

**Identifizierung und Charakterisierung
neuer interagierender Proteine der
humanen „vacuolar protein sorting“ Proteine
VPS4A und VPS4B**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Wohlfromm

aus Magdeburg

Düsseldorf

2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent(in): PD Dr. K. Köhler

Korreferent(in): Prof. Dr. J. Hegemann

Tag(e) der mündlichen Prüfung: 5.07.2005

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Überblick der Rezeptor-vermittelten Endocytose	1
1.2.	Die Rezeptor-vermittelte Endocytose und endosomaler Proteintransport in Hefe und Säugerzellen	2
1.3.	Vakuolärer Proteintransport in der Hefe	5
1.4.	Das „Vacuolar Protein Sorting“ Protein 4 – VPS4	6
2.	Fragestellung	11
3.	Material und Methoden	12
3.1.	Verwendete Bakterienstämme, Hefestämme und Säugerzelllinien	12
3.2.	Verwendete Vektoren	13
3.3.	Verwendete Oligonukleotide	15
3.4.	Verwendete Plasmid-Konstrukte	16
3.5.	Allgemeine mikrobiologische und zellbiologische Methoden	18
3.5.1.1.	Kultivierung plasmidtragender Bakterien	18
3.5.1.2.	Bestimmung der Bakterienzeldichte einer Bakteriensuspension	19
3.5.1.3.	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Transformation	19
3.5.2.1.	Kultivierung von Hefezellen	19
3.5.2.2.	Herstellung elektrokompetenter Hefezellen und Transformation.....	21
3.5.3.1.	Kultivierung humaner Zelllinien.....	21
3.5.3.2.	Bestimmung der Lebendzellzahl einer Zellsuspension.....	23
3.5.3.3.	Transfektion höherer eukaryontischer Zellen (HepG2, HeLa)	23
3.5.3.4.	Transfektion und Fixierung der Zellen zur Untersuchung am konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 510)	23
3.6.	Isolierung von Nukleinsäuren	24
3.6.1.	Isolierung von RNA aus HepG2 Zellen	24
3.6.2.	Isolierung von Plasmid – DNA aus <i>E. coli</i>	25
3.6.2.1.	Enzymatische Lyse von <i>E. coli</i>	25
3.6.2.2.	Alkalische Lyse von <i>E. coli</i>	26
3.6.3.	Isolierung großer Plasmid-DNA – VPS4b-P1	26
3.6.4.	Reinigung von DNA aus Restriktionsansätzen, bzw. aus Polymerasekettenreaktionen (PCR) und Isolierung von DNA aus Agarosegelen	27
3.6.5.	Isolierung von DNA aus Hefezellen	28

3.7.	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration mittels photometrischer Messung.....	28
3.8.	Restriktion von DNA mittels TYP II Endonukleasen	29
3.9.	Dephosphorylierung von 5'- DNA-Fragmentenden	29
3.10.	Ligation von DNA-Fragmenten	29
3.11.	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Reverse Transkription (RT).....	29
3.12.	Nachweis von DNA in TBE-Agarosegelen.....	31
3.13.	Isolierung von Proteinen	32
3.13.1.	Isolierung von Proteinen aus Hefezellen	32
3.13.2.	Isolierung von Proteinen aus kultivierten eukaryontischen Zellen	32
3.14.	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
3.15.	Western Blot – „Semi Dry“ Verfahren	34
3.16.1.	Färbung von PVDF Membranen	34
3.16.2.	Färbung von Polyacrylamidgelen	34
3.16.2.1.	Coomassiefärbung.....	34
3.16.2.2.	Sensitive Coomassiefärbung	35
3.17.	Detektion von Proteinen mittels Antikörper.....	35
3.18.	Generierung polyklonaler Antikörper und Untersuchung der Antiseren und Antikörper	37
3.19.	Detektion der Antikörper mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL).....	39
3.20.	Coimmunpräzipitationsanalysen Epitop-markierter VPS4-myc Proteinvarianten und KIAA1-HA, bzw. FYVE1-HA	39
3.21.	Hefe „Two-Hybrid“ Analysen.....	40
4.	Ergebnisse	43
4.1.	Suche nach möglichen Interaktionspartnern der humanen VPS4A und VPS4B Proteine	43
4.2.	Kontrolle der „Two-Hybrid“ Kandidaten <i>FYVE1</i> , <i>KIAA1</i> und <i>KIN17</i>	45
4.2.1.	<i>FYVE1</i>	48
4.2.2.	<i>KIAA1</i>	50
4.2.3.	<i>KIN17</i>	52
4.2.4.	Das PKC-like1 Protein	53

4.2.5.	Das BC-2 (CHMP2A) Protein	53
4.3.	Bestimmung der subzellulären Lokalisation der VPS4A, VPS4B, KIAA1 und FYVE1 Proteine	54
4.3.1.	Subzelluläre Verteilung der VPS4A-, VPS4A ^{E228Q} -, VPS4B- und VPS4B ^{E235Q} -GFP Fusionsproteine	54
4.3.2.	Subzelluläre Verteilung der KIAA1-DsRed und der FYVE1-DsRed Fusionsproteine.....	57
4.3.3.	Subzelluläre Lokalisation des KIAA1-DsRed Fusionsproteins in Abhängigkeit der Wildtyp und dominant-negativen VPS4A-GFP und VPS4B-GFP Proteine.....	59
4.3.4.	Subzelluläre Lokalisation des FYVE1-DsRed Fusionsproteins in Abhängigkeit der Wildtyp und dominant-negativen VPS4A-GFP und VPS4B-GFP Proteine.....	62
4.4.	Generierung von VPS4A, KIAA1 und FYVE1 Antikörper	65
4.5.	Nachweis Epitop-markierter VPS4A/VPS4B, KIAA1 und FYVE1 Proteine	67
4.6.	Biochemischer Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkungen <i>in vivo</i>	70
4.6.1.	Coimmunpräzipitation des VPS4A/VPS4B Interaktionspartners KIAA1	70
4.6.2.	Coimmunpräzipitation des VPS4A/VPS4B Interaktionspartners FYVE1	72
4.7.	Generierung eines dominant-negativen <i>VPS4b</i> ^{E235Q} Allels	74
4.8.	Nachweis der transkriptionellen Aktivität des <i>VPS4b</i> ^{E235Q} Allels	78
5.	Diskussion	80
5.1.	VPS4A/VPS4B Interaktionspartner.....	80
5.2.	Beteiligung der KIAA1 und FYVE1 Proteine am endosomalen Proteintransport.....	86
6.	Zusammenfassung	91
7.	Anhang, Abkürzungen	92
8.	Literaturverzeichnis.....	93

1. Einleitung

1.1. Überblick der Rezeptor-vermittelten Endocytose

Bei der Endocytose handelt es sich um einen zeit-, temperatur-, und energieabhängigen Prozess, der eukaryontischen Zellen zur Aufnahme von extrazellulären Flüssigkeiten und Partikel, sowie der Aufnahme von Plasmamembranbestandteilen durch Invagination (Internalisierung) von Teilen der Plasmamembran dient. Unter der „Flüssig-Phasen“ Endocytose (Pinocytose) versteht man die Aufnahme von extrazellulärem Material ohne Bindung an Zellmembranmoleküle. Sie ist daher nicht limitierend in der „Aufnahmekapazität“. Die Rezeptor-vermittelte Endocytose hingegen ist durch die Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche limitierend und beinhaltet die Internalisierung von membranständigen Rezeptormolekülen nach Ligandenbindung (Munn 2000). Der Prozess der Rezeptor-vermittelten Endocytose ist in Säuger- und in Hefezellen in großen Teilen konserviert. So beobachtete man, dass eine Reihe an der Endocytose beteiligter Säugerproteine in der Hefe analog funktionell aktiv sind (Mulholland et al. 1999). Ferner wurden endocytoseabhängige Kompartimente sowohl in der Hefe, als auch in Säugerzellen identifiziert, die aufgrund ihrer Eigenschaften (pH-Wert im Lumen, subzelluläre Lokalisation) Ähnlichkeiten aufweisen, weshalb auf einen konservierten Mechanismus der Endocytose in der Hefe und in Säugerzellen geschlossen werden kann (Mulholland et al. 1999).

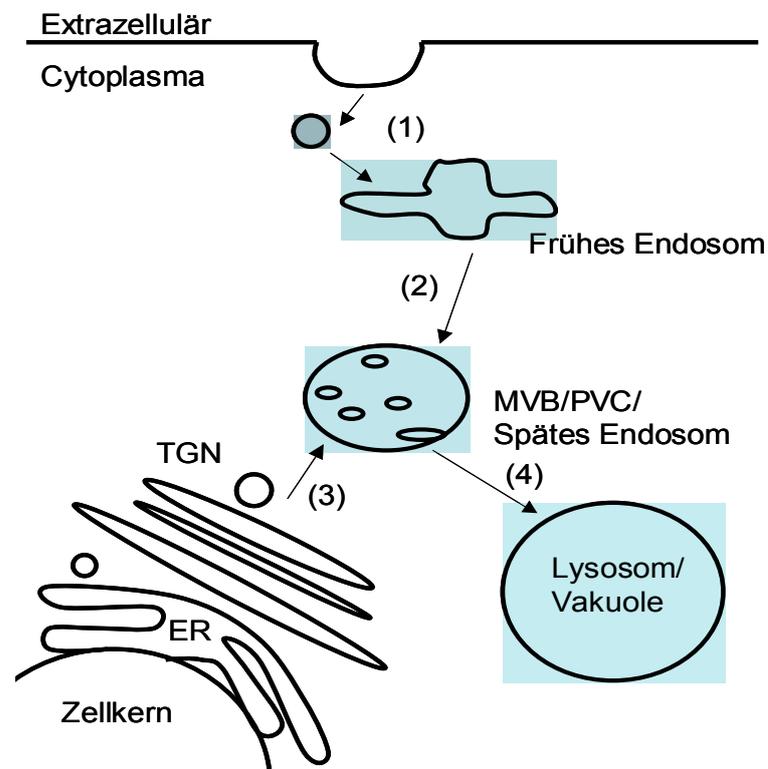


Abb. 1.1.: **Modell der Rezeptor-vermittelten Endocytose in der eukaryontischen Zelle.** Zellmembranrezeptoren und gekoppelte Liganden werden aus der extrazellulären Matrix in Vesikel aufgenommen (1) und über das Fröhhe Endosom zum MVB/PVC transportiert. Enzyme, die zum Abbau der extrazellulären Moleküle benötigt werden, erreichen über den sekretorischen Weg das PVC/MVB (3). Das MVB/PVC reift zum Spätes Endosom. Das zu degradierende Material und die lysosomalen/vakuolären Enzyme werden über das Spätes Endosom in das Lysosom, bzw. in die Vakuole transportiert (4).

In der Abb. 1.1. ist die Rezeptor-vermittelte Endocytose modellhaft dargestellt. Zu Beginn werden Zellmembranproteine (Rezeptoren) und gebundene extrazelluläre Moleküle in Vesikel eingeschlossen und zum Frühen Endosomen transportiert (1). Anschließend erfolgt der weitere Transport der zu degradierenden Proteine zu einem prälysosomalen Kompartiment (MVB – multivesicular body) in Säugerzellen, bzw. prävakuolären Kompartiment (PVC) in der Hefe (2). Auf dieses Kompartiment treffen Vesikel des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) (3). In diesen sekretorischen Vesikeln befinden sich ein Teil neusynthetisierter lysosomaler, bzw. vakuolärer Enzyme, die für die Degradation der internalisierten Proteine notwendig sind. Das MVB/PVC reift zum Späten Endosomen. Das in dem Späten Endosomen befindliche Material (extrazelluläre Partikel, Membranrezeptoren und Enzyme) wird anschließend über den vakuolären/lysosomalen Proteintransport in die Vakuole (Hefe) bzw. in das Lysosomen (Säugerzelle) transportiert. In diesem Kompartiment erfolgt der Abbau der internalisierten Proteine und Moleküle.

1.2. Die Rezeptor-vermittelte Endocytose und endosomaler Proteintransport in Hefe und Säugerzellen

Die grundlegenden Mechanismen der Endocytose in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.) und in Säugerzellen sind weitestgehend aufgeklärt, wobei die Studien einer Reihe von Membran-Rezeptoren zur Erstellung eines Modells beigetragen haben (Katzmann et al. 2002). Die ersten Proteine, welche zur Analyse der Endocytose in der Hefe untersucht wurden, war der α -Faktor bindende Ste2p und der a-Faktor bindende Ste3p Rezeptor. Beide Proteine sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Ste3p und Ste2p besitzen im cytosolisch gelegenen Proteinteil eine konservierte Aminosäuresequenz (NPF-Typ Motiv), die für die Internalisierung notwendig ist (Munn 2000). Ste2p besitzt im cytosolisch gelegenen Proteinteil als Signal zur Internalisierung neben dem „NPF-Typ Motiv“ der Aminosäuresequenz `GPFAD`, eine zusätzliche Aminosäuresequenz `SINNDKSS`, die für die Internalisierung notwendig ist (Bryant und Stevens 1998; Munn 2000). Des Weiteren wurden eine Reihe von Proteinfaktoren identifiziert, die für die Internalisierung bzw. die Ausbildung internalisierender Vesikel (Abb. 1.1. (1)) notwendig sind (End6p, Sjl1p, Sjl2p, Sjl3p, End3p, Pan1p, Ent1p und Ent2p). End3p und Pan1p besitzen eine EH Domäne (**E**ps15 **H**omologe Domäne), die am „NPF-Typ Motiv“ der zu internalisierenden Rezeptoren binden (Munn 2000). Als zusätzliches Internalisierungssignal werden im cytosolisch gelegenen Proteinteil von End3p und Pan1p Serine phosphoryliert und Lysine ubiquitinyliert. Entfernt man die Ubiquitinbindungsstellen, so führt dies zu einem Defekt in der Internalisierung der Rezeptormoleküle. Ebenso verhindert die Blockierung der Lysin-Ubiquitinylierung am Rezeptormolekül Ste2p dessen Internalisierung (Shaw et al. 2001). Dass Ubiquitinylierung eine wesentliche Voraussetzung für die Internalisierung von Membranproteinen ist, wurde auch bei Fur4p gezeigt, welcher eine `PEST`-ähnliche Sequenz besitzt, die für Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und Endocytose wichtig zu sein scheint.

Die am besten untersuchte Rezeptor-vermittelte Endocytose in Säugerzellen (receptor mediated endocytosis) ist die, welche über „Clathrin coated pits“ erfolgt (Cavalli et al. 2001). Amphiphysin, Synaptojanin, Eps15 und Epsin sind mit „Clathrin coated pits“ (CCP) assoziierte

Proteine und fördern die Bildung der CCP. Die CCP assoziierten Proteine sind homologe Proteine zu den entsprechenden Hefeproteinen, die für die Bildung der internalisierenden Vesikel notwendig sind. So ist das Amphiphysin des homologe Säugerprotein zum Hefeprotein End6p. Das Synaptojanin ist homolog zu den Hefeproteinen Sjl1p, Sjl2p und Sjl3p. Das am CCP assoziierte Protein Eps15 ist homolog zu den End3p und Pan1p Hefeproteinen. Das Säugerprotein Epsin ist homolog zu den Hefeproteinen Ent1p und Ent2p. Ähnlich wie in der Hefezelle sind in Säugerzellen ebenfalls mehrere unterschiedliche Signalsequenzen bekannt, die für die Internalisierung von membranständigen Rezeptoren notwendig sind (Alberts et al. 2002). Z.B. besitzt EGFR („epidermal growth factor receptor“) das Sequenz-Motiv 'FTRF', welches für die Assoziation der $\mu 2$ Untereinheit des CCP assoziierten AP-2 Adaptorkomplexes notwendig ist (Di Fiore und Gill 1999). Wie in Hefezellen für Ste2p und Ste3p gezeigt, ist auch für die Internalisierung des EGFR die Monoubiquitylierung eine zwingende Voraussetzung (de Melker et al. 2004).

Sowohl in Hefe wie auch in Säugerzellen erfolgt nach der Ubiquitylierung die Abtrennung des sich durch Invagination gebildeten Vesikels („Clathrin coated Vesikel“ - CCV) von der Zellmembran (Stack et al. 1995). Als Vesikel erfolgt der weitere intrazelluläre Transport von Proteinen von der Zellmembranoberfläche. Dieser Transport endet im Frühen Endosom („Sorting Endosom“), wo die internalisierten Proteine sortiert werden (Abb.1.1. (1)). Zum Einen in die tubulären Auswüchse des Frühen Endosoms, wo sich wiederum Vesikel abschnüren, die das darin enthaltene Material, zumeist die Zellmembranrezeptoren, zurück zur Oberfläche transportieren („Recycling“). Zum Anderen sammeln sich die zu degradierenden Moleküle (Rezeptorliganden) im zentralen Körper an. Dieser zentrale Körper des Frühen Endosomen entwickelt sich zu einem Kompartiment weiter, welches durch Einstülpungen der äußeren Membran innere Vesikel bildet (Abb. 1.1. (2)). In Säugerzellen sind diese Kompartimente als MVB – „Multi Vesicular Body“ beschrieben (Lemmon und Traub 2000). In der Hefe ist das Prävakuläre Kompartiment (PVC) morphologisch ähnlich dem MVB und wird diesem gleichgesetzt. Die Frühen Endosomen liegen peripher unterhalb der Zellmembran. In der Endosomenmembran spielen Phospholipide eine wichtige Rolle in der Regulation/Kontrolle des Membrantransportes zwischen den einzelnen Formen der Endosomen. Sie dienen als Erkennungssequenz für bestimmte Proteindomänen (Overduin et al. 2001). Ein Beispiel ist das Phosphoinositol-3-Phosphat (PI3P), das ein Produkt der PI3P-Kinase Vps34p in der Hefe ist. Eine Mutation (Inaktivierung) dieser Lipidkinase führt zu Störungen des vakuolären Proteintransportes (Stack und Emr 1994). So wird das vakuoläre Enzym Carboxypeptidase Y (CPY) normalerweise über den sekretorischen und vakuolären Proteintransportweg, vom Endoplasmatischem Retikulum über das TGN zur Vakuole transportiert. In einer Vps34p Kinase-inaktiven Hefemutante erfolgt jedoch die Sekretion von CPY ins Medium unter gleichzeitigem Abfall der PI3P Konzentration. In Säugerzellen wurde ebenfalls eine solche PI3P – Kinase identifiziert, jedoch katalysiert sie neben PI3P auch die Bildung von PI3,4P₂ und PI3,4,5P₃ Phospholipiden (Horazdovsky et al. 1995). Das sich aus dem Frühen Endosom entwickelnde MVB/PVC dient vor allem dem Transport von Proteinen, welche für das Lysosom im Säuger bzw. für die Vakuole in der Hefe bestimmt sind.

Aufgrund morphologischer Untersuchungen von Hefemutanten, die einen Defekt im endosomalen Proteintransport zur Vakuole aufweisen (VPS = vacuolar protein sorting), wurden die Hefemutanten aufgrund der morphologischen Veränderung in 6 Klassen (A-F) gruppiert (Banta et al. 1988; Raymond et al. 1992). Dabei stellte sich heraus, dass spezifische VPS Proteine für den intrazellulären Proteintransport verantwortlich sind und eine Inaktivierung dieser Proteine zu den beobachteten morphologischen Veränderungen führt. Eine ausführliche Klassifizierung erfolgte in der Arbeit von Raymond et al. (1992) Tab. 4. Hauptaugenmerk soll auf die VPS Klasse E Proteine gelegt werden. Im Zuge der Entwicklung der MVB, bzw. den nachfolgenden Transport zur Vakuole in der Hefe bzw. zum Lysosomen in der Säugerzelle sind Proteine der VPS Klasse E notwendig. Bei Inaktivierung eines der 17 bisher beschriebenen Klasse E Proteine (Katzmann et al. 2002) bilden sich neue leicht tubuläre, stark vergrößerte Kompartimente aus, die auch als Klasse E Kompartiment bezeichnet werden. Einige Säugerhomologe VPS Klasse E Proteine wurden funktionell analysiert und die Ergebnisse belegten, dass diese Proteine eine zentrale Rolle bei der Bildung/Reifung (Vesikelbildung) von MVB's spielen (Piper und Luzio 2001). Eines dieser Proteine ist Vps4p. Das Hefe Vps4p wurde auch bei der Suche nach Faktoren, die für die Endocytose notwendig sind, identifiziert. In den Untersuchungen wurde *end13-1* isoliert, welches einen Defekt im Endocytosetransport, sowie im vakuolären Proteintransport zeigt. Es konnte gezeigt werden, dass End13p mit Vps4p identisch ist (Zahn et al. 2001). Deletionsmutanten von End13p/Vps4p blockieren den Proteintransport von internalisiertem Farbmaler (FM4-64) und Plasmamembranrezeptoren (Ste2p + α -Faktor) vom Frühen zum Späten Endosom (Zahn et al. 2001).

Mit dem Abschluss der Invagination und Ausbildung der inneren Vesikel im MVB wird dieses Kompartiment dem Späten Endosom zugeordnet. In der Hefe S.c. konnten über subzelluläre Fraktionierung zwei Endosomenfraktionen mit jeweils spezifischer Dichte biochemisch nachgewiesen werden. Internalisierte Moleküle bewegen sich erst durch ein Kompartiment mit höherer Dichte, das dem Frühen Endosom entspricht, und anschließend durch ein Kompartiment mit geringerer Dichte, das dem gereiften PVC/MVB bzw. Späten Endosom entspricht. Für die beiden Endosomfraktionen konnten auch spezifische Phospholipide identifiziert werden. Während PI3P primär am Frühen Endosom konzentriert vorliegt, findet man PI3,5P₂ hauptsächlich am Späten Endosom (Gruenberg 2003). Hierbei ist zu bemerken, dass die Phosphorylierung von PI3P in der Hefe durch die Kinase Fab1p im Zuge der Reifung des Endosoms (interne Vesikelbildung) zum Späten Endosomen erfolgt (Odorizzi et al. 1998).

Vakuolen in der Hefe, wie auch Lysosomen in Säugerzellen sind hydrolytische Kompartimente, die von Lipidmembranen umgeben sind. Diese Organellen beinhalten viele Enzyme, die eine optimale Aktivität im sauren pH-Bereich (~ pH 4) besitzen (Haugh 2002), z.B. saure Hydrolasen. Im Lysosom endet der Transport vom Späten Endosomen zum Abbau von Proteinen und extrazellulärem Material (Luzio et al. 2001) (Abb. 1.1. (4)). Die Art des Transportes der zu degradierenden Proteine vom Späten Endosom zum Lysosom ist noch nicht endgültig geklärt. Es existieren zur Zeit drei Modelle, wobei das Erste einen vesikulären Transport ähnlich der Endocytose und Exocytose über Vesikel postuliert. Das Zweite Modell schlägt einen kurzen „Kiss and Run“ Mechanismus vor, wobei die Proteine in das Lumen des

Lysosom entlassen werden, ohne dass eine Fusion der Organellen stattfindet (Storrie und Desjardins 1996). Das dritte Modell erklärt einen langen „Kiss and Run“ Mechanismus (Luzio et al. 2000). Es erfolgt eine Fusion des Späten Endosom mit dem Lysosom zu einer Hybridorganelle, aus der wiederum das Lysosom hervorgeht. Das dritte Modell wird u.a. unterstützt durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Mullock et al. (1998), in denen Marker aus Lysosom und Endosom in einer Organelle vereint waren. Beteiligt an der Fusion beider Organellen sind VPS Klasse C Proteine (Peterson und Emr 2001).

1.3. Vakuolärer Proteintransport in der Hefe

In der Hefe (*S.c.*) erreichen Proteine die Vakuole durch eine Vielzahl verschiedener Wege. Ein weiterer Weg, neben der Rezeptor-vermittelten Endocytose, ist der Transport von vakuolären Proteinen vom Trans-Golgi-Netzwerk zur Vakuole. Über diesen Weg (Abb. 1.1. (3) + (4)) werden bestimmte Enzyme, welche in der Vakuole aktiv sind, transportiert. Carboxypeptidase Y (CPY) ist ein sehr gut untersuchtes vakuoläres Enzym der Hefe, welches als Exopeptidase C-terminale Aminosäuren abspaltet. CPY repräsentiert modellhaft den in der Hefe stattfindenden vakuolären Proteintransport. CPY erfährt während des Proteintransportes vom Endoplasmatischem Reticulum (ER) zur Vakuole mehrere aufeinanderfolgende posttranslationale Modifikationen (Stack et al. 1995). CPY wird als inaktives Vorläuferprotein preproCPY synthetisiert, das in das Lumen des ER transportiert wird. Innerhalb des ER's erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz. Diese proCPY Form erfährt eine N-Glykosylierung des Kernproteins CPY, womit die Vorform p1CPY entsteht. p1CPY wird anschließend über den Golgi Apparat, wo es weitere Modifikationen durch Oligosaccharidbindungen erhält (p2CPY), dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) überführt. Alle neusynthetisierten sekretorischen Proteine, sowie membranständige Oberflächenproteine (z.B. Rezeptoren wie Ste2p und Ste3p) werden mittels sekretorischer Vesikel vom TGN zur Zelloberfläche transportiert. p2CPY wird jedoch selektiv vom TGN über ein prävakuoläres Kompartiment (PVC) zur Vakuole transportiert. Dazu bindet p2CPY an Vps10p (CPY-Rezeptor) im Trans-Golgi-Netzwerk. Der Rezeptor-Ligand-Komplex erreicht das endosomale prävakuoläre Kompartiment (PVC) mit Hilfe Golgi-basierender Transportvesikel. Im PVC dissoziiert CPY vom Rezeptor ab. Während CPY zur Vakuole weitertransportiert wird, gelangt der Vps10p Rezeptor zurück zum TGN um neues p2CPY zu binden. Dass der Transport von CPY über das PVC erfolgt, zeigten subzelluläre Fraktionierungsstudien, in denen CPY als Markerprotein diente. In diesem Zusammenhang wurde auch das Hefe Vps4p als PVC-assoziiertes Protein charakterisiert. Die Inaktivierung von Vps4p in einer temperatursensitiven *vps4^{ts}* Mutante, führte zur Blockierung des Proteintransportes zur Vakuole von p2CPY, ProteinaseA (PrA) und dem Transmembranprotein CPS (Babst et al. 1997).

Die Inaktivierung von Klasse E VPS Genen führt zur Vergrößerung des PVC, dem Klasse E Kompartiment. Da sich im Klasse E Kompartiment/PVC nicht nur die vakuolären Vorläuferproteine p2CPY, PrA und CPS ansammeln, sondern auch die über Endocytose aufgenommenen Proteine, Ste2p und Ste3p, geht man davon aus, dass das Klasse E Kompartiment/PVC ein zentraler Schnittpunkt im intrazellulären Proteintransport darstellt. Zusätzliche Studien mit Klasse E *vps27*, *vps28* und *vps4* Mutanten deuten darauf hin, dass

Klasse E Mutanten zwar den anterograden Transport vom späten Golgi (TGN) zum PVC nicht beeinflussen, jedoch den retrograden Membrantransport zurück zum Golgi blockieren. Da auch dieser Transport Golgi-residenter Proteine (Vps10p) bei Inaktivierung der Klasse E VPS Proteine blockiert ist, ergibt sich, dass die Klasse E VPS Proteine, wie Vps4p an einer zentralen Schnittstelle des intrazellulären Proteintransport funktionell aktiv sind.

1.4. Das „Vacuolar Protein Sorting“ Protein 4 – VPS4

Ursprünglich wurde das *VPS4* Gen in der Hefe bei der Suche nach vakuolären Proteintransportmutanten (*vps* Mutanten) identifiziert (Raymond et al. 1992) und später charakterisiert (Finken-Eigen et al. 1997; Babst et al. 1998). Das *VPS4* Gen wurde auch bei der Suche nach Endocytosemutanten isoliert und untersucht (*end13-1*) (Munn und Riezman 1994; Zahn et al. 2001). Aufgrund der morphologischen Veränderungen der Hefe bei Inaktivierung von End13/Vps4p wird es den VPS Klasse E Mutanten zugeordnet.

Die VPS Klasse E Mutanten zeichnen sich durch eine Blockade des Proteintransportes am MVB/PVC aus. Eine Übersicht der zur Zeit 17 bekannten VPS Klasse E Proteine ist in Tab. 1.1. dargestellt. Die Inaktivierung eines dieser VPS Klasse E Proteine führt morphologisch zur Bildung eines multilamellaren vergrößerten Organells, dem sogenannten Klasse E Kompartiment. Genauere Untersuchungen zeigten, dass es sich um ein endosomales prävakuoläres/prälisosomales Kompartiment handelt (Rieder et al. 1996).

Hefezellen	Proteindomäne	Komplex	Säugerzellen
Vps32/Stp22	UBC-like, Coiled-coil, Pro-reich	ESCRT-I	Tsg101
Vps28	--	ESCRT-I	VPS28
Vps37	Coiled-coil	ESCRT-I	Unbekannt
Vps22	Coiled-coil	ESCRT-II	Eap30
Vps25	--	ESCRT-II	Eap25
Vps36	Cys-X-X-Cys	ESCRT-II	Eap45
Vps2/Did4/Reb1/Grd7	Hoch geladen, Coiled-coil	ESCRT-III	VPS2/CHMP2
Vps20	Hoch geladen, Coiled-coil	ESCRT-III	VPS20/CHMP6
Vps24	Hoch geladen, Coiled-coil	ESCRT-III	VPS24/CHMP3
Vps32/Snf7	Hoch geladen, Coiled-coil	ESCRT-III	Snf7/CHMP4
Vps27	VHS, FYVE, UIM	Mit Hse1/STAM	Hrs
Hse1	VHS, UIM, SH3	Mit Vps27/Hrs	STAM
Vps4	AAA-ATPase, Coiled-coil	Homomer	SKD1, VPS4
Fti1/Did2	ESCRT-III-like	Unbekannt	CHMP1
Vps60/Mos10	ESCRT-III-like	Unbekannt	CHMP5
Vps31/Bro1/Npl3	Coiled-coil, Pro-reich	Unbekannt	AIP1/ALIX
Vps44/Nhx1	Natrium/Proton Austausch	Unbekannt	SLC9A6

Tab.: 1.1.: **Klasse E VPS Proteine in Hefe- und Säugerzellen** Aufgelistet sind die zur Zeit beschriebenen VPS Klasse E Proteine in Säugerzellen und in Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Katzmann et al. 2002).

Das Hefe Vps4p hat ein Molekulargewicht von 48 kDa. Es trägt N-terminal eine „Coiled-coil“ Domäne (CC) und eine zentrale AAA-Kassette. Beide Domänen sind für die VPS4-Funktion wichtig (Babst et al. 1997; Babst et al. 1998). Eine schematische Darstellung der einzelnen Domänen ist in Abb. 1.2. gezeigt.

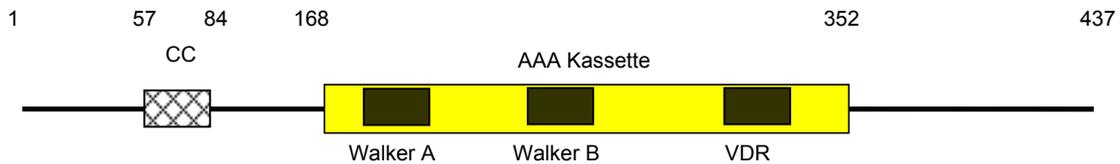


Abb. 1.2.: **Schematische Darstellung des Vps4p Proteins.** Das Vps4p besitzt 437 Aminosäuren. N-terminal befindet sich eine Coiled-Coil (CC) Domäne. Zentral gelegen ist eine AAA-Kassette (ATPase). Die AAA-Kassette beinhaltet das Walker Typ A Motiv (ATP-Bindung), Walker Typ B Motiv (ATP-Hydrolyse) und VDR Motiv (Konformationsänderung).

VPS4 wird aufgrund der konservierten Aminosäuredomäne, sowie aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften zu den AAA-Proteinen gezählt (Babst et al. 1997; Patel und Latterich 1998). AAA steht für „ATPases associated with diverse cellular activities“. Der Name dieser Proteinklasse deutet bereits an, dass es sich um eine relativ heterogene Proteinklasse handelt, die sich neben der ATPase Aktivität durch die konservierte AAA-Domäne auszeichnet. Ein Überblick über die diversen Funktionen der Familienmitglieder veranschaulicht die Abb.1.3.

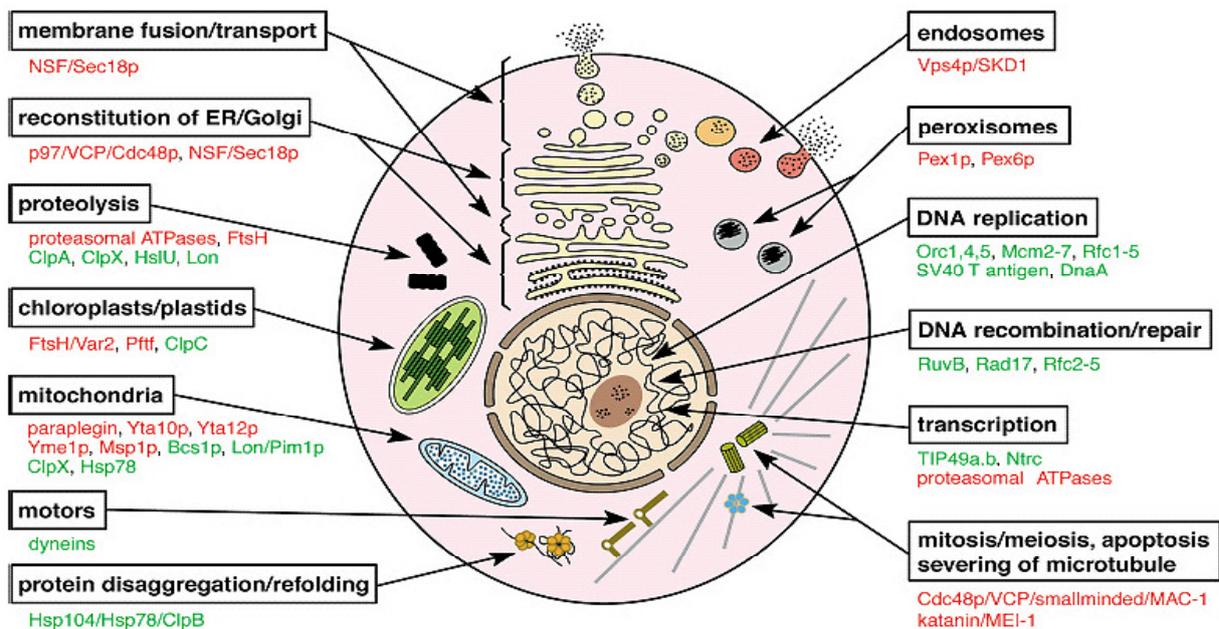


Abb. 1.3.: **Übersicht der AAA+-Superfamilie.** Es ist eine eukaryotische Zelle mit Organellen und makromolekularen Strukturen schematisch dargestellt. Gezeigt sind Beispiele von pro- und eukaryontischen Proteinen der AAA+-Superfamilie (grün). Die AAA-ATPasen sind als Unterklasse rot markiert. Die subzelluläre Lokalisation der AAA+- und AAA-Proteine und die Prozesse, an denen sie beteiligt sind, sind angegeben (Ogura und Wilkinson 2001).

Die konservierte AAA-Domäne erstreckt sich über einen Bereich von 230 bis 250 Aminosäuren, die sich in verschiedene funktionelle Bereiche einteilen lässt (Beyer 1997). Diese Bereiche beinhaltet neben dem Walker Typ A und Walker Typ B Motiv auch ein VDR Motiv (Beyer 1997) (siehe Abb. 1.2). Die Walker A Box dient der Bindung und die Walker B Box der Hydrolyse von ATP. Die VDR Region ist wichtig für die ATP-Hydrolyse abhängige Proteinkonformationsänderung (Zahn et al. 2001). Walker Typ Motive sind ein Charakteristikum der „Walker type“ A/GTPasen.

Die AAA+ Superfamilie ist eine Unterfamilie der „Walker type“ A/GTPasen (Abb.1.3.). Die AAA+ Proteine findet man bei Proteinfaltungsprozessen, Assoziation und Dissoziation von Proteinkomplexen (NSF, VPS4), Proteintransport bzw. Membranfusionsprozesse, sowie auch bei DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparaturmechanismen (Ogura und Wilkinson 2001). Die AAA-ATPasen, wie Vps4p, stellen eine Unterklasse der AAA+ -ATPasen dar (Neuwald et al. 1999). Es gibt Proteine mit ein oder zwei AAA-Kassetten. Das Vps4p Protein besitzt nur eine AAA-Kassette und gehört damit zur TYP I ATPase (Patel und Latterich 1998).

Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Hefe Vps4p als Homo-Oligomeres in der Zelle vorliegt. Cytosolisch vorliegendes Vps4p-Dimer bindet ATP. Dieses ATP-Dimer oligomerisiert in Folge der ATP-Bindung zu einem Decamer (Babst et al. 1998). Kinetische Untersuchungen zeigten, dass dieser Oligomerisierungsgrad wiederum die ATPase Aktivität steigert. Die Hydrolyse des gebundenen ATP's führt zum Zerfall des Decamers in ADP-gebundene Dimere. Im Zytoplasma erfolgt anschließend der ADP → ATP Austausch, worauf der Zyklus von Neuem beginnt (Babst et al. 1998). Welche Proteine diesen Zyklus regeln, bzw. kontrollieren ist nicht bekannt. Die Bindung und ATP-Hydrolyse erfolgen innerhalb der AAA-Kassette von Vps4p. Mutationen in dieser Region führen zu morphologischen Veränderungen in der Hefe. Es häufen sich Proteine im prävakuolären Kompartiment an (Finken-Eigen et al. 1997; Bishop und Woodman 2000; Yoshimori et al. 2000). Die am besten untersuchte Vps4p Mutation ist die E233Q Mutation, die einen Aminosäureaustausch E→Q an Position 233 des Vps4p Proteins zur Folge hat. Dieser Aminosäureaustausch in der AAA-Domäne (Walker Typ B Motiv) führt dazu, dass gebundenes ATP nicht hydrolysiert werden kann. Ein Aminosäureaustausch an Position 179 (K→A) hat zur Folge, dass keine ATP Bindung erfolgen kann. Diese Mutation befindet sich ebenfalls in der AAA-Domäne, allerdings im Walker Typ A Motiv (Babst et al. 1998). Bei der Bestimmung der subzellulären Lokalisation der verschiedenen Vps4p Varianten konnte gezeigt werden, dass Wildtyp Vps4p (ATP-Dimer), sowie Vps4p^{K179A} (ADP-Dimer) zu mehr als 90% cytoplasmatisch vorliegen. Das ATP gebundene Vps4p-Decamer (Vps4p^{E233Q}) liegt Membran-assoziiert in einem größeren Proteinkomplex vor. Dass die „Coiled-Coil“ Domäne für die Anlagerung an größeren Membrankomplexen notwendig ist, zeigen die unterschiedliche Verteilung einer Membran-assoziierten ATPase defizienten Vps4p^{E233Q} Mutante und einer ATPase defizienten Coiled-coil Deletionsmutante (Δ CC) Vps4p ^{Δ CC/E233Q}. Letztere lag cytoplasmatisch vor. Bei weiteren Untersuchungen einer VPS4p ^{Δ CC} CC-Deletionsmutante wurde gezeigt, dass die CC-Domäne für die Assoziation von VPS4p (ATP-gebundener Zustand) an endosomalen Membranen notwendig ist. (Finken-Eigen et al. 1997; Babst et al. 1998).

Bei Maus und Mensch wurden *VPS4* orthologe Gene zur Hefe identifiziert. In der Maus sind es die zueinander paraloge Gene *VPS4a* und *VPS4b* (Beyer et al. 2003). *VPS4b* wird in der Fachliteratur auch als *SKD1* bezeichnet (Yoshimori et al. 2000; Katzmann et al. 2002). Die Proteinsequenzhomologie beider Proteine liegt bei etwa 80%. *VPS4a* ist auf dem Chromosom 8D, *VPS4b* ist auf dem Chromosom 1E3 in der Maus lokalisiert (Beyer et al. 2003).

Humane Zellen besitzen ebenfalls zwei paraloge *VPS4A* und *VPS4B* Gene (Scheuring et al. 2001). *VPS4A* und *VPS4B* sind jeweils auf dem Chromosom 16q22 bzw. 18q21-22 lokalisiert (Beyer et al. 2003). Die Analyse der *VPS4A* und *VPS4B* Proteinsequenzen zeigte, dass sie hochgradig konserviert sind (80%), beide Proteine stimmen zu *VPS4b* (*SKD1*) mit jeweils 79% (*VPS4A*), bzw. 95% (*VPS4B*) in ihrer Sequenz überein. Alle vier Säugerproteine (*VPS4A/B*, *VPS4a/b*) sind zum *Vps4p* Hefeprotein noch bis zu 60% konserviert (Scheuring et al. 2001). Die Expression des *VPS4a* und *VPS4b* Gens konnte in fast allen Geweben nachgewiesen werden (Beyer et al. 2003). So in Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Hoden, nicht jedoch in Milz und Skelettmuskel. Die Expression der beiden murinen *VPS4* Paralogen ist dennoch gewebsspezifisch unterschiedlich, d.h. während z.B. in der Leber die *VPS4b* Expression signifikant höher war als jene von *VPS4a*, so war sie im Hoden genau umgedreht. In anderen Geweben (Herz und Gehirn) war die Expression der beiden Proteine ähnlich stark. Inwieweit die Expressionsunterschiede unterschiedliche Funktionen widerspiegeln ist unklar.

Mit dem Hefe *Vps4p* und dem Säuger *VPS4A* und *VPS4B* Protein wurden auch subzelluläre Lokalisationsexperimente durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle Wildtypformen vorwiegend cytosolisch in der Hefe vorliegen. Die ATPase defizienten Mutanten *VPS4p*^{E233Q}-, *VPS4A*^{E228Q}- und *VPS4B*^{E235Q}-GFP wurden jedoch an prävakuolären/endosomalen Kompartimenten lokalisiert (Scheuring et al. 2001).

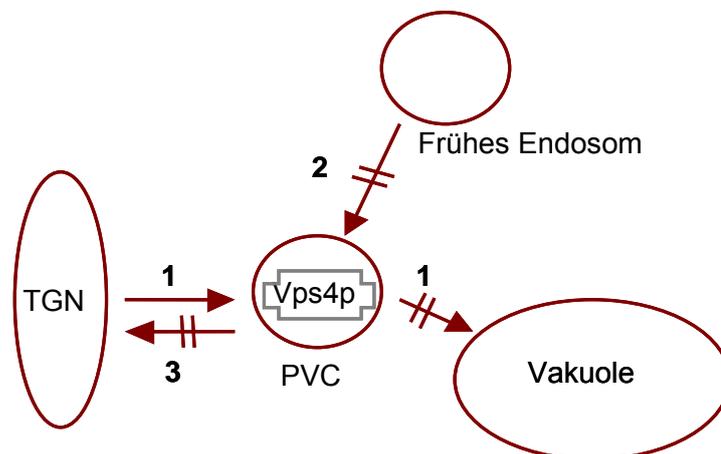


Abb. 1.4.: **Schematische Darstellung des intrazellulären Proteintransportes in der Hefe.** Die durch die Inaktivierung des *Vps4p* Proteins verursachten Blockaden im Proteintransport sind markiert (⚡▶). Das sind der vakuoläre Transport (*CPY*) biosynthetisierter Proteine vom PVC zur Vakuole (1), die Aufnahme von internalisiertem Material (*Ste2p*) in das PVC (2) und der Rücktransport/Recycling vom PVC zum TGN (*Vps10p*) (3). Nach Bryant und Stevens (1998) und Zahn et al. (2001).

Während über die Regulation/Kontrolle der *VPS4* Proteine noch wenig bekannt ist, zeigen Untersuchungen in der Hefe, dass die *Vps4p* Aktivität im Zusammenhang mit weiteren Proteinen zu sehen ist. *Vps24p*, *Vps32p* sind wie *Vps4p* *VPS* Klasse E Proteine. Ähnlich wie

bei Vps4p, findet man bei der Untersuchung der subzellulären Fraktionen sowohl membran-gebundene als auch cytosolische Anteile von Vps24p und Vps32p. In *vps4Δ1* Hefezellen, die keine Vps4p Aktivität besitzen, verlagerte sich der cytosolische Anteil von Vps32p und Vps24p in die Fraktion membrangebundener Proteine (Babst et al. 1998).

Zusätzlich konnte in Immunfluoreszenzexperimenten die Verteilungsveränderungen der beiden Proteine, Vps32p und Vps24p, in einer temperatursensitiven *vps4^{ts}* Hefemutante beobachtet werden. Die zuvor an kleinen punktierten cytoplasmatischen Kompartimenten angelagerten Klasse E Proteine Vps24p und Vps32p häuften sich bei Inaktivierung des temperatursensitiven *vps4^{ts}* Allels an vergrößerten Klasse E Kompartimenten an und dissoziierten von diesen endosomalen Kompartimenten nicht mehr. Es wird deshalb vermutet, dass zur Dissoziation der Vps Klasse E Proteine die Aktivität von Vps4p benötigt wird (Babst et al. 1998).

