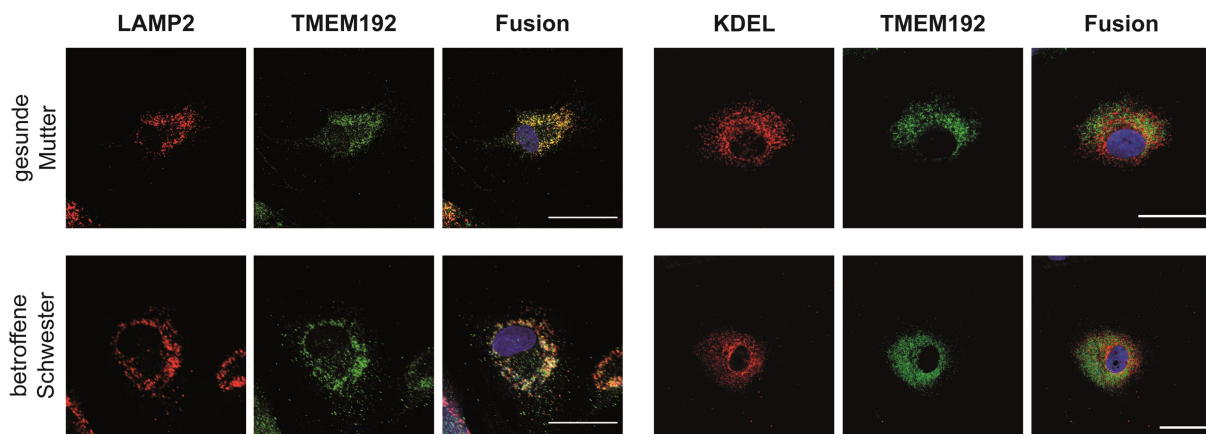
(A) HeLa-Zellen wurden transient entweder mit einem HA-Epitop fusionierten TMEM192- oder TMEM192-R39T-Expressionskonstrukt auf Coverslips transfiziert und am Folgetag mit 4% PFA fixiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern gegen HA und den polyklonalen Antikörpern gegen LAMP2 und anschließend eine einstündige Inkubation in den Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern. Nucleus-Darstellung mittels DAPI. Maßstab 20  $\mu$ m. (B) Die Expressionskonstrukte TMEM192-HA und TMEM192-R39T-HA wurden transient in HeLa-Zellen exprimiert. Für die Analyse zur Ausbildung von Dimeren wurden Proben der HeLa-Lysate bzw. (C) gleiche Anteile der Hautfibroblastenlysate des Indexpatienten und seiner Familie (25  $\mu$ g) für 5 min bei 95°C entweder mit dem oder ohne das Reduktionsmittel DTT denaturiert. Für die Auswertung wurden die monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop bzw. die polyklonalen Antikörper gegen TMEM192 verwendet. Zur Bestätigung einer gleichmäßigen Proteinauftragung wurde die Membran anschließend mit den GAPDH-Antikörpern behandelt. Das TMEM192-Monomer ist mit weißen und das Dimer mit schwarzen Pfeilspitzen markiert.

#### 4.1.2 Einfluss der R39T-Mutation auf die Morphologie und Funktion des endosomal-lysosomalen Systems

Die Hautfibroblasten des Indexpatienten und der Familienmitglieder wurden auf mögliche Veränderungen der Lysosomen-Morphologie und weiterer Zellorganellen analysiert.

In der indirekten Fluoreszenzmikroskopie der untersuchten Hautfibroblasten stellte sich das TMEM192 als perinukleär verteilte, vesikuläre Strukturen dar, welche eine starke

Ko-Lokalisation mit den lysosomalen Marker LAMP2 zeigte. Eine Ko-Lokalisation mit dem frühendosomalen Marker EEA1 (Daten nicht gezeigt) oder dem endoplasmatischen Retikulum-Marker KDEL konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Es gab keine erkennbaren Unterschiede hinsichtlich Quantität, Distribution und Größe der Lysosomen in den R39T-Mutation-Hautfibroblasten gegenüber den Kontrollzelllinien. Auch die Endosomen und das endoplasmatische Retikulum-System präsentierten keine offensichtlichen Veränderungen. Außerdem wurden in der Immunfluoreszenz der untersuchten Zellen keine Hinweise auf Akkumulation von zelleigenen und/oder Fremdmaterialien gesehen.



**Abb. 4.3: Zellmorphologisches Aspekte der R39T-Mutation**

Bei den Immunfluoreszenzbildern handelt es sich um die Hautfibroblasten der Mutter („Gesunde Mutter“) und der betroffenen Schwester des Indexpatienten („betroffene Schwester“). Die Zellen wurden am Vortag auf Coverslips gezogen. Am Folgetag erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung mittels den polyklonalen Antikörpern gegen TMEM192, den polyklonalen LAMP2-Antikörpern und den monoklonalen KDEL-Antikörpern für 1 h bei Raumtemperatur und anschließend die Visualisierung durch eine einstündige Inkubation in Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern. Maßstab 20  $\mu$ m.

Um zu überprüfen, ob die R39T-Mutation zu einer biochemisch messbaren Akkumulation von Lysosomen führt, wurden die lysosomale Proteine LAMP2 und LIMP2, die zusammen mehr als 50% der lysosomalen Membranproteine ausmachen (Fukuda 1991), und Cathepsin D untersucht (Abb. 4.4 A). Die Abundanz von LAMP2 schien in den Proben der Mutationsträger in dem gezeigten Westernblot erniedrigt im Vergleich zu den gesunden Familienmitgliedern zu sein. Bei LAMP2 handelt es sich um ein stark glykosyliertes Protein (Fukuda 1991), welches im Westernblot ohne vorherige Deglykosylierung eine sehr unscharfe Bande ergibt. Aufgrund dieser Eigenschaft ist das Interpretieren der Daten in Grenzbereichen schwierig. In weiteren Experimenten konnten keine konsistenten Erniedrigungen des LAMP2 in den Proben der Mutationsträger gesehen werden (Daten nicht gezeigt). Das LIMP2 wurde unabhängig vom Genotyp in vergleichbaren Mengen nachgewiesen. Die R39T-Mutation führt zu keiner Anreicherung von lysosomalen Proteinen und das Ergebnis sprach somit gegen eine Vergrößerung der Lysosomen. Auch konnte das Pro-Cathepsin D (55 kDa), das intermediäre

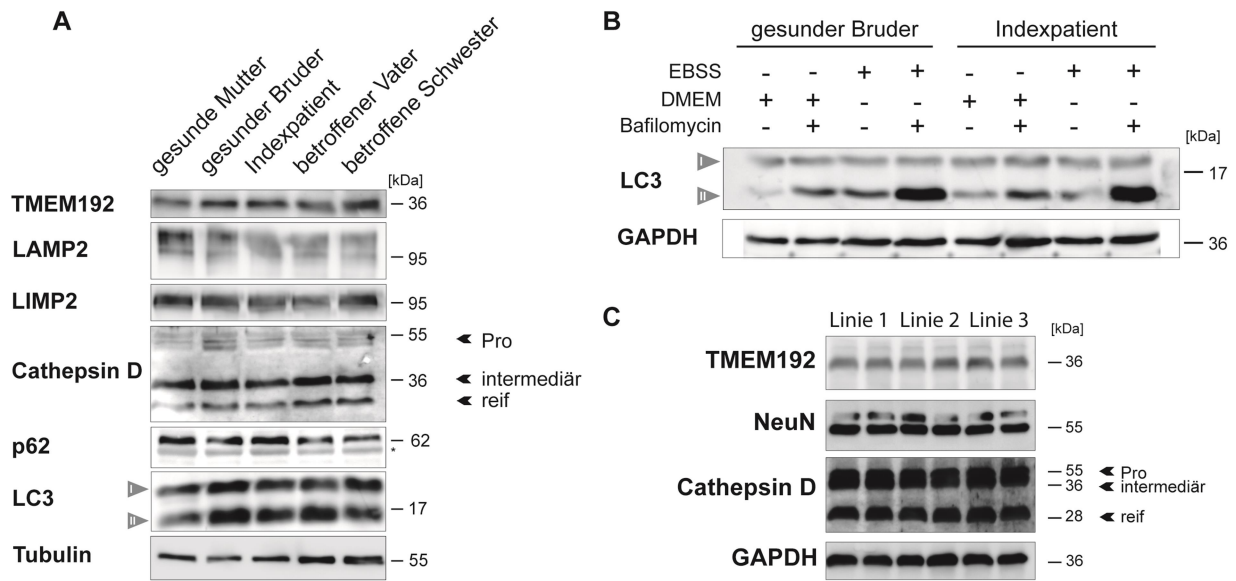


(36 kDa) und das reife Cathepsin D (25 kDa) in vergleichbarer Abundanz nachgewiesen werden. Das Maturieren des Cathepsin D findet teilweise im Lysosomen statt, sodass die Mutation die Prozedur der Protease nicht beeinflusst (Gieselmann et al. 1985).

Darüber hinaus wurde betrachtet, ob die Mutation Auswirkungen auf die Funktionen der Lysosomen hatte. Eine zentrale Aufgabe der Lysosomen ist die Regulation der Autophagie. Dafür wurden die Autophagiemarker LC3 und p62 in den nicht-stimulierten Hautfibroblasten näher betrachtet. Die Auswertung zeigte, dass im Vergleich zum Wildtyp die R39T-Mutation des TMEM192 zu keiner erhöhten Umwandlung von LC3-I zu LC3-II in den Zellen führte. Die Konversion von LC3-I zu LC3-II ist essentiell für die Initiierung der Autophagie und korreliert mit der Autophagieaktivität. Außerdem konnten vergleichbare Mengen von p62 in allen Zellreihen nachgewiesen werden (Abb. 4.4 A). Die R39T-Mutation führte nicht zur Akkumulation von p62 als Ausdruck eines gestörten Abbaus der Autophagosomen. Das Ergebnis gab somit keinen Hinweis auf einen Effekt der TMEM192-Defizienz auf die konstitutionelle Autophagie.

Um zu analysieren, ob es einen Defekt bei der induzierten Makroautophagie gibt, wurde in den Hautfibroblasten die Autophagie mit dreistündiger Aminosäuredepletion induziert. Für die Auswertung wurde das Protein LC3 mit Westernblot untersucht. Da das LC3-II nach Fusion des Autophagosomen mit dem Lysosomen durch die sauren Hydrolasen abgebaut wird und damit nicht mehr sicher nachweisbar ist, wurde der Abbau des LC3-II durch Zugabe von Bafilomycin A1, ein spezifischer Inhibitor der H<sup>+</sup>-vATPase, verhindert. Die Konversion des LC3-I in LC3-II war sowohl zum Zeitpunkt Null (Kontrolle) als auch nach einer Nahrungskarenz von drei Stunden in allen Zelllinien vergleichbar. Es zeigte sich, dass die R39T-Mutation des Proteins TMEM192 keinen aufschlaggebenden Einfluss auf die Makroautophagie hat (Abb. 4.4 B).

Da die Symptome des Indexpatienten sich hauptsächlich auf das Nervensystem beschränkten, wurden iPSC-Neurone (Linie 1–3) aus den Zellen des Indexpatienten und seiner Familienmitglieder hergestellt und aufgearbeitet. Um nachzuweisen, dass Zellen neuronal differenziert waren, wurde das Neuraminidase N (= NeuN) mittels Westernblot nachgewiesen, welches in allen Proben gleichmäßig exprimiert wurde. Auch die untersuchte lysosomale Protease Cathepsin D unterschied sich in allen drei Zelllinien weder in der Abundanz noch in den Reifestufen (Abb. 4.4 C). Schlussfolgernd, konnte auch in den iPSC-Neuronen kein Unterschied im Vergleich zu den Zellen der gesunden Familienmitglieder festgestellt werden.



**Abb. 4.4: Einfluss der R39T-Mutation auf die biochemischen Eigenschaften des Endosomen-Lysosomen-Systems**

(A) Für Westernblot-Auswertung wurden Totalzelllysate von Hautfibroblasten der betroffenen und gesunden Familienmitglieder elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Semi-Dry-Verfahren auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Detektion der lysosomalen Membranproteine LAMP2 und LIMP2, der lysosomalen Protease Cathepsin D sowie der Autophagiemarker p62 und LC3 mit polyklonalen Antikörpern. Zusätzlich diente die Detektion von TMEM192 und  $\beta$ -Tubulin als Kontrolle. (B) Die Hautfibroblasten des Indexpatienten und des gesunden Bruders wurden in EBSS für 3 h bei 37°C gehungert oder in regulärem Medium belassen. Um gleichzeitig die lysosomale Proteolyse zu verhindern, wurde 30 nM Bafilomycin, wie angegeben, hinzugefügt. Die Zelllysate wurden mittels Westernblot analysiert und die Membran mit polyklonalen Antikörpern gegen LC3 detektiert. Zur Bestätigung der gleichmäßigen Beladung der Membran wurde sie mit polyklonalen GAPDH-Antikörpern erneut gefärbt. (C) Für Westernblot-Auswertung wurden Totalzelllysate von iPSC-Neuronen der betroffenen und gesunden Familienmitglieder elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Semi-Dry-Verfahren auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Detektion des NeuN mit monoklonalen Antikörpern und der lysosomalen Protease Cathepsin D mit polyklonalen Antikörpern. Zusätzlich diente die Detektion von TMEM192 und GAPDH als Kontrolle.

## 4.2 Untersuchungen des murinen TMEM192

Das humane und murine TMEM192 weisen viele Gemeinsamkeiten auf. So zeigen bioinformatische Untersuchungen, dass das murine TMEM192 ebenfalls aus vier Transmembrandomänen besteht und beide Enden zytosolisch sind (Nguyen et al. 2017; Schröder et al. 2010a). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob das murine Ortholog des TMEM192-Proteins weitere gemeinsame Eigenschaften mit dem humanen TMEM192 teilt.

### 4.2.1 Biochemische Charakterisierung des murinen TMEM192-Proteins

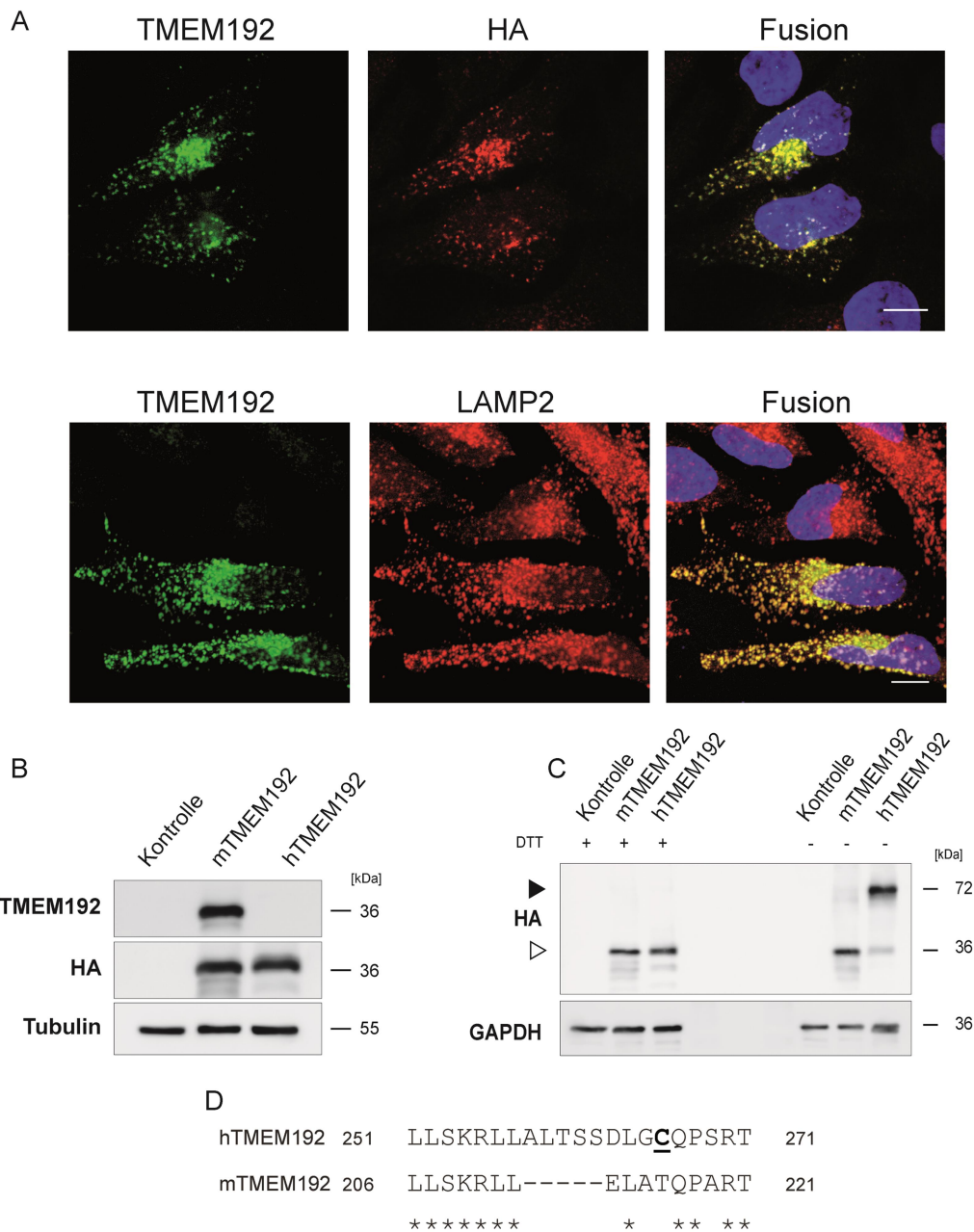
Zunächst wurde untersucht, ob die grundlegenden biochemischen Eigenschaften des murinen dem humanen TMEM192 entsprechen. Dafür wurden in HeLa-Zellen sowohl das murine als auch das humane TMEM192 überexprimiert. Außerdem wurden an diesem zellularen System die drei neu generierten Antikörper unter Überexpressionsbedingungen validiert. Die

Antikörper sind gegen ein N-terminales Epitop des murinen TMEM192 (DPLLDTQQLPHHSLQAQFRPRF) gerichtet.

Als erstes wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz das heterolog exprimierte, mit einem HA-Epitop fusionierte murine TMEM192 in HeLa-Zellen visualisiert. Die neu generierten Antikörper erkannten unter Überexpressionsbedingung in HeLa-Zellen das murine TMEM192 als ein vesikuläres Muster. Zur Verifizierung der Spezifität der neu generierten Antikörper wurden die Zellen simultan mit den Antikörpern gegen das HA-Epitop gefärbt. Eine Ko-Lokalisation bestätigte die Spezifität der neu generierten Antikörper. Um die Lokalisation des transfizierten Proteins in der Zelle einzuordnen, wurden die Zellen auch mit dem lysosomalen Marker LAMP2 gefärbt. Es wurde eine nahezu komplette Ko-Lokalisation des überexprimierten murinen Proteins mit LAMP2 beobachtet (Abb. 4.5 A).