Auch in Säugerzellen wurde der Einfluss von ATPase defizienten humanen VPS4^{EQ} auf die subzelluläre Verteilung anderer Klasse E VPS Proteine untersucht (Bishop und Woodman 2001). So konnte gezeigt werden, dass die beiden miteinander interagierenden Klasse E VPS Proteine human VPS28 und human TSG101 in einer ATPase defizienten VPS4^{EQ} Mutante von der endosomalen Membran des MVB nicht wieder dissoziieren (Bishop und Woodman 2001).

Die hier aufgeführten und eine Reihe weiterer Untersuchungen zeigen, dass VPS4 Proteine im intrazellulären Proteintransport eine zentrale Rolle spielen. Der Grund hierfür liegt sicherlich in der Tatsache, dass die VPS4 Aktivität an dem Schnittpunkt des endosomalen mit dem lysosomalen/vakuolären Proteintransport benötigt wird. Ein funktioneller Ausfall des VPS4 Proteins beeinträchtigt deshalb nicht nur den sekretorischen (CPY, PrA, CPS) (Abb. 1.4. (1)), sondern auch die rezeptorvermittelte Endocytose (Ste2p) (Abb. 1.4. (2)), sowie den Recyclingprozess vom PVC (Vps10p) zum TGN (Abb.1.4. (3)).

2. Fragestellung

Innerhalb des intrazellulären, lysosomalen/endosomalen Proteintransportweges wird dem VPS4 Protein eine zentrale Funktion zugeschrieben. Besonders intensiv ist das Hefe Vps4p Protein untersucht worden, so dass bereits mehrere Hefe Vps4p Interaktionspartner beschrieben werden konnten. Im Gegensatz zur Hefe sind in Säugerzellen 2 paraloge VPS4-Proteine, VPS4A und VPS4B, nachgewiesen. Aus dieser Tatsache ergibt sich die Fragestellung, welche Interaktionspartner der humanen VPS4A und VPS4B Proteine im Säugersystem nachgewiesen werden können. Außerdem stellt sich die Frage, ob diese putativen Interaktionspartner spezifisch nur mit einem der beiden paralogen VPS4 Proteine oder unabhängig davon, mit beiden humanen VPS4A und VPS4B Proteinen interagieren.

Um das aufgezeigte Aufgabenfeld effizient bearbeiten zu können, war geplant, Interaktionspartner einer „Two-Hybrid“ Suche zu isolieren und zu identifizieren. Als Ankerproteine dieser „Two-Hybrid“ Suche wurden sowohl VPS4B, als auch die dominant-negative VPS4A^{E228Q} Proteinvariante benutzt. Einer umfassenden genomweiten Suche nach potentiellen Interaktionspartnern wurde durch den Einsatz einer foetalen humanen cDNA Bibliothek Rechnung getragen.

Neben der Identifizierung putativer VPS4-Interaktionspartner lag ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der *in vivo* und *in vitro* Verifikation der Ergebnisse aus den „Two-Hybrid“ Untersuchungen. Dies umfasst einerseits die subzelluläre Verteilung transgen exprimierter Wildtyp und dominant-negativer VPS4A und VPS4B Proteinvarianten, sowie die der potentiellen Interaktionspartner. Dabei wird der Fokus auf eine mögliche Veränderung der subzellulären Verteilung durch eine gegenseitige Beeinflussung der exprimierten VPS4 Proteine und ihrer Interaktionspartner gelegt. Andererseits soll durch Generierung polyklonaler Antikörper die spezifische Detektion der endogenen VPS4A und VPS4B Proteine und der Interaktionspartner ermöglicht werden. Als Bestätigung der physikalischen Wechselwirkungen war geplant die Coimmunpräzipitation heranzuziehen.

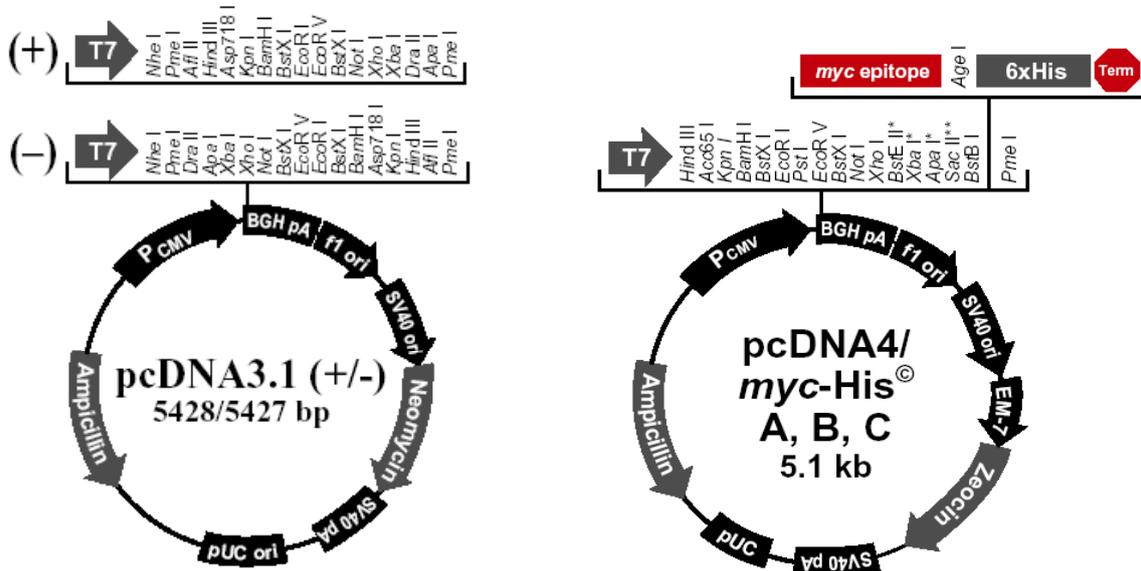
Die sich anschließenden Arbeiten werden die funktionelle Analyse des murinen *VPS4b* Gens im Tiermodell in den Vordergrund stellen. Im Vorfeld zu diesen Untersuchungen erfolgt die Generierung eines dominant-negativen *VPS4b*^{E235Q} Allels auf der Basis des kompletten genomischen *VPS4b* Locus (ca. 70 kbp) in einem pPAC4 Klon, um nach Verifikation der transkriptionellen Aktivität die Generierung transgener *VPS4b*^{E235Q} Mäuse voran zu treiben .

3. Material und Methoden

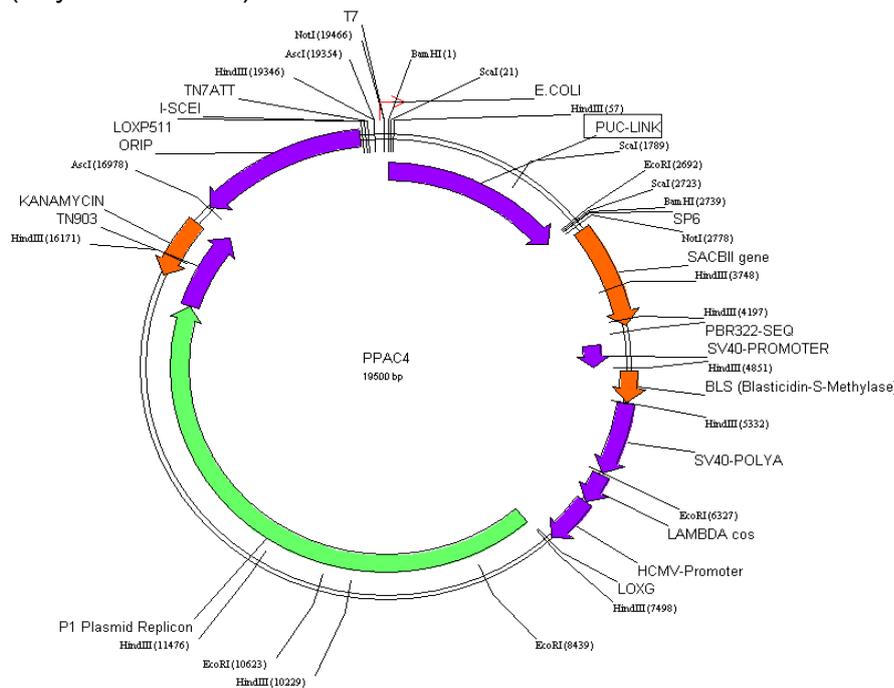
3.1. Verwendete Bakterienstämme, Hefestämme und Säugerzelllinien

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Firma; Ort
JM109	<i>e14⁻ (mrcA) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk⁻ mk⁺) supE44 relA1Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^q ZΔM15]^c</i>	Stratagene; Heidelberg, Deutschland
XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk⁻ mk⁺) subE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10(Tet^r)]^c</i>	Stratagene; Heidelberg, Deutschland
DH5α	<i>F⁻ deoR recA1 endA1 hsdR17(rk⁻ mk⁺) supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Clontech; Palo Alto, USA
DH10B	<i>F⁻ mcrA endA1 recA1 deoR Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80Δ lacZΔM15 ΔlacX74 Δ(ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL</i>	Clontech; Palo Alto, USA
BJ5183	<i>endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str^r)</i>	Qbiogene; Heidelberg Deutschland
BL21DE3	<i>F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte argU ileY leuW Cam^r</i>	Stratagene; Heidelberg, Deutschland
Hefestamm	Genotyp	Firma; Ort
PJ 69-2A	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-Δ901, leu2-3,112, gal4Δ, gal80Δ, YS2::GAL1_{UAS}GAL1_{TATA}-HIS3(rk⁻ mk⁺) GAL2_{UAS}- GAL2_{TATA}- ADE2 (James et al. 1996)</i>	Clontech; Palo Alto, USA
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4, gal80, met⁻, URA3 :: GAL1_{UAS} -GAL1_{TATA} - lacZ MEL1</i>	Clontech; Palo Alto, USA
BHY10	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 leu2-3 12::pBHY11 (CPY-Inv LEU2)</i>	(Horazdovsky et al. 1994)
Säugerzelllinie		Firma; Ort
HepG2	human hepatocellular carcinoma (ACC180)	DSMZ; Braunschweig, Deutschland
HeLa	human cervix carcinoma (ACC 57)	DSMZ; Braunschweig, Deutschland

Für die Coimmunpräzipitationsexperimente wurden die Säugerexpressionsvektoren pcDNA3.1(+) (Expression des FYVE1-HA, bzw. KIAA1-HA Fusionsproteins) und pcDNA4/myc-His C für die VPS4-myc Fusionsproteine benutzt.



Die Generierung des dominant-negativen *VPS4b*^{E235Q} Allels basierte auf dem P1-VPS4 Klon. Dieser besteht aus dem pPAC4 Plasmid (künstliches Phagen Chromosom = PAC) und dem ca. 70 kB großen Wildtyp *VPS4b* Allel, welches in die „PUC Link“ Region integriert wurde (Beyer et al. 2003).



Weitere verwendete Vektoren waren pJD302 (Dohmen et al. 1995), pRS426 (2μ) und pRS316 (CEN) (Sikorski und Hieter 1989).

3.3. Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz
ADGal4	5'-TACCACTACAATGGATG-3'
ADRev	5'-GTGCACGATGCACAGTTG-3'
VPS4b2r	5'-ATTGGAAAGTGTCTTGCAATCCAACAATCCTACCTTGCATTTGAACCA GGA ACTCCGT-3'
VPS4b2f	5'-G TTCAGGAGCTGAGCTTTACTTTCTCTTCGTAGACTGGTTAAGAACT TATTCCAGCTTG-3'
Vps4amprev	5'-TTGAACCAGGAACTCCGTCTTAATTCTCCGTGCAGCCTCGCTCTCAT TCGGATCCGGTCTGACAGTTACCAATGC-3'
Vps4ampfw	5'-AAGAACTTATTCCAGCTTGCCAGAGAGAACAAGCCTTCTATCATCTTC AAGCTTGCGCGGAACCCCTATTTG-3'
Skd20	5'-GCAGCATAAACATGTTCTT-3'
G27	5'-GAGGCTGTGATTCTGCCTA-3'
h1b12	5'-CTTTCACTGGCTTCTGTGC-3'
h1b17	5'-CGATAGATCTGGCTAGC-3'
SKD1a-Eco	5'-CGGAATTCATGACAACGTCAACCCTCCAG-3'
h1aAspneu	5'-GTATGGGTACCCACTCTCTTGCCCAAAGTCCTCTG-3'
topo3-h1b	5'-GGCCTTCTTGACCAAATC-3'
h1b-Eco	5'-CGCGCGAATTCATGTCATCCACTTCGCCCAACCTCCAG-3'
KIA-Eco	5'-GCGCAGAATTCATGCTGGGCTCTGGA-3'
KIA-Asp2	5'-GCGCAGGTACCCTGTTTTCTTTTCAGCTCTTCAAAC-3'
PCUP	5'-GACTACCAACGCAATATGG-3'
Kia-Kpn-rev	5'-CATCGTATGGGTACCGCTGTTTTTC-3'
KIA1	5'-TGTAACGAATTCATGCTGG-3'
huAEcoRI	5'-GCCCTTCGGAATTCATGACAACGTCAAC-3'
huAKpnl	5'-CCCTTGTATGGGTACCGACTCTTGCCC-3'
huBEcoRI	5'-CCCTTCGCGCGAATTCATGTCATCC-3'
HuBKpnl	5'-CCCGGTACCGGCCGCACTGTGCTGGATATC-3'
FYVE-Eco	5'-GACGGAATTCATGGAGAGTAGGTGCTAC-3'
FYVE-Asp	5'-GTATGGGTACCGAGTGCTCTTGGCCTGCACG-3'
HA-Tcyc-rev	5'-CAAGGATCCTCTAGACTGCATAG-3'
FYVE-Mix-fw	5'-GTGTGGCAGCCTTGGAAGCCAA-3'
FYVE-Mix-rev	5'-CTTGTTCTCCTGGCGGAGTCGT-3'

3.4. Verwendete Plasmid-Konstrukte

Die entsprechenden DNA-Bereiche wurden mittels genspezifischen Oligonukleotiden (siehe 3.3.) amplifiziert und/oder nach Restriktionsverdau in die entsprechenden Vektoren subkloniert.

Plasmid-Konstrukt	Klonierungsstrategie →	in Vektor	Kapitel
pVPS4A-GFP	1. PCR Amplifikation Primerpaar SKD1a-Eco/h1aAspneu auf pVPS4-A[HA2], 2.anschließend TOPO Klonierung (1,32 kbp)	pcDNA3.1/ CT - GFP-TOPO	4.3.
pVPS4B-GFP	1. PCR Amplifikation Primerpaar topo3-h1b/h1bEco auf pVPS4-B[HA2], 2.anschließend TOPO Klonierung (1,34 kbp)	pcDNA3.1/ CT - GFP-TOPO	4.3.
pVPS4A^{E228Q}-GFP	1. PCR Amplifikation Primerpaar SKD1a-Eco/h1aAspneu auf pVPS4-A ^{E228Q} [HA2], 2.anschließend TOPO Klonierung (1,32 kbp)	pcDNA3.1/ CT - GFP-TOPO	4.3.
pVPS4B^{E235Q}-GFP	1. PCR Amplifikation Primerpaar topo3-h1b/h1bEco auf pVPS4-B ^{E235Q} [HA2], 2.anschließend TOPO Klonierung (1,34 kbp)	pcDNA3.1/ CT - GFP-TOPO	4.3.
pVPS4A-myc	1. PCR Amplifikation Primerpaar huAEcoRI/huAKpnl auf pVPS4A - GFP in pECFP-N1 (Restriktion <i>EcoRI/KpnI</i>) anschließend 2. <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> Restriktion (1,34 kbp)	pcDNA4/ myc-HIS C	4.6.
pVPS4B-myc	1. PCR Amplifikation Primerpaar huBEcoRI/huBKpnl auf pVPS4b - GFP in pECFP-N1 (Restriktion <i>EcoRI/KpnI</i>) anschließend 2. <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> Restriktion (1,36 kbp)	pcDNA4/ myc-HIS C	4.6.
pVPS4A^{E228Q}-myc	1. PCR Amplifikation Primerpaar huAEcoRI/huAKpnl auf pVPS4A ^{E228Q} -GFP in pECFP-N1 (Restriktion <i>EcoRI/KpnI</i>) anschließend 2. <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> Restriktion (1,34 kbp)	pcDNA4/ myc-HIS C	4.6.
pVPS4B^{E235Q}-myc	1. PCR Amplifikation Primerpaar huBEcoRI/huBKpnl auf pVPS4B ^{E235Q} -GFP in pECFP-N1 (Restriktion <i>EcoRI/KpnI</i>) anschließend 2. <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> Restriktion (1,36 kbp)	pcDNA4/ myc-HIS C	4.6.
pVPS4-A-BD	siehe Scheuring et al. 2001	pGBT9	4.2.
pVPS4-B-BD	siehe Scheuring et al. 2001	pGBT9	4.2.
pVPS4-A^{E228Q}-BD	siehe Scheuring et al. 2001	pGBT9	4.2.
pVPS4-B^{E235Q}-BD	siehe Scheuring et al. 2001	pGBT9	4.2.
pVPS4-A[HA2] (Hefe)	siehe Scheuring et al. 2001	pRS426	4.4.
pVPS4-A^{E228Q}[HA2] (Hefe)	siehe Scheuring et al. 2001	pRS426	4.4.
pVPS4-B[HA2] (Hefe)	siehe Scheuring et al. 2001	pRS426	4.4.
pVPS4-B^{E235Q}[HA2] (Hefe)	siehe Scheuring et al. 2001	pRS426	4.4.
pVPS4-A-CHA	Siehe Scheuring et al. 2001	pJD302	--
pACT2-cDNA-AD	cDNA Bibliothek (mRNA Pool von 9 Gehirnen männlich/weiblich Föten 20.-25. Woche), kloniert in pACT2 (Fa. Clontech)	pACT2	4.1.

Plasmid - Konstrukt	Klonierungsstrategie →	in Vektor	Kapitel
pFYVE1-CHA	1. PCR Amplifikation Primerpaar FYVE-Eco/FYVE-Asp auf Two-Hybrid Klon pACT2 - #13-AD anschließend 2. <i>EcoRI</i> / <i>Asp718</i> Restriktion (987 bp)	pVPS4-A-CHA (pJD302)	4.2.
pFYVE1-DsRed	1. PCR Amplifikation Primerpaar FYVE-Eco/FYVE-Asp auf Two-Hybrid Klon pACT2 - #13-AD anschließend 2. <i>EcoRI</i> / <i>Asp718</i> Restriktion (987 bp)	pDsRed1-N1	4.3.
pFYVE1[HA2] (Hefe) pFYVE1[HA1] (Hefe)	1. pFYVE1-CHA anschließend 2. <i>HindIII</i> Restriktion (1,97 kbp)	pRS426; pRS316	4.4.
pFYVE1-HA (Zellkultur)	1. pFYVE1[HA2] (Hefe) anschließend 2. <i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i> Restriktion (1,06 kbp)	pcDNA3.1 (+)	4.6.
pKIAA1-CHA	1. HaCaT cDNA PCR Amplifikation Primerpaar Kia-Eco/Kia-Asp2 anschließend 2. <i>EcoRI</i> / <i>Asp718</i> Restriktion (1,095 kbp)	pVPS4-A-CHA (pJD302)	4.2.
pKIAA1[HA2] (Hefe) pKIAA1[HA1] (Hefe)	1. pKIAA1-CHA anschließend 2. <i>HindIII</i> Restriktion (2,16 kbp)	pRS426; pRS316	4.4.
pKIAA1-DsRed	1. pKIAA1[HA2] (Hefe) anschließend 2. <i>EcoRI</i> / <i>KpnI</i> Restriktion (1,095 kbp)	pDsRed1-N1	4.3.
pKIAA1-HA (Zellkultur)	1. PCR Amplifikation Primerpaar Kia1/HA-Tcyc-rev auf pKIAA1[HA2], anschließend 2. <i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i> Restriktion (1,17 kbp)	pcDNA3.1 (+)	4.6.
pP1-VPS4b	Genomrestriktion, ca 70 kDa <i>VPS4b</i> -Gen in "PUC Link" von pPAC4 (RZPD)	pPAC4	4.7.
pP1-VPS4b-Amp^{Res}	1. PCR Amplifikation Primerpaar Vps4ampfw/Vps4amprev auf pACT2 (1,107 kbp) 2. homologe Rekombination in BJ5183	P1-VPS4b	4.7.
pP1-VPS4b^{E235Q}	1. PCR Amplifikation Primerpaar VPS4b2f / VPS4b2r auf VPS4b ^{E235Q} cDNA (215 bp) 2. homologe Rekombination in BJ5183	P1-VPS4b-Amp ^{Res}	4.7.

3.5. Allgemeine mikrobiologische und zellbiologische Methoden

3.5.1.1. Kultivierung von plasmidtragenden Bakterien

E. coli Bakterienkulturen wurden durch Animpfen antibiotikahaltiger Flüssigmedien kultiviert. Es erfolgte eine Inkubation im Schüttler (Fa. GFL 3033) bei 37°C und 200 rpm über Nacht (ca. 16 Stunden). Zur mittelfristigen Lagerung von Kulturen wurden diese durch Ausstreichen einer Einzelkolonie oder Flüssigkultur auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusatz gehalten. Hier erfolgte die Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und anschließender Lagerung bei 4°C.

Medien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterien

LB-Flüssigmedium	1 % (w/v) Bacto-Trypton
	0,5 % (w/v) Hefe Extrakt
	0,5 % (w/v) NaCl
LB-Agar	1 L LB-Medium
	15 g Bacto-Agar
2xYT-Medium	1,6 % (w/v) Bacto-Trypton oder Bacto-Pepton
	1 % (w/v) Hefe Extrakt
	0,5 % (w/v) NaCl
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton
	0,5 % (w/v) Hefe Extrakt
	0,5 % (w/v) NaCl
	2,5 mM KCl
	mit NaOH auf pH 7.0 einstellen
	10 mM MgCl ₂ ,
	10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
Antibiotika-Konzentration	
in Medien/Agar	Ampicillin 100 µg/mL
	Tetracyclin 25 µg/mL
	Kanamycin 50 µg/mL

Lagerung und Rekultivierung von Bakterien

Für die längerfristige Lagerung und Stammsicherung wurden Glycerinkulturen angefertigt. Dazu wurden über Nacht in Flüssigmedium gewachsene Kulturen mit Glycerin (25% Endkonzentration) versetzt und bei -80°C in einem Kryokonservierungsröhrchen gelagert. Die Rekultivierung erfolgte durch Ausstreichen der eingefrorenen Zellen auf Festmedium.

3.5.1.2. Bestimmung der Bakterienzellichte einer Zellsuspension

Die Bestimmung der optischen Dichte einer Bakteriensuspension erfolgte am Spektralphotometer UV-160A (Fa. Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}), wobei der Wert $OD_{600}=1$ (eine Adsorptionseinheit) einer Dichte von etwa 8×10^8 Zellen entspricht (Näveke und Tepper 1979).

3.5.1.3. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen und Transformation

Für die Transformation von *E. coli*-Zellen (XL1 Blue, DH10B) mit Plasmid-DNA wurden diese wie folgt vorbereitet: Vom entsprechendem Bakterienstamm wurde eine stationäre Vorkultur 1:100 in 1 L LB Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,5 - 0,7 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (15 min, 4°C, 4000xg). Alle weiteren Schritte erfolgten mit eiskühlten Flüssigkeiten und auf Eis. Die Zentrifugationen erfolgten bei 0 - 4°C. Das Zellpellet wurde in 1 Liter Aqua Bidest (steril, eiskalt) resuspendiert und wieder zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 mL 10% Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 20 mL 10% Glycerin wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 10% Glycerin (Endvolumen 2 - 3 mL) aufgenommen. Die Zelldichte lag bei einem OD_{600} Wert zwischen 2 - 3. Je 50 μ L dieser Zellsuspension wurden für die Elektroporationsansätze eingesetzt oder bei -70°C eingelagert.

Die Transformation (Elektroporation) erfolgte mit dem Gene Pulser (Fa. BioRad) und den Einstellungen 25 μ F, 200 Ω und 2,5 kV unter Verwendung eiskühlter 0,2 cm Küvetten. 50 μ L der Zellsuspension und maximal 5 μ L DNA-Niedrigsalzlösung (unterschiedlicher Konzentration) wurden eingesetzt. Nach Zugabe der DNA wurde die gemischte Zellsuspension 5 min auf Eis inkubiert, in Elektroporationsküvetten überführt und anschließend der Stromimpuls gegeben. Anschließend wurden die Bakterien sofort in 1 mL SOC-Medium (eiskalt) resuspendiert und anschließend im Schüttler bei 37°C und 200 rpm für 1h geschüttelt. Es wurden verschiedene Verdünnungen auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank (Fa. Nunc) bei 37°C inkubiert.

3.5.2.1. Kultivierung von Hefezellen

Flüssigkulturen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden durch das Animpfen von Einzelkolonien in Flüssigmedium (YPD-Vollmedium bzw. SD-Minimalmedium) erzeugt. Es erfolgte eine Inkubation im Schüttler (Fa. GFL 3033) bei 30°C und 200 rpm. Zur Kupfer-induzierten Expression von Proteinen (VPS4-A[HA2], FYVE1[HA2], KIAA1[HA2]) wurden die Hefeklone von Selektionsplatten in 10 mL YPF-Medium mit 25 μ M $CuSO_4$ (Endkonzentration) übertragen und über Nacht bei 30°C kultiviert. Die Kultivierung einer Einzelkultur auf Agarplatten erfolgte durch Ausstreichen einer Einzelkolonie oder Flüssigkultur. Es erfolgte die Inkubation bei 30°C.

Medien und Lösungen zur Kultivierung von Hefen

YPD-Flüssigmedium	2% Pepton 1% Hefe Extrakt 2% Glukose 2% Agar (für Platten)
YPF-Flüssigmedium (Kupferinduktion)	wie YPD jedoch mit 2% Fructose, statt Glukose zusätzlich 25 µM CuSO ₄ (Endkonzentration)
Hefestockmedium	wie YPD Flüssigmedium + 0,003% Adeninsulfat + 13,05% Glyzerin
SD-Minimalmedium (Selektionsmedium)	Für selektives Wachstum von Hefen 6,7% Difco Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren 2% Glukose Drop Out Mix Zugabe 2 mM 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) bei 3-AT-Medien nach dem Autoklavieren

Drop Out Mix

Der Drop Out Mix wurde entsprechend dem Protokoll (Matchmaker „Two-Hybrid“ 2, Fa. Clontech) zusammengesetzt. Er besteht aus einem Gemisch aller für das Hefewachstum benötigten Aminosäuren und Nukleoside. Ausgenommen waren jeweils die Aminosäuren/Nukleoside, die durch die Transformation erhaltene vektorbasierte genetische Information auxotroph produziert werden und daher als Selektionsmarker fungieren. Je nach Selektion wurde ein Drop Out Mix dem Selektionsmedium beigelegt:

L-Adenin, Hemisulfat Salz	2 mg/L Medium
L-Histidin-HCl Monohydrat	2 mg/L Medium
L-Leucin	10 mg/L Medium
L-Tryptophan	2 mg/L Medium

Für die Sicherung von Einzelkulturen auf Selektionsplatten wurden stets 20 g Bactoagar/Liter Selektionsmedium hinzugegeben.

Lagerung von Hefekulturen

Die mittelfristige Lagerung von Hefezellen erfolgte bei 4°C auf Agarplatten. Für die Sicherung von Stämmen wurden Glycerinkulturen erstellt. Dazu wurde nach Wachstum der Zellen in YPD-Vollmedium bis zu einer Dichte von 5x10⁸ Zellen, die Zellen vom Medium durch Zentrifugation (5 min, 4000xg) getrennt und anschließend in 1 mL Hefestockmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C in entsprechenden

Kryokonservierungsröhrchen. Die Reaktivierung erfolgte durch Ausstreichen der Kulturen auf YPD-Vollmedium-Agarplatten und Kultivierung bei 30°C.

Hefeeinfriermedium für elektrokompetente Hefezellen (zur Lagerung - 20°C)

1 M Sorbitol

3% Ethylenglykol

5% DMSO

3.5.2.2. Herstellung elektrokompetenter Hefezellen und Transformation

Für die Transformation von Hefestämmen (PJD69-2A/Y187 und BHY10) mit Plasmid-DNA wurden diese wie folgt vorbereitet: Über Nacht wurde in 50 mL YPD-Medium eine Flüssigkultur durch Inokulation einer Einzelkolonie angezogen. Anschließend erfolgte die weitere Inkubation in 500 mL YPD-Medium mit einer Anfangszelldichte von $OD_{600} = 0,3$ bei 30°C. Nach Erreichen einer OD_{600} von 1,5 - 1,7 wurden die Kulturen auf Eis abgekühlt. Es erfolgte eine Sedimentierung der Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4000xg, 4°C). Alle weiteren Schritte erfolgten mit eisgekühlten Flüssigkeiten und auf Eis. Die Zentrifugation erfolgte bei 0 - 4°C. Nach der Sedimentierung wurde das Zellpellet in 500 mL Aqua Bidest (steril) resuspendiert. Anschließend wurde wiederum zentrifugiert, in 250 mL 1 M Sorbitol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Schritt wurde mit 20 mL Hefeeinfriermedium wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 μ L Hefeeinfriermedium aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden zu je 100 μ L aliquotiert und bei -80°C gesichert. Für unmittelbar folgende Transformationen wurden die neu angezogenen Zellen nicht mit Hefeeinfriermedium behandelt, sondern mit 1 M Sorbitol. 100 μ L Zellsuspension wurden für die Transformation direkt verwendet. Tiefgefrorene Zellen (100 μ L) wurden mit 1 mL eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen, zentrifugiert (4°C, 5000xg, 5 min) und auf 100 μ L Endvolumen in 1 M Sorbitol resuspendiert. Die Transformation erfolgte mit dem Gene Pulser (Fa. BioRad) und den Einstellungen 25 μ F, 200 Ω und 1,5 kV unter Verwendung eisgekühlter 0,2 cm Elektroporationsküvetten. Grundsätzlich wurden 100 μ L Zellsuspension und maximal 10 μ L DNA-Niedrigsalzlösung (unterschiedlicher Konzentration) eingesetzt. Die DNA-haltige Suspension wurde 5 min auf Eis inkubiert, in die Elektroporationsküvetten überführt, elektroporiert und sofort in 1 mL 1 M Sorbitol (eiskalt) resuspendiert. Es erfolgte die Inkubation im Schüttler bei 30°C und 200rpm. Nach 10 min wurden entsprechende Verdünnungen auf Selektionsplatten ausgestrichen und über 2 - 5 Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

3.5.3.1. Kultivierung humaner Zelllinien

HeLa Zellen und HepG2 Zellen sind adherent als sogenannte Monolayer wachsende Zellen. HepG2 bilden zusätzlich bei längerer Inkubation teilweise mehrschichtige Kolonien. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm² kultiviert. Die Inkubation

erfolgte in einem Zellkulturbrutschrank (Fa. Nunc) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂.

Als Medium wurde 90% RPMI 1640 und 10% FCS verwendet, welches vor Zugabe vorgewärmt (37°C) wurde. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% passagiert. Dies erfolgte durch Trypsinierung der Zellen. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1xPBS gespült. Anschließend wurde 1xTrypsin/EDTA (verdünnt mit 1xPBS) hinzugefügt. Es erfolgte die Inkubation bei 37°C für 5 - 10 min. Durch Zugabe von frischem Medium wurde die Trypsinierung der Zellen gestoppt. Durch Schütteln wurden restliche Zellen von der Oberfläche gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde abzentrifugiert (5 min bei 500xg und RT) und in 10 mL frischem Medium resuspeniert. 1/10 der Zellen (etwa 1x10⁶ Zellen) dienten zur Weiterkultivierung der Zelllinie. Zwischen dem Passagieren der Zellen wurde das Medium nach zwei Tagen gewechselt.

Medien und Lösungen zur Kultivierung humaner Zelllinien

Zellkulturmedium für humane

Zelllinien (HepG2, HeLa) [RPMI 1640/+ L-Glutamin] (Fa. GibcoBRL)
supplementiert mit Fötalen Kälberserum (FCS) (Fa. PAA)
10 % Endkonzentration

1x Trypsinlösung: Trypsin/EDTA-Lösung (10x) (Fa. PAA)
verdünnt mit 1x PBS (Fa. GibcoBRL)

Kryokonservierung (Lagerung) humaner Zelllinien

Die Konservierung und Lagerung von Säugerzellkulturen erfolgte im flüssigen Stickstoff. Dazu wurden die Zellen einer 80-90 % konfluent bewachsenen Zellkulturflasche trypsiniert. 3x10⁶ Zellen wurden in 1 mL Zellkultureinfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Fa. Nunc) überführt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen schrittweise abgekühlt (10 min auf Eis, 1 h bei -20°C, 2 h bei -80°C) und schließlich in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zellkultureinfriermedium 70 % RPMI 1640/ + L-Glutamin
20 % FCS (Fötale Kälberserum)
10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)

Rekultivierung humaner Zelllinien

Die tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad (37°C) aufgetaut und in 10 mL 37°C vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert. Um das cytotoxisch wirkende DMSO zu entfernen, wurden die Zellen zentrifugiert (500xg, 5min, RT) und in frischem vorgewärmten Medium resuspendiert und vorsichtig in die Zellkulturflasche getropft. Die Flasche wurde

dabei zur homogenen Verteilung kurz geschwenkt. Die Weiterkultivierung erfolgte wie beschrieben.

3.5.3.2. Bestimmung der Lebendzellzahl einer Zellsuspension (Hansen 2000)

Vor der Zellzählung wurden die Zellen vollständig und homogen im entsprechenden Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurden 10 μL Zellsuspension mit 10 μL 0,04% Trypanblau Lösung (PAA) gemischt. Die Zellen wurden mittels einer „improved“ Neubauer Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet: $X = \text{Summe der nicht blaugefärbten Zellen innerhalb der inneren 5 Quadranten}$. X entspricht der Zellzahl $X \cdot 10^5$ Zellen/mL Suspension.

3.5.3.3. Transfektion höherer eukaryontischer Zellen (HepG2, HeLa)

Die Transfektion humaner Zelllinien mit Plasmid-DNA erfolgte mit Fugene6 (Fa. Roche). Dieses Transfektionsreagenz ist lipidbasierend und umschließt das zu transfizierende genetische Material (DNA). Der „DNA-Lipid“ Komplex wird anschließend von der Zelle aufgenommen. Dazu wurden Zellen aus einer Zellkulturflasche (Oberfläche 75cm^2) trypsiniert und in Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Die Wells einer 12 Well-Zellkulturplatte (Fa. Nunc) wurden mit 950 μL Zellkulturmedium befüllt. Anschließend wurden 0,5 (HeLa) – 1×10^5 (HepG2) Zellen, resuspendiert in 50 μL Medium, in das Well getropft und homogen verteilt. Nach 24stündiger Inkubation erfolgte unmittelbar vor der Transfektion ein Medienwechsel, wobei das Medium 30 min vor der Transfektion durch 950 μL frisches vorgewärmtes Medium ersetzt wurde. Der Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurde 50 μL RPMI 1640 ohne FCS vorgelegt. Nacheinander erfolgte die Zugabe von Fugene6 (1,5 μL) und DNA (0,5 μg) direkt in das RPMI. Fugene6 Transfektionsreagenz und Plasmid DNA waren im Verhältnis 3:1 (v/w). Der Ansatz wurde leicht geschüttelt und für 30 min bei RT stehen gelassen. Im Anschluss wurde dieser Ansatz in das frische Medium getropft und das Medium ebenfalls für eine optimale Verteilung der Komplexe in der Zellkulturschale geschwenkt. Nach 7-8 Stunden erfolgte ein Medienwechsel. Anschließend wurden die Zellen für 40 Stunden weiter inkubiert. Danach wurden die Zellen aufgeschlossen bzw. weiter behandelt, um die Expression des Zielproteins zu analysieren.

3.5.3.4. Transfektion und Fixierung der Zellen zur Untersuchung am konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 510)

Zunächst wurden Objektgläser nach Desinfizierung mit reinem Ethanol in die 12 Well-Zellkulturplatten verteilt. Vor der Zellenzugabe wurden die Objektgläser in den Wells dreimal mit 1xPBS und einmal mit Zellkulturmedium gewaschen. Es erfolgte die Kultivierung und Transfektion $0,5 \times 10^5$ HeLa, bzw. HepG2 Zellen auf den Objektträgern.

Zur Untersuchung der Verteilung der VPS4-GFP Fusionsproteine wurden die HeLa und HepG2 Zellen mit den VPS4 cDNA Expressionskonstrukten (pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-

GFP, pVPS4B-GFP, pVPS4B^{E235Q}-GFP, siehe 3.4) transfiziert (500 ng DNA-Konstrukt und 1,5 µL Fugene6). Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung der Interaktionspartner wurden diese als DsRed-Fusionsproteine exprimiert. Dazu wurde zum einen die FYVE1 cDNA aus dem „Two-Hybrid“ Klon pACT2-#13-AD amplifiziert und nach anschließender Restriktion mit *EcoRI* und *Asp718* in den pDsRed1-N1 Vektor kloniert. Zum anderen wurde KIAA1 über *EcoRI* und *KpnI* Restriktion aus dem Hefekonstrukt pKIAA1[HA2] in den *EcoRI/KpnI* geschnittenen pDsRed1-N1 zur Expression des DsRed-Fusionsproteins kloniert (siehe 3.4.). HeLa und HepG2 Zellen wurden anschließend mit den jeweiligen Konstrukten (pFYVE1-DsRed und pKIAA1-DsRed) transfiziert (500 ng DNA-Konstrukt und 1,5 µL Fugene6). Für die Koloalisationsexperimente wurden HeLa und HepG2 Zellen mit den Fusionskonstrukten pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-GFP, pVPS4B-GFP, pVPS4B^{E235Q}-GFP, pFYVE1-DsRed und pKIAA1-DsRed transient transfiziert (Cotransfektion mit 3 µL Fugene6 und jeweils 500 ng Vektorkonstrukt). 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen auf den Objektgläsern wurde 1 mL einer 4 %igen Paraformaldehydlösung pro Well zugegeben und für 20 min in Dunkelheit inkubiert. Nach Abnahme der Lösung wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen. Die Objektgläser wurden nun aus den Wells genommen. Nach sorgfältigem Abtropfen des restlichen PBS wurden die Zellen mit VECTASHIELD[®] „Mounting Medium“ (Fa. Vector Laboratories) überschichtet. Die Objektgläser mit den fixierten Zellen wurden umgedreht auf Objektträger gelegt und die Ränder mit Nagellack abgedichtet. Dies diente einer längerfristigen Sicherung der Objekte.

4% Paraformaldehydlösung (PFA) (100 mL)

- 4 g (w/v) Paraformaldehyd in Aqua Bidest (45 mL) bei 60-70°C lösen
- durch Zugabe von wenigen Tropfen 10 M NaOH wird die Lösung klar
- anschließend werden 50 mL 2xPBS zugegeben und die Lösung auf pH 7,5 eingestellt
- Auffüllen auf 100 mL Gesamtvolumen mit Aqua Bidest

Die Lösung kann bei 4°C für max. 2 Wochen gelagert werden. Die PFA-Lösung wird bei RT benutzt.

3.6. Isolierung von Nukleinsäuren

3.6.1. Isolierung von RNA aus HepG2 Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus HepG2 Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt: 48 Stunden nach der Transfektion mit Plasmid-DNA wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen, gezählt und anschließend in 350 µL RNAlater (Fa. QIAGEN) resuspendiert. In dieser Lösung ist die RNA vor Degradierung geschützt und kann über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden (nach Fa. QIAGEN). Zur Isolierung wurde ein Kit der Firma QIAGEN benutzt (Rneasy Protect Mini Kit). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Handbuchs. Die gewonnene RNA wurde im RNase freiem Aqua Bidest resuspendiert und

bei -20°C gelagert. Die RNA Menge wurde photometrisch am Nanodrop (Fa. Kisker) bestimmt.

3.6.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.6.2.1. Enzymatische Lyse von *E. coli*

Die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte modifiziert nach Holmes und Quigley (1981). Die entsprechende Bakterienkultur wurde über Nacht in einer 3 mL antibiotikahaltigen Flüssigkultur herangezogen. 1,5 mL wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf) zentrifugiert (1 min 10.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 250 µL STET-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde mind. 5 min auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurden 25 µL Lysozym (Fa. Sigma) (10 mg/mL Aqua Bidest) hinzugefügt und ca. drei Sekunden kräftig gemischt (Vortexer; Fa. Eppendorf). Die Bakterien wurden im kochenden Wasserbad genau eine Minute inkubiert. Dies führte zur vollständigen Lyse der Bakterien und Denaturierung der Proteine und DNA. Anschließend wurde die Suspension auf Eis für mindestens 5 min abgekühlt und zentrifugiert (30 min bei 14.000 rpm und 4°C).

Der DNA-haltige klare Überstand wurde vom Pellet getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µL Ethanol (96 %) und Zentrifugation (14.000 rpm, 30 min, 4°C) wurde die DNA gefällt und sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde erneut zentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in einer Zentrifuge im Vakuum (Speed Vac) getrocknet, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Die DNA wurde in RNase-haltigem sterilen Aqua Bidest (100 µg RNase/mL Aqua Bidest) gelöst und bei -20°C gelagert.

Puffer und Lösungen zur DNA-Aufbereitung

STET – Puffer:	8% Saccharose
	5% TritonX-100
	50 mM EDTA
	50 mM Tris/HCl pH 8

Die Vorteile dieser Methode liegen in den geringen Kosten und die dafür benötigten Lösungen können selbst hergestellt werden. Die DNA hat einen guten Reinheitsgrad, kann jedoch einen geringen Anteil an kleinen Proteinen enthalten, die durch die Denaturierung nicht beseitigt wurden. Diese DNA kann für Restriktionsansätze, z.B. zur Kontrolle von Klonierungsexperimenten verwendet werden. Für die Verwendung in Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurde die RNase wie folgt aus der DNA-Lösung entfernt: Die DNA wurde mit 10% 3 M Ammoniumacetat (pH 5,2) und dem doppelten Volumen Isopropanol gefällt. Es wurde mit 14.000 rpm 10 min bei RT die DNA zentrifugiert und die DNA getrocknet und in Aqua Bidest bzw. Puffer (z.B. 10 mM Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert. Für den Einsatz bei

empfindlichen Enzymreaktionen (z.B. Klonierung, Sequenzierung) wird ein höherer Reinheitsgrad der DNA benötigt (siehe 3.6.2.2.).

3.6.2.2. Alkalische Lyse von *E. coli* (QIAGEN)

Zur alkalischen Lyse wurden die QIAprep Miniprep Spin Column Protokolle der Fa. QIAGEN benutzt. Eine über Nacht gewachsene Kultur in der stationären Phase wurde sedimentiert und das Medium abgenommen. Danach erfolgte die Resuspendierung in P1 Puffer (siehe 3.6.3.). Die weitere Vorgehensweise erfolgte nach Protokoll (QIAGEN SpinPrep). Nach zwei Waschschritten mit einer Tris/HCL/Ethanol – Lösung (PE-Puffer) wurde die DNA in 5 mM Tris/HCl Puffer (pH 7,5) eluiert und spektrometrisch vermessen (UV-160A Fa. Shimadzu).

3.6.3. Isolierung großer Plasmid-DNA (pPAC-Vektoren)

PAC ist die Bezeichnung für „Künstliche Phagen DNA“ (**p**hage **a**rtificial **c**hromosome). Für die Isolierung dieser sehr großen Plasmide (in dieser Arbeit VPS4b-P1 ~ 90 kBp) wurde mit einem optimierten Protokoll in Anlehnung an das Protokoll der Firma QIAGEN zur Isolierung von pPAC Vektoren gearbeitet.