Als weitere Gemeinsamkeiten stellten sich heraus, dass beide TMEM192-Proteine vier Transmembrandomänen besitzen und beide Enden sich auf der zytosolischen Seite befinden (Schröder et al. 2010a; Nguyen et al. 2017). Die biochemische Charakterisierung erfolgte an HeLa-Zellen, die transient das mit einem HA-Epitop fusionierten humanen oder murinen TMEM192 exprimierten, um die Funktionalität und Spezies-Spezifität der neu generierten TMEM192-Antikörper (TMEM192-Rabbit 1–3) im Westernblot zu prüfen. Die Westernblot-Analyse bewies, dass die neuen TMEM192-Antikörper nur das murine TMEM192 erkennen. Zur Bestätigung einer erfolgreichen Transfektion wurde die Membran mit den Antikörpern gegen das HA-Epitop behandelt. Bei beiden Spezies zeigte sich dann eine Proteinbande bei ca. 36 kDa (Abb. 4.5 B). In der Überexpression erkannten alle drei Antikörper das murine TMEM192 sowohl im Westernblot als auch in der Immunfluoreszenz zuverlässig ohne Kreuzreaktion mit dem humanen TMEM192.

Eine weitere Eigenschaft des humanen TMEM192 ist die Fähigkeit zur Dimerisierung (Schröder et al. 2010a). Es zeigte sich, dass bei Zugabe von DTT sowohl beim humanen als auch beim murinen TMEM192 nur die Bande auf Höhe von ca. 36 kDa nachweisbar waren. Ohne Zugabe von DTT sah man bei dem murinen TMEM192 keine zweite Bande auf Höhe von ca. 72 kDa. Diese Bande war beim humanen TMEM192 deutlich zu sehen (Abb. 4.5 C). Das Sequenz-Alignment der humanen und murinen TMEM192-Genhomologen zeigte, dass der Cysteinrest C266, welcher im humanen TMEM192 als entscheidend für die Dimerisation über Disulfidbrücken beschrieben wurde (Behnke et al. 2011), im murinen Protein nicht vorhanden ist (Abb. 4.5 D). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass das murine TMEM192 über andere chemische Verbindungen Homodimer ausbilden kann.



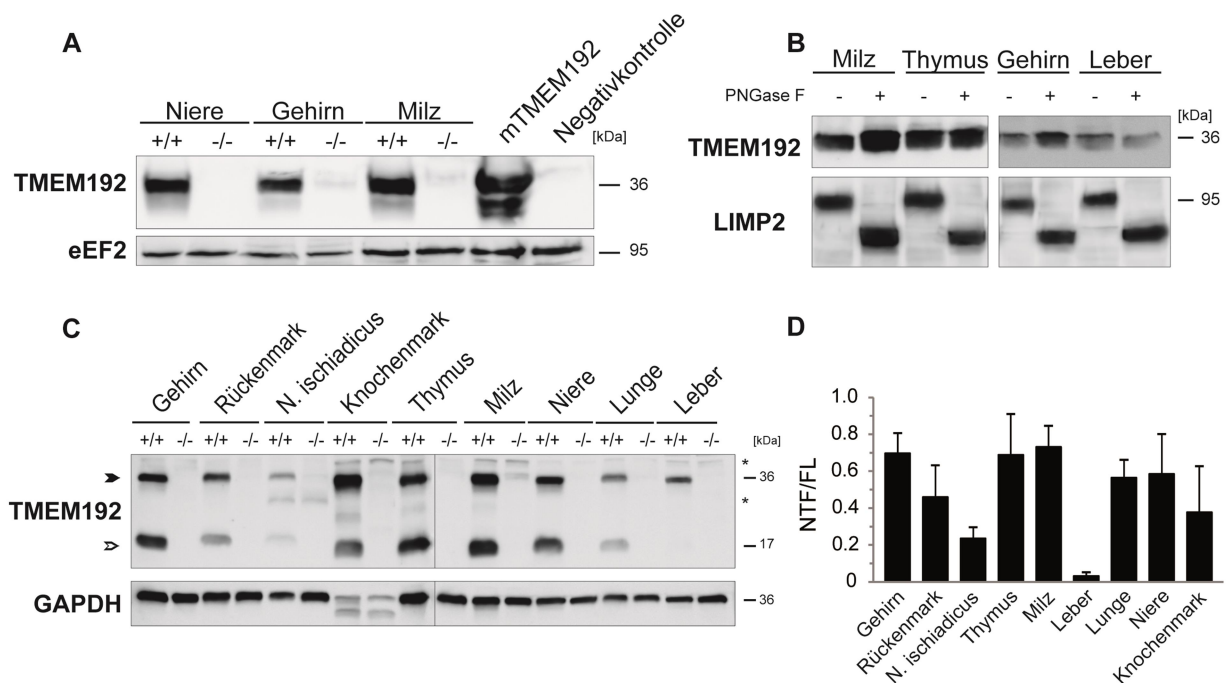
**Abb. 4.5: Eigenschaften des murinen TMEM192 unter Überexpressionsbedingungen**

HeLa-Zellen wurden transient mit einem Expressionskonstrukt für das murine TMEM192 transfiziert, welches ein HA-Epitop am C-Terminus hat. Die indirekte Immunfluoreszenz des heterolog exprimierten murinen TMEM192-Proteins erfolgte mit den polyklonalen Antikörpern gegen TMEM192 oder den monoklonalen Antikörpern gegen das HA-Epitop. Anschließend wurden die Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper für die Detektion appliziert. Maßstab 10 µm. (B) Die Westernblot-Analyse erfolgte mit den neu generierten polyklonalen Antikörpern gegen murines TMEM192 an HeLa-Zellen, die transient das mit einem HA-Epitop fusionierten humanen oder murinen TMEM192 exprimierten. Um die Proteinexpression und eine gleichmäßige Proteinauftragung zu bestätigen, wurde der Westernblot zusätzlich noch mit den Antikörpern gegen das HA-Epitop und β-Tubulin behandelt. hTMEM192: humanes TMEM192, mTMEM192: murines TMEM192 (C) Die HeLa-Zellen wurden transient mit den Expressionskonstrukten für das humane oder murine TMEM192 transfiziert. Die Lysate wurden entweder mit dem oder ohne das Reduktionsmittel DTT für 5 min bei 95°C denaturiert. TMEM192-Monomere (weiße Pfeilspitze) und Dimere (schwarze Pfeilspitze) wurden mit den monoklonalen Antikörpern gegen das HA-Epitop detektiert. Gleichmäßiges Auftragen der Proben wurde durch das erneute Färben der Membran mit Antikörpern gegen GAPDH bestätigt. (D) Sequenz-Alignment der C-Termini vom humanen (aa251–271) und murinen (aa251–266) TMEM192. Der Cysteinrest C266 (fett, unterstrichen), welches im humanen TMEM192 als entscheidend für die Dimerisation beschrieben wurde, ist im murinen Protein nicht vorhanden. \* konservierte Base.

## 4.2.2 Biochemische Charakterisierung des endogenen murinen

### TMEM192-Proteins

Als Nächstes sollten die neu generierten Antikörper für das endogene Protein validiert werden. Dafür wurden die Antikörper an den Organlysaten von Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels Westernblot getestet. Als Positivkontrolle diente das transient in HeLa-Zellen überexprimierte murine TMEM192, als Negativkontrolle HeLa-Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden. In den Wildtypmäusen sowie in der Positivkontrolle wurde auf Höhe von ca. 36 kDa eine Bande nachgewiesen, welche in TMEM192<sup>-/-</sup>-Geweben und der Negativkontrolle fehlte. Schlussfolgernd kann davon ausgegangen werden, dass die Antikörper das murine TMEM192 spezifisch identifizieren (Abb. 4.6 A).



**Abb. 4.6: Biochemische Charakterisierung des murinen TMEM192-Proteins mit dem Nachweis eines NTFs**

(A) Die Organlysaten (40 µg Protein) von Niere, Gehirn und Milz beider Genotypen wurden mit den neuen generierten Antikörpern im Westernblot untersucht. Als Positivkontrolle diente in HeLa-Zellen überexprimiertes murines TMEM192 und als Negativkontrolle HeLa-Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden. Als Ladekontrolle wurde die Membran zusätzlich mit Antikörpern gegen den eEF2-Transkriptionsfaktor behandelt. +/+ Wildtyp, -/- TMEM192-Defizienz. (B) Die Lysate der Milz, des Thymus, des Gehirns und der Leber von einer Wildtyp-Maus wurden wie angegeben mit (+) oder ohne (-) PNGase F für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion von TMEM192 erfolgte mit den polyklonalen TMEM192-Antikörpern. Die Endoglykosidase-Aktivität der PNGase F wurde durch die Detektion des lysosomalen Proteins LIMP2 mit polyklonalen Antikörpern bestätigt. (C) Je 40 µg Protein aus Organlysaten von Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen TMEM192 auf Westernblot detektiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung wurde die Membran mit monoklonalen Antikörpern gegen GAPDH behandelt. Es zeigte sich neben dem monomeren TMEM192-FL-Protein (FL, schwarze Pfeilspitze), ein N-terminales Fragment (NTF, weiße Pfeilspitze). +/+ Wildtyp. -/- TMEM192-Defizienz \*, unspezifische Bande. (D) Densitometrische Auswertung von Multitissues-Blots zur Quantifizierung der Banden des TMEM192-FL-Proteins als auch des NTFs und Errechnung der Ratio NTF/FL mit ImageJ. Die Daten wurden als Mittelwert + Standardabweichung gezeigt und basieren auf eine Analysen von n=5 Mäusen.

Bioinformatische Analysen des murinen TMEM192-Proteins identifizierten zwei potenzielle N-Glykosylierungsstellen. Um zu untersuchen, ob diese Stellen genutzt werden, wurde das murine Protein mit dem Enzym PNGase F verdaut. Das apparente Molekulargewicht des TMEM192-Proteins bei 36 kDa veränderte sich trotz PNGase F-Verdau nicht. In mehreren Organen (Milz, Thymus, Gehirn, Leber) wurde kein Einfluss gesehen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Stellen analog zum humanen Protein nicht genutzt wurden. Als Kontrolle wurde auf derselben Membran das stark glykosylierte lysosomale Protein LIMP2 untersucht, welches bei Zugabe von PNGase F eine Bande auf Höhe von ca. 70 kDa statt 95 kDa zeigte (Abb. 4.6 B). Das veränderte Laufverhalten entstand durch die enzymatische Spaltung der N-glykosylierten Zuckerreste des LIMP2 mittels PNGase F.

Darüber hinaus zeigte die Westernblot Analyse der murinen Organe, dass das Protein in allen untersuchten Organen exprimiert wurde. Die Ergebnisse demonstrierten eine ubiquitäre Expression mit hoher Expressionsrate in den immunologisch aktiven Organen wie Milz, Knochenmark und Thymus, aber auch in der Niere und im neuronalen Gewebe. Interessanterweise war zusätzlich eine weitere Proteinbande um 17 kDa in allen Geweben außer in der Leber nachweisbar, welche jedoch nicht in den TMEM192<sup>-/-</sup>-Gewebe zu finden war. Aufgrund des Fehlens in den TMEM192<sup>-/-</sup>-Proben wurden die Proteinbande dem TMEM192 zugeordnet. Die Proteinbande bei 17 kDa wurde als ein N-terminales Fragment des TMEM192 (= NTF) interpretiert, da die neu generierten Antikörper gegen ein N-terminales Epitop des murinen TMEM192 gerichtet sind. Neben der Bande um 17 kDa kam eine weitere, spezifische Bande bei ca. 21 kDa im Knochenmark, Thymus und Milz zur Darstellung. Diese nachweisbare Bande könnte man als intermediäres Produkt interpretieren (Abb. 4.6 C).

Die dargestellten Banden des TMEM192-*full length*-Proteins (= FL) als auch des NTFs wurden densitometrisch quantifiziert und das Verhältnis des NTFs zum FL errechnet und ausgewertet. Die densitometrische Auswertung der Westernblots von 5 Wildtypmäusen objektivierte die Beobachtung, dass das Verhältnis zwischen dem FL und NTF vom Organ zu Organ unterschiedlich ist. Das Ergebnis zeigte, dass im Gehirn, im Thymus und in der Milz das NTF am meisten generiert wurde. Sie machten ca. 70% im Vergleich zur Gesamtmenge von dem TMEM192 aus. Danach folgten mit ca. 60% die Nieren und die Lunge (Abb. 4.6 D). Es konnte gezeigt werden, dass das ubiquitär exprimierte TMEM192 Substrat eines proteolytischen Prozesses ist, welches organspezifisch abläuft und zur Generierung eines NTFs führt.

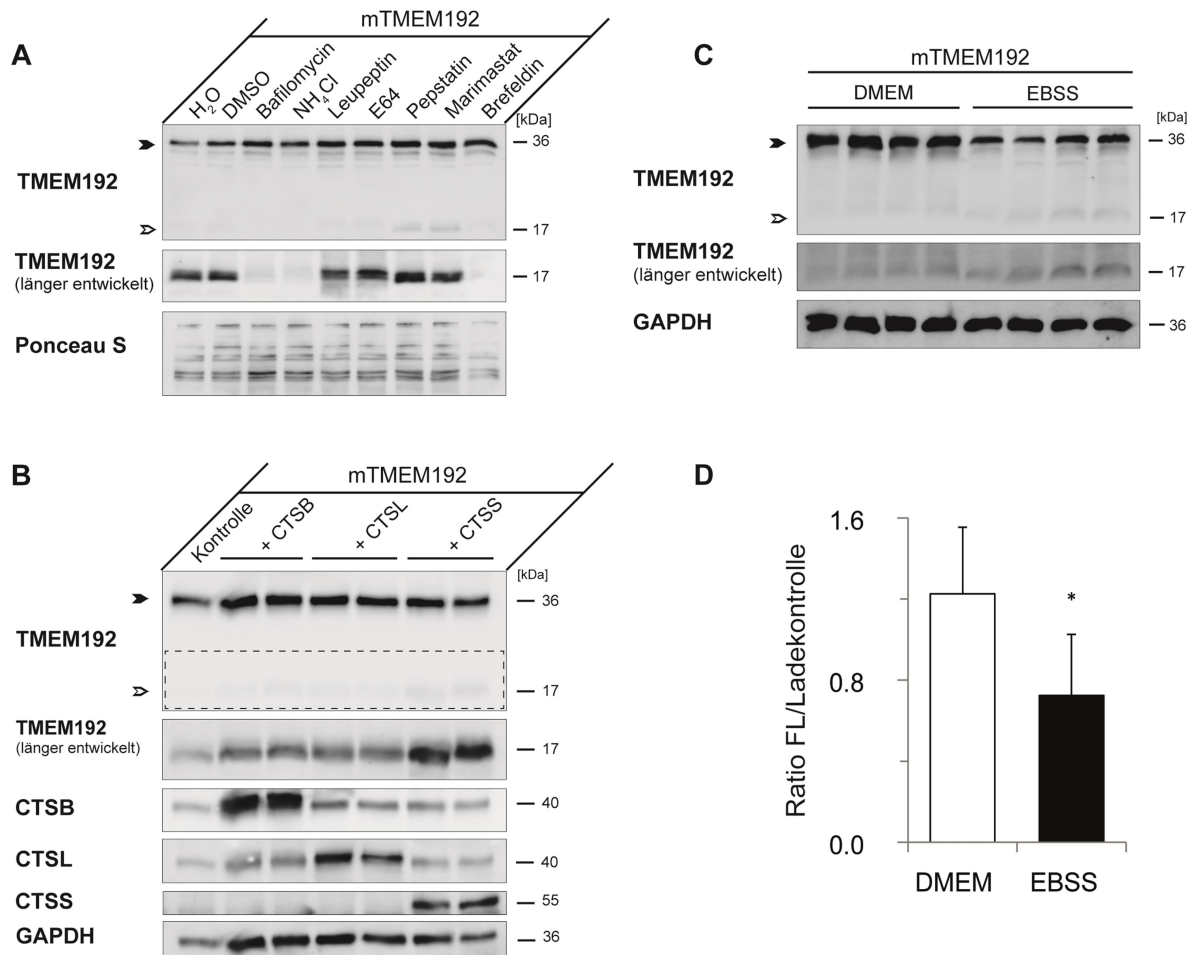
### 4.2.3 Analysen zur Generierung des NTFs

Die Entstehung des NTFs wurde näher untersucht. Um die Fragestellung zu adressieren, welche Protease das Fragment generiert, wurde zunächst das murine TMEM192 unter Überexpressionsbedingungen in HeLa-Zellen untersucht. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit den angegebenen Inhibitoren des lysosomalen Apparats (Tab 3.1) behandelt. Die Westernblot-Auswertung ergab, dass das NTF signifikant supprimiert wurde, wenn das Ansäuern der Lysosomen aufgehoben (Bafilomycin A1,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) oder der Transport zum Lysosomen blockiert wurde (Brefeldin A). Die Inhibition von Serin- und Cystein-Proteasen (Leupeptin, E64) zeigte, dass weniger NTF nachzuweisen ist, aber der Effekt war geringer als mit den oben genannten Inhibitoren. Eine Blockade von Metalloproteasen (Marimastat) oder Aspartat-Proteasen (Pepstatin A) hatte kaum Effekt auf die Menge des entstandenen NTF im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.7 A).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese formuliert, dass bei einer Überexpression einzelner Cysteinproteasen wie der Cathepsine es zu einer vermehrten Generierung des NTFs kommen sollte. Um den möglichen Effekt der überexprimierten lysosomalen Hydrolasen auf das Generieren des NTFs zu untersuchen, wurden in HeLa-Zellen das murine TMEM192 und Cystein-Proteasen (Cathepsin B, Cathepsin L, Cathepsin S) ko-transfiziert. Die Ko-Transfektion mit dem Enzym Cathepsin S zeigte, dass mehr NTF im Westernblot nachweisbar war. Wurde jedoch Cathepsin B oder Cathepsin L mit dem murinen TMEM192 ko-exprimiert, so führte dies zu keiner signifikant erhöhten Bildung des NTFs (Abb. 4.7 B). Dieses Ergebnis spricht für eine mögliche Beteiligung von Cathepsin S an dem Generieren des NTFs. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diesen Befund zu bestätigen.

Zur weiteren Charakterisierung des NTFs ist eine Beobachtung nach Induktion der Makroautophagie erwähnenswert. Das murine TMEM192-Expressionskonstrukt wurde in HeLa-Zellen transfiziert. Anschließend wurde in den HeLa-Zellen die Makroautophagie durch Aminosäuredepletion für 3 h induziert. Zur Verifizierung der erfolgreichen Transfektion wurde die Membran neben den Antikörpern gegen den Autophagiemarker LC3 auch mit den polyklonalen Antikörpern gegen das murine TMEM192 behandelt. Durch die Induktion der Makroautophagie nahm die Abundanz des LC3-I ab und es konnte vermehrt das konvertierte LC3-II, vor allem bei Zugabe von Bafilomycin A1, nachgewiesen werden. Es zeigte sich außerdem, dass durch die Aminosäuren-Depletion das TMEM192-Protein deutlich abnahm. Anschließend an diese Beobachtung wurden in mehreren unabhängigen Ansätzen HeLa-Zellen mit dem murinen TMEM192 transfiziert und danach für drei Stunden in

aminosäurefreiem Medium gehungert. Durch die Aminosäuredepletion wurde TMEM192 signifikant geringer nachgewiesen (Abb. 4.7 C, D). Aufgrund der schlechten Detektierbarkeit des NTFs unter Überexpressionsbedingungen konnte mit diesem Versuchsansatz keine Aussage über das Verhalten des NTFs unter Aminosäuredepletion getroffen werden. Weitere Untersuchungen an dem endogenen TMEM192 könnten mehr Informationen für diese beobachtete Eigenschaft liefern.



**Abb. 4.7: Analyse des neu entdeckten N-terminalen Fragments (NTF) des TMEM192**

(A) HeLa-Zellen wurden transient mit dem Expressionskonstrukt für das murine TMEM192 transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen mit den angegebenen lysosomalen Inhibitoren oder mit H<sub>2</sub>O bzw. mit DMSO als Negativkontrolle über Nacht behandelt. Für die Westernblot-Auswertung wurde die Membran mit den TMEM192-Antikörpern inkubiert. Wegen der geringen Bildung des NTFs unter Überexpressionsbedingungen musste die Membran länger entwickelt werden. Gleichmäßiges Auftragen wurde durch die anschließende Detektion der Membran von GAPDH bestätigt. (B) Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen transient mit dem Expressionskonstrukt für das murine TMEM192 und entweder mit Expressionskonstrukt für Cathepsin B (CTSB), Cathepsin L (CTSL) oder Cathepsin S (CTSS) ko-transfiziert. Die Membran wurde mit den polyklonalen TMEM192-Antikörpern behandelt. Als Nachweis einer erfolgreichen Transfektion wurde die Membran zusätzlich mit den Antikörpern gegen CTSB, CTSL und CTSS inkubiert. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde mit dem Nachweis von GAPDH belegt. (C) Nach Transfektion der HeLa-Zellen mit murinem TMEM192 am Vortag erfolgte eine dreistündige Inkubation in EBSS oder als Kontrolle in DMEM. Eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Proben wurde mit dem Nachweis von GAPDH bestätigt. (D) Dargestellt ist die densitometrische Auswertung mit ImageJ. Die Ratio TMEM192-FL/Ladekontrolle ist als Mittelwert + Standardabweichung gezeigt und basiert auf Analysen von n=5 unabhängige Untersuchungen. \* statistisch signifikant. p-Wert-Kalkulation mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test. p=0,036.

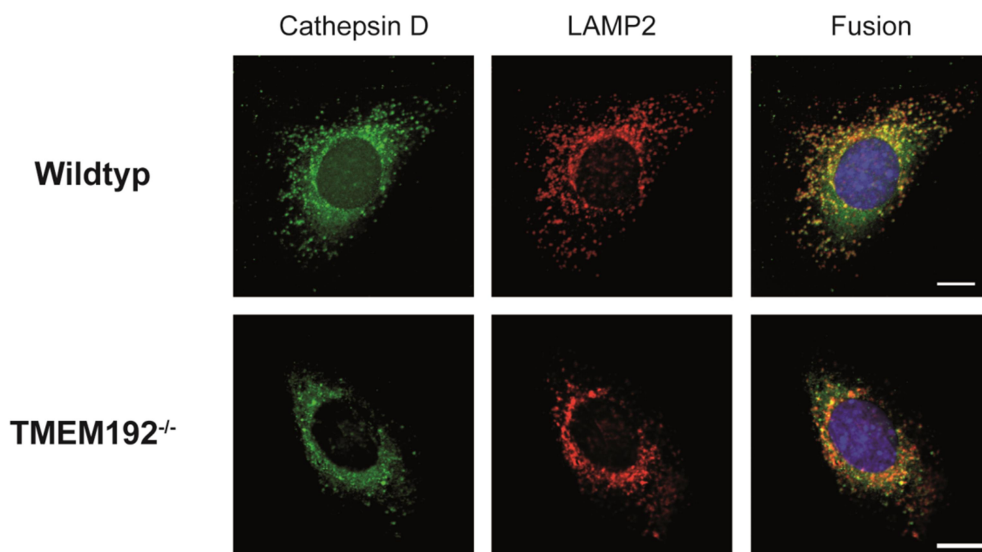


### 4.3 Die Charakterisierung von TMEM192-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (= MEF)

Es soll auf zellulärer Ebene untersucht werden, welchen Einfluss eine TMEM192-Defizienz auf das Endosomen-Lysosomen-System hat. Um eine konstitutive Deletion von TMEM192 zellbiologisch untersuchen zu können, wurden aus den Embryonen der TMEM192-Mauszucht MEF hergestellt und kultiviert. Für die Experimente standen drei primären MEF-Linien pro Genotyp zur Verfügung.

#### 4.3.1 Darstellung der Morphologie des Endosomen-Lysosomen-Systems

Um herauszufinden, ob die Deletion des TMEM192 morphologische Auswirkung auf das Endosomen-Lysosomen-System hat, wurden die primären MEF mit PFA fixiert und anschließend mit Antikörpern gegen das lysosomale Enzym Cathepsin D sowie das lysosomalen Membranprotein LAMP2 inkubiert. Das Cathepsin D zeigte eine vesikuläre Verteilung, welche zum großen Teil mit LAMP2 ko-lokalisiert. Die lysosomale Größe und Verteilung waren mit der Kontrolle vergleichbar (Abb. 4.8).



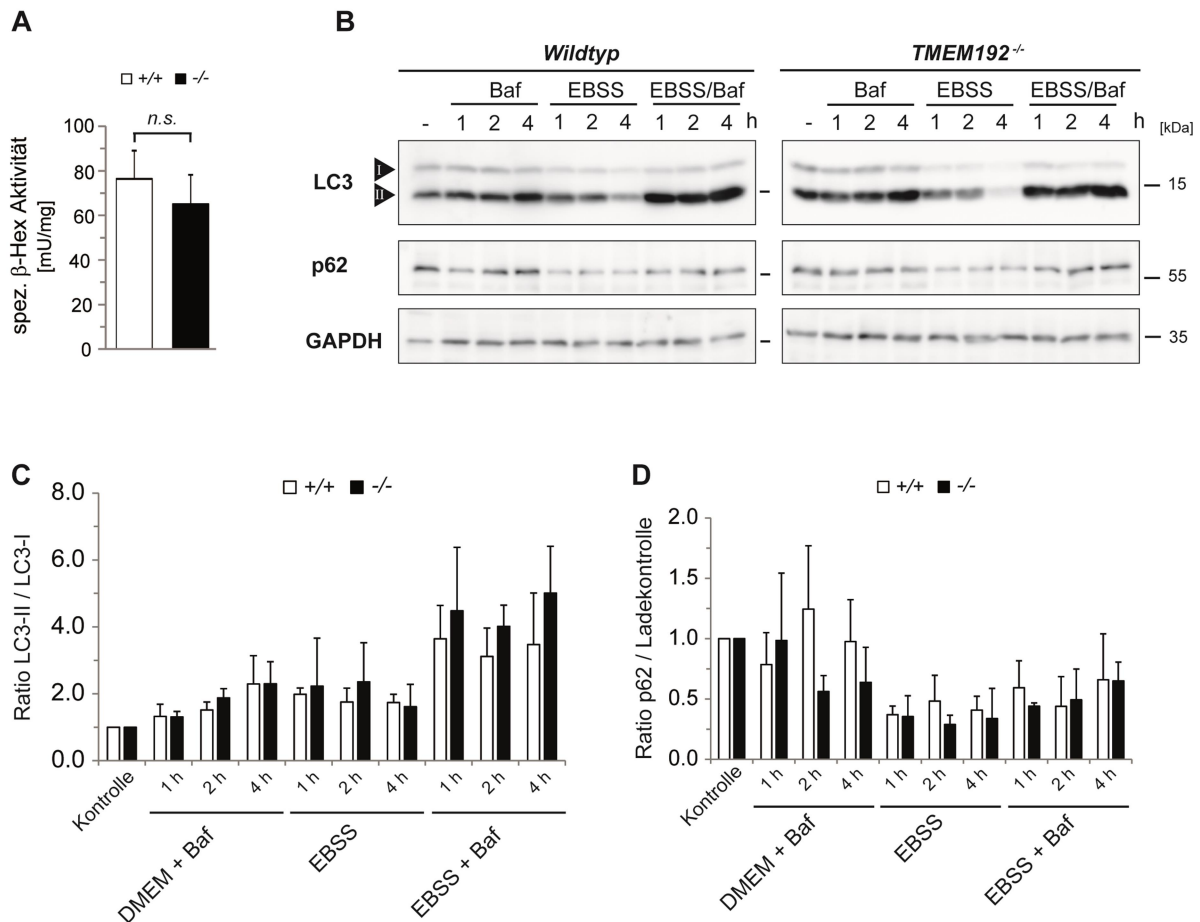
**Abb. 4.8: Darstellung der Morphologie von Lysosomen in TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF**

In Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF wurden die luminal Protease Cathepsin D und das lysosomale Membranprotein LAMP2 mithilfe von spezifischen Antikörpern und Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz visualisiert. Maßstab 10 µm.

### 4.3.2 Auswirkung der TMEM192-Defizienz auf die Funktion des lysosomalen Systems in MEF

Als frühes Anzeichen einer lysosomalen Speicherung kommt es zu einer Zunahme lysosomaler Matrixproteine wie die  $\beta$ -Hexosaminidase (Wendeler & Sandhoff 2009). In der Immunfluoreszenz wurden keine augenscheinlichen Veränderungen des lysosomalen Systems gesehen, sodass im nächsten Schritt die spektrophotometrische Messung der lysosomalen sauren Hydrolase  $\beta$ -Hexosaminidase in Totalzelllysaten von TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF und ihre Wildtyp-MEF (Kontrolle) durchgeführt wurde. In den Wildtyp-MEF wurde eine mittlere spezifische Enzymaktivität von 75 mU/mg und in den TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF ein Mittelwert von 65 mU/mg gemessen. Die Standardabweichung betrug bei beiden ca. 13 mU/mg. Es ergaben sich keine Hinweise darauf, dass das TMEM192-Defizit zu einer erhöhten lysosomalen Enzymaktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase führen würde (Abb. 4.9 A).

Anschließend wurde die mögliche Rolle des TMEM192 bei der Regulation der Makroautophagie untersucht. Durch Aminosäuredepletion wurde in den MEF die Makroautophagie induziert und der Versuch mittels Westernblots ausgewertet. Um einen differenzierteren Einblick in den komplexen Vorgang der Autophagie zu erhalten, wurde die Autophagie-Aktivität nach 1 h, 2 h und 4 h gemessen. Als Autophagiemarker wurden sowohl LC3 als auch p62 genutzt. Auf den Westernblots sah man, dass LC3-I durch die Induktion der Autophagie mit zunehmender Zeit geringer wurde und LC3-II, besser beurteilbar bei der Zugabe des lysosomalen Inhibitors Bafilomycin (Baf), mit der Zeit zunahm. Wegen des Abbaus wurde p62 ebenfalls geringer durch die Autophagie-Induktion, sodass durch Hinzufügen von Bafilomycin der Effekt abgeschwächt wurde. Diese Veränderungen wurden in beiden Genotypen in vergleichbarem Ausmaß beobachtet (Abb. 4.9 B). Zur Quantifizierung folgte eine densitometrische Auswertung der Westernblots, welche die Konversion des LC3-I zu LC3-II und den Abbau von p62 aus drei unabhängigen Wiederholungen zeigten. Das Ergebnis wurde als normierte Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Zwischen den Wildtyp- und den TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF zeigte sich weder in der Inkubation im Nährmedium (Kontrolle) noch unter Aminosäuredepletion einen Unterschied (Abb. 4.9 B–D). Diese Ergebnisse zeigten, dass die TMEM192-Defizienz in den MEF zu keiner messbaren Vergrößerung der Lysosomen führt. Überdies demonstrierten die Ergebnisse, dass es zu keinem signifikanten Einfluss auf die Makroautophagie kommt bzw. diese im Falle einer TMEM192-Defizienz über alternative Signalwege kompensiert werden kann.



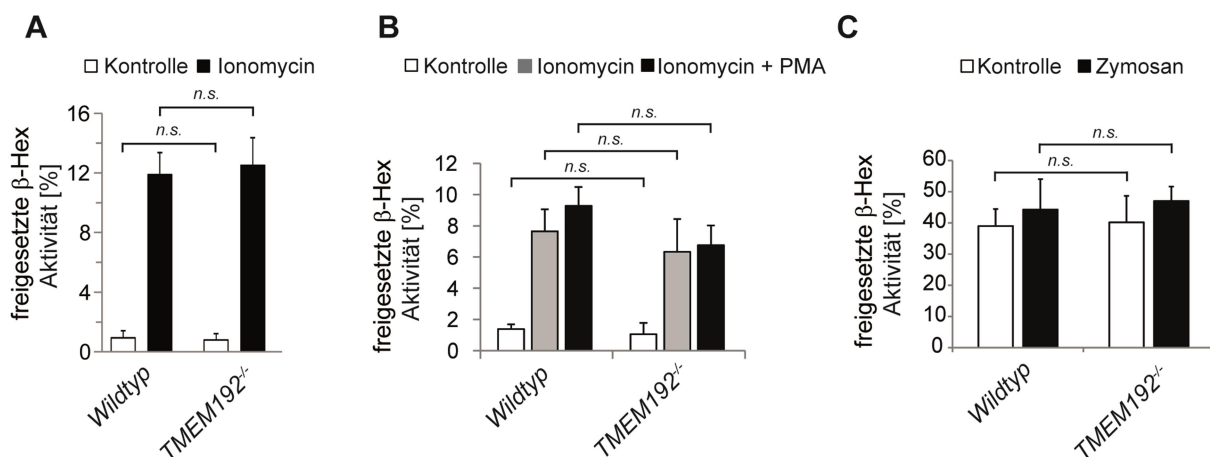
**Abb. 4.9: Funktionsanalysen von neu generierten TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF**

(A) Die Berechnung der spezifischen  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität der Totallysate von Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF basierte auf die spektrophotometrisch gemessenen Enzymaktivität und Division durch die jeweilige Proteinkonzentration. Die Ergebnisse entstammten aus n=3 unabhängigen Zelllinien pro Genotyp und werden als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. n.s. nicht signifikant. p-Wert-Kalkulation mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test. (B) Die Wildtyp- und die TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF wurden für 1, 2 und 4 h in EBSS gehungert oder in DMEM belassen. Um die lysosomale Proteolyse zu inhibieren, wurde Bafilomycin A1 (Baf), wie oben indiziert, dem Versuchsansatz hinzugefügt. Die Totallysate wurden mittels Westernblot analysiert, indem die Membran mit polyklonalen Antikorpere gegen LC3 und p62 detektiert wurde. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit monoklonalen GAPDH-Antikorpere erneut detektiert. Die densitometrische Quantifizierung der in (B) beschriebenen Westernblots wurde als Diagramm dargestellt. (C) Die LC3-II/I Ratio wurden bestimmt und auf den Wert der Kontrolle (reguläres Medium ohne Zugabe von Bafilomycin) des jeweiligen Genotyps innerhalb jedes Experiments normalisiert. (D) Die densitometrische Messwerte von p62 wurden auf die GAPDH-Menge der jeweiligen Probe als Ratio p62/GAPDH bezogen. Auch diese Werte wurden wie für die Ratio LC3-II/I auf den Wert der Kontrolle normalisiert. Bei allen Werten handelt es sich um Mittelwerte + Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten.

### 4.3.3 Einfluss der TMEM192-Defizienz auf die lysosomale Exozytose

Aus nicht veröffentlichten *Pull down*-Experimenten in Kooperation mit Dr. S. Jäger (Gladstone Institutes, University of California, San Francisco) ging hervor, dass TMEM192 möglicherweise mit den SNARE-Proteinen *Syntaxin 4* und *Syntaxin-binding Protein 3* interagiert. Für die Experimente wurde ein Konstrukt aus dreifach an FLAG®-gekoppeltem TMEM192 transient in HEK-Zellen überexprimiert. Nach Zugabe von potenziellen

Interaktionspartnern wurden die Experimente mit dem Massenspektrometer ausgewertet. Syntaxin 4 gehört zu den t-SNAREs und ist an vielen exozytotischen Prozessen beteiligt (Paumet et al. 2000). Arbeiten von Perrotta et al. berichten über seine Rolle bei der Aktivierung der sauren Sphingomyelinase. Das Enzym ist essentiell für den Sphingolipidmetabolismus und nimmt eine Schlüsselposition bei der Apoptose, der Immunität, der Zelldifferenzierung und der Tumorgenese sowie dem Ansprechen auf Chemotherapeutika ein (Perrotta et al. 2010; Perrotta et al. 2018). Darüber hinaus ist Syntaxin 4 am Membranrecycling für die exozytotischen Granula von zytotoxischen T-Zellen beteiligt (Spessott et al. 2017). Die spezifische Rolle des Syntaxin-binding Protein 3 ist nicht sicher geklärt. Man vermutet, dass es mit Syntaxin 4 und VAMP2 eine wichtige Rolle in der Exozytose des Glukosetransporters 4 (= GLUT4) spielt (Kioumourtzoglou et al. 2014). Die MEF und die aus den Stammzellen des Knochenmarks hergestellten Makrophagen wurden in dieser Arbeit genutzt, um eine mögliche funktionelle Interaktion von TMEM192 mit den SNARE-Proteinen Syntaxin 4 und Syntaxin-binding Protein 3 zu untersuchen. Dafür wurden nach Zugabe von Ionomycin oder Zymosan die Effizienz der lysosomalen Exozytose in den Zellen durch die Messung der freigesetzten lysosomalen  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität objektiviert.



**Abb. 4.10: Einfluss der TMEM192-Defizienz auf die lysosomalen Exozytose**

(A) Zur Induktion der lysosomalen Exozytose wurden die Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF mit 10  $\mu$ M Ionomycin oder einem äquivalenten Volumen von DMSO in serumfreien DMEM für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase wurde sowohl im Überstand als auch in den Zelllysaten gemessen. Der Anteil (%) des freigesetzten Enzyms wurde im Verhältnis mit der Gesamtaktivität des Enzyms (Überstand + Lysat) für jede Probe berechnet und als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. n=3, n.s. nicht signifikant, Berechnung des p-Werts durch ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test. Induktion der lysosomalen Exozytose in aus Knochenmark differenzierten Makrophagen durch entweder (B) 10  $\mu$ M Ionomycin oder 10  $\mu$ M Ionomycin + 50 nM PMA für 10 min (n=6) oder (C) 100  $\mu$ g/ml Zymosan für 1 h (n=3). Die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase wurde spektrophotometrisch in dem Überstand als auch in den Zelllysaten gemessen. Der Anteil (%) des freigesetzten Enzyms wurde in Relation mit der Gesamtaktivität des Enzyms (Überstand + Lysat) für jede Probe kalkuliert und als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Berechnung des p-Werts mittels ungepaarem, zweiseitigem Student's t-Test. n.s.: nicht signifikant.