Zur Plasmidisolierung wurden 0,5 mL einer Vorkultur (3 mL 2xYT Flüssigmedium mit 25 µg/mL Kanamycin, *E. coli* Stamm DH10B transformiert mit VPS4b-P1, $OD_{600} = 0,15$) in 500 mL 2xYT-Flüssigmedium mit 25 µg/mL Kanamycin überführt. Anschließend wurde bei 37°C über Nacht geschüttelt bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 1,3 - 1,5$. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 5000xg für 10 min. Das Zellpellet wurde in 20 mL P1 Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 20 mL P2 Lösung erfolgte die Lyse für 5 min bei Raumtemperatur. Zur vollständigen homogenen Verteilung der Lösungen und für eine effiziente Lyse wurde das Gefäß mehrmals vorsichtig geschwenkt. Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 mL eisgekühlter P3 Lösung gestoppt. Es folgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Auch hier wurde vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (20.000xg, 30 min, 4°C). Währenddessen wurde eine DEAE Anionenaustauscher- Säule (Tip 100 der Fa. QIAGEN) mit 4 mL QBT Lösung äquilibriert. Anschließend wurde der wässrige, DNA-haltige Überstand aus dem Zentrifugationsschritt auf die Säule gegeben. Durch Bindung an die Säulenmatrix wurde die DNA isoliert. Die Säule wurde zweimal mit 5 mL QC Lösung gewaschen. Im Anschluß erfolgte die Elution mit vorgewärmter (50°C) QF Lösung. Das Eluat wurde in 1 mL Fraktionen aufgefangen. Somit war eine Aufkonzentration der DNA in den mittleren Fraktionen gegeben. Die eluierten Fraktionen wurden anschließend mit Isopropanol (70 % Endkonzentration) versetzt. Nach Zentrifugation (15.000xg, 30 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 2 mL 70% Ethanol gewaschen und die DNA erneut zentrifugiert (15.000xg für 10 min bei 4°C). Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das erhaltene Pellet bei RT getrocknet. Zum Abschluß wurde die DNA in 500 µL TE Lösung aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA

P1 : 50 mM Tris/HCl (pH 8)
10 mM EDTA
100 µg/mL RNase

P2 : 200 mM NaOH
1% SDS

P3 : 3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

QBT : 750 mM NaCl
50 mM MOPS (pH 7)
15% Isopropanol
0,15% TritonX-100

QC : 1 M NaCl
50 mM MOPS (pH 7)
15% Isopropanol

QF : 1,5 M NaCl
50 mM Tris/HCl (pH 8,5)
15% Isopropanol

TE : 5 mM Tris/HCl (pH 8)
0,5 mM EDTA

3.6.4. Reinigung von DNA aus Restriktionsansätzen, bzw. aus Polymerasenkettenreaktionen (PCR) und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die durch Restriktionsverdau, bzw. in PCR-Reaktionen erzeugten DNA Fragmente wurden elektrophoretisch im Agarosegel (i.d.R. 1 % Agarose) aufgetrennt und die entsprechenden Banden ausgeschnitten. Anschließend wurde das Gelstück in QG Lösung (Fa. QIAGEN) geschmolzen und diese über Silicagel-Säulen gegeben, um die DNA aus der Schmelze zu isolieren. Zum anderen erfolgte die Rückgewinnung von DNA aus Reaktionsansätzen (PCR, Restriktion) durch Aufnahme in PB Lösung (Fa. QIAGEN) und Isolierung über Silicagel-Säulen (Fa. QIAGEN). Beide Möglichkeiten der DNA Isolierung erfolgten unter Zuhilfenahme des Isolierungskits QIAquick (Fa. QIAGEN).

3.6.5. Isolierung von DNA aus Hefezellen

Der zu untersuchende Hefeklon wurde über Nacht in 5 mL Selektionsmedium (z.B. SD Trp⁻/Leu⁻) angezogen. Anschließend wurden Zellen mit einer Gesamt-OD₆₀₀=8 zentrifugiert (2000xg, 10 min, RT), das Zellpellet in 200 µL Hefe-Lysispuffer resuspendiert und in ein 1 mL Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) überführt. Anschließend wurden 200 µL einer Phenol/Chloroform/Isopropanol Lösung (Verhältnis v/v 25:24:1) und 300 µg sterile Glaskugeln (Fa. Sigma Durchmesser 425-600 µm) zugegeben. Das Gemisch wurde zweimal 1 min lang kräftig geschüttelt (Vortexer, Fa. Eppendorf), wodurch die Hefen mechanisch aufgebrochen wurden. In der organischen Phase sammelt sich dabei der Proteinanteil des Lysates an, während die DNA in der wässrigen Phase des Lösungsgemisches verbleibt. Eine anschließende Zentrifugation bei 10.000xg für 10 min bei RT führte zur Trennung der beiden Phasen. Die obere wässrige Phase wurde ein zweites Mal mit 200 µL Phenol/Chloroform/Isopropanol extrahiert, um verbliebene Proteine zu entfernen. Anschließend wurde kräftig geschüttelt, zentrifugiert (10.000xg, 10 min, RT) und danach separiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt. Die in der wässrigen Lösung enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 10% (v/v) 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5fachen Volumenanteil Ethanol gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 10.000xg für 15 min sedimentiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, um überschüssiges Salz zu entfernen. Nach der folgenden Zentrifugation (20 min, 10.000xg, RT) wurde die DNA an der Luft getrocknet und in Aqua Bidest resuspendiert.

Hefe-Lysispuffer: 2% (v/v) Triton X – 100
 1% (w/v) SDS
 100 mM NaCl
 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA

3.7. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration mittels photometrischer Messung

Um die Konzentration einer DNA/RNA-Lösung zu bestimmen, wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Nanodrop Fa. Kinsker). Aus der Extinktion bei dieser Wellenlänge wird die Konzentration an Nukleinsäuren ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht etwa 50 µg/mL doppelsträngiger DNA, 33 µg/mL einzelsträngiger DNA, 40 µg RNA, bzw. 20 µg/mL kurzer, einzelsträngiger Oligonukleotide (Primer). Anhand des Verhältnis der Wellenlängen 260 nm/280 nm lässt sich die Qualität der DNA-Probe bestimmen, das für reine DNA einen Wert zwischen 1,8 - 2,1 hat. Geringere Werte lassen auf eine Kontamination von Proteinen und bei Phenolextraktion auf Phenolreste schließen. Die aromatischen Bestandteile absorbieren in einem Wellenlängenbereich von 280 nm (maximale Absorption von Tryptophan).

3.8. Restriktion von DNA mittels TYP II Endonucleasen

Die zur Restriktion verwendeten Enzyme sind in 3.4. aufgelistet. Für die Restriktion wurde ein vom Hersteller auf das entsprechende Restriktionsenzym optimiertes Puffersystem benutzt und bei 37°C 1 - 2 Stunden inkubiert. Bei einer Doppelrestriktion wurde das Enzym, das bei einem geringeren Salzgehalt des Puffersystems maximale Aktivität besitzt, zuerst inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des zweiten Restriktionsenzym, das bei einer höheren Salzkonzentration die optimale Aktivität hat. Zur partiellen Restriktion wurde die DNA mit „verdünnter“ Enzymmenge (ca. 0,5 U) in mehreren Ansätzen unterschiedlich lang inkubiert, die erhaltenen Fragmente elektrophoretisch im TBE-Agarosegel getrennt, um somit die optimale Inkubationszeit für eine präparative Teilrestriktion ermitteln zu können. Der Standardansatz (20 µL) einer einfachen Restriktion war wie folgt:

500 ng Plasmid-DNA

5 U Restriktionsenzym/µg DNA (Bei Teilrestriktionen < 0,5 U)

2 µl 10xRestriktionspuffer

Aqua Bidest zum Auffüllen des Gesamtansatzes auf 20 µL

3.9. Dephosphorylierung von 5'- DNA Fragmentenden

Zur Dephosphorylierung der 5'-Phosphatenden linearisierter Plasmid-DNA diente die Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (Fa. Promega). Die Dephosphorylierung verhindert bei nicht gerichteter Klonierung eine Religation der benutzten Vektoren ohne die Insertion von zu klonierenden DNA Fragmenten zu behindern. Inkubiert wurde die Vektor-DNA und die alkalische Phosphatase (1 U/µg DNA) im mitgelieferten Reaktionspuffer (0,5 M Tris-HCl (pH 9.0), 100 mM MgCl₂) für 15 min bei 37°C.

3.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden wird durch die T4-DNA-Ligase (Fa. Roche) katalysiert, was zur Ligation von geschnittenem Plasmid und den zu klonierenden DNA-Fragmenten eingesetzt wurde. Eine Einheit der T4-DNA-Ligase (1U auf max.1 µg DNA) wurde einem Ansatz aus linearisiertem Vektor und Insert (Verhältnis 1:3) und 10xLigationspuffer (Fa. Roche) zugeführt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde die Hälfte des Ansatzes zur Transformation benutzt. Zur Kontrolle der Effizienz von Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation wurden zusätzlich „geschnittener Vektor ohne Ligase“ (zeigt die Effizienz der Vektor-Restriktion) und „geschnittener Vektor mit Ligase“ (zeigt die Dephosphorylierungseffizienz) in *E. coli* transformiert.

3.11. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Reverse Transkription (RT)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, "polymerase chain reaction") ist eine *in vitro* Technik zur Vermehrung eines spezifischen DNA-Fragmentes (Mullis und Faloona 1987; Saiki et al.

1988). Dafür wird die Eigenschaft der DNA abhängigen Taq DNA-Polymerase genutzt, die einen zum DNA Einzelstrang komplementären DNA Strang synthetisiert. Auf diese Weise wird die DNA vielfach kopiert. Die PCR besteht hauptsächlich aus 3 Schritten. Zu Beginn wird durch eine längere Denaturierung (3 - 5 min, 95°C) die DNA denaturiert, danach erfolgt als 1. Schritt eine kurze Denaturierung (45s 95°C) der Template-DNA bzw. der später synthetisierten DNA-Fragmente.

Im 2. Schritt erfolgt die Anlagerung („Annealing“) von kurzen Oligonukleotiden, sogenannten *Primern*. Die Primersequenzen sind komplementär zum DNA-Strang (Matrize). In der Regel werden zwei Primer eingesetzt, welche die zu kopierende Region einschließen. Die Temperatur der Anlagerung richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer, die näherungsweise nach der Formel $T_m^{\circ}\text{C} = 4x(\text{Summe G und C}) + 2x(\text{Summe A und T})$ errechnet werden kann. Normalerweise wird für 45 s eine Temperatur zwischen 40°C und 60°C gewählt.

Im 3. Schritt erfolgt die Synthese des zum Matrizen-DNA-Strang komplementären DNA-Stranges durch Anlagerung der verwendeten hitzestabilen Taq DNA-Polymerase (Fa. QIAGEN) am Primer-DNA-Heteroduplex. Die Polymerase katalysiert die matrizenabhängige Zweitstrangsynthese beginnend vom 3'-Ende des Primers bei einer Temperatur von 72°C. Die Zeitdauer der Elongation ist von der Länge des PCR-Produktes, den verwendeten Reagenzien und des verwendeten Enzyms abhängig. Taq DNA-Polymerasen mit einer „proof reading“ Funktion (Expand High Definition Polymerase; Fa. Roche) sind in der Synthese genauer aber langsamer als Taq DNA-Polymerasen ohne „proof reading“ Funktion. Letzere synthetisieren ca. 1 kbp/min.

Die Schritte 1 - 3 werden i.d.R. 20 - 30 mal wiederholt und mit einem abschließenden Elongationsschritt (5 min 72°C) beendet. Die Polymerasekettenreaktionen wurden in dem GeneAmp PCR System 9700 (Fa. PE Applied Biosystems) durchgeführt.

Standardreaktionsansatz für eine PCR (25 µL)

Ein Reaktionsansatz für die PCR besteht grundsätzlich aus folgenden Komponenten:

- Matrize (z.B. Plasmid-DNA 20 ng)
- 2,5 µL 10xReaktionspuffer (QIAGEN)
- je 1 µL/Primer 10 µM
- 1 µL Nukleotide (dNTP's) 2,5 mM
- Taq DNA-Polymerase 0,5 U/Ansatz (QIAGEN)
- Aqua Bidest ad 25 µL

Reverse Transkription (RT)

mRNA kann nicht direkt mittels PCR amplifiziert werden, sondern muß zuvor mit Hilfe der Reversen Transkriptase (eine mRNA abhängige DNA-Polymerase) in eine zur mRNA komplementären cDNA (copy DNA) umgeschrieben werden, die dann als Matrize für die anschließende PCR dient. In dieser Arbeit diente die RT-PCR zum Nachweis des *VPS4b*^{E235Q} Transkripts in HepG2 Zellen. Für die RT-PCR wurde das OneStep RT-PCR Kit

der Firma QIAGEN benutzt. Als Primer wurden *VPS4b* sequenzspezifische Primerpaare (SKD20/G27 bzw. h1b12/h1b17) eingesetzt. Der 3' gelegene Primer (G27 bzw. h1b17) des eingesetzten Primerpaares diente jeweils zur Erstellung der cDNA.

Reaktionsansatz für RT-PCR Analysen (25 μ L)

- 50 ng isolierte Gesamt-RNA (siehe 3.6.1.)
- 2,5 μ L 10xRT-PCR Puffer
- 1 μ L PCR Enzym Mix (SensiScript - und OmniScript - Reverse Transkriptase und Hot Start Taq DNA Polymerase)
- 5 μ L 5xQ-Solution
- 1 μ L je Primer 10 μ M
- 1 μ L 2,5 mM dNTP's
- RNase freies Aqua Bidest zum Auffüllen des Gesamtansatzes
- 1 μ L RNase Inhibitor

Der erste Schritt (Reverse Transkription) wurde bei 37°C für 30 min durchgeführt. Danach wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 95°C für 5 min der RNA-DNA Heteroduplex gelöst, die Reverse Transkriptase deaktiviert und die Hot Start Taq DNA Polymerase aktiviert. Anschließend erfolgte die Denaturierung der DNA bei 95°C für 45 s, das Annealing der Primer bei 54°C für 45 s, die Elongation bei 72°C für 1 min 30 s. Denaturierung, Annealing und Elongation erfolgten in 40 Zyklen. Die PCR wurde mit einer abschließenden Elongation für 5 min bei 72°C beendet.

3.12. Nachweis von DNA in TBE-Agarosegelen

Agarose wird als Polysaccharid aus der Rotalge gewonnen. Diese Polysaccharide bilden durch Erhitzen in 1xTBE Puffer Polysaccharid-Doppelhelices aus und vernetzen sich. Je nach Porengröße, welche sich aus dem Anteil der Agarose 2 % - 0,2 % (w/v) ergibt, können DNA Fragmente von 50 bp bis 50 kbp aufgetrennt werden, wobei 1 % den Standard in dieser Arbeit darstellt. Dies entspricht einer guten Auftrennung von 400 bp bis ca. 10 kbp.

Die geschmolzene Agarose wurde mit Ethidiumbromid (0,5 ng Ethidiumbromid/mL Agarose) versetzt, das in die DNA-Helix interkaliert. Unter UV-Licht fluoresziert das in der DNA eingelagerte Ethidiumbromid. Die Gele wurden mit einem Geldokumentationsgerät (Fa. Raytest) digital photographiert.

1xTBE Puffer : 89 mM Tris
 89 mM Borsäure
 2 mM EDTA

3.13. Isolierung von Proteinen

3.13.1. Isolierung von Proteinen aus Hefezellen

Zur Isolierung von Hefegesamtproteinextrakten wurde der zu untersuchende Hefestamm in 5 mL Flüssig-Selektionsmedium über Nacht angezogen. Die Hefekultur wurde durch Zentrifugation (2000xg, 10 min, RT) sedimentiert und anschließend mit 5 mL Aqua Bidest gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet für mindestens 30 min bei -20°C eingefroren. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden. Das tiefgefrorene Pellet wurde nach Zugabe von 200 µL Hefe-Proteinpuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,5); 1 mM PMFS) einer Spatelspitze steriler Glaskugeln (ca. 100 µg; Durchmesser 450 - 600 µm; Fa. Sigma) durch kräftiges Mischen (Vortexer) lysiert. Das Lysat wurde nach kurzer Zentrifugation von den Glaskugeln separiert. Dieses Lysat stand für weitere Untersuchungen zur Verfügung (z.B. SDS-PAGE, Western Blot).

3.13.2. Isolierung von Proteinen aus kultivierten eukaryontischen Zellen (Rybalkin et al. 2002)

In einer 12 Well-Zellkulturplatte kultivierte HeLa oder HepG2 Zellen (ca. 2×10^5 Zellen) wurden i.d.R. 48 h nach der Transfektion präpariert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 80 µL Lysispuffer auf Eis auf einem Kippschüttler mind. 30 min inkubiert. Die resuspendierten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, das Well mit 40 µL Lysispuffer ausgespült und mit den im Reaktionsgefäß befindlichen Zellen vereinigt. Anschließend wurden die resuspendierten Zellen im eiskalten Ultraschallbad behandelt (3x15 s). Ein Teil (10%) des Zelllysates wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE) und im Western Blot analysiert.

Lysispuffer: 25 mM Tris/HCl (pH 7,5)
 2,5 mM MgCl₂
 0,5% TritonX-100 (v/v)
 150 mM NaCl

Proteaseinhibitoren: 10 µg/mL Aprotinin
(100x Stocklösung) 5 µg/mL Pepstatin
 20 µg/mL Leupeptin

Die Proteaseinhibitoren wurden in 20 %igem Ethanol mit 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) gelöst und erst vor Gebrauch frisch zum Lysispuffer gegeben (10 µL/mL Lysispuffer).

3.14. Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970)

In der SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung von Proteinen der Größe nach. Die Trennleistung wird durch die Vernetzung von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid erreicht. Das

Mischungsverhältnis dieser Komponenten im Gel bestimmt die Porengröße und somit die Trennmöglichkeiten. In dieser Arbeit wurde zur Analyse ausschließlich mit 8%igen Gelen gearbeitet. Benutzt wurde eine Minigel-Apparatur (Fa. Biorad). Proteinlösungen (in Lysispuffer gelöste Proteine) wurden mit einem 6x konzentrierten Gelbeladungspuffer versetzt (Verhältnis 6:1) und für 5 min in kochendem Wasserbad denaturiert. Das SDS (Natriumdodecylsulfat) im Probenpuffer lagert sich als anionisches Detergenz an die denaturierte Proteinkette an. Die Anlagerung der SDS Moleküle ist zum Molekulargewicht des Proteins proportional. Im Bereich der Sättigung werden 1,4 g Natriumdodecylsulfat pro 1 g Polypeptid gebunden. Durch Anlagerung des SDS an das Protein wird die Gesamtladung negativ, so dass die Wanderung der Proteine in einer Richtung von der Kathode zur Anode vorgegeben ist. Gleichzeitig wirkt das im Gelbeladungspuffer enthaltene Mercaptoethanol durch Reduktion der Disulfidbrücken denaturierend. Es erfolgt eine Auftrennung aufgrund des Molekulargewichtes der Proteine. Die diskontinuierliche SDS-PAGE besteht aus einem größerporigen Sammelgel (pH 6,8) in dem die Proteine auf eine Front fokussiert werden, um anschließend gemeinsam durch einen pH Sprung (pH 8,8) im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt zu werden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einer vertikalen Flachgelapparatur (Fa. Biorad) können die Proteine angefärbt (z.B. Comassie) oder für Immundetektionsanalysen auf eine Membran (z.B. PVDF, Nylon) transferiert werden.

Puffer und Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese:

6xGelbeladungspuffer:	30% 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 30,5% (v/v) Glycerin 12% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,12% (w/v) Bromphenolblau 15% β -Mercaptoethanol
Elektrodenpuffer:	200 mM Glycin 25 mM Tris/HCl 7 mM Natriumdodecylsulfat (SDS)
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Transferpuffer: (pH 9,0 - 9,4)	48 mM Tris 39 mM Glycin 20% (v/v) Methanol 0,0375% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

1xPBS:	13,7 mM NaCl
(pH 7,0)	0,27 mM KCl
	0,15 mM KH ₂ PO ₄
	0,65 mM Na ₂ HPO ₄

3.15. Western Blot – „Semi Dry“ Verfahren (Bjerrum und Schafer-Nielsen 1986)

Zur spezifischen Immundetektion bestimmter Proteine mittels Antikörper, wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen (PVDF-Polyvinylidenfluorid) transferiert. Dies erfolgte nach einem Verfahren von Bjerrum und Schafer-Nielsen (1986), wobei die Gele horizontal auf der Membran liegen und die durch angelagertes SDS negativ-geladenen Proteine über ein kontinuierliches Puffersystem elektrophoretisch auf die Membran transferiert werden.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Polyacrylamidgele im Transferpuffer (siehe 3.14.) für 20 min äquilibriert. Zwischenzeitlich erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran in Methanol (reinst) für eine Minute und anschließend die Inkubation der Membran für 2 min im Transferpuffer. Mehrere Filterpapiere (Fa. Whatmann) (sechs Lagen pro Gel) wurde ebenfalls mit Transferpuffer getränkt. Der Aufbau in der Blotapparatur (Fa. Biorad) erfolgte von Kathoden- in Anodenrichtung mit drei Lagen Filterpapier, PVDF Membran, Gel und drei Lagen Filterpapier. Vom Proteingel nicht belegte Membranbereiche wurden mittels Folie (PARAFILM) abgedeckt. Anschließend erfolgte durch Anlegen einer Spannung (15 Volt, 5 mA/cm² Gelfläche) der Transfer der Proteine für eine Stunde. Danach wurden die Membranen in 1xPBS Puffer (siehe 3.14.) überführt. Um den Transfer zu überprüfen, wurden die Polyacrylamidgele nach Waschen mit bidestilliertem Wasser mit Comassie angefärbt (siehe 3.16.2.). Die auf die Membran transferierten Proteinmarker (Protein Ladder 10 - 200 kDa, Fa. Fermentas) wurden abgeschnitten und mit einer Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt (siehe 3.16.1).

3.16.1. Färbung von PVDF Membranen (Biorad)

Färbelösung:	45 % (v/v) Methanol
	7 % (v/v) Essigsäure
	0,01 % (w/v) Amido Black

Die Membran wurde ca. 10 min gefärbt, anschließend in einer Entfärbelösung (70 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) entfärbt.

3.16.2. Färbung von Polyacrylamidgelen

3.16.2.1. Coomassiefärbung (Meyer und Lamberts 1965)

Färbelösung:	0,02% (w/v) Brilliant Blue R250
--------------	---------------------------------

10% (v/v) Essigsäure

Die Gele wurden mehrere Stunden bei RT geschwenkt, bis eine gleichmässige Färbung der Gele erfolgt war. Die Entfärbung der Coomassiegele erfolgte mit 10 % Essigsäure.

3.16.2.2. Sensitive Coomassiefärbung (Kang et al. 2002)

Färbelösung: 0,02 % (w/v) Brilliant Blue G250
 2 % (v/v) konz. Phosphorsäure
 2 % (w/v) Aluminiumsulfat (Al_3SO_4)
 10 % (v/v) Ethanol

Die Färbung der Gele erfolgte wie in 3.16.2.1. angegeben, jedoch wurde zur Entfärbung Aqua Bidest eingesetzt. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem geringeren Hintergrund der entfärbten Gele.

3.17. Detektion von Proteinen mittels Antikörper

Zum Nachweis auf PVDF Membranen transferierter Proteine wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper als primäre Antikörper eingesetzt. Die monoklonalen Antikörper besaßen eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) zum direkten Nachweis dieser Antikörper. Die polyklonalen Antikörper trugen kein Markerprotein, über das sie nachgewiesen werden konnten. Es erfolgte die Detektion in diesem Fall auf indirektem Weg über den Einsatz eines sekundären Antikörpers, der als Anti-Kaninchen Antikörper den verwendeten primären Antikörper als Antigen erkannte und seinerseits durch Kopplung mit HRP chemiluminometrisch mit dem ECL System nachgewiesen werden konnte.

Die generelle Vorgehensweise war, die PVDF Membranen nach dem Blot mit 1xPBS zu waschen, mit Magermilch-Lösung die nicht mit Proteinen bedeckten Stellen zu blockieren, wiederum mehrmals zu waschen und dann mit den entsprechenden Antikörpern zu inkubieren. Anschließend erfolgte die Detektion der angelagerten Antikörper. Die Detektion erfolgte über das ECL System der Fa. Amersham (**E**nhanced **C**hemilumineszenz). Für die unterschiedlichen Antikörper wurden die Inkubations- und Waschschriffe modifiziert, um ein optimales Signal/ Hintergrund Verhältnis zu erreichen.

Nachweis des HA-Epitops mit Maus Anti-HA-HRP Antikörper (Fa. Boehringer Ingelheim)

Die zur Detektion vorgesehene PVDF Membran (ca. 70 cm²) wurde mit 50 mL Waschpuffer (1xPBS + 1% (v/v) Tween-20) zweimal 10 min gewaschen, mit 50 mL Blockierungspuffer (Waschpuffer + 5% (w/v) Magermilch) bei RT für eine Stunde auf dem Kippschüttler inkubiert und anschließend zweimal 15 min mit 50 mL Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Maus Anti-HA-HRP Antikörper (Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt). Er wurde 1:5000 in Waschpuffer + 0,15% (w/v) Magermilch verdünnt eingesetzt (ca. 70

$\mu\text{L}/\text{cm}^2$ Membran). Die Membran wurde dazu in Folie eingeschweißt und für eine Stunde bei RT und langsamen Schwenken der Lösung inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Membran in 50 mL Waschpuffer für 10 min gewaschen, anschließend durch Zugabe von 50 mL frischer 1 M NaCl Waschpufferlösung die Salzkonzentration erhöht, um unspezifische Signale zu vermindern. Dies erfolgte 10 min lang. Fortfahrend wurde die Membran dreimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Antikörper mit dem ECL System detektiert wurden.

Nachweis des myc-Epitopes mit Kaninchen Anti-myc-HRP Antikörper (Fa. Invitrogen)

Die Inkubations- und Waschschrte waren gleich wie beim Anti-HA-HRP Antikörper. Die Zusammensetzung der Wasch- und Inkubationslösungen waren wie folgt:

Waschpuffer: 1XPBS + 0,1% (v/v) Tween-20

Blockierungspuffer: Waschpuffer + 5% (w/v) Magermilch

Antikörperlösung: Anti-c-myc-HRP (1:2500 verdünnt) in Waschpuffer
+ 0,15% (w/v) Magermilchpulver

Abweichend zum Anti-HA-HRP Antikörper wurde nach der einstündigen Inkubation mit dem Kaninchen Anti-myc-HRP Antikörper die Membran dreimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mittels ECL-System detektiert.

Nachweis des GST-Epitopes mit Kaninchen Anti-GST Antikörper (Fa. Molecular Probes)

Die Detektion des GST-Fusionsproteins erfolgte im Phospholipidbindungsassay (Molecular Probes). Verwendet wurden μStrips , auf denen verschiedene Phospholipide gebunden waren. Die Phospholipidmembranen wurden in 4 mL Blockierlösung (1xTBS + 0,1% (v/v) Tween 20 + 0,1% Ovalbumin) eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde zu frischer Blockierlösung (2 mL) das FYVE1-GST (vom Labor zur Verfügung gestellt) (50 ng) hinzugegeben und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Dabei wurde die Membran in der Lösung leicht geschwenkt (Kippschüttler). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit 4 mL Blockierlösung bei RT geschwenkt, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen mit Kaninchen Anti-GST Antikörper, 1:600 verdünnt in 2 mL 1xTBS + 0,1% (v/v) Tween 20, bei RT für eine Stunde bei leichtem Schwenken inkubiert. Nach dreimal zehninütigem Waschen mit einer Waschlösung (5 mL 1xTBS + 0,1% Tween20 (v/v)) wurden die Membranen mit Anti-Kaninchen-HRP Antikörper (Fa. Amersham Pharmacia), 1:5000 verdünnt in 2 mL 1xTBS + 0,1% Tween 20 (v/v), bei RT für 30 Min inkubiert. Anschließend wurde dreimal 10 Min mit 5 mL Waschlösung (1xTBS + 0,1% Tween 20 (v/v)) gewaschen. Anschließend wurde die Detektion mit dem ECL System durchgeführt.

3.18. Generierung polyklonaler Antikörper und Untersuchung der Antiseren und Antikörper

Um Säuger VPS4A Proteine sowie die putativen Interaktionspartner (FYVE1 und KIAA1) immunologisch nachweisen zu können, wurden polyklonale Kaninchen Antikörper bei der Firma Eurogentec erzeugt. Die Aminosäuresequenz der jeweiligen Epitope, gegen die die polyklonalen Antikörper generiert wurden, ist in Tab. 3.1. aufgeführt. Ausgangspunkt der Immunisierung waren die chemisch synthetisierten, an KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelten Peptide, die nach folgendem Immunisierungsprotokoll in Kaninchen appliziert wurden:

Zum Zeitpunkt Null	Abnahme des Präimmunserums Applikation des KLH-gekoppelten Peptides
2. und 4. Woche	Wiederholte Applikation des Peptides
5. Woche	1. Blutabnahme → Test im Western Blot
8. Woche	Applikation des Peptides
9. Woche	2. Blutabnahme → Test im Western Blot
12. Woche	Applikation des Peptides
13. Woche	3. Blutabnahme (Finales Serum) → Test im Western Blot

Sowohl die Antiseren als auch die von der Firma Eurogentec über Epitop-Affinitätsreinigung isolierten polyklonalen Antikörper aus der 3. Blutabnahme wurden im Western Blot analysiert. Um dabei eine Aussage über die Spezifität der Antiseren bzw. Antikörper zu erzielen, wurden epitopmarkierte Fusionsproteine verwendet.

Epitop	Peptid-Sequenz	Protein	Ak-Bezeichnung
EP030683	CLLKVKKFSEDFGQES	VPS4A	Ak83
EP030684	HGKKPVKENQSEGKGC	VPS4A	Ak84
KIAA-SW	RTNQIGTVNDRMLH	KIAA1	--
EP030681	EHQTSPYHPRRPCQEH	FYVE1	Ak81
EP030682	CSDSASKWSPQNYKK	FYVE1	Ak82

Tab. 3.1.: **Übersicht der ausgewählten Epitope zur Generierung polyklonaler Antikörper.** In der Tabelle sind die ausgewählten Epitopsequenzen der einzelnen Proteine dargestellt. Mit Hilfe der Peptidsequenzen wurden in Kaninchen durch Applikation des KLH-gekoppelten Peptids polyklonale Antikörper (Ak) erzeugt.

Nachweis mit Kaninchen Anti-VPS4A Antikörper

Zur Überprüfung der Anti-VPS4A Antiseren und Anti-VPS4A Antikörper wurde zum einen humanes VPS4A-GFP und Maus VPS4a-GFP, exprimiert in 3T3 Zellen, verwendet. Zum anderen dienten untransfizierte 3T3 Zellen (enthalten endogenes VPS4a) und VPS4-A[HA2] verwendet. Die Expression von VPS4-A[HA2] erfolgte durch Kultivierung des Hefestammes BHY10, transformiert mit pVPS4-A[HA2], in YPF-Medium mit 25 μM CuSO_4 (siehe 3.5.2.1.). 4×10^5 3T3 Zellen wurden dazu in 240 μL Lysepuffer lysiert (siehe 3.13.2) und 10 μL des Zelllysates für die Analysen verwendet. Vom Hefeproteinlysat (siehe 3.13.1) wurden 5 μL für die Analysen verwendet. Nach dem Transferieren der mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran (ca. 70 cm^2) wurde zu Beginn die Membran mit 50 mL Waschlösung (1xPBS + 1% (v/v) Tween-20) zweimal 10 min bei RT gewaschen, eine Stunde bei RT in 50 mL Blockierungspuffer (Waschlösung + 5% (w/v) Magermilch) inkubiert und anschließend zweimal für 15 min mit 50 mL Waschlösung gewaschen. Die Anti-VPS4A Antiseren wurden 1:100 mit dem Waschlösung verdünnt. Die Inkubation der Membranen mit den verschiedenen, verdünnten Antiseren (1., 2. und 3. Blutabnahme) (ca. 70 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) erfolgte eine Stunde bei RT und langsamen Schwenken. Die affinitätsgereinigten polyklonalen Anti-VPS4A Antikörper wurden 1:2000 im Waschlösung verdünnt und für 1 h bei RT mit der PVDF-Membran inkubiert (ca. 70 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Nach dieser Inkubation wurde die Membran in 50 mL Waschlösung für 10 min gewaschen und anschließend mit einem Anti-Kaninchen-HRP Antikörper (Fa. Amersham Pharmacia), welcher HRP gekoppelt war, in einer Verdünnung 1:5000 inkubiert (30 min, RT, ca. 70 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Nach dieser Inkubation wurde wiederum mit 50 mL Waschlösung für 10 min bei RT gewaschen. Es erfolgte ein Wechsel in 50 mL Salzwashpuffer (1 M NaCl + Waschlösung), in dem die Membran für 10 min bei RT gewaschen wurde. Fortführend wurde die Membran dreimal 15 min mit 50 mL Waschlösung gewaschen. Abschließend wurden die Anti-Kaninchen-HRP Antikörper mittels ECL-System (Fa. Amersham Pharmacia) detektiert.

Nachweis mit Kaninchen Anti-KIAA1 Antikörper

Zur Untersuchung der Antiseren und der polyklonalen Antikörper gegen das KIAA1 Protein, wurden die HA-Epitop-markierten Fusionsproteine KIAA1[HA2] und KIAA1[HA1] im Hefestamm BHY10 exprimiert. Dazu wurde der Hefestamm BHY10 mit den entsprechenden Konstrukten pKIAA1[HA1] bzw. pKIAA1[HA2] transformiert. Die Expression der entsprechenden Proteine wurde durch Zugabe von CuSO_4 in das YPF-Medium induziert (3.5.2.1.). Nach Anreicherung einer Hefeinzelnkolonie (siehe 3.13.1.) wurden je 5 μL Hefeproteinlysat entsprechender Proben gelelektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die PVDF Membran transferiert. Die Membran wurde in Analogie zum Nachweis des VPS4A behandelt. Die Anti-KIAA1 Antiseren wurden 1:100 mit Waschlösung verdünnt und mit der Membran inkubiert (ca. 70 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Der sekundäre Anti-Kaninchen-HRP Antikörper wurde 1:5000 in Waschlösung verdünnt und für 30 min bei RT mit der Membran inkubiert (ca. 70 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Die Detektion der Anti-Kaninchen-HRP Antikörper erfolgte wiederum mit dem ECL System.

Nachweis mit Kaninchen Anti-FYVE1 Antikörper

Die Sequenz der KLH gekoppelten Peptide (Epitop EP030681 und EP030682) wurde so gewählt, dass sowohl humanes als auch murines FYVE1 Protein nachweisbar sein sollte (Tab 3.1.). Die Analyse erfolgte mit FYVE1-DsRed Protein, welches in 3T3 Zellen durch Transfektion mit pFYVE1-DsRed exprimiert wurde. Als Kontrollen dienten Zelllysate nicht-transfizierter 3T3 Zellen, sowie das in Hefe exprimierte mFYVE1[HA2] Protein. Die Expression von mFYVE1[HA2] wurde durch Kultivierung in YPF-Medium + 25 μ L CuSO₄ im Hefestamm BHY10, transformiert mit pmFYVE1[HA2], induziert. Zur Analyse der Immunsereen und der polyklonal aufgereinigten Anti-FYVE1 Antikörper wurden jeweils 10 μ L Zelllysate der pFYVE1-DsRed transfizierten und nicht-transfizierten 3T3 Zellen (je 4×10^5 Zellen in 240 μ L Lysispuffer, siehe 3.13.2.) sowie 5 μ L mFYV1[HA2] Hefeproteinextrakt (siehe 13.13.1.) in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF Membran (ca. 70 cm²) transferiert. Die Untersuchung erfolgte wie im Protokoll zur Analyse der VPS4A Antiseren und Antikörper beschrieben. Die zu untersuchenden Anti-FYVE1 Antiseren wurden 1:100 im Waschpuffer verdünnt eingesetzt. Die aufgereinigten polyklonalen Anti-FYVE1 Antikörper wurden 1:2000 in Waschpuffer verdünnt eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente wiederum ein Anti-Kaninchen-HRP Antikörper (1:5000 in Waschpuffer). Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System.

3.19. Detektion von Antikörpern mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL)

Zur Detektion spezifisch gebundener Antikörper, welche eine Meerrettich-Peroxidase gebunden hatten (HRP), wurde das ECL-System der Fa. Amersham eingesetzt. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die enzymatische Umwandlung von Luminol, in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Es entsteht ein Luminol-Radikal, welches Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert. Die Chemilumineszenz erfolgt unter alkalischen Bedingungen. Dazu wurden zwei Reagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membranen damit für 1 min inkubiert. Die Signale wurden mit Hilfe eines Röntgenfilms (Fa. Kodak) sichtbar gemacht. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit Lösungen der Fa. Kodak .

3.20. Coimmunpräzipitationsanalysen Epitop-markierter VPS4-myc Proteinvarianten und KIAA1-HA, bzw. FYVE1-HA

Zum Nachweis von Proteininteraktionen wurden Coimmunpräzipitationen mit unterschiedlich Epitop-markierten Proteinen (VPS4A-myc, VPS4A^{E228Q}-myc, VPS4B-myc, VPS4B^{E235Q}-myc, KIAA1-HA bzw. FYVE1-HA) durchgeführt. Zur Generierung der pVPS4A(A^{E228Q})-myc und pVPS4B(B^{E235Q})-myc Expressionskonstrukte (siehe 3.4.) wurde der Säugerepressionsvektor pcDNA4/myc-HIS C benutzt.

Zur Generierung des pFYVE1-HA und pKIAA1-HA Expressionskonstrukte (siehe 3.4.) wurde der Säugerepressionsvektor pcDNA3.1(+) benutzt. Durch transiente Transfektion mit den Expressionskonstrukten (pVPS4A-myc, pVPS4A^{E228Q}-myc, pVPS4B-myc, pVPS4B^{E235Q}-myc,

pKIAA1-HA bzw. pFYVE1-HA) wurden die entsprechenden Proteine in HeLa Zellen zur Expression gebracht. Dazu wurden $0,5 \times 10^5$ HeLa-Zellen mit je 500ng DNA - Plasmidkonstrukt transfiziert (siehe 3.5.3.3.). 48 h nach der Transfektion/Cotransfektion wurden die Zellen für die Coimmunpräzipitation aufgearbeitet. Folgende Schritte waren dazu notwendig:

1. Lyse der transfizierten Zellen (ca. 4×10^5 Zellen) (siehe 3.13.2)
2. Kontrolle der Expression des Zielproteins mittels Western Blot, Detektion mittels Anti-myc und Anti-HA Antikörper (siehe 3.14. - 3.17.)
3. Inkubation der mit Anti-myc-Antikörper gekoppelten magnetischen Kugeln (30 min auf Eis bei leichtem Schwenken) mit dem Proteinlysate
4. Applikation des Gemisches auf Säulen, Abtrennung der magnetischen Kugeln mit gebundenem Protein durch Anlegen eines Magneten
5. Waschen
6. Elution der Präzipitate mittels Elutionspuffer
7. SDS-PAGE und Western Blot, Detektion und Nachweis der Proteine mit Anti-myc und Anti-HA Antikörper (3.14. - 3.17.1/2)

Um die Interaktion zwischen zwei Proteinen zu testen, wurden cotransfizierte Zellen unter nativen Bedingungen lysiert (siehe 3.13.2.) und gemäß dem μ MACS Epitope Tag Protein Isolation Kit der Fa. Myltenyi Biotec aufgearbeitet (Schritte 3. - 6.). Dazu wurden 75 μ L von 240 μ L Gesamtzelllysate aus 4×10^5 Zellen mit 50 μ L Anti-myc Antikörper gekoppelten magnetischen Kugeln für 1 h auf Eis inkubiert. Die von der Firma mitgelieferten Säulen wurden an einen Magneten befestigt, die Säulen mit 200 μ L Lysispuffer (3.13.2.) äquilibriert. Anschließend wurde das „Kugel-Lysat“-Gemisch auf die Säule aufgetragen. Durch Anlegen des Magneten wurden die magnetischen Kugeln mit den daran befindlichen Proteinen aus dem Lysat isoliert. Die Säule wurde dreimal mit 200 μ L Lysispuffer und einmal mit 100 μ L 20 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen und damit von nichtgebundenen Proteinen befreit. Anschließend wurden die über die Anti-myc-Antikörper gebundenen Proteine von den Kugeln mit 50 μ L Elutionspuffer (50°C) (im Kit enthalten) eluiert. 1/5 des Eluates wurden im Western Blot analysiert. Dazu wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Eluates im Western Blot neben den myc-Epitop markierten Proteinen auch HA-Epitop markierte Proteine mit entsprechenden Anti-myc-HRP und Anti-HA-HRP Antikörpern detektiert (siehe 3.17. und 3.19.).

3.21. Hefe „Two-Hybrid“ Analysen (Bartel et al. 1993a; Bartel et al. 1993b)

Das Prinzip des „Two-Hybrid“ Systems macht sich den Aufbau einiger Transkriptionsfaktoren zu Nutze, die aus separaten DNA-Bindedomänen (BD) Untereinheiten und Transkriptionsaktivator-domänen (AD) aufgebaut sind. Werden die beiden funktionellen Domänen getrennt voneinander als Hybridproteine exprimiert, so kann eine Interaktion zwischen den

Hybridanteilen zu einer aktiven Form des Transkriptionsfaktors führen. Mit Hilfe entsprechender Reportergene kann anschließend auf diese Interaktion selektioniert werden. Zur Suche nach möglichen VPS4A und VPS4B Interaktionspartnern wurde eine vortransformierte humane cDNA Bank der Firma Clontech eingesetzt. Diese cDNA Bank wurde aus mRNA generiert. Die mRNA ist aus einem Pool von humanen Gehirnen 9 männlicher/weiblicher Föten der 20.–25. Woche isoliert. Die cDNA-Bank lag im Aktivierungsdomänenvektor pACT2 als Fusionskonstrukt mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) (pACT2-cDNA-AD) kloniert im haploiden Hefestamm Y187 vor („Pretransformed Human Fetal Brain MATCHMAKER cDNA Library“, Fa. Clontech).

Zur Durchführung von VPS4 Interaktionsstudien wurde als „Ankerprotein“ einerseits eine dominant-negative Form des humanen VPS4A Proteins (VPS4A^{E228Q}) und das Wildtyp VPS4B Protein benutzt. Die kodierenden Bereiche der humanen VPS4A/VPS4A^{E228Q} und VPS4B/VPS4B^{E235Q} Gene (cDNA) wurden in den Hefe-“Two-Hybrid“ Bindedomänenvektor pGBT9 als Fusionskonstrukt mit einer GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) kloniert (pVPS4-A^{E228Q}-BD bzw. pVPS4-B-BD) und in den haploiden Hefestamm PJD69-2A transformiert (siehe 3.4.).

Durch „Mating“ der haploiden Hefen (PJ692-A *Mat a*; Y187 *Mat α*) wurden diploide Hefezellen erzeugt, die sowohl den BD- als auch den AD-Vektor (pVPS4-A^{E228Q}-BD bzw. pVPS4-B-BD und pACT2-cDNA-AD) trugen (genaueres Protokoll ist aus dem Handbuch von Clontech „Pretransformed MATCHMAKER Libraries User Manual“ 1999 zu entnehmen). Die Selektion erfolgte auf Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin Mangelmedien. Der Hefestamm Y187 ist defizient für *ADE*, *HIS3*, *LEU* und *TRP*. Der Hefestamm PJ69-2A besaß *HIS3* und *ADE2* Reportergene, die über Bindung des GAL4 Transkriptionsaktivators aktiviert werden. Dies geschieht aber nur bei Interaktion der AD- und BD-Hybridproteine. Auch dieser Stamm ist defizient für *ADE*, *HIS3*, *LEU* und *TRP*. Durch Kultivierung auf Zweifach-Selektionsplatten (Trp⁻/Leu⁻) wurden die diploiden Hefekolonien selektiert, wobei ein Wachstum der diploiden Hefen auf den Zweifach-Selektionsplatten (Trp⁻/Leu⁻) nur bei Vorliegen beider Vektoren pACT2 (besitzt *LEU2*) und pGBT9 (besitzt *TRP1*) möglich war. Anschließend wurden die Hefekolonien auf Dreifach- (Trp⁻/Leu⁻/His⁻) und Vierfach-Selektionsmedium (Trp⁻/Leu⁻/His⁻/Ade⁻) übertragen und auf eine Interaktion zwischen dem VPS4A^{E235Q}-BD, bzw. VPS4B-BD und dem cDNA-AD Fusionsprotein des jeweiligen Zellklons getestet. Durch Interaktion der beiden Proteine (VPS4A^{E235Q}/B-BD und pACT2-cDNA-AD) können die entsprechenden Reportergene *HIS3* und *ADE2* aktiviert werden (Tab. 3.2.). Da das *HIS3* Gen bereits ohne Interaktion eine geringe Aktivität aufweist, wurde durch Zugabe von 2 mM 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) in Histidin Mangelmedien die Expression des *HIS3* Gens inhibiert.

Potentielle Interaktionskandidaten zeichneten sich durch Wachstum auf Dreifach- und Vierfach-Selektionsmedien aus und wurden nach Sicherung als diploide Hefezellen in Trp⁻/Leu⁻ Flüssigmedium zwecks Plasmidisolierung (siehe 3.5.5.) angereichert. Anschließend wurden die Plasmide in den *E. coli* Stamm XL1 Blue transformiert, und von 5 Klonen Plasmid-DNA isoliert (3.5.2.1.). Durch *HindIII* Restriktion (3.7.) wurden die pACT2-cDNA-AD tragenden Klone identifiziert und auf LB-Amp Platten gesichert.