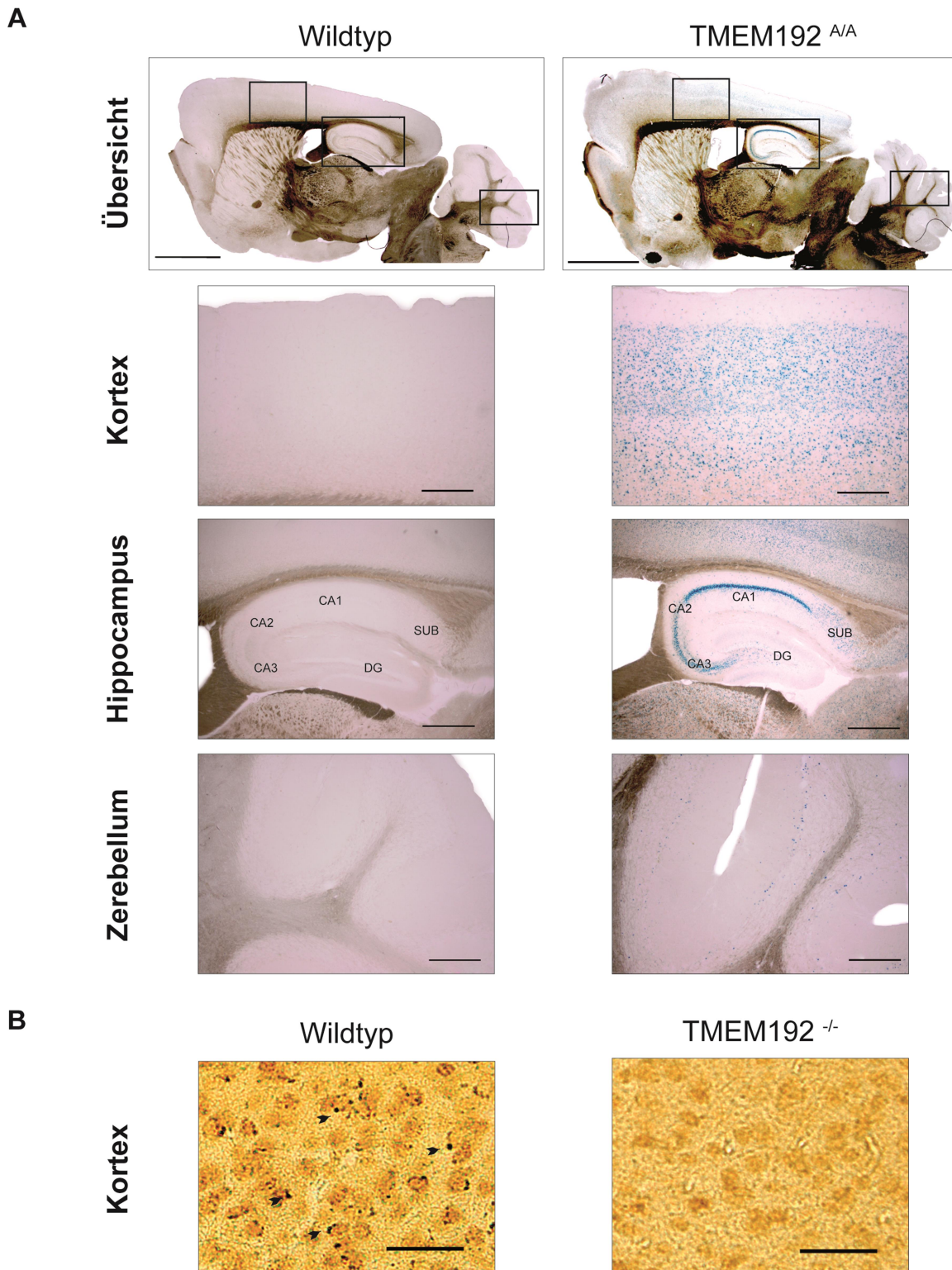
Die lysosomale Exozytose wurde in den MEF mithilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin induziert. Ohne Zugabe von Ionomycin betrug der Anteil der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität im Überstand ca. 1–2% bei beiden Genotypen. Nach zehnminütiger Induktion stieg die Enzymaktivität im Überstand auf 12–13% unabhängig vom Genotyp (Abb. 4.10 A).

Die aus dem Knochenmark generierten Makrophagen wurden für zehn Minuten entweder mit dem Ionomycin und dem Phorbolster PMA oder nur mit Ionomycin stimuliert. Durch die Behandlungen kam es zu einer Erhöhung des Anteils der freigesetzten Enzymaktivität um ca. 6 Prozentpunkte (von 2% auf ca. 8%) unabhängig vom Genotyp. Durch die Zugabe von PMA konnte in beiden Genotypen eine zusätzliche Erhöhung um ca. 1–2 Prozentpunkte erreicht werden (Abb. 4.10 B). Für den zweiten Ansatz wurden die Makrophagen eine Stunde lang mit Zymosan stimuliert. Die spektrometrischen Auswertungen zeigten, dass durch die Zugabe von Zymosan der Anteil der freigesetzten Enzymaktivität um ca. 4–7 Prozentpunkte auf knapp 50% stieg. In der Kontrolle lag die Aktivität bei ca. 40%, welches am ehesten durch die längere Inkubationszeit (1 h) im Gegensatz zum Ionomycin-Versuch (10 min) zustande kam. Dieser Anstieg war ebenfalls unabhängig vom Genotyp (Abb. 4.10 C).

Anhand dieser Ergebnisse konnte kein nachweisbarer Einfluss einer TMEM192-Defizienz auf die Calcium-vermittelte lysosomale Exozytose in murinen embryonalen Fibroblasten und aus Knochenmark differenzierte Makrophagen festgestellt werden.

#### **4.4 Untersuchung der TMEM192-defizienten Mauslinie**

Nach den Analysen im zellulären System soll die Auswirkung einer TMEM192-Defizienz auf einen komplexen Organismus im Mausmodell überprüft werden. Durch eine umfassende phänotypische Charakterisierung von TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen soll die physiologische Funktion dieses Proteins näher definiert werden. Zunächst wurde mit mikroskopischen Methoden untersucht, in welchen Geweben und Zellen das murine TMEM192 exprimiert wird. Das wurde durch den enzymatischen Nachweis des unter dem endogenen TMEM192-Promoter stehenden  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens dargestellt (Abb. 3.4). Für diesen Versuch wurden Tiere verwendet, die das *tmla*-Allel homozygot in sich trugen (TMEM192<sup>A/A</sup>-Mäusen). In den Kryogewebeschnitten von perfusionsfixierten Gehirnen stellte sich das TMEM192 in der X-Gal-Färbung im gesamten murinen Gehirn exprimiert dar. Die X-Gal-Färbung des Kortex zeigte eine ausgeprägte Zonierung, die der Nissl-Färbung entsprach, sodass eine vorwiegende Expression in den neuronalen Zellen angenommen wird. Des Weiteren suggerierte die Färbung eine hohe Expressionsrate im Hippocampus.



**Abb. 4.11: Expressionsmuster des murinen TMEM192**

(A) 35 µm dicke Gehirnschnitte von Wildtyp- und TMEM192<sup>A/A</sup>-Mäusen wurden der X-Gal-Färbung zum indirekten Nachweis des TMEM192-Expressionsmusters zugeführt. Prominente Darstellung des Hippocampus mit markantem Unterschied zwischen den einzelnen Zonen (CA1–3). Maßstab 2000 µm Übersicht; Maßstab 200 µm Kortex; Maßstab 500 µm Hippocampus; Maßstab 200 µm Zerebellum. SUB: Subiculum, CA1–3: Cornu ammonis 1–3, DG: Gyrus dentatus. (B) Der Nachweis von endogenem TMEM192 an Kryogewebeschnitten von perfusionsfixierten Gehirnen (4% PFA) erfolgte mit der immunhistochemischen DAB-Färbung in Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die TMEM192-positiven vesikulären Strukturen der Hirnrinde sind mit Pfeilspitzen markiert. Maßstab 250 µm.

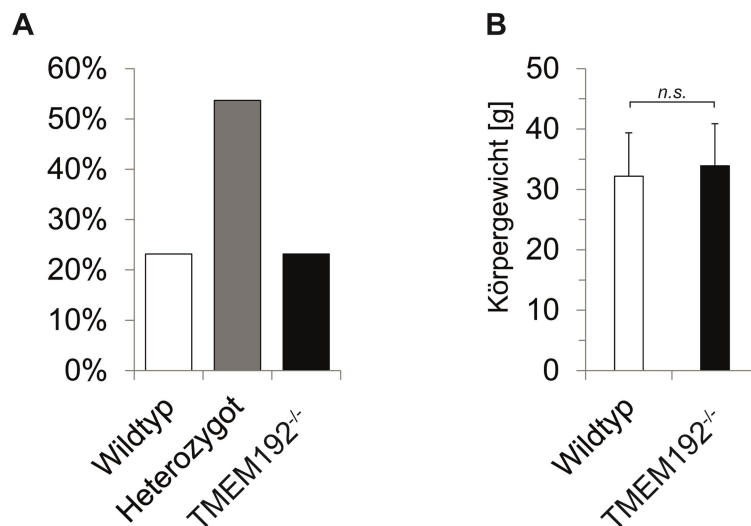
Hier konnten unterschiedliche Expressionsraten in den einzelnen Zonen feststellen werden, die höchste Dichte im Cornu ammonis 1 (= CA1), die geringste im Gyrus dentatus (= GD). Im Kleinhirn zeigten sich vereinzelt angefärbte Zellen, die am ehesten die Purkinje-Zellen darstellten (Abb. 4.11 A). Mit dieser Methode wurden auch andere murine Organe untersucht. In den anderen Organschnitten wurde eine ausgeprägte Färbung auch in den Kontrollgeweben gesehen, sodass eine aussagekräftige Analyse nicht möglich war.

Basierend auf den Ergebnissen des X-Gal-Versuchs wurde das Protein immunhistochemisch mit den neu generierten Antikörpern dargestellt. Für diese Untersuchungen wurden als Kontrolle TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse genutzt. In der Immunhistochemie sah man in den Gehirnschnitten vesikuläre Strukturen nahe dem Nukleus; diese Granula fehlten in den TMEM192<sup>-/-</sup>-Gehirnschnitten. Der Nachweis des TMEM192-Proteins war in der grauen Substanz ausgeprägter als in der weißen Substanz des Gehirns. Die positiven Zellen verfügten über einen großen Nukleus und ein nicht abgrenzbares Zytoplasma, sodass auch hier die Hypothese einer neuronalen Verteilung gestellt wurde. Die Zonierung, welche in der X-Gal-Färbung beobachten wurde, konnte in der Immunhistochemie nicht nachvollzogen werden, auch imponierte der Hippocampus nicht wie in der X-Gal-Färbung (Abb. 4.11 B). Aufgrund der technischen Schwierigkeiten mit hoher Hintergrundfärbung in den Kontrollschnitten war nur das endogene Verteilungsmuster im Gehirn untersuchbar. Die Ergebnisse aus beiden Untersuchungen legen eine vornehmliche Expression in den Neuronen nahe.

#### **4.4.1 Phänotypische Untersuchungen an TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse**

Zwei Mäusekohorten wurden biochemisch untersucht und mit merkmals- und alterskorrelierten Wildtypmäusen verglichen. Die Vererbung des *tml1d*-Allels folgt bei heterozygoten Verpaarung der Mendel'schen Verteilung. Die TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im Vergleich zu den geschlechts- und alterskorrelierten Kontrollmäusen sowohl im jungen Alter von elf bis achtzehn Wochen (Kohorte I) als auch mit einem Alter von 52 bis 55 Wochen (Kohorte II) keinen offensichtlichen Phänotyp. Sie unterschieden sich weder durch äußere Merkmale noch durch das Körpergewicht von den Kontrollmäusen (Abb. 4.12 A und B).

Auf der Basis einer einfachen Beobachtung waren der Aufmerksamkeits- und Aktivitätsgrad, das Gangbild und die Muskelkraft der beiden Mäusekohorten vergleichbar. Daran schloss sich die detaillierte biochemische und histologische Untersuchung der neu generierten TMEM192<sup>-/-</sup>-Maus an.



**Abb. 4.12: Phänotypische Untersuchungen an TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen**

(A) Grafische Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Genotypen bei Verpaarung heterozygoten tm1d-Allel-Elterntieren. Auswertung von 203 Mäusen mit einer Multiplex-PCR (3.1.4). (B) Grafische Darstellung des durchschnittlichen Gewichts von je 22 untersuchten Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen.

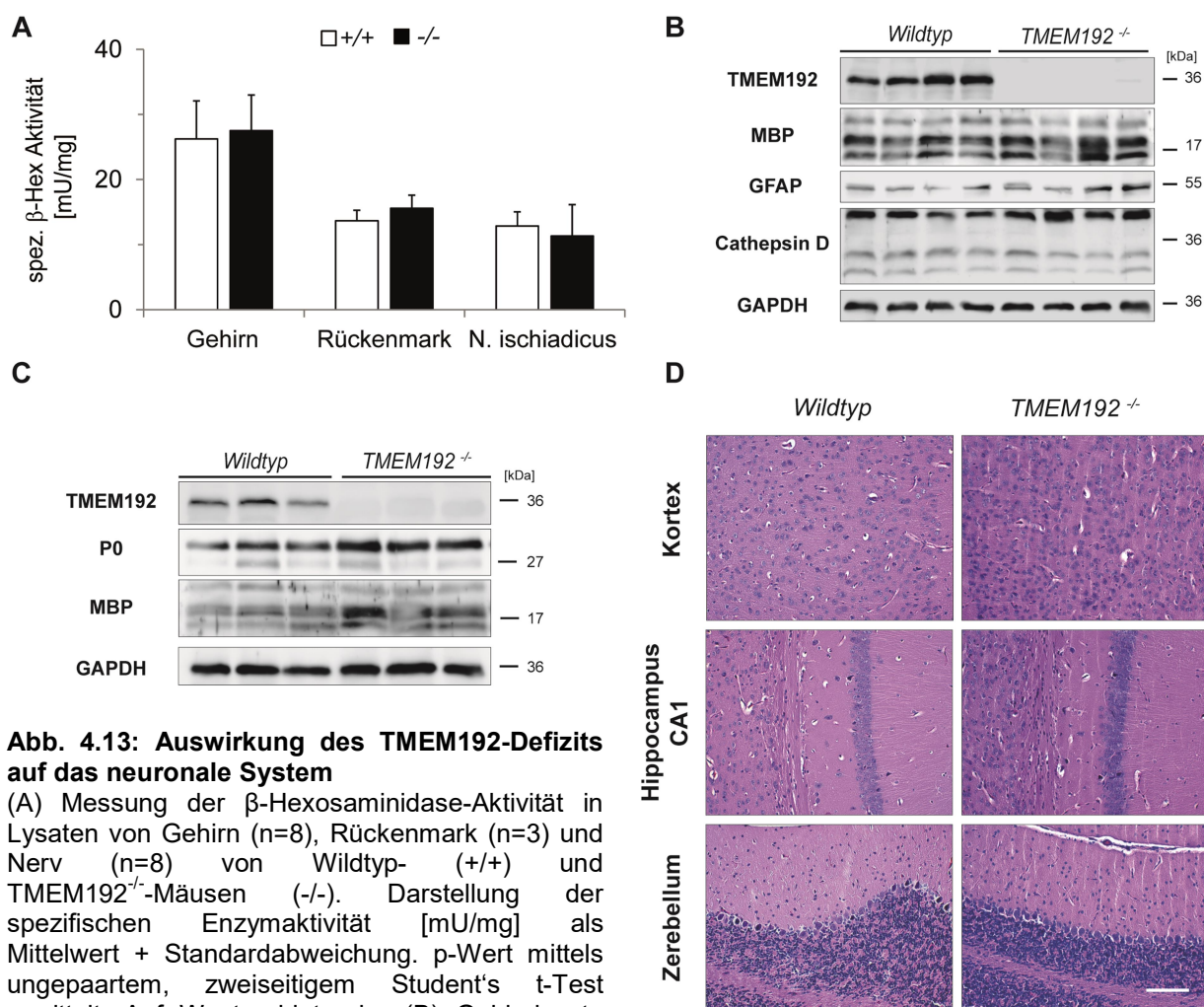
#### 4.4.2 Untersuchungen des Nervensystems von TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen

Untersucht wurden das Gehirn, das Rückenmark und der Nervus ischiadicus, stellvertretend für das periphere Nervensystem. Außer dem Gehirn, das darüber hinaus histologisch und immunhistochemisch analysiert wurde, wurden die anderen Organe nur biochemisch aufgearbeitet. Das Rückenmark als Teil des zentralen Nervensystems wurde nur für die Quantifizierung der Lysosomen mittels der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivitätsmessung genutzt.

Die Auswertung der spezifischen  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität zeigte, dass im Gehirn mit einem Mittelwert von ca. 25 mU/mg die höchste  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität des neuronalen Systems zu finden ist. Die Aktivität im Rückenmark und in den peripheren Nerven lagen beide ungefähr bei 12 mU/mg. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Das Ergebnis macht eine lysosomale Akkumulation im neuronalen Gewebe unwahrscheinlich (Abb. 4.13 A).

Westernblot Analysen von Gehirnlysaten auf Myelinproteine (MBP und P0), Gliazell-spezifisches Protein (GFAP) sowie lysosomale Markerproteine (Cathepsin D) wiesen eine vergleichbare Abundanz wie im Wildtyp auf (Abb. 4.13 B). In der biochemischen Untersuchung des N. ischiadicus wies das ubiquitär vorkommende Myelinprotein MBP eine ähnliche Abundanz auf wie im Wildtyp, das periphere Myelinprotein P0 schien dagegen diskret vermehrt (Abb. 4.13 C). Die Vermehrung des P0 war in der densitometrischen Quantifizierung der Westernblots nicht statistisch signifikant (Daten nicht gezeigt).





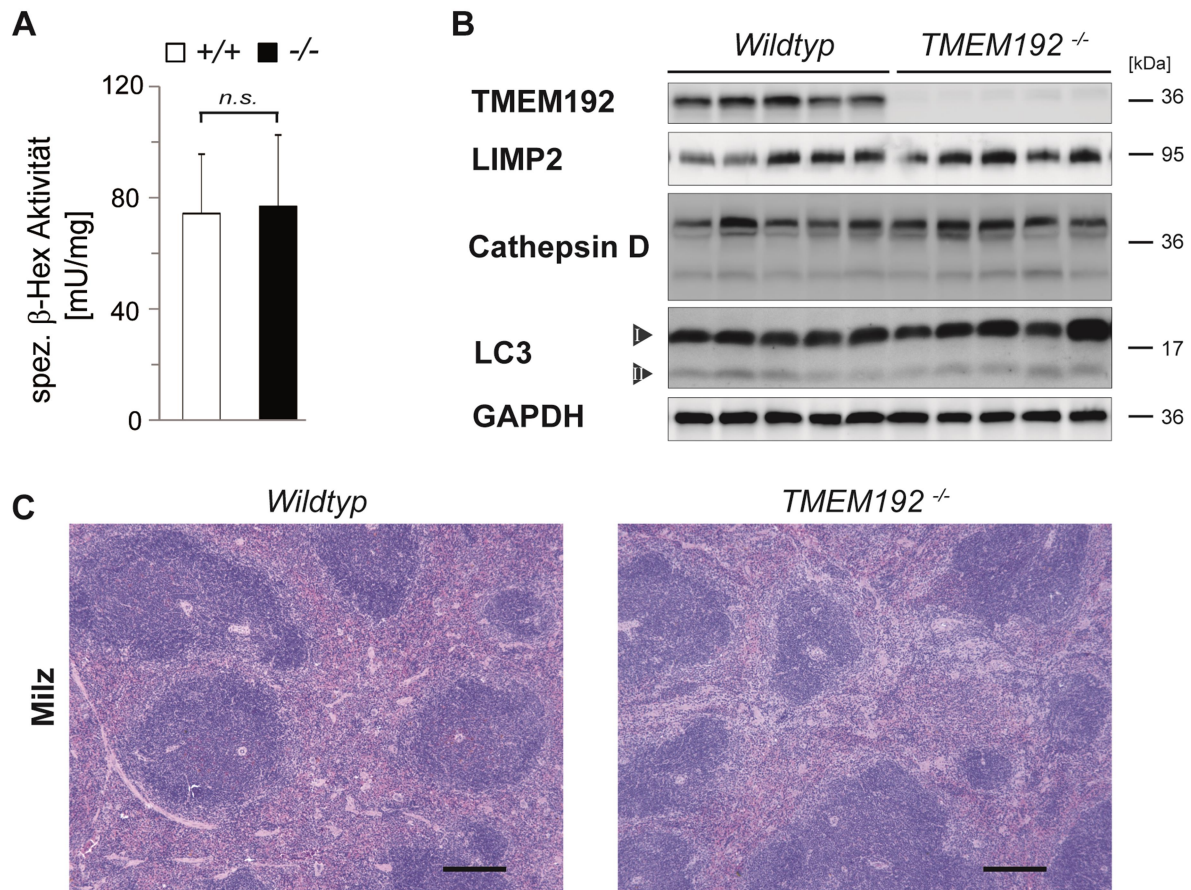
#### Abb. 4.13: Auswirkung des TMEM192-Defizits auf das neuronale System

(A) Messung der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität in Lysaten von Gehirn (n=8), Rückenmark (n=3) und Nerv (n=8) von Wildtyp- (+/+) und TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen (-/-). Darstellung der spezifischen Enzymaktivität [mU/mg] als Mittelwert + Standardabweichung. p-Wert mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test ermittelt. Auf Westernblots der (B) Gehirnllysate von Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Myelinproteine *myelin basic protein* (MBP), den Astrozytenmarker *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und die lysosomalen Protease *Cathepsin D* nachgewiesen. Außerdem wurde TMEM192 und GAPDH als Kontrolle detektiert. In Westernblot der Lysate des N. ischiadicus (C) wurde das periphere Myelinprotein *P0* und das ubiquitär vorkommenden Myelinprotein MBP quantifiziert. Ein regelmäßiger Proteinauftrag wurde durch Detektion von TMEM192 und GAPDH bestätigt. (D) Die mit HE gefärbten, repräsentativen Paraffinschnitte von immersionsfixierten Gehirnen (4% PFA) zeigten eine reguläre Architektur im Kortex, Zerebellum und Hippocampus in beiden Genotypen. Maßstab 100  $\mu$ m.

In der Zusammenarbeit mit Prof. Glatzel und Dr. Bernreuther wurden Spezialfärbungen an den Gehirnschnitten durchgeführt. Die repräsentativen Paraffinschnitte der Gehirne von TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen wiesen in der HE-Färbung eine reguläre Architektur im Kortex, Zerebellum und Hippocampus auf (Abb. 4.13 D). Zusätzlich wurden die Gehirnschnitte mit Spezialfärbungen auf Neuronen (NeuN, NSE) und Myelinisation (Luxol blue) untersucht sowie die Verteilung der Astrozyten und Mikroglia immunhistochemisch mit Antikörpern gegen GFAP und Iba1 dargestellt. Die Ergebnisse demonstrieren einen regelrechten, dem Wildtyp vergleichbaren Befund (Daten nicht gezeigt). Die Kohorte II mit den älteren Tieren demonstrierte ebenfalls keine Veränderungen über der Altersnorm hinaus, die auf eine Neurodegeneration hinweisen würden (Daten nicht gezeigt).

### 4.4.3 Auswirkungen der TMEM192-Defizienz auf das Immunsystem

Aus den vorausgegangenen Experimenten ging hervor, dass TMEM192 in großer Menge im immunologisch aktiven Organen wie die Milz und dem Thymus exprimiert wird. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde das Immunsystem der TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse näher untersucht.



**Abb. 4.14: Analyse der Milz bei TMEM192-Defizienz**

(A) Die  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität von  $n=15$  Milzen je Genotyp wurde wie unter 3.2.2.10 beschrieben gemessen und als Mittelwert + Standardabweichung der spezifischen Enzymaktivität [mU/mg] ausgewertet. Berechnung des p-Wertes mit dem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test. n.s. = nicht signifikant (B) Westernblot-Analyse der Milzlysate beider Genotypen. Detektion mit polyklonalen Antikörpern gegen LIMP2, LC3 und Cathepsin D. Außerdem wurde TMEM192 und GAPDH als Kontrolle detektiert. (C) Die Herstellung der repräsentativen Schnitte erfolgte aus in Paraffin-eingebetteten, immersionsfixierten (4% PFA) Milzen. Anschließend wurden sie mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Maßstab 250  $\mu$ m.

Für die Charakterisierung des Immunsystems wurden die Immunzellen, basierend auf ihren Oberflächenmarkern, aus verschiedenen lymphatischen Organen durchflusszytometrisch quantifiziert. Diese Untersuchungen fanden in Kooperation mit Frau Dr. rer. nat. Schneppenheim statt.

**Tab 4.1: Durchflusszytometrische Analyse der Zellen von n=4 (Milz, Thymus) oder n=6 (Knochenmark, Lymphknoten)**

Zelltypen		TMEM192 <sup>+/+</sup>		TMEM192 <sup>-/-</sup>		p-Wert
		MW	SA	MW	SA	
Knochenmark (% der lebenden Zellen)						
B-Zellen	B220+	16,8	2,0	16,0	4,5	0,731
ProB/PreB	B220+ IgM-	6,7	1,3	6,8	2,3	0,915
Immature B-Zellen	B220+ IgM+	2,7	1,0	3,4	2,0	0,442
Rezirkulierende B-Zellen	B220 <sup>hoch</sup>	7,4	1,3	5,8	1,4	0,073
Milz (% der lebenden Zellen)						
B-Zellen	B220+	46,2	5,6	50,9	5,4	0,272
T1 B-Zellen	CD21 <sup>gering</sup> CD24 <sup>hoch</sup>	6,6	2,8	6,6	1,7	0,988
T2 B-Zellen	CD21 <sup>hoch</sup> CD24 <sup>hoch</sup>	5,7	1,5	7,4	0,9	0,102
mature B-Zellen	CD21 <sup>gering</sup> CD24 <sup>gering</sup>	30,0	7,0	32,4	5,4	0,609
T-Zellen	CD3+	29,5	5,7	24,4	4,3	0,198
T-Helferzellen	CD3+ CD4+ CD8-	11,7	2,3	11,8	4,0	0,967
T-zytotoxische Zellen	CD3+ CD4- CD8+	17,3	3,5	11,9	4,0	0,087
Dendritische Zellen	CD11c+ MHCII+	5,1	1,3	6,3	1,1	0,203
Granulozyten	Gr1+	5,2	2,2	5,7	1,4	0,714
Makrophagen	F4/80+	8,4	2,2	10,0	1,3	0,279
Milz (x10 <sup>6</sup> Splenozyten)						
B-Zellen	B220+	37,2	13,7	43,4	7,5	0,453
T1 B-Zellen	CD21 <sup>gering</sup> CD24 <sup>hoch</sup>	5,9	4,3	5,9	2,5	0,991
T2 B-Zellen	CD21 <sup>hoch</sup> CD24 <sup>hoch</sup>	5,0	2,5	6,5	2,0	0,406
mature B-Zellen	CD21 <sup>gering</sup> CD24 <sup>gering</sup>	23,2	6,6	27,3	2,6	0,295
T-Zellen	CD3+	25,9	13,1	21,6	8,0	0,599
T-Helferzellen	CD3+ CD4+ CD8-	10,1	4,8	10,0	3,0	0,980
T-zytotoxische Zellen	CD3+ CD4- CD8+	15,3	8,1	10,9	5,9	0,414
Dendritische Zellen	CD11c+ MHCII+	4,2	2,2	5,5	1,8	0,406
Granulozyten	Gr1+	4,6	2,8	5,0	2,1	0,854
Makrophagen	F4/80+	7,5	3,8	8,8	3,0	0,612
Lymphknoten (% der lebenden Zellen)						
T-Zellen	CD3+	41,9	13,0	48,4	7,2	0,313
T-zytotoxische Zellen	CD3+ CD4- CD8+	18,3	5,8	22,5	4,9	0,203
T-Helferzellen	CD3+ CD4+ CD8-	22,0	6,9	23,8	3,2	0,578
B-Zellen	B220+	23,3	3,6	24,0	7,0	0,946
Dendritische Zellen	CD11c+ MHCII+	7,0	3,1	6,8	5,6	0,961
Thymus (% von lebenden Zellen)						
Doppelpositive T- Zellen	CD4+ CD8+	11,4	3,0	11,9	3,8	0,826
CD4+ T-Zellen	CD4+ CD8-	82,5	5,1	80,3	6,4	0,613
CD8+ T-Zellen	CD4- CD8+	3,8	1,6	5,6	4,2	0,456
Doppelnegative T- Zellen	CD4- CD8-	2,4	1,6	2,2	1,3	0,908

4 bis 6 Mäuse je Genotyp. Die Bestimmung der Proportion der angegebenen Subpopulationen erfolgt als prozentualer Anteil der lebenden Zellen (PI-) oder als absolute Zellzahl. Tabellarische Darstellung als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SA). Der p-Wert wurde mittels des ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Tests ermittelt.

Die TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse verfügten im Knochenmark über dieselbe Zusammensetzung der B-Zellsubpopulationen wie die Kontrollgruppe. Im Thymus sah man eine vergleichbare Verteilung von doppel-negativen und doppel-positiven T-Zellen sowie CD4-positive und CD8-positive T-Zellen in beiden Genotypen. In der Milz der TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte eine regelrechte Ausreifung von immaturren T1/T2-B-Zellen zu maturaen B-Zellen beobachtet werden, die dem Wildtyp entsprach. In der Zusammenschau konnte aufgrund einer TMEM192-Defizienz keine Reifungsstörung der Immunzellen in den untersuchten Organen nachgewiesen werden. Auch in den Lymphknoten waren alle Subpopulationen in vergleichbaren Anteilen nachweisbar (Tab 4.1).

Als nächstes wurde die Milz biochemisch untersucht. Die Auswertung der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität von n=15 präsentierte eine vergleichbare Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase mit einem Mittelwert um die 77 mU/mg (Abb. 4.14 A). Es wurde darüber hinaus die Abundanz von LIMP2 und Cathepsin D im Westernblot verglichen. Die Analyse ergab, dass die Deletion des TMEM192 keine Effekte auf die Menge von LIMP2 hatte. Auch beeinflusste das Fehlen von TMEM192 weder die Abundanz noch das Reifen von Cathepsin D. Als Letztes wurde der Autophagiemarker LC3 betrachtet, welcher für die Initiation der Autophagie wichtig ist. Vereinbar mit dem Fehlen von lysosomalen Anomalien führte die TMEM192-Defizienz zu keiner erhöhten Konversion von LC3-I zu LC3-II, was gegen eine gesteigerte konstitutionelle Autophagie-Aktivität sprach (Abb. 4.14 B).

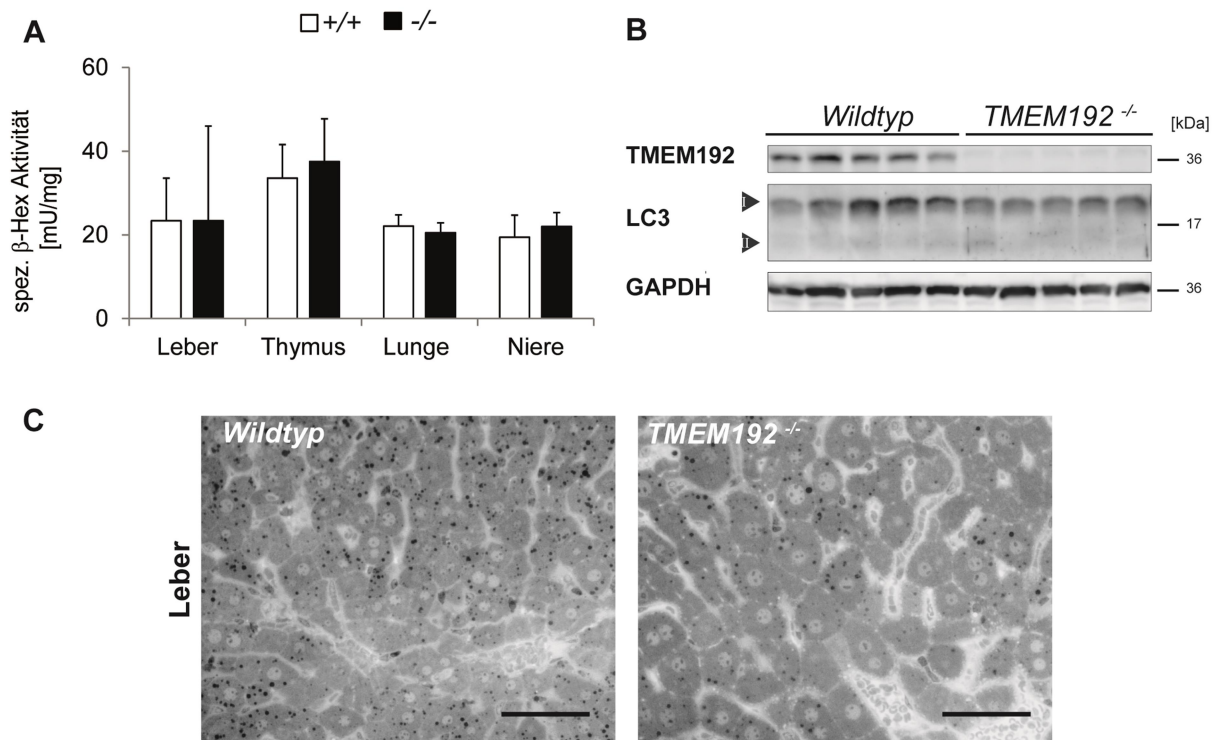
Parallel wurde die Milz histologisch aufgearbeitet. Paraffin-Schnitte und HE-Färbung wurden im Hämatopathologischen Institut des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Standort Kiel angefertigt. Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte eine regelrechte Histoarchitektur der weißen und roten Pulpa. Es wurde keine Veränderung im Sinne einer Desorganisation der weißen Pulpa oder Dysfunktion der Makrophagen mit morphologischen Zeichen eines ineffizienten Abbaus von Erythrozyten in der roten Pulpa gesehen (Abb. 4.14 C).

#### **4.4.4 Effekte der TMEM192-Deletion auf weitere Organe der Maus**

Verschiedene murine Organe wurden histologisch aufgearbeitet. Ein Schwerpunkt der Analyse war neben den bereits besprochenen Organsystemen die Leber. Sie ist das metabolische Organ des Körpers. In ihr finden die meisten Stoffwechselprozesse wie die Glukoneogenese, die Entgiftung von endogenen (wie Harnstoff) und Fremdstoffen sowie die Herstellung von Gallensalzen statt. Der Phänotyp von lysosomalen Speichererkrankungen manifestiert sich häufig in der Leber wie bei *M. Gaucher* (Baris et al. 2014).

Um zu eruieren, ob TMEM192-Defizienz zu lysosomaler Speicherung durch Funktionsstörung der Lysosomen führt, wurde in den Organlysaten die Aktivität des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -Hexosaminidase gemessen. In allen Organen unabhängig vom Genotyp konnte eine organspezifische und vergleichbare Aktivitätsrate vom Enzym gemessen werden. In der Leber wurde eine gemittelte Aktivität von 30 mU/mg unabhängig vom Genotyp gemessen (Abb. 4.15 A). Das Ergebnis spricht dafür, dass es zu keiner pathologischen Speicherung in den Lysosomen kam.

Darüber hinaus wurde in der Leber auch die konstitutionelle Autophagie betrachtet. In den angefertigten Westernblots mit den Leberlysaten wurde der Autophagiemarker LC3 untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass es zu keiner Veränderung der LC3-Abundanz kommt. Außerdem wurde keine erhöhte Konversion zu LC3-II beobachtet, welche für eine gesteigerte Autophagie-Aktivität sprechen würde (Abb. 4.15 B).



**Abb. 4.15: TMEM192-Defizienz führt nicht zu lysosomaler Akkumulation**

(A) Die  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität wurde spektrophotometrisch in Wildtyp(+/-)- und TMEM192<sup>-/-</sup>(-/-)-Organlysaten von beiden Kohorten mit n=7 gemessen. Die Darstellung der spezifischen Enzymaktivität [mU/mg] erfolgte als Mittelwert + Standardabweichung. (B) Die Leberlysate beider Genotypen wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen LC3 auf Westernblots untersucht. Die Banden, welche LC3-I und LC3-II repräsentieren, sind mit Pfeilen markiert. Als Kontrolle für die korrekten Genotypen und der Proteinauftragung wurden polyklonale TMEM192- und monoklonale GAPDH-Antikörper verwendet. (C) Die repräsentativen Araldit-eingebetteten Semidünnschnitte der Leber von Wildtyp- und TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit Toluidinblau gefärbt. Maßstab 50  $\mu$ m.

Als Nächstes wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Lüllmann-Rauch die Lebermorphologie mit Hilfe der Lichtmikroskopie untersucht. Die mit Toluidinblau gefärbten, repräsentativen Leberschnitte stellten ein regelrechtes Parenchym ohne Hinweise auf akut entzündliche oder chronisch fibrotische Prozesse dar (Abb. 4.15 C). Auch in den anderen mit Toluidinblau gefärbten Gewebeschnitten (Gehirn, Rückenmark, Milz, Niere, etc.) wurde eine regelrechte Histoarchitektur gesehen (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von diesem Ergebnis scheint die TMEM192-Deletion keinen auffälligen Einfluss auf die untersuchten Organe zu haben.