Reportergen	Synthese von	Selektion auf
<i>TRP1</i>	Tryptophan	Präsenz von pGBT9 (BD)
<i>LEU2</i>	Leucin	Präsenz von pACT2 (AD)
<i>HIS3</i>	Histidin	Interaktion von BD- mit AD-Fusionsprotein
<i>ADE2</i>	Adenin	Interaktion von BD- mit AD-Fusionsprotein

Tab. 3.2.: **Selektionsmöglichkeiten der diploiden Hefen im „Two-Hybrid“-Assay.** Dargestellt sind die Selektionsmöglichkeiten der diploiden Hefen (Mating von Y187 *MAT a* und PJD69-2A *MAT α*) auf SD-Minimalmedium. Durch Selektion auf Trp⁻/Leu⁻ Selektionsmedium wurden diploide Hefekolonien, welche beide im „Two-Hybrid“ eingesetzten Vektoren in sich vereinten, selektioniert. Eine Interaktion einer im pGBT9 klonierten VPS4-BD Variante mit einem Protein, exprimiert aus dem pACT2-cDNA-AD Vektor, führt zur Expression der Reportergene *HIS3* und *ADE2*. Die Hintergrundexpression des *HIS3* wird durch Zugabe von 2mM 3-amino-1,2,4triazol (3-AT) unterbunden.

Zur Identifizierung der Kandidaten wurde begonnen Plasmid-DNA aus den auf den Vierfach-Selektionsplatten gewachsenen Hefeklone zu isolieren und die pACT2-cDNA-AD Hybridanteile (cDNA) mittels spezifischen Primern (ADGal4/ADRev) direkt zu sequenzieren. Da eine Vielzahl von Klonen die gleiche cDNA Sequenz enthielten, wurde im weiteren Verlauf die PCR zur Identifizierung der Hybridanteile im pACT2-cDNA-AD eingesetzt (174 von 240 untersuchten Klonen). Damit wurde das gleiche Genprodukt unter Verwendung sequenzspezifischer Primer FYVE-Mix-fw/FYVE-Mix-rev amplifiziert. Klone, bei denen in der PCR kein DNA-Fragment amplifiziert werden konnte, wurden anschließend wie eingangs erwähnt zur Identifizierung der cDNA mit den Primern ADGal4 und ADRev sequenziert.

4. Ergebnisse

4.1. Suche nach möglichen Interaktionspartnern der humanen VPS4A und VPS4B Proteine

VPS4 Proteine sind Schlüsselproteine im intrazellulären Proteintransport. Sie sind wichtig für den Transport von Proteinen aus einem prävakuoalären/endosomalen Kompartiment (MVB/PVC). Experimente in der Hefe und in Säugerzellen haben gezeigt, dass hierbei Protein-Protein Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen (Babst et al. 1998). Die genauen molekularen Zusammenhänge aller beteiligten Proteinfaktoren im VPS4-abhängigen Proteintransport sind jedoch nicht geklärt. Welche weiteren Proteine involviert sind, sollte mit Hilfe einer „Two-Hybrid“ Suche geklärt und dabei möglichst umfassend nach möglichen Interaktionspartnern des humanen VPS4A und VPS4B Proteins gesucht werden. Teil dieser Arbeit war, Interaktionskandidaten zu isolieren und zu identifizieren, die eine Interaktion mit VPS4A^{E228Q} bzw. VPS4B zeigten.

Nach dem Mating der vortransformierten haploiden Hefestämme PJ69-2A (transformiert mit pVPS4-A^{E228Q}-BD oder pVPS4-B-BD) und Y187 (transformiert mit pACT2-cDNA-AD), erfolgte die Selektion auf Zweifach-Selektionsmedium, welches kein Tryptophan und Leucin enthielt (siehe 3.21). Auf Trp⁻/Leu⁻ Selektionsplatten können nur die diploiden Hefezellen (PJ69-2A/Y187) wachsen, bei denen sowohl der BD- als auch der AD-Vektor beider Fusionskonstrukte pVPS4-A^{E228Q}-/B-BD und pACT2-cDNA-AD vorhanden waren. Mit einer Matingeffizienz von ca. 10 % wurden $4,8 \times 10^6$ diploide Klone auf Interaktion durchsucht. Gewachsene Hefekolonien (Klone) wurden separiert und auf Drei- und Vierfach-Medium übertragen, um die exprimierten Proteine VPS4-A^{E228Q}-/B-BD und cDNA-AD auf Interaktion zu testen. Nach Übertragung auf Vierfach-Selektionsmedium, wurden insgesamt 254 mögliche mit VPS4A^{E228Q}, bzw. VPS4B interagierende Kandidaten isoliert (siehe Tab. 4.1.).

Im Verlauf der Analyse der 240 isolierten Klone, die auf eine Interaktion mit VPS4A^{E228Q} durch die o.g. Vierfachselektion hinwiesen, konnten 224 Klone untersucht werden (siehe Tab. 4.1 unterer Teil). 66 dieser 224 Klone wurden sequenziert, die restlichen 174 wurden durch PCR Analysen charakterisiert. 193 der 224 analysierten Klone, also 80% der Gesamtklone bei der „Two-Hybrid“ Suche mit VPS4A^{E228Q}, enthielten cDNA-Sequenzen eines Proteins, welches eine FYVE-Domäne enthält - *FYVE1*. Mit einem prozentualen Anteil von 7% aller isolierten VPS4A^{E228Q}-Kandidaten enthielten 16 Klone cDNA Fragmente des *KIAA1* Gens. 11 Klone trugen Sequenzen des humanen *KIN17* Gens. In drei Kandidaten wurden Teilsequenzen der „PKC-Like 1 Protein“ cDNA nachgewiesen und ein Klon enthielt eine *BC-2* (*CHMP2A*) Teilsequenz.

In der „Two-Hybrid“ Suche möglicher Interaktionspartner mit dem Wildtyp VPS4B Protein konnten lediglich 14 Hefeklone von den Vierfach-Selektionsplatten isoliert und sequenziert werden. 71% der Klone (10 von 14) wiesen die Sequenz des *FYVE1* Gens auf. Dies deckte sich mit dem Ergebnis der „Two-Hybrid“ Suche mit VPS4A^{E228Q}. Allerdings konnten keine Klone identifiziert werden, die in Analogie zur VPS4A^{E228Q} Suche die Sequenz des *KIAA1* Gens enthielten. 1 Klon erwies sich als falsch positiv, die restlichen 3 wurden in weiteren Analysen nicht mit einbezogen. Auch in einer in der Arbeitsgruppe durchgeführten „Two-

Hybrid“ Suche mit dem murinen dominant-negativen VPS4a^{E228Q} und Wildtyp VPS4b wurde eine murine cDNA Bank (Pool aus mRNA verschiedener Gewebe eines 17 Tage alten Embryos Fa. Clontech) eingesetzt und analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle aufgeführt (Tab. 4.1. grau unterlegt), da deutliche Parallelen zwischen beiden Ergebnissen zu erkennen sind, die auf orthologe Gene hinweisen. So wurde zum einen ein murines KIAA1 Protein als Interaktionskandidat isoliert. Zum Anderen konnte ein murines FYVE1 Protein als Interaktionskandidat in der murinen „Two-Hybrid“ Suche identifiziert werden.

„Two-Hybrid“ Suche mit:	Human VPS4A ^{E228Q} in pGBT9	Human VPS4B in pGBT9	Maus Vps4a ^{E228Q} in pGBT9	Maus Vps4b in pGBT9
Untersuchte Klone	240	14	35	46
davon sequenziert	66	14	35	42

Interaktionspartner	Anzahl der Klone	Anzahl der Klone	Anzahl der Klone	Anzahl der Klone
FYVE1	193 (80%)	10 (71%)	25 (71%)	7 (15%)
KIAA1	16 (7%)	--	6 (17%)	20 (48%)
ProteinkinaseC-like1	3			
KIN17	11			
BC-2 (CHMP2A)	1			

Tab. 4.1.: **Ergebnisse der durchgeführten „Two-Hybrid“ Suchen.** In der Tabelle sind die Ergebnisse der zwei „Two-Hybrid“ Suchen zusammengefasst (human VPS4A^{E228Q} und human VPS4B). Grau unterlegt sind die Ergebnisse von zwei „Two-Hybrid“ Suchen die im Labor mit einer Maus cDNA Bibliothek durchgeführt worden sind. Im oberen Teil ist die Anzahl der auf Vierfach-Selektionsplatten isolierten/analysierten Klone gezeigt. Im unteren Teil sind die identifizierten möglichen Interaktionspartner für human VPS4A^{E228Q}/VPS4B (weiß) und für Maus VPS4a^{E228Q}/VPS4b (grau) gezeigt. Die Interaktionspartner wurden durch Sequenzierung/PCR des pACT2-cDNA-AD Vektors identifiziert.

Das FYVE1 Protein enthält eine „FYVE-finger“ Domäne. Diese Domäne ist auch in anderen Proteinen (VPS27, EEA1) des intrazellulären Proteintransportes vorhanden. Bekannt ist, dass die „FYVE-finger“ Domäne an Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) bindet. PI3P ist Bestandteil der Endosomenmembran des Frühen Endosoms und des multivesikulären Kompartimentes.

KIAA1 enthält eine DUF292 Domäne. Die biologische Funktion dieser Domäne ist jedoch unbekannt.

KIN17 wurde bei Untersuchungen von DNA Reparaturfaktoren einer UV geschädigten Zelle analysiert. Dieses Protein ist ein Faktor im DNA Reparaturmechanismus.

Das PKC-like1 Protein ist, wie der Name zeigt, in der Sequenz ähnlich der Proteinkinase C. Eine biologische Relevanz für das PKC-like1 Protein ist nicht bekannt.

Das BC-2 ist identisch dem CHMP2A. CHMP2A ist als Interaktionspartner für VPS4b untersucht worden. CHMP2A ist homolog zum Hefeprotein Vps2p. Vps2p gehört zu den VPS Klasse E Proteinen.

4.2. Kontrolle der „Two-Hybrid“ Kandidaten *FYVE1*, *KIAA1* und *KIN17*

Neben denen in der „Two-Hybrid“ Suche eingesetzten ATPase defizienten dominant-negativen VPS4A^{E228Q}-BD und Wildtyp VPS4B-BD Ankerproteinen, wurden auch die entsprechenden Wildtyp VPS4A und dominant-negativen VPS4B^{E235Q} Proteinvarianten als GAL4-BD Expressionskonstrukte hergestellt (pVPS4-A-AD, pVPS4-B^{E235Q}-BD). Ausgewählte Kandidaten (*FYVE1*, *KIAA1* und *KIN17*) der fünf in der „Two-Hybrid“ Suche identifizierten möglichen VPS4A bzw. VPS4B Interaktionspartner sollten deshalb gezielt mit den zur Verfügung stehenden Wildtyp und dominant-negativen VPS4A und VPS4B Gal4-Bindedomänen-Fusionsproteinen auf mögliche Wechselwirkung untersucht werden. Das Ziel dieses Experimentes war einerseits, die bei der „Two-Hybrid“ Suche isolierten Kandidaten in einer unabhängigen „Two-Hybrid“ Analyse zu bestätigen. Andererseits sollte der Frage nachgegangen werden, ob insbesondere Kandidaten, die ausschließlich mit dem dominant-negativen VPS4A^{E228Q}-BD Fusionsprotein als Interaktionskandidat identifiziert werden konnten, auch mit dem VPS4A-BD und den beiden VPS4B Proteinvarianten (VPS4B-BD bzw. VPS4B^{E235Q}-BD) eine deutliche Wechselwirkung zeigen.

Es wurden deshalb, die in der Tabelle in Abb. 4.2. zusammengestellten Kombinationen aus pGBT9 und pACT2 (Leervektoren), pVPS4-A-BD, pVPS4-A^{E228Q}-BD, pVPS4-B-BD, pVPS4-B^{E235Q}-BD, sowie fünf ausgewählte cDNA Kandidatenklone (pACT2-cDNA-AD) aus der „Two-Hybrid“ Suche durch Cotransfektion des diploiden Hefestammes pJD69-2A/Y187 kombiniert. Zur Überprüfung des *FYVE1* Gens wurden die cDNA Klone pACT2-#23-AD und pACT2-#13-AD eingesetzt. Welchen Bereich des vollständigen ORFs des *FYVE1* Gens die Klone pACT2-#23-AD (#23) und pACT2-#13-AD (#13) abdecken, ist in der Abb. 4.3. ersichtlich.

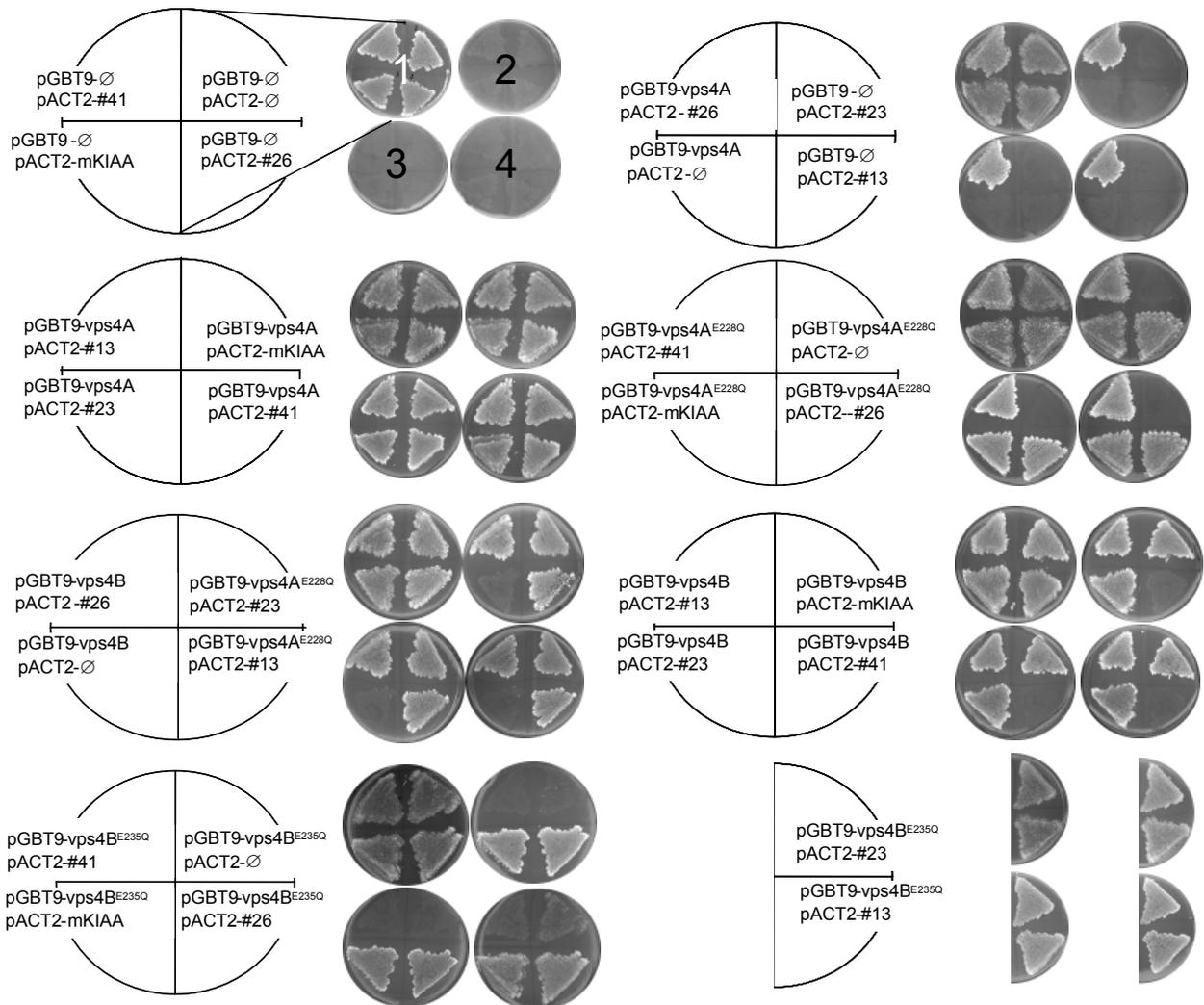
Für die Verifikation der Interaktion des KIAA1 Proteins wurde der humane Klon pACT2-#26-AD, bzw. der murine Klon pACT2-mKIAA1-AD (kompletter ORF des murinen KIAA1) in der „Two-Hybrid“ Analyse eingesetzt. In der „Two-Hybrid“ Suche konnte kein humaner KIAA1 Klon mit vollständigem ORF isoliert werden. Deshalb wurde pACT2-#26-AD (#26) zur Analyse der Interaktion mit VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B und VPS4B^{E235Q} ausgewählt (siehe Abb. 4.5.). Zur Überprüfung des KIN17 Interaktionskandidaten wurde der cDNA Klon pACT2-#41-AD (Abb. 4.7. #41) benutzt. Die transformierten Hefen wurden auf Zwei-, Drei- und Vierfach-Selektionsplatten inkubiert. Die drei cDNA Klone des ProteinkinaseC-like1 Gens, sowie der BC-2 (CHMP2A) Klon wurden bei den Analysen nicht berücksichtigt, weil sie im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter beobachtet wurden.

Als Ergebnis der „Two-Hybrid“ Analysen des *FYVE1* Interaktionspartners wuchsen auf den Selektionsplatten der Kontrolle keine Kolonien (Abb. 4.2), somit war das Wachstum der Hefen nur durch eine Interaktion der untersuchten Hybridproteine gegeben. Die mit den jeweiligen Fusionskonstrukten cotransformierten Hefen wuchsen auf allen vier verschiedenen Selektionsplatten (Trp⁻/Leu⁻ ; Trp⁻/Leu⁻/Ade⁻ ; Trp⁻/Leu⁻/His⁻/2mM AT ; Trp⁻/Leu⁻/His⁻/Ade⁻) gleichermaßen stark. Damit konnten nicht nur die bei der „Two-Hybrid“

Suche beobachteten Wechselwirkungen des FYVE1 Proteins mit der ATPase defizienten VPS4A^{E228Q} Proteinvariante und dem Wildtyp VPS4B verifiziert werden, vielmehr zeigten die Ergebnisse auch, dass die ATP-Hydrolyse defizienten VPS4B^{E235Q}-BD und Wildtyp VPS4A-BD Proteine mit dem FYVE1-AD Hybridprotein in den „Two-Hybrid“ Analysen interagierten.

Die Analyse des KIAA1 Kandidaten ergab, dass auf den Selektionsplatten der Vektorkontrollen (pACT2, pGBT9) keine Hefekolonien wuchsen (Abb. 4.2). Es belegt, dass die KIAA1 und VPS4 Fusionsproteine allein keine Aktivierung der Reportergene bewirken. Die mit den jeweiligen KIAA1 und VPS4 Fusionskonstrukten cotransformierten Hefen wuchsen auf allen vier verschiedenen Selektionsplatten gleich stark (siehe Abb. 4.2.). D.h. das humane KIAA1-AD und das murine KIAA1-AD Protein interagierten mit dem VPS4A-, VPS4A^{E228Q}-, VPS4B- und VPS4B^{E235Q}-BD Protein im „Two-Hybrid“ Assay. Ähnlich dem FYVE1 Protein konnte damit eine Interaktion nicht nur mit Wildtyp VPS4A und VPS4B, sondern auch mit den ATP-Hydrolyse defizienten Mutanten VPS4A^{E228Q} und VPS4B^{E235Q} beobachtet werden. Darüber hinaus konnte die in der „Two-Hybrid“ Suche gefundene VPS4A^{E228Q} Interaktion für das humane KIAA1-Protein auch für VPS4B nachgewiesen werden, wie sie für das murine KIAA1 Protein mit dem murinen VPS4b in der murinen „Two-Hybrid“ Suche beobachtet wurde (Tab. 4.1).

Zur Überprüfung der möglichen Interaktion des KIN17 Proteins mit den VPS4 Proteinvarianten, wurde der KIN17 Klon #41 zur „Two-Hybrid“ Analyse verwendet (Abb. 4.7.). Kontrollen wurden, wie oben für die FYVE1- und KIAA1- Experimente beschrieben, ebenfalls durchgeführt (Abb.4.2.) Genau wie in den FYVE1- und KIAA1- Experimenten wuchsen auf den Zweifach-, Dreifach- und Vierfach-Selektionsplatten der mit Leervektor transformierten Hefen keine Kolonien (Abb. 4.2). Das im DNA Reparaturmechanismus involvierte Protein aktivierte nicht die Reportergene. Die mit den jeweiligen Fusionsproteinen cotransformierten Hefen zeigten jedoch deutliche Unterschiede im Bezug auf das Wachstum auf den Dreifach- und Vierfach-Selektionsplatten. So wuchsen nur Hefezellen, in denen das KIN17-AD Protein mit dem VPS4A-BD bzw. VPS4A^{E228Q}-BD Protein interagierte. Interessanterweise zeigten Hefen, die das VPS4B-BD bzw. VPS4B^{E235Q}-BD Protein zusammen mit dem KIN17-AD Protein coexprimierten keinerlei signifikantes Wachstum auf den Selektionsplatten. Somit war festzuhalten, dass das KIN17 Protein nur mit dem VPS4A Protein und dessen dominant-negativer VPS4A^{E228Q} Proteinvariante interagiert, nicht aber mit den VPS4B und VPS4B^{E235Q} Proteinen.



-BD \ -AD	pACT2- ∅	pACT2-#26 <u>human KIAA1</u>	pACT2- mKIAA1 <u>mKIAA1</u>	pACT2-#41 <u>KIN17</u>	pACT2-#23 <u>FYVE1</u>	pACT2-#13 <u>FYVE1</u>
pGBT9-∅	-	-	-	-	-	-
pVPS4-A	-	+	+	+	+	+
pVPS4-A ^{E228Q}	-	+	+	+	+	+
pVPS4-B	-	+	+	-	+	+
pVPS4B ^{E235Q}	-	+	+	-	+	+

Abb. 4.2.: Übersicht der „Two-Hybrid“ Ergebnisse im diploiden Hefestamm PJD69-2A/Y187 zur Untersuchung der identifizierten möglichen Interaktionspartner FYVE1, KIAA1 und KIN17. Dazu wurden pVPS4-A-BD, pVPS4-A^{E228Q}-BD, pVPS4-B-BD, pVPS4-B^{E235Q}-BD (pGBT9 BD-Vektor) mit isolierten pACT2-cDNA-AD (#..) „Two-Hybrid“ Klonen (pACT2 AD-Vektor) cotransformiert. Zusätzlich erfolgte als Negativkontrolle die Transformation mit den entsprechenden „Two-Hybrid“ Leervektoren ohne Insert (∅). Gezeigt ist das Wachstum der unterschiedlich transformierten Hefen auf Trp⁻/Leu⁻ Selektionsplatten (1.); Trp⁻/Leu⁻/Ade⁻ (2.); Trp⁻/Leu⁻/His⁻, 2mM AT (3.) und Trp⁻/Leu⁻/His⁻/Ade⁻ Selektionsplatten (4.). Zur besseren Übersicht ist in der unteren Tabelle das Wachstumsverhalten der Klone zusammengefasst. + bedeutet Wachstum, - bedeutet kein signifikantes Wachstum.

4.3. FYVE1

Als mögliche Interaktionspartner für VPS4A^{E228Q} und VPS4B tauchten sehr häufig cDNA Fragmente eines Gens auf, das ein Protein mit einer „FYVE-finger“ Domäne kodiert (> 80%). Von den 193 als FYVE1 identifizierten Interaktionskandidaten für VPS4A^{E228Q}, sind in der Abbildung 4.3. diejenigen 12 Klone dargestellt, deren Sequenz komplett ermittelt wurde. Bei der Analyse der Sequenzen dieser 12 Kandidaten stellte sich heraus, dass diese Sequenz einem Protein zugeordnet werden konnte, das eine „FYVE-finger“ Domäne (Overduin et al. 2001) im N-terminalen Bereich besitzt. Die Analyse der ermittelten Sequenzen wurde in der NCBI-Datenbank durchgeführt. Aus Abb. 4.3. ist ersichtlich, dass den sequenzierten 12 Klonen gegenüber dem Offenen Leseraster (ORF) des kompletten *FYVE1* Gens (NCBI Acc # BC015738.1) ein Bereich von 201 bp fehlt. Der Vergleich mit dem FYVE1 Datenbankeintrag (Acc# 015738.1) lässt auch erkennen, dass die 12 cDNA Fragmente nur einen Teil des in der NCBI Datenbank hinterlegten ORF's abdecken.

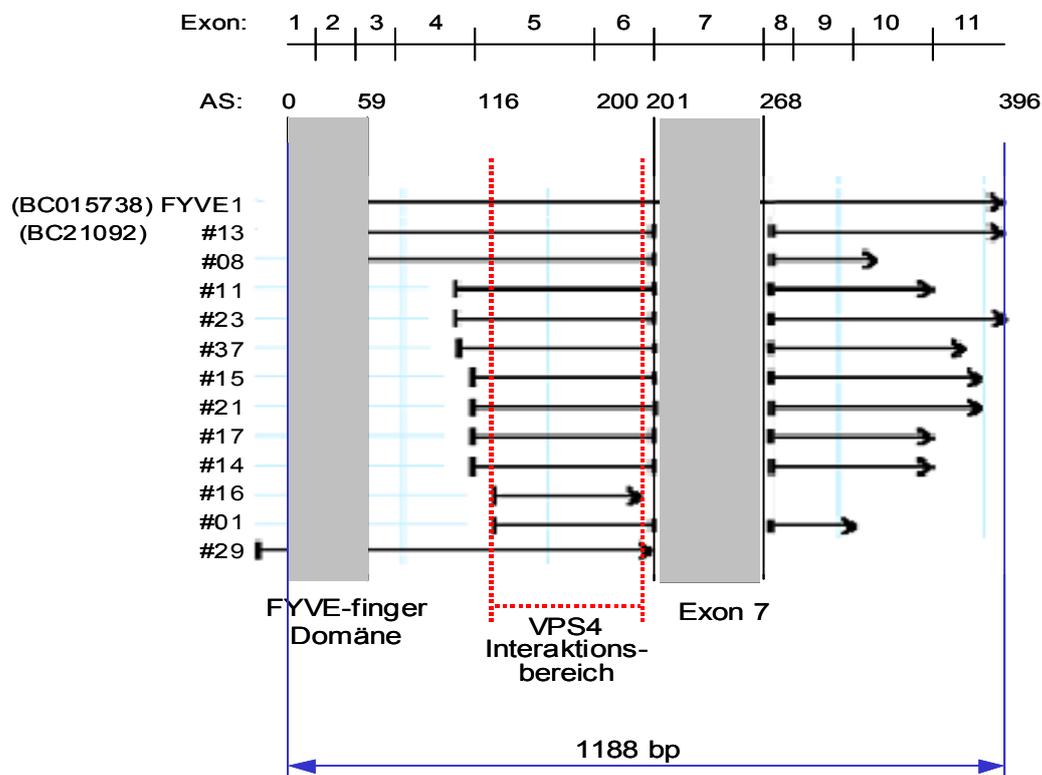


Abb. 4.3.: **Schematische Darstellung von 12 FYVE1 „Two-Hybrid“ cDNA Klonen.** Von 12 FYVE1 „Two-Hybrid“ Klonen (#..) wurde mittels DNA-Sequenzierung der für das FYVE1 Protein kodierenden Bereich ermittelt und zusammen mit dem kompletten ORF (FYVE1) des Datenbankeintrages (NCBI Acc# BC015738) schematisch darstellt. Die grauen Balken repräsentieren die FYVE-Domäne bzw. das Exon 7, das bei den sequenzierten Klonen fehlt. Rot begrenzt markiert den möglichen Interaktionsbereich mit VPS4.

Z.B. umfasst Klon 29 den 5' Bereich bis ca. 600 Basen in 3' Richtung des Startcodons (ATG) und schließt damit die „FYVE-finger“ Domäne ein. Klon 1 hingegen beginnt erst ab ca. 350 Basen 3' des ATG und deckt ab dieser Stelle den ORF des *FYVE1* Gens ab, beinhaltet aber nicht die „FYVE-finger“ Domäne selbst. Da beide Klone jedoch mit den VPS4 Proteinen im

„Two-Hybrid“ Test interagieren, muß der Interaktionsbereich mit VPS4A^{E228Q} und VPS4B innerhalb des Überlappungsbereiches liegen und zwar von AS 116 bis AS 200. Interessanterweise liegt dieser Bereich damit außerhalb der „FYVE-finger“ Domäne. Klon 16 beinhaltet das kleinste Fragment von *FYVE1*, das mit VPS4 interagiert. Die unter Punkt 4.2. beschriebenen „Two-Hybrid“ Analysen wurden mit den Klonen #13 und #23 durchgeführt (siehe Abb. 4.3.).

```

>(BC015738) 1 MESRCYGCAV KFTLFKKEYG CKNCGRAFCS GCLSFSAAVP RTGNTQQKVC
>(BC21092) 1 MESRCYGCAV KFTLFKKEYG CKNCGRAFCS GCLSFSAAVP RTGNTQQKVC

>(BC015738) 51 KQCHEVLTRG SSANASKWSP PQNYKKRVAA LEAKQKPSTS QSQGLTRQDQ
>(BC21092) 51 KQCHEVLTRG SSANASKWSP PQNYKKRVAA LEAKQKPSTS QSQGLTRQDQ

>(BC015738) 101 MIAERLARLR QENKPKLVPS QAEIEARLAA LKDERQGSIP STQEMEARLA
>(BC21092) 101 MIAERLARLR QENKPKLVPS QAEIEARLAA LKDERQGSIP STQEMEARLA

>(BC015738) 151 ALQGRVLPSQ TPQPAHHTPD TRTQAQQTQD LLTQLAAEVA IDESWKGGGP
>(BC21092) 151 ALQGRVLPSQ TPQPAHHTPD TRTQAQQTQD LLTQLAAEVA IDESWKGGGP

>(BC015738) 201 AASLQNDLNQ GGPGSTNSKR QANWSLEEEK SRLLEAAALE LREENTRQER
>(BC21092)

>(BC015738) 251 ILALAKRLAM LRGQDPERVT LQDYRLPDS DDEDEETAIQ RVLQQLTEEA
>(BC21092) 201 VT LQDYRLPDS DDEDEETAIQ RVLQQLTEEA

>(BC015738) 301 ALDEASGFNI PAEQASRPWT QPRGAEPEAQ DVDPRPEAEE EELPWCCICN
>(BC21092) 233 ALDEASGFNI PAEQASRPWT QPRGAEPEAQ DVDPRPEAEE EELPWCCICN

>(BC015738) 351 EDATLRCAGC DGDLFCARCF REGHDAFELK EHQTSAYSPP RAGQEH
>(BC21092) 283 EDATLRCAGC DGDLFCARCF REGHDAFELK EHQTSAYSPP RAGQEH

```

Abb. 4.4.: Aminosäuresequenz des FYVE1 Proteins mit Exon 7 (Acc# BC015738.1) und ohne Exon 7 (Acc# BC21092.1) Die konservierten acht Cysteine der „FYVE-finger“ Domäne sind in blau dargestellt. Die unterstrichenen Bereiche markieren die Peptidsequenzen, welche zur Generierung polyklonaler Antikörper verwendet wurden. In grün ist die Exon 7 Sequenz in BC015738 hervorgehoben. Hervorgehoben ist ebenfalls der Interaktionsbereich mit VPS4A/B Proteinen (Fettschrift).

Die komplette Aminosäuresequenz des FYVE1 Proteins ist in der Abb. 4.4. dargestellt (Acc# BC015738.1). Die Bezeichnung „FYVE“ rührt von vier Proteinen her, in denen das „FYVE zinc finger Motiv“ identifiziert und deren Anfangsbuchstaben für die Benennung herangezogen wurde: **F**ab1, **Y**OTB/ZK632.12, **V**ac1, and **E**EA1. Dieses „FYVE zinc finger Motiv“ besitzt acht Cysteine, durch deren Koordination Ionen gebunden werden, wobei die Cysteine 1 + 2 sowie 5 + 6 das erste Zn²⁺ und die übrigen das zweite Zn²⁺-Ion koordinieren. Viele Proteine dieser FYVE Familie besitzen zwei Histidine in der Anordnung R+HHC+XCG, wobei + eine geladene Aminosäure und X jede beliebige Aminosäure repräsentiert. FYVE-Proteine, welche kein Histidin in dieser konservierten Sequenz besitzen, zählen zu den sogenannten „FYVE-related“ Proteinen (Stenmark und Aasland 1999). Das in der „Two-Hybrid“ Suche gefundene FYVE1 Protein enthält kein Histidin. Desweiteren ist bekannt, dass die „FYVE-finger“ Domäne an Phosphatidylinositol-3-phosphat bindet (Gillooly et al. 2000).

PI3P ist Bestandteil der Endosomenmembran (Frühes Endosom/MVB). Bekannte Proteine, die eine „FYVE-finger“ Domäne besitzen, sind in den intrazellulären Proteintransport involviert (Gillooly et al. 2001).

Das für die weiteren Analysen verwendete FYVE1 Protein (#13) besitzt kein Exon 7 und ist 328 Aminosäuren (Acc #BC21092.1) lang. Die Aminosäuresequenz des kompletten ORF entspricht der Aminosäuresequenz des Datenbankeintrages NCBI Acc# BC015738 im National Center of Biotechnology Information. Der ORF der entsprechenden *FYVE1* cDNA Sequenz ist 1188 Basenpaare lang (396 AS). Das *FYVE1* besitzt 11 Exone, wobei das aus dem TH-Assay isolierte *FYVE1*, wie der Datenbankeintrag NCBI Acc# BC21092 kein Exon 7 besitzen (Abb.4.3.) und damit eine Splicevariante darstellen. Sowohl in der Datenbank, als auch in der „Two-Hybrid“ Suche mit VPS4A^{E228Q} und VPS4B wurden FYVE1 Proteine sowohl mit, als auch ohne Exon 7 gefunden (nicht gezeigt). FYVE1 (BC21092) ist rechnerisch 36,5 kDa groß. Das *FYVE1* Gen ist auf Chromosom 15q15.1 lokalisiert.

Die in Abb. 4.4. in blau dargestellten Cysteine stellen die acht konservierten Cysteine der „FYVE-finger“ Domäne dar. Die unterstrichenen Bereiche markieren die zwei Epitopbereiche, gegen die polyklonale Antikörper generiert wurden (Abb. 4.4. unterstrichen). Neben der „FYVE-finger“ Domäne wurde in der Ensembl Datenbank (www.ensembl.org) auch eine Ubiquitin Ligase Funktion elektronisch annotiert, die aber nicht manuell durch Experimente überprüft worden ist. Zur weiteren unabhängigen Analyse der vermuteten Interaktion mit VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B, VPS4B^{E235Q} wurde der FYVE1-Klon #13 (pACT2-#13-AD) benutzt. Dieser FYVE1-Klon wurde aus der „Two-Hybrid“ cDNA Bibliothek (Fa. Clontech) isoliert.

4.2.2. KIAA1

Ein weiterer möglicher VPS4 Interaktionspartner, der in den „Two-Hybrid“ Suchen identifiziert wurde, war das Genprodukt KIAA1 der cDNA *KIAA0174* (nachfolgend als *KIAA1* bezeichnet). cDNA Fragmente des *KIAA1* ORF's fanden sich in 16 Klonen wieder. Interessanterweise wurden diese KIAA1-Klone bei der Suche nach VPS4A^{E228Q} Interaktionspartnern gefunden, jedoch nicht mit VPS4B. In der unter Punkt 4.2. durchgeführten gezielten „Two-Hybrid“ Analyse mit einem humanen KIAA1 und einem murinen KIAA1 „Two-Hybrid“ Kandidaten konnte jedoch eine Interaktion mit Wildtyp und dominant-negativen VPS4A und VPS4B ermittelt werden. In einer parallel durchgeführten „Two-Hybrid“ Suche (grau unterlegt Tabelle 4.1.), bei der nach VPS4a^{E228Q} bzw. VPS4b Interaktionspartner in der Maus gesucht wurde, konnte das murine *KIAA1* identifiziert werden.

In Abb. 4.5 sind beispielhaft 8 der 16 identifizierten KIAA1 Klone, die in der „Two-Hybrid“ Suche gefunden wurden, schematisch dargestellt. Die Länge der cDNA-Fragmente dieser Klone sind im Verhältnis zum kompletten ORF des *KIAA1* Gens (*KIAA1* = 1098 bp) dargestellt und decken ca. 71% der *KIAA1* cDNA ab. Die mögliche Interaktion mit VPS4A^{E228Q} liegt in einem 113 Basenpaar langen Bereich (AS 302-340) (Abb.4.5.). Dieser Bereich liegt C-terminal des *KIAA1* ORF's. Bei der „Two-Hybrid“ Suche wurde kein KIAA1 Klon identifiziert, der den gesamten ORF (NCBI Acc# AK057258) des *KIAA1* Gens enthielt.

Deshalb wurde anhand der Sequenz des Datenbankeintrages eine *KIAA1* cDNA aus einer cDNA Bank amplifiziert. Als Grundlage hierzu diente eine cDNA Bank aus HaCaT Zellen. HaCaT Zellen sind eine Zelllinie humaner Keratinocyten (Hautzellen). Zur Erzeugung des KIAA1- cDNA Klones mittels cDNA Amplifikation wurden die spezifischen Primer Kia-Eco und Kia-Asp2 in einer PCR eingesetzt. Die Kia-Eco Primersequenz basierte auf der Grundlage des Datenbankeintrages (AK057258), die Kia-Asp2 Primersequenz basierte auf Sequenzierdaten der 16 Klone. Das 1098 Basenpaar große KIAA1 PCR-Fragment wurde anschließend in den Vektor pJD302 kloniert (pKIAA1-CHA).

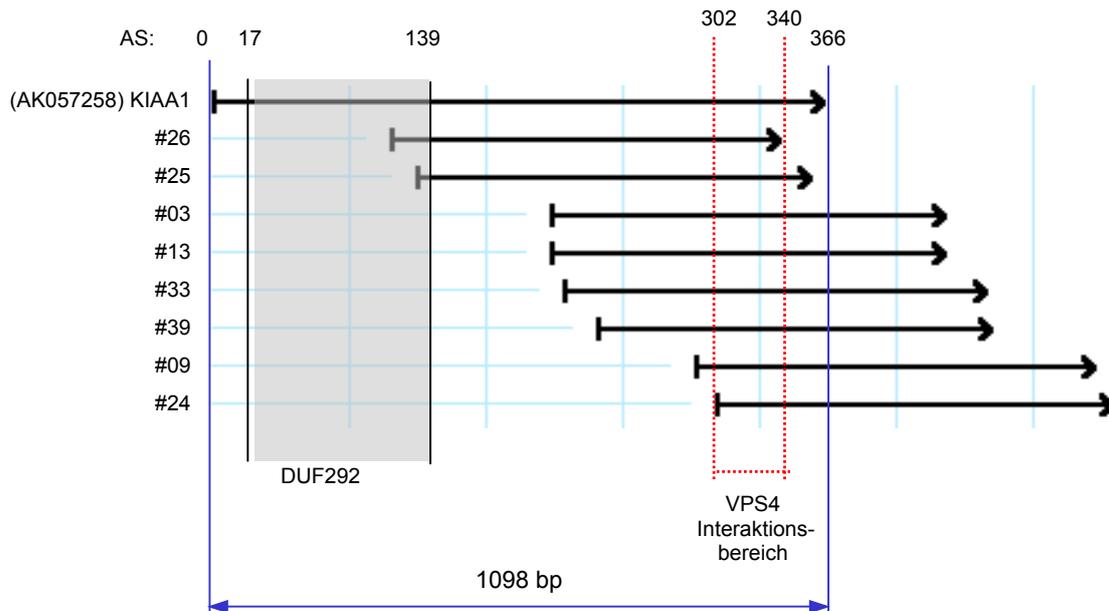


Abb. 4.5.: **Schematische Darstellung identifizierter KIAA1 „Two-Hybrid“ cDNA Klone.** Gezeigt sind 8 Klone einer Sequenzierungsanalyse, wobei KIAA1 den kompletten ORF dieses Gens (NCBI Acc# AK057258) darstellt. Der grauen Balken repräsentiert die DUF292-Domäne. Rot begrenzt markiert den möglichen Interaktionsbereich mit VPS4.

Die DNA-Sequenzierung des isolierten volle Länge *KIAA1* cDNA Klones im Vektor pJD302 ergab folgendes: Im Vergleich zum Datenbankeintrag Acc# AK057258 (NCBI) war in Position 998 eine Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch in Position 331 D → G führte. Die *KIAA1* Proteinsequenz ist 366 Aminosäuren lang. Sie entspricht dem NCBI Datenbankeintrag Acc# P53990, beinhaltet jedoch in der Aminosäuresequenz analog zu NCBI Klon Acc# BC000116 ein zusätzliches Aminosäure-Paar Prolin-Methionin (PM) zwischen 229 und 236. Die Punktmutation und PM liegen außerhalb der annotierten DUF292 Domäne, welche im N – terminalen Bereich zwischen 51 bp und 417 bp des *KIAA1* ORF's liegt. *KIAA1* hat ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Das *KIAA1* Gen liegt auf dem Chromosom 16q22.2.

In Abb. 4.6. ist die AS-Sequenz des *KIAA1* Proteins dargestellt, wie sie nach Isolierung der cDNA aus der HaCaT cDNA Bank zur weiteren Untersuchung in Colokalisations- und Coimmunpräzipitationsexperimenten exprimiert wurde. *KIAA1* enthält N-terminal eine Proteindomäne mit der Bezeichnung DUF292 (blau). Dieser Domäne ist allerdings zur Zeit noch keiner Funktion zugeordnet worden. Die Datenbankrecherche ergab, dass es auch

unter anderem in Maus, Ratte und Zebrafisch Proteine mit einer DUF292 Domäne gibt (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/).

>KIAA1 Proteinsequenz 366 Aminosäuren, 1098 Basenpaare (NCBI Acc# P53990)

```
MLGSGFKAER LRVNLRLVIN RLKLLLEKKKKT ELAQKARKEI ADYLAAGKDE RARIRVEHII60
REDYLVEAME ILELYCDLLL ARFGLIQSMK ELDSGLAESV STLIWAAPRL QSEVAELKIV120
ADQLCAKYSK EYGKLCRTNQ IGTVNDRMLH KLSVEAPPKI LVERYLIEIA KNYNVPYEPD180
SVVMAEAPPG VETDLIDVGF TDDVKKGGPG RGGSGGFTAP VGGPDGTVPM PMPMPMPMP240
ANTPFSYPLP KGPSDFNGLP MGTYQAFPNI HPPQIPATPP SYESVDDINA DKNISSAQIV300
GPGPKPEASA KLPSRPADNY DNFVLPPELPS VPCTLPTASA GASTSASEDI DFDDLSRRFE360
ELKKKT
```

Abb. 4.6.: **Aminosäuresequenz des KIAA1 Proteins (#P53990)**. Das KIAA1 Protein besitzt 366 Aminosäuren. In blau dargestellt ist die DUF292 Region. In Fettschrift dargestellt ist das zusätzliche Prolin-Methionin Aminosäurepaar (wie Acc# BC000116). Der Aminosäureaustausch D→G ist in grün hervorgehoben. Die gewählte Peptidsequenz zur Generierung polyklonaler Antikörper in Kaninchen ist unterstrichen.

4.2.3. KIN17

Auch cDNA Fragmente des *KIN17* Gens traten mehrfach in den VPS4A^{E228Q} „Two-Hybrid“ Suchen auf. Bei der Suche mit VPS4B als Ankerprotein wurden allerdings keine KIN17-cDNA Klone gefunden. In der gezielt durchgeführten „Two-Hybrid“ Analyse interagiert das KIN17-AD Hybridprotein wiederum nur mit dem VPS4A-BD bzw. VPS4A^{E228Q}-BD und nicht mit dem VPS4B-BD bzw. VPS4B^{E235Q}-BD Hybridprotein. 8 von 11 cDNA Fragmenten der sequenzierten KIN17 Klone sind in der Abb. 4.7. aufgeführt. Sie sind in Relation zum vollständigem ORF des *KIN17* dargestellt, der dem NCBI Datenbankeintrag Acc# AJ005273 entnommen wurde. Die Proteinregion, die vermutlich für die Interaktion mit VPS4A verantwortlich ist, liegt offensichtlich innerhalb der ersten 655 Basenpaare 3' vom ATG, da nur aus diesem Bereich Klone mit Fragmenten der *KIN17* cDNA isoliert worden sind. In der untersuchten „Two-Hybrid“ cDNA Bank konnte kein Klon mit komplettem *KIN17* ORF identifiziert werden.

Bei der mit einer Maus cDNA Bibliothek durchgeführten „Two-Hybrid“ Suche wurde kein murines *KIN17* Orthologes identifiziert. Das KIN17 Protein wurde bereits funktionell von Kannouche und Angulo (1999) untersucht. KIN17 ist ein humanes Protein, welches aus Zellen isoliert wurde, die u.a. mit UV-Licht behandelt worden waren. In diesem Zusammenhang wurde dieses Protein den Proteinen des DNA Reparaturmechanismus zugeordnet, wobei funktionelle Homologien zum bakteriellen RecA Protein aufgezeigt wurden. Die Aktivität des KIN17 und RecA Proteins liegen im Zellkern. Weitere funktionelle Domänen sind nicht bekannt.

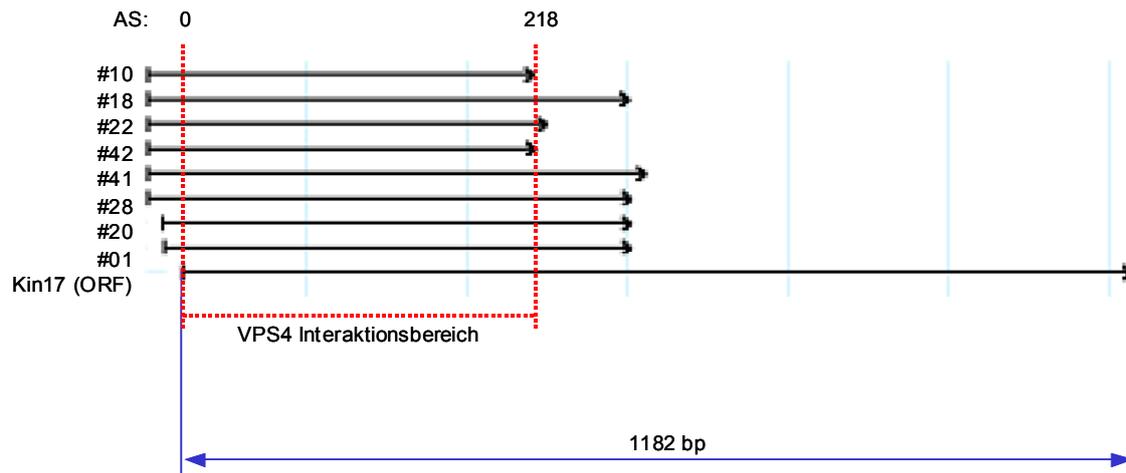


Abb. 4.7.: **Schematische Darstellung identifizierter KIN17 „Two-Hybrid“ cDNA Klone.** Gezeigt ist eine Übersicht von acht sequenzierten „Two-Hybrid“ cDNA Klone, die als *KIN17* Gen identifiziert worden waren. Der Interaktionsbereich mit den VPS4A/VPS4A^{E228Q} Proteinen liegt im Bereich bis etwa 655 Basen 3' vom Startcodon. Das *KIN17* Gen (Acc# AJ005273) ist 1182 bp lang (*KIN17* (ORF)).

4.2.4. Das PKC-like 1 Protein

Drei Klone mit cDNA Fragmenten wurden in der „Two-Hybrid“ Suche nach Analyse der DNA-Sequenz in der NCBI Datenbank dem Proteinkinase C-like1 Protein zugeordnet. Eine biologische Funktion dieses Proteins ist nicht bekannt, da lediglich DNA-Sequenzierdaten zu diesem Protein vorhanden sind. Die DNA-Sequenz des PKC-like1 Proteins ist nicht identisch mit der Sequenz der Proteinkinase C (PKC). Desweiteren gibt es von der PKC verschiedene Isoformen. Aber auch hier zeigte sich keine Übereinstimmung der isolierten „Two-Hybrid“ cDNA Klone, bzw. des PKC-like1 Proteins mit einer dieser Isoformen. Da weder über die „Two-Hybrid“ cDNA Bank, noch über die HaCaT cDNA Bank ein kompletter cDNA Klon mit vollständigem ORF amplifiziert werden konnte, wurde dieser Interaktionskandidat von den weiteren Analysen ausgenommen.

4.2.5. Das BC-2 (CHMP2A) Protein

Bei einem der fünf putativen VPS4A^{E228Q} Interaktionspartner, BC-2 (CHMP2A), handelte es sich um einen inzwischen bekannten VPS4b Interaktionspartner. In der Literatur ist das BC-2 Protein auch als CHMP2A Protein (chromatin modifying protein 2A) beschrieben. Das orthologe Hefeprotein ist das Vps2p, das man in der Literatur auch als Chmp2p/Did4p bezeichnet (Howard et al. 2001; Fujita et al. 2004). Fujita et al. (2004) konnten zeigen, dass das murine VPS2 in „Two-Hybrid“ Analysen mit dem Maus VPS4b Protein wechselwirkt. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte „Two-Hybrid“ Suche konnte die Interaktion des BC-2/CHMP2A/VPS2 mit VPS4A^{E228Q} identifiziert werden. Vps2p ist als VPS Klasse E Protein des ESCRT- III Komplexes identifiziert worden (Babst et al. 2002). Die weiteren zellbiologischen und biochemischen Experimente konzentrierten sich auf das FYVE1 und KIAA1 Protein.

4.3. Bestimmung der subzellulären Verteilung der VPS4A, VPS4B, KIAA1 und FYVE1 Proteine

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung der VPS4A, VPS4B, KIAA1 und FYVE1 Proteine wurden diese als fluoreszierende Fusionsproteine in kultivierten Säugerzellen exprimiert. Zunächst sollte die subzelluläre Verteilung der VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B und VPS4B^{E235Q} Proteine als grün fluoreszierende Fusionsproteine ermittelt werden (VPSA-GFP, VPS4A^{E228Q}-GFP, VPS4B-GFP, VPS4B^{E235Q}-GFP). Zur Bestimmung der subzellulären Verteilung der FYVE1 und KIAA1 Proteine, sollten diese in Säugerzellen als rot fluoreszierende DsRed-Fusionsproteine exprimiert werden (KIAA1-DsRed, FYVE1-DsRed). Am Laserscanning Mikroskop (LSM 510) wurde GFP mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und zwischen 505-530 nm detektiert. Die DsRed Anregung erfolgte bei 543 nm und die Detektion zwischen 560-615 nm. Mikroskopiert wurde mit dem Objektiv LD-Achroplan 40x/0,6 corr Ph2 oder Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil.

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit der humanen Leberzelllinie HepG2 und humanen HeLa-Zelllinie durchgeführt. HeLa-Zellen hatten den Vorteil, dass sie stets einschichtig als Monolayer wuchsen, während die HepG2 Zellen teilweise innerhalb der 48 Stunden vereinzelte kleine Kolonien ausbildeten, d.h. die Zellen waren nicht mehr einschichtig, was die Beobachtungen partiell erschwerte.

Zur Kontrolle wurden auch die fluoreszierenden GFP- und DsRed-Proteine in Form der reinen pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO und pDsRed1-N1 Expressionsvektoren jeweils in HeLa und in HepG2 transfiziert. Die GFP- und DsRed-Proteine waren in den HeLa und HepG2 Zellen homogen im Zellplasma verteilt. Es wurde keine Colokalisation in den Zellen beobachtet. Sie beeinflussten sich gegenseitig nicht in ihrer Verteilung (Daten nicht gezeigt).

4.3.1. Subzelluläre Verteilung der VPS4A-, VPS4A^{E228Q}-, VPS4B- und VPS4B^{E235Q}-GFP Fusionsproteine

Zunächst wurden die Fusionskonstrukte pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-GFP, pVPS4B-GFP und pVPS4B^{E235Q}-GFP in den zwei humanen Zelllinien HepG2 und HeLa einzeln transfiziert und die Verteilung der exprimierten Proteine mikroskopisch analysiert. In den transfizierten HepG2 Zellen ergab sich folgendes Bild: Das VPS4A-GFP Protein lag hauptsächlich im Zytoplasma homogen verteilt (Abb. 4.8. A). Das VPS4A^{E228Q}-GFP Protein lag eher etwas stärker konzentriert um den Zellkern (perinukleär) lokalisiert vor (Abb. 4.8. B). Die diffuse Verteilung im Cytoplasma über die ganze Zelle wie beim Wildtyp VPS4A-GFP Protein ging dabei zurück. Die in HepG2 Zellen untersuchte zelluläre Verteilung von Wildtyp VPS4B-GFP zeigte eine ähnliche cytosolische Verteilung in der Zelle wie VPS4A-GFP, wobei auch hier VPS4B im gesamten Cytoplasma verteilt war (Abb. 4.8. C). Die Verteilung des VPS4B^{E235Q}-GFP Proteins hingegen war komplett auf kleine begrenzte Regionen konzentriert. Noch stärker als in VPS4A^{E228Q}-GFP exprimierenden Zellen war die Lokalisation der VPS4B^{E235Q}-GFP Mutante um den Zellkern zu erkennen (Abb. 4.8. D weißer Pfeil).

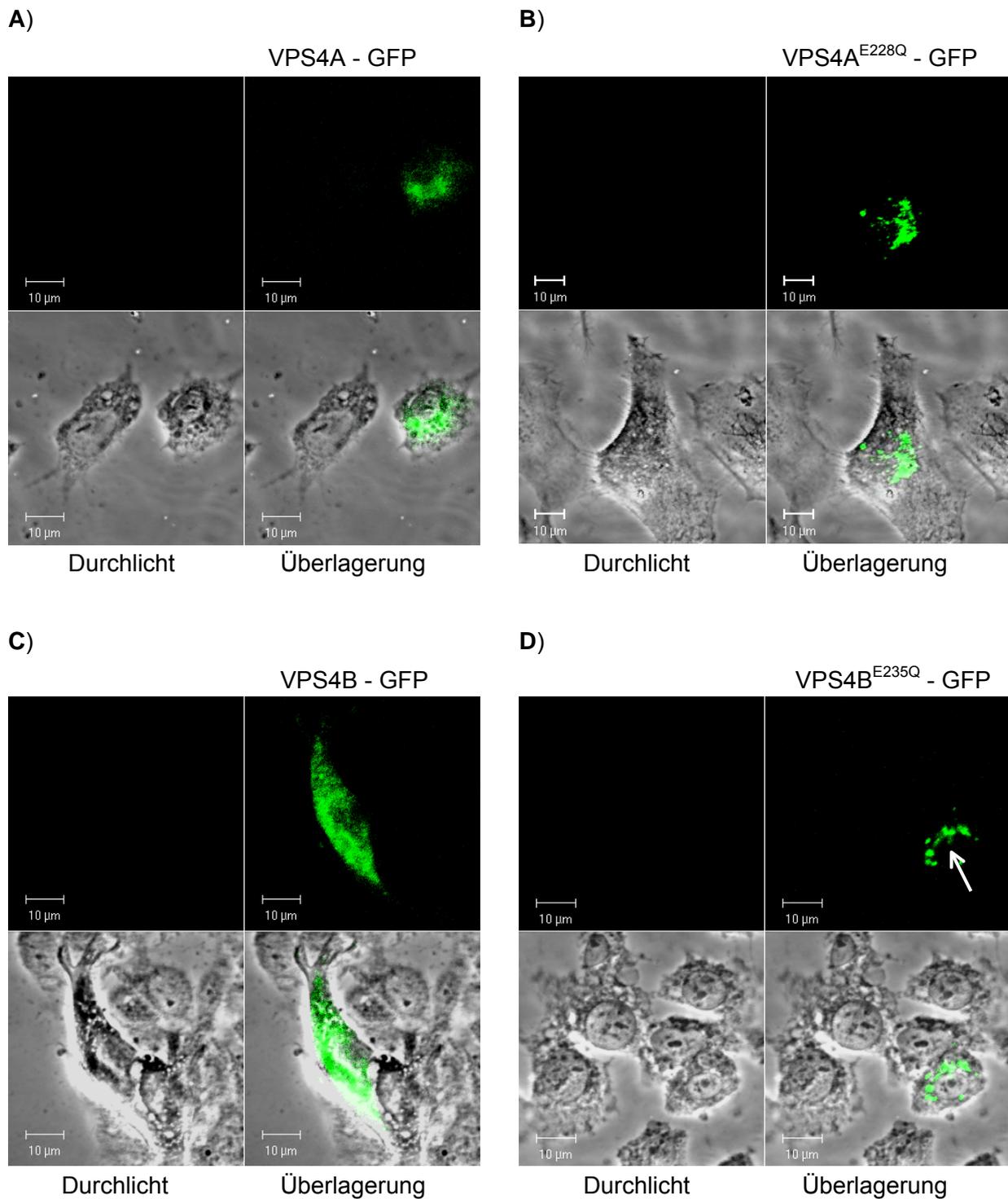
HepG2

Abb. 4.8.: Expression der VPS4A-GFP (A) und VPS4A^{E228Q}-GFP (B), bzw. der VPS4B-GFP (C) und VPS4B^{E235Q}-GFP (D) Fusionsproteine in HepG2 Zellen. Mit den Expressionskonstrukten pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-GFP, pVPS4B-GFP und pVPS4B^{E235Q}-GFP wurden HepG2 Zellen transient transfiziert und die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion fixiert. Anschließend wurde am LSM 510 (Fa. Zeiss) mikroskopiert. Dargestellt ist die jeweilige Verteilung der verschiedenen VPS4-GFP Fluoreszenzproteine in HepG2 Zellen. Der Pfeil markiert die Konzentration des VPS4B^{E235Q}-GFP Proteins an der Zellkerngrenze.

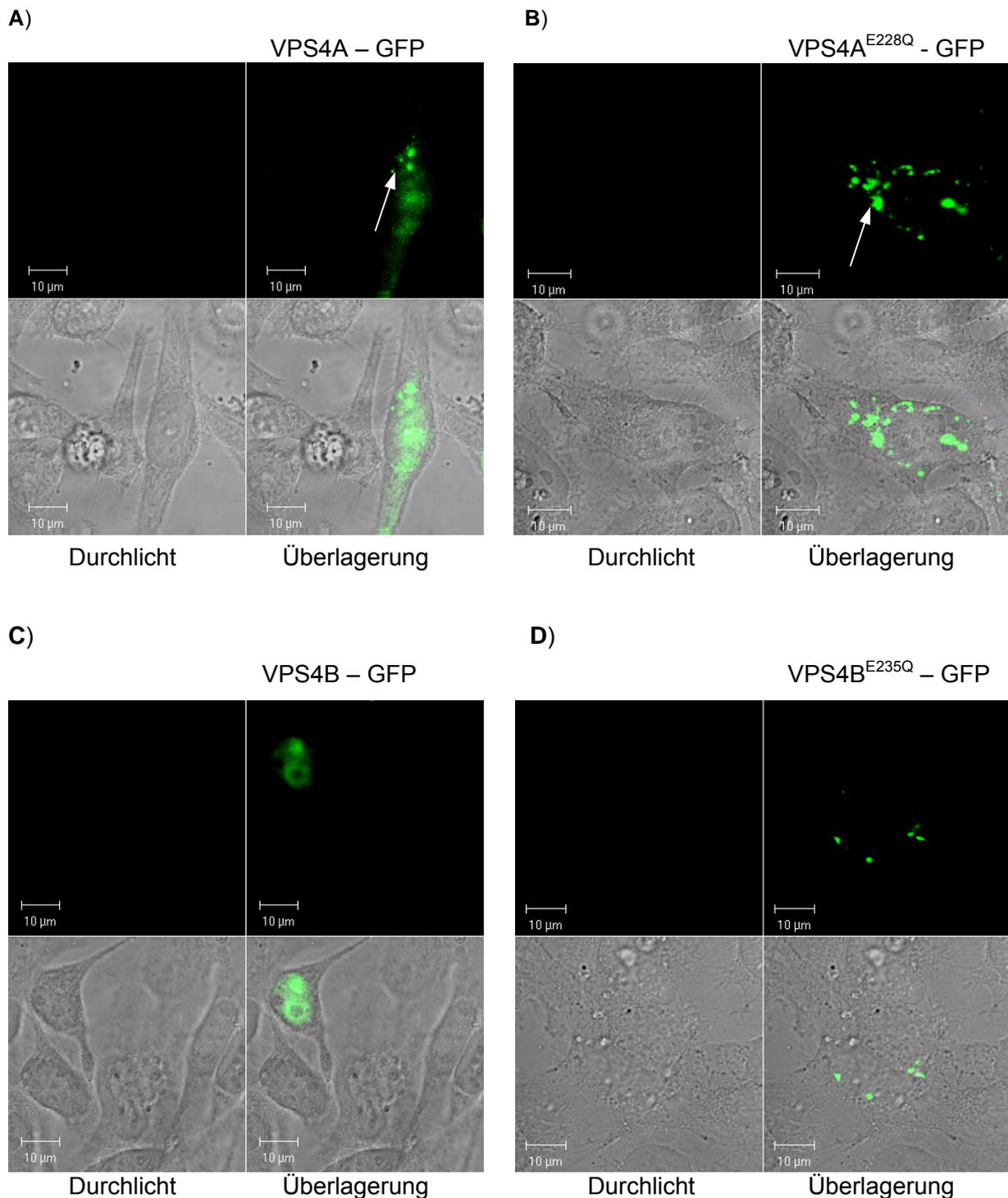
HeLa

Abb. 4.9.: Expression der VPS4A-GFP (A) und VPS4A^{E228Q}-GFP (B), bzw. der VPS4B-GFP (C) und VPS4B^{E235Q}-GFP (D) Fusionsproteine in HeLa Zellen. Mit den Expressionskonstrukten pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-GFP, pVPS4B-GFP und pVPS4B^{E235Q}-GFP wurden HeLa Zellen transient transfiziert und die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion fixiert. Anschließend wurde am LSM 510 (Fa. Zeiss) mikroskopiert. Dargestellt ist die jeweilige Verteilung der verschiedenen VPS4-GFP Fluoreszenzproteine in HeLa Zellen. Die weißen Pfeile markieren den perinuklearen Bereich, in denen sich die VPS4A-GFP und vor allem die VPS4A^{E228Q}-GFP Proteine konzentrieren.

Zusätzlich wurden die subzellulären Verteilungen der VPS4A-, VPS4A^{E228Q}-, VPS4B- und VPS4B^{E235Q}-GFP Fusionsproteine in HeLa Zellen untersucht. Sie zeigten folgende Ergebnisse (Abb. 4.9.):

Das Wildtyp VPS4A-GFP Fusionsprotein war größtenteils homogen im Cytoplasma verteilt. Zusätzlich traten auch einige wenige, kleine, scharf begrenzte Regionen auf, in denen das VPS4A-GFP konzentriert vorlag (Abb. 4.9. A weißer Pfeil). Das VPS4A^{E228Q}-GFP Protein war hingegen vorwiegend in mehreren scharf abgegrenzten Spots kreisförmig um den Zellkern lokalisiert (Abb. 4.9. B weißer Pfeil). Diese Beobachtungen deckten sich größtenteils mit den Ergebnissen der HepG2 Untersuchungen. Die mit der VPS4A^{E228Q} Mutante beobachteten lokalen Spots sind teilweise etwas größer wie beim Wildtyp VPS4A Protein. Für das Wildtyp VPS4B-GFP bzw. dem dominant-negativen VPS4B^{E235Q}-GFP Fusionsprotein wurden ähnliche Beobachtungen in den HeLa Zellen gemacht, wie für VPS4B-GFP/VPS4B^{E235Q}-GFP in den HepG2 Zellen. Allgemein kann festgehalten werden, dass Wildtyp VPS4 Proteine eher eine homogene cytosolische Verteilung aufwiesen, während sich die ATPase defizienten Mutanten in lokal begrenzte Regionen um den Zellkern konzentrierten (Abb. 4.9).

4.3.2. Subzelluläre Verteilung des KIAA1-DsRed und des FYVE1-DsRed Fusionsproteins

Die subzelluläre Verteilung des KIAA1-DsRed Fusionsproteins ist in Abb. 4.10. gezeigt. Das KIAA1-DsRed war sowohl in HepG2, als auch in den HeLa Zellen relativ gleichmäßig im Cytosol verteilt (Abb. 4.10. A, B), wobei es in HepG2 Zellen teilweise auch etwas konzentriertere Bereiche gab als in HeLa Zellen (Abb.4.10. A). Dies ist aber eher auf die morphologischen Unterschiede zwischen den HeLa und HepG2 Zellen, die verstärkt granulöse Strukturen zeigen, zurückzuführen.

Die Analyse des FYVE1-DsRed Fusionsproteins lieferte ähnliche Ergebnisse (Abb. 4.11 A, B). Das FYVE1-DsRed Fusionsprotein lag sowohl in den HepG2 Zellen, als auch in den HeLa Zellen (Abb. 4.11 B) diffus verteilt im Cytosol der Zelle vor.

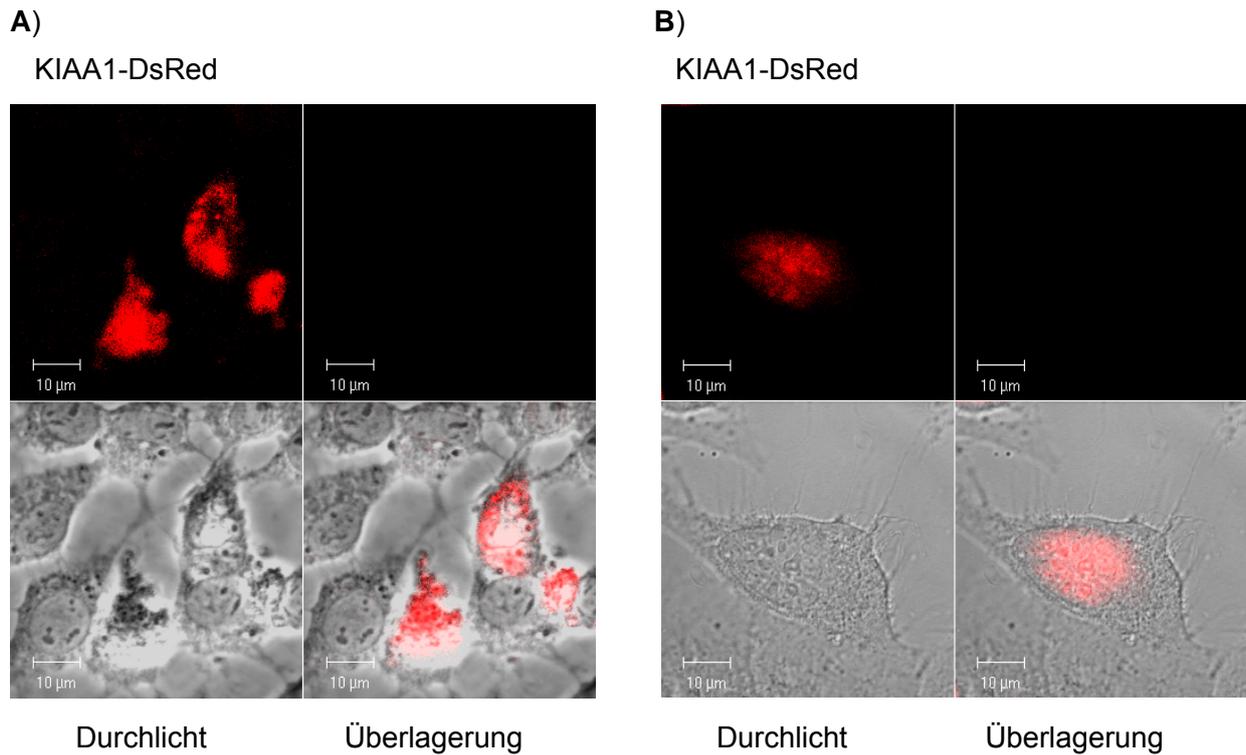


Abb. 4.10.: **Expression des KIAA1-DsRed Fusionsproteins in HepG2 (A) und HeLa Zellen (B).** 48h nach der Transfektion mit dem pKIAA1-DsRed Expressionskonstrukt wurden die Zellen fixiert und anschließend am LSM510 (Fa. Zeiss) untersucht. Die jeweiligen Abbildungen zeigen die Verteilungen des KIAA1-DsRed Proteins in HepG2 (A) und HeLa Zellen (B).

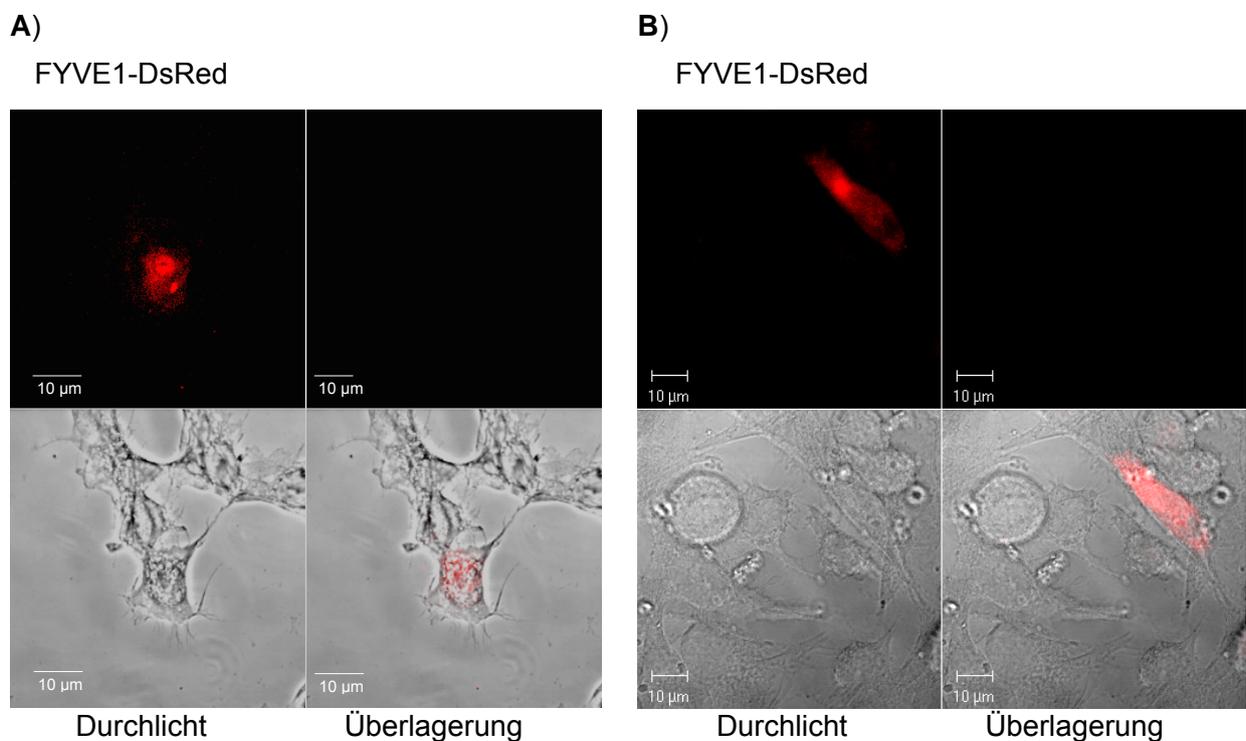


Abb. 4.11.: **Expression des FYVE1-DsRed Fusionsprotein in HepG2 (A) und HeLa Zellen (B).** 48h nach der Transfektion mit dem pFYVE1-DsRed Expressionskonstrukt wurden die Zellen fixiert und anschließend am LSM510 (Fa. Zeiss) untersucht. Die jeweiligen Abbildungen zeigen die Verteilungen des FYVE1-DsRed Proteins in HepG2 (A) und HeLa Zellen (B).

4.3.3. Subzelluläre Lokalisation des KIAA1-DsRed Fusionsproteins in Abhängigkeit der Wildtyp und dominant-negativen VPS4A-GFP und VPS4B-GFP Proteine

Wenn zwei Proteine miteinander wechselwirken, dann liegt es nahe, dass sie zu bestimmten Zeitpunkten auch räumlich benachbart sind. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob der in der „Two-Hybrid“ Analyse identifizierte potentielle Interaktionspartner KIAA1 mit VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B, bzw. VPS4B^{E235Q} in der Zelle colokalisiert und dadurch einen weiteren Indiz für eine biologisch relevante Wechselwirkung liefern würde. Zu diesem Zweck wurden die pVPS4A-, pVPS4A^{E228Q}-, pVPS4B- und pVPS4B^{E235Q}-GFP Konstrukte jeweils mit pKIAA1-DsRed in zwei verschiedene Zelllinien (HepG2 und HeLa) cotransfiziert.

In Abbildung 4.12. ist die subzelluläre Verteilung der coexprimierten KIAA1-DsRed und der verschiedenen VPS4-GFP Varianten in HepG2 Zellen dargestellt. Die Abbildung 4.13. zeigt die Ergebnisse der parallel durchgeführten Experimente in HeLa Zellen.

Bei allen untersuchten cotransfizierten HepG2 Zellen war deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzsignale des Wildtyp VPS4A-GFP und VPS4B-GFP mit den KIAA1-DsRed Signalen sich größtenteils überlagerte (Abb. 4.12. A, C). Dies ist deutlich an den gelben Bereichen im rechten unteren Quadranten zu erkennen. Eine mindestens genauso deutliche Colokalisation ergab sich insbesondere auch bei denjenigen Zellen, die mit den dominant-negativen pVPS4A^{E228Q}-GFP bzw. pVPS4B^{E235Q}-GFP und pKIAA1-DsRed cotransfiziert waren. Die exprimierten Fusionsproteine (VPS4A^{E228Q}/B^{E235Q}-GFP und KIAA1-DsRed) überlagerten sich in lokal begrenzten Bereichen, die als Spots erkennbar waren (Abb. 4.12. B, D). Auffällig war ebenfalls, dass sich offensichtlich die Verteilung des KIAA1-DsRed Fusionsproteins sich der Verteilung der VPS4-GFP Proteine stark ähnelt (Abb. 4.12.). Ein Vergleich der Darstellung der Expression von VPS4A-, VPS4A^{E228Q}-, VPS4B- und VPS4B^{E235Q}-GFP (Abb. 4.8.) in HepG2 Zellen mit den Darstellungen von VPS4-GFP und KIAA1-DsRed coexprimierenden Zellen (Abb. 4.12.) lässt erkennen, dass die Verteilungen der VPS4-GFP Proteinvarianten ähnlich geblieben sind. Die Verteilung von KIAA1-DsRed Proteinen änderte sich jedoch bei gleichzeitiger Expression der VPS4A^{E228Q}-GFP bzw. VPS4B^{E235Q}-GFP Proteine. Die sonst relativ homogene cytosolische Verteilung von KIAA1-DsRed in mit pKIAA1-DsRed transfizierten HepG2 Zellen wechselt in eine punktuell strukturierte Verteilung in HepG2 Zellen, die VPS4A^{E228Q}-GFP bzw. VPS4B^{E235Q}-GFP coexprimierten (Abb. 4.12. B, D). Es ist also eine klare Umverteilung des KIAA1-DsRed Proteins in Richtung der VPS4-GFP Fusionsproteine zu erkennen, wobei die KIAA1-DsRed Proteine und die verschiedenen VPS4-GFP Varianten sich in ihrer Verteilung in HepG2 Zellen nahezu decken (Abb. 4.12. A-D Überlagerung). Wie für die dominant-negativen VPS4A und VPS4B Proteine typisch, lagern sie sich dabei größtenteils um den Zellkern an (Abb. 4.12. D).

Sehr ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen in HeLa Zellen. Auch hier kam es zu einer Umverteilung des KIAA1-DsRed Proteins in VPS4-GFP coexprimierenden HeLa Zellen gegenüber den Zellen, welche nur das KIAA1-DsRed Protein exprimierten. Insbesondere ist dieser Effekt in der Abb. 4.13. (D) zu erkennen. In dieser Aufnahme sind eine KIAA1-DsRed exprimierende (2), sowie eine KIAA1-DsRed und VPS4B^{E235Q}-GFP coexprimierende HeLa Zelle (1) gezeigt. Die Verteilung des KIAA1-DsRed Proteins ist in der Zelle, die nur mit

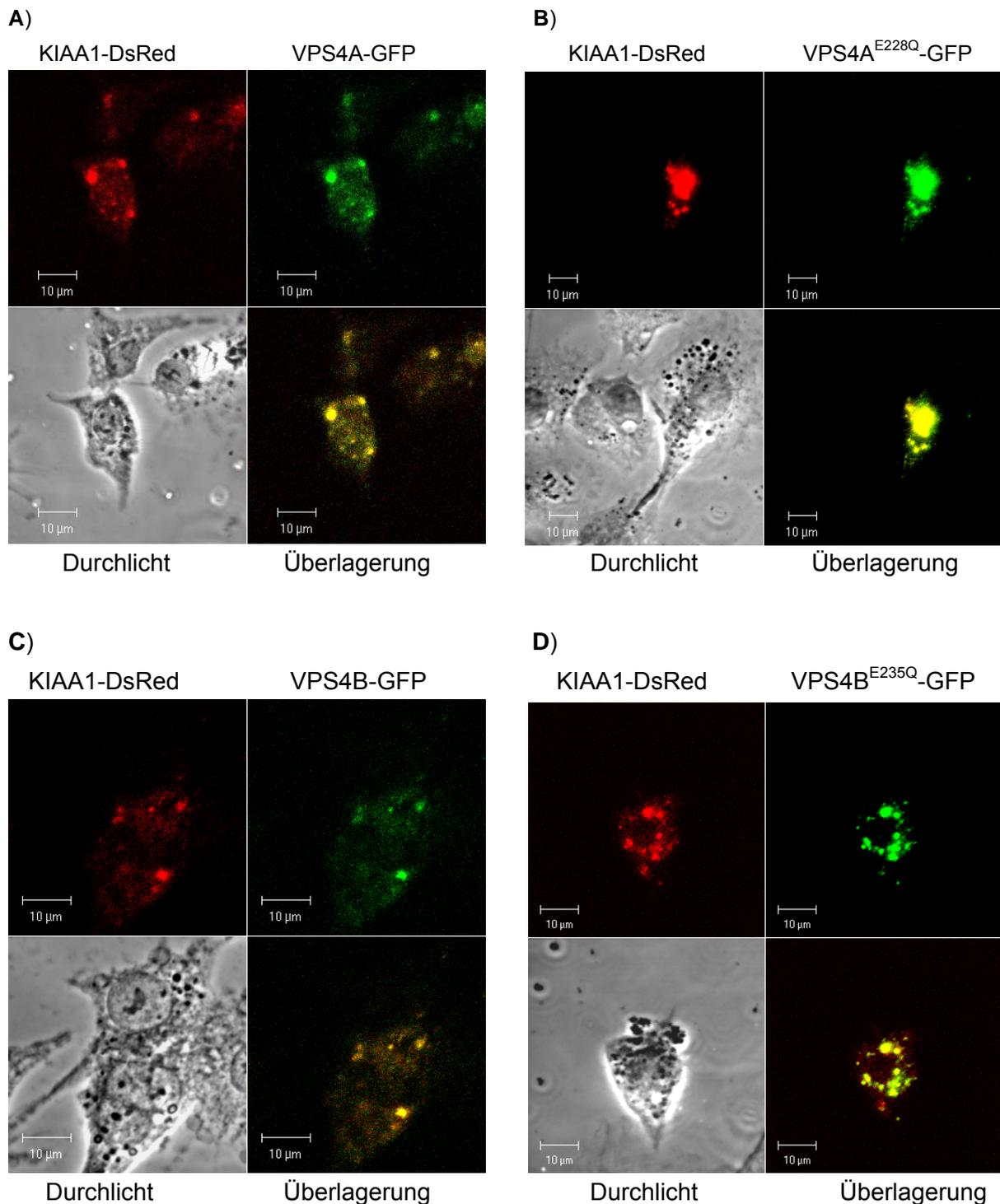
HepG2

Abb. 4.12.: **Subzelluläre Verteilung des KIAA1-DsRed Fusionsproteins mit VPS4A-GFP (A) und VPS4A^{E228Q}-GFP (B), sowie mit VPS4B-GFP (C) und VPS4B^{E235Q}-GFP (D) in HepG2 Zellen.** HepG2 Zellen wurden mit den entsprechenden pKIAA1-DsRed und pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-GFP, pVPS4B-GFP bzw. pVPS4B^{E235Q}-GFP Expressionskonstrukten transient cotransfiziert und 48h nach der Transfektion fixiert. Mikroskopiert wurde am LSM 510 (Fa. Zeiss). Dargestellt sind die subzellulären Verteilungen des KIAA1-DsRed Proteins mit unterschiedlichen VPS4-GFP Proteinvarianten in HepG2 Zellen.

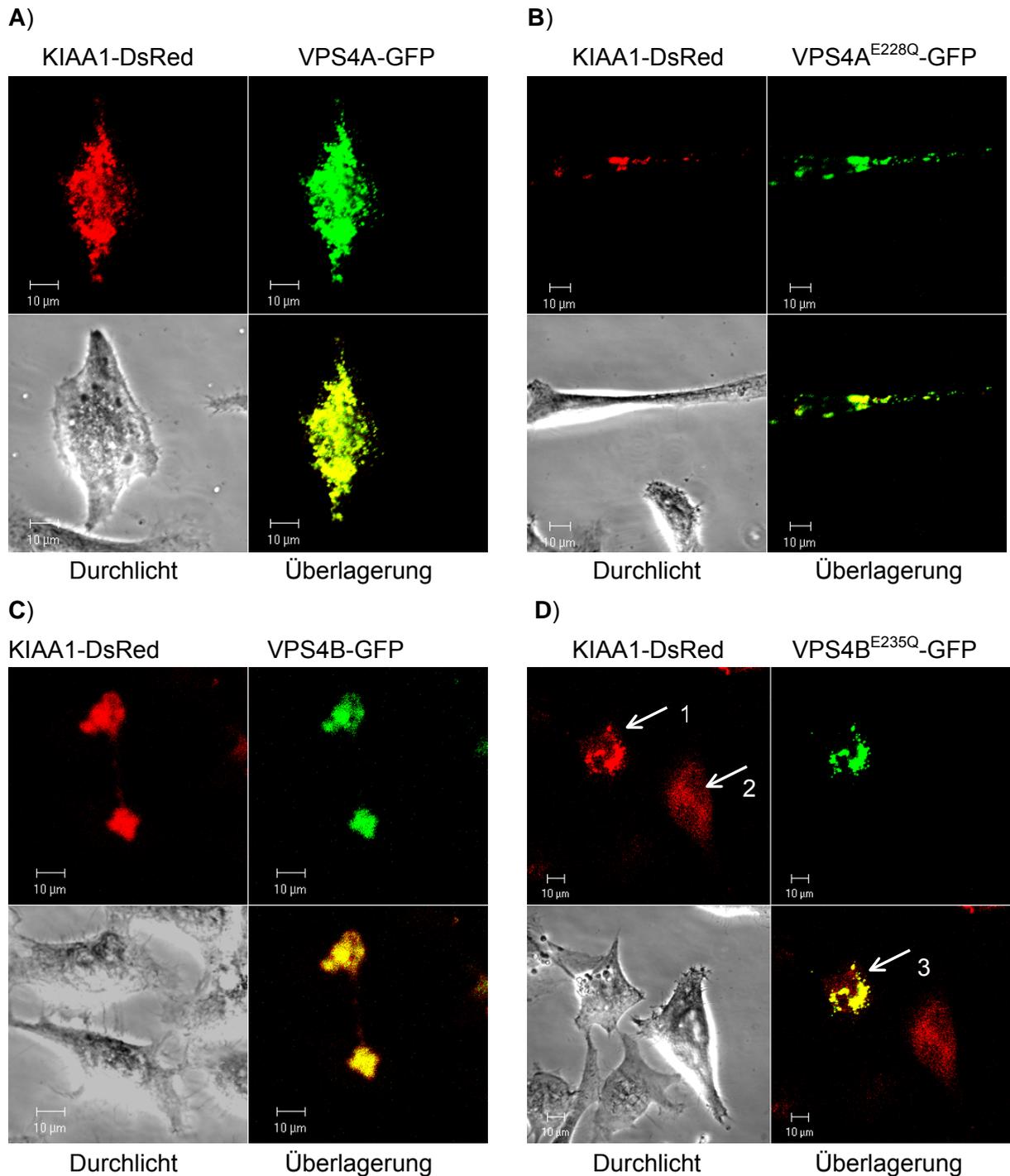
HeLa

Abb. 4.13.: **Subzelluläre Verteilung des KIAA1-DsRed Fusionsproteins mit VPS4A-GFP (A) und VPS4A^{E228Q}-GFP (B), sowie mit VPS4B-GFP (C) und VPS4B^{E235Q}-GFP (D) in HeLa Zellen.** HeLa Zellen wurden mit den entsprechenden pKIAA1-DsRed und pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-GFP, pVPS4B-GFP bzw. pVPS4B^{E235Q}-GFP Expressionskonstrukten transient cotransfiziert und 48h nach der Transfektion fixiert. Mikroskopiert wurde am LSM 510 (Fa. Zeiss). Dargestellt sind die subzellulären Verteilungen des KIAA1-DsRed Proteins mit unterschiedlichen VPS4-GFP Proteinvarianten in HeLa Zellen. Pfeil 1 zeigt die Verteilung von KIAA1-DsRed in Coexpression mit VPS4B^{E235Q}-GFP, Pfeil 2 eine Einzelsexpression von KIAA1-DsRed in einer HeLa Zelle. Pfeil 3 zeigt die Veränderung der Verteilung von KIAA1-DsRed mit VPS4B^{E325Q}-GFP.

pKIAA1-DsRed transfiziert wurde, homogen cytosolisch. In der coexprimierenden Zelle colokalisiert das KIAA1-DsRed Protein mit VPS4B^{E235Q}-GFP in stark konzentrierten Bereichen, d.h. die Verteilung des KIAA1-DsRed Proteins gleicht überwiegend der des VPS4B^{E235Q}-GFP Proteins (Abb. 4.13. D Pfeil 3). Dies zeigt eine „Umverteilung“, bzw. Rekrutierung des KIAA1-DsRed Proteins bei gleichzeitiger Expression des VPS4B^{E235Q}-GFP Proteins. Die Verteilung von VPS4B^{E235Q}-GFP hingegen wurde durch die Expression des KIAA1-DsRed Proteins nicht beeinflusst (siehe Abb. 4.9. D und Abb. 4.13. D).

4.3.4. Subzelluläre Lokalisation des FYVE1-DsRed Fusionsproteins in Abhängigkeit der Wildtyp bzw. dominant-negativen VPS4A-GFP und VPS4B-GFP Proteine

Um die in „Two-Hybrid“ Experimenten gefundenen Hinweise auf eine mögliche Interaktion des FYVE1 Proteins mit VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B und VPS4B^{E235Q} in kultivierten Säugerzellen zu untersuchen, wurde die Verteilung des FYVE1-DsRed Proteins in Abhängigkeit der Expression der verschiedenen VPS4-GFP Proteine in humanen HepG2 und HeLa Zellen analysiert.

HeLa und HepG2 Zellen wurden dafür, wie für das KIAA1 Protein beschrieben, mit den Expressionskonstrukten für die GFP-Fusionsproteine VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B, VPS4B^{E235Q} und KIAA1-DsRed transient transfiziert, nach 48 h fixiert und mikroskopiert. In der Abb. 4.14. ist die Verteilung der coexprimierten VPS4A-GFP (A), VPS4A^{E228Q}-GFP (B) und FYVE1-DsRed Fusionsproteine in HepG2 Zellen dargestellt. Bei Coexpression von humanen VPS4A-, VPS4A^{E228Q}-GFP mit FYVE1-DsRed zeigte sich, dass die jeweiligen Proteine eine nahezu deckungsgleiche subzelluläre Verteilung in der Zelle aufwiesen. Sowohl das Wildtyp VPS4A-GFP, als auch das dominant-negative VPS4A^{E228Q}-GFP Fusionsprotein war mit dem FYVE1-DsRed Protein colokalisiert. Ein sehr ähnliches Bild ergab sich bei den Analysen mit den VPS4B Proteinen. Wiederum gab es eine nahezu identische Verteilung des FYVE1-DsRed Proteins und der Wildtyp VPS4B-GFP, bzw. ATPase defizienten VPS4B^{E228Q}-GFP Proteinvariante in HepG2 Zellen (Abb. 4.14. C, D). Beide Proteine, VPS4B/B^{E235Q}-GFP und FYVE1-DsRed colokalisierten in der Zelle. Im Vergleich mit HepG2 Zellen, die nur das VPS4-GFP Protein exprimierten (Abb.4.8), zeigte sich, dass die Verteilungen der verschiedenen VPS4-GFP Proteinvarianten durch die gleichzeitige Expression des KIAA1-DsRed Fusionsproteins in den HepG2 Zellen nicht beeinflusst wurden (Abb. 4.14).

Das FYVE1-DsRed Protein hingegen änderte seine Verteilung signifikant bei Coexpression von VPS4A^{E228Q}-GFP und VPS4B^{E235Q}-GFP in den entsprechend coexprimierenden Zellen.. Das FYVE1-DsRed Protein lag „punktuell“ strukturiert verteilt vor, wie das VPS4A^{E228Q}-GFP, bzw. das VPS4B^{E235Q}-GFP Protein (siehe Abb. 4.14. B, D). Eine deutliche Colokalisation des FYVE1 Proteins mit Wildtyp VPS4A und VPS4B, sowie dominant-negativem VPS4A^{E228Q} und VPS4B^{E235Q} ergab sich auch bei der Analyse von transient transfizierten HeLa Zellen (Abb. 4.15.). Ähnlich in HepG2 Zellen kann wiederum festgestellt werden, dass es zur Umverteilung des FYVE1-DsRed Proteins kommt, was insbesondere in der Abb. 4.15. B, D bei der Untersuchung der Coexpression von FYVE1-DsRed mit den VPS4A^{E228Q}-GFP bzw. VPS4B^{E235Q}-GFP Proteinen ersichtlich ist.