Um mögliche ultrastrukturelle Veränderungen durch die TMEM192-Defizienz zu untersuchen, wurde der N. opticus, das Rückenmark und die Leber der TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse elektromikroskopisch näher untersucht. Die elektromikroskopische Auswertung der Leber zeigte keine pathologischen Veränderungen der zellulären Strukturen. Auch in den untersuchten Nn. optici und im Rückenmark der TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse traten elektromikroskopisch keine morphologischen Anomalien wie vergrößerte Granula auf (Daten nicht gezeigt).

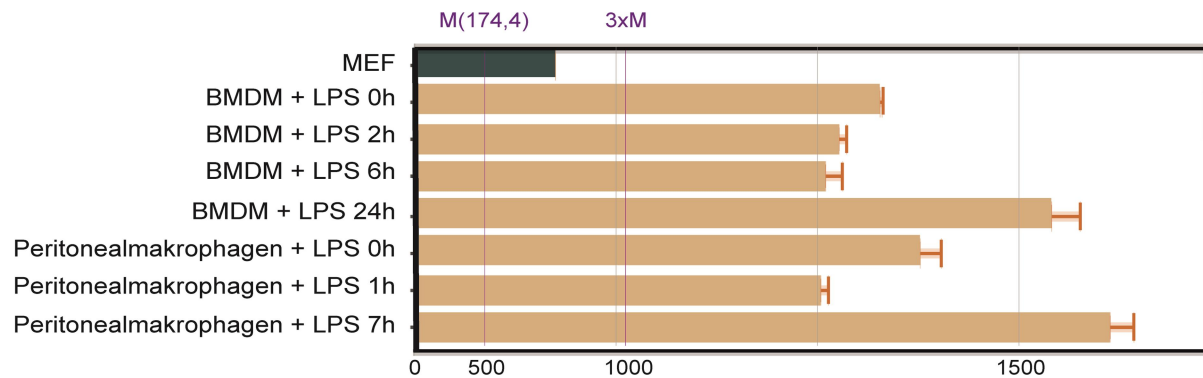
## 5. Diskussion

In vorausgegangenen Studien wurde die molekulare Struktur und die Sortierung des TMEM192-Proteins in der Zelle beschrieben (Behnke et al. 2011; Schröder et al. 2010a). Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Funktionsanalyse des unzureichend charakterisierten TMEM192-Proteins. Eine systematische Analyse der TMEM192<sup>-/-</sup>-Maus soll Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des TMEM192 geben.

Das murine TMEM192 wird ubiquitär exprimiert (Nguyen et al. 2017). Dieses Ergebnis suggeriert eine zentrale, zelltypunabhängige Funktion des Proteins. Die systematischen Analysen zeigten, dass die TMEM192<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zum Wildtyp keinen offensichtlichen Phänotyp präsentiert. Die Expressionsrate unterscheidet sich von Organ zu Organ. Außerdem belegten die Ergebnisse, dass alle untersuchten Organe keine biochemischen oder histomorphologischen Auffälligkeiten vorwiesen. Die vorhandene Menge und Differenzierung der Immunzellen war ebenfalls unauffällig. Die Phänotypen sowohl der Jungtiere (Kohorte I: 11–18 Wochen alt) als auch der Alttiere (Kohorte II: 52–55 Wochen alt) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Daten dieser Arbeit schließen eine Einschränkung durch Alterung oder lysosomale Akkumulation von Makromolekülen bei vollständigem Verlust von TMEM192 mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. Der fehlende Phänotyp der TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse könnte sich dadurch erklären, dass die Funktion des TMEM192 wie bei LAMP1 durch ein ähnliches, noch unbekanntes Protein kompensiert werden kann. LAMP1<sup>-/-</sup>-Mäuse haben nur milde Symptome, da sie LAMP2 hochregulieren und dieses die Funktion von LAMP1 übernimmt (Andrejewski et al. 1999; Eskelinen et al. 2003; Eskelinen 2006).

Eine weitere Möglichkeit ist, dass TMEM192 erst in bestimmten Situationen von (physiologischer) Bedeutung ist. Die Versuchsmäuse mussten ihre biologische Reserve nicht voll ausschöpfen, da sie nach dem Standard der europäischen Haltungsrichtlinien (gv-solas) gehalten wurden. Die Zucht schützte sie vor biotischen (Hunger, Konkurrenz, Feinde, parasitären und infektiösen Befall) und abiotischen (Hitze, Kälte, Radioaktivität) Stressfaktoren. Denkbar ist, dass TMEM192 als lysosomales (Membran-)Protein unter katabolischer Stoffwechsellage, z.B. durch infektiöse oder maligne Krankheiten in seiner Funktion zum Tragen kommt. Passend zu der Hypothese zeigen Metadaten von TMEM192-Expression in murinen Zellen, dass es nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (= LPS) zu einer Hochregulation der Transkription des TMEM192-Gens in Makrophagen kommt (Abb. 5.1). Die Hochregulation geschieht mit einer zeitlichen Latenz von 24 h bei den

BMDM bzw. 7 h bei den Peritonealmakrophagen, möglicherweise als einen Ausdruck einer Immunantwort auf den äußeren Stimulus.



**Abb. 5.1: Genexpression in Abhängigkeit des Zelltyps und nach Induktion durch LPS**

Abbildung nach BioGPS verändert (<http://ds.biogps.org/?dataset=GSE10246&gene=73067> vom 19.04.2021). Nach Stimulation der BMDM oder der Peritonealmakrophagen mit LPS steigt die Expressionsrate des TMEM192-Gens nach 24 h bzw. nach 7 h deutlich an. BMDM = Bone marrow derived Macrophagen.

Ferner gibt es Hinweise, dass der TMEM192-Promoter über potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie u.a. *Forkhead box-O transcription factor 4* (FoxO4), *heat shock factor 2* (HSF2), *heat shock factor 1* (HSF1(long) und HSF1(short)) verfügt (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TMEM192> vom 19.04.2021; Fishilevich et al. 2017). Die Transkriptionsfaktoren beeinflussen eine Vielzahl von Genen, die wichtige Funktionen wie Metabolismus, Zellzyklus, Apoptose und zelluläre Homöostase regulieren. Die Zusammenschau dieser Informationen macht es wahrscheinlich, dass TMEM192 eher für Stresssituationen benötigt wird.

Passend dazu beschreibt die Arbeitsgruppe um Yoshida ein mögliches molekulares Korrelat. Sie rupturierten die lysosomale Membran durch Gabe von L-Leucyl-L-Leucin-Methylester (= LLOMe). Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass bei diesem Prozess unter anderem TMEM192 ubiquitiniert und diese Lysosomen für die Lysophagie markiert werden (Yoshida et al. 2017). Es ist lange bekannt, dass durch die Ubiquitinierung beschädigte Proteine für das Proteasomensystem markiert werden. Weitere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass die Ubiquitinierung ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der selektiven Autophagie spielt (Shaid et al. 2013). Als Lysophagie wird die selektive Autophagie von defekten Lysosomen bezeichnet (Anding & Baehrecke 2017; Marques & Saftig 2019). Durch welche Mechanismen TMEM192 ubiquitiniert wird, ist weiterhin unbekannt. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das Protein TMEM192 für die Erhaltung der intrazellulären Homöostase wichtig sein kann.



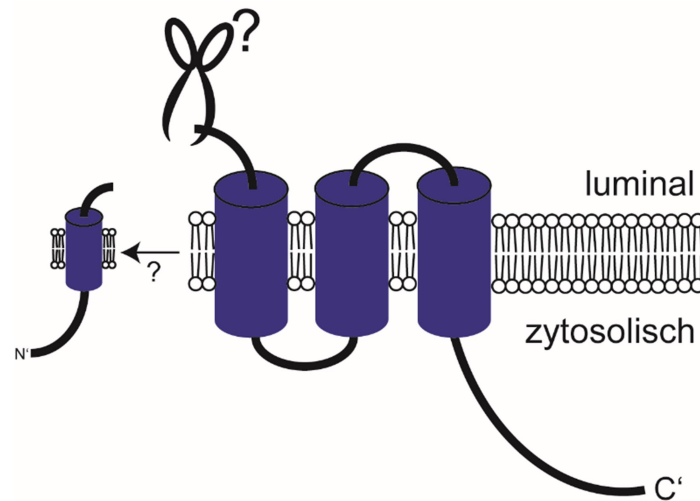
Erwähnenswert ist ebenfalls das Ergebnis der Arbeitsgruppe um Liu. Sie zeigten, dass es durch *small interfering RNA* (siRNA)-vermittelte Herunterregulierung von TMEM192 in HepG2-Zellen zu einer Wachstumshemmung dieser Zellen und einer erhöhten Apoptoserate kommt. Der Effekt wurde nur in den HepG2-Zellen nachgewiesen, welche aus einem gut differenzierten humanen hepatozellulären Karzinom gewonnen wurden. Bei den gleich behandelten L02-Zellen, einer als physiologisch angenommenen Leberzelllinie, zeigte sich keine Wachstumshemmung oder erhöhte Apoptoserate (Liu et al. 2012). Dieses Ergebnis impliziert, dass eine TMEM192-Defizienz mehr Einfluss auf entartete Zellen als auf physiologische Zellen haben könnte. Eine mögliche Hypothese ist, dass in den Tumorzellen die alternativen Kompensationsmechanismen bei TMEM192-Defizienz vermindert vorliegen oder gar fehlen. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass die unbekannte spezifische Funktion des TMEM192 für das Überleben der Tumorzelle, die sich durch hohe Zellteilung und hohen Energiebedarf sowie veränderte Signalwege von den physiologischen Zellen unterscheidet, essentiell bzw. von größerer Bedeutung ist. Jedoch müssen bei der Interpretation der Daten von Liu et al. die Befunde von Liang et al. berücksichtigt werden, die zeigten, dass die L02-Zelllinie in Leberkinase B1 (= LKB1) defizient sind und damit kanzerogene Eigenschaften besitzen (Liang et al. 2016).

Bei den systematischen Analysen des Mausmodells wurde eine spezifische Bande auf Höhe von 17 kDa in den Westernblot-Untersuchungen des lysosomalen Membranproteins TMEM192 nachgewiesen. In der aktuellen Literatur findet sich keine Splicing-Variante dieser Länge, folglich wird angenommen, dass es sich dabei um ein proteolytisches Fragment des Proteins handelt. Weil die verwendeten Antikörper an ein N-terminales Epitop binden, wird postuliert, dass diese Bande ein NTF des murinen TMEM192-Proteins darstellt. Das NTF hat eine Größe von ungefähr 17 kDa. Die Schnittstelle befindet sich höchstwahrscheinlich in der ersten intralysosomalen Schleife des Membranproteins.

Um die verantwortliche Protease zu identifizieren, wurde zunächst in Überexpression die Generierung des NTFs untersucht. Die zellbasierten Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Inhibition einzelner Proteasefamilien keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung des NTFs hat; nur die Inhibition des Transportes zum Lysosomen oder die Azidifikation des Lysosomen führten zu einer relevanten Reduktion des NTFs.

Eine geringe Reduktion des NTFs wurde beim Einsatz von Cysteinproteaseninhibitor gesehen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass an der Bildung des NTFs mehrere Proteasen

beteiligt sind. Sicher schlussfolgern kann man nur, dass das NTF im Lysosomen generiert wird.



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung möglicher Schnittstelle des murinen NTFs**

Die Schere symbolisiert die unbekannte Protease.

Obwohl in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, welche Proteasen für die Generierung des NTFs verantwortlich ist, sollen mögliche Funktionen dieses Fragmentes diskutiert werden:

Zum einen könnte es sich bei dem NTF um ein unspezifisches Abbauprodukt handeln. Denkbar wäre, falls TMEM192 an der Lysophagie beteiligt wäre, dass es dabei auch selbst abgebaut werden müsste. Man könnte postulieren, dass TMEM192 nur prozessiert wird, wenn es sich intralysosomal und nicht in der Membran eines Lysosomen befindet. Das könnte ebenfalls erklären, warum in der Überexpression das NTF kaum nachweisbar war und nach Inhibition spezifischer Proteasen kein Einfluss auf die Bildung des NTFs gesehen wurde. Diese Ergebnisse würden zu der Annahme passen, dass das NTF durch Lysophagie entsteht. Zum anderen könnte das Generieren des NTFs Ausdruck unterschiedlicher Funktionen oder Aktivierungsstatus des TMEM192-Proteins in einzelnen Organen sein. Diese Hypothese wird von dem Ergebnis gestützt, dass die Quantität des NTFs zelltyp- und organspezifisch variiert. In allen untersuchten murinen Geweben konnte das NTF in unterschiedlichem Verhältnis zum FL nachgewiesen werden (Abb. 4.6 C). Nur in der Leber war das Fragment nicht detektierbar. Mögliche Erklärungen sind, dass die Leber entweder für die Funktionalität des TMEM192 die Spaltung nicht benötigt oder das NTF in der Leber so schnell degradiert wird, dass es sich einer Detektion entzieht. Bei weiterhin unbekannter Funktion des TMEM192 kann nur spekuliert werden, ob die Bildung des NTF eine aktivierende oder inhibierende Funktion auf TMEM192 hat. Die weitere Charakterisierung des NTFs ist von Interesse, da in der Literatur

der letzten Jahre vermehrt Arbeiten erscheinen, die von lysosomalen polytopen Membranproteinen berichten, die durch lysosomale Proteasen prozessiert werden. Beispiele sind die Proteine HGSNAT (Durand et al. 2010), Mucolipin-1 (Miedel et al. 2006; Kiselyov et al. 2005), und die putativen Transportproteine *Disrupted in renal carcinoma 2* (DIRC2) (Savalas et al. 2011) und CLN7 (Steenhuis et al. 2012). Jedoch konnte wie bei TMEM192 noch nicht endgültig geklärt werden, welche Funktion die proteolytische Prozessierung bei diesen Proteinen erfüllt.

Eine interessante Beobachtung, um die Funktion des NTFs näher zu charakterisieren, wurde in den Experimenten zur Makroautophagie gemacht. Nach Autophagie-Induktion wurde eine Reduktion des FLs unter Überexpressionsbedingungen um 60% beobachtet (Abb. 4.7). Einerseits könnte der verminderte Nachweis des transfizierten FLs Ausdruck eines unspezifischen Abbaus sein, um dem Organismus Energie zur Verfügung zu stellen. Andererseits könnte der vermehrte Abbau des FLs die Beteiligung des TMEM192 bei dem Prozess der Autophagie widerspiegeln. Ein Indiz liefern die Ergebnisse an den Cathepsin L<sup>-/-</sup>-Mäusen. Es ist bekannt, dass Cathepsin L<sup>-/-</sup>-Mäuse auf zellulärer Ebene vergrößerte zytoplasmatische Vesikel aufweisen, die biochemisch am ehesten großen Autophagolysosomen entsprechen. Die Untersuchungen von Dennemarker et al. an Cathepsin L<sup>-/-</sup>-MEF belegen, dass die Cathepsin L-Defizienz keinen Einfluss auf die Initiation der Makroautophagie, die Bildung der Autophagosomen oder die Fusion mit dem Lysosomen zu Autophagolysosomen hat, aber der Inhalt der Autophagolysosomen durch das Fehlen von Cathepsin L verzögert oder gar nicht abgebaut werden kann (Dennemarker et al. 2010). Dieser Zustand entspricht biochemisch dem eines unbeendeten Autophagieprozesses mit intrazellulärer Akkumulation der dysomorphen Vesikel. Die Westernblot-Analysen an Cathepsin L<sup>-/-</sup>-Milzlysaten mit Nachweis von TMEM192 zeigten ebenfalls eine Verringerung des FLs und eine vermehrte Bildung des NTFs (Daten nicht gezeigt). Die Interpretation der Ergebnisse im Cathepsin L<sup>-/-</sup>-Organismus müssen kritisch betrachtet werden, da mehrere Arbeiten zu den Cathepsin L<sup>-/-</sup>-Mäusen deutliche Veränderungen des lysosomalen Systems zeigen (Dennemarker et al. 2010; Reinheckel et al. 2001). Daher kann der vermehrte Abbau des TMEM192 das Resultat eines Zusammenspiels mehrerer Faktoren und nicht zwingend Ausdruck seiner mutmaßlichen Funktion in der Makroautophagie sein. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse an TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäusen, dass TMEM192 keinen Einfluss auf die konstitutionelle Autophagie hat bzw. seine Funktion über noch unbekannt Proteine kompensiert werden kann. Dessen ungeachtet war die Reduktion des FLs nach Induktion der Makroautophagie unter Überexpressionsbedingungen signifikant. Die Daten unter

Überexpressionsbedingungen implizieren eine bis jetzt unzureichend erforschte Wechselwirkung zwischen der Autophagie und TMEM192, deshalb sind weitere Untersuchungen an dem endogenen murinen TMEM192 notwendig.

Die Arbeitsgruppe um Shyu wies ebenfalls einen Zusammenhang zwischen TMEM192 und der Autophagie nach. Sie berichtete über eine Interaktion zwischen Tazarotene-induziertem Gen 1 (= TIG1) und TMEM192, in der eine Suppression von sowohl TIG1 als auch TMEM192 zu einer all-trans-Retinsäure-vermittelten Autophagieaktivitätssteigerung und Wachstumshemmung in HeLa-Zellen führt (Shyu et al. 2016).

Nach der Betrachtung der Autophagie soll die Rolle des TMEM192 in weiteren Funktionen des endosomal-lysosomalen Apparates untersucht werden. In der Strukturanalyse des TMEM192 zeigte sich, dass es über vier Transmembrandomänen verfügt und Homodimere ausbildet (Schröder et al. 2010a). Diese Eigenschaften erinnern an die Struktur von einfachen Ionenkanälen (Catterall 2010). Auf Grundlage der molekularen Analyse kann spekuliert werden, dass TMEM192 ein potentieller  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. Kationenkanal ist und eine Rolle in der Regulation der Kalzium-abhängigen Exozytose spielen kann (Rodriguez et al. 1997).

Die Kapazität der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten lysosomalen Exozytose von TMEM192<sup>-/-</sup>-MEF und BMDM im Vergleich zum Wildtyp wurde durch Ionomycingabe überprüft. Die durchgeführten Experimente demonstrierten, dass es zu keiner messbaren Einschränkung der lysosomalen Exozytose durch eine TMEM192-Defizienz kommt (4.3.3). Bei einem hohen Kalzium-Influx reagiert das  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive lysosomale Membranprotein Synaptotagmin VII, welches über Interaktionen mit dem Plasmamembranprotein Syntaxin die Membranfusion ab einem intrazellulären Kalziumgehalt von 10  $\mu\text{M}$  initiiert. Eine normwertige intrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt 0,1  $\mu\text{M}$  (Gerasimenko et al. 2001). Sollte TMEM192 ein selektiver Kalziumkanal sein, welcher über noch unbekannte Stimuli lokal Kalzium für die Membranfusionsvorgang freisetzt, so würde man mit Ionomycin diesen Vorgang übergehen und eine Defizienz würde keine Auswirkungen haben. Anzustreben wäre somit ein System, welches eine Induktion der Exozytose von Lysosomen ohne massiven Influx von extrazellulärem Kalzium auslösen würde.