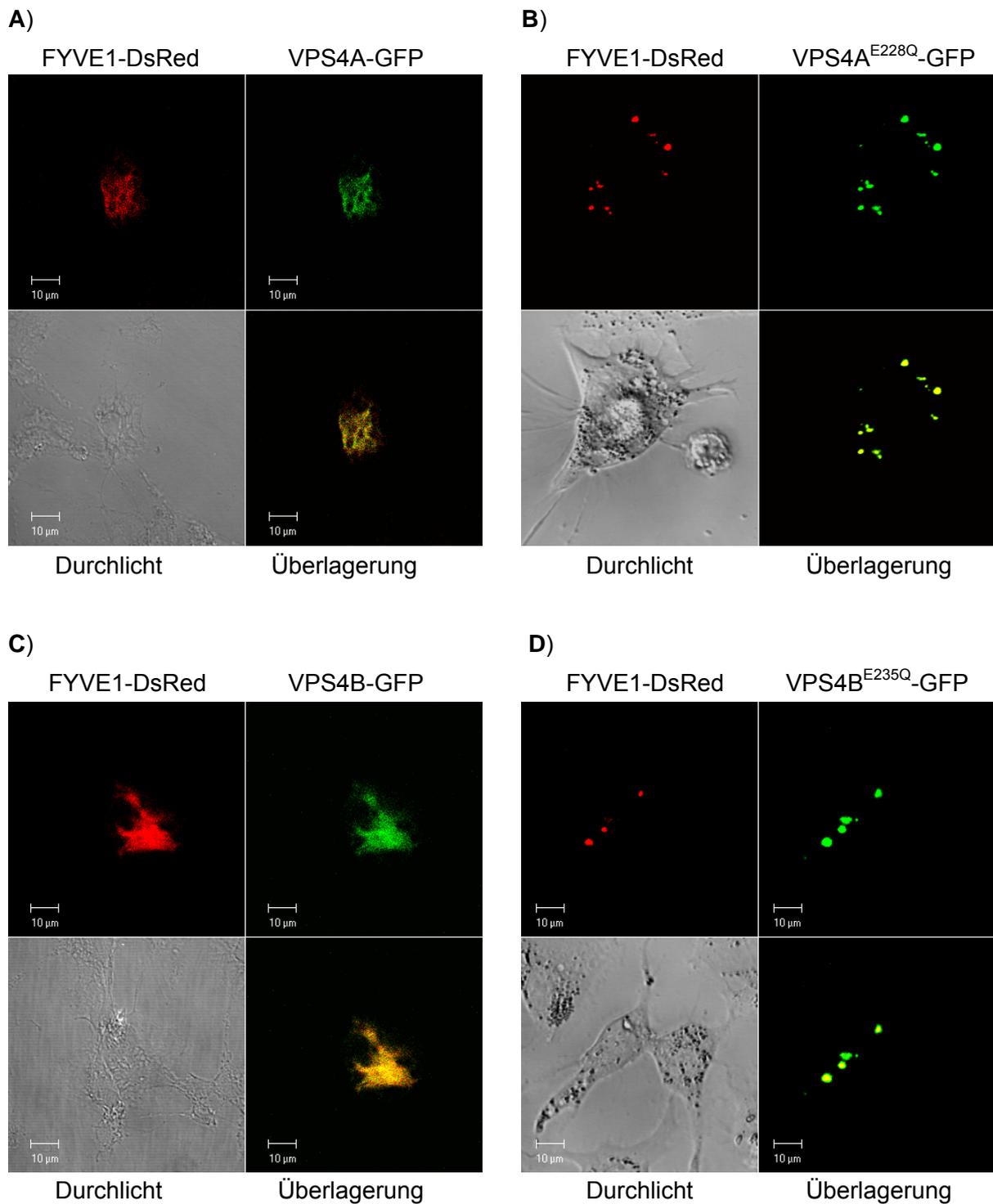
HepG2

Abb. 4.14.: Subzelluläre Verteilung des FYVE1-DsRed Fusionsproteins mit VPS4A-GFP (A) und VPS4A^{E228Q}-GFP (B), sowie mit VPS4B-GFP (C) und VPS4B^{E235Q}-GFP (D) in HepG2 Zellen. HepG2 Zellen wurden mit den entsprechenden pFYVE1-DsRed und pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-GFP, pVPS4B-GFP bzw. pVPS4B^{E235Q}-GFP Expressionskonstrukten transient cotransfiziert und 48h nach der Transfektion fixiert. Mikroskopiert wurde am LSM 510 (Fa. Zeiss). Dargestellt sind die subzellulären Verteilungen des FYVE1-DsRed Proteins mit unterschiedlichen VPS4-GFP Proteinvarianten in HepG2 Zellen.

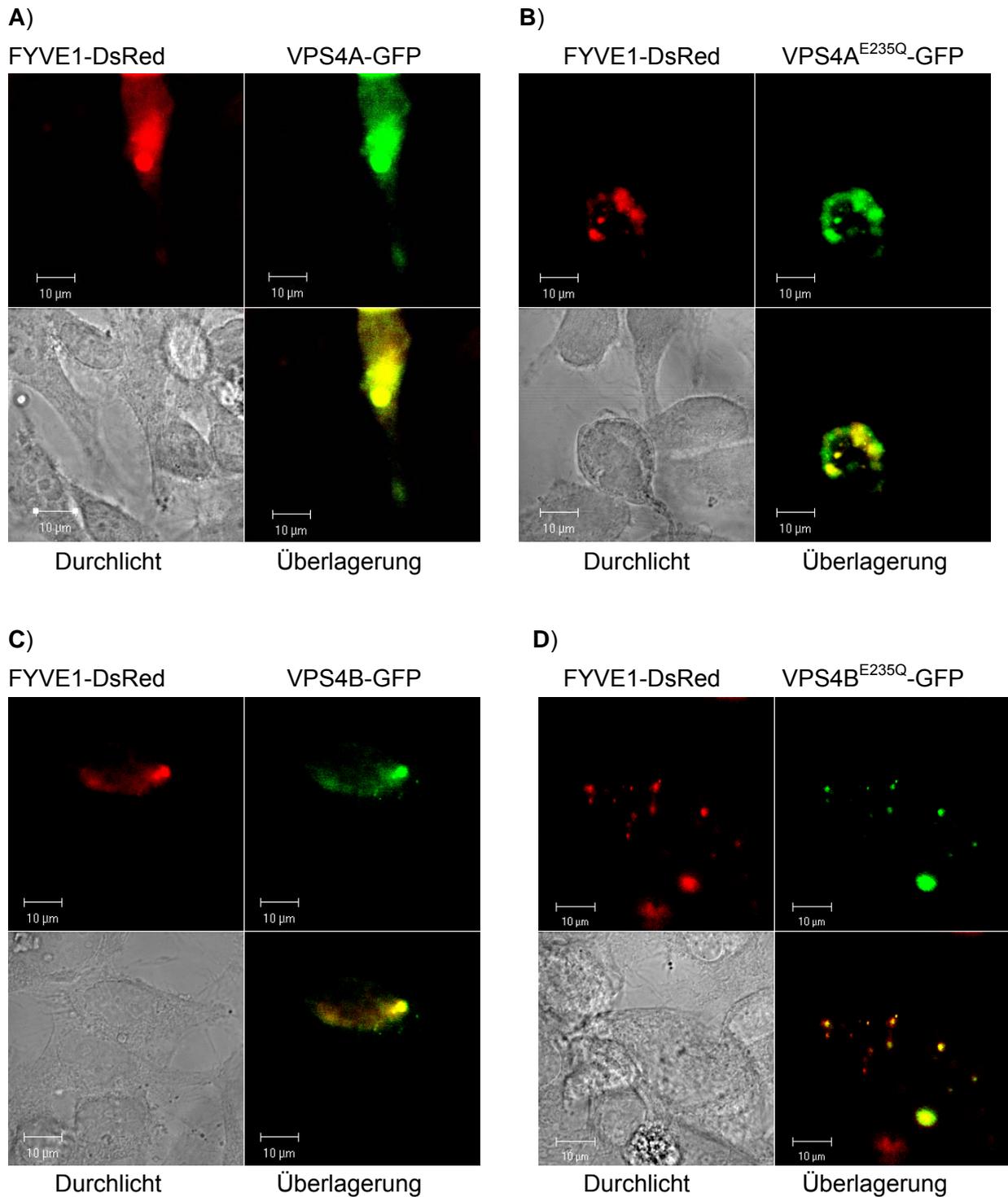
HeLa

Abb. 4.15.: **Subzelluläre Verteilung des FYVE1-DsRed Fusionsproteins mit VPS4A-GFP (A) und VPS4A^{E228Q}-GFP (B), sowie mit VPS4B-GFP (C) und VPS4B^{E235Q}-GFP (D) in HeLa Zellen.** HeLa Zellen wurden mit den entsprechenden pFYVE1-DsRed und pVPS4A-GFP, pVPS4A^{E228Q}-GFP, pVPS4B-GFP bzw. pVPS4B^{E235Q}-GFP Expressionskonstrukten transient cotransfiziert und 48h nach der Transfektion fixiert. Mikroskopiert wurde am LSM 510 (Fa. Zeiss). Dargestellt sind die subzellulären Verteilungen des FYVE1-DsRed Proteins mit unterschiedlichen VPS4-GFP Proteinvarianten in HepG2 Zellen.

4.4. Generierung von VPS4A, KIAA1 und FYVE1 Antikörper

Für die geplanten proteinchemischen Untersuchungen der VPS4A, FYVE1 und KIAA1 Proteine sollten spezifische Peptidantiseren generiert werden. Hierzu wurden aus den jeweiligen Aminosäuresequenzen des humanen VPS4A, KIAA1 und FYVE1 Proteins je eine (bei KIAA1) bzw. zwei Peptidsequenzen ausgewählt und die an KLH gekoppelten Peptide in Kaninchen zur Immunisierung appliziert (siehe Punkt 3.18.). Die finalen Anti-VPS4A, -KIAA1 und -FYVE1 Antiseren (3. Blutung), sowie gegen die für die Immunisierung benutzten Peptide affinitätsgereinigten Antikörper (Ak) wurden mit Hilfe von Western Blot Analysen getestet.

VPS4A/a

Die für die Immunisierung benutzten VPS4A spezifischen Peptide waren so gewählt worden, dass sie nicht nur das humane VPS4A sondern auch das murine VPS4a Protein erkennen sollten. Zum Test des VPS4A/a Antiserums (Finale Blutung) und des affinitätsgereinigten VPS4A/a Antikörpers wurden HepG2 Zellextrakte mit VPS4A-GFP benutzt. Als Kontrolle dienten 3T3 Zellextrakte, sowie ein Hefeproteinextrakt mit VPS4-A[HA2]. In der Abbildung 4.16. (A) ist das Ergebnis der Untersuchung des VPS4A/a Antiserums (Finale Blutung) veranschaulicht.

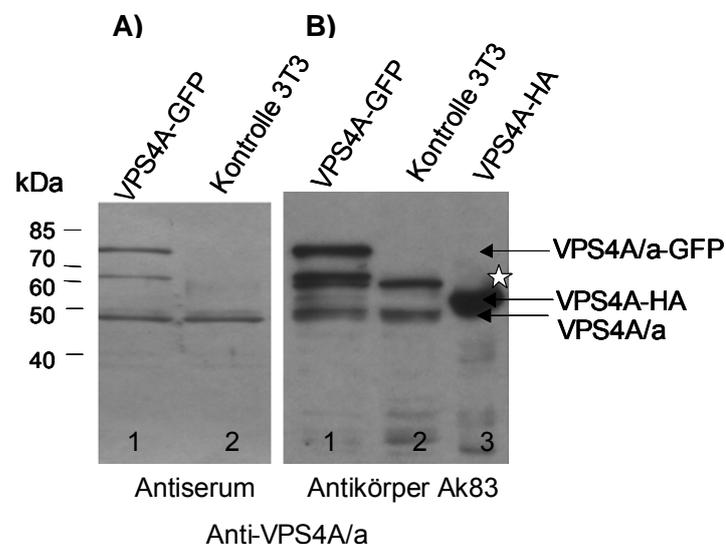


Abb. 4.16.: **Western Blot Analysen des VPS4A/a Antiserums und des affinitätsgereinigten VPS4A/a Antikörpers (Ak 83).** Humane HepG2 Zellen wurden transient mit pVPS4A-GFP transfiziert. Zur Analyse wurden das Zelllysate der transfizierten HepG2 Zellen (10 μ L)(Spur 1), Zelllysate nicht-transfizierter 3T3 Zellen (10 μ L)(Spur 2) und ein Proteinextrakt aus Hefezellen, die VPS4-A[HA2] exprimierten (5 μ L)(Spur 3), benutzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 8%igem SDS-Polyacrylamidgel wurden in Western Blot Analysen die Anti-VPS4A/a Antiseren (linkes Bild) und die affinitätsgereinigten Anti-VPS4A/a Antikörper (Ak 83) (rechtes Bild) überprüft. Die detektierten VPS4A/a Proteine sind jeweils durch ein Pfeil markiert. Der Stern markiert Signale möglicher unspezifischer oder modifizierter VPS4A Proteine.

In den Western Blot Experimenten mit dem VPS4A/a Antiserum konnte in den Zellextrakten aus den pVPS4-A[HA2] transfizierten HepG2 Zellen (Spur 1) das theoretisch zu erwartende 77 kDa große (ca. 50 kDa+27 kDa) VPS4A-GFP Fusionsprotein eindeutig detektiert werden.

Zusätzlich wurden 2 weitere Proteine (ca. 65 kDa und 50 kDa) detektiert. Bei dem 50 kDa Protein handelt es sich sehr wahrscheinlich um das endogene VPS4A, das mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa in dieser Höhe erwartet wurde. So zeigte sich auch in der Spur 2 (Proteinlysat aus nicht-transfizierten 3T3 Zellen) eine Proteinbande vergleichbarer Höhe, was dem endogenen Maus VPS4a entspricht. Ob es sich bei dem 65 kDa Protein, das im Zellextrakt der VPS4A-GFP exprimierenden HepG2 Zellen vom VPS4A/a Antiserum erkannt wurde, um eine unspezifische Wechselwirkung mit einem Fremdprotein, ein VPS4A-GFP Degradationsprodukt oder ein modifiziertes endogenes VPS4A Protein handelt, ließ sich nicht klären. In den Western Blot Analysen mit dem affinitätsgereinigten Anti-VPS4A/a Antikörper zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 4.16. B). Neben ein in der Hefe exprimiertes HA-Epitop markiertes VPS4A (Spur 3 VPS4-A[HA2] 52 kDa) detektierte der Anti-VPS4A/a Antikörper in den Proteinextrakten VPS4A-GFP exprimierender HepG2 Zellen (Spur 1) das VPS4A-GFP Fusionsprotein eindeutig (77 kDa). Des weiteren wurde in der Höhe von 50 kDa ein Protein sowohl in der Spur HepG2 transfizierter Zellen, als auch in der Spur nicht-transfizierter 3T3 Zellen detektiert, was dem vermuteten endogenen VPS4A/a entspricht. Ebenfalls wurde wiederum das unbekannte 65 kDa Protein in beiden Spuren detektiert.

FYVE1

Wie für das VPS4A/a Protein wurde auch für das FYVE1 Protein spezifische Peptide ausgewählt, dass sowohl humanes als auch murines FYVE1 Protein detektiert werden kann. Zum Test des FYVE1 Antiserums (Finale Blutung) und des affinitätsgereinigten FYVE1 Antikörpers wurden 3T3 Zellextrakte mit FYVE1-DsRed benutzt. Als Kontrolle dienten Zellextrakte nicht-transfizierter 3T3 Zellen, sowie in Hefe BHY10 exprimiertes mFYVE1[HA2]. In der Abbildung 4.17. (A) ist das Ergebnis der Untersuchung des FYVE1 Antiserums (Finale Blutung) veranschaulicht.

In den Western Blot Analysen wurde für das FYVE1-DsRed Protein eine Größe von ca. 65 kDa erwartet, für das murine FYVE1[HA2] Protein eine Größe von etwa 45 kDa. In der Spur 1 Abb. 4.17. (A), was dem Zellextrakt FYVE1-DsRed exprimierender Zellen entsprach, konnte das humane FYVE1-DsRed Protein mit dem FYVE1 Antiserum detektiert werden. In der Spur des Proteinextraktes nicht-transfizierter 3T3 Zellen (Spur 2) wurden viele Banden mit dem FYVE1 Antiserum detektiert, eine Zuordnung des endogenen FYVE1 war jedoch nicht möglich. Das Epitop markierte mFYVE1[HA2] konnte mittels FYVE1 Antiserum im Hefeproteinextrakt (Spur 3) detektiert werden. Um den relativ hohen Hintergrund an unspezifisch markierten Proteinen zu minimieren, wurde die Finale Blutung aufbereitet und die Anti-FYVE1 Antikörper durch Peptid-Affinitätsreinigung aus dem Serum isoliert. Die Analyse der aufgereinigten Anti-FYVE1 Antikörper brachte folgendes Ergebnis (Abb. 4.17. B): Das FYVE1-DsRed Protein im Proteinextrakt der mit pFYVE1-DsRed transfizierten 3T3 Zellen (Spur 1) konnte eindeutig detektiert werden. Des weiteren wurden zusätzlich zwei Proteinbanden zwischen (50 und 55 kDa) detektiert. Eines dieser Proteine wurde auch im Proteinextrakt nicht-transfizierter 3T3 Zellen detektiert. Diese Proteine sind vermutlich unspezifische Wechselwirkungen mit dem Anti-FYV1 Antikörper, oder modifiziertes endogenes FYVE1 Protein. Das endogene Protein (ca. 43 kDa) wurde nicht detektiert. In der

Spur des Hefeproteinextraktes wurde das entsprechende murine FYVE1[HA2] Protein (ca. 45 kDa) mit dem Anti-FYVE1 Antikörper eindeutig detektiert.

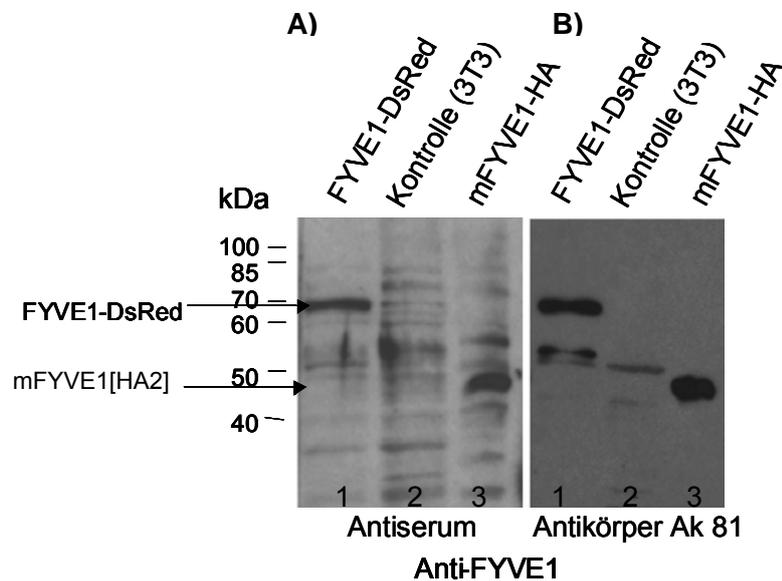


Abb. 4.17.: **Western Blot Analysen des FYVE1 Antiserums und des affinitätsgereinigten FYVE1 Antikörpers (Ak 81).** Maus 3T3 Zellen wurden transient mit pFYVE1-DsRed transfiziert. Zur Analyse wurde Zelllysate der transfizierten 3T3 Zellen (10 μ L)(Spur 1), Zelllysate nicht-transfizierter 3T3 Zellen (10 μ L)(Spur 2) und ein Proteinextrakt aus Hefezellen, die murines FYVE1[HA2] exprimierten (5 μ L)(Spur 3), benutzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 8%igem SDS-Polyacrylamidgel wurden in Western Blot Analysen das Anti-FYVE1 Antiserum (linkes Bild) und die affinitätsgereinigten Anti-FYVE1 Antikörper (Ak 81) (rechtes Bild) überprüft. Nachgewiesen wurde das FYVE1-DsRed in Spur 1, sowie das mFYVE1[HA2] in Spur 3.

KIAA1

Die Immunisierung verschiedener Kaninchen mit dem KLH gekoppelten KIAA1-Peptid führte zu keinen verwendbaren spezifischen Anti-KIAA1 Antiserum, bzw. Antikörper. Auch durch Modifikationen in den Western Blot Bedingungen konnte das KIAA1 nicht spezifisch detektiert werden.

Da die endogenen VPS4A, KIAA1 und FYVE1 Proteine mit den erzeugten Antiseren/Antikörpern nicht spezifisch genug nachgewiesen werden konnten, wurden für die im folgenden beschriebenen biochemischen Arbeiten Epitop-markierte Fusionsproteine analysiert, die mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden konnten.

4.5. Nachweis Epitop-markierter VPS4A/B, KIAA1 und FYVE1 Proteine

Im Detail wurden vier verschiedene VPS4A/B Proteinvarianten (VPS4A-myc, VPS4A^{E228Q}-myc, VPS4B-myc, VPS4B^{E235Q}-myc), sowie FYVE1-HA und KIAA1-HA in HeLa Zellen exprimiert und mit den monoklonalen Antikörpern Anti-HA und Anti-myc die Epitop-markierten Proteine detektiert. Die Benutzung von Epitop-markierten Proteinen hatte den Vorteil, dass eine gezielte Isolierung des „Interaktionskomplexes“ in den folgenden Coimmunpräzipitationsexperimenten über eines dieser Epitope erfolgen konnte.

Vor der eigentlichen Coimmunpräzipitationsanalyse wurden die Expressionen der jeweiligen myc- und HA-Konstrukte durch Western Blot Analysen untersucht. Dazu wurden ca. 2×10^5 HeLa Zellen/Well 48 Stunden nach der Transfektion lysiert (siehe Punkt 3.13.2), die Proteinlysate in der SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und anschließend auf PVDF Membranen geblottet. Die anschließende Detektion der Fusionsproteine erfolgte entweder mit dem Anti-myc-HRP Antikörper (Fa. Invitrogen) zur Detektion der myc-markierten Proteine (VPS4A/B) oder mit Anti-HA-HRP Antikörper (Fa. Roche) zur Detektion der HA-markierten Proteine (FYVE1 und KIAA1) (siehe 3.17.).

Die Western Blot Analysen zur Kontrolle der Expression myc-Epitop markierter VPS4A/VPS4B Proteine, sowie der HA-Epitop markierten Interaktionspartner FYVE1 und KIAA1 sind in den folgenden Abbildungen 4.18 und 4.19. dargestellt. In der Abb. 4.18. A ist die Kontrolle der Expression von exprimiertem VPS4A-myc und VPS4A^{E228Q}-myc sowohl in einzel-, als auch in mit pKIAA1-HA, bzw. pFYVE1-HA cotransfizierten HeLa Zellen dargestellt. Als positive Kontrolle der Detektion myc-Epitop markierter Proteine wurde das myc-markierte LacZ Protein (lacZ-myc) eingesetzt, dessen Detektion in Abb. 4.18. A Spur 7 zu erkennen ist. Zusätzlich wurde als negative Kontrolle Proteinlysate aus nicht-transfizierten HeLa Zellen eingesetzt, in der keine Detektion Epitop-markierter Proteine erfolgte (jeweils Spur 8 in Abb. 4.18. A und B). In allen einzel- und cotransfizierten HeLa Zelllysaten konnte eine Expression des VPS4A-myc Proteins nachgewiesen werden (Spur 1, 3, 5 in Abb. 4.18. A). Ebenfalls konnte die Expression der ATPase defizienten Proteinvariante VPS4A^{E228Q}-myc in den entsprechenden Zelllysaten bestätigt werden (Spur 2, 4, 6 in Abb. 4.18. A). KIAA1-HA und FYVE1-HA wurden in einzeltransfizierten, wie auch in mit VPS4A-myc, bzw. VPS4A^{E228Q}-myc cotransfizierten Zellen nachgewiesen (Abb. 4.18. B). Die Expression des FYVE1-HA Proteins (Abb. 4.18. B Spur 2) war generell stärker als die Expression des KIAA1-HA Proteins (Abb. 4.18. B Spur 1).

Auch die Expression des VPS4B-myc, bzw. VPS4B^{E235Q}-myc Protein in einzel-, als auch in mit dem pFYVE1-HA, bzw. pKIAA1-HA cotransfizierten HeLa Zellen wurde in Western Blot Analysen untersucht (Abb. 4.19.). Das Ergebnis dieser Analysen zeigte, dass das wiltyp VPS4B-myc (Spur 5, 8, 9 in Abb. 4.19.) sowie die ATPase defiziente Proteinvariante VPS4B^{E235Q}-myc (Spur 4, 6, 7 in Abb. 4.19.) ähnlich stark exprimiert wurden. VPS4B-myc, bzw. VPS4B^{E235Q}-myc sind ca. 0,8 kDa größer als VPS4A-myc, bzw. VPS4A^{E228Q}-myc, das in der Western Blot Analyse durch einen Bandenshift erkennbar war (Vergleiche Abb. 4.19. Spur 1, 2 mit Spur 4, 5).

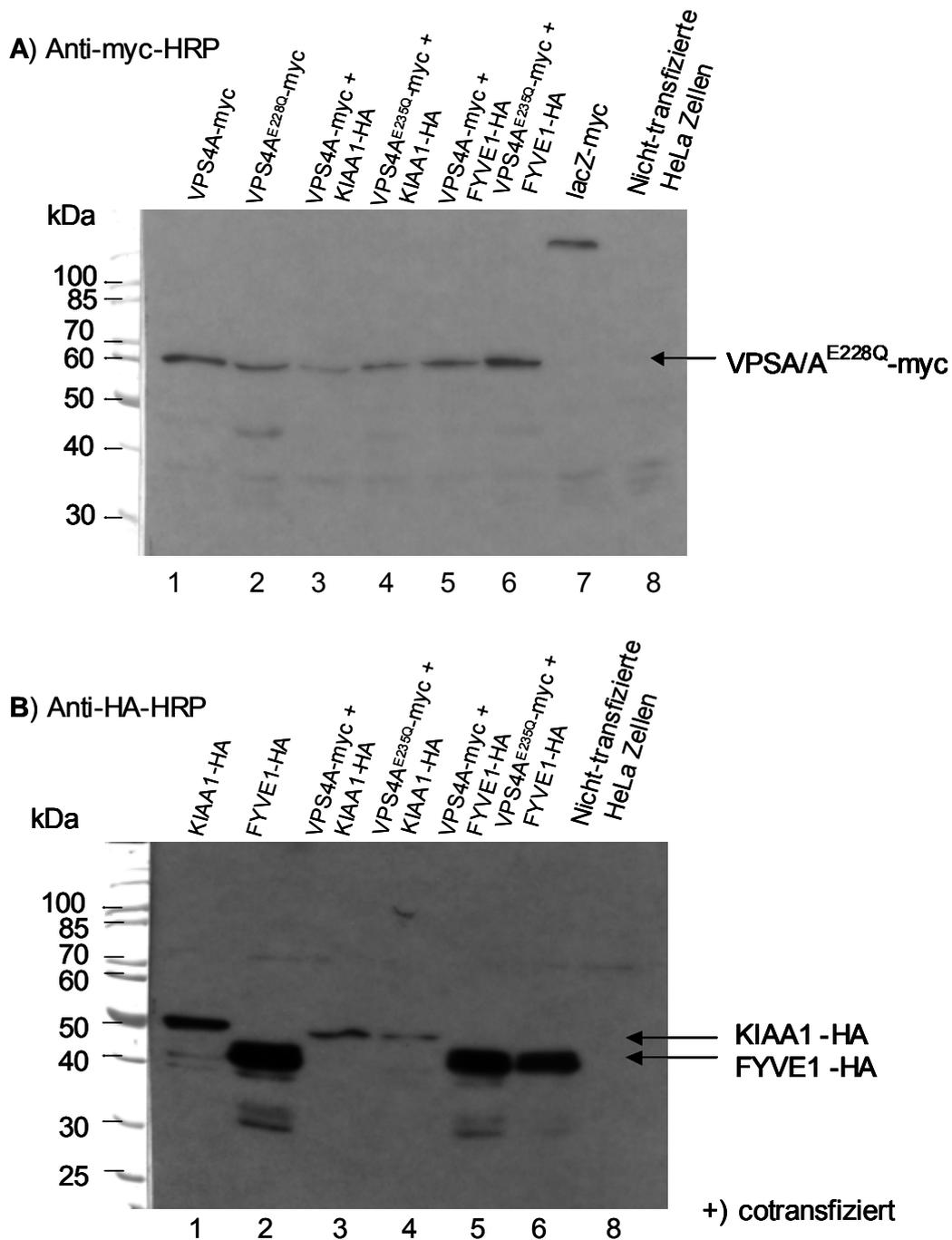


Abb. 4.18.: **Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression des VPS4A-myc, VPS4A^{E228Q}-myc und KIAA1-HA bzw. FYVE1-HA Proteins in HeLa Zellen.** Für die Western Blot Analysen wurden die (co-)transfizierte HeLa Zellen lysiert (siehe Punkt 3.13.2.) und im Western Blot auf Expression der zu untersuchenden Proteine überprüft. Der Nachweis erfolgte mit Kaninchen Anti-myc-HRP Antikörper für VPS4A-myc (Abb.4.18. A Spuren 1, 3 und 5), bzw. VPS4A^{E228Q}-myc (Abb. 4.18. A. Spuren 2, 4 und 6). Als Kontrolle für den Nachweis des myc-Epitop markierten Proteins diente das myc-Epitop markierte lacZ Protein (lacZ-myc) (Abb.4.18. A Spur 7). In Abb. 4.18. B wurden die HA-Epitop markierten Proteine KIAA1-HA (Spuren 1, 3 und 4), bzw. FYVE1-HA (Spuren 2, 5 und 6) der gleichen mit VPS4A/VPS4A^{E228Q} cotransfizierte HeLa Zellen mit dem Maus Anti-HA - HRP Antikörper nachgewiesen.

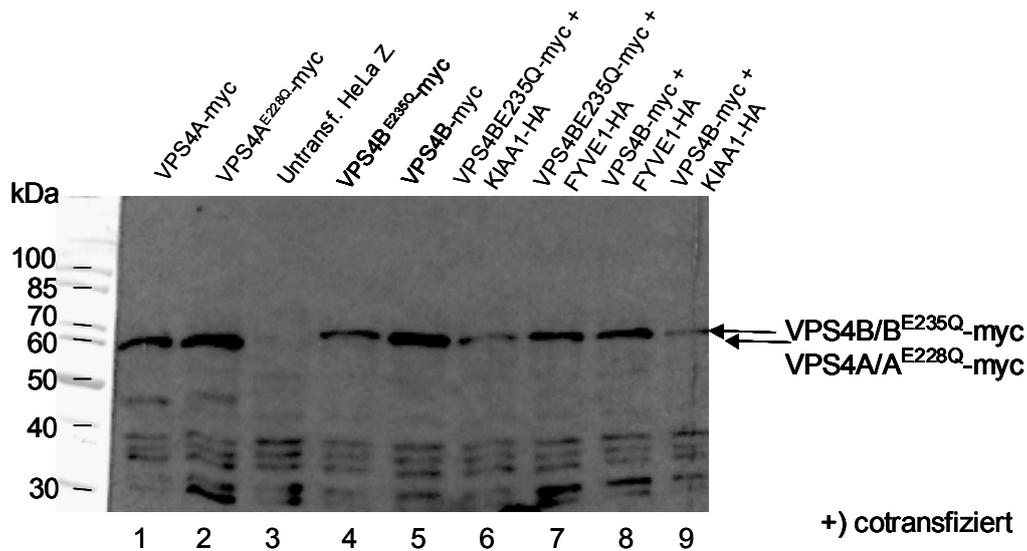


Abb. 4.19.: **Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression von VPS4A/A^{E228Q}-myc und VPS4B/B^{E235Q}-myc in HeLa Zellen.** Für die Western Blot Analysen wurden die (co-)transfizierte HeLa Zellen lysiert (siehe Punkt 3.13.2.) und im Western Blot auf Expression der zu untersuchenden Proteine überprüft. Der Nachweis erfolgte mit Kaninchen Anti-myc-HRP Antikörper für VPS4A-myc (Spur 1), bzw. VPS4A^{E228Q}-myc (Spur 2), VPS4B-myc (Spuren 5, 8 und 9), bzw. VPS4B^{E235Q}-myc (Spuren 4, 6 und 7). Zur Differenzierung des unspezifischen Hintergrundes diente Zelllysate untransfizierter HeLa Zellen (Spur 3). +) bedeutet, dass das entsprechende Protein aus Zelllysate cotransfizierter HeLa Zellen detektiert wurde.

4.6. Biochemischer Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkungen

Um die in den „Two-Hybrid“ Analysen gefundenen Interaktionen der KIAA1 und FYVE1 Proteine mit den VPS4A und VPS4B Proteinen durch biochemische Experimente zu untermauern, sollten Coimmunpräzitationsanalysen durchgeführt werden. Durch die Coimmun-präzipitation der VPS4A/B Interaktionspartner KIAA1 und FYVE1 sollte bestätigt werden, dass eine physikalische Interaktion zwischen KIAA1, bzw. FYVE1 Proteinen und den VPS4A/B Proteinen besteht.

4.6.1. Coimmunpräzipitation des VPS4A / VPS4B Interaktionspartners KIAA1

Für die Untersuchungen zum Nachweis einer Protein-Protein-Wechselwirkung der VPS4A/B Proteine mit dem KIAA1 Protein, wurden HeLa Zellen mit den Expressionskonstrukten pKIAA1-HA und pVPS4A-myc, pVPS4A^{E228Q}-myc, pVPS4B-myc, bzw. pVPS4B^{E235Q}-myc cotransfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion lysiert. Dabei wurden jeweils 4×10^5 Zellen (entspricht 2 Wells einer 12 Well Kulturschale) aufgearbeitet (siehe 3.13.2.) Die Expression der jeweiligen interagierenden Proteine wurde in Western Blot Analysen überprüft. Anschließend wurden die jeweiligen Proteinlysate für die Coimmunpräzitationsanalysen verwendet. Der μ MACS Epitope Tag Protein Isolation Kit der Fa. Myltenyi Biotec diente zur Durchführung dieser Interaktionsstudien (siehe Punkt 3.20.).

In Abb. 4.20. ist das Ergebnis der Analysen zur Coimmunpräzipitation gezeigt. In den jeweiligen Abbildungen 4.20. (A) für VPS4A/A^{E228Q} und (B) für VPS4B/B^{E235Q} sind die Nachweise der myc-Epitop markierten VPS4 Proteinvarianten im oberen Bild und die Detektionen des KIAA-HA Proteins im unteren Bild veranschaulicht.

Die Western Blot Analysen mit dem Anti-myc-HRP (oberes Bild) und dem Anti-HA-HRP Antikörper belegen, dass in den Rohextrakten der einzel- und cotransfizierten Zellen die Epitop-markierten Fusionsproteine wie erwartet vorlagen. So konnte mit dem Anti-myc Antikörper die VP4A-myc und VPS4A^{E228Q}-myc Proteine nachgewiesen werden (Abb. 4.20. A Spur 1 und 2). Ebenfalls wurden die VPS4B-myc und VPS4B^{E235Q}-myc Proteine in den Rohextrakten detektiert (Abb. 4.20. B Spur 1 und 2). Das KIAA1-HA Protein wurde in allen transfizierten Zellen exprimiert und konnte mit dem Anti-HA Antikörper eindeutig detektiert werden (Abb. 4.20. jeweils Spur 1, 2 und 3 in A + B). Dass eine Bindung der myc-Epitop markierten Wildtyp VPS4A und VPS4B Proteine, sowie der dominant-negativen Proteinvarianten VPS4A^{E228Q}/VPS4B^{E235Q} an den Anti-myc IgG gekoppelten magnetischen Kugeln erfolgte, zeigte sich auf der Seite der Eluate. So wurden mit dem Anti-myc-HRP Antikörper das VPS4A-myc Protein (Abb. 4.20. A Spur 4), das VPS4A^{E228Q}-myc Protein (Spur 5), sowie das VPS4B-myc Protein (Abb. 4.20. B Spur 4) und das VPS4B^{E235Q}-myc Protein nachgewiesen (Spur 5).

In den jeweiligen Kontrolleextrakten, in denen nur das KIAA1-HA, jedoch nicht die myc-markierten Proteinvarianten der VPS4A/B Proteine vorlagen, liess sich das KIAA1-HA im Rohextrakt nachweisen (Spur 3 in Abb. 4.20. A, B). Nach der Immunselektion mit den Anti-myc IgG gekoppelten magnetischen Kugeln konnte jedoch kein KIAA1-HA Protein im Eluat detektiert werden (Spur 6 in Abb. 4.20. A und B). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass HA-markiertes KIAA1 Protein unspezifisch am Säulenmaterial oder an den Anti-myc IgG gekoppelten magnetischen Kugeln gebunden hat.

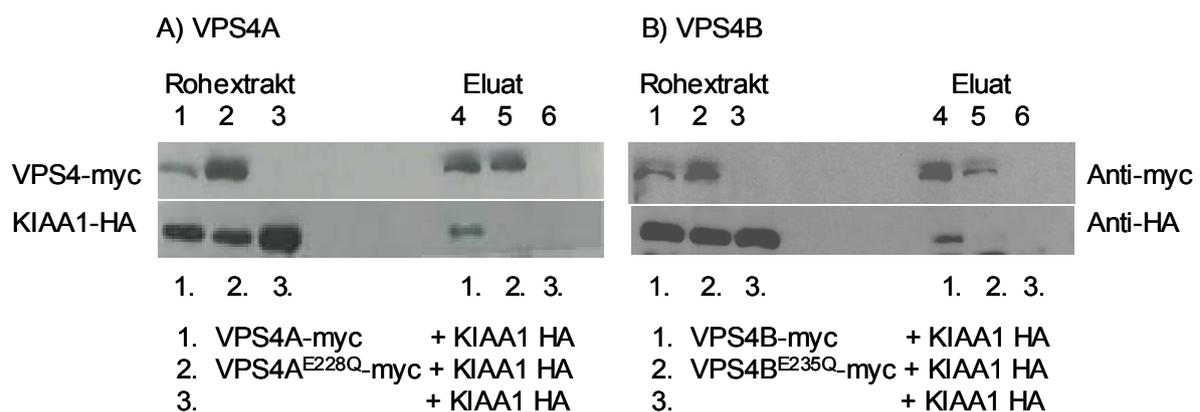


Abb. 4.20.: **Coimmunpräzipitation des KIAA1-HA Proteins.** $0,5 \times 10^5$ HeLa Zellen wurden transient mit folgenden Expressionskonstrukten transfiziert: A) 1. pVPS4A-myc/pKIAA1-HA, 2. pVPS4A^{E228Q}-myc/pKIAA1-HA, 3. pKIAA1-HA, B) 1. pVPS4B-myc/pKIAA1-HA, 2. pVPS4B^{E235Q}-myc/pKIAA1-HA, 3. pKIAA1-HA. 48 h nach der Transfektion bzw. Cotransfektion wurden die Zellen unter nativen Bedingungen lysiert (siehe 3.13.2.). 10% der entsprechenden Rohextrakte (Spuren 1-3) wurden zur Bestimmung der Expression aufgetragen. Parallel wurden in den Spuren 4-6 20% der über μ MACS Anti-myc-IgG gekoppelten magnetischen Kugeln immunselektierten Eluate im 8%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion der myc- und HA-markierten Proteine erfolgte mit Anti-HA-IgG bzw. Anti-myc-IgG.

In den mit Anti-myc IgG immunselektierten Eluaten aus den Cotransfektionen mit pVPS4A-myc/pKIAA1-HA (Abb. 4.20. A Spur 4) konnte das KIAA1-HA Protein mit den Anti-HA-HRP Antikörpern detektiert werden. Im Eluat der VPS4A^{E228Q}-myc/KIAA1-HA coexprimierten Zellen konnte jedoch das KIAA1-HA Protein nicht detektiert werden (Abb. 4.20. A Spur 5). Ein ähnliches Ergebnis lieferten die Coimmunpräzitationsexperimente mit Wildtyp und ATPase defizienten VPS4B Protein. Nur für das Wildtyp VPS4B-myc Protein konnte ein coeluiertes KIAA1-HA Protein nachgewiesen werden (Abb. 4.20. Spur 4).

Interessanterweise konnte KIAA1-HA im Eluat der mit pVPS4B^{E235Q}-myc/pKIAA1-HA cotransfizierten Zellen nicht deutlich detektiert werden (Abb. 4.20. B Spur 5) (Bei längerer Expositionszeit des Röntgenfilms zeigte sich bei VPS4B^{E235Q} eine sehr schwache Bande). Dementsprechend konnte nur für die Wildtyp Formen des VPS4A und VPS4B Proteins eine physikalische Interaktion mit dem KIAA1-HA Proteins *in vivo* eindeutig nachgewiesen werden.

4.6.2. Coimmunpräzitation des VPS4A/VPS4B Interaktionspartners FYVE1

Wie für das KIAA1 Protein wurden auch Coimmunpräzitationsanalysen zum Nachweis einer Protein-Protein-Wechselwirkung der VPS4A/B Proteine mit dem FYVE1 Protein durchgeführt. So wurden HeLa Zellen mit den Expressionskonstrukten pFYVE1-HA und pVPS4A-myc, pVPS4A^{E228Q}-myc, pVPS4B-myc, bzw. pVPS4B^{E235Q}-myc cotransfiziert, nach 48 Stunden lysiert und die Expression der Fusionsproteine in Western Blot Analysen überprüft. Anschließend wurden die jeweiligen Proteinlysate für die Coimmunpräzitationsanalysen verwendet. In der Abb. 4.21. sind die Ergebnisse der Coimmunpräzitationsanalysen gezeigt. Im oberen Bild sind wiederum die Detektionen der myc-Epitop markierten VPS4A/VPS4A^{E228Q} (Abb. 4.21. A) und VPS4B/VPS4B^{E235Q} Proteine (Abb.4.21. B) gezeigt, im unteren Bild die Detektion des HA-Epitop markierten FYVE1 Proteins.

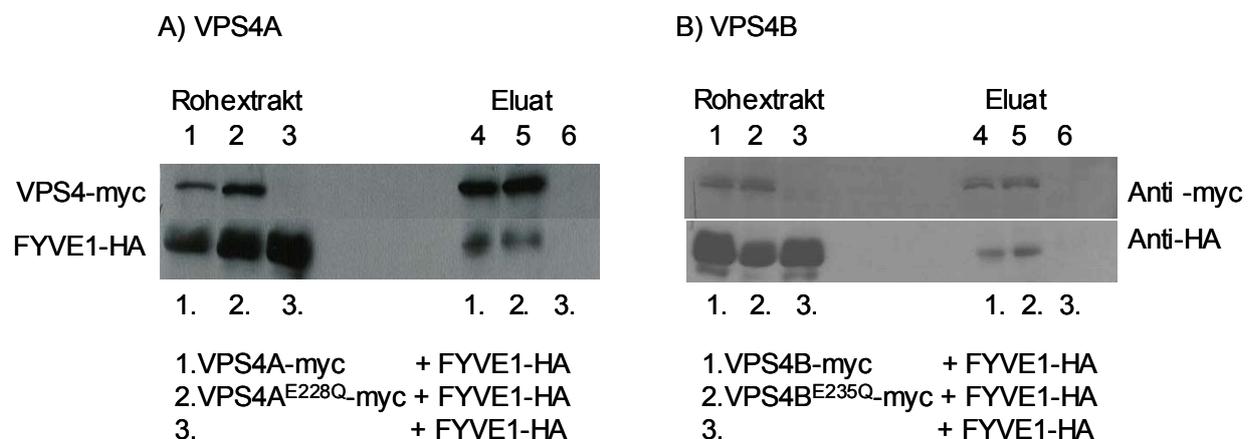


Abb. 4.21.: **Coimmunpräzitation des FYVE1-HA Proteins.** HeLa Zellen wurden transient mit folgenden Expressionskonstrukten transfiziert: A) 1. pVPS4A-myc/ pFYVE1-HA, 2. pVPS4A^{E228Q}-myc/ pFYVE1-HA, 3. pKIAA1-HA, B) 1. pVPS4B-myc/ pFYVE1-HA, 2. pVPS4B^{E235Q}-myc/ pFYVE1-HA, 3. pKIAA1-HA. 48 h nach der Transfektion bzw. Cotransfektion wurden die Zellen unter nativen Bedingungen lysiert (siehe 3.13.2.). 10% der entsprechenden Rohextrakte (Spuren 1-3) wurden zur Bestimmung der Expression aufgetragen. Parallel wurden in den Spuren 4-6 20% der über μ MACS

Anti-myc-IgG gekoppelten magnetischen Kugeln immunselektierten Eluate im 8%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion der myc- und HA-markierten Proteine erfolgte mit Anti-HA-IgG bzw. Anti-myc-IgG.

Die Analyse der Rohextrakte aus den drei Transfektionsansätzen (Abb. 4.21. 1.-3.) ergab, dass alle Epitop-markierten Wildtyp und dominant-negativen VPS4A-myc, bzw. VPS4B-myc Fusionsproteine exprimiert wurden und entsprechend im jeweiligen Rohextrakt mittels Anti-myc-HRP Antikörper nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.21. A VPS4A-myc in Spur 1, VPS4A^{E228Q}-myc in Spur 2, sowie Abb. 4.21. B VPS4B-myc in Spur 1 und VPS4B^{E235Q} in Spur 2). Der VPS4A und VPS4B „Two-Hybrid“ Interaktionspartner FYVE1-HA wurde in allen transfizierten HeLa Zellen exprimiert und mittels Anti-HA-HRP detektiert (Abb. 4.21. A/B in Spur 1, 2 und 3). In der Kontrolle zeigt sich, dass FYVE1-HA nicht am Säulenmaterial, bzw. an den Anti-myc-IgG magnetischen Kugeln gebunden hat (Abb. 4.21. A/B Spur 6).

In den oberen Abbildungen 4.21. A/B Spuren 4 und 5 ist zu erkennen, dass die Wildtyp VPS4A/B-myc, sowie die dominant negativen VPS4A^{E228Q}/VPS4B^{E235Q}-myc Proteine an den Anti-myc IgG gekoppelten magnetischen Kugeln gebunden haben und eluiert werden konnten. In den mit Anti-myc immunselektierten Eluaten aus der Coexpression von VPS4A-myc/FYVE1-HA (Abb. 4.21. A Spur 4) konnte das FYVE1-HA Protein mit dem Anti-HA-HRP detektiert werden. Im Eluat der pVPS4A^{E228Q}-myc/pFYVE1-HA cotransfizierten Zellen konnte ebenfalls die Coimmunpräzipitation des FYVE1-HA Proteins nachgewiesen werden (Abb. 4.21. A Spur 5). Wie für Wildtyp VPS4A-myc und dominant-negativen VPS4A^{E228Q}-myc, so ergaben sich gleiche Ergebnisse im Hinblick auf VPS4B-myc und VPS4B^{E235Q}-myc. Das FYVE1-HA Protein eluierte sowohl mit Wildtyp VPS4B-myc (Abb. 4.21. B Spur 4) als auch mit dominant-negativen VPS4B^{E235Q}-myc Protein (Abb. 4.21. B Spur 5 unteres Bild).

Eine physikalische Interaktion des FYVE1-HA Proteins konnte in den Coimmunpräzipitationsanalysen für das Wildtyp VPS4A-myc und VPS4B-myc Protein, sowie für die ATPase defizienten Proteinvarianten VPS4A^{E228Q}-myc und VPS4B^{E235Q}-myc eindeutig nachgewiesen werden.

4.7. Generierung eines dominant-negativen *VPS4b*^{E235Q} Allels

Die Expression eines dominant-negativen *VPS4* Allels in der Hefe und in Säugerzellen führt zu massiven Störungen im intrazellulären Proteintransport. Insbesondere wird durch eine ATP-Hydrolyse defiziente *VPS4* Mutante die Bildung der multivesikulären Kompartimente (MVB) durch Blockierung der Dissoziation von membranassoziierten Proteinkomplexen verhindert. Welche Konsequenz die Expression eines dominant-negativen Allels auf die Entwicklung eines Organismus hat, ist unklar. Um die funktionellen Konsequenzen der Expression eines dominant-negativen *VPS4* Proteins im transgenen Tiermodell (Maus) studieren zu können, sollte ein dominant-negatives *VPS4b*^{E235Q} Allel erzeugt werden. Diese Mutante führt zu einem ATPase defizienten *VPS4b* Protein. Um die zelltypische und organspezifische Expression des *VPS4b* Gens dabei möglichst wenig zu beeinflussen, war geplant, den chromosomalen *VPS4b* Locus zu isolieren und anschließend gezielt die Punktmutationen einzufügen, die zur Expression der mutanten *VPS4b*^{E235Q} Proteinvariante führte.

Die Selektion eines pP1-*VPS4b* Klonen mit kompletten *VPS4b* Locus erfolgte am RZPD in Heidelberg. In diesem pP1-*VPS4b* Klon war das *VPS4b* Gen in einen pPAC4 Vektor in die PUC Link Region kloniert worden. Der pP1-*VPS4b* Klon (pPAC4+*VPS4b*) hatte eine Größe von ca. 90 kB. Das Einbringen der Punktmutationen in Form einer klassischen Klonierung durch Restriktion/Ligation, oder durch PCR-Mutagenese war aufgrund der Größe des Vektors nicht möglich. Deshalb sollten die Punktmutationen über ein modifiziertes „ET“-Klonierungsverfahren erfolgen (ET-Ableitung von RecE und RecT) (Muyrers et al. 2000).

Dies geschah durch *in vivo* Rekombinationen, bei denen der Austausch von Wildtyp-Genabschnitten durch mutierte Genabschnitte erfolgte. Für die Rekombination benötigt man eine Rekombinase, die z.B. Plasmid-kodiert (pBAD $\alpha\beta\gamma$ codiert durch Red α und Red β) bereitgestellt werden kann.

Die Rekombinationen, die das Ziel hatten zwei Punktmutationen GAG zu CAA im Exon 7 des murinen *VPS4b* Gens einzufügen, was zu einem Aminosäureaustausch an der Position 235 Glutamat (E) gegen Glutamin (Q) im *VPS4b* Protein zur Folge hatte, wurden im *E. coli* Stamm BJ518 realisiert. Bei dem Stamm BJ5183 handelt es sich um einen weiterentwickelten K12 *E. coli* Stamm, welcher eine Rekombinaseaktivität durch das Protein RecBC und Suppressor sbcBC besitzt. Eine Induzierung einer plasmidbasierten Rekombinase war hier nicht notwendig.

Die Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Punktmutationen im Exon7 des *VPS4b* Gens sowie die Kontrolle dessen beinhaltete folgende Schritte (Abb. 4.22.):

1. Erzeugen einer Ampicillin-Resistenzgenkassette
2. Kontrolle der Ampicillinresistenz in einem Ampicillin-sensitiven Stamm
3. Integration des Ampicillin-Resistenzgens in das Exon 7 des *VPS4b* Gens
4. Selektion auf Ampicillinresistenz
5. Austausch der Exon 7 Region mit Ampicillinresistenz durch ein Exon 7 Fragment mit der E235Q Mutation
6. Isolierung von Ampicillin-sensitiven Klonen
7. Identifizierung der Mutation durch Sequenzierung
8. Kontrolle der Transkriptionsaktivität mittels RT-PCR

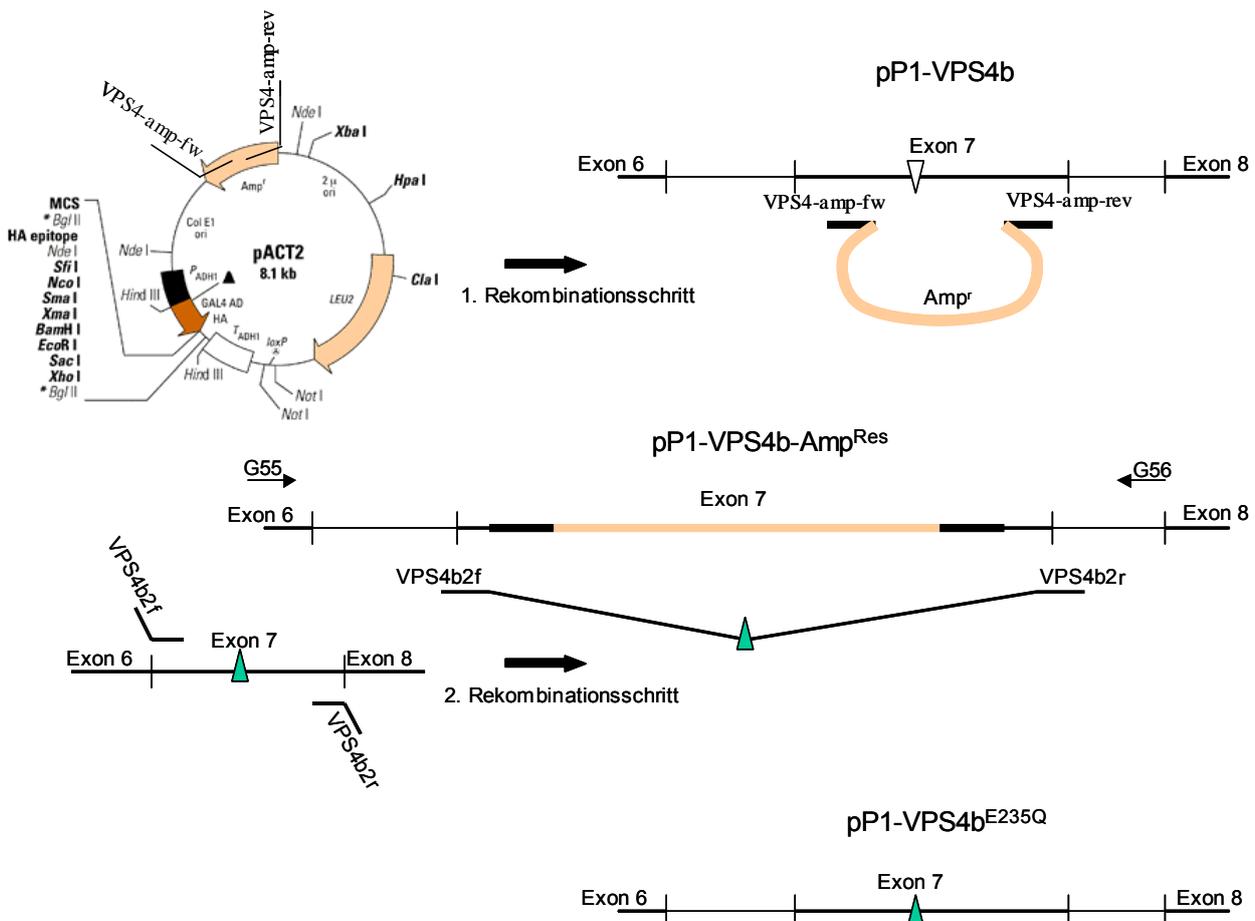


Abb. 4.22.: **Generierung eines dominant-negativen *VPS4b*^{E235Q} Allels durch homologe Rekombination.** Im 1.Schritt erfolgte die homologe Rekombination im Exon 7 des pP1-VPS4b Plasmides mit einem VPS4b-Exon 7-Amp^{Res} PCR Fragmentes. In der 2.Stufe erfolgte die Rekombination im Exon 7 des pP1-VPS4b-Amp^{Res} Plasmides mit einem VPS4b^{E235Q}-Exon 7 PCR Fragment.

Zunächst wurde die Amp^{Res}-Genkassette mit den Primern VPS4-amp-fw und VPS4-amp-rev, die zusätzlich zu der Ampicillin spezifischen Sequenz 5' flankierend je 50 bp VPS4b Exon 7 spezifische Sequenz trugen, aus dem Vektor pACT2 amplifiziert und den Vektor pDsRed1-N1 subkloniert. Dies erfolgte durch *Bam*H1/*Hind*III Restriktion von pDsRed1-N1 und Amplifikat die gerichtete Klonierung des Ampicillin-Resistenzgenes in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pDsRed1-N1 Vektors. Da der pDsRed1-N1 Vektor keine Amp^{Res}

besitzt, konnte die Funktionalität der Amp-Kassette getestet werden. *E. coli* Zellen, die mit dem Plasmid (pDsRed1-N1-Amp^{Res}) transfiziert wurden, konnten auf LB-Amp/Kan-Agarplatten selektiv wachsen.

Erster Rekombinationsschritt:

Für den ersten Rekombinationsschritt wurde mit den Primern VPS4-amp-fw und VPS4-amp-rev, welche 5' flankierend VPS4b Sequenzen enthielten, die komplette Ampicillingen Expressionskassette aus dem pACT2 Vektor amplifiziert (1087 kb großes Fragment). Mit diesem PCR Fragment und dem P1-VPS4b Vektor wurde der *E. coli* Stamm BJ5183 cotransformiert. Da dieser *E. coli* Stamm bereits endogen eine Rekombinase exprimiert, der P1-VPS4b Vektor keine Amp^{Res}, aber eine Kan^{Res} trug, konnte durch eine Doppelsektion auf Kan/Amp Agarplatten auf die Intergration des Ampicillingen in den P1-VPS4b Vektor selektioniert werden.

Die korrekte Integration des PCR-Fragmentes VPS4b-Exon 7-Amp^{Res} in den Exon 7 Bereich des *VPS4b* Gens des P1-VPS4b Klonen wurde durch eine PCR mit den flankierenden Primern G55 und G56, die diesen Bereich überspannen, kontrolliert (siehe Abb. 4.22.). Bei korrekter Integration ergab sich ein um 1087 bp (Ampicillinkassette) vergrößertes Fragment mit einer Größe von ca. 2 kbp (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde aus fünf Klonen die ein korrektes PCR Ergebnis lieferten, das pP1-VPS4b-Amp^{Res} Plasmid über eine modifizierte QIAGEN Plasmidisolierung (siehe 3.6.3.) aufgereinigt und in den *E. coli* Stamm DH10B (enthält keine Rekombinase) zur Sicherung und Vervielfältigung des Plasmids transformiert. Abschließend erfolgte eine Kontrollrestriktion mit *KpnI* und *BamHI* zur Bestätigung der richtigen Integration des Ampicillingen. In Abb. 4.24. Spur Amp ist diese Restriktion an einem Klon veranschaulicht. Bei korrekter Integration wurde erwartet, dass sich im Restriktionsmuster mit *KpnI* ein Bandenshift von 4,6 kbp zu 5,5 kbp ergab. Ebenso sollte eine zusätzliche Bande (4,8 kbp) im *BamHI* Restriktionsmuster des pP1-VPS4b-Amp^{Res} Plasmids ergeben (siehe weiße Pfeile in der Abb. 4.24.). Nach dieser Kontrolle wurde dieser Klon für den nächsten Rekombinationsschritt benutzt.

Zweiter Rekombinationsschritt:

Im zweiten Rekombinationsschritt sollte ein Austausch in der Exon 7-Amp Region durch ein Exon 7 Genabschnitt mit den Punktmutationen GAG→CAA erfolgen. Dazu wurde aus einem VPS4b^{E235Q} cDNA Klon, der die dominant-negative Mutation E235Q trug, die Exon 7 Region mit den Primerpaaren VPS4b2f und VPS4b2r amplifiziert. Das PCR Fragment hatte eine Größe von 216 bp. Das Amplifikat (VPS4b^{E235Q}-Exon7) wurde anschließend zusammen mit dem Vektor pP1-VPS4b-Amp in einem Verhältnis 1:20 (P1:Amplifikat) in den *E. coli* Stamm BJ5183 cotransformiert (siehe 3.5.1.3.). Nach Inkubation des Transformationsansatzes bei 37°C wurde dieser anschließend verdünnt (1:100) und der gesamte Ansatz in 100 µL Aliquots auf Kanamycin-haltigen LB-Agarselektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag (Koloniendurchmesser >1mm) wurden alle Kolonien auf Kan/Amp-haltigem LB-Agarmedium überstempelt. Nach 24 stündiger Inkubation bei 37°C

wurden alle Klone, die nicht auf den Kan/Amp Platten gewachsen waren, identifiziert. 36 Ampicillin-sensitiven Klone wurden isoliert und anschließend in einer PCR mit den Primern G55/G56 auf korrekte Integration des VPS4b^{E235Q}-Exon 7 Fragmentes überprüft (Abb. 4.23.) Bei richtiger Integration sollte das zu erhaltene Fragment wiederum um die Größe der Ampicillinkassette (1084 bp) vermindert sein, d.h. entsprechend ca. 1 kbp groß sein. Als Kontrolle wurde ein VPS4b^{E235Q} cDNA Klon mit dem Primerpaar G55/56 amplifiziert, um somit ein Maß für die richtige Größe des rekombinierten Bereiches zu erhalten (Abb. 4.23. Spur „E235Q“) In dieser PCR Analyse besaß ein Klon (#29) die richtige Größe (Abb. 4.23. rot markiert). In einem zweiten Schritt wurde wiederum das pP1-VPS4b^{E235Q} Plasmid über ein modifiziertes QIAGEN Plasmidisolierungsprotokoll (siehe 3.6.3.) gewonnen, in den *E. coli* Stamm DH10B zur Sicherung und Vervielfältigung des Plasmids transformiert. Das Plasmid wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *BamHI* geschnitten (Abb. 4.24. Spur E235Q). Das Restriktionsmuster musste dem Restriktionsmuster des ursprünglichen pP1-VPS4b Plasmides entsprechen, jedoch vom pP1-VPS4b-Amp^{Res} Plasmid abweichen. In der Abb. 4.24. sind die Restriktionsmuster der mit *KpnI* und *BamHI* geschnittenen Plasmide pP1-VPS4b (Spur WT) und pP1VPS4b^{E235Q} (Spur E235Q) identisch. Beide weichen, wie im ersten Rekombinationsschritt beschrieben, vom pP1-VPS4b-Amp^{Res} Plasmid ab (Spur Amp). Als letzter Schritt erfolgte die DNA Sequenzierung des Exon 7 zur endgültigen Verifizierung der Punktmutationen GAG → CAA (Abb. 4.25.).

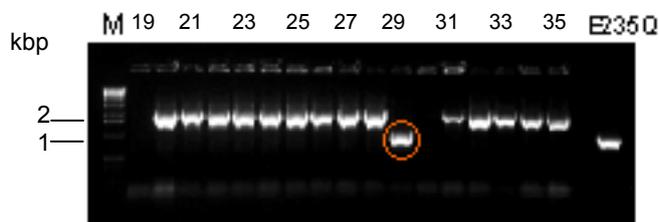


Abb. 4.23.: **PCR Kontrolle der korrekten Integration des VPS4b^{E235Q}-Exon 7 Fragmentes in den pP1-VPS4b-Amp^{Res} Vektor.** Das Lysat 36 Ampicillin-sensitiver Bakterienkolonien wurde in einer PCR mit dem Primerpaar G55/G56 auf Integration des VPS4b^{E235Q}-Exon 7 Fragmentes überprüft. Bei korrekter Rekombination wurde ein Bandenshift von ca. 1kbp durch den Verlust der Ampicillinkassette erwartet. Der Klon #29 (roter Kreis) hatte die Größe von ca. 1 kbp, dass mit der Kontrolle, eine VPS4b^{E235Q} cDNA Amplifikation (E235Q), übereinstimmt.

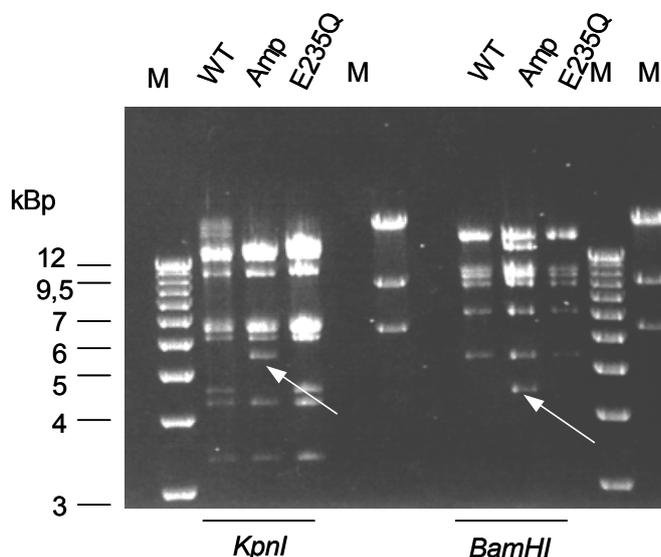


Abb. 4.24.: **Kontrollrestriktion der P1 Klone pP1-VPS4b, pP1-VPS4b-Amp^{Res} und pP1-VPS4b^{E235Q}.** Ca. 1 µg des pP1-VPS4b (WT), pP1-VPS4b-Amp^{Res} (Amp) und pP1-VPS4b^{E235Q} (E235Q) wurden mit *KpnI* und *BamHI* geschnitten. WT und E235Q zeigen die gleichen Restriktionsmuster auf. Durch die Insertion der Ampicillinresistenz in den pP1-VPS4b-Amp^{Res} Vektors kam es in der *KpnI* Restriktion zu einem Bandenshift von 4,6 zu 5,5 kbp in Amp gegenüber WT und E235Q (Linke Seite). In der *BamHI* Restriktion wurde zusätzlich eine Bande (ca. 4,8 kBp) in Amp gegenüber WT und E235Q erzeugt.

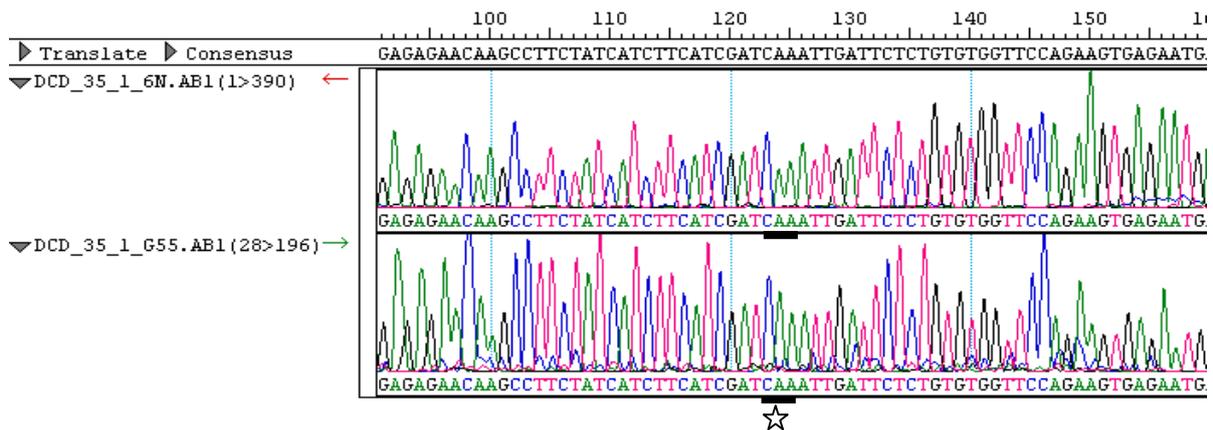


Abb. 4.25.: **Sequenzierung des pP1-VPS4b^{E235Q} Plasmides.** Dargestellt sind die Chromatogramme der Sequenzierungen des pP1-VPS4b^{E235Q} Plasmides mit den Primern 6N und G55. Die beiden Punktmutationen GAG→CAA sind in der Abbildung im Bereich 123 – 125 markiert.

4.7. Nachweis der transkriptionellen Aktivität des *VPS4b*^{E235Q} Allels

Bevor das pP1-VPS4b^{E235Q} Konstrukt zur Erzeugung transgener Mäuse benutzt werden konnte, sollte die transkriptionelle Aktivität des *VPS4b*^{E235Q} Allels überprüft werden. Dazu wurden 5×10^5 HepG2 Zellen mit Wildtyp P1-VPS4b, bzw. P1-VPS4b^{E235Q} transfiziert (jeweils 500 ng DNA).

48 Stunden nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA aus den transient transfizierten HepG2 Zellen isoliert. Zusätzlich wurde aus untransfizierten 3T3 und HepG2 Zellen die RNA isoliert. Zum Nachweis der Transkriptionsaktivität des *VPS4b* Allels wurden RT-PCR Analysen durchgeführt. In Abb. 4.26. ist das experimentelle Vorgehen schematisch dargestellt. Für die RT-PCR Analysen wurde ein OneStep RT-PCR Kit (Fa. QIAGEN) eingesetzt. In Abb. 4.27 sind die RT-PCR Ergebnisse aus den Reaktionen der mit pP1-VPS4b (Spur 1) und mit pP1-VPS4b^{E235Q} transfizierter HepG2 Zellen (Spur 2), sowie nicht-transfizierter HepG2 (Spur 3) und nicht-transfizierter 3T3 Zellen (Spur 4) dargestellt. Für die Amplifikation der Gesamt-RNA wurden die Maus spezifischen *VPS4b* Primer SKD20 und G27 und die Maus und Human spezifischen *VPS4B/b* Primer h1b12 und h1b17 (Abb. 4.26.) eingesetzt. Mit dem *VPS4B/b* spezifischen Primerpaar h1b12/h1b17 wurde ein 234 bp großes PCR Fragment aus der 5'Region in der RT-PCR amplifiziert (Abb 4.27 Spuren 1-4 rechts). Diese RT-PCR diente vor allem als interne Kontrolle der Isolierung intakter *VPS4B/b* mRNA aus den HepG2 und den 3T3 Zellen, sowie für die Reverse Transkription und anschließende PCR Reaktion. In Abb. 4.27. rechts ist ersichtlich, dass in allen RT-PCR Ansätzen das erwartete 234 bp große *VPS4B/b* und *VPS4b*^{E235Q} spezifische PCR Fragment amplifiziert worden ist.

Mit dem Primerpaar G27/SKD20 wurde ein PCR Fragment von 925 bp nur in den Proben mit *VPS4b*(*Vps4b*^{E235Q}) Transkript erwartet. So ist in Abb. 4.27. linke Seite (SKD20/G27) zu erkennen, dass ein PCR Fragment der erwarteten Größe von 925 bp in den Proben P1-VPS4b mRNA (Abb. 4.27 Spur 1 links) und P1-VPS4b^{E235Q} mRNA (Abb. 4.27 Spur 2 links), sowie Wildtyp *VPS4b* mRNA nicht-transfizierter 3T3 (Maus) Zellen (Spur 4) amplifiziert wurde. In der Probe mit *VPS4B* mRNA untransfizierter HepG2 (Human) Zellen (Spur 3) ist

wie erwartet kein PCR-Fragment zu erkennen. Das in dieser Probe VPS4B mRNA vorlag, zeigt sich in Abb. 4.27. Spur 3 rechte Seite. Damit ist die Spezifität der VPS4b Primer SKD20/G27 durch die Negativ-Kontrolle gezeigt. Das bedeutet ebenfalls, dass das auf dem P1 Vektor liegende *VPS4b* Allel bzw. *VPS4b*^{E235Q} Allel transkriptionell aktiv ist. Der positive Beleg der transkriptionellen Aktivität des transfizierten *VPS4b*^{E235Q} Allels in dem pP1-VPS4b^{E235Q} Konstrukt war eine zwingende Voraussetzung für die folgenden tierexperimentellen Arbeiten.

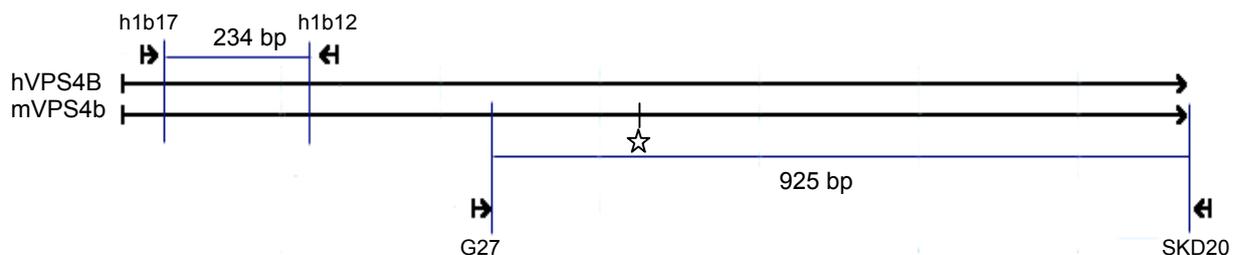


Abb. 4.26.: **Schematische Darstellung der RT-PCR Strategie.** Isolierte mRNA aus HepG2 Zellen, die mit pP1VPS4b, pP1-VPS4b^{E235Q} transfiziert waren, bzw. aus nicht-transfizierten HepG2 und 3T3 Zellen wurden zu Beginn in zwei parallelen Ansätzen in der Reversen Transkription die komplementäre cDNA (hVPS4B mit Primer h1b12, bzw. hVPS4b mit Primer SKD20) erzeugt. Anschließend erfolgte die Amplifikation der cDNA mit dem VPS4B/b spezifischen Primerpaar h1b17/h1b12 (234 bp), bzw. dem VPS4b spezifischen Primerpaar G27/SKD20 (925 bp). Die Fragmente wurden in einer Agarosegelelektrophorese überprüft. ☆) Mutation VPS4B/b^{E235Q}

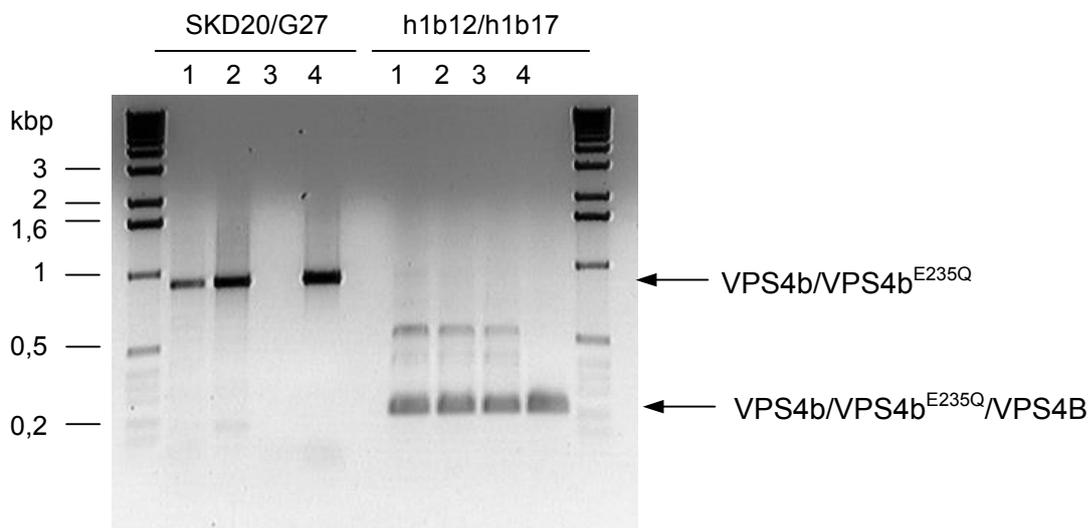


Abb. 4.27. **Ergebnisse der RT-PCR Analysen.** Humane HepG2 Zellen wurden mit dem Wildtyp pP1-VPS4b (Spur 1), bzw. dem dominant-negativen pP1-VPS4b^{E235Q} (Spur 2) Expressionskonstrukt transformiert. 48 h nach der Transfektion wurde aus den transfizierten HepG2 Zellen, sowie nicht-transfizierten HepG2 (Spur 3) und nicht-transfizierten Maus 3T3 Zellen (Spur 4) die Gesamt RNA isoliert. Für die anschließenden RT-PCR Analysen wurden jeweils 50 ng Gesamt RNA eingesetzt. Mit dem Primerpaar h1b12/h1b17 wurde die Expression von humanem und maus VPS4B/b (Spur 1, 3 und 4) und VPS4B/b^{E235Q} (Spur 2) durch Amplifikation der revers transkribierten mRNA (ein 234 bp großes PCR Fragment) nachgewiesen. Das Primerpaar SKD20/G27 bindet spezifisch an VPS4b cDNA und generiert ein 925 bp PCR Fragment. So wurde die cDNA von VPS4b (Spur 1 und 4) und von VPS4b^{E235Q} (Spur 2) (925bp) und dementsprechend die mRNA nachgewiesen.

5. Diskussion

5.1. VPS4A/VPS4B Interaktionspartner

„Vacuolar Protein Sorting“ Proteine sind für den vakuolären Proteintransport in der Hefe verantwortlich. Sie werden aufgrund unterschiedlicher morphologischer Veränderungen in sechs sogenannte VPS Klassen (A-F) eingeteilt (Raymond et al. 1992). VPS Klasse E Mutanten akkumulieren vakuoläre, endocytotische und trans-Golgi Markerproteine in einem vergrößerten multivesikulären Kompartiment, dem sogenannten Klasse E Kompartiment. Das Hefe Vps4p ist ein Klasse E VPS Protein mit einer zentralen AAA-Domäne (AAA-ATPase) und einer N-terminal gelegenen Coiled-Coil Domäne (CC) (Finken-Eigen et al. 1997). In Säugerzellen (Maus und Mensch) konnten zwei zueinander paraloge VPS4 Proteine identifiziert werden. Im Mensch das VPS4A und VPS4B, in der Maus das VPS4a bzw. VPS4b/SKD1 (Scheuring et al. 2001; Beyer et al. 2003). Die paraloge Proteine VPS4A/a und VPS4B/b besitzen eine N-terminale Coiled-Coil Domäne, sowie die zentrale AAA-Domäne. Sie folgen der selben Verteilung in der Zelle und assoziieren an vergrößerten endosomalen Strukturen bei Expression ATPase defizienter Mutanten (VPS4A^{E228Q}, VPS4B^{E235Q}) (Yoshimori et al. 2000). In der Kenntnis, dass das Hefe Vps4p an endosomalen Strukturen mit anderen VPS Proteinen (Vps24p, Vps32p) assoziiert ist (Babst et al. 1998), wurden in dieser Arbeit in Säugerzellen Proteine identifiziert, die mit den humanen VPS4A und VPS4B Proteinen interagieren. Die ATPase defiziente Mutante VPS4A^{E228Q} und das Wildtyp VPS4B Protein wurden zur genomweiten Suche nach humanen VPS4 Interaktionspartner eingesetzt. Durchsucht wurde eine cDNA Bank, die aus RNA, isoliert aus humanen Hirngewebszellen, generiert war. Im Verlauf wurden 240 mögliche VPS4A^{E228Q} Interaktionspartner untersucht, die den Genen FYVE1, KIAA1, KIN17, PKC-like1 und BC-2 zugeordnet werden konnten. 14 Interaktionskandidaten wurden bei der Suche mit dem Wildtyp VPS4B Protein als Ankerprotein isoliert. 10 von diesen 14 Kandidaten wurden ebenfalls dem FYVE1 Protein zugeordnet.

Einer der isolierten VPS4A^{E228Q} Interaktionspartner war das Genprodukt des BC-2 Gens (Keese et al. 1999). Für das VPS4B Ankerprotein wurde zwar kein BC-2 gefunden, was aber sehr wahrscheinlich an der niedrigen Zahl an untersuchten Klonen für VPS4B liegt. Denn es konnte gezeigt werden, dass das BC-2 identische Protein CHMP2A (Chromatin modifying protein 2A) ein VPS4b/SKD1 interagierendes Protein ist (Howard et al. 2001). Das CHMP2A/BC-2 Protein wurde als „Two-Hybrid“ Interaktionspartner mit Maus VPS4b/SKD1 als Ankerprotein in einer humanen Gehirn cDNA Bibliothek identifiziert (Howard et al. 2001). Neben dem CHMP2A/BC-2 Protein wurde in dieser humanen „Two-Hybrid“ Suche ebenfalls das CHMP1 Protein als Maus VPS4b/SKD1 Bindungspartner gefunden, dass in *in vitro* Bindungsassays und Coimmunpräzipitationsanalysen als VPS4b Interaktionspartner bestätigt wurde. Die in der Arbeit von Howard et al. (2001) untersuchten *chm* Deletionshefemutanten wiesen den selben morphologischen Phänotyp auf, wie sie für VPS Klasse E Mutanten beschrieben worden sind (Raymond et al. 1992). Interessanterweise sind 80% aller VPS4b Interaktionskandidaten dem CHMP1 Protein zugeordnet worden (Howard et al. 2001).

Der VPS4 Interaktionspartner - FYVE1

Auch in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten „Two-Hybrid“ Suche mit VPS4A^{E228Q}/VPS4B wurde ein Protein ungewöhnlich häufig identifiziert. Ca. 80% (203 cDNA Klone) der identifizierten VPS4A^{E228Q}/VPS4B Interaktionskandidaten wurden dem *FYVE1* Gen zugeordnet. Ein DNA-Sequenzvergleich der cDNA Sequenzen von 12 *FYVE1* cDNA Klonen ergab, dass ein 252 Basenpaar langer Sequenzbereich bei allen Kandidaten vorhanden ist, der für die Protein-Protein-Wechselwirkung mit VPS4A/B verantwortlich sein muß. Dieser Interaktionsbereich (Aminosäure (AS) 116 – 200) schließt sich an die „FYVE-finger“ Domäne des *FYVE1* Proteins an, die innerhalb der ersten 180 Basenpaare vom Startcodon liegt (AS 1-59). Weitere funktionelle Bereiche konnten nicht identifiziert werden. Das *FYVE1* Gen (NCBI GenID: 84936) besitzt 11 Exone. Bei einem Vergleich der aus den „Two-Hybrid“ Klonen ermittelten *FYVE1* cDNA Sequenzen und dem Sequenzeintrag in der DNA-Datenbank (ENSEMBL ACC# BC15738.1) wurde festgestellt, dass das *FYVE1* Gen in zwei verschiedenen Splicevarianten vorliegt, was zu zwei unterschiedliche Proteinvarianten führt. Zum einen ein *FYVE1* Protein der vollen Länge (ENSEMBL ACC# AAH15738) zum anderen ein *FYVE1*-Protein (ENSEMBL ACC# AAH021092), welchem das Exon 7 fehlt. Auch die sequenzierten 12 *FYVE1* Kandidaten enthielten, wie das für die weiteren Untersuchungen benutzte *FYVE1* Protein kein Exon 7 (ENSEMBL ACC# AAH021092). In einer parallelen „Two-Hybrid“ Suche mit murinem VPS4a^{E228Q} und VPS4b als Ankerprotein wurde das murine *FYVE1* Gen in 32 von 81 „Two-Hybrid“ Klonen identifiziert. Auch hier wurde der Hauptteil mit VPS4a^{E228Q} gefunden. Eine Clustal W Analyse der kompletten Proteinsequenz von humanem und murinem *FYVE1* Protein ergab eine 81%ige Proteinsequenzidentität.

In einem spezifischen „Two-Hybrid“ Test mit Wildtyp VPS4A/B, sowie den dominant-negativen VPS4A^{E228Q}/VPS4B^{E235Q} Proteinen interagiert das humane *FYVE1* Protein mit jedem der untersuchten VPS4 Proteinvarianten, wobei die Untersuchungen unter Vierfachselektionsbedingungen durchgeführt wurden, d.h. unter sehr stringenten Bedingungen. Dabei zeigte sich, dass die Wechselwirkungen der vier verschiedenen VPS4 Proteinvarianten (VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B, VPS4B^{E235Q}) mit den *FYVE1* Protein offensichtlich ähnlich stark sind, da der jeweilige cotransformierte Hefestamm ein gleich starkes Wachstum auf den Selektionsplatten zeigte.

Erste Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen dem *FYVE1* Protein und den VPS4A/B Proteinen *in vivo* ergaben Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des *FYVE1* Proteins. Untersucht man die Verteilung eines fluoreszierenden *FYVE1* Fusionsproteins in transient transfizierten HeLa Zellen ohne den Einfluß eines parallel überexprimierten VPS4A bzw. VPS4B, so findet man das *FYVE1*-DsRed Fusionsprotein hauptsächlich cytosolisch homogen verteilt vorliegen. Ein ähnliches Verteilungsmuster findet man auch für Wildtyp VPS4A-GFP und VPS4B-GFP Fusionsproteine, die wie das endogene Vps4p Hefeprotein in der Hefe auch gleichmäßig im Cytoplasma verteilt sind (Scheuring et al. 2001). Die ATPase defizienten VPS4A^{E228Q}-GFP und VPS4B^{E235Q}-GFP Proteinvarianten hingegen findet man konzentriert im perinuklearen Bereich assoziiert an endosomalen Strukturen. Diese für die Wildtyp und die ATPase defizienten VPS4A/VPS4B Proteine typische subzelluläre Verteilung findet man nicht

nur in verschiedenen Säugerzelllinien (in NRK Zellen, Bishop und Woodman (2000); in HeLa, bzw. COS Zellen Yoshimori et al. (2000)) sondern auch in Hefezellen (Scheuring et al. 2001). Interessanterweise beobachtet man bei der Überexpression von Wildtyp VPS4A-GFP und VPS4B-GFP Proteinen oder bei Überexpression der dominant negativen VPS4A^{E228Q}-GFP bzw. VPS4B^{E235Q}-GFP Fusionsproteine eine deutliche Colokalisation mit FYVE1-DsRed Proteinen. Dies ist besonders deutlich bei Überexpression der ATPase defizienten VPS4A/VPS4B Proteinen. Dort kommt es offensichtlich zu einer generellen Umverteilung und Rekrutierung des FYVE1-DsRed Fusionsproteins hin zu den perinuklearen endosomalen Regionen der Zelle, in denen sich die ATPase defizienten Fusionsproteine VPS4A^{E228Q}-GFP bzw. VPS4B^{E235Q}-GFP konzentrierten. Dass es sich hierbei um endosomale Bereiche handelt, konnte durch die Detektion mit Markerproteinen wie dem EEA1 Antikörper gezeigt werden (Tanaka et al. 2002). In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Colokalisationsuntersuchung konnten ähnliche endosomale Strukturen in den mit VPS4A^{E228Q}, bzw. VPS4B^{E235Q} und FYVE1 cotransfizierten Zellen beobachtet werden, so dass vermutet werden kann, dass beide Proteine, FYVE1 und VPS4A/B, zusammen an endosomalen Strukturen assoziieren.

Mit dem von Tanaka et al. (2002) identifizierten VPS4A Interaktionspartner Rnd2 wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Die endosomale Colokalisation der Rho GTPase Rnd2 und des dominant-negativen VPS4A^{E228Q} Proteins wurde mit Hilfe des endosomalen Markerproteins EEA1 dem Frühen Endosomen zugeordnet. Wie bei FYVE1 beobachtet man bei Rnd2 ebenfalls eine Umverteilung des Rnd2 Proteins in Richtung des VPS4A^{E228Q}, das assoziiert an Frühen Endosomen in entsprechend cotransfizierten HeLa Zellen vorlag. Tanaka et al. (2002) schlussfolgerten aus diesen Beobachtungen, dass Rnd2 vom dominant-negativen VPS4A^{E228Q} zu den endosomalen Bereichen rekrutiert wird. Rho GTPasen sind als „Signalknoten“ in der Signalkaskade, aktiviert durch extrazelluläre Stimuli (Rezeptor bindende Hormone), bekannt (Karnoub et al. 2004).

Eine physikalische Interaktion wurde auch für Rnd2 durch Coimmunpräzipitation gezeigt (Tanaka et al. 2002).

Zum Nachweis der physikalischen Interaktion des FYVE1 Proteins mit VPS4 Proteinen wurden Coimmunpräzipitationsanalysen mit epitop-markierten Proteinen durchgeführt. Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen, dass das Epitop-markierte FYVE1-HA Protein sowohl mit den Wildtyp VPS4A-myc und VPS4B-myc, als auch mit den dominant-negativen Proteinvarianten VPS4A^{E228Q}-myc und VPS4^{E235Q}-myc Proteinen copräzipitiert. Bei diesen Copräzipitationsexperimenten wurden jeweils die myc-Epitop markierten VPS4A/VPS4B Proteine als „Ankerproteine“ isoliert. Das FYVE1-HA Protein wurde auf Grund der Interaktion mit VPS4A und VPS4B aus dem Zelllysat coisoliert. Eine weitere wichtige Frage war, ob das FYVE1 Protein in der „FYVE-finger“ Domäne ein Phosphatidylinositolphosphat-Bindungsmotiv besitzt, wie es für andere „FYVE-finger“ Domänen Proteine beschrieben ist, die im endosomalen Proteintransport beteiligt sind.

Ein Beispiel ist das PIKfyve Protein, das in einer Untersuchung mit VPS4b eine Beeinflussung der zellulären Verteilung von VPS4b zeigte (Ikononov et al. 2002). Dort wurde eine Colokalisation von SKD1/VPS4b mit PIKfyve beobachtet. Die Verteilung von PIKfyve war in der Zelle homogen mit einzelnen kleinen Punkten, sowohl bei Einzel-, wie auch bei

zum „FYVE-related“ Protein. Generell fällt auf, dass die in der „FYVE-finger“ Domäne konservierten Arginine durch Lysine (K) ersetzt sind (Pos. 12, 13, 18, 44). Beide Aminosäuren besitzen ähnliche chemische Eigenschaften: Sie sind basisch mit einer Aminogruppe $-NH_2$ in der ϵ -Seitenkette. Somit gibt es gute Argumente, die bei FYVE1 für eine „echte“ „FYVE-finger“ Domäne sprechen. Es gibt aber auch Argumente dafür, dass das FYVE1 Protein in die Gruppe der „FYVE-related“ Proteine einzusortieren ist. Die in der „FYVE-finger“ Sequenz konservierten zwei Histidine in der Box1 sind im FYVE1 Protein durch die Sequenz (YG) ersetzt, die eher eine saure, hydrophobe Eigenschaft besitzen, was wiederum für eine „FYVE-related“ Domäne sprechen würde. Arbeiten von Stenmark und Aasland (1999) zeigen, dass die Sequenz **RRHHCR** in der Box 1 der „FYVE-finger“ Domäne das Bindungsmotiv für die 3'-Phosphatgruppe des Phosphatidylinositol-3-Phosphates (PI3P) ist. Bezieht man das Bindungsverhalten des FYVE1 (keine PI3P Bindung) und die Abweichungen im Bindungsmotiv mit ein, so würde zum jetzigen Zeitpunkt FYVE1 eher in die Gruppe der „FYVE-related“ Proteine einzuordnen sein.