Als weiteres Ziel dieser Dissertation wurde untersucht, ob eine Kausalität zwischen den Symptomen des Indexpatienten und der heterozygoten R39T-Mutation im TMEM192-Gen besteht. In der Literatur bekannte Defekte eines lysosomalen Membranproteins präsentieren sich mit einer weiten Bandbreite, abhängig von der physiologischen Funktion des Proteins

(Ruivo et al. 2009). Typische Symptome sind Störungen des zentralen Nervensystems mit Epilepsie sowie mentale Retardierung, Taubheit, Blindheit und Demenz (Boustany 2013). Das Diagnostizieren dieser Krankheiten wird erschwert, da die Patienten trotz gleichem Genotyp eine Spannweite an Ausprägungen und Symptomen zeigen können. Studien an eineiigen Zwillingen weisen darauf hin, dass extrinsische Faktoren eine wesentliche Rolle bei der Ausprägung der Symptome spielen (Platt 2018; Marques & Saftig 2019).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die R39T-Mutation keinen Einfluss auf den Transport zum Lysosomen, die Ausbildung von Homodimeren, die Morphologie des endosomal-lysosomalen Apparats sowie die Autophagie und lysosomale Exozytose hat. Zu diskutieren ist, dass es durch die heterozygote Mutation zu strukturellen Veränderungen der Homodimere kommt. Dadurch könnten die Interaktionen mit anderen Proteinen gestört werden oder mögliche Kompensationsmechanismen nicht greifen, welche normalerweise bei Verlust des Proteins genutzt werden. Sollten die Monomere sich zufällig zu Homodimere zusammenfinden, bestehen bei Vorliegen einer heterozygoten Mutation vier Kombinationsmöglichkeiten. Mit 75% Wahrscheinlichkeit entsteht dann ein dysfunktionales und zu 25% ein vollfunktionsfähiges Homodimer. Nimmt man nun an, dass TMEM192 sogar größere Quartärstrukturen annehmen kann, würde eine heterozygote Mutation dazu führen, dass der Anteil des dysfunktionalen Proteins weiter zunimmt. So beträgt der Anteil des dysfunktionalen Proteins bei einem Homotetramer statistisch schon 93,75%. Zusätzlich ist es denkbar, dass ein mutiertes TMEM192-Monomer in Interaktion mit einem Wildtyp-TMEM192-Monomer mehr schadet (dominant-negativer Effekt) als der komplette Verlust des Proteins. Bei ungeklärter Funktion des TMEM192-Proteins kann nur spekuliert werden, inwiefern sich die Mutation auf die Funktionalität von TMEM192 auswirkt.

Aus nicht veröffentlichten Daten in Kooperation mit Dr. S. Jäger wurde eine mögliche Interaktion des TMEM192 mit *Syntaxin 4* und *Syntaxin-binding Protein 3* postuliert (4.3.3). Dieses Ergebnis ist interessant, da in mehreren Arbeiten ein Zusammenhang zwischen SNARE-Proteinen und Neurodegeneration gezeigt wurde. In der Arbeit von Sambri et al. wird eine präsynaptische Störung als mögliche Ursache für die Neurodegeneration bei lysosomaler Dysfunktion beschrieben (Sambri et al. 2017). Die Wissenschaftler belegen, dass unabhängig von der Ursache der lysosomalen Dysfunktion,  $\alpha$ -Synuclein und *Cystein String Protein  $\alpha$*  (= CSP $\alpha$ ) Einfluss auf die SNARE-Proteine haben und somit die Endozytose und Exozytose verändern. Die Arbeitsgruppe um Sambri beschäftigte sich mit dem Mausmodell für die Erkrankung *Mucopolysaccharidose Typ IIIA* (= MPS-III A). Sie stellten fest, dass bei lysosomaler Dysregulation  $\alpha$ -Synuclein im Lysosomen akkumuliert und

somit im Zytosol nicht mehr zur Verfügung steht. Zusätzlich wird die Aktivität des Ubiquitin-Proteasomen-Systems kompensatorisch hochreguliert und das Protein CSP $\alpha$  vermehrt abgebaut. Sinkt der zytosolische Spiegel beider Proteine, so werden wichtige SNARE-Proteine destabilisiert und ebenfalls vermehrt abgebaut. Als Endstrecke dieser Effekte kommt es präsynaptisch zu Recycling-Defekten, die zu präsynaptischem Versagen und Neurodegeneration führen. Obwohl die Interaktion zwischen TMEM192 und den SNARE-Proteinen Syntaxin 4 und Syntaxin-binding Protein 3 noch nicht bewiesen ist, könnte eine Interaktion zwischen TMEM192 und den SNARE-Proteinen diese stabilisieren. Bei Funktionsverlust des TMEM192 könnte der oben genannte Mechanismus (Destabilisierung von SNARE-Proteinen) eine mögliche Ursache der Symptome des Indexpatienten sein.

Anhand der Analysen der Hautfibroblasten konnte kein Zusammenhang zwischen den Symptomen des Indexpatienten und der Mutation festgestellt werden. Dieses experimentelle System weist jedoch mehrere Schwächen auf: Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass das TMEM192 ubiquitär exprimiert wird. Die Expressionsintensität unterscheidet sich aber zwischen den einzelnen Geweben und Organen (Schröder et al. 2010a). Außerdem zeigen die Symptome des Indexpatienten keine Haut- bzw. Bindegewebsbeteiligung, welche eine lebenswichtige Funktion des TMEM192-Proteins in diesem Organsystem in Frage stellt. Ein weiterer Aspekt ist, dass mitotisch aktive Zellen durch Zellteilung möglicherweise eine kritische Akkumulation von nicht-abbaubaren Produkten aufgrund des TMEM192-Defektes verhindern und somit eine Funktionsstörung nicht nachweisbar ist (Bergeland et al. 2001). Anders ist es bei den postmitotischen Zellen, die u.a. im Nervensystem anzutreffen sind (Marques & Saftig 2019). Entsprechend der Symptome des Indexpatienten wurden Studien an iPSC-Neuronen durchgeführt. Auch hier zeigte sich zwischen den iPSC-Neuronen der gesunden und der betroffenen Familienmitglieder kein Unterschied.

Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, sollte bedacht werden, dass die kultivierten Hautfibroblasten im Schnitt bei einer frühen Passagennummer untersucht wurden. Die iPSC-Neuronen wurden zu den Zeitpunkten Tag 3, Tag 7 und Tag 14 nach Differenzierung analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Zellen spiegeln daher einen frühen Zeitpunkt wider. Außerdem wurden die untersuchten Neuronen *de novo* aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenziert und können somit alters- oder akkumulationsbedingte Phänomene nicht abbilden. Es stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse der Untersuchungen über einen Zeitpunkt Auskunft geben, in dem noch keine Auswirkungen auf zellulärer Ebene feststellbar sind. Die am längsten in Kultur gehaltenen iPSC-Neuronen wurden am Tag 14 nach Induktion bearbeitet. In einem ähnlichen System mit kultivierten

Hippocampus-Neuronen aus den MPS-IIIa-Mäusen beschrieben die Autoren, dass in den Neuronen im direkten Vergleich zum Wildtyp erst ab Tag 6 diskrete Veränderungen festgestellt werden konnten und erst ab Tag 10 deutliche Veränderungen sichtbar waren (Sambri et al. 2017). Bei der MPS-IIIa handelt es sich um eine schwere LSD, die bereits im Kindesalter zu schweren neurologischen Ausfällen führt (1.1.5). Wie bereits erwähnt, könnten die iPSC-Neuronen zu einem Zeitpunkt untersucht worden sein, in der die Veränderungen noch gar nicht nachweisbar sind. Einerseits wurde im TMEM192-defizienten Mausmodell gezeigt, dass die erhobenen Ergebnisse altersunabhängig sind. Andererseits müssen die Arbeiten von Wils et al. und Watanabe et al. berücksichtigt werden. Wils et al. untersuchte Progranulin<sup>-/-</sup>-Mäuse und stellte fest, dass die Mäuse bis zu einem Alter von zehn Monaten sich phänotypisch nicht von ihren Kontrolltieren unterschieden und vor allem keine Anzeichen einer Neurodegeneration zeigten (Wils et al. 2012). Eine Progranulin-Defizienz führt im Menschen zu einer vererbaren Demenz. Watanabe et al. wies nach, dass unabhängig vom Alter der Mäuse keine Neurodegeneration beobachtet wurde, obwohl die Tiere dieselbe genetische Mutation (TDP-43<sup>M337V</sup>) besitzen, die bei Menschen zu einer früh einsetzenden Amyotrophe Lateralsklerose führen (Watanabe et al. 2020). Diese Beispiele zeigen, dass Mausmodelle nicht immer zum besseren Verständnis Erkrankungen geeignet sind.

Als weiteres Argument für den fehlenden Zusammenhang zwischen der Mutation und den klinischen Symptomen ist zu erwähnen, dass es sich bei der humangenetischen Untersuchung um eine reine Exom-Sequenzierung handelt. Es besteht die Möglichkeit, dass weitere Mutationen im TMEM192-Gen oder seiner Promotorregion nicht erfasst wurden. Außerdem wurden weitere Mutationen in der Familie des Indexpatienten gefunden, welche ebenfalls Ursache der Symptome sein können.

Zusammenfassend konnte in Rahmen dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen der heterozygoten Punktmutation im TMEM192-Gen und den Symptomen des Patienten festgestellt werden.

## 6. Ausblick

Die Funktion des TMEM192 bleibt weiterhin unbekannt. Aufgrund seiner Struktur und der Fähigkeit zur Dimerisierung ist es wahrscheinlich, dass TMEM192 als Transporter fungiert. Da in der Arbeit keine Akkumulation durch die TMEM192-Defizienz nachgewiesen wurde, kann man spekulieren, dass TMEM192 ein Transporter für seltene Metabolite sein kann. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, soll das Metabolom von isolierten Lysosomen TMEM192-defiziter Zellen mit dem Metabolom von isolierten Lysosomen aus Kontrollzellen verglichen werden. Dafür könnte man die LysoIP-Verfahren nutzen, um Lysosomen effizient zu isolieren (Abu-Remaileh et al. 2017). Die so gewonnene Lystate können anschließend entweder nach einer gas- oder flüssigchromatographischen Trennung mit einer massenspektrometrischer Detektion oder einer Kernspin-Magnetresonanzspektroskopie analysiert werden.

Weitere Untersuchungsansätze bietet das erstmalig beschriebene NTF des TMEM192. Nun stellt sich die Frage, ob die Bildung des NTFs essentiell für die Funktion des TMEM192 ist. Nach Induktion der Makroautophagie unter Überexpressionsbedingung wurde beobachtet, dass es zu einer Verringerung des FLs und wahrscheinlich einer vermehrten NTF-Bildung kam. Dieses Ergebnis muss zunächst endogen bestätigt werden. Anschließend sollte untersucht werden, welche Funktion das NTF bei der Autophagie spielt, z.B. welche Auswirkung die Unterdrückung der Bildung des NTFs hat. Von Interesse ist ebenfalls, ob eine vermehrte NTF-Bildung bei der Lysophagie entsteht.

Der Einfluss einer TMEM192-Defizienz auf die Lysophagie kann neue Ansätze für die Erforschung der (physiologischen) Funktion(en) des TMEM192 liefern. Yoshida et al. zeigten, dass nach Zerstörung der Integrität der lysosomalen Membran u.a. TMEM192 ubiquitiniert wird und so die defekte Lysosomen für die Degradation markiert (Yoshida et al. 2017). So sollte fluoreszenzmikroskopisch oder durchflusszytometrisch geprüft werden, ob TMEM192-defiziente Zellen vulnerabler auf eine LLOMe-Behandlung reagieren und vermehrt untergehen. Solche Experimente könnten Rückschlüsse auf die Rolle des Proteins in dieser Stresssituation geben.

Auch ist von Interesse, welchen Einfluss weitere Stresssituationen wie eine maligne Transformation auf TMEM192-defiziente Zellen haben. Es gibt Hinweise, dass eine TMEM192-Defizienz mehr Einfluss auf entartete Zellen als auf normale Zellen hat



(Liu et al. 2012). Den beobachteten Effekt, welcher nur in den HepG2-Zellen nachgewiesen wurde, müsste in weiteren Tumorzelllinien überprüft werden. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, könnte TMEM192 ein potentes Ziel für die Tumorthherapie sein ohne Schaden an gesunden Zellen anzurichten. Es bestehe dann die Möglichkeit Wirkstoffe zu entwickeln, die gezielt TMEM192 blockieren. Dafür werden weitere Funktionsanalysen des Proteins benötigt, um geeignete Bindungsdomänen zu identifizieren.

## 7. Zusammenfassung

Das Membranprotein 192 (TMEM192) ist ein lysosomales Membranprotein, welches über vier Transmembrandomänen verfügt und Homodimere über Disulfidbrücken bildet (Schröder et al. 2010a). Zwei benachbarte Dileucin-Motive sind für den gerichteten Transport zu den Lysosomen entscheidend (Behnke et al. 2011). Bei einem Indexpatienten mit neurodegenerativen Symptomen wurde eine heterozygote R39T-Punktmutation im TMEM192-Gen gefunden. Die systematische Beschreibung der Auswirkungen dieser heterozygoten Punktmutation sowie einer TMEM192-Defizienz im Mausmodell sollen Hinweise auf die physiologischen Aufgaben des TMEM192-Proteins geben.

Die Analysen der Patientenzellen ergaben, dass die heterozygote Punktmutation weder den Transport zum Lysosomen noch die Dimerisation beeinflusst. In den Westernblot-Analysen und Immunfluoreszenz der Patientenzellen wurden keine Hinweise auf Dysfunktionen der Lysosomen gesehen. Als Nächstes wurde die Gewebeexpression des TMEM192-Proteins in Mäusen analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass das murine TMEM192 ubiquitär exprimiert wird mit hoher Expressionsrate in der Milz, dem Knochenmark und dem Thymus, aber auch in der Niere und im neuronalen Gewebe (Nguyen et al. 2017). Um altersbedingte Veränderungen bei der umfassenden phänotypischen Charakterisierung der TMEM192<sup>-/-</sup>-Mäuse zu untersuchen, wurden zwei Kohorten (Kohorte I: 11–18 Wochen alt, Kohorte II: 52–55 Wochen alt) analysiert. In beiden Kohorten führte eine TMEM192-Defizienz zu keiner relevanten Funktionseinschränkung der Lysosomen. Es gab weder Hinweise auf lysosomale Speicherung noch Dysregulationen von Autophagie oder lysosomaler Exozytose. Die histologische Aufarbeitung wies ebenfalls keine Veränderungen in den untersuchten Organen auf. In Rahmen dieser Arbeit wurde ein stabiles N-terminales Fragment des murinen TMEM192 entdeckt, welches organspezifisch generiert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das NTF intralysosomal generiert wird. Eine verantwortliche Protease konnte in dieser Arbeit nicht sicher identifiziert werden, wobei sich Hinweise auf eine Beteiligung von Cathepsin S ergaben. Außerdem führt eine Aminosäuredepletion in transient transfizierten HeLa-Zellen mit murinen TMEM192 zu einer verstärkten Bildung des N-terminales Fragments.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Funktion des TMEM192 näher zu beleuchten und die mögliche Funktion des intralysosomalen Prozessierens zu verstehen. Der Einfluss einer TMEM192-Defizienz auf die Lysophagie kann neue Ansätze für die Erforschung der (physiologischen) Funktionen des TMEM192 liefern. Ferner ist anzustreben, die Auswirkungen einer Aminosäuredepletion auf das endogene TMEM192 zu prüfen.

# Literaturverzeichnis

- Abu-Remaileh, M., G. A. Wyant, C. Kim, N. N. Laqtom, M. Abbasi, S. H. Chan, E. Freinkman, and D. M. Sabatini. 2017. 'Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase- and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes', *Science*, 358: 807-13.
- Anding, A. L., and E. H. Baehrecke. 2017. 'Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles', *Dev Cell*, 41: 10-22.
- Andrejewski, N., E. L. Punnonen, G. Guhde, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, K. von Figura, and P. Saftig. 1999. 'Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice', *J Biol Chem*, 274: 12692-701.
- Andrews, N. W. 2000. 'Regulated secretion of conventional lysosomes', *Trends Cell Biol*, 10: 316-21.
- Aslam, B., M. Basit, M. A. Nisar, M. Khurshid, and M. H. Rasool. 2017. 'Proteomics: Technologies and Their Applications', *J Chromatogr Sci*, 55: 182-96.
- Bagshaw, R. D., D. J. Mahuran, and J. W. Callahan. 2005. 'A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle', *Mol Cell Proteomics*, 4: 133-43.
- Bar-Peled, L., and D. M. Sabatini. 2014. 'Regulation of mTORC1 by amino acids', *Trends Cell Biol*, 24: 400-6.
- Baris, H. N., I. J. Cohen, and P. K. Mistry. 2014. 'Gaucher disease: the metabolic defect, pathophysiology, phenotypes and natural history', *Pediatr Endocrinol Rev*, 12 Suppl 1: 72-81.
- Behnke, J., E. L. Eskelinen, P. Saftig, and B. Schroder. 2011. 'Two dileucine motifs mediate late endosomal/lysosomal targeting of transmembrane protein 192 (TMEM192) and a C-terminal cysteine residue is responsible for disulfide bond formation in TMEM192 homodimers', *Biochem J*, 434: 219-31.
- Bergeland, T., J. Widerberg, O. Bakke, and T. W. Nordeng. 2001. 'Mitotic partitioning of endosomes and lysosomes', *Curr Biol*, 11: 644-51.
- Berry, G. T. 1993. 'Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia.' in M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens and A. Amemiya (eds.), *GeneReviews((R))* (Seattle (WA)).
- Blott, E. J., and G. M. Griffiths. 2002. 'Secretory lysosomes', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 122-31.
- Boustany, R. M. 2013. 'Lysosomal storage diseases--the horizon expands', *Nat Rev Neurol*, 9: 583-98.
- Catterall, W. A. 2010. 'Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology', *Neuron*, 67: 915-28.

- Chen, G., Z. Zhang, Z. Wei, Q. Cheng, X. Li, W. Li, S. Duan, and X. Gu. 2012. 'Lysosomal exocytosis in Schwann cells contributes to axon remyelination', *Glia*, 60: 295-305.
- Dall, E., and H. Brandstetter. 2016. 'Structure and function of legumain in health and disease', *Biochimie*, 122: 126-50.
- Damme, M., T. Suntio, P. Saftig, and E. L. Eskelinen. 2015. 'Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions', *Acta Neuropathol*, 129: 337-62.
- Danon, M. J., S. J. Oh, S. DiMauro, J. R. Manaligod, A. Eastwood, S. Naidu, and L. H. Schliselfeld. 1981. 'Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase', *Neurology*, 31: 51-7.
- De Duve, C., B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, and F. Appelmans. 1955. 'Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue', *Biochem J*, 60: 604-17.
- De Duve, C., and R. Wattiaux. 1966. 'Functions of lysosomes', *Annu Rev Physiol*, 28: 435-92.
- Dennemarker, J., T. Lohmuller, S. Muller, S. V. Aguilar, D. J. Tobin, C. Peters, and T. Reinheckel. 2010. 'Impaired turnover of autophagolysosomes in cathepsin L deficiency', *Biol Chem*, 391: 913-22.
- Durand, S., M. Feldhammer, E. Bonneil, P. Thibault, and A. V. Pshezhetsky. 2010. 'Analysis of the biogenesis of heparan sulfate acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase provides insights into the mechanism underlying its complete deficiency in mucopolysaccharidosis IIIC', *J Biol Chem*, 285: 31233-42.
- Edwardson, J. M. 1998. 'Membrane fusion: all done with SNAREpins?', *Curr Biol*, 8: R390-3.
- Eskelinen, E. L., Y. Tanaka, and P. Saftig. 2003. 'At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins', *Trends Cell Biol*, 13: 137-45.
- Eskelinen, E. L. 2006. 'Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy', *Mol Aspects Med*, 27: 495-502.
- Fernandes Filho, J. A., and B. E. Shapiro. 2004. 'Tay-Sachs disease', *Arch Neurol*, 61: 1466-8.
- Fishilevich, S., R. Nudel, N. Rappaport, R. Hadar, I. Plaschkes, T. Iny Stein, N. Rosen, A. Kohn, M. Twik, M. Safran, D. Lancet, and D. Cohen. 2017. 'GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards', *Database (Oxford)*, 2017.
- Fukuda, M. 1991. 'Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking', *J Biol Chem*, 266: 21327-30.
- Gahl, W. A., N. Bashan, F. Tietze, I. Bernardini, and J. D. Schulman. 1982. 'Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with cystinosis', *Science*, 217: 1263-5.

- Geraldo, N., I. Baurle, S. Kidou, X. Hu, and C. Dean. 2009. 'FRIGIDA delays flowering in Arabidopsis via a cotranscriptional mechanism involving direct interaction with the nuclear cap-binding complex', *Plant Physiol*, 150: 1611-8.
- Gerasimenko, J. V., O. V. Gerasimenko, and O. H. Petersen. 2001. 'Membrane repair: Ca(2+)-elicited lysosomal exocytosis', *Curr Biol*, 11: R971-4.
- Gieselmann, V., A. Hasilik, and K. von Figura. 1985. 'Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro', *J Biol Chem*, 260: 3215-20.
- Jung, J., H. W. Jo, H. Kwon, and N. Y. Jeong. 2014. 'ATP release through lysosomal exocytosis from peripheral nerves: the effect of lysosomal exocytosis on peripheral nerve degeneration and regeneration after nerve injury', *Biomed Res Int*, 2014: 936891.
- Kioumourtzoglou, D., G. W. Gould, and N. J. Bryant. 2014. 'Insulin stimulates Syntaxin 4 SNARE complex assembly via a novel regulatory mechanism', *Mol Cell Biol*, 34: 1271-9.
- Kiselyov, K., J. Chen, Y. Rbaibi, D. Oberdick, S. Tjon-Kon-Sang, N. Shcheynikov, S. Muallem, and A. Soyombo. 2005. 'TRP-ML1 is a lysosomal monovalent cation channel that undergoes proteolytic cleavage', *J Biol Chem*, 280: 43218-23.
- Kornfeld, S., and I. Mellman. 1989. 'The biogenesis of lysosomes', *Annu Rev Cell Biol*, 5: 483-525.
- Laemmli, U.K. 1970. 'Glycine-SDS-PAGE for separation of proteins', *Nature*, 227: 680-685
- Liang, X., G. Xu, Q. Gao, and X. Tao. 2016. 'LKB1 expression reverses the tumorigenicity of L02 cells', *Oncol Rep*, 36: 1055-61.
- Liu, Z., Y. J. Lv, Y. P. Song, X. H. Li, Y. N. Du, C. H. Wang, and L. K. Hu. 2012. 'Lysosomal membrane protein TMEM192 deficiency triggers crosstalk between autophagy and apoptosis in HepG2 hepatoma cells', *Oncol Rep*, 28: 985-91.
- Lubke, T., P. Lobel, and D. E. Sleat. 2009. 'Proteomics of the lysosome', *Biochim Biophys Acta*, 1793: 625-35.
- Luzio, J. P., Y. Hackmann, N. M. Dieckmann, and G. M. Griffiths. 2014. 'The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a016840.
- Malm, D., and O. Nilssen. 2008. 'Alpha-mannosidosis', *Orphanet J Rare Dis*, 3: 21.
- Marques, A. R. A., and P. Saftig. 2019. 'Lysosomal storage disorders - challenges, concepts and avenues for therapy: beyond rare diseases', *J Cell Sci*, 132.
- Masur, S. K., and E. Holtzman. 1969. 'Lysosomes and secretory granules in the normal and autotransplanted salamander pars distalis', *Gen Comp Endocrinol*, 12: 33-9.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague, and W. F. Carey. 1999. 'Prevalence of lysosomal storage disorders', *JAMA*, 281: 249-54.

- Miedel, M. T., K. M. Weixel, J. R. Bruns, L. M. Traub, and O. A. Weisz. 2006. 'Posttranslational cleavage and adaptor protein complex-dependent trafficking of mucolipin-1', *J Biol Chem*, 281: 12751-9.
- Nguyen, T. L., J. Schneppenheim, S. Rudnik, R. Lullmann-Rauch, C. Bernreuther, I. Hermans-Borgmeyer, M. Glatzel, P. Saftig, and B. Schroder. 2017. 'Functional characterization of the lysosomal membrane protein TMEM192 in mice', *Oncotarget*.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J. E. Riggs, S. J. Oh, Y. Koga, C. M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro, and M. Hirano. 2000. 'Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease)', *Nature*, 406: 906-10.
- Paumet, F., J. Le Mao, S. Martin, T. Galli, B. David, U. Blank, and M. Roa. 2000. 'Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment', *J Immunol*, 164: 5850-7.
- Perrotta, C., L. Bizzozero, D. Cazzato, S. Morlacchi, E. Assi, F. Simbari, Y. Zhang, E. Gulbins, M. T. Bassi, P. Rosa, and E. Clementi. 2010. 'Syntaxin 4 is required for acid sphingomyelinase activity and apoptotic function', *J Biol Chem*, 285: 40240-51.
- Perrotta, C., D. Cervia, I. Di Renzo, C. Moscheni, M. T. Bassi, L. Campana, C. Martelli, E. Catalani, M. Giovarelli, S. Zecchini, M. Cozzoli, A. Capobianco, L. Ottobrini, G. Lucignani, P. Rosa, P. Rovere-Querini, C. De Palma, and E. Clementi. 2018. 'Nitric Oxide Generated by Tumor-Associated Macrophages Is Responsible for Cancer Resistance to Cisplatin and Correlated With Syntaxin 4 and Acid Sphingomyelinase Inhibition', *Front Immunol*, 9: 1186.
- Platt, F. M. 2018. 'Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies', *Nat Rev Drug Discov*, 17: 133-50.
- Reczek, D., M. Schwake, J. Schroder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds, and P. Saftig. 2007. 'LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase', *Cell*, 131: 770-83.
- Reddy, A., E. V. Caler, and N. W. Andrews. 2001. 'Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes', *Cell*, 106: 157-69.
- Reinheckel, T., J. Deussing, W. Roth, and C. Peters. 2001. 'Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L', *Biol Chem*, 382: 735-41.
- Reitsma, S., D. W. Slaaf, H. Vink, M. A. van Zandvoort, and M. G. oude Egbrink. 2007. 'The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization', *Pflugers Arch*, 454: 345-59.
- Rodriguez, A., I. Martinez, A. Chung, C. H. Berlot, and N. W. Andrews. 1999. 'cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes', *J Biol Chem*, 274: 16754-9.

- Rodriguez, A., P. Webster, J. Ortego, and N. W. Andrews. 1997. 'Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells', *J Cell Biol*, 137: 93-104.
- Rothaug, M., F. Zunke, J. R. Mazzulli, M. Schweizer, H. Altmeyen, R. Lullmann-Rauch, W. W. Kallemeijn, P. Gaspar, J. M. Aerts, M. Glatzel, P. Saftig, D. Krainc, M. Schwake, and J. Blanz. 2014. 'LIMP-2 expression is critical for beta-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 15573-8.
- Ruivo, R., C. Anne, C. Sagne, and B. Gasnier. 2009. 'Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction', *Biochim Biophys Acta*, 1793: 636-49.
- Saftig, P., and J. Klumperman. 2009. 'Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 623-35.
- Sambri, I., R. D'Alessio, Y. Ezhova, T. Giuliano, N. C. Sorrentino, V. Cacace, M. De Risi, M. Cataldi, L. Annunziato, E. De Leonibus, and A. Fraldi. 2017. 'Lysosomal dysfunction disrupts presynaptic maintenance and restoration of presynaptic function prevents neurodegeneration in lysosomal storage diseases', *EMBO Mol Med*, 9: 112-32.
- Samie, M. A., and H. Xu. 2014. 'Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders', *J Lipid Res*, 55: 995-1009.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 5463-7.
- Savalas, L. R., B. Gasnier, M. Damme, T. Lubke, C. Wrocklage, C. Debacker, A. Jezegou, T. Reinheckel, A. Hasilik, P. Saftig, and B. Schroder. 2011. 'Disrupted in renal carcinoma 2 (DIRC2), a novel transporter of the lysosomal membrane, is proteolytically processed by cathepsin L', *Biochem J*, 439: 113-28.
- Smith, PK et al, R Il Krohn, G T Hermanson, A K Mallia, F H Gartner, MDea Provenzano, E K Fujimoto, N M Goeke, B J Olson, and DC Klenk. 1985. 'Measurement of protein using bicinchoninic acid', *Analytical biochemistry*, 150: 76-85.
- Schröder, B., C. Wrocklage, A. Hasilik, and P. Saftig. 2010a. 'Molecular characterisation of 'transmembrane protein 192' (TMEM192), a novel protein of the lysosomal membrane', *Biol Chem*, 391: 695-704.
- Schröder, B., C. Wrocklage, A. Hasilik, and P. Saftig. 2010b. 'The proteome of lysosomes', *Proteomics*, 10: 4053-76.
- Schwake, M., B. Schroder, and P. Saftig. 2013. 'Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology', *Traffic*, 14: 739-48.
- Shaid, S., C. H. Brandts, H. Serve, and I. Dikic. 2013. 'Ubiquitination and selective autophagy', *Cell Death Differ*, 20: 21-30.
- Shyu, R. Y., C. H. Wang, C. C. Wu, M. L. Chen, M. C. Lee, L. K. Wang, S. Y. Jiang, and F. M. Tsai. 2016. 'Tazarotene-Induced Gene 1 Enhanced Cervical Cell Autophagy through Transmembrane Protein 192', *Mol Cells*, 39: 877-87.

- Spessott, W. A., M. L. Sanmillan, V. V. Kulkarni, M. E. McCormick, and C. G. Giraud. 2017. 'Syntaxin 4 mediates endosome recycling for lytic granule exocytosis in cytotoxic T-lymphocytes', *Traffic*, 18: 442-52.
- Steenhuis, P., J. Froemming, T. Reinheckel, and S. Storch. 2012. 'Proteolytic cleavage of the disease-related lysosomal membrane glycoprotein CLN7', *Biochim Biophys Acta*, 1822: 1617-28.
- Sundler, R. 1997. 'Lysosomal and cytosolic pH as regulators of exocytosis in mouse macrophages', *Acta Physiol Scand*, 161: 553-6.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura, and P. Saftig. 2000. 'Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice', *Nature*, 406: 902-6.
- Watanabe, S., K. Oiwa, Y. Murata, O. Komine, A. Sobue, F. Endo, E. Takahashi, and K. Yamanaka. 2020. 'ALS-linked TDP-43(M337V) knock-in mice exhibit splicing deregulation without neurodegeneration', *Mol Brain*, 13: 8.
- Weber, T., B. V. Zemelman, J. A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T. H. Sollner, and J. E. Rothman. 1998. 'SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion', *Cell*, 92: 759-72.
- Wendeler, M., and K. Sandhoff. 2009. 'Hexosaminidase assays', *Glycoconj J*, 26: 945-52.
- Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser, and K. L. Williams. 1996. 'Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it', *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13: 19-50.
- Wils, H., G. Kleinberger, S. Pereson, J. Janssens, A. Capell, D. Van Dam, I. Cuijt, G. Joris, P. P. De Deyn, C. Haass, C. Van Broeckhoven, and S. Kumar-Singh. 2012. 'Cellular ageing, increased mortality and FTLTDP-associated neuropathology in progranulin knockout mice', *J Pathol*, 228: 67-76.
- Wu, H. J., J. L. Pu, P. R. Krafft, J. M. Zhang, and S. Chen. 2015. 'The molecular mechanisms between autophagy and apoptosis: potential role in central nervous system disorders', *Cell Mol Neurobiol*, 35: 85-99.
- Yoshida, Y., S. Yasuda, T. Fujita, M. Hamasaki, A. Murakami, J. Kawawaki, K. Iwai, Y. Saeki, T. Yoshimori, N. Matsuda, and K. Tanaka. 2017. 'Ubiquitination of exposed glycoproteins by SCF(FBXO27) directs damaged lysosomes for autophagy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 8574-79.
- Zhang, H., X. Fan, R. D. Bagshaw, L. Zhang, D. J. Mahuran, and J. W. Callahan. 2007. 'Lysosomal membranes from beige mice contain higher than normal levels of endoplasmic reticulum proteins', *J Proteome Res*, 6: 240-9.
- Zucker, R. S. 1996. 'Exocytosis: a molecular and physiological perspective', *Neuron*, 17: 1049-55.



# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Wege in und aus dem Lysosomen.....	2
Abb. 3.1: Gene-Targeting Schema zur Generierung von TMEM192 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	17
Abb. 3.2: Generierung der murinen TMEM192-Antikörper.....	18
Abb. 3.3: Aufbau der Komponente für die Semi-Dry Westernblot .....	29
Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Prinzips, das TMEM192-Expressionsmuster durch den indirekten Nachweis von $\beta$ -Galactosidase mithilfe des tm1a-Allels darzustellen.....	35
Abb. 4.1: Charakterisierung der R39T-Mutation .....	38
Abb. 4.2: Einfluss der R39T-Mutation auf die Lokalisation und Dimerisierung des TMEM192 in Überexpression.....	40
Abb. 4.3: Zellmorphologisches Aspekte der R39T-Mutation.....	41
Abb. 4.4: Einfluss der R39T-Mutation auf die biochemischen Eigenschaften des Endosomen-Lysosomen-Systems.....	43
Abb. 4.5: Eigenschaften des murinen TMEM192 unter Überexpressionsbedingungen .....	45
Abb. 4.6: Biochemische Charakterisierung des murinen TMEM192-Proteins mit dem Nachweis eines NTFs.....	46
Abb. 4.7: Analyse des neu entdeckten N-terminalen Fragments (NTF) des TMEM192.....	49
Abb. 4.8: Darstellung der Morphologie von Lysosomen in TMEM192 <sup>-/-</sup> -MEF.....	50
Abb. 4.9: Funktionsanalysen von neu generierten TMEM192 <sup>-/-</sup> -MEF .....	52
Abb. 4.10: Einfluss der TMEM192-Defizienz auf die lysosomalen Exozytose .....	53
Abb. 4.11: Expressionsmuster des murinen TMEM192 .....	55
Abb. 4.12: Phänotypische Untersuchungen an TMEM192 <sup>-/-</sup> -Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen.....	57
Abb. 4.13: Auswirkung des TMEM192-Defizits auf das neuronale System .....	58
Abb. 4.14: Analyse der Milz bei TMEM192-Defizienz.....	59
Abb. 4.15: TMEM192-Defizienz führt nicht zu lysosomaler Akkumulation .....	62
Abb. 5.1: Genexpression in Abhängigkeit des Zelltyps und nach Induktion durch LPS.....	65
Abb. 5.2: Schematische Darstellung möglicher Schnittstelle des murinen NTFs.....	67

# Tabellenverzeichnis

Tab 1.1:	Lysosomale Speichererkrankung aufgrund von defekten lysosomalen Membranproteinen (modifiziert nach Saftig & Klumperman 2009).....	9
Tab 3.1:	Zielkonzentrationen der verwendeten Inhibitoren.....	14
Tab 3.2:	Verwendete Plasmide .....	14
Tab 3.3:	Häufig verwendete Puffer.....	15
Tab 3.4:	Verwendete Zelllinien .....	16
Tab 3.5:	Patientenzelllinien mit der heterozygoten R39T-Mutation und Kontrollzelllinien gesunder Familienmitglieder.....	16
Tab 3.6:	Pipettierschema für die TMEM192-Genotypisierung.....	18
Tab 3.7:	Einstellung für die Multiplex-PCR.....	18
Tab 3.8:	Primäre Antikörper.....	19
Tab 3.9:	Sekundärantikörper .....	20
Tab 3.10:	Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	20
Tab 3.11:	Benötigte DNA-Menge für transiente Transfektion bezogen auf die Größe der Kulturschalen.....	22
Tab 3.12:	Zusammenfassung der Stimulatoren für die Quantifizierung der lysosomalen Exozytose .....	23
Tab 3.13:	Pipettierschema zur Herstellung der SDS-Sammel- und Trenngele .....	29
Tab 4.1:	Durchflusszytometrische Analyse der Zellen von n=4 (Milz, Thymus) oder n=6 (Knochenmark, Lymphknoten).....	60

## **Danksagung**

Hier möchte ich die Möglichkeit nutzen, mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Saftig und meinem Betreuer Prof. Dr. Bernd Schröder für das interessante und vielseitige Thema sowie die hervorragende Betreuung und die fachlichen Anregungen zu bedanken. Insbesondere danke ich meinen Betreuer für seine Geduld, seinen fachlichen Input und seine Mühen, vor allem während des Schreibprozesses. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Saftig am Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel danken, die mir auf meinem Weg mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich für das Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel sowie der AG Saftig bedanken, ohne die ich diese Dissertation nicht ohne weiteres hätte durchführen können.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie und Freunden, die mich während der ganzen Zeit unterstützten und an mich glaubten. Insbesondere möchte ich meinem Freund für seine Ausdauer und das Korrekturlesen in dieser Zeit sowie meiner Schwester für die fachliche Hilfe beim Schreibprozess danken.

# Publikationen

- 04/2017                    Nguyen, T.L., et al., Functional characterization of the lysosomal membrane protein TMEM192 in mice. *Oncotarget*, 2017.
- 12/2015                    Posterpräsentation bei *Tag der Medizinischen Fakultät*, CAU zu Kiel