Der VPS4 Interaktionspartner - KIAA1

Bei der „Two-Hybrid“ Suche nach VPS4A^{E228Q} und VPS4B interagierenden Proteinen wurden 16 cDNA Fragmente des humanen *KIAA1* Gens identifiziert, wobei nur mit VPS4A^{E228Q} als Ankerprotein KIAA1 Kandidaten gefunden wurden. Der Grund liegt sehr wahrscheinlich in der geringen Anzahl an untersuchten Kandidaten bei der VPS4B Suche im Vergleich mit den VPS4A^{E228Q} Ankerprotein (14 Kandidaten bei VPS4B und 240 Kandidaten bei VPS4A^{E228Q}). Unterstützt wird diese Annahme durch eine parallele „Two-Hybrid“ Suche mit murinen VPS4a^{E228Q}, bzw. VPS4b Ankerproteinen, da in diesem Fall für beide VPS4 Proteinvarianten murine KIAA1 Interaktionskandidaten isoliert worden sind.

Die 16 humanen cDNA Klone decken C-terminal über 70% des kompletten ORF des *KIAA1* Gens ab. Ein ca. 114 Basenpaar langer Bereich (AS 302 – AS 340) ist bei allen Kandidaten vertreten. Innerhalb dieses Bereiches ist die Region, die für die Wechselwirkung mit VPS4A/B verantwortlich ist, zu suchen. Das KIAA1 Protein enthält N-terminal eine sogenannte DUF292 Dömäne, ein 122 AS langer konservierter Bereich, der jedoch noch keiner bestimmten biologischen Funktion zugeordnet ist (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Eine Clustal W Analyse der in der „Two-Hybrid“ Suche gefundenen humanen und murinen KIAA1 cDNA Klone ergab, dass es sich hierbei um ein hochkonserviertes Protein handelt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit auch dieselbe Funktion besitzt. Bei einer spezifischen „Two-Hybrid“ Analyse des KIAA1 Proteins mit verschiedenen VPS4 Proteinvarianten (VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B, VPS4B^{E235Q}) wurde deshalb zusätzlich zu dem humanen auch ein muriner KIAA1 cDNA Klon auf Interaktion mit den humanen VPS4 Proteinvarianten untersucht. Unterschiedliche Bindungsaktivität der murinen und humanen KIAA1 Proteine mit den VPS4A/B Proteinvarianten waren nicht zu erkennen. Alle cotransformierten Hefestämme wuchsen auf den Vierfach-Selektionsplatten gleich stark. Wenn man davon auf gleich starke Bindungsaktivitäten der murinen und humanen KIAA1 Proteine mit den VPS4 Proteinen ableitet, dann deutet dies zusammen mit der hohen Sequenzidentität darauf hin, dass es sich bei dem murinen und humanen *KIAA1* Gen um orthologe Gene handelt.

Ein kompletter humaner KIAA1 cDNA Klon (1098 Bp, 366 AS) wurde im Rahmen dieser Arbeit aus einer HaCaT cDNA-Bank isoliert, um die Interaktion zwischen dem KIAA1 Protein und den VPS4A und VPS4B Proteinen zu untersuchen. Im Vergleich zu einem KIAA1 NCBI Datenbankeintrag (NCBI Acc# AK057258) wich die Sequenz des aus der HaCaT cDNA Bank isolierte KIAA1 cDNA Klon an Position 998 von dem Datenbankeintrag ab, was zu einem Aminosäureaustausch (D→G) führte. Die Untersuchung zur subzellulären Verteilung des KIAA1 Proteins in verschiedenen kultivierten Säugerzelllinien (HeLa und HepG2) ergaben ein sehr ähnliches Bild, wie die Studien des FYVE1 Proteins. Normalerweise lag das KIAA1 Protein, exprimiert als KIAA1-DsRed, homogen verteilt im Cytoplasma der transient transfizierten Zellen vor. Bei gleichzeitiger Expression der Wildtyp und dominant-negativen VPS4A- und VPS4B-GFP Fusionsproteine beobachtete man eine Umverteilung des KIAA1-DsRed Fusionsproteins hin zu Regionen in der Zelle, in denen sich die VPS4-GFP Proteinvarianten konzentrierten. Die Umverteilung des KIAA1-DsRed Proteins, die besonders ausgeprägt bei Coexpression der ATPase defizienten VPS4A^{E228Q}-GFP und VPS4B^{E235Q}-GFP Proteine erkennbar war, gibt neben der Colokalisation einen zusätzlichen Hinweis auf eine Interaktion zwischen den Interaktionspartnern KIAA1 und VPS4A, bzw. VPS4B.

Bei den FYVE1 und KIAA1 Proteinen handelt es sich um Proteine, die in der Literatur noch nicht beschrieben sind. Es gibt aber bereits Studien anderer Proteine, die z.B. mit der ATPase defizienten VPS4A^{E228Q} Proteinvariante in HeLa Zellen colokalisieren, wie z.B. das hSNF7 (Peck et al. 2004). Wie Peck et al. (2004) bei Studien in HeLa Zellen zeigen konnten, colokalisierten das hSNF7 mit dem dominant-negativen VPS4A^{E228Q} an endosomalen Bereichen in der Zelle. Interessanterweise konnte die in der Colokalisation beobachtete Assoziation als eine Interaktion beider Proteine in den durchgeführten Coimmunpräzipitationsexperimenten nicht nachgewiesen werden (Peck et al. 2004). Als ein möglicher Grund wurde vermutet, dass die in „Two-Hybrid“ Analysen ermittelte Interaktion zwischen dem Hefeproteinen Vps4p und Snf7p in Säugerzellen nicht konserviert ist und möglicherweise weitere Proteine für die Wechselwirkung von VPS4A und hSNF7 benötigt werden.

Fujita et al. (2004) berichteten von zwei weiteren Maus VPS4b/SKD1 interagierenden Proteinen. SBP1 und mVPS2/CHMP2A, die in „Two-Hybrid“ Suchen identifiziert wurden, sind in ihrer subzellulären Verteilung unter Einfluß von VPS4b/SKD1 beobachtet worden. SBP1 und mVPS2/CHMP2A folgen, wie die in dieser Arbeit beschriebenen FYVE1 und KIAA1 Interaktionspartner, der subzellulären Verteilung des VPS4b/SKD1 Proteins. Insbesondere mit VPS4b^{E235Q}-GFP wurde diese Umverteilung des SBP1 und mVPS2 sichtbar (Fujita et al. 2004). Im Gegensatz zu hSNF7 konnte jedoch in GST – Pull Down Experimenten eine Wechselwirkung der SBP1 und mVPS2 Proteine mit dem VPS4b/SKD1 Protein *in vivo* nachgewiesen werden (Fujita et al. 2004).

Eine physikalische Wechselwirkung des KIAA1 Proteins mit VPS4A und VPS4B Protein wurde in dieser Arbeit durch native Coimmunpräzipitationsanalysen nachgewiesen. Die Ergebnisse der Coimmunpräzipitationsexperimente lieferten dabei einen unmittelbaren Hinweis auf eine Interaktion eines KIAA1-HA Epitop markierten Proteins mit beiden Wildtyp VPS4A-myc und VPS4B-myc Proteinen. Interessanterweise konnte eine direkte Bindung zu den ATPase defizienten VPS4 Proteinvarianten nicht (VPS4A^{E228Q}-myc) bzw. nicht eindeutig (VPS4B^{E235Q}-

myc) nachgewiesen werden. Im Bezug auf die ATPase defizienten VPS4 Proteine decken sich diese Ergebnisse allerdings nicht mit den Beobachtungen in den Koloalisations- und „Two-Hybrid“ Experimenten, die klare Hinweise auf eine Interaktion sowohl mit Wildtyp, als auch mit dominant negativem VPS4 lieferten. Verschiedene Gründe könnten diese Diskrepanz erklären. Einerseits könnte der Oligomerisierungsgrad der VPS4 Proteine bei der Coimmunpräzipitation insofern eine Rolle spielen, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Bindungsaffinität der mutierten VPS4A/VPS4B Proteinvarianten zum KIAA1 herabgesetzt sein könnte. Babst et al. (1998) haben das hauptsächliche Vorkommen von Wildtyp Vps4p als Dimere (ATP/ADP gebunden) nachgewiesen, während die Mutantenform Vps4^{E233Q}p vorwiegend als Decamer (ATP gebunden) vorliegt. In der „Two-Hybrid“ Analyse spielen diese oligomeren Strukturen eine untergeordnete Rolle, weil Protein - Protein Interaktionen im Zellkern untersucht werden. Die Wechselwirkung von KIAA1 und VPS4A^{E228Q} und VPS4B^{E235Q} findet *in vivo* jedoch an endosomalen Strukturen statt, was der beobachteten konzentrierten Verteilung beider Proteine, bzw. der Rekrutierung von KIAA1 entspricht. Möglicherweise wird die Bindungsaffinität im Zuge der Oligomerisierung des VPS4 Proteins stark herab gesetzt, so dass eine Isolierung des KIAA1-VPS4(A^{E228Q}/B^{E235Q}) Interaktionskomplexes unter den gewählten Bedingungen in der Coimmunpräzipitationsanalyse nicht möglich ist. Wie in den Koloalisationsexperimenten gezeigt, kommt es jedoch nicht zur Dissoziation dieses in seiner Bindung „abgeschwächten“ Proteinkomplexes des ATP-Hydrolyse inaktiven VPS4A/VPS4B Proteins und KIAA1.

Ein zweite mögliche Erklärung könnte in der Assoziation weiterer VPS4 interagierender/ assoziierter Proteine liegen (SBP1; CHMP1; VPS2/CHMP2/BC-2 oder andere). Es könnte sein, dass sie die Bindung von KIAA1 an VPS4^{EQ} verringern/stören, die sich im Zuge der MVB Reifung anlagern. Da diese VPS4^{EQ} Mutante zur ATP Hydrolyse nicht fähig ist, erfolgt keine Dissoziation der VPS4 interagierenden/assoziierenden Proteine am multivesikulären Kompartiment (MVB), was zu den in der Koloalisation beobachteten Effekten kommt.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass das humane KIAA1 mit den physiologisch relevanten und funktionell aktiven humanen Wildtyp VPS4A und VPS4B Proteinen in HeLa Zellen interagiert und als ein Komplex in der Coimmunpräzipitationsanalyse aus dem Zelllysat gewonnen werden kann.

5.2. Beteiligung der KIAA1 und FYVE1 Proteine am endosomalen Proteintransport

Bei der Suche nach Interaktionspartner der Säuger VPS4A und VPS4B Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit das KIAA1 und das FYVE1 Protein identifiziert und eine direkte Wechselwirkung *in vivo* nachgewiesen. Obwohl die intrazellulären Proteintransportprozesse in Säugerzellen und in Hefezellen stark konserviert sind, war es trotz intensiver Datenbankrecherchen nicht möglich orthologe Hefeproteine zu den Säugerproteinen FYVE1 und KIAA1 zu finden. Eine „Two-Hybrid“ Analyse mit dem Hefeprotein Vps4p führte zur Identifizierung von zwei Hefeproteinen, Vta1p und Vps20p (Yeo et al. 2003). In weiteren „Two-Hybrid“ Tests mit verschiedenen Vta1, Vps20 und Vps4 Deletionsmutanten wurde ermittelt, dass die N-terminale Coiled-Coil Domäne des Vps4p Proteins mit Vps20p, jedoch nicht mit Vta1p interagiert. Der C-terminale Bereich von Vps4p, welcher vermehrt saure Aminosäuren

beinhaltet, interagiert mit beiden Proteinen, stärker jedoch mit Vta1p. Die zentrale Coiled-Coil Domäne von Vps20p, sowie die C-terminale Coiled-Coil Domäne von Vta1p ist für eine Interaktion mit VPS4p notwendig (Yeo et al. 2003).

Durch GST-„Pull Down“ Bindungsassays konnte eine Wechselwirkung beider Proteine mit dem Hefe Vps4p nachgewiesen werden. *Vps20Δ* und *Vta1Δ* Hefemutanten zeigten Defekte im multivesikulären/endosomalen Proteintransport des Hefemembranrezeptors Ste3p (Ste3p-GFP). Dieses Markerprotein wird bei der Endocytose Zellmembran-beständiger Proteine über das MVB in die Vakuole transportiert. Aufgrund der beobachteten Phänotypen der *Vta1Δ* und *Vps20Δ* Nullmutanten wird beiden Proteinen eine wichtige Funktion bei der Reifung des multivesikulären Kompartiments (MVB) zugesprochen.

Für das Hefe Vps20p und das Hefe Vps2p/Chmp2p Protein (ortholog zum identifizierten Säuger VPS4A^{E228Q} Interaktionspartner BC-2), konnte eine direkte Beteiligung bei der ESCRT-Komplexbildung nachgewiesen werden (Katzmann et al. 2002). Die bisher beschriebenen ESCRT-Komplexe I, II und III spielen eine wichtige Rolle im lysosomalen/vakuolären Proteintransport und bei der Bildung/Reifung multivesikulärer Kompartimente (Katzmann et al. 2002). Die an den Komplexen beteiligten Proteine sind zum großen Teil VPS Klasse E Proteine, die sich an endosomalen Kompartimenten wie MVB/PVC konzentrieren (Katzmann et al. 2002). Mittlerweile sind drei ESCRT Komplexe identifiziert, wobei Vps23, Vps28 und Vps37 den ESCRT-I Komplex bilden (Bishop und Woodman 2001; Katzmann et al. 2001). Vps27 und Hse1 binden über das UIM (Ubiquitin interacting motif) am Ubiquitin endocytierter monoubiquitinylierter Proteine und am ESCRT-I. Sie stabilisieren die Ubiquitin-vermittelte Proteinsortierung zum vakuolären/lysosomalen Abbau von Proteinen (Bilodeau et al. 2003). Vps22, Vps25 und Vps36 bilden den ESCRT-II Komplex. Eine direkte Interaktion wurde zwischen Vps22 und Vps20, bzw. Snf7/Vps32 nachgewiesen (Babst et al. 2002). Vps20 und Snf7 binden als Untereinheit des ESCRT-III Komplexes am ESCRT-II. Anschließend lagert sich Vps2 und Vps24 als zweite Untereinheit des ESCRT-III Komplexes an (Babst et al. 2002). Im weiteren Verlauf lagern sich das Bro1 Protein und das Doa4 Protein am ESCRT-III Komplex an. Beide Proteine sind ebenfalls an endosomalen Kompartimenten lokalisiert worden (Amerik et al. 2000; Luhtala und Odorizzi 2004). Das Doa4 Protein benötigt Bro1 zur Anlagerung an den endosomalen Membrankomplexen (Luhtala und Odorizzi 2004). Doa4 entfernt die Ubiquitinmodifikationen an den Proteinen, die im Lysosom bzw. in der Vakuole degradiert werden sollen (Amerik et al. 2000). Im letzten Schritt bindet das ATP-Vps4p-Oligomer (Decamer) am ESCRT-III Komplex über den Vps2-Vps24 Subkomplex und Vps20, jedoch nicht über Snf7 (Babst et al. 2002; Yeo et al. 2003; Fujita et al. 2004; Peck et al. 2004). Neueste Untersuchungen zeigen, dass humanes Snf7 an endosomalen Membranen assoziiert und mit murinem VPS4b/SKD1 colokalisiert ist (Lin et al. 2005). Die ATP-Hydrolyse des Vps4 Proteins führt zur Dissoziation der ESCRT-Komplexe. Anschließend erfolgt der Austausch von ADP→ATP (Katzmann et al. 2002). In Abb. 5.2. ist die ESCRT-Komplexbildung, sowie der Vps4p ADP/ATP Oligomerisierungszyklus am Hefemodell schematisch dargestellt. Aufgrund der Wechselwirkungen mit den VPS4A bzw. VPS4B Protein und aufgrund der subzellulären Lokalisationsergebnisse liegt es nahe, dass die beiden neuen VPS4 Interaktionspartner KIAA1 und FYVE1 ebenfalls im endosomalen VPS4 abhängigen Proteintransport beteiligt sind.

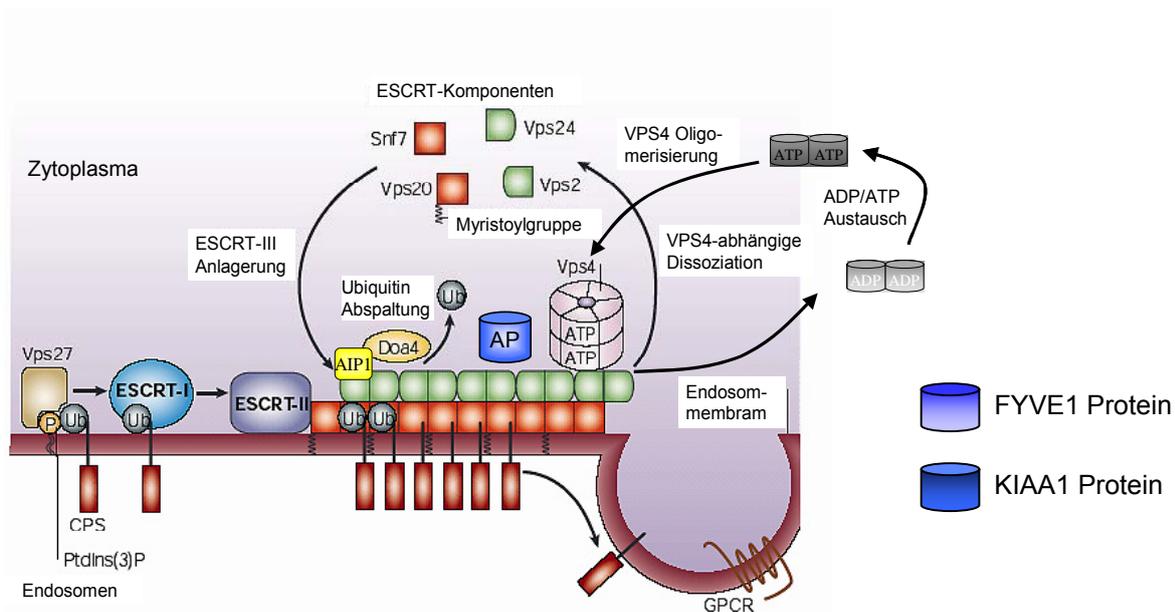


Abb. 5.2.: **Schematische Darstellung der Bildung multivesikulärer Kompartimente in der Hefe.** Im Zuge der PVC/MVB Vesikelbildung entwickeln sich unter Beteiligung der VPS Klasse E Proteine drei sogenannte ESCRT-I, II, III Komplexe (endosomal sorting complex required for transport). Sie binden an der Endosomenmembranoberfläche. Damit verknüpft ist ein Vps4p ADP/ATP Oligomerisierungszyklus. Durch den Austausch von $\text{ADP} \rightarrow \text{ATP}$ kommt es zur Oligomerisierung des Vps4p-ATP Dimeres zum Decamer-Komplex, der am ESCRT-III Komplex bindet. Durch Hydrolyse des ATP kommt es zur Dissoziation der ESCRT Komplexe. Dargestellt sind die zur Zeit in der Hefe und Säugerzellen beteiligten Proteine. Modifiziert nach Katzmann et al. (2002).

Ihre genaue molekulare Funktion ist allerdings aufgrund der zur Verfügung stehenden experimentellen Daten noch nicht eindeutig zu benennen.

Die nachgewiesenen Wechselwirkungen mit den VPS4A/VPS4B Proteinen und die deutliche Colokalisation mit dem Endosom-assoziierten ATPase defizienten VPS4A/VPS4B Protein lassen vermuten, dass das KIAA1 und FYVE1 Protein vielleicht zusammen mit dem VPS4A/VPS4B Protein an der Dissoziation der ESCRT Komplexe beteiligt sind und damit für die Bildung bzw. Reifung von MVBs notwendig sind. Ob beide Proteine dabei gleichzeitig oder nacheinander am VPS4 gebunden werden müssen ist nicht klar. In Abb. 5.2. sind FYVE1 und KIAA1 als Säugerproteine neben der schematischen Darstellung als involvierte Proteine des VPS4A/VPS4B abhängigen endosomal Proteintransportes benannt.

In umfangreichen „Two-Hybrid“ Analysen aller bekannter VPS Klasse E Proteine und bekannter ESCRT-Komplex assoziierter Proteine, wurden mögliche Interaktionen des Hefe Vps4p Proteine untersucht (Bowers et al. 2004). Neben der Wechselwirkung von Vps4p mit Vta1p wurde eine mögliche Wechselwirkung mit Vps46p/Chm1p gefunden. Chm1p ist das Hefeortholog zum humanen CHMP1. Eine Interaktion mit ESCRT Proteinen konnte in diesen „Two-Hybrid“ Experimenten mit Vps32p gezeigt werden (Bowers et al. 2004). Interessanterweise konnte für das orthologe humane VPS32/hSnf7 eine direkte Interaktion mit VPS4b/SKD1 durch Coimmunpräzipitationsanalysen nicht bestätigt werden (Peck et al. 2004). Es wird deshalb vermutet, dass in Säugerzellen weitere assoziierte Proteine zur Bindung von

hSNF7 und zur Bildung der ESCRT-Komplexe notwendig sind (Bowers et al. 2004; Peck et al. 2004).

In der Hefe wurden 4 ESCRT III (assoziierte) Proteine (Vta1p, Vps46p, Vps20p, Vps2p) isoliert, mit denen das Hefe Vps4p interagiert. Warum bei den in dieser Arbeit durchgeführten „Two-Hybrid“ Analysen nur eines dieser vier bekannten Proteine, BC-2/CHMP2/VPS2, als VPS4A/B Interaktionspartner gefunden wurde, kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits war die Suche sicher nicht sättigend, was unter anderem an der unterschiedlichen Zahl der isolierten Interaktionskandidaten von VPS4A^{E228Q} (240) bzw. VPS4B (14) abzulesen ist. Andererseits war die Stringenz (Vierfach-Selektion) bei der „Two-Hybrid“ Suche mit Absicht so hoch gewählt worden, um die Anzahl falsch positiver Interaktionskandidaten möglichst gering zu halten.

In Tabelle 5.3. sind die zur Zeit bekannten VPS4 Interaktionspartner aufgeführt, die über „Two-Hybrid“ Analysen und/oder durch GST-Pull Down bzw. Coimmunpräzipitationsanalysen ermittelt wurden.

Da das genaue Molekulargewicht des ESCRT-III Komplex und dessen genaue Zusammensetzung noch nicht abschließend geklärt ist (Bowers et al. 2004), lässt sich aufgrund der aktuellen Datenlage auch nicht klären, ob die neu identifizierten VPS4A und VPS4B Interaktionspartner KIAA1 und FYVE1 feste Bestandteile des ESCRT-III Komplexes sind, oder ob sie vielleicht zusammen mit dem VPS4A/VPS4B Protein einen Subkomplex bilden. Um zu klären, ob das KIAA1 und das FYVE1 Protein feste Bestandteile des ESCRTIII Komplexes sind oder als assoziierte Proteine zusammen mit VPS4A/B am ESCRTIII Komplex binden, müssen zukünftige biochemische Untersuchungen zeigen. Auch umfangreiche „Two-Hybrid“ Analysen, ähnlich wie sie in der Hefe durch Bowers et al. (2004) durchgeführt worden sind, mit den identifizierten Säugerproteinen der ESCRT-I, II, III Komplexe und KIAA1 bzw. FYVE1 könnten helfen die Zusammenhänge bei Säugerzellen zu klären.

Es konnte gezeigt werden, dass KIAA1 und FYVE1 mit VPS4A und VPS4B an VPS4 spezifischen endosomalen Kompartimenten wechselwirkt. Mittels geeigneter Marker könnten diese Endosomen spezifischer bestimmt werden. Hierfür eignen sich EEA1 (Early Endosom Antigen1) für das frühe Endosom, Rab 4 (Recyclisierendes Endosom), Lysosom-assoziiertes Protein1 (LAMP1) (Lysosom) und Lysobisphosphat (LBPA), welches spezifisch nur in den inneren Vesikeln des MVB nachgewiesen wurde. Von besonderem Interesse wird jedoch sein, welche Konsequenzen ein Funktionsverlust des VPS4A/a, VPS4B/b, KIAA1 oder des FYVE1 Proteins für Säugerzellen hat. RNA Interference (RNAi) Experimente mit kultivierten Säugerzellen würden sich dazu eignen und könnten erste Hinweise liefern.

Um die Konsequenzen eines VPS4b Funktionsverlustes für einen gesamten Organismus (Maus) zu studieren, wurde in der Arbeit die Grundlage für die Generierung einer ATPase defizienten (transgenen) Maus geschaffen. Mittels einer neu modifizierten homologen Rekombination wurde ein VPS4b^{E235Q} Allel generiert, welches transkriptionell aktiv ist.

Organismus	Hefe	Maus	Mensch
VPS4	Vps4p	VPS4b/ SKD1	VPS4A
Interaktionspartner	Vps 20p Vta1 p Vps 2p Vps 46p	VPS2/ CHMP2 / BC-2 CHMP1 SBP1 Maus VPS2	BC-2 Rnd2 KIAA1 KIAA1 FYVE 1 FYVE 1
ESCRT-Komplex	III III (*) III III (*)	III III (*) ? III	III ? ? ? ? ?

Tab. 5.3.: **Übersicht bekannter VPS4 (Säuger)/ VPS4p (Hefe) interagierender Proteine.**

In dieser Tabelle sind alle zur Zeit bekanntesten Interaktionspartner aufgeführt. Die in „Two-Hybrid“ Analysen gefundenen Interaktionen sind z.T. durch unabhängige Experimente (GST-Pull Down oder Coimmunpräzipitationsanalysen) bestätigt. *) ESCRT-III Komplex assoziierte Proteine; ?) Bindung an ESCRT-Komplexen nicht bekannt. Erweitert nach Bowers et al. (2004).

6. Zusammenfassung

Das Hefe Vps4p Protein, als Mitglied der AAA Proteinfamilie, spielt eine Schlüsselrolle im intrazellulären, vakuolären Proteintransport. Es gehört zur Klasse E VPS Proteine, die für alle Proteintransportprozesse wichtig sind, die über das prävakuoläre Kompartiment (PVC) bzw. das multivesikuläre, endosomale Kompartiment (MVB) in Säugerzellen verlaufen. Während in der Hefe nur ein Vps4p Protein nachgewiesen werden konnte, wurden in Säugerzellen zwei paraloge VPS4 Proteine identifiziert, VPS4A und VPS4B beim Menschen, bzw. VPS4a und VPS4b in der Maus. Für das Hefe Vps4p wurden Wechselwirkungen mit Vps20p und Vps2p nachgewiesen, die ebenfalls zu den VPS Klasse E Proteinen zählen. Da weiterhin bekannt ist, dass die beiden paraloge Säuger VPS4 Proteine das Hefe Vps4p funktionell ersetzen können, sollte mit Hilfe genomweiter „Two-Hybrid“ Analysen nach möglichen Interaktionspartnern der humanen VPS4A und VPS4B Proteine gesucht werden. Bei dieser Suche wurden das Wildtyp VPS4B Protein und die ATPase-defiziente Proteinvariante VPS4A^{E228Q} als Ankerproteine eingesetzt. Die Identifizierung von humanem BC2, dem orthologen Hefe Vps2 Protein, als potenziellen Interaktionspartner von VPS4A^{E228Q} und VPS4B, bestätigten einerseits, die für die Hefe beschriebenen Vps2p-Vps4p Interaktion und zeigten andererseits die Funktionalität der „Two-Hybrid“ Suche auf.

Ein Großteil der weiteren identifizierten Kandidaten konnte entweder dem KIAA1 oder FYVE1 Protein zugeordnet werden. In spezifischen „Two-Hybrid“ Tests mit VPS4A, VPS4A^{E228Q}, VPS4B und VPS4B^{E235Q} konnte gezeigt werden, dass das KIAA1 und das FYVE1 Protein sowohl mit Wildtyp VPS4A/B als auch mit den ATPase-defizienten Proteinvarianten VPS4A^{E228Q} und VPS4B^{E235Q} interagieren können.

Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation fluoreszierender KIAA1 und FYVE1 Fusionsproteine fand in HepG2 und HeLa Zellen statt und führte grundsätzlich zu gleichen Ergebnissen. Während die KIAA1 und FYVE1 Proteine normalerweise gleichmäßig verteilt im Cytosol vorlagen, änderte sich dies bei Coexpression von ATPase-defizienten VPS4A^{E228Q}, bzw. VPS4B^{E235Q} Proteinen. Die gleichzeitige Expression der dominant-negativen VPS4A^{E228Q}/VPS4B^{E235Q} Proteine resultierte in einer gravierenden Umverteilung und Rekrutierung der KIAA1 und der FYVE1 Proteine hin zu endosomalen Kompartimenten der Zelle, was an der Colokalisation mit den MVB-assoziierten VPS4^{EQ} Proteinvarianten zu erkennen war. In Coimmunpräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl das KIAA1 als auch das FYVE1 Protein direkt mit dem Wildtyp VPS4A und VPS4B Protein *in vivo* interagieren. Während das FYVE1 Protein nicht nur mit den Wildtyp VPS4A und VPS4B Proteinen, sondern auch mit den dominant-negativen VPS4A^{E228Q} und VPS4B^{E235Q} Proteinvarianten interagiert, wurde für das KIAA1 Protein nur eine deutliche Wechselwirkung mit dem Wildtyp VPS4A und VPS4B nachgewiesen. Zur spezifischen Detektion der endogen exprimierten Proteine VPS4A, KIAA1 und FYVE1 wurden entsprechende Anti-Peptid Antiseren erzeugt, affinitätsgereinigt und für Western Blot Analysen optimiert.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde für tierexperimentelle, funktionelle Untersuchungen ein dominant-negatives VPS4b^{E235Q} Allel auf der Grundlage eines kompletten VPS4b Genlocus enthaltenden P1-Klons generiert. Mittels RT-PCR konnte die transkriptionelle Aktivität des generierten, dominant-negativen VPS4b^{E235Q} Allels in transient transfizierten 3T3 Zellen bestätigt werden.

7. Abkürzungen

°C	Grad Celsius	mRNA	Messenger RNA
μ	Mikro	n	Nano
A	Adenin	NCBI	National Center for Biotechnology Information
Abb.	Abbildung	nxg	nfache Erdbeschleunigung
AAA	<u>A</u> TPases <u>a</u> ssociated with diverse cellular <u>a</u> ctivities	OD	Optische Dichte
ADP	Adenosindiphosphat	ORF	Open-Reading-Frame
Amp	Ampicillin	p	Pico
AS	Aminosäure	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ATP	Adenosintriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
BLAST	Basic local alignment search tool	PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
bp	Basenpaare	PIP	Phosphatidylinositolphosphat
C	Cytosin	PVC	Prävakuoaläres Kompartiment
CC	Coiled-Coil	RNA	Ribonukleinsäure
cDNA	copy DNA	RNAse	Ribonuklease
Da	Dalton	rpm	Rounds per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxy-Nukleotide	RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	s	Sekunde
E235Q	Aminosäureaustasch Glutamat gegen Glutamin in AS-Position235	S.c.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
E228Q	... in AS-Position 228	SDS	Natriumdodecylsulfat
ECL	Enhanced Chemiluminescence	T	Thymin
Fa.	Firma	Tab.	Tabelle
FCS	Fötales Kälberserum	U	Unit
G	Guanin	ü.N.	Über Nacht
g	Gramm	v/v	Volumina pro Volumen
h	Stunde	VPS	Vacular Protein Sorting
HA	Hämagglutinin	w/v	Masse pro Volumen
HRP	Meerrettich-Peroxidase		
IgG	ImmunglobulinG		
k	Kilo		
Kan	Kanamycin		
L	Liter		
LB	Luria-Bertani		
m	Milli		
m	Meter		
min	Minute		
mM	Milli-Molar		
MVB	Multivesikular Body		

8. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). 13. Intracellular Vesicular Traffic. *Molecular Biology of the Cell*. 4.
- Amerik, A. Y., J. Nowak, S. Swaminathan and M. Hochstrasser (2000). "The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways." *Mol Biol Cell* 11(10): 3365-80.
- Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S. D. Emr (2002). "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." *Dev Cell* 3(2): 271-82.
- Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland and S. D. Emr (2002). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." *Dev Cell* 3(2): 283-9.
- Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta and S. D. Emr (1997). "Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p." *Embo J* 16(8): 1820-31.
- Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa and S. D. Emr (1998). "The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function." *Embo J* 17(11): 2982-93.
- Banta, L. M., J. S. Robinson, D. J. Klionsky and S. D. Emr (1988). "Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting." *J Cell Biol* 107(4): 1369-83.
- Bartel, P., C. T. Chien, R. Sternglanz and S. Fields (1993a). "Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions." *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*: 153-179.
- Bartel, P., C. T. Chien, R. Sternglanz and S. Fields (1993b). "Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system." *Biotechniques* 14(6): 920-4.
- Beyer, A. (1997). "Sequence analysis of the AAA protein family." *Protein Sci* 6(10): 2043-58.
- Beyer, A., S. Scheuring, S. Muller, A. Mincheva, P. Lichter and K. Kohrer (2003). "Comparative sequence and expression analyses of four mammalian VPS4 genes." *Gene* 305(1): 47-59.
- Bilodeau, P. S., S. C. Winistorfer, W. R. Kearney, A. D. Robertson and R. C. Piper (2003). "Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome." *J Cell Biol* 163(2): 237-43.
- Biorad, F. "Amido Black Staining." *Bulletin_9130*: 1.
- Bishop, N. and P. Woodman (2000). "ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking." *Mol Biol Cell* 11(1): 227-39.
- Bishop, N. and P. Woodman (2001). "TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes." *J Biol Chem* 276(15): 11735-42.
- Bjerrum, O. J. and C. Schafer-Nielsen (1986). "Buffer systems and transfer parameters for semi-dry electroblotting with horizontal apparatus." *Dunn Electrophoresis*: 315-327.
- Bowers, K., J. Lottridge, S. B. Helliwell, L. M. Goldthwaite, J. P. Luzio and T. H. Stevens (2004). "Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Traffic* 5(3): 194-210.
- Bryant, N. J. and T. H. Stevens (1998). "Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1): 230-47.
- Burda, P., S. M. Padilla, S. Sarkar and S. D. Emr (2002). "Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase." *J Cell Sci* 115(Pt 20): 3889-900.

- Cavalli, V., M. Corti and J. Gruenberg (2001). "Endocytosis and signaling cascades: a close encounter." *FEBS Lett* 498(2-3): 190-6.
- de Melker, A. A., G. van der Horst and J. Borst (2004). "Ubiquitin ligase activity of c-Cbl guides the EGF receptor into clathrin-coated pits by two distinct modes of Eps15 recruitment." *J Biol Chem*.
- Di Fiore, P. P. and G. N. Gill (1999). "Endocytosis and mitogenic signaling." *Curr Opin Cell Biol* 11(4): 483-8.
- Dohmen, R. J., R. Stappen, J. P. McGrath, H. Forrova, J. Kolarov, A. Goffeau and A. Varshavsky (1995). "An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme." *J Biol Chem* 270(30): 18099-109.
- Finken-Eigen, M., R. A. Rohricht and K. Kohrer (1997). "The VPS4 gene is involved in protein transport out of a yeast pre-vacuolar endosome-like compartment." *Curr Genet* 31(6): 469-80.
- Fujita, H., Y. Umezaki, K. Imamura, D. Ishikawa, S. Uchimura, A. Nara, T. Yoshimori, Y. Hayashizaki, J. Kawai, K. Ishidoh, Y. Tanaka and M. Himeno (2004). "Mammalian class E Vps proteins, SBP1 and mVps2/CHMP2A, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4B." *J Cell Sci* 117(Pt 14): 2997-3009.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton and H. Stenmark (2000). "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells." *Embo J* 19(17): 4577-88.
- Gillooly, D. J., A. Simonsen and H. Stenmark (2001). "Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins." *Biochem J* 355(Pt 2): 249-58.
- Gruenberg, J. (2003). "Lipids in endocytic membrane transport and sorting." *Curr Opin Cell Biol* 15(4): 382-8.
- Hansen, P. J. (2000). "Use of a Hemacytometer." www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacytometer.htm.
- Haugh, J. M. (2002). "Localization of receptor-mediated signal transduction pathways: the inside story." *Mol Intervent* 2(5): 292-307.
- Horazdovsky, B. F., G. R. Busch and S. D. Emr (1994). "VPS21 encodes a rab5-like GTP binding protein that is required for the sorting of yeast vacuolar proteins." *Embo J* 13(6): 1297-309.
- Horazdovsky, B. F., D. B. DeWald and S. D. Emr (1995). "Protein transport to the yeast vacuole." *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 544-51.
- Howard, T. L., D. R. Stauffer, C. R. Degrin and S. M. Hollenberg (2001). "CHMP1 functions as a member of a newly defined family of vesicle trafficking proteins." *J Cell Sci* 114(Pt 13): 2395-404.
- Ikonomov, O. C., D. Sbrissa, T. Yoshimori, T. L. Cover and A. Shisheva (2002). "PIKfyve Kinase and SKD1 AAA ATPase define distinct endocytic compartments. Only PIKfyve expression inhibits the cell-vacuolating activity of Helicobacter pylori VacA toxin." *J Biol Chem* 277(48): 46785-90.
- James, P., J. Halladay and E. A. Craig (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." *Genetics* 144(4): 1425-36.
- Kang, D., Y. S. Gho, M. Suh and C. Kang (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Bulletin of Korean Chemistry Society* 23(11): 1511-1512.
- Karnoub, A. E., M. Symons, S. L. Campbell and C. J. Der (2004). "Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity." *Breast Cancer Res Treat* 84(1): 61-71.
- Katzmann, D. J., M. Babst and S. D. Emr (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." *Cell* 106(2): 145-55.

- Katzmann, D. J., G. Odorizzi and S. D. Emr (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12): 893-905.
- Keesee, S. K., R. Obar and Y.-J. Wu (1999). "Materials and methods for detection of breast cancer." US Patent 5,914,238.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Lemmon, S. K. and L. M. Traub (2000). "Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells." *Curr Opin Cell Biol* 12(4): 457-66.
- Lin, Y., L. A. Kimpler, T. V. Naismith, J. M. Lauer and P. I. Hanson (2005). "Interaction of the mammalian ESCRT-III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1." *J Biol Chem*.
- Luhtala, N. and G. Odorizzi (2004). "Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes." *J Cell Biol* 166(5): 717-29.
- Luzio, J. P., B. M. Mullock, P. R. Pryor, M. R. Lindsay, D. E. James and R. C. Piper (2001). "Relationship between endosomes and lysosomes." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 4): 476-80.
- Luzio, J. P., B. A. Rous, N. A. Bright, P. R. Pryor, B. M. Mullock and R. C. Piper (2000). "Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis." *J Cell Sci* 113 (Pt 9): 1515-24.
- Meyer, T. S. and B. L. Lamberts (1965). "Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips." *Biochim Biophys Acta* 107(1): 144-5.
- Mulholland, J., J. Konopka, B. Singer-Kruger, M. Zerial and D. Botstein (1999). "Visualization of receptor-mediated endocytosis in yeast." *Mol Biol Cell* 10(3): 799-817.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-50.
- Munn, A. L. (2000). "The yeast endocytic membrane transport system." *Microsc Res Tech* 51(6): 547-62.
- Munn, A. L. and H. Riezman (1994). "Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes." *J Cell Biol* 127(2): 373-86.
- Muyrers, J. P., Y. Zhang, V. Benes, G. Testa, W. Ansorge and A. F. Stewart (2000). "Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination." *EMBO Rep* 1(3): 239-43.
- Näveke, R. and K. P. Tepper (1979). "Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden." Gustav Fischer Verl.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge and E. V. Koonin (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." *Genome Res* 9(1): 27-43.
- Odorizzi, G., M. Babst and S. D. Emr (1998). "Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body." *Cell* 95(6): 847-58.
- Ogura, T. and A. J. Wilkinson (2001). "AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function." *Genes Cells* 6(7): 575-97.
- Overduin, M., M. L. Cheever and T. G. Kutateladze (2001). "Signaling with phosphoinositides: better than binary." *Mol Interv* 1(3): 150-9.
- Patel, S. and M. Latterich (1998). "The AAA team: related ATPases with diverse functions." *Trends Cell Biol* 8(2): 65-71.
- Peck, J. W., E. T. Bowden and P. D. Burbelo (2004). "Structure and function of human Vps20 and Snf7 proteins." *Biochem J* 377(Pt 3): 693-700.
- Peterson, M. R. and S. D. Emr (2001). "The class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway." *Traffic* 2(7): 476-86.

- Piper, R. C. and J. P. Luzio (2001). "Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies." *Traffic* 2(9): 612-21.
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, C. A. Vater and T. H. Stevens (1992). "Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants." *Mol Biol Cell* 3(12): 1389-402.
- Rieder, S. E., L. M. Banta, K. Kohrer, J. M. McCaffery and S. D. Emr (1996). "Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant." *Mol Biol Cell* 7(6): 985-99.
- Rybalkin, S. D., I. G. Rybalkina, R. Feil, F. Hofmann and J. A. Beavo (2002). "Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells." *J Biol Chem* 277(5): 3310-7.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-91.
- Sbrissa, D., O. C. Ikononov and A. Shisheva (1999). "PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin." *J Biol Chem* 274(31): 21589-97.
- Scheuring, S., R. A. Rohricht, B. Schoning-Burkhardt, A. Beyer, S. Muller, H. F. Abts and K. Kohrer (2001). "Mammalian cells express two VPS4 proteins both of which are involved in intracellular protein trafficking." *J Mol Biol* 312(3): 469-80.
- Shaw, J. D., K. B. Cummings, G. Huyer, S. Michaelis and B. Wendland (2001). "Yeast as a model system for studying endocytosis." *Exp Cell Res* 271(1): 1-9.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 122(1): 19-27.
- Simonsen, A. and H. Stenmark (2001). "PX domains: attracted by phosphoinositides." *Nat Cell Biol* 3(8): E179-82.
- Stack, J. H. and S. D. Emr (1994). "Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities." *J Biol Chem* 269(50): 31552-62.
- Stack, J. H., B. Horazdovsky and S. D. Emr (1995). "Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins." *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 1-33.
- Stenmark, H. and R. Aasland (1999). "FYVE-finger proteins--effectors of an inositol lipid." *J Cell Sci* 112 (Pt 23): 4175-83.
- Storrie, B. and M. Desjardins (1996). "The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process?" *Bioessays* 18(11): 895-903.
- Tanaka, H., H. Fujita, H. Katoh, K. Mori and M. Negishi (2002). "Vps4-A is a binding partner for a novel Rho family GTPase, Rnd2." *Biochem J Pt*.
- Yeo, S. C., L. Xu, J. Ren, V. J. Boulton, M. D. Wagle, C. Liu, G. Ren, P. Wong, R. Zahn, P. Sasajala, H. Yang, R. C. Piper and A. L. Munn (2003). "Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* 116(Pt 19): 3957-70.
- Yoshimori, T., F. Yamagata, A. Yamamoto, N. Mizushima, Y. Kabeya, A. Nara, I. Miwako, M. Ohashi, M. Ohsumi and Y. Ohsumi (2000). "The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells." *Mol Biol Cell* 11(2): 747-63.
- Zahn, R., B. J. Stevenson, S. Schröder-Köhne, B. Zanolari, H. Riezman and A. L. Munn (2001). "End13p/Vps4p is required for efficient transport from early to late endosomes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Cell Science* 114: 1935-1947.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Karl Köhrer für die Überlassung des interessanten Themas, für die gute Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und partnerschaftliche Unterstützung über den ganzen Zeitraum meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Hegemann für seine Unterstützung zum Anfertigen dieser Arbeit.

Natürlich gilt ein großer Dank den Mitarbeitern im Molekularbiologischen Zentrallabor des BMFZ's. Insbesondere Sibylle Müller. Ihre Hilfsbereitschaft war mir immer sehr willkommen. Dr. Sibylle Scheuring und ihren Mitarbeitern danke ich für die vielen Sequenzierungen und ihr für die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Maria Kokozidou danke ich für die Einarbeitung am LSM, Herrn Dr. V. Stoldt für die Benutzung des Laserscanning Mikroskops.

Danken möchte ich meiner „zweiten“ Familie, die mich in Düsseldorf so herzlich aufgenommen hat.

Ganz besonderen Dank gilt meinen Eltern, ohne die mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen wären. Vielen Dank für Eure Unterstützung, sowohl in materieller als auch in ideeller Weise.